

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS  
U. N. A. M.

---

**DETERMINACION**  
*de* **PROPERDINA**  
*En Algunas*  
**PREPARACIONES**

**TESIS**  
que para obtener el título de  
**QUIMICO**  
presenta  
**ARCELIA RAMIREZ LLAMAS**

1958



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DETERMINACION**  
*de* **PROPERDINA**  
*En Algunas*  
**PREPARACIONES**

**TESIS**  
que para obtener el título de  
**QUIMICO**  
presenta  
**ARCELIA RAMIREZ LLAMAS**

Hago constar mi agradecimiento a los Laboratorios Dr. Zapata, S. A. y en particular al Q. B. P. Federico F. Gavarrón por sus atinados consejos. Al Dr. Ricardo Mancera y al Hospital de Nutrición por su cooperación en el desarrollo de este trabajo.

Al Químico José I. Bolívar director de esta tesis y a los profesores de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas.

## **C O N T E N I D O**

**CAPITULO I. INTRODUCCION**

**CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS**

**CAPITULO III. RESULTADOS**

**CAPITULO IV. DISCUSION**

**CAPITULO V. CONCLUSIONES**

**CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA**

## CAPITULO I

## INTRODUCCION

En 1900 von Dungern notó que por la adición de células de levadura al suero humano se inactivaba el complemento. Coca, en 1914, demostró que la inactivación era debida a la destrucción o eliminación de una fracción del complemento llamada tercer componente (C3); otros dos componentes del complemento habían sido descubiertos previamente. Whitehead, Gordon y Wormald (31) supusieron que el polvo de levadura se combinaba con el C3, ya fuerza física o químicamente. Posteriormente Pillemer y Ecker encontraron que un residuo purificado de la pared celular de la levadura, insoluble en agua, inactivaba específicamente el C3 del complemento (17).

Anteriormente se pensó que el zimosán inactivaba el C3 directa e independientemente, pero por estudios posteriores se demostró que presenta un mecanismo más complejo.

De los resultados obtenidos por Pillemer y colaboradores (14, 16) se desprende que la inactivación del C3 por la adición de zimosán al suero humano es de naturaleza estequiométrica y depende de un número de factores determinados. Se encontró que el zimosán era más efectivo a 37°, a un pH de 6.8 a 8.0 y a una fuerza iónica de 0.15 o menor. No inactivaba el C3 a temperaturas menores de 15°. Su acción era inhibida a una fuerza iónica de 0.2 o mayor. Esta dependencia de la temperatura, fuerza iónica y pH no es común en los fenómenos de adsorción, pero generalmente se encuentra en las reacciones enzimáticas y en las de inmunólisis.

También se demostró que era necesaria la presencia de los iones magnesio. Los cationes metálicos toman parte en muchas reacciones enzimáticas y el efecto de los iones magnesio sugiere que puede ser un activador del complemento. Se ha demostrado que tratando el suero con resinas de intercambio iónico se inhibe la acción del zimosán sobre el C3. Pero la adición de iones magnesio a los sueros tratados con resinas permite la inactivación completa y específica del C3 por el zimosán. Se probaron otros cationes pero no fueron efectivos, de

la adición de complemento, o de aquellos componentes del complemento que se destruyeron al ser tratado el suero por los diferentes procedimientos, se restablece la actividad del sistema.

El segundo paso consiste en la inactivación del C3 por el complejo PZ, y se efectúa a temperaturas superiores a 20°; requiere la presencia de los iones magnesio y también parece necesaria la presencia del C1 o un factor semejante a este componente del complemento (9, 10, 13, 12, 20).

La properdina humana es una globulina con un peso molecular cuando menos ocho veces mayor que el de la gamma globulina, con un punto isoeléctrico entre pH 5.5 y 5.8; contiene lípidos, carbohidratos y fósforo. Se calcula que representa del 0.02 al 0.03 por ciento del total de las proteínas del suero. Una unidad de properdina no representa más de 0.5% de nitrógeno proteico.

La properdina purificada tiene una constante de sedimentación de 24 a 30 S. Permaneciendo a 1° la molécula de la properdina se disocia en una variedad de moléculas con constantes de sedimentación de 18, 12, 9, 6 y 3 S. Cuando las moléculas llegan a tener un constante de sedimentación de 3 S la properdina pierde su actividad. Una preparación de properdina que al principio contenía 1,000 unidades de properdina por ml, se disocia enteramente en unidades de 3 S después de permanecer durante dos meses a 1°. La properdina puede ser inactivada por huellas de detergentes, jabones y pH menores de 5.2; también es perjudicial la saturación con anhídrido carbónico.

La properdina purificada no contiene componentes del complemento, ni sustancias relacionadas con la coagulación de la sangre.

La properdina, en el suero, es estable a 43°; pierde su actividad lentamente a 50° y se inactiva por completo, en 30 minutos, a 56°. La properdina purificada es más estable, puesto que se inactiva por completo, en 30 minutos, a 60° y rápidamente a 100°.

La properdina en el suero no se destruye con hidrazina o tripsina, o por eliminación de cationes divalentes. No se inactiva, ni es separada del suero por agregados antígeno-anticuerpo (13, 14).

La properdina se encuentra en el suero humano y en el de algunos mamíferos. En unión del complemento y de los iones magnesio, participa en la destrucción de algunas bacterias (14, 27, 28), protozoarios (1, 4), glóbulos rojos anormales (3, 6, 14) y en la inactivación

modo que los iones magnesio parecen ser un factor necesario para la inactivación del C3, por lo que se supone que un fenómeno catalítico puede tener lugar en la inactivación del C3 por el zimosán (11, 16).

Cuando se estudió la reacción del zimosán con el suero a 17°, se tornó aparentemente más complejo este sistema, pues a esta temperatura, el zimosán no inactivaba al C3 ni a ningún otro componente. Sin embargo, después de eliminar el zimosán por centrifugación se obtenía un suero alterado, pues volviendo a incubar este suero con nuevo zimosán a 37° no se inactivaba el C3.

El zimosán a 17° se combina con un factor llamado properidina (P) y forma un complejo insoluble (PZ) que es el causante de la inactivación del C3 a 37° pero no a 17°. En un suero deficiente en properidina (RP), el C3 no se altera por el tratamiento con zimosán a 37°; pero sí se altera, si se le añade properidina y zimosán y se incuba a 37°. En la diferencia del comportamiento del RP (suero deficiente en properidina) y el suero normal, está basada la determinación de la properidina.

El complejo PZ se disocia en sus componentes, properidina-zimosán, en un medio de fuerza iónica elevada. En la formación y disociación del complejo PZ se basa el método para la obtención de la properidina (14).

La inactivación del C3 por el zimosán ocurre en dos pasos. En el primer paso se combina la properidina con el zimosán estequiométricamente, para formar el complejo PZ. Esta reacción se efectúa muy lentamente a 1°, pero a 15° se lleva a cabo rápidamente. El pH óptimo es cercano a 7. Para la formación del complejo PZ también se requiere la presencia de los factores que se asemejan a los componentes C1 y C1 del complemento y que son probablemente idénticos a ellos, y los iones magnesio (13). La variedad de condiciones que se conocen para fijar o para destruir el complemento también evitan la formación del PZ. El complejo PZ no se forma cuando se añade zimosán a las fracciones de suero deficientes en C1 o C1, o a sueros que han sido previamente tratados con agregados antígeno-anticuerpo, o con tripsina, o con resinas de intercambio iónico; en estos últimos, el factor necesario parece ser el magnesio, puesto que la adición de este en una concentración de  $5 \times 10^{-3} M$ , restablece las condiciones necesarias para la actuación del sistema. En los ensayos anteriores, por

la adición de complemento, o de aquellos componentes del complemento que se destruyeron al ser tratado el suero por los diferentes procedimientos, se restablece la actividad del sistema.

El segundo paso consiste en la inactivación del C3 por el complejo IZ, y se efectúa a temperaturas superiores a 20°; requiere la presencia de los iones magnesio y también parece necesaria la presencia del C1 o un factor semejante a este componente del complemento (9, 10, 13, 18, 20).

La properdina humana es una globulina con un peso molecular cuando menos ocho veces mayor que el de la gamma globulina, con un punto isoeléctrico entre pH 5.5 y 5.8; contiene lípidos, carbohidratos y fósforo. Se calcula que representa del 0.02 al 0.03 por ciento del total de las proteínas del suero. Una unidad de properdina no<sup>2</sup> representa más de 0.5% de nitrógeno proteico.

La properdina purificada tiene una constante de sedimentación de 24 a 30 S. Permaneciendo a 1. La molécula de la properdina se disocia en una variedad de moléculas con constantes de sedimentación de 18, 12, 9, 6 y 3 S. Cuando las moléculas llegan a tener un constante de sedimentación de 3 S la properdina pierde su actividad. Una preparación de properdina que al principio contenía 1,000 unidades de properdina por ml, se disocia enteramente en unidades de 3 S después de permanecer durante dos meses a 1°. La properdina puede ser inactivada por huellas de detergentes, jabones y pH menores de 5.2; también es perjudicial la saturación con anhídrido carbónico.

La properdina purificada no contiene componentes del complemento, ni sustancias relacionadas con la coagulación de la sangre.

La properdina, en el suero, es estable a 48°; pierde su actividad lentamente a 50° y se inactiva por completo, en 30 minutos, a 56°. La properdina purificada es más estable, puesto que se inactiva por completo, en 30 minutos, a 66° y rápidamente a 100°.

La properdina en el suero no se destruye con hidrazina o tripolina, o por eliminación de cationes divalentes. No se inactiva, ni es separada del suero por agregados antígeno-anticuerpo (13, 14).

La properdina se encuentra en el suero humano y en el de algunos mamíferos. En unión del complemento y de los iones magnesio, participa en la destrucción de algunas bacterias (14, 27, 28), protozoarios (1, 4), glóbulos rojos anormales (5, 6, 14) y en la inactivación

de algunos virus (3, 14, 30). Estas actividades diversas del sistema de la properdina, su presencia en el suero normal, la diferencia de lo anticuerpos y la relación que parece existir entre los niveles de properdina y la resistencia o susceptibilidad de los animales del laboratorio a la infección (8, 12, 23), shock (2) e irradiación (21, 24), sugieren que el sistema de la properdina es uno de los factores responsables de la inmunidad natural.

La properdina difiere de los anticuerpos en muchos aspectos:

1.—Se combina con diversas sustancias, mientras que los anticuerpos son específicos.

2.—Se encuentra presente, tanto en el suero normal, como en el suero de ratas libres de gérmenes; los anticuerpos aparecen en el suero como respuesta a los antígenos.

3.—La properdina se encuentra en la fracción III-I de Cohn, mientras que los anticuerpos se encuentran generalmente en la fracción II, aunque también se pueden encontrar en la fracción III.

4.—Para la combinación de la properdina con varios agentes, es necesaria la presencia de los componentes del complemento, y de los iones magnesio; en cambio, estos factores no son necesarios para la unión del antígeno con el anticuerpo.

5.—El complejo properdina aminoácido (PZ) y otros complejos de properdina con polisacáridos, inactivan el C3 específicamente, mientras que los complejos antígeno anticuerpo inactivan el C1, C2 y C4 y no tienen ningún efecto sobre el C3 (13, 14).

Desde hace mucho tiempo se ha observado que el suero normal humano y el de algunos otros mamíferos tienen poder bactericida, fundamentalmente contra bacterias gram negativas. Esta acción bactericida se ha atribuido a diferentes sustancias que se encuentran presentes en el suero.

Pillemer (15) demostró la gran importancia que tiene el sistema de la properdina en relación con el poder bactericida de la sangre, comparando el número de bacterias viables de una suspensión de *Shigella dysenteriae* puesta en presencia de suero normal y de suero deficiente en properdina (RP), encontrando como resultado que el RP carece casi de poder bactericida, mientras que el suero normal con-

tiene toda la actividad original. El poder bactericida del RP se restablece por la adición de properdina purificada, en las concentraciones que normalmente se encuentra en el suero. Estas experiencias pusieron de relieve la aparente importancia del sistema de la properdina en la resistencia a algunas enfermedades. Esta posibilidad se vio reforzada por el hecho de que la inyección de zimosán a ratas naturalmente resistentes a una cepa de *Escherichia coli* las hacía muy susceptibles a esta infección después de una hora de haberlas inyectado, pero transcurridos 2 a 5 días después de la inyección, las ratas se volvían muy resistentes aun a cepas de *Escherichia coli* muy virulentas para las ratas normales. Estos cambios en la resistencia a la infección son semejantes a los observados en los niveles de properdina, puesto que una hora después de la inyección de zimosán sufren una disminución muy notable, mientras que después de 2 a 5 días se produce un aumento de properdina por encima del nivel normal (14, 20, 25, 28).

Se ha demostrado también que muchos polisacáridos de gran peso molecular y muy ramificados, o compuestos polisacáridos de origen microbiano o de tejidos de mamíferos, forman complejos con la properdina *in vitro* y alteran los niveles de la properdina *in vivo*. Entre estos polisacáridos se incluyen los derivados de paredes celulares de bacterias, endotoxinas y lipopolisacáridos, algunas dextranas y levanas de filtrados bacterianos y polisacáridos, lipopolisacáridos y mucinas de tejidos de mamíferos. Los lipopolisacáridos derivados de las bacterias han sido los agentes más potentes para elevar el título de la properdina *in vivo*. Los niveles de properdina en el suero son el resultado de una estimulación o depresión de la properdina por productos tanto bacterianos como del huésped. Una elevación en el título de properdina puede ser debida a la liberación de pequeñas cantidades de estos productos, mientras que la caída en el título de la properdina va acompañada de una liberación de grandes cantidades de estas sustancias (8, 13, 21, 27, 28).

Es de interés especial el hecho de que mientras los cuatro componentes del complemento, los iones magnesio y la properdina son necesarios para las actividades bactericida, hemolítica y de neutralización de virus, contra las células o virus sensibles a la properdina, solamente los componentes C1 y C4 del complemento y los iones mag-

nesio son necesarios para que se forme el complejo de la properdina con las paredes celulares de las bacterias, así como del zimosán (13).

Dubos y Scharfetter observaron un aumento en la resistencia a las infecciones producidas por bacterias gram positivas después de la administración de lipopolisacáridos, pero como estas bacterias no son susceptibles al sistema de la properdina *in vitro*, se cree que se estimulan otras defensas del organismo por la inyección de lipopolisacáridos, además del sistema de la properdina, lo que da por resultado que aumente la resistencia del huésped (*cf.* 29).

Diversos investigadores han demostrado que los virus del Newcastle, de la influenza A y B y el de la parotiditis son inhibidos por un factor termolábil presente en el suero normal. Se ha probado que este factor es distinto del complemento y, debido a sus características de necesitar la presencia de los iones calcio y magnesio y del complemento y por ser separado del suero por tratamiento con zimosán a 17°, se ha identificado con la properdina (3, 14, 29).

Se ha demostrado que la irradiación total del cuerpo de las ratas tiene como consecuencia una bacteremia aguda que termina con la muerte del animal. Los estudios de los niveles de properdina en estos animales han demostrado ser mucho menores que los normales y que se pierde simultáneamente la actividad antibacteriana y neutralizante de virus. La inyección a estos animales irradiados de la fracción III de Cohn o de properdina purificada en los niveles que normalmente se encuentra en el suero, protege a los animales a la infección (13, 14, 24).

La hemoglobinuria paroxística nocturna es una enfermedad que se caracteriza porque los eritrocitos del paciente son lisados, tanto *in vitro* como *in vivo*, por su propio suero o por el suero de donadores compatibles. Como se ha encontrado hemolisinas o anticuerpos contra los glóbulos rojos característicos de esta enfermedad, se ha pensado que este fenómeno es debido a un defecto de los propios glóbulos rojos. Las características y los factores necesarios para la hemólisis de estas células indican que el sistema de la properdina es el responsable de esta hemólisis (14).

## CAPITULO II

## MATERIALES Y METODOS

El método seguido para la determinación de la properdina está basado en la inactivación del C3 del complemento por medio del zimosán y de la properdina (15).

### *Nomenclatura*

- P — Properdina
- RP — Suero deficiente en Properdina
- Z — Zimosán
- PZ — Complejo Properdina Zimosán
- C — Complemento
- C1 — Primer componente del complemento
- C2 — Segundo componente del complemento
- C3 — Tercer componente del complemento
- C4 — Cuarto componente del complemento
- R1 — Suero deficiente en C1
- R2 — Suero deficiente en C2
- R3 — Suero deficiente en C3
- R4 — Suero deficiente en C4

*Suero Humano.*—La sangre obtenida de donadores humanos se deja a temperatura ambiente durante 2 horas, se desprende el coágulo y se deja la sangre toda la noche a 2°. El suero se separa por centrifugación a 2° durante 30 min a 4,000 rpm y se recentrifuga bajo las mismas condiciones para eliminar cualquier residuo de glóbulos rojos. Si el suero se va a usar dentro de un periodo de 8 h se guarda a 4°, o si se requiere para usos posteriores se conserva a -70°.

*Titulación del Complemento Humano.*—Una unidad de complemento es la mínima cantidad de suero necesario para producir hemólisis completa de 1 ml de una dilución determinada de glóbulos rojos

de cordero sensibilizados en un volumen final de 1.5 ml, después de incubarse 30 min a 37°.

Los sueros normales dan valores de 2.5 a 7.5 unidades por ml de suero, con un valor medio, más o menos, de 40 unidades por ml de suero.

La titulación del complemento se lleva a cabo como sigue: Se colocan cantidades variables, desde 0.001 hasta 0.3 ml de una dilución 1:5 de suero humano en tubos para pruebas serológicas; con amortiguador de barbital se completa el volumen a 0.5 ml en cada tubo y, después, se añade 1 ml de una suspensión de glóbulos rojos de cordero sensibilizados. Se agitan los tubos y se incuban 30 min en un baño maría a 37°. La menor cantidad de suero que muestra hemólisis completa se considera como una unidad de complemento.

#### *Amortiguador de Barbital*

85.0 g NaCl

5.75 g ácido 5,5-dietilbarbitúrico

3.75 g 5,5-dietilbarbiturato de sodio

5.0 ml *M* MgCl<sub>2</sub>

1.5 ml *M* CaCl<sub>2</sub>

Las sustancias anteriores se disuelven en 1,500 ml de agua destilada caliente. La solución se enfría y se completa a un volumen de 2 l con agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4, ya sea con ácido dietilbarbitúrico o con sosa.

Esta solución amortiguadora concentrada se guarda a 1°. Para su uso, se diluye una parte de este amortiguador con cuatro partes de agua destilada. El amortiguador diluido se prepara antes de usarse y se desecha después de 12 h de preparado.

*Glóbulos Rojos de Cordero Sensibilizados.* La sangre fresca de cordero se colecta en un volumen igual de solución de Alvert y se mantiene a 1°. La sangre se guarda 4 días antes de usarse y se desecha 10 días después.

Los glóbulos rojos de cordero sensibilizados se preparan diariamente como sigue:

Las células se lavan 2 veces con 10 volúmenes de una solución 0.15 M de NaCl y después, una vez, con 10 volúmenes de amortiguador de barbital. Se prepara una suspensión al 2 por ciento de glóbulos rojos en amortiguador de barbital. Un mililitro de esa suspensión se hemoliza por la adición de 24 ml de agua destilada. La concentración de hemoglobina de los glóbulos rojos hemolizados se determina con un espectrofotómetro a 550 m $\mu$  con un filtro violeta, usando como testigo agua destilada. La suspensión de glóbulos rojos se diluye con amortiguador de barbital para obtener una concentración de  $5 \times 10^8$  células por mililitro, tomando como referencia una curva que relacione el número de células con la densidad óptica. Un volumen igual de amortiguador de barbital, conteniendo 4 unidades de hemolisina por mililitro, se añade rápidamente, agitando la suspensión de glóbulos rojos.

Los glóbulos rojos sensibilizados se desechan después de un período de 12 h de preparados.

#### *Soluciones de Abscer*

2.05 g glucosa  
0.8 g citrato de sodio  
0.42 g NaCl

Las sustancias anteriores se disuelven en agua destilada y se completa el volumen a 100 ml. Se ajusta el pH a 6.1 con ácido cítrico (17).

*Hemolisina contra Cordero.*— Se aplican a un conejo 5 ó 6 inyecciones intravenosas, de 5 ml cada una, de una suspensión al 10 por ciento de glóbulos rojos de cordero, lavados tres veces, en una solución 0.15 M de NaCl. Las inyecciones se ponen con intervalos de 5 días. Se sangra el conejo de 7 a 9 días después de la última inyección. Si la titulación previa es satisfactoria, se separa el suero y se preserva con una parte igual de glicerina neutra, conservándose en el refrigerador.

*Titulación del C/3.*— Una unidad de C/3 es la cantidad que en presencia de dos unidades de R3 (generalmente 0.05 ml) y 1 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados, llevando esto a un volumen

final de 1.5 ml, con amortiguador de barbital, e incubando 30 min a 37°, da el 50 por ciento de hemólisis. Por ejemplo: si 0.2 ml de muestra diluida 1:24 da el 50 por ciento de hemólisis, bajo las condiciones anteriores, la concentración de C3 es de 24/0.2 igual a 120 unidades por ml.

La titulación se lleva a cabo como sigue:

Se coloca una serie de tubos de 12 x 75 mm en baño de hielo y a cada tubo se le pone 0.2 ml de diferentes diluciones de la muestra por titular y se añade una cantidad constante de R3 y 1 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados. Los tubos se agitan y se incuban en un baño maría a 37° durante 30 min, después se centrifuga a 2,000 rpm 5 min y se compara visualmente con un tipo equivalente al 50 por ciento de hemólisis.

*Zimosán* (17). Es un polvo fino ligeramente gris, insoluble en agua pero se dispersa fácilmente en ésta, para dar una suspensión homogénea. Es un derivado de la pared celular de la levadura. Está compuesto principalmente de carbohidratos, como polímeros de la glucosa y, además, contiene pequeñas cantidades de nitrógeno, fósforo y magnesio. Es posible eliminar la mayor parte del nitrógeno y del complejo magnesio-fósforo sin destruir las propiedades inmunológicas del zimosán (15).

El zimosán tiene la propiedad de inactivar selectivamente el C3 cuando se añade al suero humano y se incuba a 37°; de formar un complejo con la properidina en presencia del complemento y de los iones magnesio a 17°, y de formar R3 y RP a partir del suero, los que se usan como reactivos en la determinación de la properidina por medio del zimosán. No todas las preparaciones de la pared celular de la levadura llenan estos requisitos.

#### *Preparación del Zimosán*

1.—Se suspende un kilogramo de levadura en 4 l de 0.5 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se hierve 3 h.

2.—Se enfría a 37° y se le añaden 0.5 g de tripsina (Wilson 1:250) el primero, tercero, sexto y décimo días y 2.5 ml de tolueno el tercero, séptimo, undécimo y décimoquinto días de incubación. Se

incuba 16 días a 37°, se agita ocasionalmente y se ajusta diariamente el pH a 7.8 — 8.0.

3.—Se centrifuga y el sobrenadante se desecha.

4.—Se suspende el precipitado en 4 l de agua de la llave a temperatura ambiente. Se agita fuertemente durante una hora y se centrifuga como en el paso 3.

5.—Se suspende el precipitado en 4 l de agua de la llave, hirviendo y agitando vigorosamente. Se agita durante una hora a 92°. Se centrifuga aún caliente, como en el paso 3. Se repite este paso una vez más.

6.—Se suspende el precipitado en 4 l de agua destilada, hirviendo y agitando vigorosamente. Se trata y se centrifuga como en el paso 5. Se repite este paso una vez más. El sobrenadante no debe contener carbohidratos solubles. Si los contiene se repite el lavado.

7.—El precipitado del paso 6 se añade rápidamente con agitación vigorosa a:

a) 8 l de alcohol etílico absoluto, se agita por una hora y se centrifuga.

b) El precipitado se añade a 4 l de alcohol etílico absoluto y se trata como en el paso (a).

c) El residuo se seca en vacío.

d) El polvo se refluja durante 3 h con 500 ml de alcohol etílico absoluto.

e) Se centrifuga y se seca inmediatamente en vacío. Se conserva guardado en vacío. El rendimiento es de 1 a 2 por ciento.

Se tiene gran cuidado en evitar contaminaciones durante el proceso, para permitir una digestión triptica completa de las proteínas de la levadura y para eliminar todos los carbohidratos solubles por medio de los lavados. La mayoría de las dificultades se presentan durante el tratamiento con alcohol etílico. Es indispensable usar alcohol etílico absoluto. Cuando la deshidratación no es adecuada, da como resultado productos de color café, que son difíciles de suspender en agua y se parecen en su apariencia a las resinas.

Antes de usarse el zimosán, se suspende lo más posible en 100 volúmenes de 0.15 M de NaCl y se coloca en un baño maría hirviendo durante una hora. Se centrifuga 30 min a 4,000 rpm; el sobrenadante se desecha y el residuo se sujeta a la dilución necesaria para tener la concentración requerida. Esta suspensión se puede tener a 4° por lo menos durante un mes, teniendo cuidado de evitar contaminaciones.

*Normalización del Zimosán.*—Se prueba cada lote de zimosán para determinar la cantidad necesaria para la inactivación del C3. Se determina de la siguiente manera: se incuban 2, 4, 8 y 12 mg de zimosán con 1 ml de suero a 37° durante una hora, con agitación ocasional. El residuo se separa por centrifugación y, en el sobrenadante, se determina la actividad del C3. La mínima cantidad de zimosán que inactiva por completo el C3, será la requerida para preparar el R3. También con esa cantidad se incuba el suero a 17° y, en el sobrenadante, se determina la actividad del complemento y de los otros componentes del complemento. Por lo menos el 75 por ciento de la actividad original del complemento tiene que estar presente, para que el reactivo obtenido sea adecuado.

*Preparación del RP.*—El suero se lleva y se mantiene a 17° en un baño a temperatura constante. El control de la temperatura es muy importante, pues a temperaturas menores de 15° no es eliminada toda la properidina del suero, mientras que a temperaturas mayores de 19° se incrementa la pérdida de la actividad del C3. Se le añade la cantidad necesaria de zimosán en 0.03 ml de amortiguador de barbital a cada ml de suero. La mezcla se agita constantemente; si se trata de pequeñas cantidades se agita manualmente cada 10 min. Después de una hora la mezcla se centrifuga a 4,000 rpm durante 30 min a 4°. Se repite este tratamiento una vez más con el sobrenadante. El suero deficiente en properidina (RP), así obtenido, se guarda a -70° o se mantiene a 4° si se usa dentro de un período de 12 h.

*Normalización del RP.*—El RP debe tener por lo menos 75 por ciento de la actividad original del complemento. No debe ser anticomplementario contra suero fresco, ni contra ninguno de los reactivos empleados en el sistema de la properidina. La adición de zimosán a 37°

durante una hora, no debe reducir el título del C3 a menos del 75 por ciento del RP.

Para medir la actividad de la properdina se necesita un RP deficiente tan solo en properdina. El RP debe contener C3 y un exceso de todos los cofactores necesarios no sólo para la formación de un PZ activo o para la inactivación del C3 por el complejo PZ, sino también cantidades adecuadas de C1, C2 y C4 para llevar a cabo la hemólisis de las células sensibilizadas de cordero en la titulación final de la properdina.

*Preparación del R3.*—Se añade a cada ml de suero la cantidad necesaria de zimosán en 0.08 ml de amortiguador de barbital, suspendiéndolo tanto como sea posible. La mezcla se incuba a 37° durante una hora con agitación periódica. Después se centrifuga a 4,000 rpm a la temperatura de 1° durante 30 min. El sobrenadante claro se guarda a -70° o se mantiene a 1° si se usa dentro de un período de 12 h.

*Normalización del R3.*—0.1 ml de R3 no debe ser lítico para 1 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados. Cuando se agrega 0.05 ml de R3 a 1 ml de suero fresco diluido 1:15 debe aumentar el título del complemento del suero por lo menos 200 por ciento. Cuando se agrega 0.05 ml de R3 a 1 ml de RP debe medir 120 unidades de C3 por mililitro de RP y cuando se agrega esa misma cantidad a 1 ml de RP previamente tratado con zimosán a 37° no debe medir menos de 90 unidades de C3.

Una unidad de R3 es igual al volumen menor del suero original del cual se prepara el R3, al cual cuando se le añade 1 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados en un volumen final de 1.5 ml, da 100 por ciento de hemólisis cuando se incuba a 37° durante 30 min. Por ejemplo: si 0.12 ml de suero original diluido 1:5, antes de convertirse a R3 da 100 por ciento de hemólisis, entonces 2 unidades de R3 preparado a partir de este suero están contenidas en  $2 \times 0.12/5$  o sean 0.05 ml de R3.

## TITELACIÓN DE LA PROPERDINA POR EL ZIMOSÁN

Una unidad de properdina es la cantidad que en presencia de la cantidad óptima de zimosán inactiva por completo 120 unidades de C3 en 1 ml de RP durante una hora a 37°. Por ejemplo si 0.1 ml de muestra es la mínima cantidad que inactiva por completo 120 unidades de C3 en 1 ml de RP en presencia de zimosán, la muestra contiene 1/0.1 igual a 10 unidades de properdina por ml.

### *Procedimiento:*

1.—Se añade la cantidad necesaria de una suspensión de zimosán normalizado a una serie de tubos colocados en baño de hielo.

2.—Se añade a cada tubo 0.5 ml de RP.

3.—Se añaden sucesivamente cantidades decrecientes de muestra por titular a cada tubo. Por ejemplo: 0.5 ml al primero, 0.25 ml al segundo, etc.

4.—Se tapan los tubos, se agitan y se incuban durante una hora a 37° con agitación periódica cada 10 min.

5.—Se añade la cantidad necesaria de amortiguador de barbital para tener un volumen final de 1.5 ml en cada tubo.

6.—Se centrifuga cada tubo 10 min a 2,000 rpm y se decanta el sobrenadante en tubos vacíos.

El siguiente paso consiste en la determinación de la concentración del C3 en cada sobrenadante.

7.—Con cada sobrenadante del paso 6 se hace una serie de diluciones desde 1:1 hasta 1:16 con amortiguador de barbital. De cada dilución se ponen 0.2 ml en una serie de tubos, se agregan 2 unidades de R3 y la cantidad necesaria de amortiguador de barbital para tener un volumen final de 0.5 ml en cada tubo.

Se añade después 1 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados y se incuban a 37° durante 30 min, después de lo cual se centrifuga a 1,500 rpm durante 5 min.

Se determina cual dilución da el 50 por ciento de hemólisis por comparación con un tipo, que se prepara añadiendo 0.5 ml de glóbulos rojos de cordero sensibilizados a 1 ml de agua destilada. Si el punto final del 50 por ciento de hemólisis está intermedio entre dos diluciones, por ejemplo: entre 1:8 y 1:16, el punto final se lee en 1:12. Entonces la concentración del C3 en el sobrenadante del paso 6 es de  $12 \times 1/0.2$ , igual a 60 unidades por ml. Como la concentración siempre se expresa en términos de RP sin diluir, y como el RP se encuentra en una dilución 1:3 en los sobrenadantes del paso 6, la concentración final en la titulación del C3 es de  $60 \times 3$  igual a 180 unidades de C3 por ml de RP sin diluir. Si el punto final de la titulación del C3 estuvo dado por el sobrenadante sin diluir del paso 6, el título del C3 es de 15 unidades por ml de RP sin diluir. Si no hay huellas de hemólisis, el título del C3 se toma como cero y entonces se supone que todo el C3 del RP fue inactivado. El punto final en la titulación de la properdina se toma como el menor volumen del paso 3 que inactiva por completo el C3 del paso 7. El número de unidades de properdina en la muestra se determina dividiendo 0.5 entre el volumen menor del paso 3.

#### Controles:

Tubo A. —Contiene 0.5 ml de RP, 1 ml de amortiguador de barbital y zimosán. Este sirve para determinar la pérdida de C3 en presencia de zimosán, pero en ausencia de properdina.

Tubo B. —Contiene 0.5 ml de RP, 1 ml de amortiguador de barbital. Este sirve para determinar la concentración de C3 en el RP después de incubarlo en ausencia de zimosán y de properdina.

Tubo C. —Contiene 0.5 ml de RP, 0.5 ml de muestra que se prueba y 0.5 ml de amortiguador de barbital. Este control sirve para determinar si el suero de prueba no es anticomplementario.

En presencia de este suero de prueba, no debe disminuir el título del C3 del RP, sino por el contrario, en la mayoría de los casos mejora el título del C3.

Tubo D.—Contiene 0.5 ml de la muestra por titular y 1 ml de amortiguador de barbital. Sirve como rutina para titular el C3 en el suero de prueba.

Tubo E.—Contiene 0.5 ml de RP, 1 unidad de propperdina normal en 0.1 ml de amortiguador de barbital, 0.9 ml de amortiguador de barbital y zimosán. Sirve para verificar la prueba y demostrar que el RP tiene todos los factores necesarios para inactivar el C3. O sea, que la adición de una unidad de propperdina (por 0.5 ml de RP) en presencia de zimosán inactiva por completo el C3.

La siguiente tabla se ha seguido como tipo para llevar a cabo las determinaciones de propperdina en las diferentes muestras que se han probado.

<i>Tubo N°</i>	<i>RP  ml</i>	<i>Muestra por titular  ml</i>	<i>Amortiguador barbital  ml</i>	<i>Z  mg</i>	<i>Título del C3  Unida- des/ml</i>
1	0.5	0.50	0.50	8	0
2	0.5	0.25	0.75	8	0
3	0.5	0.12	0.88	8	0
4	0.5	0.06	0.94	8	huellas
5	0.5	0.03	0.97	8	30
6	0.5	—	1.00	8	120
7	0.5	—	1.00	—	120
8	0.5	0.50	0.50	—	180
9	—	0.50	1.00	—	240
10	0.5	1 unidad de pro- perdina	0.90	8	0

Los tubos 6, 7, 8, 9 y 10 corresponden a los controles A, B, C, D y E respectivamente.

En las pruebas llevadas a cabo no se ha puesto el control E por carecer de propperdina normal.

## Titulación de Properdina en Suero Humano

### Muestra N° 1 (Mezcla de sueros)

Tubo N°	<i>Diluciones</i>				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	50%	<50%	—	—	—
5	>50%	<50%	—	—	—
6	>50%	50%	<50%	—	—
7	>50%	>50%	>50%	<50%	—
8	100%	100%	>50%	50%	<50%
9	100%	>50%	>50%	50%	<50%

En el suero humano se encontraron aproximadamente 6 unidades de properdina por mililitro de suero.

## Titulación de Properdina en Suero Humano

### Muestra N° 2 (Mezcla de sueros)

Tubo N°	<i>Diluciones</i>				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	50%	<50%	—	—	—
4	>50%	>50%	<50%	—	—
5	100%	50%	<50%	—	—
6	100%	50%	<50%	—	—
7	100%	>50%	>50%	<50%	—
8	100%	100%	100%	>50%	>50%
9	100%	100%	50%	>50%	>50%

Este suero contiene aproximadamente 3 unidades de properdina por mililitro de suero.

## Titulación de Properdina en Suero de Conejo

### Muestra N° 3 (Un solo suero)

Tubo N°	<i>D i l u c i o n e s</i>				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1					
2					
3					
4					
5	>50%	<50%			
6	>50%	<50%	<50%		
7	>50%	<50%	<50%	<50%	
8	100%	<50%	<50%	<50%	
9	100%	<50%	<50%	<50%	

En el suero de conejo se encontraron aproximadamente 8 unidades de properdina por mililitro.

## Titulación de Properdina en Suero de Cuy

### Muestra N° 4 (Un solo suero)

Tubo N°	<i>D i l u c i o n e s</i>				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1	>50%	<50%			
2	>50%	<50%	<50%		
3	>50%	<50%	<50%		
4	>50%	<50%	<50%		
5	<50%	<50%	<50%	<50%	
6	<50%	<50%	<50%	<50%	
7	100%	<50%	50%	50%	<50%
8	100%	100%	100%	100%	100%
9	100%	100%	100%	100%	100%

En el suero de cuy se encontró aproximadamente media unidad de properdina por mililitro de suero.

## Titulación de Properdina en Suero de Bovino

### Muestra N° 5 (Mezcla sangría Rastro)

<i>Tubo N°</i>	<i>Diluciones</i>				
	<i>1:1</i>	<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	≈50%	—	—	—	—
5	50%	<50%	—	—	—
6	>50%	≈50%	—	—	—
7	>50%	>50%	≈50%	<50%	—
8	<50%	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—

El tubo número 5 ya es positivo por lo tanto en el suero de bovino se encuentran aproximadamente 8 unidades de properdina por mililitro.

## Titulación de Properdina en Suero de Cordero

### Muestra N° 6 (Un solo suero)

<i>Tubo N°</i>	<i>Diluciones</i>				
	<i>1:1</i>	<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	≈50%	<50%	—	—	—
5	>50%	≈50%	<50%	—	—
6	>50%	>50%	<50%	<50%	—
7	<100%	>50%	>50%	<50%	<50%
8	>50%	<50%	<50%	<50%	—
9	—	—	—	—	—

Esta titulación da aproximadamente 6 unidades de properdina por mililitro de suero de cordero.

## Titulación de Properdina en Globulina de Caballo

Muestra N° 7 (obtenida de los laboratorios Dr. Zapata)

<i>Tubo N°</i>	<i>Diluciones</i>				
	<i>1:1</i>	<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	≥50%	≥50%	—	—	—
4	≥50%	≥50%	—	—	—
5	≥50%	≥50%	—	—	—
6	≥50%	≥50%	≥50%	—	—
7	≥100%	≥50%	50%	≥50%	—
8	≥50%	≥50%	—	—	—
9	—	—	—	—	—

Se encontraron aproximadamente 3 unidades de properdina por mililitro de globulina de caballo de una dilución 1:10.

## Titulación de Properdina en gamma Globulina Humana

Muestra N° B (obtenida de los laboratorios Dr. Zapata)

<i>Tubo N°</i>	<i>Diluciones</i>				
	<i>1:1</i>	<i>1:2</i>	<i>1:4</i>	<i>1:8</i>	<i>1:16</i>
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	≥50%	≥50%	—	—	—
6	50%	≥50%	—	—	—
7	≥50%	50%	≥50%	—	—
8	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—

El resultado de esta titulación es aproximadamente de 10 unidades de properdina por mililitro de globulina humana de una dilución

1:10. Este resultado parece ser demasiado alto, en primer lugar porque la globulina humana es anticomplementaria, y en segundo lugar si se toma en cuenta los tubos del número 7 que sirven para determinar la concentración del C3 en el RP después de incubarse en ausencia de zimosán y de properdina, se nota que el contenido en C3 se encuentra bajo.

### Titulación de Properdina en Globulina Humana (Dilución 1:150)

Muestra N° 9 (obtenida de los laboratorios Dr. Zapata)

Tubo N°	Diluciones				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
1	>50%	<50%	—	—	—
2	>50%	<50%	—	—	—
3	>50%	<50%	—	—	—
4	>50%	<50%	<50%	—	—
5	>50%	<50%	<50%	—	—
6	>50%	<50%	<50%	—	—
7	>50%	>50%	>50%	<50%	—
8	>50%	<50%	<50%	—	—
9	—	—	—	—	—

En esta titulación se empleó una dilución tan alta que no se observó efecto anticomplementario, ni actividad apreciable de properdina.

## CAPITULO III

## DISCUSION

Al comenzar a tratar de titular la properdina se tropezó con una serie de dificultades, de las cuales la más importante fue la destrucción del complemento cuando se diluía con amortiguador de barbital 1:3 y se incubaba a 37°.

Se hicieron una serie de ensayos con diferentes sustancias para tratar de evitar la pérdida del complemento, sin embargo, se obtuvieron datos que indicaban que esta pérdida del complemento tenía lugar principalmente en los casos de sueros diluidos con barbital, mientras que en el suero sin diluir la estabilidad del complemento a 37° era suficiente; por este motivo, se modificó la titulación de la properdina, haciendo la incubación a 37° de las muestras de properdina y RP antes de diluir con el amortiguador y agregando este después de la incubación.

En cuanto a los resultados obtenidos en las titulaciones de properdina se observa, que en las muestras N° 1 y N° 2, o sean muestras de suero humano obtenido del Hospital de Nutrición, la titulación es fácil de llevarse a cabo. En la muestra N° 3, o sea el suero de un conejo, la titulación también es bastante aceptable y tampoco presenta dificultad. Mientras que la titulación de properdina en el suero de cuy se dificulta por su gran contenido de complemento y poca actividad de properdina, probablemente por esta razón, el resultado es menor que el obtenido por Pillemer. En el caso de las muestras N° 5 y N° 6, o sean en el suero de bovino y de cordero, las titulaciones se encuentran enmascaradas por la acción anticomplementaria de estas sustancias, por lo que se supone que estos resultados son altos, como lo es en el caso del cordero en comparación con el dato obtenido por Pillemer. En cuanto a la titulación de properdina en las preparaciones purificadas de globulina de caballo y de gamma globulina humana, no se puede asegurar que contengan properdina, puesto que la pérdida de complemento puede ser debida a la acción anticomplementaria de

estas sustancias; puesto que los primeros tubos son semejantes a los Nos. 8, aun cuando estos dan valores ligeramente más altos, esto puede ser debido a que los primeros se han incubado a 37° en presencia de zimosán mientras que los últimos no lo contienen.

## CAPITULO IV

## CONCLUSIONES

De los datos anteriores se pueden resumir las siguientes conclusiones:

A.—Los datos obtenidos en las titulaciones de proteridina en los diferentes sueros, son parecidos dentro de ciertos límites, a los dados por Pillemer, de donde se puede decir que el método es bueno.

B.—Con la pequeña modificación introducida por nosotros en el método de Pillemer, se evita en gran parte la pérdida del complemento, por lo que es posible hacer determinaciones de proteridina en laboratorios no especializados.

En el tiempo ocupado en finalizar este trabajo otros investigadores han logrado obtener mejores resultados en las titulaciones de la proteridina por algunas modificaciones al método de Pillemer, que permiten el uso de casi la totalidad de los sueros humanos.

Esto nos hace suponer que una investigación más amplia sobre este punto permitirá obtener resultados más precisos y facilitar el método.

BIBLIOGRAPHY

1. FREEMAN, H. A. The relationship of complement antibody activity to the serum properdin system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 66:27-283 (1956).
2. FRANK, F., FINE, J. & PLETNER, I. Serum Properdin levels in hemostyptic shock. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49:213 (1953).
3. GINSBERG, H. S. & HENRIKSEN, F. C. Jr. A label component of normal serum which combines with various viruses. Neutralization of infectivity and inhibition of hemagglutination by the component. *J. Exp. Med.*, 68:433 (1939).
4. GONKOROFF, P. The action of Properdin in *Leptospira* gonorrhoeae. A preliminary report. *Ann. Med. et Biol. Fennica (Helsinki)* 33:319 (1955).
5. HISE, C. E. JR., JOHNSON, W. S., JR. & PLETNER, I. Properdin: A specific hemolytic factor in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *J. Lab. Clin. Med.* 48:411 (1956).
6. HISE, C. E., JR., JOHNSON, W. S., JR. & PLETNER, I. A specific hemolytic factor in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* 35:133 (1956).
7. KERR, J. A. & MAYER, M. M. Experimental Immunochemistry. Plenum, Springfield, Ill. (1946).
8. LASKI, M. & PLETNER, I. Elevation of Properdin Levels in Man Following subcutaneous Inoculation of Bacterial Lipopolysaccharides. *J. Exp. Med.* 103:231 (1956).
9. LEVOW, I. H., PLETNER, I. & RAYSON, O. D. The Influence of Calcium Ions on the Inactivation of Human Complement and its Components by Plasma. *J. Exp. Med.* 98:257 (1953).
10. LEVOW, I. H., WERT, I., RAYSON, O. D. & PLETNER, I. Studies on the Mechanism of Inactivation of Human Complement by Plasma and by Antigen Antibody Aggregates. *J. Immunol.* 73:146 (1954).
11. MAYER, M. M., OLICK, A. K., BORN, O. E. & HENRIKSSON, M. The Activating Effect of Magnesium and other Cations on the Hemolytic Formation of Complement. *J. Exp. Med.* 81:555 (1946).
12. PLETNER, I. The Properdin System. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* (1955).
13. PLETNER, I. The Nature of the Properdin System and its Interaction with Polysaccharide Complexes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 66(2):252 (1956).
14. PLETNER, I., BEUM, I., LEVOW, I. H., BORN, O. A., LITKE, F. W. & WERZAW, A. C. The Properdin System and Immunity. I. Demonstration and Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and its Role in Immune Phenomena. *Science* 129:279 (1957).
15. PLETNER, I., BEUM, I., LEVOW, I. H., WERT, I. & LITKE, F. W. The Properdin System and Immunity. II. The Zymosan Array of Properdin. *J. Exp. Med.* 123:1 (1956).
16. PLETNER, I., BEUM, I., PRINCE, J. & LEVOW, I. H. The Requirement for Magnesium Ions in the Inactivation of the Third Component of Human Complement (C3) by Insoluble Residue of Yeast Cell Zymosan. *J. Immunol.* 71:334 (1953).
17. PLETNER, I. & LITKE, F. F. Anticomplementary Factor in Fresh Yeast. *J. Biol. Chem.* 147:139 (1947).
18. PLETNER, I., LEVOW, I. H. & BEUM, I. The Requirement for a Heat-labile Sensitive Serum Factor and Heat Labile Serum Factor in the Inactivation of Human C3 by Zymosan. *J. Immunol.* 71:336 (1953).
19. PLETNER, I., RAYSON, O. D., BORN, I. & LEVOW, I. H. The Inactivation of Complement and its Components by Plasma. *J. Exp. Med.* 97:513 (1953).
20. PLETNER, I. & BORN, O. A. Alterations in Serum Properdin Levels Following Infection of Zymosan. *Science* 121:732 (1952).
21. PLETNER, I., SCHLESINGER, M. H. & WERT, I. Properdin System and Immunity. II. Interaction of the Properdin System with Polysaccharides. *Science* 122:443 (1956).

22. PILLINGER, I., SUTTER, S., DEY, C. S., M. D. & YEKER, E. E. Function of Components of Complement in Immune Hemolysis. *J. Exp. Med.*, 15: 93 (1942).
23. ROSS, O. A. The Properdin System in Relation to Fatal Bacteremia following Total Body Irradiation of Laboratory Animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 66(2): 274 (1956).
24. ROSS, O. A., MORTZ, A. R., WALKER, E. J., WOOD, L., LIND, E. W. & PILLINGER, I. Role of the Properdin System in the Whole Body Irradiation. *Federation Proc.*, 14: 496 (1955).
25. ROYCE, D. Stimulation of Natural Immunity to *Escherichia coli* Infections. Observations on Mice. *Cancer*, 1: 232 (1954).
26. SIKESCA, R. C. & WATSON, D. W. Antimicrobial Factors of Normal Tissues and Fluids. *Bacterial Revs.*, 21: 273 (1957).
27. WARREN, A. C., REISS, I. & PILLINGER, I. Bactericidal Activity of the properdin system in human serum. *Federation Proc.*, 14: 490 (1955).
28. WARREN, A. C. & PILLINGER, I. The Properdin System and Immunity. V. The Bactericidal Activity of the Properdin System. *J. Exp. Med.*, 103: 553 (1956).
29. WINDOM, R. J., GARDNER, H. S. & PILLINGER, I. The Properdin System and Immunity. VI. The Inactivation of Newcastle Disease Virus by the Properdin System. *J. Exp. Med.*, 104: 267 (1956).
30. WINDOM, R. J., GARDNER, H. S. & PILLINGER, I. The Inactivation of Newcastle Disease by the properdin system. *Ann. J. Diseases Chickens*, 90: 526 (1955).
31. WINTERBURN, H. R., GARDNER, J. & WARDNER, A. Third Component of heat-labile factor of complement. *Biochem. J.*, 19: 618 (1925).