
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIAN ANGELO AMIRANTE, VITTORIO PARISI

Anticorpopoiesi e caratteri serologici negli Anfibi

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.1, p. 88–94.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_88_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Zoologia. — *Anticorpopoiesi e caratteri serologici negli Anfibi* (*).
Nota di GIAN ANGELO AMIRANTE e VITTORIO PARISI, presentata (**)
dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — Antibody production in some species of Amphibian (Anura and Urodela) has been studied; bacteria, viruses and proteins were used as antigens. The electrophoretic study of sera of immunized animals showed the appearance of a new fraction of γ -globulins. Sera electropherograms of other species of Amphibia demonstrate a remarkable variability in the percentage of γ -globulins.

L'anticorpopoiesi negli Anfibi è stata oggetto di diverse ricerche; esse hanno posto in evidenza che negli Anuri vi sono anticorpi del tipo agglutinine [22] e che la formazione degli anticorpi dipende dalla temperatura alla quale l'anfibi è tenuto durante il periodo d'immunizzazione [5, 6, 13], a differenza di quanto avviene ad esempio in Uccelli e Mammiferi.

A quanto ci risulta non si conosce nulla sulla anticorpopoiesi negli Urodeli; inoltre non si è riuscito a evidenziare in modo certo negli Anfibi anticorpi di tipo precipitine contro proteine purificate.

Nel corso di questa ricerca è stata studiata l'anticorpopoiesi di alcune specie di Anuri e di Urodeli, usando come antigeni batteri, virus e proteine purificate, e le caratteristiche elettroforetiche dei sieri di tali animali, prima e dopo l'immunizzazione.

È stato oggetto di particolare interesse il raffronto fra le diverse specie per ciò che concerne le percentuali delle frazioni proteiche del siero.

MATERIALI E METODI. — Le specie usate per l'immunizzazione furono: *Xenopus laevis* Duadin (da allevamento), *Rana esculenta* L. (raccolte in natura), *Salamandra maculosa* Laur. (raccolte in natura), *Triturus cristatus* Laur. (raccolti in natura, ma stabulati da diversi mesi). Per comparazione furono studiati i tracciati elettroforetici del siero normale di *Rana dalmatina* Bp. (raccolte in natura), *Bufo bufo* L. (raccolti in natura), *Triturus alpestris* Laur. (raccolti in natura), *Pleurodeles waltlii* Mich. (da allevamento). Tutti gli animali furono tenuti durante il tempo dell'esperimento a 21°C e nutriti con *Tubifex* o fegato tritato.

Il sangue fu ottenuto nelle specie in cui ciò era possibile (*Xenopus laevis*, *Triturus cristatus*, *Salamandra maculosa*, *Pleurodeles waltlii*) mediante salasso; nelle altre sacrificando l'animale e prendendo il sangue direttamente dal cuore mediante micropipetta, a 10 giorni dall'ultima iniezione.

Gli antigeni usati furono: *Salmonella typhi* preparata per l'antigene H (*S. typhi* H), batteriofago Φ X 174 (inviatoci dall'Institut Pasteur di Parigi e coltivato su *E. coli*, sec. Kleinschmidt [18]); siero albumina di bue frazione 5 (SAB).

(*) Ricerche eseguite nei Laboratori di Zoologia e di Embriologia dell'Università Statale di Milano.

Ringraziamo il dr. Sam M. Beiser di New York per le critiche e i consigli dati durante il corso del lavoro.

(**) Nella seduta del 14 gennaio 1967.

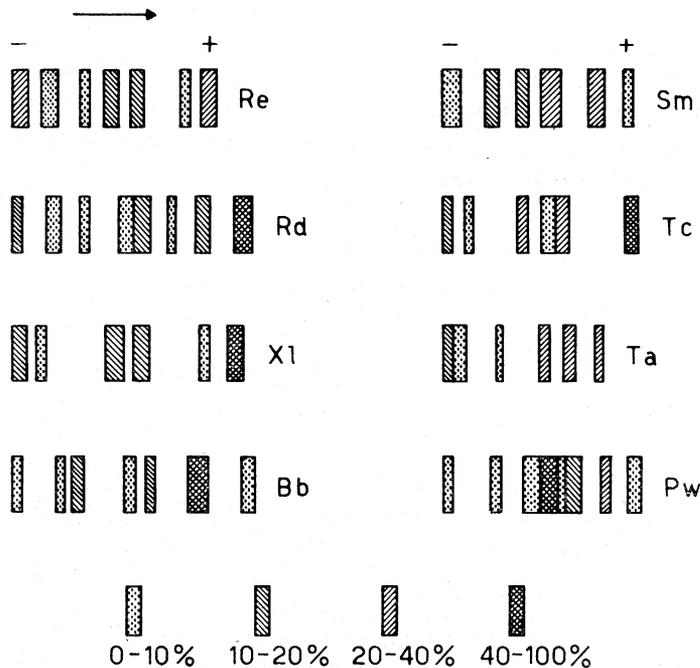
La prova di agglutinazione fu fatta secondo la tecnica usuale [8, 21]. Per i fagi si usò la prova della inibizione delle placche di lisi consistente nella seguente metodica (comunicazione personale del dr. Beiser): a 0,2 ml di antisiero si aggiungono 0,2 ml di sospensione di fagi (a concentrazione 2×10^8 /ml); si incubano a 37° C. per 1 ora e si inseminano in *E. coli* su agar; dopo 24 ore si contano le placche di lisi formate.

Per controllo si è usata una concentrazione di fagi pari a 2×10^8 /ml, e cioè 100.000 volte minore di quella usata per l'antisiero.

Il numero medio delle placche di lisi dei controlli è stato di $125,5 \pm 4,12$.

Per le precipitine si usò il *ring-test*.

Le elettroforesi si ottennero facendo migrare il siero su gel di acetato di cellulosa (cellogel, Chemetron) per 90' a 125 volts in apparecchio gel-phor (Terzano) con buffer al veronal a pH 8,7 f.i. 0,05 [16]. Le percentuali delle varie frazioni furono ottenute mediante lettura sul fotodensimetro (Terzano).



PERCENTUALE DELLE DIVERSE FRAZIONI

Fig. 1. - Traccianti elettroforetici dei sieri delle specie studiate. Bb = *Bufo bufo*; Pw = *Pleurodeles waltlii*; Rd = *Rana dalmatina*; Re = *Rana esculenta*; Sm = *Salamandra maculosa*; Ta = *Triturus alpestris*; Tc = *Triturus cristatus*; Xl = *Xenopus laevis*.

S. typhi H. Le agglutinine vennero indotte facilmente in *Xenopus laevis*, *Salamandra maculosa*, *Rana esculenta* mediante 7 iniezioni nella coscia di 0,1 ml di sospensione di *S. typhi* H in soluzione fisiologica, a intervalli di 2 giorni (la sospensione iniettata conteneva circa 1×10^8 microorganismi/ml). Furono trattati un lotto di 15 rane tenute in recipienti separati, un lotto di 7 *Xenopus* tenuti a gruppi rispettivamente di tre, due, due individui e un lotto di 2 salamandre.

Fagi $\Phi X 174$. A un lotto di 25 rane e 10 tritoni vennero praticate 7 iniezioni di 0,1 ml di sospensione di fagi $\Phi X 174$ (contenente circa $2,3 \times 10^9$ microorganismi/ml). A giorni

alterni la sospensione veniva iniettata nel sacco linfatico nelle rane, nella cavità peritoneale nei tritoni.

Siero albumina. A 3 *Xenopus* vennero praticate 7 iniezioni a intervalli di 2 giorni, di 0,5 ml di siero albumina di bue (concentrazione della proteina = 1%); ad altri due *Xenopus* vennero praticate 3 iniezioni, distanziate una settimana l'una dall'altra con 0,4 ml di SAB + 0,2 ml di adiuvante (Complete Freud adjuvant Difco).

In nessun animale si ottennero precipitine contro SAB, anche quando si fece ricorso agli adiuvanti.

Durante la stesura del presente lavoro si è riusciti a produrre anticorpi in tre femmine di *Xenopus* contro emocianina, purificata per dialisi e ultracentrifugazione, di *Viviparus ater* Cristofori e Jan (*Mollusca, Gasteropoda*). Per doppia diffusione su micropiastre di agar si è avuto la formazione di un arco molto netto di precipitato. Facendo migrare per elettroforesi l'antisiero e ricercando gli anticorpi mediante emocianina, si è visto che l'attività anticorpale è legata alla frazione delle γ -globuline.

Tutte le elettroforesi vennero fatte con sieri freschi (fig. 1).

I risultati degli esperimenti di immunizzazione con *S. typhi* H sono riportati nella Tabella I, quelli della immunizzazione contro il fago Φ X 174 nella Tabella II. Nella Tabella III sono riportate le percentuali delle varie frazioni sieriche nelle diverse specie animali.

TABELLA I.

Esperimento di agglutinazione.

Specie	N° animali immunizzati	N° animali superstiti	N° iniezioni	Titolo del siero (*)
<i>Rana esculenta</i>	15	11	7	3 = 160 4 = 80 3 = 40 1 = 0 1 = 80
<i>Xenopus laevis</i>	7	5	7	3 = 60 1 = 0
<i>Salamandra maculosa</i> .	2	2	7	2 = 60

(*) I titoli dei sieri sono espressi con il reciproco della massima diluizione alla quale si ha ancora agglutinazione; i numeri a sinistra, sulla colonna dei titoli, indicano il numero di individui che hanno tale titolo.

I nostri risultati concordano coi dati di altri Autori sulla capacità degli Anuri di produrre anticorpi specifici contro antigeni particolari; sul fatto che tale anticorpoesisi sia condizionata dalla temperatura alla quale l'animale è tenuto e che sia impossibile evidenziare anticorpi circolanti contro proteine pure (SAB), salvo il caso precedentemente ricordato di emocianina.

TABELLA II.
Esperimento di inibizione di lisi.

Specie	N° animali immunizzati	N ^a animali superstiti	N° iniezioni	Lisi (*)
<i>Rana esculenta</i>	25	18	7	8 = 0 ; 1 = 6 1 = 1 ; 1 = 25 1 = 2 ; 1 = 27 1 = 4 ; 2 = 90 2 = lisi totale
<i>Triturus cristatus</i>	10	8	7	3 = 0 1 = 17 4 = lisi totale

(*) Numero di placche di lisi osservate; i numeri a sinistra, nella colonna delle lisi, indicano il numero di individui che presentano tale lisi.

TABELLA III.
Percentuali delle frazioni proteiche del siero.

Specie	Prealbumine	Albumine	Globuline				
			α_1	α_2	β_1	β_2	γ
<i>Rana esculenta</i>	—	36,07	7,47	11,67	15,80	7,75	21,72
<i>Rana dalmatina</i>	—	46,00	15,00	6,00	17,50	2,00	13,50
<i>Xenopus laevis</i> non immunizzato	—	41,52	6,05	15,32	13,05	—	27,12
<i>Xenopus laevis</i> immun. <i>S. typhi</i>	—	37,14	4,28	10,00	16,43	—	32,15
<i>Bufo bufo</i>	2,50	60,67	11,83	7,03	13,97	—	5,47
<i>Salamandra maculosa</i> non immunizzata	8,00	34,40	22,20	18,60	12,60	—	8,00
<i>Salamandra maculosa</i> immunizz. <i>S. typhi</i>	2,00	47,00	20,00	6,00	16,00	—	9,00
<i>Triturus cristatus</i>	—	41,87	24,07	—	11,22	5,30	10,02
<i>Triturus alpestris</i>	—	25,62	29,12	—	25,25	9,85	10,10
<i>Pleurodeles waltlii</i>	4,30	34,60	14,80	—	45,30	—	1,50

Circa la impossibilità di ottenere antigeni contro proteine pure Elek, Rees e Gowing [13] immunizzarono *Xenopus* contro γ -globuline di bue (fraz. 2); sono invece incerti i risultati ottenuti con sieri in toto di altri animali [15, 12] e gli unici dati sicuramente positivi sono quelli di Dumas [11].

Come risulta dai nostri dati anche in Urodeli (salamandra e tritone) è possibile ottenere anticorpi di tipo agglutinine e anticorpi inibenti i fagi.

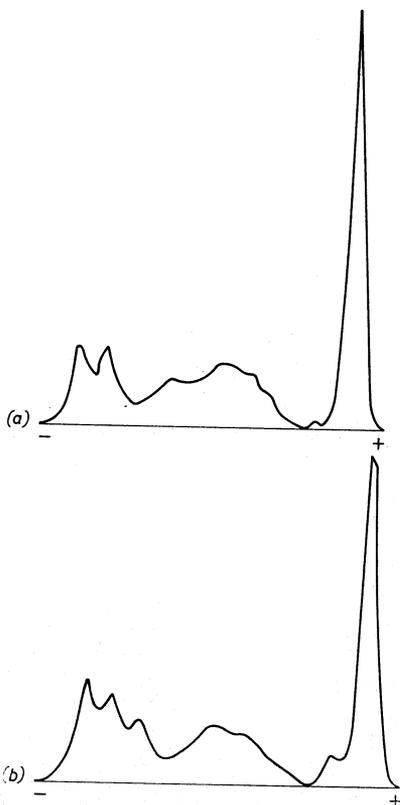


Fig. 2. - Curva fotodensimetrica di siero di *Xenopus laevis* normale (a) e immunizzato con *S. typhi* (b).

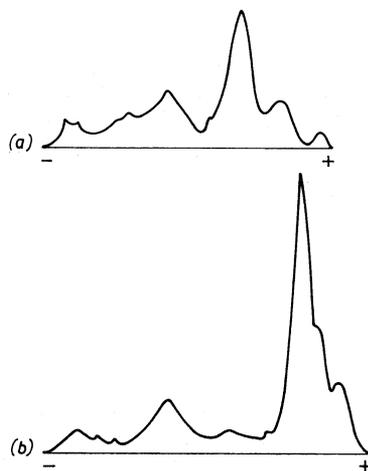


Fig. 3. - Curva fotodensimetrica di siero di *Salamandra maculosa* normale (a) e immunizzata con *S. typhi* (b).

Noi abbiamo inoltre notato che nei sieri, sia di Anuri che di Urodeli, contenenti agglutinine, appare una nuova banda nella zona delle γ -globuline (figg. 2 e 3) con mobilità maggiore rispetto a quella delle due bande presenti nel siero normale.

Questo dato non conferma i risultati di Butler, Rees e Elek [7], che non hanno rilevato notevoli differenze tra siero di *Xenopus* normale e immunizzato contro *S. typhi*, mentre è in accordo con i dati del Marini [20] che ha messo in evidenza che in tritoni cancerizzati si ha un aumento delle globuline.

La banda da noi notata non è dovuta ad eventuale emolisi, come dimostra il confronto con i traccianti elettroforetici di emoglobina dello stesso *Xenopus*.

Il significato di tale banda si mette in evidenza eluendo le varie frazioni elettroforetiche del siero di *Xenopus* immunizzato contro *S. typhi* H e facendo la prova di agglutinazione: si è notato che l'attività anticorpale è presente soprattutto in questa nuova frazione delle γ -globuline, e anche a livello delle α_2 .

Infine la percentuale delle γ -globuline valutata sui dati fotodensimetrici aumenta considerevolmente negli animali immunizzati rispetto a quella di animali normali.

Degno di rilievo il fatto che in esemplari di *Xenopus* nei quali si è iniettato la siero albumina non è apparsa nessuna nuova frazione.

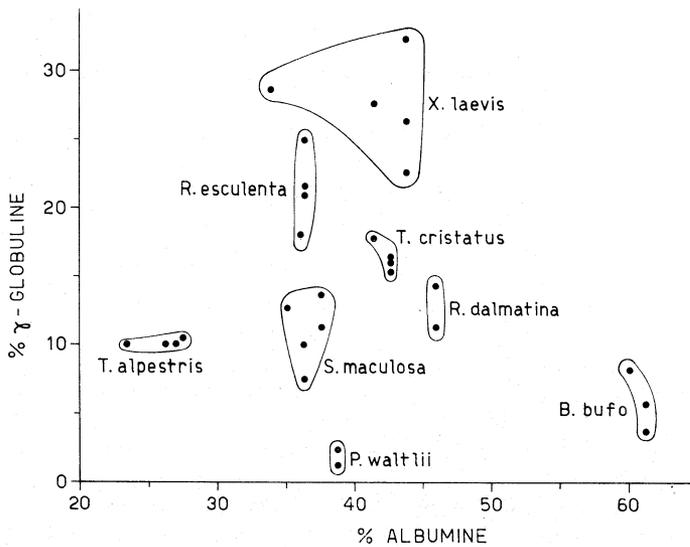


Fig. 4. - Percentuali delle γ -globuline e delle albumine nelle specie studiate di Anuri ed Urodela.

Dai dati riassuntivi nella Tabella III, relativi alle elettroforesi dei sieri delle specie studiate, si può vedere, come anche dal grafico della fig. 4, che ogni specie presenta un aspetto caratteristico (come si può anche desumere dai dati della bibliografia [1, 2, 3, 4, 9, 10, 14, 17, 19]).

Dal grafico si può anche rilevare come il rapporto fra γ -globuline e albumine sia diverso nelle differenti specie; queste differenze però hanno un significato esclusivamente diagnostico e non filogenetico.

Degna di nota però ci sembra l'indicazione, rilevabile nello stesso grafico, che la variabilità nell'ambito di una data specie, tra quelle rappresentate da animali raccolti in natura, non è alta, mentre nelle specie in cui esemplari provengono da allevamento in laboratorio si hanno forti differenze individuali in *Xenopus*, minori differenze in *Pleurodeles*. Il rilievo va però sostenuto da una più ampia casistica.

Si è constatato inoltre che la percentuale di albumine è abbastanza costante nell'ambito della specie, mentre è molto variabile quella delle γ -glo-

buline. Per quanto riguarda quest'ultima sembra che non vi sia un netto rapporto tra percentuali di γ -globuline caratteristiche in una data specie e la capacità di questa di produrre anticorpi, in quanto le specie studiate danno sieri con titoli anticorpali dello stesso ordine di grandezza.

LAVORI CITATI.

- [1] F. M. ANTONINI e C. PIVA, *Il frazionamento elettroforetico del siero di alcuni animali*, « Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. », 28, 1887-1889 (1952).
- [2] F. BERTINI e M. CEI, *Electroferogramas de proteínas séricas en el genero Bufo*, « Acta I Congr. Sudam., La Plata », 4, 161 (1959).
- [3] F. BERTINI e J. M. CEI, *Observaciones electroforeticas en seroproteinas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum*, « Rev. Soc. Arg. Biol. », 36, 355-362 (1961).
- [4] F. BERTINI e J. M. CEI, *Seroprotein patterns in the Bufo marinus complex*, « Herpetologica », 17, 231-238 (1962).
- [5] K. A. BISSET, *The effect of temperature on immunity in Amphibians*, « J. Path. Bact. », 59, 301-306 (1947).
- [6] K. A. BISSET, *The effect of temperature upon antibody production in cold-blooded vertebrates*, « J. Path. Bact. », 60, 87-92 (1948).
- [7] L. O. BUTLER, T. A. REES e S. D. ELEK, *Studies on the serum proteins of Xenopus laevis Daudin*, « Comp. Biochem. Physiol. », 6, 105-110 (1962).
- [8] E. CARLINFANTI, *Nozioni di immunologia*, Istituto Sieroterapico milanese, Milano (1946).
- [9] H. C. DESSAUER e W. FOX, *Characteristic electrophoretic patterns of plasma proteins of orders of Amphibia and Reptilia*, « Science », 124, 225-226 (1956).
- [10] A. F. DEUTSH e W. H. MCSHAN, *Electrophoretic studies of the blood serum proteins of some lower animals*, « J. Biol. Chem. », 180, 219-234 (1949).
- [11] P. C. DUMAS, *Studies of the Rana species complex in the Pacific Northwest*, « Copeia », 1, 60-74 (1966).
- [12] M. K. EBERT, *Die Antikörper bei Kaltblütern III Die Spezifität der Immunitätsphänomene bei Fröschen*, « Z. Imm. Forsch. », 72, 13 (1931).
- [13] S. D. ELEK, T. A. REES e N. F. C. GOWING, *Studies on the immune response in a poikilothermic species (Xenopus laevis Daudin)*, « Comp. Biochem. Physiol. », 7, 255-267 (1962).
- [14] W. FOX, H. C. DESSAUER e L. T. MAUMUS, *Electrophoretic studies of blood proteins of two species of toads and their natural hybrid*, « Comp. Biochem. Physiol. », 3, 52-63 (1961).
- [15] K. A. FRIEDE e M. K. EBERT, *Über Anaphylaxie bei Fröschen*, « Z. Immun. Forsch. », 49, 329-346 (1926).
- [16] B. W. GRUMBAUM e L. DONG, *Immuno-electrophoresis with cellulose acetate*, « Nature », 194, 185-186 (1962).
- [17] V. K. KIORTSIS e M. KIORTSIS, *Fractionnement par l'électrophorèse sur papier des protéines sériques de trois espèces du genre Triturus*, « Rev. suisse Zool. », 67, 119-127 (1960).
- [18] A. K. KLEINSCHMIDT, *Electron microscopy of the replicative form of the DNA of the bacteriophage ΦX 174*, « Science », 142, 961 (1963).
- [19] B. LANZA e F. ANTONINI, *Sulla possibilità di distinguere specie tra loro diverse per mezzo del protidogramma del siero. Studio su Rana esculenta e su Rana dalmatina*, « Monit. Zool. Ital. », 63, 293-299 (1955).
- [20] F. MARINI, *Il frazionamento elettroforetico su carta delle proteine del siero di Anfibi*, « Ist. Lomb. Rend. Sc. B », 88, 203-214 (1955).
- [21] S. RAFFEL, *Immunity, hypersensitivity, serology*, Appleton Century Crafte, New York (1953).
- [22] E. WOLLMAN, *Recherches immunologiques sur les animaux inferieurs*, « Rev. Immunol. », 4, 101-110 (1938).