
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIANNI A. AMIRANTE, ANNA M. CACCAMO, SILVIO
FERRARIO

**Studi sulle caratteristiche immunologiche del
teleosteo Tinca tinca L. - I) Le eteroagglutinine
naturali del siero**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.5, p. 783–789.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_5_783_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Studi sulle caratteristiche immunologiche del teleosteo Tinca tinca L.* — I) *Le eteroagglutinine naturali del siero* (*). Nota di GIANNI A. AMIRANTE, ANNA M. CACCAMO e SILVIO FERRARIO, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — Serological and immunochemical properties of natural heteroagglutinins are studied in serum of the teleost *Tinca tinca* L. Results showed that agglutinating activity of serum is due to three different proteins. Two of such proteins seem to be essentially similar to mammalian immunoglobulins (IgG and IgM). The third protein, with the electrophoretic mobility of pre-albumin, shows characteristics of agglutinins found in body fluids of many Invertebrates.

I Teleostei sembrano essere un gruppo di Vertebrati immunologicamente poco evoluto; ma i dati esistenti sulle caratteristiche immunochimiche del siero di tali animali sono incompleti. Le prime ricerche in proposito, si devono a Babes e Riegler [1] che nel 1903 dimostrarono la esistenza di agglutinine naturali contro *Amoeba proteus* in *Carassius vulgaris*. Agglutinine naturali furono pure dimostrate nel 1942 da Cushing [2] nella tinca. In salmonidi Post [3] ottenne produzione di anticorpi specifici contro *Aeromonas hydrophila*; sempre nei salmonidi Krantz e coll. [4] e Anderson e coll. [5] contro *Aeromonas salmonicida*. Muroga e Egusa [6] indussero nell'anguilla la produzione di anticorpi specifici contro *Vibrio anguillarum*. Ambrosius e Schäker [7] nel 1964 dimostrarono nella carpa l'induzione di precipitine contro siero di maiale. Sempre Ambrosius e coll. [8] riuscirono a indurre la produzione di precipitine contro gamma-globuline umane purificate in pesce persico, carpa e pesce gatto. Da tali ricerche risulta inoltre che mentre è frequente la presenza di agglutinine naturali, la sintesi di anticorpi circolanti indotti avviene solamente mantenendo gli animali ad una temperatura relativamente elevata.

Con questa ricerca ci siamo proposti di indagare sulle caratteristiche sierologiche ed immunochimiche delle eteroagglutinine naturali in un teleosteo d'acqua dolce, *Tinca tinca* L., ed in particolare di verificare se tali agglutinine siano da considerare appartenenti alla classe delle immunoglobuline.

(*) Ricerche eseguite nel Laboratorio di Zoologia, direttore prof. V. G. Leone: Università statale di Milano.

(**) Nella seduta del 13 maggio 1972.

MATERIALI E METODI

Il sangue fu prelevato mediante taglio della coda dopo anestesia in etil-uretano al 5%, da 35 tince adulte, maschi e femmine, mantenute in vasche d'acqua corrente a ca. 15°C. Il siero ottenuto, fu scomplementato per 5' a 45°C⁽¹⁾ e conservato a -20°C.

Prove di agglutinazione. L'attività agglutinante fu saggiata su globuli rossi delle seguenti specie di Vertebrati: coniglio, ratto, montone, criceto, bue, uomo (gruppi A, B, AB, O), pollo, tartaruga, tritone, rana, xenopus, rospo, anguilla, trota, ciprino, carpa, tinca.

Siero di tinca diluito 1:10 fu trattato inoltre con globuli rossi di montone, mantenuto a 37°C per un'ora e centrifugato per separare le cellule agglutinate. Tale operazione fu ripetuta più volte. L'attività agglutinante del siero così trattato è stata provata su globuli rossi delle rimanenti specie.

Produzione di anticorpi anti-eteroagglutinine. Il siero di tinca venne fatto reagire contro globuli rossi di ratto (furono utilizzati questi ultimi perchè diedero una reazione di agglutinazione superiore a tutti gli altri). A un volume di siero di tinca diluito 1:50 fu aggiunto un equal volume di globuli rossi di ratto all'1%, tale sospensione venne mantenuta a 37°C per un'ora e a 4°C per 12 ore. In tale modo si ebbe la totale agglutinazione dei globuli rossi. Le cellule agglutinate furono centrifugate e lavate ripetutamente in soluzione fisiologica. Un volume di tali cellule venne emulsionato in due volumi di adiuvante di Freund completo e iniettato sottocute nel coniglio. Furono praticate un totale di 6 iniezioni durante un periodo di 4 mesi. Il prelievo fu effettuato dopo 10 giorni dall'ultima iniezione. Un altro coniglio fu immunizzato contro siero totale di tinca mediante 7 iniezioni endovena di 1 ml di siero diluito 1:50, distanziate di 15 giorni l'una dall'altra. Con i due antisieri così ottenuti furono eseguite prove di immunoelettroforesi contro siero di tinca, normale e trattato con 2-mercaptoetanolo (2-ME).

Trattamento con 2-mercaptoetanolo. Parte del siero di tinca fu dializzato per 16 ore contro 2-ME 0.1M e poi per 24 ore contro soluzione fisiologica. Con questo siero furono effettuate prove di agglutinazione contro globuli rossi delle specie che col siero normale avevano dato agglutinazione positiva.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dai dati ottenuti ed espressi nella Tabella I si può innanzitutto osservare che il potere agglutinante varia notevolmente da specie a specie. Per quanto riguarda i mammiferi si può notare, ad eccezione del bue in cui l'agglutinazione è risultata nulla, che in tutte le altre specie esaminate l'agglutinazione è sempre positiva, con un massimo nel ratto in cui questa è ancora presente con una diluizione del siero di 1/1280. In particolare per quanto riguarda i globuli rossi di uomo, abbiamo riscontrato che l'agglutinazione è sempre positiva a prescindere dal gruppo sanguigno. Circa le altre classi di Vertebrati la risposta è sempre negativa, ad eccezione di un unico caso (anguilla); poichè però il numero di specie esaminate in tali classi è limitato, tali risultati non possono essere generalizzati.

(1) Come in altre ricerche non pubblicate, abbiamo riscontrato che il complemento di tinca è molto più termolabile di quello di mammifero; sono infatti sufficienti per inattivarlo temperature e tempi molto inferiori.

TABELLA I.
Prove di agglutinazione del siero di Tinca tinca contro globuli rossi di diverse specie.

ANTIGENE	TITOLO DEL SIERO								
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
Coniglio	++	++	++	+	—	—	—	—	—
Bue	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Montone	++	++	++	++	+	—	—	—	—
Ratto	++	++	++	++	++	++	+	+	—
Criceto	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Uomo A	++	++	++	+	—	—	—	—	—
Uomo B	++	++	++	+	+	—	—	—	—
Uomo AB	++	++	+	+	—	—	—	—	—
Uomo O	++	++	++	++	+	—	—	—	—
Pollo	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tartaruga	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rospo	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Xenopus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rana	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tritone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anguilla	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Trota	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ciprino	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Carpa	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tinca	—	—	—	—	—	—	—	—	—

TABELLA II.

Prova di agglutinazione col siero di Tinca tinca trattato con 2-ME, contro globuli rossi delle specie che, col siero normale, hanno dato agglutinazione positiva.

ANTIGENE	TITOLO DEL SIERO					
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Coniglio	++	+	—	—	—	—
Montone	++	++	+	—	—	—
Ratto	++	++	++	+	—	—
Criceto	+	—	—	—	—	—
Uomo A	++	+	—	—	—	—
Uomo B	++	++	+	—	—	—
Uomo AB	++	+	—	—	—	—
Uomo O	++	+	+	—	—	—
Anguilla	+	—	—	—	—	—

È da rilevare che il siero che è stato messo a reagire con globuli rossi di una specie, ad esempio montone, non reagisce più con globuli rossi delle altre specie. Questo fenomeno lascia supporre che nel siero di tinca sia presente un unico fattore agglutinante che reagisce con un medesimo tipo di antigene, presente in misura variabile o del tutto assente sui globuli rossi delle diverse specie. Quest'ultima ipotesi spiegherebbe anche il diverso grado di diluizione massima alla quale avviene ancora l'agglutinazione dei globuli rossi delle varie specie. Per determinare se tali agglutinine appartenessero o meno alla classe delle immunoglobuline, il siero fu trattato con 2-ME che inattiva le IgM ⁽²⁾ dei Vertebrati superiori. Dopo tale trattamento si verifica un notevole calo (Tabella II), ma non la totale scomparsa dell'attività agglutinante del siero, il che fa supporre la presenza di due tipi di agglutinine, un tipo 2-ME sensibile, l'altro 2-ME resistente. Sulla base di tali dati abbiamo ulteriormente esplorato, mediante analisi immunochimiche, la natura di queste eteroagglutinine. Modificando il metodo di Milgrom [9], usando come antigene globuli rossi di ratto agglutinati con siero di tinca, siamo riusciti

(2) IgM = immunoglobulina M ; IgG = immunoglobulina G presenti nel siero dei Vertebrati superiori.

ad ottenere un antisiero specifico contro le eteroagglutinine, che inibisce le agglutinazioni della Tabella I. All'immunolettroforesi le eteroagglutinine sono risultate costituite da tre diverse componenti proteiche. Di tali proteine una ha caratteristiche immunochimiche simili alle prealbumine, mentre le

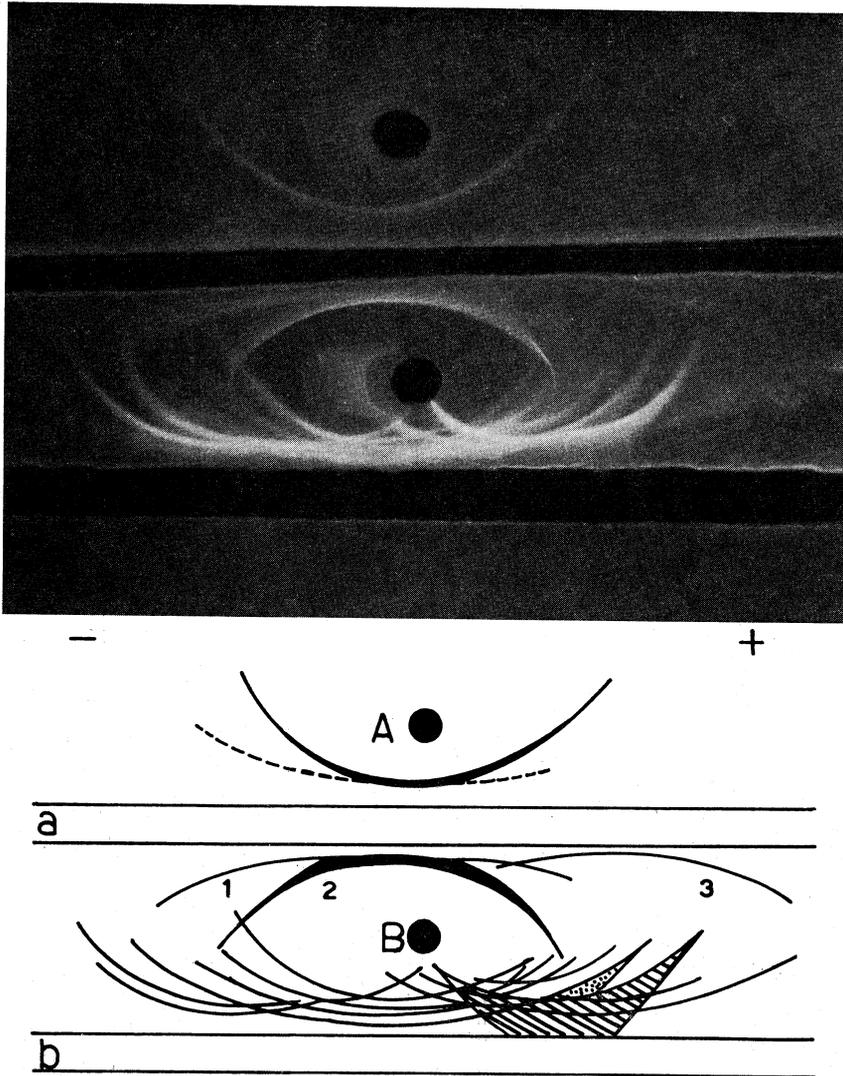


Fig. 1. - Immunolettroforesi in agar del siero di *Tinca tinca* L. Nel pozzetto A siero di tinca trattato con 2-ME; nel pozzetto B siero di tinca normale. In *a* siero anti-eteroagglutinine; in *b* siero anti-tinca *in toto*. Banda 1: mobilità γ ; banda 2: mobilità β_2 ; banda 3: mobilità prealbuminica.

altre due, con mobilità elettroforetica β_2 e γ , hanno tutte le caratteristiche che consentono di considerarle immunoglobuline (fig. 1). Dalla fig. 1 si può notare inoltre che nel siero trattato con 2-ME scompare del tutto la banda prealbuminica (fig. 1, 3) e diminuisce di molto la banda con mobilità γ (fig. 1, 1),

mentre rimane inalterata la banda con mobilità β_2 (fig. 1, 2). Dal complesso dei dati ottenuti ci sembra poter concludere che, delle eteroagglutinine di tinca studiate, le due con mobilità γ e β_2 appartengono alla classe delle immunoglobuline, e in particolare alle IgM (2-ME sensibili) e alle IgG (2-ME resistenti). L'ipotesi che si tratti di immunoglobuline è avvalorata anche dal fatto che su di esse (complesso eteroagglutinine-globuli rossi) agisce il complemento [10]. D'altra parte, se si ammette che le immunoglobuline hanno una ben precisa configurazione e che sono sintetizzate dalle plasmacellule, emerge il problema di come tali cellule possano sintetizzare una stessa classe di proteine, le immunoglobuline, in due condizioni completamente differenti: a temperatura ambiente (10-15°C) le eteroagglutinine naturali; a temperatura anormale (26-28°C) e solo dopo ripetuti stimoli antigenici, spesso accompagnati dall'impiego di adiuvanti, gli anticorpi indotti. La presenza nel sangue di tinca di una proteina con caratteristiche immunochimiche ed elettroforetiche di prealbumina e con potere agglutinante, ci induce a ipotizzare che in tali Vertebrati inferiori, accanto alla comparsa di meccanismi immunitari evoluti, vi sia quel meccanismo presente in parecchi gruppi di Invertebrati, nei cui fluidi circolanti è stata spesso dimostrata la presenza di fattori naturali agglutinanti [11-18]. Ovviamente tale ipotesi dovrà essere suffragata da ulteriori indagini.

LAVORI CITATI

- [1] BABES V. e RIEGLER P., *Über eine Fischepidemie bei Bukarest*, «Centralb. Bakt. Abt. II», 33, 438-449 (1903).
- [2] CUSHING J. E., *An effect of temperature upon antibody production in fish*, «J. Immunol.», 45, 123-126 (1942).
- [3] POST G., *Serum proteins and antibody production in rainbow trout (Salmo gairdneri)*, «J. Fish. Res. Bd. Canada», 23, 1957-1963 (1966).
- [4] KRANTZ G. E., REDDECLIFF J. M. e HEIST C. E., *Development of antibodies against Aeromonas salmonicida in trout*, «J. Immunol.», 91, 757-760 (1963).
- [5] ANDERSON D. P. e KLONTZ G. W., *Precipitating antibody against Aeromonas salmonicida in serum of inbred albino rainbow trout (S. gairdneri)*, «J. Fish. Res. Bd. Canada», 27, 1389-1393 (1970).
- [6] MUROGA K. e EGUSA S., *Immune response of the Japanese Eel to Vibrio anguillarum. I. Effects of temperature on agglutinating antibody production in starved Eels*, «Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.», 35, 868-874 (1969).
- [7] AMBROSIUS H. e SCHÄKER W., *Beiträge zur Immunbiologie poikilothermer Wirbeltiere. I. Immunologische Untersuchungen an Karpfen*, «Zool. Jb. Physiol. Bd.», 71, 73-88 (1964).
- [8] AMBROSIUS H., RICHTER R. e KÖNIG I., *Über die Immunglobuline von Knochenfischen*, «Acta Biol. Med. german.», 19, 599-601 (1967).
- [9] MILGROM F., LUSZCZYNSKI T. e DUBISKI S., *Preparation of antiglobulin sera*, «Nature», 177, 329 (1956).
- [10] AMIRANTE G. A., *Studi sulle caratteristiche del complemento di un Teleosteo (Tinca tinca L.)*, «Boll. Zool.», 37, 469 (1970).
- [11] SCHNITZLER St., KRÜGER W. e UHLENBRUCK G., *Hämagglutinine von Helix lucorum und Caucasotachea atrolabiata: Vergleichende Untersuchungen zu Anti-A^{HP} und Anti-A^{CN}*, «Z. Immun. Forsch.», 140, 156-167 (1970).

- [12] BROWN R., ALMODOVAR L. R., BHATIA H. M. e BOYD W. C., *Blood group specific agglutinins in Invertebrates*, « J. Immunol. », 100, 214-216 (1968).
- [13] TRIPP M. R., *Immunity in Mollusca*, « Transplant. Proc. », 2, 231-232 (1970).
- [14] HINK W. F., *Immunity in Insects*, « Transplant. Proc. », 2, 233-235 (1970).
- [15] PARISI V. e AMBROSLI MOGNONI G., *Primi dati sulla precipitazione della emocianina di Gasteropodi ed Anfineuri da parte dell'estratto di Turrítella communis L.*, « Rend. Acad. Naz. Lincei », 40, 686-691 (1966).
- [16] DU PASQUIER L. e DUPRAT P., *Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non spécifique chez l'Oligochète Eisenia foetida Sav.*, « C. R. Acad. Sc. Paris », 266, 538-541 (1968).
- [17] WEINHEIMER P. F., EVANS E. E., STROUD R. M., ACTON R. T. e PAINTER B., *Comparative immunology: Natural hemolytic system of the Spiny Lobster, Panulirus argus*, « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 130, 322-326 (1969).
- [18] HINK W. F. e BRIGGS J. D., *Bactericidal factors in haemolymph from normal and immune Wax Moth larvae, Galleria mellonella*, « J. Insect. Physiol. », 14, 1025-1034 (1968).