FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA

ATTI DELLE GIORNATE DI STUDIO SU:

IMMUNOGENETICA ANIMALE e

BRESCIA - 20 MAGGIO 1983

IMMUNOPATOLOGIA VETERINARIA

BRESCIA - 24 GIUGNO 1983

11

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLE GIORNATE DI STUDIO SU:
IMMUNOGENETICA ANIMALE E
IMMUNOPATOLOGIA VETERINARIA

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni Respiratorie del Bovino

1980 - L'oggi e il domani della Sulfamidoterapia Veterinaria

1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

1980 - Gli antibiotici nella pratica veterinaria

1981 - La Leucosi Bovina Enzootica

1981 - La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia

1982 - Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale

1982 - Le Elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino

1983 - Zoonosi ed animali da compagnia

1983 - Le infezioni da «Escherichia Coli» degli animali

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE

ISTITUTO
ZOOPOFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA
Brescia - Via Bianchi, 7

SOCIETÀ ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE

Atti delle giornate di studio su:

IMMUNOGENETICA ANIMALE

(Brescia 20 Maggio 1983)

IMMUNOPATOLOGIA VETERINARIA

(Brescia 24 Giugno 1983)

Edito a cura della

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia
Marzo 1984

Stampa: Tipolitografia Queriniana - Brescia

INDICE

GIORNATA DI STUDIO SU: IMMUNOGENETICA ANIMALE

A. GOBETTO: Presentazione . . . . . pag. 9

G. ROGNONI: Introduzione . . . . . » 11

G. POLI: La risposta immunitaria . . . . . » 13

A.O. CARBONARA: Genetica dela formazione degi anticorpi . . . . . » 21

D. IANNELLI e P. TAPPARELLI: Anticorpi monoclonali. Proprietà e possibili applicazioni in campo veterinario . . . . . » 31

R.L. SPOONER: Il complesso maggiore di istocompatibilità e malattie nei bovini . . . . . » 39

M. ZANOTTI e G. PAGNACCO: Il marcatore immunologico ed elettroforetico in campo zootecnico: considerazioni su un ventennio di ricerche in Italia . . . » 53

G. SARTORE: Considerazioni sui polimorfismi genetici . » 79

GIORNATA DI STUDIO SU: IMMUNOPATOLOGIA VETERINARIA

A. GOBETTO: Presentazione . . . . . » 91

P.S. MARCATO: Introduzione . . . . . » 93

P.S. MARCATO: Ortologia e patologia dei fenomeni immunologici. Lineamenti attuali . . . . . » 95

J. HOORENS e R. DUCATELLE: Le tecniche dell'immunoperossidasi nello studio della interazione virus-cellula ospite . . . . . » 115

G. TRAUTWEIN: Malattie da immunocomplessi negli animali . . . . . » 131

G. POLI: Le malattie autoimmuni . . . . . » 143

C. GENCHI: Alterazioni della risposta immunitaria nelle infestioni da elminti . . . . . » 147

S. CERRUTI SOLA: Aspetti immunologici della patogenesi della encefalite cimurrosa del cane . . . . » 161

GIORNATA DI STUDIO SU:
IMMUNOGENETICA ANIMALE

(Brescia 20.5.1983)

MODERATORI

G. Rognoni

G. Sartore

RELATORI

G. Poli
Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria - Università di Milano.

A. Carbonara
Istituto di Genetica Medica - Università di Torino.

D. Iannelli
Istituto di Produzione Animale - Facoltà di Agraria di Portici - Università di Napoli.

R. Spooner
Department of Immunology - Animal Breeding Organisation - Edinburgh.

M. Zanotti
Istituto di Zootecnia - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Milano.

G. Sartore
Cattedra di Zootecnia II - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Torino.

PRESENTAZIONE

Gentili Signore e Signori

Sono lieto di aprire, con brevi parole di saluto, i lavori di questa giornata di studio che ha come argomento l'immunogenetica animale. È per me motivo di compiacimento che abbiano accettato l'incarico di Moderatori due insigni studiosi del tema in discussione, i professori Rognoni e Sartore; essi per la loro preparazione culturale e scientifica costituiscono una sicura garanzia del successo di questa manifestazione. Esprimo ad entrambi la mia viva riconoscenza per quanto hanno saputo programmare in un tempo relativamente breve.

Un sincero ringraziamento rivolgo agli Enti organizzatori, qui rappresentanti dal prof. Gualandi, direttore dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia e dal dott. Pecorelli, Segretario Generale della benemerita Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche e della Scuola per la ricerca scientifica di Brescia.

Un particolare saluto e un ringraziamento esprimo infine agli illustri Relatori, ai Colleghi delle Università italiane, ai rappresentanti delle Società degli Allevatori e a voi tutti che intervenendo così numerosi rendete testimonianza dell'interesse dell'argomento in discussione.

L'immunogenetica è scienza relativamente giovane ed in continuo, rapido sviluppo, essa ha fini applicativi particolarmente interessanti ed importanti per noi Veterinari. Il suo scopo fondamentale, in campo zootecnico, è quello di utilizzare le risorse genetiche delle popolazioni animali per migliorarne l'efficienza produttiva tenendo anche presenti gli aspetti igienico-sanitari.

La S.I.S.VET. ha ritenuto opportuno programmare questa giornata di studio su un argomento di sicuro interesse proprio per fornire utili indicazioni agli allevatori e per prospettare ai giovani ricercatori nuove vie da percorrere. Mi auguro perciò che quanto emergerà dalle relazioni e dalla discussione possa essere proficuo per tutti.

PROF. A. GOBETTO

INTRODUZIONE DEL MODERATORE

Negli ultimi 30 anni si è sviluppata una linea di ricerca nel settore zootecnico sui cosiddetti caratteri immunologici e più tardi elettroforetici, delle tecniche del loro rilevamento, che dapprima vista con una certa diffidenza dalla zootecnia tradizionale, si è andata sempre più affermando.

Nel settore didattico, per la peculiarità delle tecniche utilizzate, per la specificità dell'approccio di studio nell'ambito della disciplina madre la «genetica» si è sviluppata sempre con maggiore autonomia il capitolo dell'immunogenetica che, debitamente mirata a taluni obiettivi, si è riconosciuta in alcuni corsi di laurea, disciplina necessaria di autonomo insegnamento.

Si sono così istituite le prime cattedre di Immunogenetica Zootecnica che in Italia si sono affermate nelle Facoltà dove la ricerca zootecnica si rifà più specificamente ad indagini ad indirizzo biologico generale.

L'incontro di oggi ha lo scopo di presentare al mondo operativo veterinario e zootecnico, attraverso il dibattito di più competenze, come la ricerca sul cosiddetto marcatore genetico rilevato con tecniche di tipo immunologico, elettroforetico e biologico similari abbia consentito di operare nella pratica della produzione animale e quali prospettive di ricaduta si possano intravedere nel futuro.

PROF. G. ROGNONI
(Istituto di Zootecnia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano)

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

G. Poli *

LA RISPOSTA IMMUNITARIA

Il ruolo fondamentale del sistema immunitario è quello di preservare l'integrità dell'organismo dai tentativi di invasione operati continuamente dai microrganismi e dall'aggressione provocata dagli agenti chimici.

Le molecole che sono riconosciute dall'ospite come estranee vengono chiamate «antigeni». La presenza di qualunque antigene nei tessuti ed organi rappresenta un pericolo per la omeostasi dell'organismo stesso ed è appunto il sistema immunitario che è deputato alla difesa verso questo insulto. Per operare in questo senso, l'organismo ha sviluppato divrsi sistemi che possono anche intervenire contemporaneamente e le cui finalità molteplici includono: l'asportazione dell'antigene dai tessuti, la neutralizzazione di agenti infettanti e di molecole biologicamente attive e la lisi delle cellule estranee.

Le cellule della risposta immunitaria

La cellula cardine che è predisposta a svolgere il ruolo principale nella risposta immunitaria è il «linfocita». Questa cellula, che è mobile e circola in tutti i tessuti ed organi dell'organismo, è pronta ad intervenire in difesa dell'ospite contro infezioni ovunque si realizzino. Non è però la cellula più aggressiva (i neutrofili ed i macrofagi sono infatti gli elementi più efficienti nell'eliminare gli antigeni), ma d'altra parte è l'unico elemento che ha la capacità intrinseca di riconoscere specificamente un antigene come «estraneo» (*not self*),

* Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria - Università di Milano.

cioè come qualche cosa non appartenente all'ospite ed è quindi in grado di innescare quei meccanismi che porteranno poi alla eliminazione dell'elemento invasore.

Per queste stesse caratteristiche, il linfocita è in grado di riconoscere le componenti dei tessuti dell'ospite come «self» o «proprie» e quindi fa si che tutti i meccanismi del sistema immunitario rimangano sempre funzionanti, ma areattivi verso l'ospite stesso. Questa abilità a distinguere il «not self» dal «self» e cioè le sostanze estranee e potenzialmente pericolose delle componenti tissutali dell'organismo stesso è una caratteristica essenziale ed esclusiva del linfocita; è cioè il punto di partenza per ogni tipo di reattività immunologica.

Il riconoscimento dell'antigene ad opera del linfocita innesca una serie di eventi che conducono alla distruzione e/o alla rimozione dell'agente patogeno. Inizialmente il linfocita va incontro ad alcune imponenti alterazioni morfologiche: la sua dimensione aumenta marcatamente, quale diretta conseguenza dell'aumento della massa citoplasmatica. Il linfocita attivato, denominato «immunoblasto», può svolgere molte funzioni immunitarie, ma in genere necessita un'ulteriore differenziazione per realizzare la massima e completa risposta immunologica.

Le funzioni che tale cellula può svolgere, dopo attivazione, sono molteplici ed indirizzate a mettere due sistemi che interagiscono tra loro e precisamente:

1) *L'immunità umorale* che si riferisce alla produzione degli anticorpi, cioè molecole glicoproteiche capaci di fissarsi all'antigene stimolatore. Più precisamente, queste molecole vengono prodotte dagli stessi linfociti dopo essersi trasformati in plasmacellule.

2) *L'immunità cellulo-mediata* che si riferisce invece a quelle funzioni operate direttamente da cellule o da loro prodotti, diversi però dalle molecole anticorpali. Più precisamente, determinati linfociti non si differenziano in plasmacellule «anticorpo-secernenti» ma partecipano direttamente alla distruzione dell'antigene. Quando per esempio la sostanza estranea è una cellula, i linfociti attivati o altre cellule attivate dai linfociti si fissano ad essa ed attraverso meccanismi non ancora del tutto conosciuti sono capaci di distruggerla.

Il rigetto dei trapianti di cute o di organi (es. reni) sono classici esempi di una distruzione immunitaria cellulo-mediata.

Oltre al linfocita, cellula immunocompetente per eccellenza, altri elementi cellulari, sia pur con diverse modalità, vengono impiegati nella risposta immunologica dell'organismo e precisamente:

— *il granulocita neutrofilo*, che esercita prevalentemente una funzione linfocitaria nei confronti degli antigeni.

— *Il granulocita eosinofilo*, che esercita pure una funzione fagocitaria con predilezione però per quei complessi antigene-anticorpo che compaiono nel corso di malattie allergiche, nelle parassitosi e nella ipersensibilità da farmaci.

— *La mast-zelle ed il granulocita basofilo*, che si differenziano soprattutto perché la prima non è circolante, esplicano funzioni simili: posseggono recettori specifici per la porzione Fc della molecola anticorpale IgE e la legano così alla loro superficie. Sono relattie da immunocomplessi.

— *La plasmacellula*, che come già detto rappresenta un particolare stadio funzionale di alcune classi di linfociti, è la principale produttrice di immunoglobuline e quindi di anticorpi di tipo solubile.

— *Il macrofago*, che, sebbene agisca in modo non specifico, rappresenta un altro elemento cardine della risposta immunitaria. Questa cellula, che deriva dal monocita del sangue circolante dopo il suo passaggio nei tessuti, è capace di almeno tre attività correlate ai fenomeni immunitari: 1) rappresenta un potente fagocita e quindi gioca un ruolo cruciale nella demolizione ed eliminazione delle sostanze estranee penetrate nell'organismo; 2) possiede una capacità chemiotattica che la fa migrare attivamente nei siti dove verrà realizzata la reazione immunitaria; 3) può esporre sulla sua superficie gli antigeni i quali, se presentati in questo modo ai linfociti, divengono fortemente immunogenici, cioè sono più idonei a stimolare la risposta immunitaria del linfocita. Gli antigeni che invece sfuggono a questo «trattamento» operato dal macrofago, stimolano solo blandamente o per nulla la risposta immunitaria.

Il macrofago per essere efficiente deve però a sua volta venire

attivato dai fattori solubili liberati dai linfociti al loro incontro e riconoscimento dell'antigene: questo fenomeno, come vedremo, lega la fagocitosi macrofagica alla risposta immunitaria del linfocita.

Compartimentazione anatomo-funzionale del sistema immunitario: linfociti B e linfociti T

Tra i due complessi universi della «immunità umorale» e della «immunità cellulo-mediata» vi è una ben precisa compartimentazione anatomica: vi sono infatti due distinti organi linfoidi centrali che sono responsabili dello sviluppo e mantenimento di due diverse popolazioni di linfociti. Più in particolare, il timo è l'organo responsabile dei linfociti coinvolti nella immunità cellulo-mediata, mentre l'organo linfoide centrale implicato nel controllo dei linfociti che secernono anticorpi è rappresentato, nei volatili, dalla borsa di Fabrizio e nei mammiferi da una struttura borsa-equivalente (tonsille palatine, apparato linfatico oro-faringeo, appendice, altro).

Si riconoscono quindi due distinte famiglie di linfociti presenti nel sangue, nei linfonodi, nella milza e nei tessuti linfoidi: gli uni che derivano dalla borsa di Fabrizio o da una struttura borsa-equivalente e per questo denominati «linfociti B» e gli altri che derivano dal timo e quindi denominati «linfociti T».

Markers di superficie dei linfociti B e T

I linfociti B non possono venire distinti, per lo meno al microscopio ottico o al microscopio elettronico a trasmissione, dai linfociti T.

D'altra parte sulla superficie dei linfociti B sono state messe in evidenza delle immunoglobuline che non paiono invece rilevabili sulla superficie dei linfociti T. Più precisamente si è osservato che il linfocita B maturo, a riposo, veicola sulla sua superficie delle immunoglobuline di una determinata classe anticorpale, specifiche per un determinato antigene, per cui solo quest'ultimo viene riconosciuto da tale linfocita mentre tutti gli altri antigeni vengono ignorati.

In termini di popolazioni di cellule B possiamo quindi avere cellule con IgG sulla loro superficie, altre cellule con IgA ed altre ancora con IgM o IgD o IgE.

Oltre alle immunoglobuline, che rappresentano quindi i più caratteristici *markers* di superficie, i linfociti B veicolano altri *markers* di membrana quali dei particolari recettori per la terza componente attivata del completamento ed altri per la porzione Fc delle immunoglobuline.

Diverse sono invece le caratteristiche dei *markers* di superficie che ci consentono di riconoscere i linfociti T.

Già si è accennato ai dubbi sull'esistenza di immunoglobuline di superficie sulle cellule T. La cosa certa è che se i linfociti T posseggono immunoglobuline di superficie (es. IgT), queste sono sicuramente in numero limitato e comunque non tali da poter essere evidenziate mediante le tecniche di immunofluorescenza che si impiegano per riconoscere le immunoglobuline presenti sulle cellute B.

L'identificazione dei linfociti T nel topo è stata invece molto facilitata dalla scoperta di un antigene di superficie delle cellule T, denominato *theta* Ø.

Nelle altre specie animali, non è ancora stato definito compiutamente un equivalente dell'antigene Ø del topo. Vi è comunque un metodo che permette un rapido riconoscimento dei linfociti T umani e bovini, soprattutto nel sangue: le cellule T dell'uomo e del bovino posseggono infatti la proprietà di aderire agli eritrociti di pecora (per il bovino è necessario un pre-trattamento con neuramidasi) e quindi, quando una sospensione di cellule del sangue periferico viene mescolata con una sospensione di tali eritrociti, si osserva che circa il 50-60% (nei bovini il 35-40%) dei linfociti sono circondati da un certo numero di emazie a formare delle tipiche «rosette».

Innesco dei linfociti B per la produzione anticorpale

Ancor prima che fosse riconosciuta la distinzione tra cellule B e T, la teoria della selezione clonare di Burnett aveva ipotizzato che un linfocita destinato alla produzione di anticorpi fosse predeterminato

a riconoscere ed a rispondere ad un numero ben limitato di antigeni. Oggi si ritiene addirittura che una determinata cellula B possa riconoscere solo un determinante antigenico e perdipiù possa rispondere producendo anticorpi solo di una determinata classe di immunoglobuline.

Come avviene questo processo di riconoscimento dell'antigene? È già stato detto che il linfocita B maturo, a riposo, possiede sulla sua superficie delle immunoglobuline, di una determinata classe, specifiche per un particolare antigene, per cui solo quest'ultimo viene riconosciuto da tale linfocita mentre tutti gli altri antigeni vengono ignorati.

Questo significa che una cellula B, anche prima di venire attivata dall'antigene, possiede sulla sua membrana esterna un piccolo «campione» di quegli anticorpi che sarà poi in grado di produrre.

Queste immunoglobuline di superficie dei linfociti B sono distribuite in modo piuttosto diffuso sulla membrana linfocitaria e, parimenti ad altre proteine localizzate sulla membrana citoplasmatica «semi-fluida», sono presenti come «isole di proteine in un mare di lipidi» e sono quindi mobili entro lo spessore della membrana stessa.

Questo evento può essere dimostrato chiaramente impiegando la misroscopia a fluorescenza: le cellule B, a riposo, presentano le loro immunoglobuline di superficie in forma diffusa o ad anello; quando vengono però a contatto con l'appropriato antigene si riuniscono prima in ammassi e quindi si muovono a formare un cappello («cap») sopra l'apparato del Golgi. Dopo questo evento il cappello può venire inglobato oppure liberato dalla cellula o ancora possono realizzarsi entrambi i fenomeni. Si avvia in questo modo la trasformazione del linfocita che porterà alla divisione mitotica e, finalmente, alla sintesi degli anticorpi.

Il ruolo dei macrofagi nella produzione anticorpale

Da molto tempo ormai è noto il coinvolgimento dei macrofagi nella produzione degli anticorpi, ma il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro. Si è pensato ad un intervento dei macrofagi che

digerirebbero gli antigeni complessi in modo da renderli «palatabili» per le cellule B. O ancora, dopo ingestione dell'antigene, i macrofagi sintetizzerebbero un particolare tipo di RNA informatore che, unito o non all'antigene, verrebbe trasferito ai linfociti B competenti per l'innesco della produzione anticorpale.

Comunque sia è la membrana di superficie del macrofago che gioca il ruolo principale; infatti un antigene, quando è associato alla membrana di superficie del macrofago, si dimostra altamente immunogenico per i linfociti. È chiaro che l'interazione tra l'antigene, il linfocita T ed il macrofago rappresenta un sistema efficacissimo per innescare il linfocita B. D'altra parte gli antigeni T-indipendenti, che non necessitano cioè aiuto dai linfociti T, non hanno neppure bsogno dell'intervento dei macrofagi. Quindi tale situazione può essere generalizzata nei seguenti termini: gli antigeni T-dipendenti coinvolgono tre tipi di cellule (linfociti T, macrofagi e linfociti B); mentre gli anitgeni T-indipendenti coinvolgono solo un tipo cellulare (i linfociti B).

Linfociti T e immunità cellulo-mediata

La possibilità di distruggere cellule bersaglio, sulla cui superficie sia presente una sufficiente quantità di antigene specifico, costituisce la più tipica manifestazione delle reazioni della immunità cellulare. Questi fenomeni diretti contro singole cellule o tessuti (citotossicità) si realizzano attraverso meccanismi diversi, non esclusivi dei linfociti T, ma che coinvolgono altri elementi cellulari.

Più precisamente, il linfocita T, attivato dall'antigene specifico, può esplicare fenomeni di citotossicità aderendo direttamente alla cellula bersaglio e provocandone la lisi, oppure «armando», con i suoi stessi recettori per l'antigene, i macrofagi che divengono quindi capaci di individuare il bersaglio specifico e di distruggerlo. Ancora, il linfocita può intervenire, nei confronti dell'elemento da distruggere attraverso particolari prodotti solubili che sintetizza rapidamente dopo ativazione e che vengono nel loro insieme chiamati «linfochine» o «mediatori dell'immunità cellulo-mediata».

Le linfochine sinora individuate sono molte ma poiché per la

maggior parte di esse non sono ancora note le caratteristiche fisico-chimiche, la loro definizione e classificazione è basata esclusivamente sulle loro attività biologiche, per lo più evidenziabili *in vitro*.

Tra le linfochine più studiate ricordiamo:

1) il *macrophage inhibitory factor* (MIF), che inibisce la migrazione dei macrofagi e che si identifica anche con il *macrophage activating factor* (MAF), che attiva il macrofago potenziandone la capacità fagocitaria;

2) le *linfocitotossine* che distruggono direttamente le cellule bersaglio;

3) i *fattori che attivano i linfociti* inducendoli a proliferare ed a blastizzare;

4) i *fattori chemiotattici*, che richiamano nel sito in cui si realizza la reazione verso l'antigene sia i macrofagi, sia i leucociti, sia gli eosinofili;

5) il *leukocyte inhibitory factor* (LIF) che inibisce la migrazione dei leucociti;

6) l'*interferone*, sostanza che blocca specificamente la replicazione dei virus;

7) il *transfer factor* che conferisce ai linfociti non attivati una rapida e specifica sensibilizzazione verso l'antigene che ne ha stimolato la produzione (questo prodotto non viene però liberato spontaneamente ma può essere estratto dai linfociti attivati).

Vanno infine ricordati, tra i fenomeni di citotossicità, quelli mediati dalle cosiddette cellule «killer» (K).

Queste cellule, che posseggono caratteri morfologici simili ai linfociti ma che non si identificano in nessuna delle popolazioni sinora descritte, sono capaci di attaccare e distruggere qualunque cellula bersaglio su cui abbiano aderito specificamente degli anticorpi di tipo IgG, diretti verso antigeni di superficie. Il loro ruolo nelle reazioni immunologiche è ancora tutto da chiarire; di sicuro è stato osservato che agiscono contro qualunque bersaglio e non necessitano quindi di stimoli antigenici specifici (da questo intervento «cieco» è derivato il singolare nome che è stato loro attribuito).

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

A.O. CARBONARA *

GENETICA DELLA FORMAZIONE DEGLI ANTICORPI

Le immunoglobuline (Ig) sono una famiglia di proteine caratterizzate da una estrema eterogeneità sia funzionale per quando riguarda l'attività anticorpo sia strutturale per quanto riguarda le caratteristiche fisico-chimiche (peso molecolare, struttura primaria) (Ceppellini, 1967; Putnam, 1977; Carbonara e De Marchi, 1978). Se da una parte questa estrema eterogeneità ha rappresentato la maggior difficoltà per gli studi biochimici e genetici, dall'altra essa costituisce uno dei problemi di maggior interesse biologico nella genetica degli eucarioti. Storicamente questa difficoltà è stata evitata analizzando le proteine omogenee prodotte da cloni plasmacellulari neoplastici. Riassumeremo in breve i dati di base che hanno contribuito a definire il sistema delle immunoglobuline per poi esporre i recenti sviluppi della genetica molecolare che hanno ulteriormente sottolineato il peculiare interesse del sistema.

Il modello molecolare di base, comune a tutte le Ig, è quello di una struttura tetramerica con due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) unite da ponti disulfuro. Sia le catene H sia le catene L sono composte da una sequenza N-terminale variabile (V) e da una porzione C-terminale costante (C). L'eterogeneità delle Ig è stata inquadrata in tre categorie. Le prime due, *isotipica* e *allotipica* sono a carico delle regioni C e risultano rispettivamente: l'eterogeneità isotipica dall'esistenza del genoma di ogni individuo di diversi loci per ogni classe di catene H (μ, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, ε, δ) e per ogni tipo di catene L ($\varkappa$, $\lambda 1$ e $\lambda 2$); e l'eterogeneità allotipica dal polimorfismo genetico dei vari loci (gruppi Gm per i loci gamma, Am per i loci alfa ed Km per i locus K) (Van Loghem, 1978).

* Istituto di Genetica Medica, Università di Torino.

Il terzo livello di eterogeneità, detta *idiotipica*, riguarda le regioni V e deriva dalla diversa sequenza aminoacida nei siti combinatori di anticorpi con diversa specificità antigenica (regioni ipervariabili). Questi tre livelli contribuiscono diversamente alla eterogeneità complessiva delle Ig: calcolando l'esistenza di un minimo di 9 loci H e 3 loci L ciascuno con due varianti alleliche, ed ammettendo la combinazione di qualunque catena H con qualunque catena L, si può facilmente calcolare che il numero delle possibili varianti isotipiche di Ig è di 27, quello delle varianti allotipiche di 270; considerando invece l'eterogeneità idiotipica si stima che possano esistere circa 10^7 diverse molecole di Ig con diverse specificità anticorpo.

Le regioni C e V, pur appartenendo alla stessa catena polipeptidica, sono sotto separato controllo genetico. Le basi di questa teoria, contraria al precedente dogma «*un gene - una catena polipeptidica*», consistevano inizialmente in una serie di osservazioni indirette (riscontro nello stesso clone plasmacellulare di identiche sequenze V integrate con diverse sequenze C, mielomi biclonali con identico idiotipo, etc.), e sono state ampiamente confermate dalla analisi diretta a livello del DNA come vedremo più avanti.

L'organizzazione genomica dei geni delle Ig consiste in tre «supergeni», uno per le catene H, uno per le catene κ ed uno per le catene λ, localizzati su diversi autosomi. Ogni supergene comprende un insieme di vari loci C strettamente associati (come dimostrato dal linkage dei marcatori allotipici Gm, Am) e separatamente un insieme di geni V. Il numero esatto dei geni V non è stato precisato né dai dati immunologici né dai dati di genetica formale, ma sicuramente deve almeno corrispondere al numero di isotipi V (chiamati gruppi o sottogruppi) riconoscibili in base ai residui facenti parte della regione V, ma non compresi nella regione ipervariabile. La diversità di queste ultime poteva essere variamente spiegata o sulla base di mutazioni somatiche a partire da un numero limitato di geni V (*teoria delle mutazioni somatiche*) o ammettendo un repertorio molto elevato di geni V trasmessi ereditariamente (*teoria della linea germinale*) (Autori vari, 1977; Hood e Talmage, 1970; Jerne, 1971).

La possibilità di approfondire gli studi di questa problematica tanto complessa e di dirimere le controverse interpretazioni genetiche sulla diversità degli anticorpi è stata offerta dalle nuove tecnologie

della genetica molecolare. Esse sono legate soprattutto allo sviluppo di tecniche quali:

i) digestione del DNA con endonucleasi di restrizione, cioè enzimi capaci di scindere il DNA a livello di specifiche sequenze nucleotidiche con la formazione di frammenti di variabile lunghezza; questi possono essere separati mediante elettroforesi su agaroso e riconosciuti mediante l'ibridazione con *probes* radioattivi;

ii) la clonazione di queste sequenze nucleotidiche mediante l'inserzione in adatti vettori come fagi o plasmidi con tecniche di ingegneria genetica; diventa così possibile la sintesi di grandi quantità di tratti di genoma identici tra loro e disponibili per analisi di sequenze. Inoltre, come per lo studio di prodotti genici, anche lo studio a livello del DNA si è servito di materiale *omogeneo* ottenuto da singoli cloni plasmacellulari neoplastici. L'importanza di questo è essenziale in quanto, come vedremo, la differenziazione clonare delle plasmacellule non è limitata alla espressione selettiva del gene, ma comporta il loro riarrangiamento fisico a livello del DNA durante le varie fasi della differenziazione cellulare.

Schematicamente i principali problemi affrontati dalla genetica molecolare delle Ig sono:

a) L'integrazione dei geni V e C sia per le catene L che per le catene H.

b) L'esclusione allelica, cioè la selettiva attivazione in un clone plasmacellulare di uno solo degli alleli in un supergene H ed in un supergene L (esclusione allelica propriamente detta) e di uno solo dei vari isotipi (esclusione isotipica).

c) I riarrangiamenti a livello del DNA e del mRNA durante i diversi stadi della differenziazione del clone plasmacellulare: dal linfocita pre-B (che sintetizza solo catene μ monomeriche) allo stadio di linfocita B maturo (con IgM e IgD di membrana) fino alla espressione sequenziale dei diversi isotipi (il cosiddetto *switch* da IgM ad IgG, IgA, etc.).

d) La problematica sulla origine somatica o germinale della diver-

sità degli anticorpi mediante valutazione del numero dei geni V per corredo aploide.

L'integrazione dei geni C e V

La prima dimostrazione sperimentale della integrazione dei geni C e V fu ottenuta nel 1976 da Tonegawa et al. per le catene lambda del topo, confrontando i frammenti di restrizione ottenuti da DNA embrionale e DNA di un mieloma plasmacellulare IgG lambda. Per riconoscere la localizzazione dei geni Vλ e Cλ furono usati come *probes* l'mRNA specifico per la catena leggera isolato dal citoplasma del mieloma o cDNA corrispondenti ai soli tratti V e C della stessa catena. I risultati dimostravano chiaramente che nel DNA embrionale i geni Cλ e Vλ erano localizzati in due diversi frammenti di restrizione, mentre nel DNA del mieloma veniva riscontrato un nuovo frammento di restrizione contenente sia il gene Cλ che Vλ. Successivamente gli stessi dati vennero confermati per i supergeni K ed H sia nel topo che nell'uomo (Autori vari, 1981 a, b).

L'interpretazione di questa fondamentale osservazione è che la differenziazione di un clone plasmacellulare a livello del supergene H e di uno dei due supergeni K o L comporta un evento di ricombinazione somatica mediante il quale un determinato gene V viene integrato con il corrispondente gene C.

Le conseguenze della traslocazione V1C sono duplici:

a - La cellula acquisisce la capacità di sintetizzare Ig grazie alla formazione di due nuovi geni VC complessi (uno per la catena H ed uno per la catena L) che, trascritti in mRNA, sono espressi come catene H e catene L.

b - Il nuovo assetto VC viene trasmesso per mitosi a tutte le cellule derivanti dalla capostipite in cui è avvenuta la ricombinazione dando così origine ad un clone; questo sarà caratterizzato rispetto agli altri cloni plasmacellulari, dall'espressione di un determinato gene V_H e di un determinato gene V_L che lo rendono unico e ne determinano la specificità anticorpale ed idiotipica.

Ulteriori indagini, espletate mediante metodologie del DNA ricombinante, hanno fornito la sequenza nucleotidica dei segmenti di DNA che codificano per i tratti V e C e delle sequenze ad essi adiacenti consentendo di dedurre anche i meccanismi molecolari della integrazione (Autori vari, 1981a, 1981b; Black et al., 1978; Sakano et al., 1980). I dati ottenuti hanno dimostrato che in realtà nei tre supergeni la sequenza V è controllata da più categorie di segmenti nucleotidici (V_K e J_K per le catene K; $V\lambda$ e $J\lambda$ per le catene λ; V_H, D_H e J_H per le catene H) che nel DNA embrionale sono tra loro separati, mentre nel DNA plasmacellulare sono contigui a formare una unica sequenza V in prossimità della sequenza C. La sequenza *intron* di circa 1000 nucleotidi che separa i geni VJ o VDJ dal gene C viene trascritta e successivamente rimossa dal mNRA (processo detto *splicing*).

La formazione del gene V completo avviene attraverso una traslocazione sito-specifica guidata da precise sequenze nucleotidiche. Una caratteristica essenziale del processo è la possibilità di molteplici combinazioni tra uno qualunque dei geni V ed uno qualunque dei geni J contribuendo in parte alla diversità del prodotto finale. Una ulteriore variabilità può originare nel punto di unione tra i vari segmenti anche se limitatamente alla terza regione ipervariabile.

L'esclusione allelica

Una delle caratteristiche più importanti di ogni clone plasmacellulare è la sintesi di Ig omogenee ,cioè composte da un unico tipo di catene H e catene L. Questo risultato deriva dalla attivazione in ogni cellula di uno solo degli alleli del supergene H e del supergene L, fenomeno denominato *esclusione allelica.* Ad esempio un individuo eterozigote Gm^a/Gm^i per il locus $\lambda 1$ risulta un mosaico, cioè possiede cloni plasmacellulari (Gm (f). Questa modalità di espressione è peculiare dei geni Ig e può essere paragonata solo con l'inattivazione del cromosoma X nella femmina, anche se le basi molecolari ed il significato biologico dei due fenomeni sono probabilmente diversi.

È risultato che molteplici meccanismi molecolari sono responsabili della esclusione allelica (Coleclough et al., 1981; Joho and

Weissman, 1980; Perry et al., 1980). Uno dei più semplici è rappresentato dalla traslocazione VJ e VDJ limitata ad uno solo dei supergeni, rispettivamente L ed H. Questa situazione è stata osservata in linfociti B normali, nei quali è ancora presente una significativa aliquota (circa il 50% del DNA nell'assetto embrionale non riarrangiato e corrispondente al supergene non espresso sul cromosoma omologo. Altri meccanismi più complessi sono stati riscontrati sia in mielomi che plasmacellule normali caratterizzati dalla presenza del riarrangiamento su entrambi i cromosomi omologhi. Tuttavia in questi casi è stato dimostrato che solo il supergene espresso presenta un riarrangiamento corretto, mentre il supergene omologo ha subìto una traslocazione aberrante con un assetto genico che per diversi motivi non può essere espresso. Tra i possibili assetti non produttivi sono state riscontrate traslocazioni *frame-shift*, delezioni di sequenze segnale, traslocazioni incomplete (per esempio solo VD o solo DJ).

La differenziazione del clone plasmacellulare

L'integrazione dei geni V e C rappresenta sicuramente l'evento fondamentale ed indispensabile per la sintesi delle catene immunoglobuliniche. Si sa oggi che essa non è simultanea a livello dei tre supergeni, ma avviene secondo una successione che condiziona il caratteristico fenotipo dei vari stadi maturativi dal pre-B linfocita alla plasmacellula matura sia prima che dopo lo stimolo antigenico. In un primo tempo la traslocazione interessa il supergene H con la formazione del complesso VDJ e la sua integrazione con il gene Cμ. Questo evento è seguito dalla comparsa nel citoplasma di molecole μ isolate. Segue la traslocazione VC su uno dei supergeni L, la sintesi di catene leggere e l'assemblaggio di molecole complete μ_2L_2 monomeriche (Autori vari, 1981 a, b).

I passi successivi della differenziazione consistono:

i - nella inserzione delle molecole IgM a livello della membrana cellulare insieme alle IgD;

ii - nella secrezione di IgM 19S e/o IgD;

iii - il cosiddetto *switch* del clone da IgM a IgG o IgA.

Queste fasi successive avvengono attraverso meccanismi molecolari diversi: le fasi *i* ed *ii* sembrano controllate da processi di regolazione post-trascrizionali in cui un mRNA policistronico della catena H può generare quattro prodoti genici diversi IgH e/o IgD di membrana e/o secrete, con lo stesso idiotipo, grazie all'intervento di processi di *splicing* differenziali.

La fase *iii* al contrario comporta rimaneggiamenti a livello del DNA successivi e distinti dalla traslocazione VDJ. In breve si passa da una sequenza nucleotidica VDJ-intron-Cμ ad una VDJ-intron-Cγ mediante delezione dell'intero tratto del DNA compreso tra l'intron che precede Cμ fino all'intron che precede Cγ (Rabbitts et al., 1980; Autori vari, 1981a, 1981b). Particolare significativo, questa delezione sembra interessare entrambi i supergeni, sia quello funzionalmente riarrangiato, sia quello non espresso.

Origine della «diversità degli anticorpi»

Come ultimo argomento, ma non il meno importante, esamineremo i contributi della genetica molecolare nella problematica più dibattuta della immunologia, cioè quella relativa alla diversità degli anticorpi. Attualmente, sulla base di numerosi risultati sperimentali, il problema non è più se sia valida la teoria germinale o quella somatica, ma in che misura ed a quale livello questi due meccanismi, dimostrati entrambi operanti, contribuiscono al repertorio complessivo delle specificità anticorpali.

Come abbiamo già visto la traslocazione VJ e VDJ generano, grazie alle molteplici possibilità combinatorie, una notevole variabilità delle regioni V_H e V_L soprattutto a livello della terza regione ipervariabile. A questo dato rimane da aggiungere l'informazione del numero dei geni V trasmessi ereditariamente.

Impiegando in esperimenti di idridazione *probes* contenenti un gene V embrionale Rabbits e coll. nel laboratorio di Cambridge (Rabbitts et al., 1980; Autori vari, 1981a, 1981b) hanno valutato in circa 15 o 20 il numero dei geni V presenti nel corredo aploide sia per il supergene K 7-10 geni V_H per ogni sottogruppo per un numero complessivo di 200 geni.

Queste dimensioni relativamente elevate del repertorio V presente nlela linea germinale sono in accordo con il numero di specificità ioditipiche trasmesse ereditariamente e potrebbero giustificare una ampia parte del repertorio complessivo (220 geni V_K x J_K = 1000; 1000 geni V_K x 1000 geni V_H = 10^6 specificità anticorpali). Su questa base sicuramente si aggiunge un'ulteriore variabilità derivante da mutazioni somatiche che interesserebbero il genoma riarrangiato dei linfociti B nella amplificazione e differenziazione successiva allo stimolo antigenico. Dati preliminari di diversi laboratori concordano nel riscontro di mutazioni puntiformi localizzate preferenzialmente nel gene V e nelle sequenze ad esso adiacenti di ibridomi secernenti IgG (Bothwell et al., 1981; Gearhart et al., 1981).

BIBLIOGRAFIA

1) Autori Vari (1977): Origin of Lymphocyte diversity. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41.
2) Autori Vari (1981a): Organization of Immunoglobulin genes. Immunol. Reviews 59.
3) Autori Vari (1981b): Movable genetic elements. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 45.
4) Bentley D. L., Rabbits T. H. (1981): Human immunoglobulin gene number; implications for the origin of lymphocyte diversity. Cell 24: 613.
5) Bothwell A.L.M., Maskind M., Reth M., Imanishi-Karl T., Rajemsky K., Baltimore D. (1981): Cell 24: 625-627.
6) Brack C., Hirama M., Lenhard-Scholler R., Tonegawa S. (1978): A Complete Immunoglobulin Gene Is Created by Somatic Recombination. Cell 15: 1.
7) Carbonara A., De Marchi M. (1978): Genetica delle immunoglobuline. Piccin ed., Padova.
8) Ceppellini R. (1967): Genetica delle immunoglobuline. Atti AGI, 12: 1-131.
9) Coleclough C., Perry R. P., Karjalainen K., Weigert M. (1981): Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. Nature 290: 372-378.
10) Gearhart P. J., Johnson N. D., Douglas R., Hood L. (1981):

IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. Nature 291: 29.

11) HOOD L., TALMAGE D. (1970): Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability. Science 168: 325.

12) JERN- N. K. (1971): The somatic generation of immune recognition. Eur. J. Immunol. 1: 1.

13) JOHO R., WEISSMAN I. L. (1980): V-J joining of immunoglobulin k genes only occurs on one homologous chromosome. Nature 284: 179-181.

14) MATTHYSSENS G., RABBITTS T. H. (1980b): Structure and multiplicity of human immunoglobulin heavy chain variable region genes. Proc. nat. Acad., Sci. USA 77: 6561.

15) PERRY R. P., KELLEY D. E., COLECLOUGH C., SEIDMAN J. G., LEDER P., TONEGAWA S., MATTHYSSENS G., WEIGERT M. (1980b): Transcription of mouse k chain genes: implications for allelic exclusion. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 77: 1937-1941.

16) PUTNAM F. W. (1977): Immunoglobulins. I. Structure - II. Antibody specificity and genetic control - III. Comparative Biochemistry and evolution, in Plasma Proteins, Acad. Press.

17) RABBITTS T. H., MATTHYSSENS G., HAMLYN P. H. (1980c): Contribution of immunoglobulin heavy chain variable region genes to antibody diversity. Nature 284: 238.

18) RABBITTS T. H., FORSTER A., DUNNICK W., BENTLEY D. L. (1980): The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch. Nature, 283: 351.

19) SAKANO H., MAXI R., KUROSAWA Y., ROEDER W., TONEGAWA S. (1980): Two types of somatic recombination are necessary for the generatio of complete immunoglobulin heavy chain genes. Nature 286: 676.

20) TONEGAWA S., HOZUMI N., MATTHYSSENS G., SCHULLER R. (1976): Somatic changes in the content and context of immunoglobulines genes. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41: 877.

21) VAN LOGHEM E. (1978): Genetic studies on human immunoglobulins. In WEIZ D. M., Handbook of experimental immnuology, vol. I, II, Blackwell.

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

D. Iannelli e P. Capparelli *

ANTICORPI MONOCLONALI. PROPRIETA' E POSSIBILI APPLICAZIONI IN CAMPO VETERINARIO

Introduzione

La risposta anticorpale di un organismo è estremamente eterogenea. Nella milza di un topo o di un uomo esiste forse un milione (o più) di cloni diversi di linfociti B, da cui derivano le plasmacellule. Ciascun clone sviluppa la capacità di produrre anticorpi in grado di riconoscere un solo determinante antigenico. Questa è l'idea centrale della teoria della selezione clonale sull'origine degli anticorpi. Quando si inietta un antigene, l'animale reagisce producendo anticorpi diversi diretti cotro i diversi determinanti antigeni presenti su di un singolo antigene. Ma produce anche anticorpi differenti (per proprietà biochimiche e fisiologiche) contro uno stesso determinante antigenico .Kohler (1976) ha accertato che un singolo topo è in grado di produrre 43 diversi tipi di anticorpi contro un singolo determinante antigenico della β-galattosidasi e 1.200 diversi tipi di anticorpi contro l'intera molecola della β-galattosidasi. In definitiva, l'immunizzazione, di norma, stimola una risposta policlonale (anche quando l'antigene è puro) e, di conseguenza, gli anticorpi prodotti in vivo sono molto eterogenei.

li anticorpi monoclonali sono anticorpi prodotti da un singolo clone di plasma-cellule: tutte le molecole anticorpali hanno la stessa sequenza amino-acidica e quindi la stessa specificità ed affinità. Kohler e Milstein (1975) dimostrarono che è possibile costruire un mieloma ibrido — od ibridoma — in grado di formare anticorpi contro un an-

* Istituto di Produzione Animale - Facoltà di Agraria di Portici - Università di Napoli.

tigene predeterminato. Essi fusero gli splenociti di un topo immunizzato con eritrociti di pecora con una linea cellulare mielomatosa, anch'essa di topo. Ciascuna cellula ibrida mostrò di avere ereditato dalla linae parentale tumorale la capacità di crescere in coltura e dal linfocita che aveva partecipato alla fusione la capacità di produrre anticorpi contro un singolo determinante antigenico (quello riconosciuto dal linfocita); in definitiva, cioè, di produrre anticorpi monoclonali.

La differenza fondamentale tra anticorpi prodotti da un ibridoma ed anticorpi ottenuti da un animale immunizzato è chiara: i primi rappresentano uno (ed uno solo) dei tanti anticorpi prodotti dall'animale immunizzato.

Le cellule ibride possoo essere congelate (per essere utilizzate al momento opportuno) e possono essere inoculate in topi singenici dove formano tumori. Nel siero del fluido ascitico dei topi inoculati si accumulano quantità notevoli di anticorpi monoclonali (5-10 mg per ml di fluido ascitico).

Nelle pagine seguenti sarà delineato lo sviluppo della tecnologia degli ibridomi, se ne illustreranno le proprietà ed alcune possibili applicazioni nel campo veterinario.

La produzione degli anticorpi monoclonali

Gli ibridomi rappresentano certamente il metodo migliore per la produzione di anticorpi monoclonali, ma non il primo, né l'unico metodo.

Il mieloma è un tumore derivato da una singola plasmacellula e pertanto rappresenta un clone di cellule che producono anticorpi monoclonali. Le proteine mielomatose hanno dato un contributo fondamentale alla conoscenza della strutura e biosintesi delle immunoglobuline (Potter, 1972). La loro utilità come fonte di anticorpi monoclonali è però molto modesta sia perché la loro specificità non è predeterminabile sia perché alcune specie sono refrattarie alla induzione di mielomi.

Alcuni autori (Stroberg et al., 1974; Zurawski et al., 1978) hanno ottenuto anticorpi monoclonali da linfociti B trasformati con il virus SV40 od Epstein-Barr (EB). Le cellule trasformate secernono

però quantità molto modeste di immunoglobuline e la trasformazione è un fenomeno raro; in più, il virus EB può trasformare solo i linfociti dei primati (Shulman e Kohler, 1979).

Quantità molto modeste di anticorpi monoclonali sono state ottenute anche clonando linfociti B normali (cioè non trasformati) di animali immunizzati (Eichmann, 1972).

La produzione di quantità illimitata di anticorpi monoclonali con una specificità predeterminata è possibile attraverso la produzione di un ibridoma. Un topo è immunizzato con l'antigene prescelto. Alla fine dell'immunizzazione le cellule della milza (ricca di plasmacellule che producono anticorpi specifici) vengono fuse con cellule mielomatose (anche queste di origine murina) in presenza di polietilene glicol. Le linee tumorali generalmente usate nella fusione sono «varianti» che hanno perso la capacità di produrre immunoglobuline proprie (od almeno le catene pesanti di queste), per cui l'ibridoma produce soltanto le immunoglobuline del linfocita che ha partecipato alla fusione (cioè solo anticorpi specifici). Il prodotto della fusione viene distribuito in pozzetti contenenti terreno HAT (un terreno a cui sono stati aggiunti ipoxantina, aminopterina, timidina). L'aminopterina (A) blocca la via principale di sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche. La linea tumorale, cresciuta in terreno che contiene 8-azaguanina, manca dell'enzima ipoxantina-guanina-fosforibosil transferasi (HGPRT) e pertanto, non potendo utilizzare la via alternativa di sintesi delle basi puriniche e pirimidiniche a partire dall'ipoxantina (H) e dalla timidina (T), nel terreno HAT muore. L'altra popolazione di cellule parentali (gli splenociti) muore anch'essa perché incapace di crescere in coltura. In definitiva, nel terreno HAT crescono solo le cellule ibride: le cellule che hanno ereditato dagli splenociti l'enzima HGPRT e dalle cellule mielomatose la capacità di crescere in coltura.

Alcune proprietà degli anticorpi monoclonali

Gli antisieri convenzionali sono miscugli molto complessi di anticorpi appartenenti a classi differenti e con differenti proprietà fisiologiche. Essi sono spesso in grado di svolgere diverse funzioni con-

temporaneamente: di fissare il complemento, per esempio, di precipitare l'antigene o di agglutinarlo. Gli anticorpi monoclonali, a causa della loro estrema uniformità, difficilmente sono altrettanto polifunzionali. Gli anticorpi secreti da un certo ibridoma possono funzionare molto bene in un dosaggio radioimmunologico (per esempio, in virtù della loro elevata affinità) ma non funzionare affatto in un test di citotossicità (per esempio, perché di una classe che non fissa il complemento). Oppure possono fissare bene il complemento, ma non essere capaci di agglutinare l'antigene.

Gli anticorpi monoclonali, riconoscendo un solo determinante antigenico, non possono formare un lattice abbastanza fitto da precipitare, a meno che il determinante non sia presente più volte sulla stessa molecola. Essi pertanto non possono essere impiegati nell'immunodiffusione doppia. Questo limite può però essere superato mescolando due anticorpi monoclonali specifici per due distinti siti antigenici.

Gli antisieri convenzionali normalmente sono polispecifici e possono — anzi il più delle volte debbono — essere assorbiti. L'assorbimento è difficile (spesso insieme agli anticorpi indesiderati vengono rimossi anche quelli utili) e causa una notevole diminuzione del titolo dell'antisiero. Gli anticorpi monoclonali non richiedono alcun assorbimento. Anche questa caratteristica deriva dalla loro peculiarità di riconoscere un unico determinante.

Gli anticorpi monoclonali, al pari di quelli convenzionali, possono però manifestare una reazione crociata. Essa sta ad indicare che lo stesso determinante (od uno molto simile) è presente sull'antigene omologo e su quello eterologo. Gli anticorpi responsabili della reazione crociata possono essere rimossi per assorbimento da un antisiero convenzionale. Ciò non è possibile nel caso degli anticorpi monoclonali che non sono frazionabili (vedasi sopra).

Uno dei maggiori vantaggi certi dagli ibridomi è la possibilità di ottenere anticorpi specifici per un singolo determinante, anche quando l'antigene è molto complesso (una cellula, per esempio) oppure non è puro. La tecnica infatti offre la possibilità di clonare la singola cellula ibrida e quindi di separare gli anticorpi diretti contro il determinante che interessa da tutti gli altri.

Applicazione degli anticorpi monoclonali nel campo veterinario

L'impatto della tecnologia degli ibridomi in medicina umana è stato enorme. Marginale invece quello in campo veterinario e, più in generale, delle produzioni animali. Si vogliono di seguito indicare alcune possibili applicazioni in questi settori.

Il fenomeno del polimorfismo attualmente è oggetto di notevole attenzione da parte dei genetisti animali (anche nel nostro Paese, grazie all'importanza attribuitagli nell'ambito del progetto finalizzato sulla «Difesa delle risorse genetiche degli animali in produzione zootecnica» (vedasi la relazione del prof. Rognoni a questo Convegno).

Gli anticorpi monoclonali possono essere applicati con successo allo studio del polimorfismo antigenico. Molto significativi sono i risultati ottenuti in questa direzione da Slaughter et al. (1980). La fosfatasi alcalina placentare umana (ALPase) è sotto il controllo di tre alleli ($ALPp^1$ - $ALPp^2$ - $ALPp^3$), i cui prodotti (sei fenotipi) sono elettroforeticamente distinguibili. Uno dei cloni contro l'ALPase (il clone Sp 2/4) ha permesso di evidenziare differenze antigeniche individuali entro una stessa classe fenotipica: i 188 campioni individuali di tipo I, uniformi tra loro rispetto alla mobilità elettroforetica, sono risultati invece eterogenei rispetto alla capacità di legarsi agli anticorpi del clone Sp 2/4. In altre parole, gli anticorpi monoclonali hanno messo in luce differenze alleliche che l'elettroforesi non aveva permesso di evidenziare: là dove l'elettroforesi indicava la presenza di un unico allele (ALP^1), gli anticorpi monoclonali hanno dimostrato la esistenza di almeno due alleli $ALPp^1$ i quali sintetizzano enzimi che hanno la stessa mobilità elettroforetica ma differiscono rispetto alla capacità di legarsi agli anticorpi del clone Sp 2/4. L'approccio utilizzato da Slaughter et al. (1980) è ovviamente estensibile a qualsiasi proteina (enzimatica e non) ed a qualsiasi specie, il che ne estende l'importanza anche al campo della immunogenetica animale. Esso offre inoltre una prova della squisita specificità degli anticorpi monoclonali e della loro utilità quando occorre evidenziare differenze antigeniche minori tra proteine per altro molto simili, quali sono quelle prodotte da geni alleli.

La parassitologia ha tratto enorme vantaggio dalla tecnologia degli ibridomi, sia sul versante della ricerca applicata (Mitchell et

al., 1979; Mitchell et al., 1981; Craig et al., 1980) che su quello della ricerca teorica (Pearson e Anderson, 1980). I risultati più significativi riguardano:

a) la produzione di ibridomi 'funzionali' contro il *P.* (*Plasmodium*) *bergheii* (Yoshida et al., 1980), P. Yoeli (Freeman et al., 1980), *P. knowlesi* (Cochrane et al., 1982), *P. falciparum* (Perrin et al., 1981); di ibridomi cioè capaci di proteggere l'ospite (il topo nel caso del *P. berghii* e *P. yoeli* e la scimmia rhesus nel caso del *P. knowlesi*) o di inibire la crescita in vitro del parassita (come nel caso della forma eritrocitica del *P. falciparum*).

b) La possibilità di distinguere specie molto vicine tra loro, quali la *L.* (*Leishmania*) *mexicana* e *L. brasilensis* (McMahon-Pratt et al., 1982).

c) La immunodiagnosi delle infezioni da *Schistosoma japonicum* (Mitchell et al., 1981).

La parassitologia veterinaria, sulla scia dei risultati sopra delineati, potrebbe servirsi degli anticorpi monoclonali: per individuare gli antigeni del parassita che conferiscono protezione all'ospite; per identificare il DNA clonato del parassita (cioè come 'tecnologia di supporto' per la produzione di vaccini mediante DNA ricombinante); per distinguere specie vicine; per la immunodiagnosi delle infezioni da parassiti; per localizzare specifici siti antigenici sulla superficie del parassita e delinearne l'architettura.

La tipizzazione del sangue attualmente è limitata ai soli bovini, ma si sta considerando di estenderla anche ad altre specie. Reagenti emodiagnostici monoclonali avrebbero il vantaggio, proprio degli anticorpi monoclonali, di essere disponibili in quantità illimitata e di non richedere confronti dei risultati tra laboratori (gli addetti ai lavori sanno della necessità di confrontare e standardizzare i loro reagenti periodicamente. A questo vantaggio, di per sé notevole, potrebbe aggiungersi anche quello di una riduzione dei costi di produzione: Voak et al. (1980) hanno prodotto anticorpi monoclonali contro l'antigene di gruppo sanguigno A dell'uomo con una riduzione del 50% del costo di produzione rispetto al metodo convenzionale. Longenecker (1982) ha otteuto anticorpi monoclonali con-

tro il sistema B-G, che fa parte del complesso maggiore di istocompatibilità del pollo e che è presente anche sugli eritrociti. Un clone (ED-IMCA) ha reagito molto specificamente con gli eritrociti che esprimono il prodotto dell'allele B-G^2. Tuttavia, una limitata alterazione del pH e/o della temperatura di agglutinazione ha causato effetti profondi sulla specificità degli anticorpi (Mosmann et al., 1980). Questa caratteristica — la necessità di definire con precisione la condizione in cui il test è fatto — può essere vista come uno svantaggio degli anticorpi monoclonali, ma anche come un vantaggio, nel senso che variando opportunamente le condizioni, è possibile ridurre le reazioni crociate al di sotto del limite di identificazione, senza perdere il grado di specificità inerente agli anticorpi monoclonali.

In conclusione, i tempi sembrano maturi per considerare seriamente la possibilità di produrre reagenti emodiagnostici monoclonali, sia perché essi rappresentano l'unico modo per avere dati confrontabili nel tempo e tra laboratori diversi, sia perché potrebbero contribuire a ridurre i costi di gestione del programma. Inoltre, reagenti specifici per un singolo determinante antigenico permetterebbero di arrivare finalmente alla elucidazione di sistemi molto complessi (il sistema B dei bovini e quelli analoghi delle altre specie); la complessità di questi sistemi è infatti sì di natura genetica (inerente ai sistemi, quindi) ma, in parte, presumibilmente, anche di natura sierologica (dovuta cioè all'impiego di reagenti convenzionali, polispecifici e molto eterogenei).

BIBLIOGRAFIA

1) Cochrane A. H., Santoro F., Nussenzweig V., Gwadz R., and Nussenzweig R. S .(1982): Proc. Nat. Acad. Sci. USA *79*, 5651-5655.

2) Craig P. S., Mitchell G. F., Cruise K. M., and Rickard M. D. 1980): Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. *58*, 339-350.

3) Eichmann K. (1972): Eur. J. Imm. *2*, 301-307.

4) Freman R. R., Trejdosiewcz A. J. and Cross G. A. M. (1980): Nature *284*, 366-370.

5) Longenecker B. M. (1982): Animal Blood Groups and Biochemical Genetics *13*, 225-238.

6) KOHLER G. and MILSTEIN C. (1975): Nature *256,* 495.
7) KOHLER G. (1976): Eur. J. Imm. *6,* 340.
8) MCMAHON-PRATT D., BENNETT E., and DAVID J. R. (1982): J. Immunol. *129,* 926-927.
9) MITCHELL G. F., CRUISE K. M., CHAPMAN C. B., ANDERS R. F. and HOWARD M. C. (1979): Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. *57,* 287-302.
10) MITCHELL G. F., CRUISE K. M., GARCIA E. G. and ANDERS R. B. (1981): Proc. Nat. Acad. Sci. USA *78,* 3165-3169.
11) MOSMANN T. R., GALLATIN M., and LONGENECKER B. M. (1980): J. Immunol. *125,* 1152-1156.
12) PEARSON T., and ANDERSON L. (1980): Analytical Biochemistry *101,* 377-386.
13) PERRIN L. H., RAMIREZ E., LAMBERT P. H., and MIETSCHER P. A. (1981): Nature *289,* 301-303.
14) POTTER M. (1971): Psysiological Reviews *52,* 631-684.
15) SHULMAN M., and KOHLER G. (1979): in «Cells of Immunoglobulin Synthesis». B. Pernis e H. J. Vogel editori Academic Press, 275-293.
16) SLAUGHTER C. A., COSEO M. C., CANCRO M. P., and HARRIS H. 1980): Proc. Nat. Acad. Sci. USA *78,* 1124-1128.
17) STROBERG A., COLLINS J., BLACK P., MALAMUD D., WILBERT S., BLOCH K., and HABER E. (1974): Proc. Nat. Acad. Sci. USA *71,* 263-264.
18) VOAK D., SACHS S., ALDERSON T., TAKEI F., LENNOX E., JARVIS J., MILSTEIN C., and DANBOROUGH J. (1980): Vox Sanguinis *39,* 131-140.
19) YOSHIDA N., NUSSENZWEIG R. S., POTOCNJAK P., NUSSENZWEIG V., and AIKAWA M. (1980): Science *207,* 71-73.
20) ZURAWSKI V., SPEDDEN S., BLACK P., and HABER E. (1978): Curr. Top. Microbiol. Immunol. *81,* 156-163.

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

R.L. SPOONER *

IL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITA' E MALATTIE NEI BOVINI

Risale al 1938 l'osservazione di Gorer che differenze antigeniche tra linee di topi influenzavano la sopravvivenza dei tumori, per cui egli propose la teoria immunologica del trapianto. Questo Autore continuò a studiare le differenze antigeniche tra linee di topi e nel 1956 descrisse un test citotossico (Gorer e O'Gorman, 1956) che era capace di evidenziare gli anticorpi a basso titolo che definiscono le differenze tra linee meglio dei test di agglutinazione usati in precedenza.

Questo test è alla base dei tests citotossici correntemente usati nello studio dei sistemi maggiori di istocompatibilità di un'ampia varietà di specie.

Il rinnovato interesse per il complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) del topo, il sistema H-2, avvenne negli anni 60 con la scoperta che la risposta immunitaria a polipeptidi sintetici era controllata geneticamente nelle cavie e nei topi e che nei topi tale controllo era situato nella regione H-2.

Studi sul sistema dell'uomo equivalente all'H-2 del topo, cioè sul sistema HLA erano stati condotti per un certo tempo allo scopo di tipizzare i tessuti prima del trapianto, anche tale sistema non era stato denominato HLA all'inizio. Con la scoperta del controllo della risposta immunitaria e del controllo della suscettibilità ai tumori da parte del sistema H-2, vennero ricercate e trovate associazioni tra il sistema HLA e le malattie. Alcune delle prime associazioni, ad esempio quella con la malattia di Hodgkin, non vennero confermate in studi successivi, in quanto non si era compreso a quel tempo che tali studi erano stati condotti su pazienti il cui stato di malattia e

* Department of Immunology - Animal Breeding organisation - Edinburgh.

la cui prognosi tendevano ad essere meno gravi che nelle primitive ricerche. Ulteriori ricerche sono state condotte e associazioni molto strette sono state evidenziate come quella tra HLA e B27 e la spondilite anchilosante dove la presenza nel patrimonio ereditario di B 27 aumenta il rischio di contrarre la mlaattia di circa 100 volte e addirittura 300 volte in Giappone (Dausset e Svejgaard, 1977). Molte più associazioni sono state e si stanno trovando, ma per la maggior parte esse riguardano malattie croniche spesso non mortali. Le associazioni con malattie infettive sono molto più difficili da studiare.

Gotze (1977) e Vaiman (1980) hanno passato in rassegna le ricerche sull'MHC in diverse specie mettendo in evidenza il rimarchevole grado di omologia dell'MHC in specie notevolmente diverse fra loro. I geni che controllano la risposta immunitaria che sono ora ben definiti nel topo, sono anche stati studiati nella cavia e nel ratto mentre la situazione è meno chiara in specie geneticamente meno omogenee.

Relativamente pochi studi sono stati condotti prima sulle relazioni tra MHC e le malattie come la tubercolosi, il vaiolo o la malaria. Tuttavia in alcune popolazioni coloniali Olandesi che sono state esposte alla malattia ed al tifo interessanti cambiamenti nelle frequenze al locus HLA sono stati evidenziati in confronto con le popolazioni non esposte da cui esse derivano (De Vries, 1979).

Forse queste malattie sono responsabili delle grandi differenze razziali nellefrequenze del locus HLA trovate nell'uomo e che sono anche chiaramente presenti nei bovini (Oliver e Coll., 1981).

Il MHC nel topo, nell'uomo e nella cavia controlla anche altre funzioni immunologicamente correlate come ad esempio alcune parti del sistema del complemento ed anche in questo caso esiste una stretta omologia tra le specie nei riguardi dei componenti controllati.

Nessuna di queste ricerche tuttavia ci dà una diretta indicazione del vero ruolo del MHC. Forse l'area più verosimile riguarda il trasferimento di informazioni tra cellule. In effetti il meccanismo della risposta immunitaria coinvolge numerosi tipi cellulari - macrofagi, linfociti B e T e questi linfociti sono a loro volta suddivisi in vari sottotipi incluse cellule soppressori, helper e killer.

Le informazioni chiaramente devono essere passate tra queste cellule e sembra che al riguardo il MHC sia un importante sistema di ricognizione.

Il MHC dei bovini

Il primo lavoro che indica la presenza di anticorpi contro i linfociti di bovini immunizzati con sangue intero risale al 1967 quando Borovska e Demant suggerirono una possibile associazione tra queste linfocitotossine ed il sistema S dei gruppi eritrocitari, mentre Iha e Coll. (1973) dimostrarono non solo la presenza di sieri linfocitotossici in vacche immunizzate o multipare ma anche la possibilità di reazioni crociate con antigeni HLA.

I primi dati sull'eredità degli antigeni linfocitari bovini furono presentati da Spooner e Coll. (1978) e da Amorena e Stone (1978). Da allora i laboratori interessati alle ricerche sul MHC dei bovini hanno collaborato a due tests di confronto internazionale ed attualmente a livello internazionale sono riconosciuti 17 alleli appartenenti ad un singolo *locus*, alleli che controllano la sintesi di antigeni della prima classe che nell'uomo e nel topo sono costituiti da due catene polipeptidiche di 12K e 44K *daltons*.

Il primo esempio di restrizione MHC nelle cellule T che uccidono cellule infestate con un parassita protozoario intracellulare è stato messo in evidenza nei bovini: è stato infatti dimostrato che cellule citotossiche generate *in vivo* a seguito di infestazione con *Theileria annulata* se contengono gli stessi antigeni linfocitari (BoLA) uccidono linee cellulari linfoblastiche infestate da questi parassiti in misura maggiore delle cellule che non contengono gli stessi antigeni (Preston e coll., 1983).

Nei riguardi di una malattia simile cioè la East Coast fever causata da infestazioni di *Theilaria parva*, abbiamo dimostrato che le li-

Tabella 1 — Mortalità negli Zebù esposti a infestione naturale di tripanosomiasi

	N. esposti	N. morti
Zebù	40	30
N' dama	37	0

(da Murray e Coll. 1979)

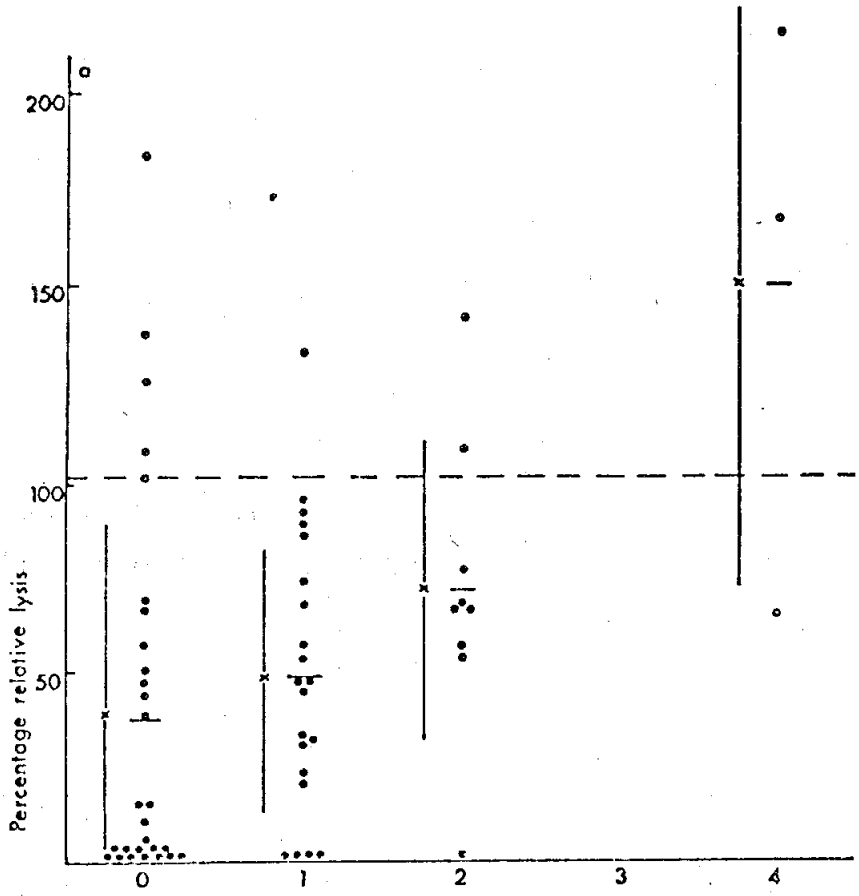


Fig. 1 — Percentuale di lisi relativa delle cellule infette da *T. annulata* ad opera dei linfociti di vitelli infestati con il parassita quando non vi è condivisione degli alleli BOLA e quando il grado di condivisione va da *1 a 4 siti specifici.* 100% è la percentuale di lisi ottenuta quando i linfociti lisano bersagli autologhi.

nee cellulari infestate da *T. parva* immunizzano i bovini contro il rischio di malattia se posseggono gli stessi antigeni BoLa del ricevente, mentre non hanno attività se gli antigeni sono diversi (Dolan e Coll., 1983).

Il fatto che gli antigeni linfocitari siano il bersaglio della linfolisi

cellulare mediata nei bovini risulta dal lavoro di Teale e Coll. in Kenia, dove cellule citotossiche generate in colture miste di linfociti riconoscono antigeni di classe prima come bersaglio.

Finora per contro esistono relativamente pochi dati su un possibile locus (o loci) relativo alla classe seconda del MHC, sebbene vi siano dati per affermare che esso esiste e antigeni di membrana del peso molecolare 28K e 33K daltons sono stati descritti (Hoand-Xuan e Coll., 1982 a e b). Il controllo genetico della classe seconda sembra essere strettamente associato alla regione degli antigeni linfocitari della prima classe.

Resistenza alle malattie

Esistono diverse malattie, importanti dal punto di vista economico, per le quali non vi sono vaccini come la tripanosomiasi, la East coast fever e la peste suina africana. La resistenza genetica è una misura potenziale di controllo di queste malattie ed è ormai presa in seria considerazione.

Organizzazioni internazionali come la FAO, l'ILCA e la ILRAD e Governi nazionali stanno attivamente studiando la possibilità di allevare razze capaci di sopravvivere in presenza di tripanosomiasi. Tuttavia, anche quando sono disponibili vaccini o farmaci, la resistenza genetica può ben avere un ruolo da giocare, considerato che lo sviluppo della resistenza ai farmaci in molti parassiti è un problema serio ed in aumento. Ciò è particolarmente vero nell'allevamento estensivo che è la norma nei tropici ed in molte parti dell'Australia e della Nuova Zelanda. In queste regioni è spesso impossibile trattare tuti gli animali o somministrare la dose esatta in tutti i casi e ciò rappresenta la condizione ideale per lo sviluppo della resistenza ai farmaci. Probabilmente non è casuale che i maggiori problemi di resistenza ai farmaci si stanno verificando in Australia ed a lungo termine, l'allevamento tropicale è sottoposto a grave rischio. Inoltre la vaccinazione funziona soltanto se il vaccino è conservato in modo adeguato ed usato prima della data di scadenza negli animali giusti ed al tempo opportuno. Vi sono numerosi esempi relativi al fatto che queste condizioni non sono state rispettate ed il controllo

della malattia è fallito: tanto per citarne uno ricordiamo la ricomparsa della peste bovina importata in diverse parti dell'Africa nonostante esista un eccellente vaccino.

In aggiunta alla resistenza ai farmaci ed al cattivo uso dei vaccini sono anche da ricordare i cambiamenti che sono avvenuti nei sistemi di conduzione e nelle situazioni politiche in alcune aree.

Per esempio nello Zimbabwe era pratica corrente ed intensiva il bagno medico contro le zecche. Durante il periodo precedente all'indipendenza del Paese fu impossibile mantenere tale sistema in alcune aree cosicché la popolazione sensibile alle zecche, che si era sviluppata durante gli anni in cui il sistema era stato attuato, fu soccombente all'infestione e ne risultò una malattia epidemica. Se fossero stati allevati animali resistenti alle zecche è probabile che questi sarebbero stati meno danneggiati dall'impossibilità di continuare il sistema di prevenzione, tanto che da qualcuno in Zimbabwe è stato proposto che non si debba ritornare ad un sistema completo di prevenzione al fine di mantenere nella popolazione la resistenza alle zecche.

Evidenza di variazioni genetiche nella suscettibilità

Esistono modificazioni relative a variazioni genetiche nei riguardi della resistenza alle malattie che risalgono a molti anni fa. Nei primi decenni di questo secolo vi furono molti esperimenti nei piccoli animali. Così ad esempio venne dimostrato che la resistenza alla tubercolosi nella cavia ha una forte componente genetica così come quella alla salmonellosi nel topo.

Nei grandi animali esistono notevoli indicazioni circa differenze nella resistenza alle malattie e gli esempi più signficativi si evidenziano quando il rischio di malattia è maggiore. Così nei tropici le razze bovine indigene dell'Africa occidentale, l'N'dama a corna lunghe e la Baoule a corna corte sono notevolmente più resistenti alla tripanosomiasi degli Zebù (tabella 1) che sono stati introdotti nella regione più di recente e che originano dall'India dove la tripanosomiasi non esiste. Entrambe le razze Baoule e N'dama dimostrano anche resistenza ad altre malattie inclusa l'infestione da zecche.

Vi sono marcate differenze tra razze sulla resistenza alle zecche. È stato dimostrato che bovini Zebù e Shorthorn che non erano stati prima esposti alle zecche sono ugualmente suscettibili ad una prima infestione. Gli zebù tuttavia sviluppano rapidamente resistenza ad una successiva infestione mentre gli Shorthorn non ne sono capaci (tabella 2). Il meccanismo della resistenza non è completamente conosciuto, sembra tuttavia si tratti di una risposta immunologica alla zecca che non la uccide ma la induce al distacco. Questa resistenza degli Zebù alle zecche ha giocato un grosso ruolo nella loro introduzione nelle aree tropicali dell'Australia dove essi stanno largamente rimpiazzando gli Shorthorns ed altre razze europee.

Tabella 2 — Numero di zecche in *Bos indicus* e *Bos taurus* in seguito a contatto sperimentale con *Boophilus microplus*

Contatto	Brahmins	Shorthorns
1°	4932	4845
2°	2026	4996
3°	1428	4685
4°	1514	5002

(da Wagland 1975)

La resistenza genetica ai parassiti intestinali è conosciuta da diversi anni ma fino a poco tempo fa pochi tentativi sono stati fatti per utilizzare scientificamente l'informazione nell'allevamento pratico. Variazioni nella resistenza all'*Haemonchus contortus* sono state messe in evidenza in molti studi, mentre le attuali ricerche volte a studiare le risposte di giovani agnelli alla vaccinazione con *Trichostrongylus colubriformis* hanno dimostrato che alcuni agnelli rispondono più precocemente di altri e che gli agnelli a risposta rapida sono più resistenti ai parassiti.

Dineen e Coll. hanno selezionato due linee, una a risposta rapida ed una a risposta lenta e l'effetto sul numero dei parassiti fu notevole:

1.560 parassiti furono raccolti dai soggetti a risposta rapida contro 24.340 dei soggetti a risposta lenta. Arieti provenienti da queste due linee vennero quindi utilizzati su pecore non selezionate per il carattere e ne risultò che la progenie di arieti a risposta rapida erano più resistenti al contagio della progenie di arieti a risposta lenta (tabella 3). E' suggestivo pensare che la velocità con le due linee si separarono in conseguenza della selezione indica che solo alcuni geni siano coinvolti nell'effetto.

Tabella 3 — Risposta alla vaccinazione con larve irradiate di *Trichostrongylus Colubriformis* sulla successiva suscettibilità delle pecore alla infestione parassitaria

	Numero	Uova per grammo di feci
Positivi	23	441
Negativi	56	1567

(da Windon, Dineen e Kelly 1980)

La cheratocongiuntivite infettiva dei bovini (Pink eye) è stato oggetto di intense ricerche miranti ad isolare e caratterizzare l'agente causale. Forse un approccio più gratificante sarebbe quello di studiare più da vicino la variabilità dei bovini sulla suscettibilità. In un confronto sull'incidenza della malattia dei bovini europei, Africander e Zebù e nei loro incroci, risultò che gli zebù erano del tutto resistenti mentre le razze auropee erano le più suscettibili (tabella 4) e che la velocità di accrescimento dei soggetti affetti era significativamente inferiore a quella dei soggetti non affetti.

La malattia di Marek è una malattia linfoproliferativa dei polli di grossa importanza dal punto di vista economico e da diversi anni è noto che esiste resistenza genetica nei suoi confronti.

Quando venne prodotto un vaccino si pensò che sebbene la resistenza genetica alla malattia poteva essere sviluppata essa non era commercialmente importante e si poteva fare affidamento sul solo vaccino. Venne poi dimostrato che le linee di polli resistenti erano più

Tabella 4 — Incidenza della cheratocongiuntivite infettiva nei bovini esposti a infezione naturale in Australia

Razze	Percentuale di affetti a 15 mesi
Hereford x Shorthorn	72.5
Incroci africander	22.1
Incroci Brahmin	8.4
Africander	6.1
Brahmin	0

facilmente protette dal vaccino che non quelle non resistenti. Venne altresì dimostrato che polli con particolari alleli MHC mostravano differenze di resistenza alla malattia. Gli allevatori stanno ora tipizzando gli alleli del locus T e stanno incorporando B21 che è l'allele che conferisce maggior resistenza nelle loro linee (tabella 5). Varianti altamente patogene del virus contro le quali il vaccino non è completamente efficace si stanno propagando per cui la resistenza genetica assume sempre maggiore importanza.

Tabella 5 — Incidenza di malattia in polli infettati sperimentalmente con virus della malattia di Marek. Effetto del MHC.

Genotipo B	N. esaminati	% malattia di Marek
B^2/B^2	67	19.4
B^2/B^{21}	148	0.6
B^{21}/B^{21}	65	0.0

I meccanismi della resistenza in generale sono assai poco conosciuti. Come prima ricordato, il MHC gioca un ruolo importante nella resistenza alla malattia di Marek del pollo. A causa del suo coinvolgimento nel controllo dell'intero spettro delle funzioni immunitarie è

probabile che un coinvolgimento del MHC nella patogenesi delle malattie dei grandi mammiferi domestici verrà trovato.

Vi sono anche altre loci non associati con il MHC che controllano la resistenza ad alcune malattie ed i virus del sarcoma aviare sono esempi di questo tipo. La resistenza alle infezioni da salmonella venne dimostrata essere correlata con il livello degli anticorpi e questa scoperta è stata seguita estensivamente da Biozzi e Coll. Egli ha selezionato linee di topi per alta e bassa produzione di anticorpi rispetto ad uno spettro di antigeni ed in molti casi le linee ad alta risposta si dimostrarono più suscettibili alla maggior parte delle malattie batteriche e meno suscettibili ad alcune malattie protozoarie.

Così la risposta all'immunità umorale può essere un potenziale indicatore della suscettibilità ad alcune malattie.

In ricerche condotte da me con Carr e Mac Leod in Zambia abbiamo messo in evidenza che i bovini che vivono in aree ad alto rischio di infestione da tripanosomi hanno pelle significativamente più spessa ed una più bassa frequenza dei gruppi sanguigni M ed E1 di soggetti della stessa razza che vivono in ambienti a basso rischio (tabella 6).

Tabella 6 — Differenze di frequenza nei gruppi sanguigni e nello spessore della pelle nei bovini Angoni della provincia orientale dello Zambia sotto alto e basso rischio di infestione da Tripanosoma

	Rischio di tripanosoma alto	basso
Gruppo sanguigno M	33%	54%
Spessore della pelle	7.22 mm	6.36 mm

I meccanismi sono importanti per due motivi: se si capiscono i meccanismi e si possono identificare i passaggi nel processo della resistenza, può essere possibile indicare quali animali saranno capaci di sopravvivere in particolari ambienti. Una seconda possibilità e questa è ovviamente proiettata nel futuro, è che se il DNA che controlla un passaggio chiave potesse essere clonato, lo si potrebbe in-

Tabella 7 — Effetto degli antigeni leucocitari bovini (BoLA) tra linea cellulare e riceventi sull'efficienza di linee cellulari linfoblastoidi infestate con *T. parva* nella protezione contro l'infestione di *T. parva*

Stato della linea	N. cellule	N. sopravvissuti
Autologo	10^3	2/2
	10^5	3/3
BoLA uguale al 100%	10^3	1/2
	10^5	2/3
BoLA uguale al 50%	10^3	0/3
	10^5	1/3
BoLA disuguale	10^3	0/3
	10^5	0/3
Non immunizzati		0/4

trodurre nei genomi di animali suscettibili. Questa è una possibilità che necessita di essere considerata nel caso della peste suina africana, una malattia per la quale non esiste vaccino ed alla quale alcuni suini indigeni sono resistenti.

Conclusioni

La resistenza genetica alle malattie è diffusa ed è stata messa in evidenza praticamente in tutte le malattie nelle quali è stata cercata.

La selezione naturale è stata intensa e ha dato origine a razze locali adatte ad ambienti particolari. Nei sistemi di conduzione estensiva l'uso di vaccini e di medicinali può essere molto difficile e certamente non redditizio. La resistenza genetica rappresenta forse l'unica possibilità per mantenere l'allevamento animale in tali ambienti.

Indicatori di resistenza sono utilizzati a livello commerciale nell'allevamento avicolo. Ci sono speranze che si troveranno simili indicatori anche nei mammiferi domestici ed il MHC sembra essere a questo proposito il principale candidato. Il MHC dei bovini e l'omo-

logo dell'MHC dell'uomo e del topo sembra essere coinvolto nella patagenesi dell'infestione da *T. annulata* e nella possibilità di produrre un vaccino cellulare contro la parassitosi da *T. parva*.

BIBLIOGRAFIA

1) AMORENA B., and STONE W. J. (1978): Serologically defined (SD) locus in cattle. Science *201*: 159.
2) ANON (1982): Proceedings of the Second International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. *13*: 33-53.
3) BRILES W. E., STONE H. A. and COLE R. K. (1977): Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines. Science *195*: 193-195.
4) CARR W. R., MACLEOD J., WOOLF B., and SPOONER R. L. (1974): A survey of the relationship of genetic markers, tick-infestation level and parasitic diseases in Zebu cattle in Zambia. Trop. Anim. Hlth. Prod., *6*: 203-214.
5) DAUSSET J., and SVEJGAARD A. (1977): «HLA and Disease» (J. Dausset and A. Svejgaard, Eds.), Munksgaard, Copenhagen.
6) DE VRIES R. (1979): The HLA system and infectious diseases. Thesis Leiden University Hospital.
7) DINEEN J. K., and WINDON R. G. (1980): The effect of sire selection on the response of lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. Int. J. Parasit., *10*: 189-196.
8) DOLAN T. T., TEALE A. J., STAGG D. A., KEMP S. J., COWAN K. M., YOUNG A. S., GROOCOCK C. M., LEITCH B. L., SPOONER R. L., and C. G. D. (1983): Histocompatibility barrier to imunisation against East Coast fever using schizont infected lymphoblastoid cell lines. Parasite Immunology (In press).
9) FRISCH J. E. (1975): The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos cattle*. Animal Production *21*: 265-274.
10) GORER P. A. (1938): The antigenic basis of tumour transplantation. J. Path. Bact. *47*: 231.
11) GORER P. A., and O'GORMAN P. (1956): The cytotoxic activity of isoantibodies in mice. Transplant. Bull. *3*: 142.
12) GÖTZE D. (1977): The Major Histocompatibility Systems in Man and Animals. Springer-Verlag, Berlin.

13) HOANG-XUAN M., LEVEZIEL H., ZILBER M.-T., PARODI, ANDRE-L., and LEVY D. (1982a): Immunochemical characterization of major histocompatibility antigens in cattle. Immunogenetics *15*: 207-211.

14) HOANG-XUAN M., CHARRON D., ZILBER M.-T., and LEVY D. (1982b): Biochemical characterization of Class II bovine major histocompatibility complex antigens using cross-species reactive antibodies. Immunogenetics *15*: 621-624.

15) LONGENECKER B. M., and MOSMAN T. R. (1981): Structure and properties of the Major Histocompatibility Complex of the Chicken. Speculation on the advantages and evolution of polymorphism. Immunogenetics *13*: 1-23.

16) OLIVER R. A., MCCOUBREY C. M., MILLAR P., MORGAN A. L. G., and SPOONER R. L. (1981): A genetic study of bovine lymphocyte antigens (BoLA) and their frequency in several breeds. Immunogenetics *13*, 127-132.

17) PRESTON P. M., BROWN C. G. D., and SPOONER R. L. (1983): Cell mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. Clin. Exp. Immunol. (In press).

18) SIEFERT G. W. (1971): Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infections of the cattle tick (Boophilus microplus). Aust. J. Agric. Res., *22*: 159-168.

19) SPOONER R. L., LEVEZIEL H., GROSCLAUDE F., OLIVER R. A., and VAIMAN M. (1978): Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. J. Immunogen. *5*: 335.

20) SPOONER R. L., OLIVER R. A., SALES D. I. et al. (1979): Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes. Joint report of the 1st International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop. Anim. Blood Grps. biochem. Genet. *10*: 63-86.

21) THA T. H., GERBRANDT G., BODMER W. F., MCGARY D., and STONE, W. H. (1973): Cross reactions of cattle lymphocytotoxic sera with HL-A and other human antigens. Tissue Antigens *3*: 291.

22) VAIMAN M. (1980): Complex majeur d'histocompatibilité chez les animaux. Complex Majeur d'Histocompatibilite de l'Homme (HLA). J. Dausset Flammarion, Paris, pp. 28-52.

23) WAGLAND B. M. (1975): Host resistance to cattle tick (Boophilus microplus) in Bhramin (Bos indicus) cattle. I. Responses of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. Aust. J. Agric. Res., *26*: 1073-1080.

24) WINDON R. G., DINEEN J. K., (1980): The segregation of lambs into «responders» and «nonresponders»: response to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae before weaning. Int. J. Parasit., *10*: 65-73.

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

M. Zanotti e G. Pagnacco *

IL MARCATORE IMMUNOLOGICO ED ELETTROFORETICO IN CAMPO ZOOTECNICO: CONSIDERAZIONI SU UN VENTENNIO DI RICERCHE IN ITALIA

Lo studio dei marcatori immunologici negli animali domestici è iniziato solo nel 1910 sulla base delle indagini che erano state condotte in campo umano (Todd e White 1910). Sono stati evidenziati i primi antigeni eritrocitari dei bovini mediante tecniche immunologiche e ne è stato definito il loro comportamento ereditario. Successivamente queste indagini sono state estese anche alle altre specie di interesse zootecnico in quanto, fin dall'inizio, si ravvisò l'importanza di questi caratteri per una conoscenza approfondita del corredo genetico sia individuale che di popolazione. (Stone W.H., Irwin M. R. 1963 - Stormont 1962). Si tratta, difatti, di caratteri qualitativi, a semplice trasmissione mendeliana, la cui identificazione è univoca durante tutta la vita dell'individuo e dove, per effetto della condominanza, del fenotipo è spesso possibilile risalire al genotipo.

Il gran numero di loci identificati, la grande variabilità per locus; ha fatto sì che queste ricerche si ampliassero sempre più in funzione di una sempre maggiore conoscenza del patrimonio genetico.

Oltre agli antigeni della membrana eritrocitaria sono stati cercati altri caratteri ad uguale comportamento genetico. Immunologicamente vennero identificati gli allotipi, che sono varianti dei principali costituenti plasmatici (es. immunoglobuline) e gli antigeni di istocompatibilità che sono riferiti a caratteri evidenziabili sulla superficie cellulare dei linfociti. Mediante elettroforesi, invece, sono state identificate le varianti genetiche delle proteine del siero, dell'eritrocita, del latte, come emoglobina, albumina, transferrina ecc.

* Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Milano.

In questi ultimi anni si è cercato anche di individuare il polimorfismo di costituenti che, per le loro stesse caratteristiche biologiche, sono più o meno direttamente implicati in funzioni fisiologiche e/o metaboliche come gli enzimi eritrocitari, le costanti ematalogiche di base, gli enzimi degli spermatozoi e certi ormoni.

Alcuni di questi marcatori sono ancora in fase di studio, sia per quanto riguarda la loro conoscenza, sia per la loro utilizzazione pratica. Altri sono già ampiamente noti e, in parte sono entrati nella routine della zootecnia, in parte hanno consentito di approfondire la conoscenza biologica delle popolazioni animali oggetto di studio.

E' sulla base anche di questa conoscenza biologica che ci si augura di poter meglio utilizzare le nostre popolazioni animali ai fini di una intensificazione della produzione zootecnica con conseguente miglioramento morfologico-produttivo e funzionale delle specie oggetto di studio.

Gruppi Sanguigni

Come gruppo sanguigno si intende l'insieme dei fattori antigene presenti sulla superficie della membrana eritrocitaria. In campo animale questi antigeni vengono evidenziati per lo più mediante sieri isoimmuni ottenuti inoculando gli eritrociti di un soggetto detto donatore in un altro soggetto, opportunamente scelto, detto recettore. In genere si tratta di emolisine, ma in alcune specie, si ottengono anche delle agglutinine.

Nel bovino con queste metodiche sono stati identificati almeno settanta antigeni alcuni dei quali danno delle reazioni crociate tra di loro (tabella 1) - (Rognoni 1962).

Geneticamente questi antigeni nel bovino sono l'espressione di più geni suddivisi in dodici sistemi genetici indipendenti l'uno dall'altro. Alcuni sistemi sono semplici e presentano un solo fattore antigene e quindi due alleli (es. L). Altri sistemi sono più complessi come il sistema B: comprendono più fattori antigene che vengono trasmessi o singolarmente o a gruppi (fenogruppi) prestando il fenomeno della pluriallelia. In alcune razze si conoscono fino a 400 alleli (tabella 2).

Data la complessità dei sistemi di questo tipo non sempre è pos-

TABELLA 1 - SISTEMI DI GRUPPO SANGUIGNO DEI BOVINI

Sistema genetico	Fattori antigene	Alleli
A	A_1 A_2 D H Z'	A_2-A_2Z'-A_2H - a etc.
B	B G G_1 G_2 G_3 I_1 I_2 K O_1 O O_3 O_x P_1 P_2 Q T_1 T_2 Y_1 Y_2 A' B' D' E'_1 E'_2 E'_3 F'_1 F'_2 G' I' I'_1 I'_2 J'_1 J'_2 K' O'_1 O'_2 P' Q' Y' B'' G'' J''	E'_3 G'-G Y_2 E'_1 Q' O J' K' O'_2-B I_1 Q - b etc.
C	C_1 C_2 E R_1 R_2 W X_1 X_2 C' L'	C_2 W - W - c etc.
F/V	F V	F - V
J	J	J - j
L	L	L - l
M	M	M - m
S	S U U_1 U_2 H' U' H'' S'' U''	H' S-H'-U'-SUH' etc.
Z	Z	Z - z
R/S	R'_1 R'_2 S'	R' - S'
T'	T'	T' - t'
N'	N'	N' - n

sibile risalire dal fenotipo al genotipo senza un'analisi di segregazione familiare (tabella 3).

Nei cavalli si conoscono 8 sistemi genetici (Tabella 4) (Sanderg 1974), negli ovini se ne conoscono 7 e nei suini 15 (tabelle 5-6) (Tucker E.M. 1975 - Gahne B. 1979).

Ogni laboratorio che lavora in questo settore si occupa anche della produzione e della purificazione dei sieri immuni per ottenere i

TABELLA 2 - LISTA DEGLI ALLELI DEL SISTEMA B NELLE RAZZE BRUNA ALPINA E FRISONA ITALIANA A FREQUENZA MAGGIORE

BRUNA FRISONA		FRISONA ITALIANA	
Fenogruppo	Frequenza	Fenogruppo	Frequenza
1 G_1 O_x I'_2 O'	0.1268	1 GY_2 E'_1 Q'	0.1962
2 O_1 T_1 Y_2 E'_3 F'_1 I'_2	0.1054	2 O_2 J'_1 K' O'	0.0837
3O_x I'_2 O'	0.0746	3 I_2	0.0575
4 I_1 E_3 G' I'_2	0.0672	4 E'_3	0.0487
5 Y_2	0.0569	5 Q'	0.0462
6 BI' I'_2 P'	0.0448	6 b	0.0375
7 b	0.0410	7 O_x D' E'_3 F'_1 G' O'	0.0375
8 GO_x E'_3 F'_1 I'_2 O'	0.0363	8 $BGKO_x$ E'_3 F'_2 I'_2 O' H_{12}	0.0350
9 O_2 J'_1 K' O'	0.0326	9 BO_1 Y_2 D' I'_2	0.0350
10 Q'	0.0317	10 BO_3 Y_2 A' E'_3 G' P' Q'	0.0350
11 P_2 Q E'_1 I' I'_2	0.0298	11 O_2 K'	0.0325
12 BI_1 E'_1 I'_2	0.0298	12 Q' I'_2	0.0250
13 O_3 E'_2 F'_2 I'_2 J'_2 H_{12} B'_1	0.0260	13 O_x Y_2 A'	0.0237
14 B G K E'_3 F'_1 G' O' H_{12}	0.0252	14 O_1 A' I'_2	0.0237
15 I' I'_2 Q'	0.0233	15 GO_1 Y_2 I'_2	0.0162
16 O_x A' I'_2	0.0233	16 G_1 I_1	0.0162
17 Y_2 I' I'_2 Q' Y'	0.0214	17 BO_1 I'_2	0.0125
18 I_1 Y_2 TY' Y'	0.0186	18 $BGKO_x$ Y_2 A' I'_2 O' Y'	0.0125
19 $BGKO_x$ I'_2 O'	0.0168	19 I' I'_2	0.0112
20 Y_2 E'_3 G' Y'	0.0149	20 BO_1 Y_2 I'_2	0.0112
21 BI_1 Q	0.0158	21 $BGKO_x$ A' E'_1 I' I'_2 O'	0.0087
22 O_1 E'_1	0.0121	22 O_1	0.0075
23 BO_3 A' P' Q' I'_2	0.0112	23 BI_1	0.0060
24 O_x E'_1 F'_1 O'	0.0111	24 $BGKO_x$ Y_2 A' I'_2 O'	0.0060
25 $BGKY_2$ E'_2 F'_2 G' I'_2 O' H	0.0093	25 BO_1 D' I'_2	0.0060
26 Y_2 D' E'_3 I'_2	0.0084	26 G'_1 O_1	0.0060
27 G_2 O_1 E'_1 I'_2	0.0084	27 I'_2 I' Q'	0.0060
28 GO_x E'_3 F'_1 O'	0.0074	28 O A' I'	0.0050
29 O_1	0.0065	29 P_2 I' I'_2	0.0050
30 I' I'_2	0.0065	30 BO_3 A' I' I'_2 P' Q'	0.0050

reagenti necessari alla tipizzazione eritrocitaria. E' stata quindi istituita a livello internazionale una organizzazione che si occupa della

TABELLA 3 - ESEMPIO DI SEGREGAZIONE FAMILIARE DEGLI ANTIGENI DEL SISTEMA B IN 7 FIGLI DI UN TORO

TORO TERLING ISIS

FENOTIPO K_2 I' E'_3 G' P

GENOTIPO [P I'] / [Y_2 E'_3 G']

	FIGLIO	MADRE
1	[P I'] / B P'	B P' / Q'
2	[Y_2 E'_3 G'] / —	G Y_2 E'_3 / —
3	[P I'] / A'	A' / Q'
4	[Y_2 E'_3 G'] / Q'	G E'_3 / Q'
5	[Y_2 E'_3 G'] / G Y_2 E'_3 Q	G Y_2 E'_3 Q' / I'
6	[P I'] / A'	B O_1 P' Q' / A'
7	[P I'] / I_2 J' K' O'	B O_1 Y_2 D' / I_2 J' K' O'

standardizzazione della nomenclatura e del controllo dei reagenti utilizzati dai diversi laboratori di modo che le formule eritrocitarie siano univoche in tutto il mondo.

Allotipi

Per allotipi in campo animale si intendono tutte le proteine polimorfe del siero, tra cui le più studiate e le più interessanti sono quelle che si riferiscono alle immunoglobine stesse (Harvey E.F., Stone W.H. 1976).

I reagenti utilizzati per l'identificazione di questi fattori antigene

TABELLA 4 - SISTEMI DI GRUPPO SANGUIGNO NEGLI EQUINI

Sistemi genetici	Fattori antigene	Alleli
A	Aa Ab Ac Ad Ae Af Ag	A^a A^{adf} A^{adg} A^b A^{bc} A^{cd} A^-
C	Ca	C^a C^-
D	Da Db Dc Dd De Df Dg Dh Di Dk Dl	D^{ad} D^{bc} D^{cg} D^{ccfg} D^{cegi} D^{de} D^{dfk} D^k D^{dgh} D^-
K	Ka	K^a K^-
P	Pa Pb	P^a P^b P^-
Q	Qa Qb Qc	Q^{abc} Q^{ac} Q^b Q^c Q^-
U	Ua	U^a U^-
T	Tt	T^t T^-

TABELLA 5 - SISTEMI DI GRUPPO SANGUIGNO NEGLI OVINI

Sistemi genetici	Fattori antigene	Alleli
A	Aa Ab A'	A^a, A^b, A^-
C	Ca Cb C^-	C^a, C^{ab}, C^b, C^-
M	Ma Mb Mc	M^a, M^b, M^{ac}, M^c
D	Da D^-	D^a, D^-
B	Ba Bb Bc Bd Be Bf Bg Bh Bi B^-	B^a, B^{ab}, B^{abc} B^- etc.
X	X Z	X, X^z
R	R - O	R, r

TABELLA 6 - SISTEMI DI GRUPPO SANGUIGNO NEI SUINI

Sistemi genetici	Fattori antigene	Alleli
A	A, O	A^a, A^o
B	Ba Bb	B^a, B^b
C	Ca	Ca, C^-
D	Da Db	D^a, D^b
E	Ea Eb Ed Ec Ef Eg Eh Ei Ej Ek El Em En Eo Ep	E^{bdgkmp}, $E^{deghkmnp}$, E^{aegln}, $E^{defhkmnp}$
F	Fa Fb Fc Fd	F^{ac}, F^{bc}, F^{bd}
G	Ga Gb	G^a, G^b
H	Ha Hb Hc Hd He	A^a, H^b, H^{ab}, H^{cd}, H^{bd}, M^{be}, H^-
I	Ia Ib	I^a, I^b
J	Ja Jb	J^a, J^b, J^-
K	Ka Kb Kc Kd Ke	K^{ac}, K^{ace}, K^{ade}, K^b, K^-
L	La Lb Lc Ld Lf Lg Lh Li Lj Lk Li	L^{adhi}, L^{bcgi}, L^{bdfi}, L^{agi}, L^{adhjk} L^{adhjl}
M	Ma Mb Mc Md Me Mf Mg	M^{abe}, M^{ae}, M^b, M^c, M^{bc}, M^{cd}, M^d, M^{dg}, M^{ef}, M^{ade}, M^-
N	Na Nb Nc	N^a, N^b, N^{bc}
O	Oa Ob	O^a, Ob

vengono prodotti sia mediante iso che eteroimunizzazioni inoculando le frazioni sieriche precedentemente purificate. La reazione antigene anticorpo viene evidenziata secondo le normali tecniche immunologiche di precipitazione quali l'immunodiffusione secondo Ouchterlony, l'immunodiffusione secondo Mancini, l'immunodiffusione radiale.

Nei bovini si conoscono almeno sette sistemi genetici che control-

lano gli allotipi di cui i più interessanti sono Bva e Bvb che identificano delle immunoglobuline (tabella 7).

TABELLA 7 - SISTEMI ALLOTIPICI NEI BOVINI

Locus	Classe molecolare	Catena	N. degli Alleli	Specificità
Bva	Ig G_2	(H) F c	2	2
Bvb	Ig G_2	(L) Fab	2	1
Bvc	Ig G_1	Sconosciuta	2	1
Mc	Macroglobuline	—	2	1
Lpc	H D Lp	a	2	1
Ic	Sconosciuta	Sconosciuta	2	1
Nac	Sconosciuta	Sconosciuta	2	1

Gli allotipi sono stati studiati anche in altre specie tra cui ricordiamo gli studi effettuati in Italia in questi ultimi anni che hanno permesso di identificare analoghe caratteristiche antigeniche di componenti sierologiche sia nel bufalo, che nella pecora (Iannelli D., Capparelli R. 1981).

Per questi caratteri non ci si è limitati alla identificazione, ma è stato effettuato uno studio genetico ed anche uno studio biochimico atto ad identificare il prodotto dei differenti alleli.

Antigeni di istocompatibilità

Mi limiterò semplicemente ad accennare che si tratta di caratteristiche antigeniche presenti su tutte le cellule dell'organismo e studiate soprattutto a livello dei linfociti.

E' inutile sottolineare qui l'importanza che questi caratteri hanno in campo umano in quanto non solo sono direttamente implicati

nel problema del rigetto e nel problema dei tumori, ma sembrano strettamente associati al fenomeno della resistenza alle malattie. Quest'ultimo aspetto ha fatto sì che anche in campo zootecnico si stia studiando ampiamente il problema e al momento attuale si conoscono molte specificità antigeniche legate al sistema maggiore di istocompatibilità sia per il bovino, il suino, le pecore, le capre, ecc. (Leveziel H. 1979).

Polimorfismi biochimici ed elettroforetici

In questo settore vengono considerati tutti i polimorfismi geneticamente determinati che presentano delle differenze individuali e sono evidenziabili mediante tecniche biochimiche. Nella maggior parte dei casi si tratta di differenze qualitative identificabili per lo più mediante elettroforesi (emoglobina, transferrina): in altri casi si tratta di caratteri semiquantitativi che presuppongono anche una determinazione biochimica quantitativa (Na, K, GSH, ecc).

Per lo più sono stati considerati quei polimorfismi che possono essere individuati in cellule e liquidi biologici facilmente ottenibili come i vari costituenti del sangue (eritrociti, siero) ed il latte.

a) *Polimorfismi elettroforetici*

Questi polimorfismi biochimici vengono inviduati sfruttando la elettroforesi zonale che permette di separare le diverse frazioni proteiche in funzione di anche piccolissime differenze di carica. Si tratta di una metodica biochimica relativamente semplice e di facile applicazione specie quando non richiede particolari metodi di rilevazione come le proteine del latte (Lg, La, BCn, Cn, KCn) e alcune proteine del siero e degli eritrociti (Hb, Tf, Pa, Al) (figura 1).

In altri casi il metodo di rilevazione è più indaginoso in quanto si tratta di enzimi che vengono rilevati mediante opportuna colorazione enzimatica sfruttando le proprietà biogiche degli stessi (Es, Am, Ca...) (Dermid E.M. 1975).

Dopo elettroforesi le bande proteiche rimangono separate e, dal momento che ogni banda è l'espressione di un allele codominante è

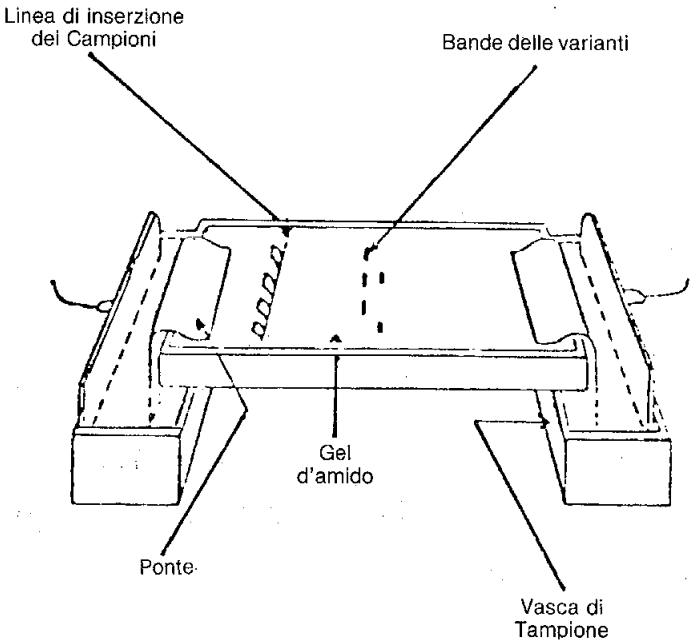


Figura 1 - Rappresentazione schematica di una elettroforesi su gel d'amido

possibile conoscere il genotipo individuale direttamente dal fenotipo.

Nella tabella 8 sono raggrupati i più noti polimorfismi elettroforetici dei bovini, equini, suini, avini (Ashton e coll 1967).

b) *Polimorfismi biochimici*

In questo settore vengono considerati alcuni caratteri che mostrano una variabilità quantitativa piuttosto che qualitativa e che vengono determinati con metodi biochimici specifici per ognuno di essi.

Questo tipo di indagini rispecchia un lento evolversi degli interessi dei ricercatori in quanto, mentre in un primo tempo ci si è accontentati di rilevare delle differenze di ordine genetico, successivamente queste differenze sono state ricercate a livello di proteine aven-

TABELLA 8 - POLIMORFISMI ELETTROFORETICI SUDDIVISI PER SPECIE

SUINI

Locus	Simbolo	Alleli
Pre-albumina	Pa	A - B
Albumina	Alb	A-B-O
Post albumina	Po	A-B-C-D
Ceruloplasmina	Cp	A - B
Hemopexina	Hpx	O-IF-I-Is 2-3 F-3
Transferrina	Tf	I-Aw-A-B C-E-D
α_2 Macroglobulina	$S\alpha_2$	A-B-C
Fosfatasi alcal.	Akp	
Amilasi	Am	A-BF-B-C
Esterasi	Es	A-B
Adenosin Deaminasi	Ada	A-B-O
Fosfatasi acida	Acp	A-B
Anidrasi carb.	Ca	A-B
Catalasi	Cat	
Glucosio 6 P deidr.	Gpd	A-B
Fosfoglucomutasi	Pgm	A-B
Fosfoesoso isomer.		A-B
6 Fosfo glucon. dei.	Pgd	A-B

EQUINI

Locus	Simbolo	Alleli
Albumina	AI	A- B
Fosfatasi acida	AP	F - S
Anidrasi carbon.	CA	F-I-L-O-S
Catalasi	CAT	F - S
NADAH - Diaforasi	DIA	F - S
Esterasi (acide)	Es	F-G-H-I
Esterasi (alcaline)	Es	F-I-S
Prot. Vit. D legante	Gc	F-S
Emoglobina	Hb	A-a
Postalbumina	Pa	D-F-S
6 - Fosfogluconato dei.	6-PGD	D-F-S
Fosfoglucomutasi	PGM	F-S-V
Fosfoesoso isomer.	PMI	F-I-S
Prealbumina	Pr	F-G-I-L-N S-U-W-Z
Transferrina	Tf	D-F-H-M-G O-R

OVINI

Locus	Simbolo	Alleli
Albumina	Al	F-S-W
Prealbumina	Pr	F-S-O
Transferrina	Tf	I-A-G-B-C M-U-E-P
Esterasi	Es	a-b-c
Emoglobina	Hb	A-B
Anidrasi Carb.	Ca	F-S
Proteina X	X	X-x
Diaforasi	Dia	I-Z
Potassio	K	L-h
Glutatione	GSH	H-h

BOVINI

Locus	Simbolo	Alleli
Emoglobina	Hb	A-B
Transferrina	Tf	A-B-D_1-D_2-E
Albumina	Al	F-S
Postalbumina	Pa	F-S
S α_2 globulina	S α_2	A-O
Fosfatasi alcalina	Akp	A-O
Amilasi	Am	A-B-C
Anidrasi carb.	Ca	F-S
β - Lattoglobulina	β - Lg	A-B
α - Lattoalbumina	α - La	A-B
β - Caseina	β - Cn	A_1-A_2-A_3-B-C
γ - Caseina	γ - Cn	A-B
α - Caseina	α s_1 - Cn	A-B-C-D
ϰ - Caseina	ϰ - Cn	A-B

ti anche un significato fisiologico, patologico (Hb, Tf, ecc.) ed anche produttivo (Cn) ed infine si è partiti dallo studio di un particolare sistema metabolico per ricercare le evetuali connessioni genetiche.

Tra i vari approcci effettuati ricordiamo lo studio di talune costanti ematologiche di base (emoglobina, ematocrito, Na, K) di alcuni sistemi enzimatici eritrocitari (metaemoglobina reduttasi = NADPH dipendente, glucosio 6 fosfato deidrogenasi, ATPasi oubaina sensibile) preposti al controllo dei processi ossidativi ai danni dell'eritrocita ed al trasporto attivo degli ioni. Questi studi hanno permesso di individuare delle differenze anche significative tra gli individui, ma, al momento attuale, è difficile poter asserire se si tratta di differenze dovute a fenomeni adattativi o a base genetica (Locatelli A. 1982).

Ricordiamo inoltre gli studi relativi a proteine ed enzimi solubili degli spermatozoi e del muco cervicale di vacche in diverse fasi del ciclo estrale ai fini di evidenziare possibili correlazioni genetiche nei processi riproduttivi. Sono state studiate le esterasi, fosfatasi acida, diaforasi, latticodeidrogenasi, arilamidasi ed esochinasi; tuttavia i risultati conseguiti, anche se hanno messo in evidenza una certa variabilità, non sono sufficienti a stabilire se tali differenze siano da attribuire ad alleli diversi di loci specifici (Sartore G. 1982).

Anche per questi parametri quindi bisogna ancora approfondire gli studi sulla trasmissione ereditaria per potere escludere che si tratti di una variazione legata allo specifico stato fisiologico.

c) *Studi su DNA*

Da ultimo sono da ricordare anche gli studi che si stanno effettuando per caratterizzare il DNA sia a livello di genoma (cariotipo), sia a livello della struttura molecolare (restriction fragments per individuare anche a questo livello le differenze genetiche individuali e le eventuali anomalie che possono portare (Hauswirth W.W., Laipis P.J. 1982).

Tipico esempio è la ben nota traslocazione 1/29 del bovino che è stata individuata soprattutto nella Romagnola e che sembra essere responsabile di una minore fertilità (Succi G. 1982).

Applicazione dei Marcatori Genetici.

Identificazione dell'animale.

Assieme alla determinazione della parentela è l'applicazione che ormai è entrata nella routine della zootecnia (Rognoni G., Sartore G. 1975).

I gruppi sanguigni ed i polimorfismi elettroforetici sono caratteri che sono identificabili univocamente durante tutta la vita dell'animale senza subire alcuna influenza ambientale. Inoltre, per effetto della pluriallelia, il numero delle possibili combinazioni fenotipiche e, quindi, genotipiche è talmente alto che è praticamente impossibile avere due individui con la medesima formula eritrocitaria.

L'importanza di questa applicazione è ovvia se si pensa alle innumerevoli possibilità di errore, sia in buona fede, che dolose, che si possono avere nella pratica commerciale soprattutto oggi in cui sia animali, che seme vengono spostati da un paese all'altro.

Da un punto di vista pratico, attualmente, anche in Italia, le Associazioni di razza richiedono la formula eritrocitaria per la registrazione del bestiame. In questo modo riescono a caratterizzare in maniera più completa ogni soggetto iscritto al Libro Genealogico e si salvaguardano da eventuali controversie.

Controllo della parentela

E' senza dubbio l'applicazione più importante e quella che, in un certo senso, ha condizionato tutto lo sviluppo degli studi immunogenetici.

Il controllo della parentela e, quindi, l'esclusione di paternità e maternità si basano sul fatto che, trattandosi di caratteri qualitativi semplici, trasmessi secondo le leggi Mendeliane, ogni figlio non può presentare fattori sanguigni, che non siano presenti in almeno uno dei genitori e che deve sempre avere un allele di origine paterna ed uno di origine materna. (La diagnosi negativa, pertanto, ha valore assoluto, mentre la diagnosi positiva è valida solo in termini probabilistici) (tabella 9).

TABELLA 9 - ESEMPI DI DETERMINAZIONE DI PARENTELA: nel 1 caso può essere figlio dei genitori indicati; nel 2 caso non può essere figlio del padre; nel 3 caso non può essere figlio della madre

	FORMULA ERITROCITARIA										POLIMORFISMO ELETTROFORETICO			
											Tf	Alb	Am	Ca
	A_2	$OJ'K'O'_2/E'_3G'$	R_2X_2	F/F	J		M	H'		S'/S'	D_1D_2	FF	AB	SF
1) Figlio		$E'_3G'/GY_2E'_1Q'$	C_2R_2	F/V		L	M	H'		S'/S'	D_1D_1	FF	AB	SF
Madre	A_2	$GY_2E'_1Q/BGKO'$	C_2W	V/V		L		H'		R'/S'	D_1D_2	FS	BB	FF
2) Figlio	A_2	BO_1Q'/BO_1Y_2D'	C_2W	F/V	J			H'		E'/S'	D_1E	SS	AA	FF
Madre		BO_1Y_2D'/E'_3	C_2R_2W	F/F	J			H'		E'/S'	E E	SS	AB	SF
3) Figlio		$OJ'K'O'_2/G_1O_1$	C_2E	F/V		L	M	H'	Z	R'/S'				
Madre	A_2H	$BI_1Q/O_1T_1E'_3F'_1'K'$	C_2WX_2	F/F				H'		E'/S'	D_1D_1	SS	AB	SS

Grazie alla grande variabilità ed al numero elevato di loci nei bovini è possibile individuare con i gruppi sanguigni ed i polimorfismi il 95% dei casi di errata parentela, ne cavalli si arriva al 92%, negli ovini al 75%.

È chiara quindi l'importanza di questa analisi qualora si presentino delle possibilità di errore, come ad es. nel caso di più fecondazione durante lo stesso calore e della monta non controllata.

Il controllo può essere effettuato con almeno tre differenti finalità: — controllo sporadico negli allevamenti onde scoraggiare eventuali false attribuzioni, — controllo di tutti i soggetti sottoposti alle prove progenie per essere sicuri nella valutazione di riproduttori, — controllo di tutti i soggetti iscritti al libro genealogico per comprovare ulteriormente la genealogia dichiarata.

Vengono riportati nella figura 2 i dati relativi alle false attribuzio-

Figura 2 - Percentuale di false attribuzioni di parentela identificate dal 1966 al 1982 per la FRISONA ITALIANA (————) e BRUNA ALPINA (- - - - - - -)

ni della parentela all'inizio delle testificazioni in Italia fino ad oggi per la razza Bruna Alpina e Frisona Italiana. Come si può notare, anche se le attribuzioni errate non sono scomparse sono nettamente diminuite probabilmente perché l'allevatore, conoscendo questo tipo di controllo, si è sentito più responsabilizzato ed ha intensificato i controlli.

Nelle pecore la situazione è ancora più allarmante, probabilmente sia per le condizioni dell'allevamento, sia per la figura dell'allevatore che non è ancora stato «educato» ad un controllo delle monte.

Per il cavallo si sta cominciando solo da poco ad effettuare le prime diagnosi di parentela ed anche per questa specie che pure dovrebbe essere essere molto più controllata, le sorprese sono sempre molte e gli errori più del previsto.

Ci auguriamo pertanto che, come per il bovino, anche per le altre specie la determinazione della parentela possa divenire uno strumento utile ed efficace da affiancare a tutti i parametri di tipo zootecnico.

Distinzione dei free-martins e dei gemelli monozigotici

Le connessioni vascolari che possono instaurarsi nella vita intrauterina tra i gemelli dizigotici dei bovini non solo porta alla strerilità le femmine nel caso di gemelli a sessi diversi, ma possono determinare uno scambio di eritroblasti per cui alla nascita ogni gemello possiederà eritrociti con le caratteristiche antigeniche del genotipo del fratello ed eritrociti con le proprie caratteristiche (eritromosaicismo). Con opportune analisi è possibile individuare l'eritromosaicismo, e quindi, sapere se ci sono state delle connessioni vascolari nella vita intrauterina che porteranno alla sterilità la femmina (Zuffada A. e altri 1967). (figura 3).

L'utilità di questo tipo di analisi è dovuta al fatto che ben il 6% delle gemelle è normale non avendo avuto anastomosi con il fratello e quindi può essere destinata alla riproduzione.

Questo riconoscimento naturalmente è tanto utile, quanto più la progenie interessata è di alta genealogia.

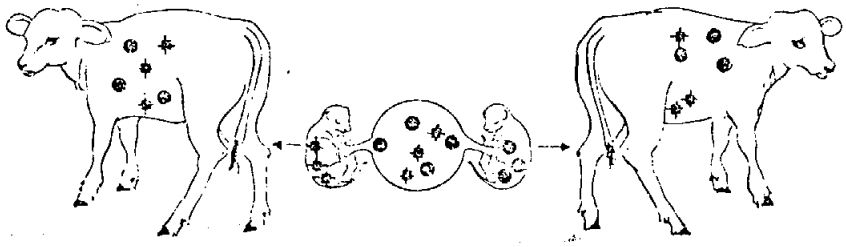


Figura 3 - Eritromosaicismo in due gemelli bovini biovulari

Prevenzione dell'ittero neonatale del puledro

È noto che nel cavallo, come per l'uomo, esiste una incompatibilità materna fetale dovuta agli antigeni di gruppo sanguigno. Mentre per l'uomo questa incompatibilità si può manifestare anche durante la vita intrauterina, nel cavallo si manifesta solo alla nascita in seguito all'assunzione del colostro che può contenere anticorpi specifici antieritrociti del puledro. Con un test semplicissimo si può sapere già prima della nascita se il puledro corre questo rischio onde sottrarlo alla madre e nutrirlo in altro modo almeno fino a quando gli anticorpi del colostro non sono più in grado di essere assorbiti. Si può anche cercare di evitare certi tipi di accoppiamento in funzione del gruppo sanguigno dello stallone e della fattrice (Lubas G. J. 1982).

Genetica di popolazioni

La definizione del genotipo di una popolazione di animali permette di ottenere molte altre informazioni che vanno, oltre la semplice identificazione dell'individuo, la diagnosi della sua paternità e maternità. Il passo dall'analisi del genotipo individuale a quella del genotipo collettivo ci consente di definire un parametro fondamentale negli studi di genetica di popolazione: la frequenza genica.

Le frequenze geniche possono servire essenzialmente per tre diversi scopi:

1. - conoscenza della struttura della popolazione e di alcuni parametri che la definiscono;

2. - conoscenza delle relazioni tra le diverse popolazioni;

3. - indagini su correlazioni tra marcatori e caratteri quantitativi di interesse zootecnico.

a) *Struttura della popolazione*

Un parametro di grande interesse che può essere definito dalla analisi delle frequenze geniche in una popolazione è il grado di consanguineità (F) presente in essa. Come è noto le frequenze genotipiche, se gli accoppiamenti avvengono casualmente nella popolazione, seguono le normali leggi della probabilità: così dati alleli A B allo stesso locus, le frequenze attese dei genotipi saranno f (AA) = p^2, f (AB) = 2pq, f (BB = q^2 posto p = g (A) e q = f (B). La presenza di accoppiamenti tra parenti e quindi di individui con F o provocherà un eccesso di genotipi omozigoti o una carenza di eterozigoti (tabella 10). Questa può essere misurata e fornire una stima di F medio nella popolazione (Kurczynski T. W., Steinberg A. G. 1967).

Disponendo di questa stima ad intervalli diversi, può essere calcolato un AF che esprime l'incremento di omozigosi per generazione e che è inversamente proporzionale al doppio del numero effettivo (Ne) della popolazione. Anche se la seguente non è l'esatta definizione di Ne, questo può essere pensato come il numero di individui geneticamente indipendenti presenti nella popolazione (Crow J., Kimura M. 1970).

Può capitare che una popolazione composta da molte migliaia di individui abbia un piccolo numero effettivo per l'elevata incidenza di consanguineità dovuta ad es. all'esiguo numero di riproduttori in uso. Parametri di questo genere possono essere confrontati con gli stessi ottenuti con altri procedimenti di analisi: per es. utilizzando dati demografici e anagrafici.

b) *Relazioni tra popolazioni*

Le frequenze geniche, quando non esistono forze selettive, ten-

TABELLA 10 Esempio di stima delle frequenze geniche in una popolazione di pecore Massesi mediante gene counting. Il gene è la transferrina e l'ipotesi di equilibrio di Hardy-Weinberg viene contraddetta dal test del χ^2 quando l'ipotesi è quella del semplice accoppiamento casuale degli individui. Se si introduce nel modello anche il coefficiente di consanguineità (F) alla stima (ottenuta con maximum likely hood) delle frequenze geniche si aggiunge quella di F e lo scostamento delle frequenze genotipiche attese da quelle osservate non è più significativa.

Genotipo	F. oss	Modello	F. attesa	X^2	Prob.	Modello	F. attesa	X^2
AA	106	p^2N	91.13	2.43		p^2 (I-F)+pF	108.1	0.04
BB	63	q^2N	40.9	11.94		q^2 (I-F)+qF	53.5	1.69
DD	73	r^2N	65.64	0.83		r^2 (I-F)+rF	82.4	1.07
AB	92	2pqN	121.89	7.33		2pq (I-F)	106.1	1.87
AD	155	2prN	154.85	0.01		2pr (I-F)	137.2	2.31
BD	89	2qrN	103.57	2.05		2qr (I-F)	90.7	0.03
	N 578		578	24.58	~.0001		578	7.01

p =	.3971	p =	.3975
q =	.2656	q =	.2627
r =	.3374	r =	.3397
		F =	.1213

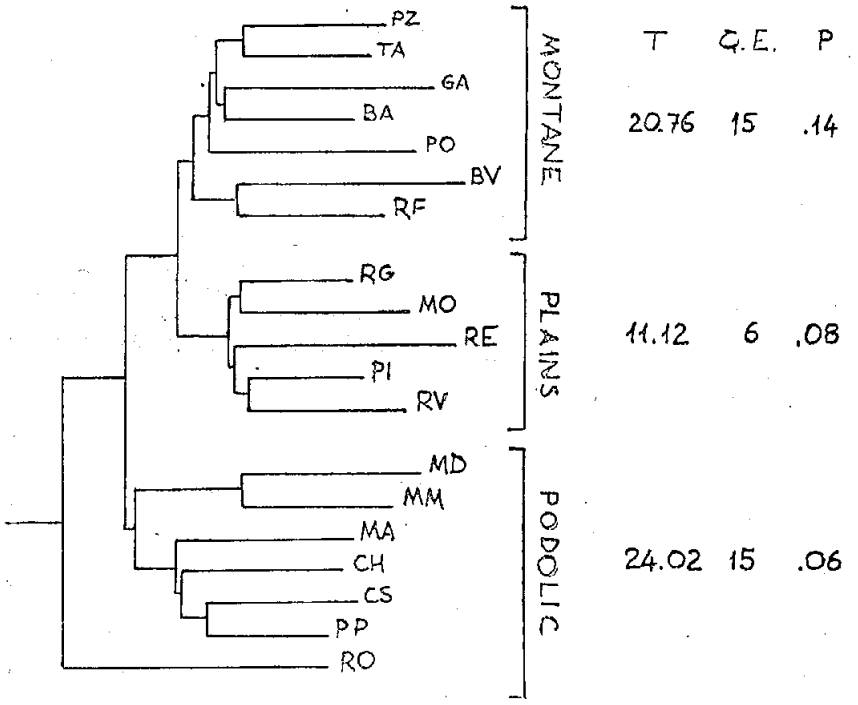


Figura 4
Dendrogramma che rappresenta le relazioni filogenetiche tra alcune razze bovine italiane ricostruite in base alle frequenze geniche di 13 loci di polimorfismo ematico ed eritrocitario.
(PZ = Pinzgau, TA = Tarina, GA = Grigia Alpina, BA = Bruna Alpina, PO = Pezzata d'Oropa, PV = Pezzata Nera Valdostana, RF = Pezzata Rossa Friulana, RG = Reggiana, MO = Modenese, RE = Rendena, PI = Piemontese, RV = Pezzata Rossa Valdostana, MD = Modicana, MM = Maremmana, MA = Marchigiana, CH = Chianina, CS = Cinisara, PP = Podolica Pugliese, RO = Romagnola).
Il test «treenes» riportato a fianco esprime l'accordo tra le relazioni espresse dall'albero e l'ipotesi di evoluzione indipendente che questo rappresenta.

dono a rimanere stabili da una generazione all'altra o, al limite, si spostano lentamente ed a caso per un fenomeno detto deriva genetica. È ovvio, quindi, che un gene selettivamente neutrale avrà frequenza simile in due popolazioni che hanno un'origine comune e vicina nel tempo. Su questo principio si basano i numerosi metodi di analisi statistica multivariata che, a partire dalle frequenze geniche, calcolano la distanza tra popolazioni e rappresentano queste distanze con metodi grafici di vario genere (figura 4).

La conoscenza delle frequenze di uno stesso allele in varie popolazioni consente di stimare la varianza tra le frequenze e quindi di individuare la presenza di forze estranee a quelle casuali nella distribuzione delle frequenze geniche (Cavalli Sforza L. L., Bodmer W. F. 1971).

In questo modo è stato accertato (almeno fino prova contraria) che gli alleli che vengono oggi riconosciuti per i sistemi di gruppo sanguigno e di polimorfismo ematico nel bovino sono selettivamente neutrali: la loro variabilità è ampiamente spiegata dalla deriva (figura 5) (Astolfi P. e coll. 1983).

In altre parole la selezione neutrale o artificiale non agisce su questi geni o vi agisce in modo impercettibile ai nostri sistemi di analisi. Questo fatto ci introduce al 3° punto (Pagnacco G. e coll. 1983 Atti A.S.P.A.).

c) *Correlazioni con caratteri quantitativi*

Fin da quando furono scoperti si pensò che una eventuale associazione tra caratteri quantitativi e marcatori facilmente testabili avrebbe consentito un enorme incremento e semplificazione nella velocità di selezione.

I risultati scaturiti dalle numerosissime indagini condotte sono stati largamente deludenti e contradditori. Questo fatto non stupisce se è vero che i marcatori — comunemente testati — sono selettivamente neutrali.

Un'eccezione importante, che viene acquisendo un sempre maggiore peso, è il complesso dei loci che controllano la qualità delle proteine del latte: caseine e sieroproteine.

La qualità di queste proteine, ossia il genotipo della bovina, in-

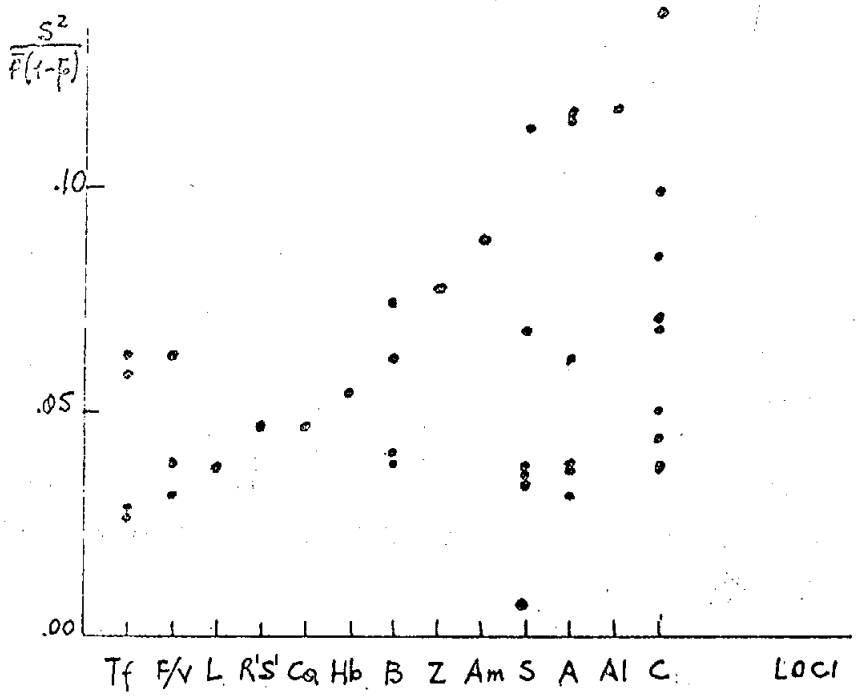


Figura 5
La variabilità delle frequenze geniche tra le varie razze bovine è completamente spiegabile dalla deriva genetica. Nessun allele risulta «spinto» in alcun modo da forze selettive.

fluenza in modo notevole le qualità del latte sotto molti profili, il più importante dei quali è l'attitudine alla caseificazione. Si ritiene che il genotipo Cn^{-BB} sia superiore agli altri, ma sicuramente anche l'assetto genetico dei rimanenti loci e le interazioni tra questi hanno un peso determinante e probabilmente l'eterozigote è il genotipo favorito.

Nel caso delle caseine il marcatore acquisisce un ruolo di grande rilievo: non si tratta semplicemente di antigeni sulla parete del globulo rosso, ma di geni che hanno un significato metabolico e più ancora una diretta interferenza con processi che interessano le produzioni zootecniche. Probabilmente, esaurito il filone dell'analisi tassonomica tra popolazioni, sarà verso marcatori di questo genere che

dovrà orientarsi la ricerca: caratteri qualitativi in funzione di aspetti quantitativi delle produzioni.

BIBLIOGRAFIA

1) ASTHON G. C., GILMOUR D. G., KIDDY C. A., KRISTIANSSON F. K. (1967): «Proposals on nomenclature of protein polymorphisms in farm livestock» Genetics 56; 353-362.

2) ASTOLFI P., PAGNACCO C., GUGLIELMINO-MATESSI C. R. (1983): «Phylogenetic analysis of native Italian cattle breeds» J. Anim. Breeding and Genetics 100: 87, 100.

3) CAVALLI SFORZA L. L., BODMER W. F. (1971): «The genetics of Human Populations» Freemann, S. Francisco.

4) CROW J., KIMURA M. (1970): «An introduction to population genetics theory» Harper & Row, N. Y.

5) DERMID E. M., AGAR N. S., CHAI C. K. (1975): «Electrophoretic variation of red cell enzyme systems in farm animals» Anim. Blood Grps Bioch. Genet. 6; 127-174.

6) GAHNE B. (1979): «Immunogenetics and biochemical genetics as a tool in pig breeding programmes» Acta Agric. Scand. Suppl. 21; 185-197.

7) HAUSWIRTH W. W., LAIPSIS P. J. (1982): «Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal linkage of Holstein cows». Pro. Nat. Acad. Sci. 79; 4686-4690.

8) HARVEY E. F., STONE W. H. (1976): «Cattle allotypes: a review and suggested nomneclature» Anim. Blood Grps biochem. Genet. 7; 39-50.

9) IANNELLI D., CAPPARELLI R. (1981): «Water buffalo allotypes: identification of two specificities controlled by indipendent genes» Anim. Blood Grps Biochem. Genetics 12; 23-30.

10) KURCZYNSKI T. W., STEINBERG A. G. (1967): «A general program for maximum likeli hood estimation of gene frequences» Amer J. Hum. Genet. 19: 172, 179.

11) LEVEZIEL H. (1979) «Le complexe d'histocompatibilité majeur chez l'homme e chez les animaux» Ann. Genet. Sel. Anim. 11 (3); 281-356.

12) LOCATELLI A. Milano (1982): «Polimorfismi enzimatici dei bovini» C.N.R. Atti del P.F. «Difesa delle risorse genetiche delle popolazioni animali» 91-103.

13) LUBAS G. J. (1982): «Malattia emolitica neonatale (MEN) del puledro. Recenti acquisizioni ed aggiornamento bibliografico» Riv. Zoot. Vet. 10 (2); 114-123.

14) PAGNACCO G. e Coll. (1983): «Relazione tra polimorfismi proteici del latte, parametri ambientali ed attitudine alla caseificazione, osservazioni preliminari». Atti A.S.P.A.. In corso di stampa.

15) ROGNONI G. (1962): «I gruppi sanguigni dei bovini: considerazioni sulle loro applicazioni nella pratica zootecnica». La clinica Veterinaria 85, 8; 381-421.

16) ROGNONI G., SARTORE G. (1975): «Aspetti applicativi dei polimorfismi genetici nell'allevamento bovino, acquisizione e prospettive» Atti VIII International Conference on disease of cattle; 114-141.

17) SANDBERG K. (1974): «Blood typing of horses: current status and application to identification problems» 1st World Congress on Genetics applied Livestock Improvement 253-265.

18) SARTORE G. Milano (1982): «Polimorfismi biochimici degli spermatozoi e delle secrezioni utero cervicali e loro connessione con la fisiologia della riproduzione». C.N.R. Atti del P. F. «Difesa delle risorse genetiche delle popolazioni animali» 140-150.

19) STORMONT C. (1962): «Current status of Blood Groups in cattle». Ann. N. Y. Acad. Sci. 97; 251-268.

20) STONE W. H., IRWIN M. R. (1963): Blood groups in animals other than man Adv. In. Immunol. 3; 315-350.

21) SUCCI G. Milano (1982): «Indagini cariologiche su razze bovine scarsamente valorizzate o in via di estinzione» C.N.R. Atti del P. F. «Difesa delle risorse genetiche delle popolazioni animali» 164-176.

22) TODD C., WHITE R. G. (1910): «On the haemolytic immune lysins of the ox and their relation to the question of individuality and blood relationship» Jour Hyp 10; 185-196.

23) TUCKER E. M. (1975): The blood of sheep «Genetic Markers in the palsma and red blood cells» Blunt ed. Springer Verlag 123-153.

24) ZUFFADA A., BOCCI A. M., FIORENTINI A. (1967): «Evidenziazione dell'eventuale connessione vascolare interplacentare in casi di gemelli biovulari» Atti SISVET 21; 423-427.

Atti della Giornata di studio su:
Immunogenetica animale

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 20 Maggio 1983

G. SARTORE *

CONSIDERAZIONI SUI POLIMORFISMI GENETICI

Introduzione

Il polimorfismo genetico è un tipo di variazione in cui individui con nettamente distinte qualità coesistono come membri normali di una popolazione. Questa condizione è stata definita da Ford (1940) come la contemporanea presenza nello stesso ambiente di due o più forme o fasi discontinue di una specie, in proporzioni tali che la più rara di esse non può essere mantenuta semplicemente come conseguenza della mutazione ricorrente.

Questa definizione è estremamente significativa perché esclude da una parte le razze geografiche, le forme stagionali e le variazioni continue, come peso e statura, che danno origine a curve di distribuzione gaussiana, e dall'altra altresì esclude la segregazione di geni mendeliani responsabili di forme patologiche o di difetti, poiché queste anormalità vengono contrastate dalla selezione naturale, l'effetto della quale è bilanciato soltanto dalla mutazione.

Il controllo genetico della fase polimorfe può derivare dalla segregazione di un singolo locus mendeliano o di un super gene, inteso sia come un complesso genico strettamente associato, sia come una inversione o un intero cromosoma.

Variazioni di questo tipo sono note da tempo, anche se in numero limitato e riferite particolarmente a caratteristiche esteriori degli individui. Sono però stati gli studi e le ricerche di immunogenetica e di genetica biochimica a dimostrare che una enorme ricchezza

* Cattedra di Zootecnica II: Genetica e allevamento - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Torino.

di variazioni genetiche esiste nelle popolazioni naturali della maggior parte degli organismi.

Le variazioni messe in evidenza dall'elettroforesi su mezzi di supporto più o meno sofisticati, dalla carta alla poliacrilamide, accoppiata a tecniche di colorazione istochimica, e da altre tecniche come i metodi immunologici e sierologici, il sequenziamento della proteine, ecc., consistono in differenze nella sequenza degli aminoacidi delle proteine. Tuttavia recenti studi suggeriscono che variazioni nella regolazione genica, modificando per esempio la quantità o il tempo della sintesi proteica, possono essere abbastanza comuni in natura e potrebbero essere di grande significato nell'evoluzione, ma l'accertamento di variazioni nella regolazione genica risulta essere un problema assai difficile e indubbiamente costituisce un grande campo di studio al fine di definirne il livello ed il significato adattivo (Mc Donald e Ayala, 1978).

In riferimento a quanto è appena stato detto, le considerazioni che verranno fatte riguarderanno soltanto le variazioni strutturali qualitative, intendendo con il termine «locus» una sezione di DNA che specifica una singola catena polipeptidica, cioè un cistrone (Roberston 1966), a carico del quale eventi mutazionali più o meno remoti hanno determinato la comparsa di alleli che specificano le attuali varianti.

Da questo punto di vista derivano alcuni problemi fondamentali della genetica di popolazioni che verranno brevemente discussi.

a) *Frequenza di loci polimorfi nelle popolazioni naturali*

Per quanto riguarda questo aspetto è evidentemente importante considerare che l'aumento di variazione genetica in una popolazione ne determina il potenziale evolutivo. A questo proposito negli ultimi anni considerevoli progressi sono stati fatti al fine di ottenere stime delle variazioni genetiche nelle popolazioni attraverso l'applicazione di concetti e tecniche della biologia molecolare. In particolare, come già detto, l'elettroforesi ha fornito stime del livello di variazione dei loci che specificano enzimi ed altre proteine.

L'ammontare di tali variazioni è notevole e al momento attuale

sappiamo che i singoli individui appartenenti ai vertebrati, uomo incluso, sono eterozigoti per almeno il 6% dei loro loci, mentre un invertebrato può essere eterozigote per più del doppio dei loci di un vertebrato (Selander, 1976; Dobzhansky e coll., 1977).

Due importanti problemi non ancora risolti influiscono sulle stime della variazione genetica ottenute mediante l'elettroforesi. Il primo è che questa tecnica evidenzia soltanto una frazione di tutte le sostituzioni di aminoacidi nelle proteine e non sappiamo ancora quanta variazione esista, anche se questo è un problema oggetto di attive ricerche.

Il secondo problema deriva dal fatto che attraverso tale tecnica vengono esaminati soltanto i loci che influiscono qualitativamente sulla struttura delle proteine, mentre ben poco si conosce su quanta variazione esista in altri loci, particolarmente in quelli la cui funzione è di regolare il tempo e la quantità della sintesi proteica.

b) *Numero di alleli per locus*

Riguardo a questo punto, cioè quanti alleli competano ad ogni locus, sempre tenendo conto del concetto di locus prima indicato, la risposta può essere «non molti», in quanto generalmente nell'ambito delle popolazioni si trovano due o tre varianti e soltanto di rado il numero degli alleli arriva a sei o sette.

Alcune eccezioni riguardano determinati sistemi immunogenetici, in particolare il locus B dei bovini, per il quale venivano riportate centinaia di alleli, mentre sembra ormai chiaro che si tratta di un locus multiplo. D'altra parte è vero che per esempio sono conosciute molte emoglobine anormali nell'uomo, o diverse varianti proteiche in altri animali, ma è altresì da segnalare che si tratta per la maggior parte dei casi di varianti assai rare e che le popolazioni polimorfe generalmente presentano soltanto poche forme alternative. Piuttosto è da rilevare che nelle popolazioni vi è una considerevole variazione tra loci nell'ammontare dei polimorfismi genetici, che ad ogni locus vi è somiglianza tra le popolazioni nell'ammontare e nel comportamento delle variazioni genetiche e che una differenziazione genetica tra popolazioni esiste per alcuni loci (Zanotti e Pagnacco, 1983), il

che comporta un notevole grado di eterozigosi nell'ambito delle singole popolazioni.

c) *Significato adattativo dei polimorfismi genetici*

Si è detto in precedenza che l'equilibrio tra mutazione ricorrente e selezione naturale giustifica la presenza nelle popolazioni di geni patogeni o indesiderabili, i quali a bassa frequenza causano la comparsa di rari individui anormali o mutanti recessivi. Geni di questo tpo, la cui frequenza al punto di equilibrio tra le due forze è data da $q = \sqrt{u/s}$, dove u è la frequenza di mutazione ed s è il coefficiente di selezione, costituiscono la parte minore della variabilità genetica trovata nelle popolazioni.

Ciò che interessa in questa sede sono i geni che non sono né rari, né patogeni o indesiderabili e per i quali non si può chiamare in causa l'equilibrio tra pressione di selezione da una parte e frequenza di mutazione dall'altra, si tratta cioè di loci nei quali sono presenti alleli a frequenze intermedie. I valori delle frequenze intermedie, per i quali i loci vengono considerati polimorfi, sono arbitrari e variano secondo alcuni tra 0,01 e 0,99 e secondo altri tra 0,05 e 0,09, intendendo con ciò che la frequenza dell'allele più comune non eccede il valore di 0,99. Il punto essenziale è che gli alleli più rari presentano frequenze troppo alte rispetto al valore di $q = \sqrt{u/s}$ per essere considerate frequenze di equilibrio tra mutazione ricorrente e selezione.

A questo punto è necessario chiamare in causa altre spiegazioni per giustificare la grande diffusione dei polimorfismi genetici prima accennata e questo è un aspetto sul quale si riversano l'interesse e le controversie di molti genetisti.

In termini generali e con riferimento alle popolazioni naturali, la controversia maggiore è tra selezionisti e neutralisti, intendendo con i primi coloro che ritengono che i polimorfismi genetici siano bilanciati, cioè siano equilibrii stabili mantenuti da forze selettive che agiscono sulla «fitness» o efficienza riproduttiva, mentre i secondi sono coloro che ritengono che molti polimorfismi siano neutrali rispetto alla «fitness», cioè non abbiano significato funzionale e derivino da

eventi mutazionali e dal ridotto numero di invidui che costituiscono le popolazioni.

Dal punto di vista teorico, i meccanismi più significativi che possono determinare i polimorfismi genetici sono i seguenti.

1) *Vantaggio selettivo degli eterozigoti* o *superdominanza*: è il caso classico dell'anemia falciforme nelle zone malariche del golfo di Guinea, ma qualche esempio esiste anche nei bovini, come la sindrone «artrogrifosi, idromielia e palatoschisi» dei bovini Charollais. In questi casi risultano sfavoriti entrambi gli omozigoti, sia pure per motivi diversi, per cui ponendo s_1 il coefficiente di selezione contro gli omozigoti normali ed s_2 il coefficiente di selezione contro gli omozigoti difettosi, il punto di equilibrio viene raggiunto quando $q = s_1/s_1 + s_2$.

Affinché si verifichi superdominanza nei riguardi dell'efficienza riproduttiva gli alleli devono influenzare due componenti della «firness» in direzioni opposte: nel caso della falcemia un omozigote la riduce attraverso la sensibilità alla malaria, l'altro attraverso l'anemia.

Poiché la superdominanza in favore dell'efficienza riproduttiva mantiene le frequenze geniche a valori intermedi e poiché esistono diverse modalità attraverso le quali questa superdominanza può derivare, essa rappresenta una spiegazione attraente dei polimorfismi genetici.

I casi in cui questo meccanismo è stato provato sono relativamente pochi, ma questo non costituisce un grave problema, poiché sarebbe sufficiente un vantaggio estremamente piccolo e non facilmente evidenziabile per mantenere il polimorfismo. Piuttosto ci sono serie difficoltà derivanti dal fatto che nella selezione basata su efficienze riproduttive moltiplative la *fitness* dei singoli individui omozigoti per n loci può essere rappresentata da $1 - s)^n$, dove s è il coefficiente di selezione associato con l'omozigosi ad ogni *locus* (Wills, 1978), per cui se s è sufficientemente grande il carico genetico, cioè la percentuale della popolazione che va incontro alla morte genetica per l'incapacità a sopravvivere o a riprodursi, diventa così elevata da portare all'estinzione della popolazione man mano che il numero dei loci segreganti diventa grande.

2) *Selezione dipendente dalla frequenza*: il fatto che un individuo

possieda un fenotipo raro può rappresentare di per sé un vantaggio, indipendentemente da quale fenotipo si tratti, per cui la direzione della selezione dipende dalla frequenza del gene e, quindi, un allele a bassa frequenza è favorito perché produce il fenotipo raro, mentre lo stesso allele ad alta frequenza è controselezionato.

Così, ad esempio, è stato dimostrato che uccelli e pesci assumono sproporzionatamente più alimento del tipo più frequente, per cui si esercita una selezione frequenza-dipendente su prede polimorfe, attribuendo un vantaggio agli individui con colorazioni rare (Clarke, 1969).

In generale lo sviluppo di speciali metodi di attacco e di difesa nella relazione tra predatore e preda e tra patogeno e ospite sembra dare origine ad una selezione di questo tipo.

3) *Eterogeneità di ambiente*: l'ambiente in cui vivono gli individui di una popolazione non è costante, in quanto varia con le località e con il tempo, per cui se un allele è vantaggioso in un ambiente ed un altro allele lo è in un ambiente differente, ne può risultare un polimorfismo stabile, senza che necessariamente vi sia un vantaggio selettivo degli eterozigoti, in quanto la selezione tende ad adattare ai differenti ambienti i differenti individui, con la formazione di un gradiente di frequenze geniche tra una località ed un'altra.

4) *Transizione*: gli attuali polimorfismi genetici possono essere considerati come stadi di transizione nel rimpiazzo evolutivo di un allele con un altro che è diventato più vantaggioso attraverso qualche cambiamento ambientale del passato. Questa ipotesi, tuttavia, è verosimile per non più di una piccola parte dei polimorfismi.

5) *Mutazioni neutrali* : i meccanismi fin qui esaminati richiedono la selezione come forza responsabile dei polimorfismi. E' possibile tuttavia che i coefficienti di selezione siano così piccoli che le frequenze di mutazione diventino fattori significativi. Infatti le mutazioni che potrebbero dare origine ai polimorfismi proteici devono essere considerate come eventi unici, poiché le varianti proteiche differiscono per uno o pochi aminoacidi e la probabilità di ottenere la stessa sostituzione aminoacidica attraverso mutazioni ricorrenti è molto piccola.

Quando ogni mutazione è trattata come un evento unico, il pren-

dere in considerazione la grandezza della popolazione dimostra che mutazione e cosa possono dare origine ai polimorfismi: infatti quando una popolazione è piccola un unico evento mutazionale ha una probabilità piccola, ma diversa da zero, non solo di sopravvivere, ma anche di diffondersi attraverso popolazione e più piccola è la popolazione e maggiore è la probabilità del mutante di sopravvivere (FALCONER, 1981).

Secondo la teoria neutralista alcuni dei polimorfismi presenti ad un dato tempo rappresentano geni che, praticamente neutrali rispetto all'efficienza riproduttiva, sono mutati in un passato remoto e sono ancora presenti nella popolazione.

Le opinioni sono controverse su quanti polimorfismi possono essere attribuiti a mutazioni neutrali ed il problema è principalmente legato alla forza delle selezione, che agisce su di esse, ed alla grandezza della popolazione.

Conclusioni

Da questa rapida rassegna risulta evidente che le opinioni sono contrastanti: in alcuni casi i dati riportati dalla letteratura sono nettamente a favore dell'una o dell'altra ipotesi, cioè selezionista o neutralista, ma la maggior parte delle evidenze sperimentali ottenute sembra essere coerente con entrambe le ipotesi.

Se la situazione apare quindi complicata a livello di popolazioni naturali, nelle quali è solo la selezione naturale ad operare sulla efficienza riproduttiva, il discorso diventa ancora più complesso negli animali da allevamento, dove oltre alla selezione naturale per la efficienza riproduttiva si effettua anche la selezione artificiale per l'efficienza produttiva e dove la grandezza effettiva delle popolazioni dipende dalla sproporzione esistente tra i due sessi; perciò popolazioni apparentemente numerose, soprattutto in condizioni di inseminazione strumentale, si riducono notevolmente e riproduttori eterozigoti possono diffondere nella popolazione stessa determinati polimorfismi. In una situazione di così complesse interazioni sembrerebbe quindi accettabile l'ipotesi neutralista, anche se quella selezionista potrebbe apparire più suggestiva.

Riassunto

Vengono passati in rassegna alcuni aspetti relativi ai polimorfismi genetici prendendo in considerazione la frequenza dei loci polimorfi nelle popolazioni, il numero di alleli per locus ed il loro possibile significato adattativo.

Summary

Considerations on genetic polymorphisms.

Some aspects of the genetic polymorphisms are reviewed considering the frequency of polymorphic loci in populations, the number of alleles per locus and their possible adaptive significance.

BIBLIOGRAFIA

1) Clarke B. C. (1969): The evidence for apostatic selection. Heredity, *24*: 347.

2) Dobzhansky T., Ayala F. J., Stebbins G. L. e Valentine J. W. (1977): Evolution W. H. Freeman Co., San Francisco.

3) Ford E. B. (1940): Polymorphism and taxonomy. The new Systematics. Ed. J. Huxley, Clarendon Press, Oxford.

4) Mc Donald J. F. e Ayala F. J. (1978): Genetic and biochemical basis of enzyme activity variation in natural populations. I. Alcohol dehidrogenase in Drosophila melanogaster. Genetics, 89: 371.

5) Robertson A. (1966): Biochemical polymorphisms in animal improvement. Xth European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphisms, 35.

6) Selander R. K. (1976): Genetic variation in natural populations. Molecular Evolution. Ed. F. J. Ayala, Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusset, 21.

7) Wills C. (1978): Rank-order selection is capable of maintaining all genetic polymorphisms. Genetics, 89: 403.

8)) Zanotti M. e Pagnacco G. (1983): Il marcatore immunologico ed elettroforetico in campo zootecnico: considerazioni su un ventennio di ricerche in Italia.

CONCLUSIONI DEL MODERATORE

A conclusione di questo incontro che è stato seguito dai partecipanti con viva attenzione appare utile richiamare sinteticamente alcuni punti che potrebbero aiutare ad evidenziare la tematica che si sviluppa nell'ambito della ricerca Zootecnica e Veterinaria e che si svolge a sostegno dell'attività pratica.

— Si tratta di una via di concreta operatività scientifica e tecnica nella moderna produzione animale rivolta ad utilizzare l'attitudine alla risposta immunitaria mediante lo studio del complesso di istocompatibilità in chiave di miglioramento genetico del bestiame in una zootecnia che sempre più è portata a lavorare al limite del fisiologico scivolando nel fisiopatologico.

— Si afferma il significato dell'interdisciplinarietà in una ricerca zootecnica che richiederà sempre più di privilegiare gli aspetti biologici nella problematica degli sfruttamenti economici del bestiame.

— Si evidenziano aspetti nuovi di approccio di studio con ricaduta concreta nel mondo dell'operatività in modo particolare per il veterinario impegnato direttamente a promuovere nella futura generazione di bestiame buona attitudine alla risposta immunitaria in genere, resistenza naturale geneticamente determinata alle forme morbose, dismetaboliche, infettive, parassitarie, qualificate caratteristiche biologiche collegate alla valorizzazione della produzione qualiquantitativa.

Dall'interesse manifestato dai partecipanti nel seguire le relazioni, si deve ritenere che questa giornata di studio ha risposto allo

scopo: quello di aggiornare il mondo veterinario e zootecnico su nuove linee di frontiere della ricerca zootecnica e veterinaria.

Bene ha fatto la SISVET a promuoverla.

Un vivo ringraziamento alla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche e all'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e Emilia Romagna che con la loro consueta sensibilità per iniziative del settore ne hanno curato l'organizzazione.

PROF. G. ROGNONI
(Istituto di Zootecnia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano)

GIORNATA DI STUDIO SU:

IMMUNOPATOLOGIA VETERINARIA

(Brescia 24.6.1983)

MODERATORE

P. S. MARCATO
Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria
Università di Bologna

RELATORI

P. S. MARCATO
Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria
Università di Bologna

J. HOORENS
Istituto di Patologia degli Animali Domestici
Università di Gent - Belgio

G. TRAUTWEIN
Istituto di Patologia Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria, Hannover - Germania

G. POLI
Istituto di Microbiologia e Immunologia
Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano

C. GENCHI
Istituto di Patologia Generale Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano

S. CERRUTI SOLA
Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria - Torino

PRESENTAZIONE

Gentili Signore e Signori

a nome della Società Italiana delle Scienze Veterinarie mi è gradito porgere un cordiale saluto a tutti coloro che partecipano a questa giornata di studio.

Desidero rivolgere un particolare ringraziamento alla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche ed alla Scuola per la Ricerca Scientifica di Brescia, qui rappresentate dal dott. Pecorelli, e all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, qui rappresentato dal suo Direttore, il prof. Gualandi.

Un vivo ringraziamento esprimo anche al Moderatore, il prof. Marcato dell'Università di Bologna, e ai Relatori italiani e stranieri: i professori Poli e Genchi dell'Università di Milano, la dott.ssa Cerruti Sola dell'Università di Torino, il prof. Hoorens dell'Università di Gent e il prof. Trautwein della Tierärztliche Hochschule di Hannover. Essi hanno aderito di buon grado all'invito di venire a Brescia per esporre i risultati delle loro indagini e le loro considerazioni personali sul tema oggetto di studio.

La S.I.S.VET. ha voluto privilegiare quest'anno gli argomenti riguardanti i processi immunologici degli organismi animali, programmando due giornate di aggiornamento e di studio, una sull'immunogenetica, svoltasi un mese fa in questa sede, e l'altra sulla immunopatologia.

Per il prossimo anno è già prevista una Tavola rotonda sulle malattie a base autoimmunitaria.

La scelta dei suddetti temi non è casuale: i processi immunologici, com'è noto, costituiscono la base principale dei fenomeni di difesa dell'organismo animale contro gli agenti patogeni di qualsiasi natura, e, in alcuni casi, lo stesso sistema immunitario può dare luogo, se alterato, all'insorgenza di particolari malattie.

La S.I.S.VET. perciò si augura che da questi incontri si riesca a favorire sempre di più l'aggiornamento scientifico dei veterinari e a stimolare l'interesse per nuove, approfondite indagini tra i giovani ricercatori, siano essi giovani per età o conservatisi tali nello spirito.

PROF. A. GOBETTO

INTRODUZIONE DEL MODERATORE

Signore e Signori,

questa giornata di studio sull'Immunopatologia è un segnale ulteriore ed importante del risveglio nel nostro Paese dell'interesse per gli studi di patologia veterinaria. L'immunopatologia è infatti un settore fondamentale di quella «Patologia» che, in Europa, non ha bisogno di nessun'altra aggettivazione se non quella di «veterinaria» per qualificare le sue competenze.

Come coordinatore del Convegno sono grato agli Enti organizzatori, e in particolare al presidente della Società Italiana Scienze Veterinarie, prof. Gobetto, per la fiducia con la quale mi è stato conferito un compito così impegnativo. Ma è soprattutto come socio della Associazione Italiana Patologi Veterinari, e a nome del suo presidente, prof. Romboli, che io tengo ad esprimere profonda riconoscenza non solo agli Enti organizzatori, ma anche ai Relatori e a tutti gli ascoltatori intervenuti.

A proposito dei relatori, sono certo che i colleghi italiani, Poli, Genchi e Cerruti Sola, non avranno nulla da eccepire se antepongo il mio caloroso benvenuto ai professori Hoorens e Trautwein. Onorandoci con il prestigio della loro esperienza di studiosi di fama internazionale, essi hanno risposto con puntuale cortesia all'invito della SISVET di tenere qui a Brescia una relazione su problemi di immunopatologia che hanno approfondito specificamente con le loro ricerche.

Consentitemi a questo punto di dedicare una nota introduttiva agli argomenti che saranno oggetto di relazione e di dibattito in questa giornata di studio.

Prof. P. S. Marcato
(Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna)

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

P. S. MARCATO *

ORTOLOGIA E PATOLOGIA DEI FENOMENI IMMUNOLOGICI. LINEAMENTI ATTUALI

L'immunità (stato immunitario) è uno stato di difesa dell'organismo basato su un sistema immunitario (sistema immunocompetente) che reagisce (risponde) a stimoli patogeni immunogeni (antigeni). Si può dividere la risposta a un antigene in due categorie: l'immunità umorale e l'immunità cellulare, sovente coinvolte in una stretta collaborazione. La prima ha come funzione principale l'eliminazione di agenti patogeni extracellulari (batteri, miceti, protozoi, elminti, ecc.), la seconda funziona contro patogeni intracellulari facoltativi (come virus, salmonelle, brucelle, micobatteri) e nell'eliminazione di cellule aberranti, come quelle neoplastiche. Nel caso dell'immunità umorale il sistema immunitario risponde all'antigene con la sintesi di un anticorpo (anticorpo umorale), cioè con la sintesi di una proteina effettrice complementare, che riconosce l'antigene e interagisce specificamente con esso. Gli anticorpi (Ig = Immunoglobuline) sono secreti dalle plasmacellule (che originano per differenziazione da linfociti B stimolati dall'immunogeno) e si trovano nel plasma, nei liquidi extracellulari e alla superficie delle mucose, dove partecipano all'azione locale protettiva dei secreti mucosi (c.d. immunità locale). L'interazione dell'anticorpo con l'antigene attiva un meccanismo protettivo idoneo a eliminarlo (fagocitosi, lisi per attivazione del complemento, ecc.). Nel caso dell'immunità cellulare, la protezione, ad esempio contro un virus, è operata da cellule effettrici citotossiche specificamente sensibilizzate (derivate da linfociti T), che riconoscono le cellule infettate dal virus e le distruggono. Le due ramificazioni del sistema immuni-

* Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica della Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna.

tario (umorale e cellulare) hanno origine da cellule staminali del midollo osseo che acquistano «immunocompetenza» emigrando nel timo (linea delle cellule T, deputate alla risposta cellulare) e nella milza e nei linfonodi (linea delle cellule B, deputate alla risposta umorale). Per semplificare, si può immaginare un modello del sistema immunitario (tabella 1) concepito come un sistema autoregolato mediante una retroazione negativa (*negative feedback*), dato che il risultato dell'anticorpo, o della cellula T, che si combina con l'immunogeno è quello di diminuirne o bloccarne l'ingresso. Al centro del sistema vi è il tessuto linfatico, che «tratta» l'immunogeno che gli perviene (branca afferente), produce e smista gli elementi effettori specifici, cioè anticorpi e cellule T (branca efferente).

Fin qui è stato schematizzato il meccanismo della risposta immunitaria nel mantenere un normale stato di salute. Ma la risposta immunitaria (paradosso non nuovo nella biologia) può entrare anche nella patogenesi delle malattie. Si vedrà poi (altro apparente paradosso) che certi fenomeni patoimmunitari a volte possono risultare benefici. Fu all'inizio del secolo che gli effetti biologici dell'immunità si rivelarono per la prima volta gravemente lesivi per l'organismo, e tale sconvolgente scoperta emerse da una ricerca di patologia veterinaria sperimentale: Portier e Richet (1902), inoculando cani con un estratto tossico dell'anemone di mare, constatarono una reazione sistematica mortale, che chiamarono anafilassi, cioè il contrario della protezione immunitaria o profilassi che si attendevano. Da allora si è sviluppato lo studio della immunopatologia.

I fenomeni immunopatologici si possono dividere in tre grandi categorie:

a) deficienza immunitaria,

b) ipersensibilità immunitaria,

c) autoimmunità (autosensibilità immunitaria) .

Deficienza immunitaria

Le sindromi da deficienza immunitaria sono primarie, da improprio sviluppo del sistema immunitario umorale o cellulare, e seconda-

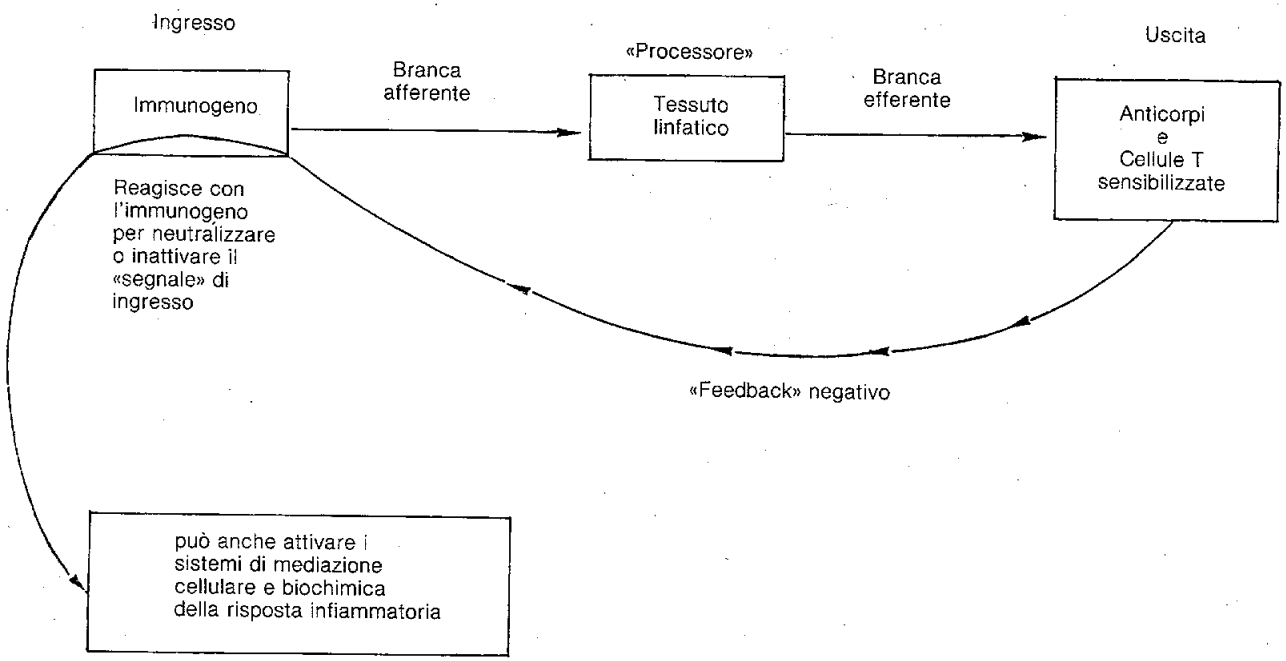


Tabella 1 - Modello di autoregolazione del sistema immunitario che semplifica le interrelazioni dei principali componenti (da Nakamura e Tucker, 1979, con modifiche)

rie, acquisite, associate a malattie tossiche (da sostanze immunosoppressive e citostatiche), a malattie neoplastiche (mieloma multiplo), a sindrome nefrosica, a enteropatia protidodisperdente, a difetto di trasferimento passivo di Ig materne.

Nel mieloma multiplo, neoplasia plasmacellulare osservabile nel cane, l'atipia delle plasmacellule fa sì che vengano sintetizzate in eccesso Ig anomale (paraproteinemia) e in difetto Ig normali (ipogammaglobulinemia). Si tratta dunque di una deficienza immunitaria delle cellule B.

Un'ipogammaglobulinemia neonatale è relativamente frequente nei vitelli e dipende per lo più da insufficiente assunzione o assorbimento intestinale di colostro (Tennant e Hornbuckle, 1980). I vitelli ipogammaglobulinemici sono più soggetti a infezioni setticemiche e enteropatie diarroiche acute.

Tabella 2 - Classificazione delle deficienze immunitarie ed esempi dei vari tipi

A) *Deficienze immunitarie primarie*

1) delle cellule B
(sindrome di Bruton, ipogammaglobulinemia legata al sesso)
2) delle cellule T
(ipoplasia timica congenita) - BOVINO
3) delle cellule B e T
(immunodeficienza grave combinata) - CAVALLO
4) Turbe della fagocitosi
(sindrome di Chédiak-Higashi) - BOVINO, GATTO

B) *Deficienze immunitarie secondarie*

1) delle cellule B
(mieloma multiplo) - CANE
2) delle cellule T
(morbo di Hodgkin)

Le deficienze immunitarie primarie possono riguardare le cellule B (sindrome di Bruton o ipogammaglobulinemia legata al sesso), le cellule T (sindrome di Di George o aplasia timica congenita), en-

trambe le linee cellulari B e T (ipogammaglobulinemia di tipo svizzero), e la funzione fagocitaria (sindrome di Chédiak-Higaschi).

In vitelli pezzati neri di discendenza frisona è segnalata la sindrome ereditaria «lethal trait A 46», caratterizzata da deficienza immunitaria cellulare associata ad ipoplasia timica (Ansay 1975). È simile alla sindrome di Di George dell'uomo (Mc Guire, 1976).

In puledri di razza araba è conosciuta una deficienza immunitaria combinata delle ecllule B e T, che presenta il quadro di una ipoplasia timica associata ad assenza di strutture linfoidi organizzate (corpuscoli) nei linfonodi e nella milza (Mc Guire, 1976). È analoga alla ipogammaglobulinemia di tipo svizzero dell'uomo.

Un esempio di turba della fagocitosi, uno dei più importanti meccanismi effettori della risposta immunitaria, lo troviamo nella sindrome di Chédiak-Higaschi, individuata nel bovino e nel gatto (Prieur e Collier, 1978): i fagociti hanno una ridotta capacità di distruggere i batteri e presentano lisosomi giganti a causa di un'anormale fusione dei lisosomi con i fagosomi. Ciò dipenderebbe anche da un difetto nell'assemblaggio dei microtubuli.

Lesioni da ipersensibilità immunitaria

Alla base di varie lesioni immunologicamente indotte, c.d. lesioni immunitarie, troviamo l'ipersensibilità, cioè lo stato di un animale, precedentemente immunizzato, nel quale la reazione immunitaria a una ulteriore dose di antigene provoca una lesione tessutale. In altre parole compare una iperreattività patologica a fronte di un antigene normalmente innocuo.

Le lesioni immunitarie variano in rapporto alle due principali forme di reattività immunitaria, umorale («anticorpo-dipendente») e cellulare («linfocito T-dipendente»).

Lesioni immunitarie da anticorpi umorali

La lesione da reazione «anticorpo-dipendente» (detta anche immediata) può essere di tre tipi:

a) anafilattica,

b) citotossica o citolitica,

c) da immunocomplessi.

Come si può vedere dalla tabella 3 ognuna di queste lesioni è collegata a una certa classe di Ig, a un certo tipo di cellula ,e a specifici mediatori biochimici. A proposito di questi si deve ricordare che il danneggiamento tessutale è principalmente l'effetto dell'attivazione immunologica di mediatori cellulari e biochimici (meccanismo lesivo indiretto). Infatti la combinazione dei reagenti immuni (Ag, Ac) causa solamente effetti diretti di minima entità, ma come meccanismo d'innesco fa entrare in gioco fattori lesivi per lo più di natura infiammatoria (c.d. infiammazione allergica). In merito si consideri che le vere e proprie allergie (dette anche atopie) sarebbero quelle sindromi di ipersensibilità verso uno specifico antigene, nelle quali si constata una forte predisposizione, spesso ereditaria, e un alto livello sierico di Ig della classe E (reagine). Le reagine sono chiamate anche anticorpi citotropi, perché si legano mediante il frammento Fc della molecola anticorpale alle Mastzellen e ai granulociti basofili: all'incontro con l'antigene queste cellule liberano mediatori chimici flogogeni come l'istamina. Intervengono allora i granulociti eosinofili a modulare l'attività di questi mediatori (Weller e Goetzl, 1979).

A differenza dell'uomo, nell'ipersensibilità allergica degli animali non è sempre dimostrabile una correlazione diretta con il tasso sierico di IgE (Geroldi, 1980).

Lesioni anafilattiche

Le atopie appartengono alle reazioni d'ipersensibilità di tipo anafilattico. Di queste tuttavia l'espressione più grave è lo shock anafilattico (anafilassi sistematica), caratterizzato in tutte le specie da una serie di fenomeni comuni: aumento della permeabilità capillare, contrazione della muscolatura liscia, ipotensione, emoconcentrazione, ipocoagulabilità del sangue, ipotermia. Può variare invece l'organo di shock: nel cane è il fegato, nel bovino e nel cavallo i polmoni. Tali

Tabella 3 - Caratteristiche dei principali tipi di lesione immunologica

Tipo di reazione	Insorgenza	Anticorpo	Cellule	Mediatori
A) Anticorpale (umorale)				
1) anafilattica (atopica)	rapida (secondi-minuti)	IgE	basofili Mastzellen	Istamina, Serotonina, SRS-A
2a) citolitica	intermedia (minuti-ore)	IgG, IgM	——	Complemento (C8, C9)
2b) citolitica (immunoaderenza)	intermedia (minuti-ore)	IgG, IgM	macrofagi (SRE)	Complemento (C3b)
2c) citolitica	intermedia	IgG	leucociti non immuni (cellule killer «naturali»)	Citotossine
3) da immunocomplessi	intermedia (minuti-ore)	IgG, IgM (e IgE)	neutrofili (e basofili)	Complemento (C5a), idrolasi lisosomiali dei neutrofili
B) Cellulare				
1) linfomonocitaria	ritardata (18-48 ore)	——	linfociti T «effettori», monociti/macrofagi	linfochine, monochine
2) citolitica	ritardata (18-48 ore)	——	linfociti T «effettori» (cellule killer T)	linfochine (linfotossine)

profonde reazioni generali sono dovute a una massiva liberazione di mediatori farmacologici da parte dei granulociti basofili in circolo.

L'atopia spontanea da pollini (microspore delle piante anemogame) con rinocongiuntivite e asma è molto conosciuta nel cane (pollinosi da ragweed) e meno nel bovino («Summer snuffles»). Casi di atopia sono segnalati inoltre in cani allergici a vari alimenti. Manifestazioni orticarioidi e dispnea possono comparire nelle vacche a seguito di ritenzione del latte (c.d. allergia da latte) quando vengono messe in asciutta o quando non possono essere munte (Bienfet, 1976). Il meccanismo di ipersensibilità viene attivato dal riassorbimento in circolo di componenti proteiche del latte.

Reazioni atopiche e anafilattiche sistemiche indote, iatrogene, si registrano talvolta con l'uso di antibiotici e ormoni (responsabile la carbossimetilcellulosa impiegata come mezzo di sospensione) e vaccini antiaftosi (responsabile un complesso di formalina e siero normale bovino presente nei vaccini).

Anche le punture di insetti possono provocare reazioni cutanee di tipo anafilattico: nel cavallo è nota una dermatite da punture di pulci (*Culicoides robertsi*).

Lesioni citolitiche

La lesione immunitaria citotossica comporta una reazione di Ig, della classe G ed M, con antigeni delle plasmamembrane specialmente di cellule del sangue: segue la lisi cellulare, di solito con la mediazione del complemento attivato nelle sue componenti terminali, C8 e C9, che hanno effetto citotossico. Un altro tipo di distruzione cellulare mediata dal complemento avviene tramite l'immunoaderenza: le molecole della frazione complementare C3b, attivata sulla membrana cellulare agiscono da recettori che facilitano la captazione delle cellule (emazie, piastrine, leucociti) da parte dei macrofagi del SRE, che le fagocitano ed eliminano.

Recentemente è stato descritto un nuovo meccanismo di citolisi anticorpo-dipendente non mediato dal complemento (Perlmann, 1976): la distruzione cellulare anticorpo-dipendente da parte di cellule *killer* (K) «naturali», così dette per distinguerle dalle cellule K

specificamente sensibilizzate (linfociti T «effettori») che intervengono nelle lesioni immunitarie a mediazione cellulare. In questa reazione anticorpo-dipendente la specificità deriva dalla reazione Ag-Ac alla superficie della cellula bersaglio, mentre la cellula *killer* «naturale» agisce in modo aspecifico, liberando fattori biochimici letali (citotossine) per la cellula bersaglio, alla quale si è legata tramite un recettore per il frammento Fc dell'anticorpo *.

Un meccanismo citolitico a mediazione complementare è alla base delle reazioni da isoimmunizzazione trasfusionale (trasfusione di sangue incompatibile) nell'uomo. Quando il ricevente non possiede Ac (agglutinine) contro Ag che sono situati alla superficie dei globuli rossi (agglutinogeni), la trasfusione può essere tollerata. Diversamente si ha emoagglutinazione e poi emolisi. Negli animali domestici sono stati identificati diversi antigeni eritrocitari specie-specifici appartenenti a vari sistemi di gruppi sanguigni, ma le corrispondenti emoagglutinine sono presenti in genere in concentrazioni ridotte o mancano del tutto (Schalm, 1975). Di conseguenza l'intensità e l'occorrenza del danno da trasfusione di sangue incompatibile variano nelle differenti specie (Allan, 1980): lieve nel cavallo, raro se non dopo ripetute trasfusioni nel bovino e nella pecora, lieve nel suino, intenso nel cane, assente nel pollo.

Un'altra malattia da isoimmunizzazione eritrolitica è la malattia emolitica neonatale (cavallo, mulo, bovino, suino), che risulta dalla immunizzazione della madre ad opera degli eritrociti del feto e compare dopo l'assunzione del colostro. Nelle cavalle una lieve lesione della placenta durante il parto del primo puledro provoca l'isoimmunizzazione materna e alle successive gravidanze i puledri possono ammalarsi (Allan, 1980). Altra possibilità è che le madri vengano stimolate a produrre anticorpi contro antigeni eritrocitari da vaccini contenenti componenti del sangue o di altri tessuti omologhi (vaccini antianaplasmosi e antibabesiosi nel bovino, vaccino antiaborto virale preparato da tessuto fetale nel cavallo, vaccino antipestoso al cristalvioletto nel suino).

La porpora trombocitopenica neonatale dei suini è anch'essa basata su una isoimmunizzazione materno-fetale: la trombocitopenia,

* Come tramite di lesione tessutale questa reazione è importante in condizioni in cui le cellule presentano antigeni di superficie (virali, tumorali, indotti da farmaci) strettamente legati agli antigeni di istocompatibilità.

che causa la sindrome emorragica, consegue all'intervento di anticorpi agglutinanti antipiastrine.

L'adsorbimento sulla superficie cellulare di antigeni batterici o di farmaci ,che si comportano da apteni, può rendere le cellule temporaneamente esposte all'effetto citolitico anticorpo-dipendente mediato dal complemento.

L'antigene polisaccaridico di *Salmonella gallinarum,* agente eziologico della tifosi aviare, viene adsorbito sui globuli rossi che vanno incontro a lisi a contatto con l'anticorpo e ne consegue anemia (Allan, 1980).

Lesioni da immunocomplessi

La lesione da immunocomplessi (c.d. reazione di tipo Arthus) rappresenta probabilmente la più frequente lesione immunologica. È causata da anticorpi precipitanti che formano con l'antigene presente in circolo dei complessi solubili, che attivano frazioni chemiotattiche del complemento (C5a) che richiamano le cellule effettrici di questa reazione immunologica, i granulociti neutrofili. Gli enzimi lisosomiali liberati da queste cellule inducono alterazioni tessutali contrassegnate da flogosi dei piccoli vasi (microvasculite). Nel prototipo sperimentale (reazione di Arthus) quest'alterazione vascolare è seguita da edema, emorragia, trombosi e necrosi.

Nell'innesco di reazioni da immunocomplessi può assumere importanza un meccanismo istaminergico, come è dimostrato nella reazione generalizzata a forti somministrazioni di siero eterologo (malattia da siero): i granulociti basofili, cui si sono legate IgE (che intervengono in aggiunta alle IgG e IgM), liberano il fattore di attivazione piastrinica (PAF) allorché incontrano l'antigene specifico. Il PAF causa l'aggregazione delle piastrine, le quali liberano istamina, che aumenta la permeabilità vasale, consentendo agli immunocomplessi di depositarsi più copiosamente nelle pareti vasali.

Nell'alveolite allergica estrinseca dei bovini (malattia di Ronca), analoga al *farmer's lung* dell'uomo, vi è un'ipersensibilità di tipo Arthus verso gli antigeni di *Micropolyspora faeni,* un actinomicete termofilo presente nei fieni umidi ed ammuffiti. Gli antigeni fungini

si uniscono negli alveoli agli anticorpi precipitanti specifici, causando alveolite e vasculite (Wilkie, 1976).

Nelle glomerulonefriti da immunocomplessi, questi, arrestandosi nei capillari glomerulari, attivano il complemento. Sono segnalate in corso di virosi croniche, come l'anemia infettiva equina, la peste suina, l'«Aleutian disease» dei visoni, la coriomeningite linfocitaria murina. Le uveiti, cheratiti e nefriti che si sovrappongono all'epatite virale del cane sono provocate da immunocomplessi. La stessa patogenesi si avrebbe nella glomerulonefrite del lupus eritematoso disseminato dei cani. In questa malattia gli immunocomplessi sono formati da anticorpi che hanno reagito con nucleoproteine del soggetto (autoanticorpi).

Nel cane e nel cavallo sembra possibile osservare una glomerulonefrite conseguente al deposito glomerulare di immunocomplessi formati con antigeni streptococcici (glomerulonefrite post-streptococcica).

Una vasculite immunitaria tipo Arthus sarebbe responsabile delle lesioni edematose emorragiche sottocutanee diffuse dell'anasarca o febbre petecchiale del cavallo, che fa seguito all'adenite streptococcica.

Secondo alcuni i ponfi cutanei romboidi caratteristici del Mal Rosso suino avrebbero come base patogenetica una reazione tipo Arthus.

Lesioni immunitarie mediate da cellule

Si tratta di lesioni indotte da reazioni cellulari, dette ritardate, perché nei prototipi sperimentali si sviluppa una flogosi a evoluzione rallentata. Il fenomeno centrale è l'intervento di cellule specificamente sensibilizzate (linfociti T), che riconoscono gli antigeni e secernono sostanze non anticorpali, dette mediatori chimici linfocitari o linfochine, che hanno svariati effetti: stimolatori, flogogeni e inibitori (Rocklin, 1980). Le linfochine inibitorie comprendono sostanze che producono lisi di cellule bersaglio (linfotossine) o inibiscono la loro moltiplicazione (fattori citostatici); le linfochine stimolatorie comprendono fattori di moltiplicazione (mitogeni) per i linfociti e i ma-

crofagi, e fattori che mediano la collaborazione tra cellule T e B; le linfochine flogogene infine comprendono fattori che intervengono nell'immunità cellulare (MIF e MAF = fattori di immobilizzazione e attivazione dei macrofagi), fattori chemiotattici, fattori procoagulanti e permeabilizzanti il microcircolo.

Alla base di queste reazioni si considera tradizionalmente l'infiltrazione tessutale di linfociti e macrofagi (cellule spesso collegate da stretti rapporti di collaborazione) e un meccanismo destinato alla comunicazione intercellulare che induce lesioni granulomatose (ad es. granulomi tubercolari, micotici e parassitari) oppure lo sviluppo della c.d. allergia da contatto (eczema causato da svariati corpi chimici semplici che fungono da apteni e formano antigeni completi con le proteine dell'epidermide). Un meccanismo immunopatologico citotossico a mediazione cellulare (linfociti T *killer* o «effettori») interviene inoltre nel danno tessutale di certe infezioni virali, come dimostra il caso della coriomeningite linfocitaria virale murina.

Nelle lesioni immunitarie mediate da cellule ha una parte importante la collaborazione tra linfociti e macrofagi: i macrofagi «presentano» gli antigeni ai linfociti T, i quali una volta sensibilizzati reclutano e attivano, mediante le linfochine, nuovi macrofagi, che a loro volta producono sostanze (monochine) attivanti i linfociti. Queste interazioni cellulari fanno sì che la sensibilizzazione non possa essere trasferita ad altro animale della stessa specie tramite il siero (come avviene per la sensibilizzazione da anticorpi umorali), ma solamente tramite linfociti specificamente sensibilizzati.

Rapporti tra i vari tipi di ipersensibilità immunitaria

L'inquadramento delle lesioni immunologiche da ipersensibilità, alla luce delle più recenti acquisizioni, non può essere mantenuto rigido come quello sopra prospettato per motivi di chiarezza espositiva. Ad esempio, in certi casi la reazione anafilattica è accompagnata da una reazione da immunocomplessi. Cioè di fronte a un medesimo antigene si ha una risposta allergica di tipo misto, sebbene sempre anticorpo-dipendente.

È noto poi che i linfociti T collaborano con i linfociti B, sia per

quanto riguarda l'induzione sia per quanto riguarda la regolazione della risposta umorale verso numerosi antigeni. Linfochine stimolatorie prodotte dai c.d. linfociti T «coadiutori» (*T helper cells*) mediano la collaborazione fra cellule T e B e stimolano o reprimono la produzione di anticorpi da parte delle plasmacellule. Inoltre i monociti, elementi tipici delle reazioni a mediazione cellulare, sarebbero capaci di attivare direttamente i linfociti B. Si prospetta pertanto anche una compartecipazione di reazioni umorali e cellulari nelle lesioni immunologiche. Ad esempio è dimostrato che il riconoscimento di antigeni da parte di linfociti T può essere condizionato da molecole di Ig poste sulla superficie di queste cellule. Si aggiunga che Ig umorali o legate a cellule (basofili, Mastzellen, linfociti B) potrebbero modulare alcuni tipi di reazioni a mediazione cellulare (Dvorak et al., 1980). È significativo ciò che si constata nell'ipersensibilità cutanea basofila della cavia (fenomeno allergico sperimentale di Jones-Mote): quando si aumentano le dosi di antigene, la reazione allergica ritardata recede e lascia il posto a una reazione da anticorpi umorali, di tipo Arthus.

Anche il tradizionale criterio discriminatorio, che vuole le reazioni di tipo immediato o umorali espresse da flogosi acute essudative e le reazioni di tipo ritardato o a mediazione cellulare espresse da flogosi croniche produttive o granulomatose, è attualmente in fase di superamento. Infatti vi sono reazioni c.d. immediate che mostrano caratteri di flogosi cronica, come la glomerulonefrite da immunocomplessi, e reazioni c.d. ritardate che svelano fenomeni tipici delle reazioni flogistiche acute, come l'essudazione fibrinosa che ha una parte importante nel più noto modello di flogosi allergica ritardata, la reazione tubercolinica (Colvin e Dvorak, 1975).

Nemmeno il più consolidato criterio differenziale tra le due classi di reazioni immunologiche (il trasferimento passivo della sensibilizzazione mediante il siero per le reazioni umorali, solamente mediante linfociti per le reazioni cellulari) è esente da qualche eccezione. Infatti in date circostanze è possibile trasferire ad animale della stessa specie mediante il siero la sensibilizzazione che consente la comparsa del fenomeno di Jones-Mote (ipersensibilità cutanea basofila della cavia), una delle più tipiche espressioni delle reazioni ritardate a mediazione cellulare. Tuttavia in tutte le lesioni immunologiche di questo tipo permangono fondamentali le ampie facoltà di «memoria» ed

«esecutive» dei linfociti T, che sono in grado di sostenere da protagonisti le eterogenee espressioni dei fenomeni immunologici a mediazione cellulare, attivando e regolando altre cellule e vari meccanismi biochimici.

Lesioni autoimmunitarie

Solitamente diretta verso antigeni esogeni, la risposta immunitaria può talvolta essere diretta verso antigeni endogeni (determinanti autoantigenici), ossia componenti dell'organismo stesso. Ciò costituisce apparentemente un'aberrazione (*horror autotoxicus* di Erlich, 1900) in rapporto ad un sistema immunitario concepito assiomaticamente come tollerante, inerte, verso le sostanze riconosciute come proprie dell'organismo (*self*), e invece sensibile, reattivo, verso le sostanze riconosciute estranee (*not self*).

In realtà un difetto della tolleranza immunologica è stato individuato nel recente passato come base patogenetica di varie malattie animali. Bendixen e Carlstrom (1929) furono i primi a suggerire l'intervento di un autoanticorpo patogeno, un'autolisina sierica, nella emoglobinuria cronica intermittente del cavallo.

La risposta autoimmunitaria può causare lesione ai tessuti sia con un meccanismo umorale sia con un meccanismo cellulare, cioè con le già ricordate reazioni di ipersensibilità, in questo caso da autosensibilità, immunitaria.

A questo punto si ricorda che le risposte autoimmunitarie non sono sempre necessariamente dannose. Vi sono casi in cui si registra la presenza di autoanticorpi in assenza di malattia palese. In altri casi è accertato che gli autoanticorpi rimuovono dalla circolazione i prodotti delle lesioni tessutali oppure, come nel caso delle immunoconglutinine, favoriscono l'eliminazione di batteri da parte del SRE. A partire da queste constatazioni di autoanticorpi «fisiogeni», contrapposti ad autoanticorpi patogeni, si è arrivati fino a concepire che le risposte autoimmunitarie regolino le reazioni umorali e cellulari del sistema immunitario (Jerne, 1974): è la teoria della rete idiotipica. Gli idiotipi sono i determinanti antigenici della molecola anticorpale, che com'è noto può diventare immunogena anche nell'animale

che la produce. Gli anti-idiotipi sono gli anticorpi di cui gli idiotipi hanno stimolato la sintesi, cioè sono anti-autoanticorpi, che a loro volta inducono sintesi di anticorpi anti-(anti-idiotipi), e così via. Questa rete di interazioni di idiotipi-anti-idiotipi, di natura essenzialmente autoimmunitaria, assicurerebbe l'omeostasi del sistema.

Alcuni hanno proposto che certe malattie possano venire dominate inducendo una autoimmunizzazione iatrogena: l'immunità autoanti-idiotipica potrebbe eliminare reazioni immunitarie dannose. Ad esempio, in certe forme di diabete in cui l'insulina è prodotta normalmente mentre è ridotta la sua capacità di legarsi a specifici recettori cellulari inattivati da autoanticorpi, l'uso di anticorpi-anti-idiotipici diretti contro gli anticorpi bloccanti i recettori dell'insulina potrebbe sbloccare l'azione dell'insulina (Schechter et al., 1982).

Le malattie da lesione autoimmunitaria si possono dividere in due gruppi:

a) sistemiche o non organo-specifiche,

b) organo-specifiche.

Le prime sono caratterizzate da risposte autoanticorpali verso determinanti autoantigenici largamente diffusi, ad esempio verso componenti del nucleo cellulare come il DNA. È il caso del lupus eritematoso sistemico del cane. Le malattie organo-specifiche sono invece contraddistinte da reazioni abnormi contro un antigene confinato in un dato organo, come nel caso delle tiroiditi autoimmuni.

La comparsa di fenomeni autoimmuni è condizionata da vari fattori esogeni (virus, batteri) o endogeni (ormoni, geni anormali) che concorrono ad alterare la tolleranza del sistema immunitario verso il *self*.

Il meccanismo reattivo è mediato da uno, o più di uno, dei seguenti fenomeni:

a) formazione di autoanticorpi diretti contro strutture intracellulari o superfici cellulari modificate o immodificate,

b) formazione di immunocomplessi autoantigene-autoanticorpo nei liquidi intercellulari o nel circolo,

c) intervento dei linfociti T sensibilizzati.

In a) e b) si può avere una mediazione finale del complemento, in c) intervengono le linfochine a causare la lesione tessutale direttamente o innescando la flogosi.

È stato recentemente dimostrato un interessante meccanismo autoimmune capace di provocare un danno funzionale senza distruzione cellulare: la formazione di autoanticorpi contro recettori funzionali di superficie delle cellule con il risultato di stimolare o inibire particolari funzioni specializzate delle cellule stesse. Ad esempio: anticorpi contro i recettori dell'acetilcolina delle giunzioni neuromuscolari, nella miastenia grave (Theofilopoulos e Dixon, 1982).

Il problema patogenetico di base nelle autoimmunopatie è la comprensione del difetto di tolleranza immunologica che innesca la reazione autolesiva. In proposito esistono solo delle ipotesi più o meno fondate (tabella 4).

Tabella 4 - Ipotesi patogenetiche sulle autoimmunopatie (da Theofilopoulos e Dixon, 1982, modificata)

Liberazione di antigeni inaccessibili (desegregazione di antigeni)
Attenuazione della funzione di soppressione delle cellule T
«By-pass» delle cellule T
Difetti del timo
Presenza di cloni anormali di cellule B «autoreattive»
Attivazione policlonale di cellule B
Insensibilità delle cellule B al messaggio delle cellule T «soppressorie»
Difetti nella «presentazione» dell'antigene da parte di macrofagi
Difetti delle cellule staminali che generano gli immunociti
Difetti nella «rete idiotipo-anti-idiotipo»
Anomalie dei geni codificanti le risposte immunitarie
Fattori virali
Difetti nel meccanismo ormonale che regola l'omeostasi del sistema immunitario.

Nell'induzione sperimentale di vari stati autoimmunitari è necessario ricorrere ad un adiuvante per rendere efficace l'introduzione dell'autoantigene, e ciò significa che lo stato autoaggressivo non è una semplice risposta ad autoantigeni, ma un fenomeno più complesso.

L'ipotesi più accreditata è che la lesione autoimmunitaria sia il risultato di un perturbamento delle normali vie d'interazione delle cellule T e B tra loro e con gli autoantigeni (Nakamura e Tucker, 1979). Ciò potrebbe accadere con un meccanismo di *by-pass* della specificità dei linfociti T *helper* che tollerano gli autoantigeni, in presenza di linfociti B non tolleranti stimolati in vario modo a produrre autoanticorpi. Oppure potrebbe verificarsi una caduta dell'attività dei linfociti T soppressori, cioè capaci di sopprimere la sintesi linfocito B-dipendente degli autoanticorpi.

In alternativa all'anomalia autoaggressiva incentrata su un difetto primario delle cellule T regolatrici (*helper* e *suppressor*), è stato proposto che il difetto primario sia a livello delle cellule B: queste cellule potrebbero venire indotte direttamente (senza necessità dell'intervento delle cellule T *helper*) a produrre autoanticorpi da mitogeni endogeni ed esogeni (c.d. attivatori policlonali). L'attivazione policlonale può essere stimolata da componenti batterici e virali, da parassiti e da varie sostanze tra cui enzimi proteolitici e antibiotici (Goodman e Weigle, 1981).

Un interesse notevole riveste attualmente il possibile intervento di virus nella patogenesi delle autoimmunopatie. Infezioni virali persistenti delle cellule potrebbero modificare antigeni autologhi di superficie conferendogli la proprietà di far apparire autoanticorpi, oppure potrebbero far comparire, per derepressione genica, degli autoantigeni embrionali verso i quali l'organismo non ha acquisito tolleranza. Altra eventualità è che i virus danneggino le cellule T che regolano la risposta immunitaria (Rose, 1981). È noto inoltre che certi virus possono agire da attivatori policlonali dei linfociti B inducendoli a produrre antoanticorpi.

Le relazioni tra virus e autoimmunopatie trovano un fertile terreno di ricerca in modelli animali di autoimmunopatie a eziologia virale accertata (*Aleutian disease* dei visoni, anemia infettiva equina) o probabile (lupus eritematoso del cane).

Per concludere questa rassegna si riporta (tabella 5) un elenco di

Tabella 5 - Sindromi immunopatologiche umane che hanno corrispondenze nella patologia spontanea degli animali domestici

Malattia dell'uomo	Animali domestici che presentano l'equivalente malattia
Ipoplasia timica congenita (Sindrome di Di George)	BOVINO («Lethal trait A 46»)
Immunodeficienza combinata (grave) (Agammaglobulinemia di tipo svizzero)	CAVALLO
Sindrome di Chédiak-Higashi	BOVINO, GATTO
Immunodeficienza secondaria al mieloma multiplo (malattia di Kalher)	CANE
Macroglobulinemia (malattia di Waldenström)	CANE
Dermatite allergica (atopica)	CANE
Rinocongiuntivite allergica (Pollinosi)	CANE, BOVINO («Summer snuffles»)
Malattia da siero	VARIE SPECIE
Farmer's lung	BOVINO (alveolite allergica estrinseca)
Glomerulonefrite da immunocomplessi	CAVALLO, SUINO, CANE
Anemia emolitica autoimmune	CANE
Trombocitopenia autoimmune	CAVALLO, CANE
Lupus eritematoso sistemico	CANE
Artrite reumatoide	SUINO, CANE
Glomerulonefrite da autoanticorpi	CAVALLO, CANE
Amiloidosi secondaria	CANE (Amiloidosi spontanea associata all'emopoiesi ciclica o «Gray Collie Syndrome»)
Pemphigus vulgaris (e sue varianti)	CANE
Miastenia grave	CANE
Tiroidite di Hashimoto	CANE (tiroidite linfocitaria)

note malattie immunologiche dell'uomo di cui a tutt'oggi si sono potuti definire gli equivalenti spontanei negli animali domestici.

Lo studio di questi modelli animali delle immunopatie umane colloca indubbiamente la patologia veterinaria al centro di un campo di indagini dalle prospettive assai vaste.

BIBLIOGRAFIA

1) ALLAN D. (1980): Outlines of animal immunobiology. Baillière Tindall, London.
2) ANSAY M. (1975): Le syndrome héréditaire A46 (Deficience héréditaire en zinc) dans le bétail pie-noir d'origine hollandaise, une déficience de l'immunité de type cellulaire. Ann. Méd. Vet. 119, 7.
3) BENDIXEN e CARLSTROM, citati da Lapras e Oudar.
4) BIENFET V. (1976): L'allergie au lait chez les bovins. Ann. Méd. Vet. 120, 205.
5) COLIN R. B., DVORAK H. F. (1975): Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity. J. Immunol. 114, 377.
6) DVORAK H. F., GALLI S. J., DVORAK A. M. (1980): Cell-mediated hypersensitivity in vitro. Inter. Rev. Exp. Path. 21, 119.
7) ERLICH P., citato da Theofilopoulos e Dixon.
8) GEROLDI S. (1980): Aggiornamento sulla ipersensibilità del bovino. La Clin. Vet. 103, 336.
9) GOADMAN M. G., WEIGLE W. O. (1981): Role of polyclonal B cell activation in self/non self discrimination. Immunology Today 2, 54.
10) JERNE N. K. (1974): Towards a network theory of the immune system. Ann. Immunol. (Paris) 125C, 373-389.
11) LAPRAS M., OUDAR J. (1971): Connaisances actuelles sur les maladies auto-immunes des animaux. Inf. Méd. Vét. 236.
12) MCGUIRE T. C., BANKS K. L., DAVIS W. C. (1976): Alterations of the thymus and other lymphoid tissue in young horses with combined immunodeficiency. Am. J. Pathol. 84, 39.
13) NAKAMURA R. M., TUCKER E. S. (1979): «Mechanisms of immunologic disease and autoimmunity», in «Pathologic physiology» (Sodeman W. A. e Sodeman T. M., ed.) pag. 146. Saunders Co., Philadelphia.
14) PERLMANN P. (1976): Cellular immunity: antibody-dependent cytotoxicity (K-cell activity). Clin. Immunobiol. 3, 107.

15) Portier P., Richet C. (1902): De l'action anaphylactique de certains vénins. C. R. Soc. Biol. 54, 170.
16) Prieur D. J., Collier L. L. (1978): Chédiak-Higashi syndrome of animals. Am. J. Pathol. 90, 533.
17) Rocklin R. E., Bendtzen K., Greineder D. (1980): Mediators of immunity: lymphokines and monokines. Adv. Immunol. 29, 55.
18) Rose N. R. (1981): Malattie autoimmuni. Le Scienze, 152, 58.
19) Schalm O. W., Jain N. C., Carrol E. J. (1975): Veterinary hematology. Lea e Febiger, Philadelphia.
20) Schechter Y., Maron R., Elias D., Cohen I. R. (1982): Autoantibodies to insulin receptor spontaneously develop as anti-idiotypes in mice immunized with insulin. Science 216, 542.
21) Tennant B. C., Hornbuckle W. E. (1980): Gastrointestinal function, in «Clinical biochemistry of domestic animals (Kaneko J. J., ed.), Acad. Press, N. Y.
22) Theofilopoulos A. N., Dixon F. J. (1982): Autoimmune disease. Immunopathology and etiopathogenesis Am. J. Pathol. 108, 319.
23) Weller P. F., Goetzl E. J. (1979): The regulatory and effector role of eosinophils. Adv. Immunol. 27, 339.
24) Wilkie B. N. (1976): Hypersensitivity pneumonitis: experimental production in calves with antigens of *Micropolyspora faeni.* Can. J. Comp. Med. 40, 221.

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

J. HOORENS AND R. DUCATELLE * [1]

LE TECNICHE DELL'IMMUNOPEROSSIDASI NELLO STUDIO DELLE INTERAZIONI VIRUS-CELLULA OSPITE *

La marcatura immunologica di antigeni nei tessuti è stata per lungo tempo un privilegio dei microbiologi. In effetti quando *Coons* agli inizi degli anni '40 sviluppò per primo le sue tecniche di immunofluorescenza non aveva altro scopo se non la dimostrazione diagnostica di alcune infezioni batteriche e virali. Con queste tecniche gli antigeni reagiscono con gli anticorpi specifici i quali sono a loro volta marcati con una molecola chiamata *fluorescina.* Questa molecola può essere resa visibile mediante l'osservazione con *luce ultravioletta.*

Molti anni più tardi, nel periodo d'oro degli anni '60 furono sviluppati metodi alternativi alla microscopia a fluorescenza. La prima delle novità di interesse per i patologi fu la *tecnica di Sainte Marie. Egli descrisse per primo una metodica per la microscopia a fluorescenza su sezioni in paraffina, nel 1963.* Nonostante ciò questa tecnica non ebbe un grosso successo, probabilmente in quanto essa non era applicabile ad un gran numero di antigeni differenti.

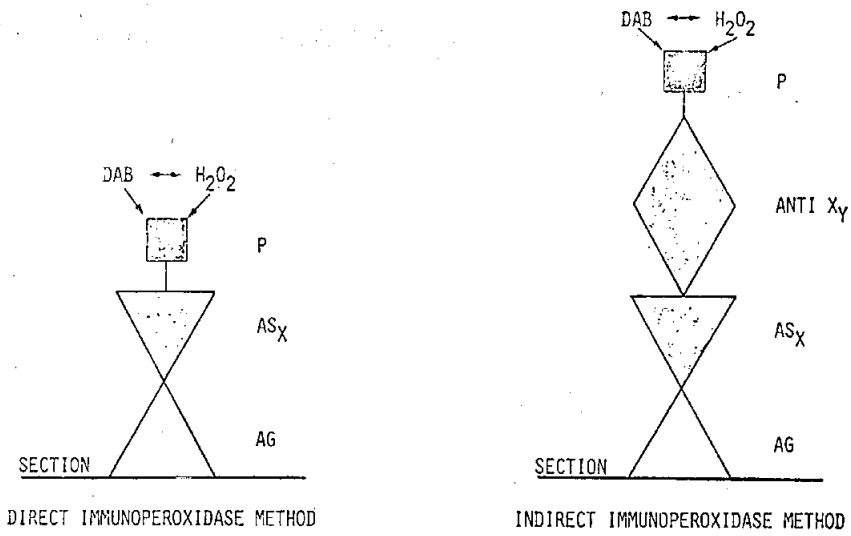
Il maggior problema che derivava dall'immunofluorescenza era la difficoltà di correlare la localizzazione più fine dell'antigene con la morfologia del tessuto. Un importante passo avanti per superare questo problema fu fatto da *Avrameas.* Egli per primo iniziò ad utilizzare la perossidasi del rafano, un enzima vegetale come marcatore degli anticorpi invece della fluorescina.

La perossidasi del rafano è un enzima che ha la capacità di allontanare un protone dalla molecola di perossido di idrogeno. Questo

[1] Istituto di Patologia animale - Università di Gent (Belgio).
* Questo lavoro è stato finanziato dallo IWONL (*Institute for the Encouragement of Research in Industry and Agricolture*).

protone a sua volta agisce su una sostanza solubile, la *diaminobenzidina idrocloruro,* che diviene marrone. Queste tecniche immunologiche utilizzanti la perossidasi del rafano possono essere esaminate con un comune microscopio a luce ordinaria. Da questo punto inizia la nostra storia.

Nello schema n. 1 sono rappresentati i principi della colorazione di antigeni con la tecnica dell'immunoperossidasi diretta ed indiretta in sezioni di tessuto. Ag sta per antigene presente in una sezione di tessuto. As_x sta per anticorpi che sono stati ottenuti in una specie animale X e che sono specifici per l'antigene presente nella sezione. Questi anticorpi sono quindi evidenziati con la perossidasi del rafano. Nel metodo indiretto si può vedere come esista un passaggio ulteriore che necessita di anticorpi contro le globuline della specie animale X.

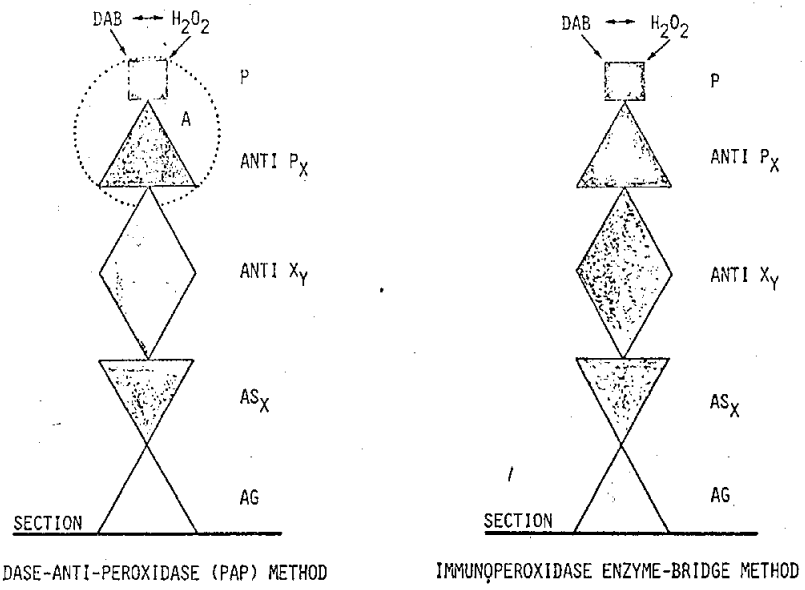


Schema n. 1

L'immunoperossidasi diretta ed indiretta vengono ampiamente utilizzate per la dimostrazione precoce della replicazione virale in colture cellulari e per la dimostrazione di diversi antigeni in sezioni di tessuto al criostato. Un esempio di ciò è l'uso del metodo dell'im-

munoperossidasi indiretta per la dimostrazione precoce della replicazione del virus della pseudorabbia in colture cellulari, recentemente descritto da Chasey in Inghilterra. Esso si è dimostrato molto utile per una diagnosi rapida ed efficiente.

Un ulteriore decisivo passo avanti nell'immunoistologia è stato ottenuto da *Sternberger*. Egli descrisse per primo la cosidetta tecnica PAP nel 1971. Nello schema n. 2 sono rappresentati i principi di due tipi di tecnica PAP. Da un lato vi è il metodo enzima-ponte e dall'altro il metodo PAP originale di Sternberger. Queste tecniche offrono il vantaggio di poter essere più facilmente applicate alle sezioni in paraffina di materiale fissato in formalina. Il principale vantaggio di queste tecniche sta nel fatto che esse non richiedono alcuna marcatura. Essenzialmente sono simili ad una reazione di immunoperossidasi indiretta ad eccezione del fatto che richiedono un passaggio addizionale. In effetti il secondo antisiero in questa metodica non è marcato con perossidasi. Esso reagisce semplicemente dal punto di vista immunologico con un terzo antisiero che è ottenuto come primo antisiero da



Schema n. 2

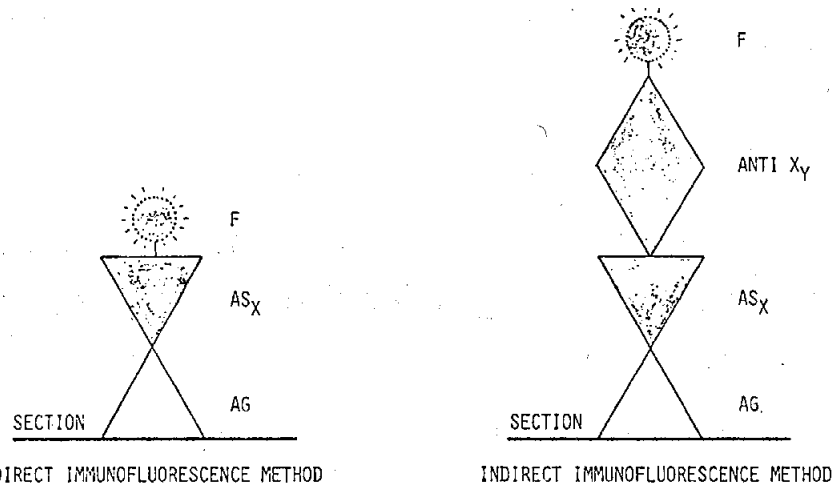
una specie animale X. Questo terzo antisiero è un'immunoglobulina che funge da anticorpo nei confronti della perossidasi del rafano. Di conseguenza, la perossidasi è legata all'antigene tissutale attraverso una serie di reazioni antigene-anticorpo e ciò non richiede alcuna marcatura chimica. Questo metodo ha enormemente aumentato l'efficienza del legame Ag-Ac. E questa è la principale ragione per cui le tecniche PAP sono da preferirsi per l'immunoistochimica su sezioni in paraffina.

La differenza tra il metodo enzima-ponte ed il metodo PAP originale sta nel fatto che con l'enzima-ponte ogni componente la reazione viene aggiunto singolarmente, mentre con il metodo PAP di Sternberger l'antiperossidasi e la perossidasi vengono aggiunte in un unico complesso in soluzione consentendo così una semplificazione della procedura. Da tutto ciò possiamo renderci conto anche di uno dei maggiori svantaggi del metodo PAP. Esso è infatti una reazione immunologica estremamente complessa che richiede molti passaggi e quindi presenta notevoli possibilità di insuccesso.

L'applicazione pratica del metodo PAP necessita quindi una standardizzazione completa delle procedure da seguire. D'altro canto una volta che il sistema funziona bene è possibile utilizzare un qualsiasi antisiero primario decente per la dimostrazione di un qualsiasi antigene, una volta che si sia ottenuto l'antisiero da una specie animale X. Noi abbiamo utilizzato la tecnica originale di Sternberger nel nostro laboratorio da molto tempo. Abbiamo ottenuto tutti i nostri sieri usando soltanto due specie animali diverse. Conigli New Zealand-White sono stati utilizzati per la produzione degli antisieri primari e dell'antiperossidasi. Per la produzione di globuline anti-coniglio sono utilizzate delle capre.

Negli ultimi 2 o 3 anni è stato sviluppato un metodo alternativo alla tecnica PAP. Questo metodo è conosciuto come metodo dell'immuno-oro. Esso utilizza particelle d'oro colloidale del diametro di 5-20 μm come marcatori per la reazione immunologica, invece della comune fluorescina o della perossidasi del rafano. Come si può osservare nello schema n. 3 il procedimento dell'immuno-oro è sostanzialmente identico a quello dell'immunofluorescenza o dell'immunoperossidasi, sia diretta che indiretta. Una stupenda colorazione rosa si ottiene attraverso un effetto ottico di diffrazione dei raggi luminosi da parte delle particelle d'oro colloidale. Questa tecnica può essere an-

che utilizzata per materiali fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Deve essere comunque tenuto presente che i metodi dell'immunooro richiedono una marcatura chimica dei sieri con particelle d'oro. Ritorniamo ora al metodo PAP e cerchiamo di metterne a fuoco le potenzialità, i vantaggi e gli svantaggi.



Schema n. 3

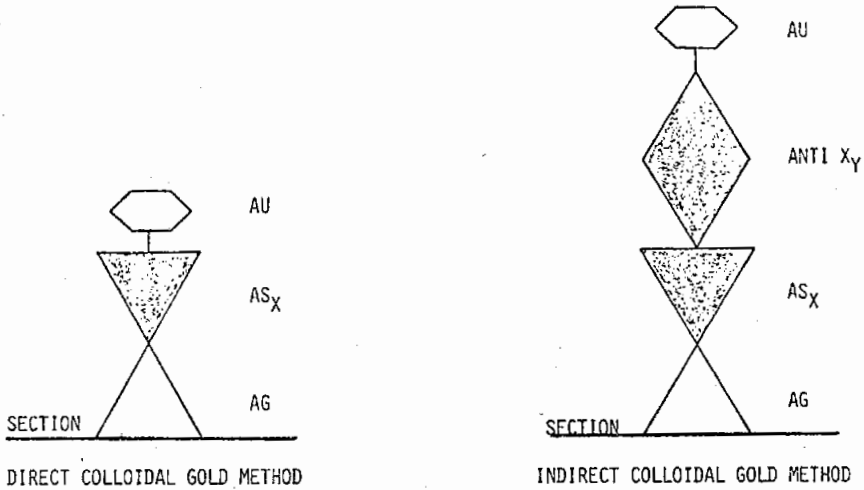
Abbiamo già ricordato che la PAP è una reazione immunologica complessa che richiede tecniche di laboratorio altamente standardizzate. Questo implica anche che la PAP richiede lunghi tempi di esecuzione. Si devono mettere in preventivo interi giorni di lavoro a tempo pieno per tagliare e colorare una serie di sezioni. Tuttavia questa tecnica non richiede affatto alcuna apparecchiatura o strumentazione da laboratorio sofisticata. È quindi possibile per un qualsiasi laboratorio di patologia accedere a queste tecniche. Le uniche attrezzature necessarie consistono infatti in una camera umida a temperatura costante di 25°C ed una piattaforma agitatrice.

Vediamo ora i risultati di una reazione di immunoperossidasi. Si utilizzano, ad esempio, sezioni in paraffina della corteccia cerebrale di un suinetto infettato sul campo con il virus della malattia di

Aujeszky (l'animale morì spontaneamente e fu sottoposto ad autopsia parecchie ore più tardi). I campioni di tessuto furono fissati in formalina 10% e passati in alcool e toluolo per l'inclusione in paraffina. Furono eseguite sezioni di 5 μ, che vennero colorate con ematossilina-eosina come controllo e con la tecnica PAP per la dimostrazione dell'antigene virale della Pseudorabbia. Le comuni procedure di laboratorio comprendono una reidratazione della sezione. Quindi la sezione trattata viene preincubata con siero normale di capra per prevenire legami aspecifici con i successivi antisieri; la sezione viene poi coperta con una piccola quantità di siero iperimmune molto diluito, contenente anticorpi diretti contro l'antigene da dimostrare, in questo caso il virus della pseudorabbia. Con i virus l'intervallo delle diluizioni da utilizzare varia da 1:200 fino a 1:1000.

Con gli antigeni ormonali si utilizzano diluizioni fino a 1:10000.

La qualità di questo antisiero primario è essenziale per il successo della colorazione. In vero, si dovrebbe tenere a mente che a seguito della fissazione in formalina e dell'inclusione in paraffina gran parte dei siti antigenici perdono la struttura originale. Di conseguenza è necessario un antisiero di ottima qualità per mettere in evidenza quello che è rimasto dell'antigene originario. L'antisiero primario deve es-



Schema n. 4

sere lasciato reagire sulle sezioni per 24 ore a 4°C oppure solo per 2 ore a temperatura ambiente. Tra ognuna delle incubazioni con i sieri è necessario un lavaggio accurato. Il secondo antisiero dovrebbe essere più concentrato in modo che esso possa legarsi sia al primo che al terzo antisiero. Il terzo antisiero è il complesso PAP solubile. La colorazione viene eseguita in un tampone contenente diaminobenzidina e perossido di idrogeno.

I neuroni infetti appaiono di colore marrone intenso. La localizzazione dell'antigene virale è intracellulare e straordinariamente precisa. Tuttavia il neuropilo risulta debolmente colorato in marrone giallastro. Questa «colorazione di fondo» dovrebbe essere evitata per quanto possibile perché essa potrebbe interferire con l'interpretazione della colorazione specifica. Altre colorazioni aspecifiche sono dovute alle attività perossidasica endogena e pseudoperossidasica dei globuli bianchi e degli eritrociti. Queste reazioni aspecifiche possono essere bloccate con fenilidrazina o metanolo. L'attività perossidasica endogena è dovuta alla presenza di una perossidasi tissutale attiva, che si trova principalmente nei granulociti neutrofili. Soprattutto nel cane, questo enzima è molto resistente e può permanere attivo dopo la fissazione e l'inclusione.

Altro esempio: una sezione di corteccia cerebrale di maiale viene colorata con l'immunoperossidasi e contrastata con il metodo comune ematossilina-eosina. Questo è il modo più valido da cui si può partire per studiare le lesioni patologiche e contemporaneamente dimostrarne l'agente eziologico. In verità è possibile contrastare facilmente sezioni colorate con diaminobenzidina con una gran varietà dei comuni coloranti per istologia. Si può così osservare come l'antigene virale sia presente principalmente nel citoplasma dei neuroni; contemporaneamente il citoplasma mostra una moderata degenerazione vacuolare. In effetti è stato descritto da Fujiwara che il sito di sintesi delle proteine virali in cellule infette dal virus della Pseudorabbia, è nel citoplasma e che le proteine virali si dirigono nel nucleo delle cellule infette solo in un momento successivo. Può essere molto vantaggioso, in un gran numero di situazioni, utilizzare differenti colorazioni di contrasto. Per le ghiandole mucose, ad esempio, il PAS/ematossilina/verde luce offre un contrasto molto valido.

Lavorando con tecniche di marcatura immunologica di antigeni virali occorre sempre ricordare che la maggior parte degli antigeni

che vengono dimostrati nei tessuti sono proteine virali neosintetizzate che generalmente non si sono ancora trasformate in particelle virali mature. Di regola le proteine virali sono prodotte sul reticolo endoplasmatico rugoso della cellula ospite. Questo è il motivo per cui nei neuroni il prodotto di reazione della diaminobenzidina è principalmente localizzato a livello della sostanza tigroide di Nissl. Questa sostanza, osservata al M.O., si presenta in forma di masserelle di materiale eosinofilo nel pericario dei neuroni. Esse sono in realtà composte di cumuli di lamelle parallele di reticolo endoplasmatico rugoso.

Altri esempi di antigeni virali che possono essere evidenziati con la PAP: epitelio tracheale di pulcino. La sezione di controllo presente in un normale epitelio ciliato pseudostratificato, contenente ghiandole mucose intraepiteliali. La sezione di epitelio tracheale prelevato 25 ore dopo l'infezione intratracreale con un ceppo a bassa virulenza del virus della Bronchite infettiva aviare, dimostra che le ciglia dell'epitelio sono scomparse; sono pure assenti le ghiandole mucose e le restanti cellule epiteliali prestano profili irregolari. Alcune sono desquamate nel lume tracheale, altre, che sono ancora fissate alla loro membrana basale, hanno un citoplasma nettamente vacuolizzato. La lamina propria e la sottomucosa sono infiltrate da cellule infiammatorie. Quando queste sezioni vengono colorate per l'antigene IBV con la tecnica PAP si ottengono i seguenti risultati: l'epitelio del controllo è come immaginabile assolutamente negativo per il virus della bronchite infettiva. Tuttavia è possibile osservare come i globuli rossi nei capillari della lamina propria e della sottomucosa si siano colorati a seguito della loro attività pseudoperossidasica. I gruppi di cellule epiteliali delle trachee infette sono intensamente colorati con la diaminobenzidina; ciò significa che le cellule infette non sono sparse qua e là lungo la trachea, ma esiste una tendenza alla formazione di focolai di infezione.

Un altro *Coronavirus* in questo caso infettante il canale alimentare è il *Coronavirus* bovino, in passato conosciuto come *Coronavirus* della Diarrea neonatale dei vitelli. L'esame istologico di sezioni dell'intestino di vitelli infettati con questo virus rivela sempre una desquamazione molto precoce e drammatica delle cellule epiteliali degli apici dei villi. Ciò è associato con una degenerazione vacuolare

all'estremità di tali cellule epiteliali. Dopo colorazione con immunoperossidasi per evidenziare la presenza del *Coronavirus* bovino, le cellule epiteliali desquamate appaiono nettamente positive; la desquamazione delle cellule epiteliali può quindi essere considerata una conseguenza diretta della replicazione virale. Correlando questi dati con studi ultrastrutturali è possibile mettere in evidenza come la vacuolizzazione citoplasmatica delle cellule epiteliali sia in relazione alla gemmazione dei *Coronavirus* che acquisiscono il loro involucro pericapsidico a spese delle cisterne del reticolo endoplasmatico, provocandone la dilatazione.

La diagnosi istologica del Cimurro nel cane è in genere fatta sulla base dell'esistenza di corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili in un gran numero di epiteli quali quelle della vescica urinaria, della mucosa gastrica, dei bronchioli ed anche dei neuroni del sistema nervoso centrale. Questa diagnosi istopatologica può essere confermata immunologicamente utilizzando la tecnica PAP.

In un cane affetto da cimurro l'antigene virale è caratteristicamente presente nell'epitelio di transizione della vescica urinaria. L'antigene virale si accumula in certe aree nelle cellule epiteliali che spiccano come macchie marrone scuro mentre i sottostanti strati sottomucoso e muscolare non contengono il virus. Con ingrandimenti più forti noi possiamo studiare la distribuzione intracellulare dell'antigene virale del cimurro. Le macchie scure sono per lo più localizzate nel citoplasma perinucleare. Esse possono essere paragonate con sezioni colorate con la tecnica di Shorr per i corpi inclusi. Anche in questo caso i corpi inclusi sono localizzati nel citoplasma perinucleare. Nelle cellule epiteliali più pesantemente infettate, il citoplasma è completamente stipato di proteine virali. Nonostante ciò, si può osservare come il nucleo non contenga antigeni virali. Questo è in armonia con le proprietà biochimiche del virus, infatti esso è un paramixovirus che si replica nel citoplasma della cellula ospite. Il nucleo della cellula ospite non è interessato alla morfogenesi del virus.

Per contro, possono esistere condizioni eccezionali in cui gli antigeni virali sono presenti allo stesso modo anche nel nucleo. Ciò è vero ad esempio in alcuni neuroni del sistema nervoso centrale, nei quali appaiono inclusioni intranucleari positive per l'antigene virale del Cimurro del cane. Con l'uso dell'immunoperossidasi si può vedere come un neurone dell'ippocampo di cane sia infetto da virus rabi-

do. L'applicazione della PAP al virus della rabbia è stata eseguita dal Dr. Palmer di Zurigo. Finora sono state descritte alcune modificazioni patologiche virus indotte associate con il virus della bronchite infettiva del pulcino con il coronavirus bovino nei vitelli e con il virus del cimurro nel cane. Tutti questi sono RNA virus che si replicano nel citoplasma delle cellule ospite.

Ora vorrei indicarvi alcuni casi di tessuti infetti da DNA virus. Una di questi è l'*Adenovirus* suino. A Gent noi abbiamo scoperto la relazione tra il sierotipo 3 dell'*Adenovirus* suino e la steatorrea dei suinetti lattanti di 2-3 settimane. Istologicamente era stato dimostrato che questi *Adenovirus* si replicano nelle cellule epiteliali intestinali del digiuno e dell'ileo. In una sezione semifine colorata con blu di toluidina si può osservare un villo intestinale contenente due cellule epiteliali infette. Queste cellule hanno perso il loro orletto striato e si presentano pallide ed arrotondate. Il nucleo è molto rigonfiato ed arrotondato. Nel nucleo si osserva un corpo incluso di tipo A di Cowdry. Le cellule infettate vengono spinte verso il lume intestinale e sono sul punto di desquamarsi. Con la colorazione con l'immunoperossidasi si osserva una cellula pesantemente infettata il cui citoplasma è particolarmente positivo e mostra una specie di colorazione fibrillare.

Tutto ciò corrisponde alle nostre osservazioni al M.E. che mostravano un reticolo endoplasmatico dilatato. Come precedentemente dimostrato, il reticolo endoplasmatico è il sito di produzione delle proteine virali. Usando l'immunoperossidasi abbiamo esaminato più a fondo i corpi inclusi. La PAP colora i corpi inclusi di tipo A di Cowdry diversamente dall'ematossilina-eosina. Il corpo incluso in sé è difficile a riconoscersi ed il nucleo presenta una distribuzione a chiazze del colorante. Con la reazione Feulgen si può capire che il DNA è presente in tutto il nucleo e soprattutto alla sua periferia. Il corpo incluso di tipo A di Cowdry ed il suo alone circostante contengono proteine virali ed acidi nucleici.

Noi abbiamo anche studiato un'altra infezione da *Adenovirus* associata con fenomeni di polmonite nei cani. Ciò è stato fatto in cooperazione con il Dipartimento di Patologia di Zurigo, dal momento che l'antisiero verso il virus dell'epatite infettiva del cane è stato ottenuto dal Dr. Palmer che è uno degli assistenti del Prof. Stünzi. Questo tipo di polmonite del cane è principalmente un'alveolite;

come si può osservare in sezioni colorate con l'immunoperossidasi, i macrofagi intralveolari sono pesantemente infettati con un titolo di antigene virale significativamente più alto nel citoplasma che nel nucleo. Occasionalmente possono anche essere infettati i pneumociti di tipo uno o di tipo due. Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina le cellule infette possono essere riconosciute per la presenza di corpi inclusi intranucleari tipo A di Cowdry anfofilici ed omogenei. Quando queste cellule vengono esaminate con il M.E. si osservano nei loro nuclei grandi raggruppamenti paracristallini di particelle dell'*Adenovirus* e tra questi raggruppamenti si osservano aggregati di un materiale granulo-fibrillare elettrondenso. Questa peculiare distribuzione delle strutture intranucleari può giustificare la colorazione a chiazze dei nuclei infetti con l'immunoperossidasi. Come dato di fatto è interessante conoscere come la reazione PAP sia correlata ad altri metodi immunologici.

Noi abbiamo quindi iniziato uno studio comparativo con 4 differenti tecniche diagnostiche per la Pseudorabbia. Queste tecniche erano l'isolamento del virus (VI) l'immunofluorescenza (IF) l'esame istologico (EI) e l'immunoperossidasi. Nessuna delle tecniche utilizzate può essere considerata realmente superiore alle altre e per inciso occorre notare che questi erano casi di autopsie su suinetti o feti naturalmente infetti.

Da ciò possiamo concludere che l'immunoperossidasi rappresenta un'utile alternativa all'isolamento del virus ed all'immunofluorescenza a scopo diagnostico. Questo potrebbe essere particolarmente interessante in quei casi in cui è particolarmente difficile preservare o trasportare campioni di tessuto fresco. In paesi a clima caldo ad esempio, potrebbe essere consigliabile fissare immediatamente i campioni in formalina e provvedere al loro trasporto solo successivamente.

Nella terza parte della mia conferenza dimostro come la tecnica PAP possa essere consigliata nello studio della patogenesi di una malattia. Il Morbo di Aujesky è una malattia molto importante per le conseguenze economiche che essa determina nel nostro Paese e perciò noi abbiamo compiuto notevoli sforzi per sviluppare metodi ottimali di marcatura immunologica per tale malattia. Il virus infetta sia i neuroni che le cellule gliali del sistema nervoso centrale e l'infezione virale è associata dal punto di vista istologico con una meni-

go-encefalite non purulenta. Attraverso uno studio comparativo completo di sezioni colorate con ematossilina-eosina e con la PAP le lesioni caratteristiche si possono riassumere nel modo seguente. I neuroni infetti vanno incontro a necrosi eosinofila; d'altro canto il nucleo dei neuroni infetti non appare picnotico ma mostra un caratteristico aspetto anfofilico. Possono esistere foci necrotici anche nel neuropilo mentre la glia e gli infiltrati perivascolari raramente contengono l'antigene virale. Nei neuroni infetti l'antigene virale può spingersi nei dendriti e negli assoni. Nella cripta tonsillare di un giovane suinetto infetto, la quale può essere considerata la porta di ingresso del virus, l'antigene virale può essere osservato nelle cellule epiteliali della cripta tonsillare e principalmente nei nuclei. Un'altra via di ingresso del virus della Pseudorabbia sono i polmoni. Nel focus necrotico peribronchiolare infetto si possono osservare alcune cellule dell'epitelio bronchiolare colpite dall'infezione. Dopo la penetrazione nell'organismo ospite il virus di Aujesky si moltiplica nei punti di ingresso. Questo è in accordo con gli studi al M.E. che hanno dimostrato come il virus venga poi trasportato lungo gli assoni nelle cellule di Schwann e nello spazio perineurale. Perciò è logico aspettarsi che nei suini il virus possa essere trasportato dalle tonsille lungo il nervo trigemino e dal polmone lungo il nervo vago o i nervi simpatici e dalla cavità nasale lungo i nervi olfattivi.

Nel sistema nervoso centrale il virus è inizialmente rilevabile nel citoplasma perinucleare di un limitato numero di neuroni. Dapprima nei neuroni, non è ancora presente alcuna proteina virale nel nucleo, il che significa che le particelle virali complete non si sono ancora formate. L'infezione può continuare e quindi produrre una lesione nella quale la grande maggioranza dei neuroni è infetta e si colora con diaminobenzidina a livello nucleare od anche a livello citoplasmatico. Tale differente localizzazione può dipendere dal grado di infezione della cellula.

Una lesione di questo genere è probabilmente causa di morte per l'ospite. Nondimeno essa non può essere considerata la tappa finale nella patogenesi della pseudorabbia. Infatti un altro problema epidemiologico importante correlato con la patogenesi riguarda l'eliminazione del virus dall'ospite nell'ambiente. Ad esempio si è discusso a lungo sulla possibilità che le secrezioni siano un importante vettore nella diffusione della malattia di Aujesky; per stabilire con

certezza tutto ciò abbiamo esaminato un gran numero di organi le cui secrezioni si riversano nell'ambiente.

I virologi conoscevano da tempo l'infettività della saliva. In un lobulo infetto di una ghiandola salivare si possono osservare corpi inclusi intranucleari tipo A di Cowdry, però tali corpi sono rari nella pseudorabbia del suino. Così l'infettività della saliva è conseguenza dell'infezione delle cellule epiteliali secretrici delle ghiandole salivari.

L'infettività dell'urina è stato un punto controverso tra i virologi; ciò soprattutto per l'effetto tossico dell'urina sulle colture cellulari, effetto che potrebbe causare interpretazioni errate nelle prove di isolamento del virus. Nel materiale a nostra disposizione abbiamo osservato la presenza dell'antigene virale nelle cellule endoteliali e mesangiali del glomerulo renale. Questo fatto può portare all'eliminazione di particelle virali con il filtrato glomerulare. Esaminando i tubuli renali si possono incontrare file di cellule epiteliali infettate dal virus della pseudorabbia e si osservano anche cellule epiteliali desquamate, che entreranno nell'uretere e saranno eliminate con l'urina. È quindi altamente probabile che l'urina del maiale contenga proteine e probabilmente anche particelle virali; tuttavia i nostri risultati possono soltanto confermare che è possibile che l'urina contenga particelle virali. È compito dei virologi provarne l'infettività attraverso test opportuni.

Il virus della pseudorabbia penetra attraverso le tonsille ed i polmoni e giunge nel S.N.C. attraverso i nervi, si tratta quindi di una infezione sistemica i cui loci multipli possono essere osservati in gran parte degli organi quali il fegato e le surrenali. Quindi concludendo vi ho indicato alcuni esempi di interazioni virus-cellula ospite che possono essere studiati utilizzando la tecnica dell'immunoperossidasi. Un gran numero di lesioni sono associate alla presenza di virus quali il virus della bronchite infettiva, il *Coronavirus* bovino, il virus del Cimurro del cane e cosi via. Vi ho anche ricordato nell'introduzione alla mia conferenza che esiste una nuova tecnica alternativa all'immunoperossidasi, quella dell'immuno-oro. Con tale tecnica i neuroni assumono un gran numero di particelle di 20μ di oro colloidale le quali erano state legate ad un siero antipseudorabbia. In tale tipo di colorazione non esiste colorazione di fondo, tuttavia il contrasto non è molto netto. Questa tecnica all'immuno-oro originariamente non è infatti stata ideata per l'uso con il M.O., ma per una marcatura

immuno-chimica ultrastrutturale. Anche nella cosiddetta «fabbrica di virus» intranucleare con molti capsidi del virus di Aujesky, si osservano piccole macchie nere arrotondate costituite da particelle d'oro. Esse marcano sia le particelle virali che il nucloplasma, così vengono evidenziate sia le proteine virali strutturali che quelle non ancora assemblate. La tecnica dell'immuno-oro apre così un nuovo campo di indagine che potrà dare risposta ad un gran numero di reperti patomorfologici ultrastrutturali.

Per dare a Cesare quello che è di Cesare, devo ringraziare i membri dello staff del mio laboratorio a Gent ed in particolar modo il Dr. Ducatelle che è stato il responsabile di gran parte degli esperimenti e l'Istituto IWONL di Bruxelles che ha finanziato questo programma di ricerca.

Tecnica di laboratorio per la colorazione PAP di antigeni virali secondo Sternberger

1. Tagliare sezioni di 5μ di materiale incluso in paraffina
2. Sparaffinare ed idratare
3. Incubare con siero normale di capra diluito 1:5 per 20 min.
4. Incubare con antisiero primario di coniglio diluito in modo appropriato per 2 ore a 25°C
5. Risciacquare con soluzione salina tamponata con TRIS a pH 7,8 per 5 min. a 25°C
6. Incubare con siero di capra anti-coniglio 1:40 per 20 min. a 25°C
7. Risciacquare
8. Incubare con complesso solubile PAP 1:300 per 20 min. a 25°C
9. Risciacquare
10. Colorare con 3,3' diaminobenzidina-idrocloruro 0,01% e H_2O_2 0,005% in soluzione salina 0,05 M. tamponata con TRIS per 3-7 min.
11. Contrastare, disidratare e montare.

Riassunto

Negli ultimi anni lo sviluppo delle tecniche immunoistochimiche ha fornito strumenti altamente efficienti per lo studio istopatologico delle malattie infettive. Tra queste tecniche, l'immunofluorescenza è largamente utilizzata per l'identificazione degli antigeni virali come tali mentre i metodi con l'immunoperossidasi offrono ulteriori importanti informazioni sulla localizzazione intracellulare e sull'associazione tra virus e concomitanti lesioni istopatologiche. Per questi scopi il metodo perossidasi-antiperossidasi (PAP) elaborato da Sternberger si è dimostrato il metodo di elezione.

Nella presente trattazione vengono discussi i vantaggi e gli svantaggi del metodo PAP in particolar modo per quanto riguarda le applicazioni ed i particolari tecnici. Nella seconda parte di questa relazione vengono forniti alcuni esempi di infezioni virali studiate con l'aiuto della PAP. Sia gli RNA virus (IBV nel pulcino, BCV nel vitello, CDV e virus rabido nel cane) che i DNA virus (*Adenovirus* ed *Herpesvirus* del suino ed *Adenovirus* del cane) possono essere evidenziati nelle comuni sezioni in paraffina di materiale fissato in formalina. La gran parte di questi lavori è stata eseguita presso il Dipartimento di Patologia veterinaria di Gent. La distribuzione caratteristica dei diversi antigeni virali nei tessuti e le lesioni ad essa associate sono descritte e paragonate le une con le altre. La terza parte di questa conferenza riguarda la sensibilità, la specificità e la riproducibilità del metodo PAP utilizzato a scopi diagnostici. Viene fatto un paragone tra l'isolamento del virus, l'immunofluorescenza, la PAP e gli esami istopatologici per la diagnostica del Morbo di Aujeszky nel suino. Si trae la conclusione che anche in questo caso la PAP fornisce uno strumento diagnostico attendibile.

L'ultima parte di questa relazione mette a fuoco il valore dell'immunoperossidasi come strumento di ricerca. Ciò viene fatto utilizzando a titolo di esempio lo studio della patogenesi della Pseudorabbia nel suino illustrando la via di penetrazione, la diffusione del virus nell'organismo e la sua disseminazione nell'ambiente.

Infine viene riportato un breve commento sul metodo dell'immu-

no-oro per la dimostrazione degli antigeni virali. Questo metodo potrebbe rappresentare un'alternativa alle tecniche dell'immunoperossidasi. Si dimostra come esso sia particolarmente utile per la localizzazione del virus in sezioni di tessuto in microscopia elettronica.

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

G. TRAUTWEIN *

MALATTIE DA IMMUNOCOMPLESSI NEGLI ANIMALI

Durante l'interazione tra anticorpi ed antigeni molto frequentemente si possono formare complessi antigene-anticorpo. Il formarsi di tale immunocomplesso (IC) dapprima rappresenta un evento fisiologico, che ovviamente è necessario per neutralizzare ed eliminare materiale estraneo. Tuttavia è conoscenza comune che in certe situazioni si possono formare immunocomplessi che sono patogeni per l'ospite.

L'organismo sensibilizzato può reagire immunologicamente in modi diversi con l'antigene omologo. In accordo con la classificazione di Gell e coll. (1974) si conoscono quattro modi di reazione di base.

Reazione di tipo 1

L'antigene omologo reagisce con l'anticorpo IgE (reagina) sulle *Mastzellen* sensibilizzate nei tessuti o con i granulociti basofili del sangue. Questa interazione causa degranulazione di queste cellule e la liberazione di sostanze vasoattive (istamina, serotonina).

Reazione tipo 2

In questo tipo di reazione l'attività di un anticorpo è diretta contro determniate cellule bersaglio. Le cellule bersaglio possono essere

* Istituto di Patologia animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Hannover (Germania).

danneggiate direttamente; esse possono essere preparate per la susseguente fagocitosi e possono essere attratte da macrofagi o da cellule citotossiche.

Reazione di tipo 3

La reazione di tipo 3, fulcro essenziale di questa relazione è causata dai complessi antigene-anticorpo. Ci sono due possibilità di base nella patogenesi delle malattie mediate da immunocomplessi:

1) Gli immunocomplessi si possono formare localmente nel tessuto, come si osserva nel fenomeno di Arthus, sia nella cute che negli altri organi.

2) Gli immunocomplessi circolanti si repertano nel sangue come nelle malattie da siero.

Essi si depositano in determinati «organi bersaglio» dove attivano il complemento ed il sistema di coagulazione ed eventualmente possono causare danni tissutali.

È ormai acquisizione certa che in certe malattie infettive dell'uomo e degli animali i sintomi clinici e le alterazioni patologiche negli organi non siano dovuti all'azione diretta degli agenti infettivi, ma piuttosto siano dovuti ad immunocomplessi patogeni. L'obiettivo di questa relazione è discutere:

1) I parametri della patogenecità di certi complessi immuni;
2) Gli effetti biologici dei complessi immuni;
3) La patogenesi delle malattie da immunocomplessi;
4) Esempi conosciuti di malattie da immunocomplessi negli animali.

Reazione di tipo 4

Questo gruppo comprende le reazioni allergiche di ipersensibilità ritardata in cui le cellule T sono i mediatori cellulari essenziali.

Parametri di patogenicità degli immunocomplessi

La formazione di IC, i loro effetti biologici e le proprietà flogogene ovviamente dipendono da fattori quali la natura dell'antigene e dell'anticorpo, il rapporto molare di questi immunoreagenti, la reattività dei sistemi complementari e del sistema monocitomacrofagico (Theofilopoulos e Dixon, 1979, 1980).

Tabella 1 - Parametri di patogenicità degli immunocomplessi circolanti

1)	Antigene
	Grandezza e valenza dell'antigene
	Composizione chimica dell'antigene
	Quantità di antigene e velocità di formazione
2)	Anticorpo
	Classe e sottoclasse dell'immunoglobulina
	Valenza dell'anticorpo
	Quantità di anticorpo
	Affinità (capacità di attrazione tra Ab e Ag)
	Avidità (solidità del legame antigene-anticorpo)
3)	Rapporto molare dell'antigene e dell'anticorpo
	IC con eccesso di antigene
	IC ad equivalenza
	IC con eccesso di anticorpo

Antigene

La grandezza e la valenza dell'antigene sono fattori importanti. Gli antigeni monovalenti formano reticoli molto piccoli con i loro anticorpi, che rimangono in circolazione per lunghi periodi; mentre antigeni multivalenti formano grossi reticoli e complessi di varia composizione.

Anticorpo

In relazione all'anticorpo, la patogenicità dell'IC sarà determinata dalla classe e sottoclasse dell'immunoglobina e particolarmente dall'affinità dell'anticorpo con il suo antigene. Anticorpi precipitanti con alta affinità formano complessi con grossi reticoli e si forma una gran quantità di immuno-precipitato che è rimossa prontamente dal sistema monocitario-macrofagico.

Dall'altro canto, se l'anticorpo ha scarse affinità, l'immunocomplesso, in eccesso di antigene, che si verrà a formare sarà piccolo ed instabile. In tale situazione si può instaurare una malattia da immunocomplesso.

Rapporto molare di antigene ed anticorpo

Un fattore determinante della patogenecità è il rapporto molare tra antigene ed anticorpo (Dixon et al. 1961; Dixon, 1963; Cochrane e Koffler, 1973; Theofilopoulos e Dixon, 1980). Da esperimenti eseguiti utilizzando il modello delle malattie da siero acute si è compreso che IC con scarso eccesso antigene è patogeno; d'altro canto in condizioni di notevole eccesso antigene, l'IC è piccolo, fissa poco complemento ed ha scarso potenziale flogogeno. Gli immunocomplessi formati sono di notevole dimensione, tendono a precipitare e sono rapidamente eliminati dal sistema reticolo endoteliale; in tal modo hanno scarso potere patogeno.

Effetti biologici degli immunocomplessi

Uno degli effetti fondamentali dei complessi immuni è l'attivazione del sistema complementare sia secondo lo schema classico sia secondo quello alternato (properdina). Il passo essenziale è la frammentazione del fattore complementare C3. I prodotti di frammentazione hanno effetti biologici diversi: C3a possiede proprietà chemiotattiche e perciò attrae i granulociti sul sito di deposizione dell'IC. C3b attiva i susseguenti fattori complementari C5, C6 e C7. I prodotti

di frammentazione più piccoli di C5, C5a, ed anche il complesso C5, C6, C7 sono chemiotattici per i granulociti. Perciò l'infiammazione focale avviene nel sito di deposizione dell'immuncomplesso (IC).

Gli stessi fattori C3a e C5a, sono anche potenti tossine anafilattiche, poiché sono capaci di liberare istamina e sostanze vasoattive dalle *Mastzellen* e dai granulociti basofili.

Patogenesi delle malattie da immuno-complessi

Si devono considerare tre meccanismi di base nella patogenesi delle malattie da immuno-complessi (Theofilopoulos e Dixon, 1979).

1) *Gli anticorpi reagiscono con i determinanti antigenici sulla superficie delle sostanze e strutture intercellulari.* Se l'anticorpo è diretto contro le membrane basali «cosiddette sostanze indotte antimembrana basale» può causare malattia.

Il modello sperimentale è la nefrite di Masugi indotta da anticorpi antimembrana basale glomerulare. Una malattia spontanea dell'uomo che segue questa modalità patogenetica è la sindrome di Goodpasture caratterizzata dall'instaurarsi di una glomerulonefrite, nefrite tubulo-interstiziale ed emorragie polmonari.

2) *Reazione di Arthus.* Nel secondo meccanismo patogenetico gli anticorpi circolanti nel sangue reagiscono con un antigene nel tessuto; il prototipo di questa reazione è il fenomeno di Arthus. Gli immunocomplessi si localizzano nella parete delle piccole arterie e di conseguenza viene attivato il sistema complementare. Fattori chemiotattici del complemento (C3a, C5a, C5, 6, 7) induce accumulo di leucociti polimorfonucleati che fagocitano i complessi immuni. Il punto finale è la liberazione di enzimi lisosomiali con distruzione delle pareti vasali, trombosi e necrosi ischemica del sito tissutale colpito.

3) *Malattie sistemiche da immunocomplessi.* Nella reazione di terzo tipo l'anticorpo reagisce con antigeni solubili in circolo. Gli IC che si sono formati possono essere rimossi mediante fagocitosi nel sangue e nel tessuto oppure depositarsi in certe strutture vascolari

ed organi con funzione di escrezione e di filtro, dove inducono lesioni tissutali (Cochrane e Dixon, 1978). La deposizione di IC ovviamente dipende dalla struttura degli organi bersaglio: IC sono stati trovati in quegli organi che hanno un elevato flusso ematico per unità di tessuto; es. i glomeruli renali, i plessi corioidei, la membrana sinoviale delle articolazioni, la cute e l'uvea. Per ragioni anatomiche gli IC circolanti vengono intrappolati in questi siti. Nelle malattie da complessi immuni tali organi possono essere considerati come «organi di rischio» (Cochrane e Koffler, 1973).

Gli immuno-complessi circolanti nel sangue non sono primariamente patogeni; è solo dopo penetrazione nel tessuto e l'attivazione di mediatori cellulari ed umorali che essi danno origine ad effetti patogeni. In accordo con le ipotesi di Cochrane e Koffler (1973) gli anticorpi IgE aumentano la permeabilità vasale fatto necessario per la penetrazione dell'IC attraverso la parete vascolare. Le IgE aderiscono ai recettori sui granulociti basofili nel sangue e sulle *Mastzellen* nei tessuti e quindi sensibilizzano queste cellule. Dopo un successivo contatto queste cellule sensibilizzate liberano un fattore attivante le piastrine (PAF) che causa aggregazioni di trombociti e liberazione di sostanze vasoattive (istamina, serotonina). Tali mediatori aumenteranno la permeabilità vascolare; quest'ultima è anche mediata dall'azione di tossine anafilattiche del sistema complementare (C3a, C5a). Dopo la deposizione dell'IC nei tessuti ed organi (es. rene, arterie, plessi corioidei, cute), l'attivazione del complemento continua e vengono attratti più leucociti polimorfonucleati. Dopo la fagocitosi di IC tali cellule liberano enzimi lisosomiali che inducono danni tissutali focali e flogosi. Queste lesioni sono intensificate dalla azione di enzimi (es. elastasi, collagenasi) liberati dai macrofagi.

Diagnosi di malattia da immunocomplessi

La dimostrazione di immunocomplessi circolanti in qualunque malattia non vuole ancora dire che essi esplichino effetti patogeni. È necessario dimostrare la deposizione di immunocomplessi negli organi e la loro associazione con lesioni tissutali. I metodi elettivi sono le tecniche dell'immunofluorescenza ed immunoperossidasi. Questi

Tabella 2 - Metodi per individuare gli immun-complessi (IC)

A) *Individuazione di IC nei tessuti*
- Metodi immunoistologici
  - Immunofluorescenza
  - Immunoperossidasi
- Eluizione di immunoglobuline dei tessuti

B) *Individuazione di IC nel sangue*
1) Metodi fisico-chimici
   - Ultracentrifugazione analitica
   - Gradiente di densità zuccherina per centrifugazione
   - Precipitazione glicole polietilenico (PEG)
2) Metodi biologici
   - C1q immunodiffusione in agarosio
   - C1q fase solida per radioimmunodiffusione
   - Test di aggregazione delle piastrine
   - Test cellulare Raji (C1q, C3b recettori)

metodi possono individuare componenti dell'IC come immunoglobuline e fattori del complemento ed in alcuni casi anche l'antigene.

Quali metodi antigene-non specifici per individuare IC circolanti sono disponibili metodi fisico-chimici e metodi basati sulle caratteristiche biologiche degli IC, quali l'interazione di IC con C1 g purificati, o la reazione di IC con recettori su cellule quali le piastrine e le cellule linfoidi.

Malattie da immuncomplessi negli animali

In un modesto numero di malattie definite da immuno-complessi negli animali è stato possibile identificare IC circolanti e negli IC depositati nei tessuti. Tuttavia noi ora conosciamo che sia gli antigeni endogeni che esogeni possono essere componenti degli IC. Per quanto riguarda i batteri si può affermare che durante determinate infezioni streptococciche e da *E. coli* nei cani può insorgere una glomerulonefrite, e ciò è stato provato in modo definitivo.

Tabella 3 - Malattie da immunocomplessi negli animali

A) *Antigeni esogeni*

1) Batteri e miceti
   Glomerulonefrite (Streptococchi, E. coli)
   Polmonite bovina (Micropolyspora faeni)

2) Virus
   Virus della leucemia murina (MLV)
   Virus della leucemia felina (FLV)
   Coriomeningite linfocitaria nel topo (LCM)
   Lattato-deidrogenasi virus nel topo
   Malattia del visone aleutino (*Parvovirus*)
   Anemia infettiva nei cavalli (*Oncornavirus*)
   Malattia delle mucose - diarrea da virus nel bovino (toga virus)
   Peste suina europea (*Togavirus*)
   Peste suina africana
   Infezione da *Adenovirus* canino, tipo 1 (CAV-1)
   Peritonite infetiva felina (FIP, *Coronavirus*)

3) Parassiti
   Glomerulonefrite (*Dirofilaria immitis*)

B) *Antigeni endogeni*

1) Antigeni immunoglobulinici
   Poliartrite da *Erysipelothrix* (fattore reumatoide)

2) Antigeni nucleari
   Lupus eritematoso disseminato (LES) nel topo
   Lupus eritematoso disseminato nel cane

C) *Antigeni sconosciuti*

1) Panarterite
2) Glomerulonefrite cronica
3) Pemfigo canino

Formazione di immuno-complessi locali del tipo di Arthus sono stati descritti nella polmonite allergica bovina causata da *Micropolyspora faeni* (Wilkie, 1976). Si trovano numerosi esempi di malattie

da immuno-complessi nell'ambito delle infezioni virali. Nelle infezioni da virus della leucemia murina (MLV) e da virus della leucemia felina (FeLV) esiste un'interessante associazione tra IC circolanti e la presenza di glomerulonefrite ed arterite da immuncomplessi. L'antigene virale della leucemia del topo è stato dimostrato nei glomeruli e gli anticorpi eluiti dai glomeruli reagisce con gli antigeni gp 70, gp 45 e p 30 del virus della leucemia del topo (Izui e al. 1979, 1981 Oldstone et al. 1976).

La coriomeningite linfocitaria (LCM) virale e l'infezione da «Lattato-deidrogenasi» nel topo sono ulteriori esempi di una chiara associazione tra IC circolanti e la deposizione di IC nei glomeruli renali (Cochrane e Koffler, 1973).

La malattia del visone aleutino può essere considerata un prototipo di malattia da immuno-complessi. L'agente casuale, un *Parvovirus,* non causa modificazioni tissutali, ma piuttosto esercita il suo potere patogeno in modo indiretto. In questa malattia i complessi circolanti virus-anticorpo nel siero sono correlati con la deposizione di immuno-complessi nei glomeruli renali e pareti vasali. Il continuo depositarsi di IC patogeni causa progressiva glomerulo-nefrite ed arterite sistemica (Trautwein e Müller-Peddinghaus, 1981).

Aspetti di malattie da immuno-complessi sono anche riscontrati in malattie virali quale l'*anemia infettiva equina* (Banks e al. 1972, Mc Guire e al. 1972), nella forma persistente di BVD/MD nel bovino (Prajer e Liess, 1976 Cutlip e al., 1980), in determinate forme di Peste suina europea e Peste suina africana (Cheville e al., 1970; Slauson e Sanchez-Vizcaino, 1981).

Una affezione oculare da immuno-complesso definita «occhio blu» è stata riscontrata in cani spontaneamente infetti o vaccinati contro l'*Adenovirus* canino (CAV. 1) (Charmichael, 1965). La malattia è caratterizzata da iridociclite con opacamento della cornea. In altri esperimenti è stata indotta, mediante tale virus una glomerulo nefrite non progressiva del tipo da immuno-complessi (Morrison e Wright, 1976, Wright e al. 1981.

Si è ultimamente evidenziato che nella *Peritonite infettiva felina* causata da un *Coronavirus,* si formano immuno-complessi che si depositano nei glomeruli renali (Horzinek e Osterhaus, 1979; Jacobse e Geels, al. 1980).

Recentemente è stata dimostrata tra l'infezione con *Dirofilaria im-*

mitis e l'insorgere di una glomerulopatia indotta da IC (Abramowsky e al. 1981, Aikawa e al. 1981).

Antigeni endogeni: Uno degli aspetti della *artrite reumatoide* nell'uomo e l'artrite cronica negli animali, es. la poliartrite indotta da *Erypelothrix rhusiopathiae* è la presenza del fattore reumatoide (RF). RF è un'immunoglobulina (IgM, IgG) diretta contro IgG autologa, che può combinarsi con i complessi antigene-anticorpo circolanti e formare complessi antigene-anticorpo circolanti e formare complessi più grandi. Questi ultimi si depositano quindi nelle articolazioni dove mantengono la forma artritica in atto (Theofilopoulos e Dixon, 1979, 1980).

Gli immuno-complessi che contengono come componenti antigenici autologhi degli antigeni nucleari (DNA, RNA, proteine ribonucleiche, antigeni nucleari solubili) giocano un ruolo nella patogenesi del Lupus erythematosis sistemico (SLE) nell'uomo ed in numerosi modelli animali es. cani, gatti, e ratto (Dixon e al., 1978; Trautwein, 1982).

Reperti immunoistologici nella *glomerulonefrite cronica* (GN) di parecchie specie animali mettono in evidenza che queste lesioni renali sono anche indotte da complessi immuni. Diverse forme morfologiche di GN possono essere differenziate, essendo il quadro comune costituito da depositi di granuli grossolani o fini di immunoglobuline e fattori complementari. Tuttavia si conosce poco circa la natura degli antigeni in causa (Trautwein e Müller-Peddinghaus, 1978).

BIBLIOGRAFIA

1) Abramowsky C. R., Powers K. G., Aikawa M. and Swinehart G. (1981): Dirofilaria immitis. 5. Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. Amer. J. Path. 104, 1-12.
2) Aikawa M., Abramosky C. R., Powers K. and Furrow R. (1981): Dirofilariasis. 4. Glomerulonephropathy induced by Dirofilaria immitis. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 30, 84-91.
3) Banks K. L., Henson J. B. and McGuire T. C. (1972): Immunologically mediated glomerulitis of horses. I. Pathogenesis in persistent infection by EIA virus. Lab. Invest. 26, 701-707.
4) Carmichael L. E. (1965): The pathogenesis of ocular lesions of

infectious canine hepatitis. II. Experimental ocular hypersensitivity produced by the virus. Path. Vet. 2, 344-359.

5) CHEVILLE N. F., MENGELING W. L. and SINOBER M. R. (1970): Ultrastructural and immunofluorescent studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera. Lab. Invest. 22, 458-467.

6) COCHRANE C. G. and DIXON F. J. (1978): Immune complex injury. In: M. Samter (Ed.) Immunological Diseases. Vol. 1, pp. 210-229. Little, Brown Publishers, Boston, USA.

7) COCHRANE C. G. and KOFFLER D. (1973): Immune complex disease in experimental animals and man. Adv. Immunology 16, 186-264.

8) CUTLIP R. C., MCCLURKIN A. W. and CORIA M. F. (1980): Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhea - Glomerulonephritis and encephalitis. Amer. J. Vet. Res. 41, 1938-1941.

9) DIXON F. J. (1963): The role of antigen-antibody complexes in disease. Harvey Lect. 58, 21-52.

10) DIXON F. J., FELDMANN J. D. and VAZQUEZ J. J. (1961): Experimental glomerulonephritis: The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. J. exp. Med. 113, 899-919.

11) DIXON F. J., ANDREWS B. S., EISENBERG R. A., MCCONAHEY P. J., THEOFILOPOULOS A. N. and WILSON C. B. (1978): Etiology and pathogenesis of a spontaneous lupus-like syndrome of mice. Arthr. Rheum. 21, (suppl.), pp. 64-67.

12) HORZINEK M. C. and OSTERHAUS A. D. M. E., (1979): The virology and pathogenesis of infectious peritonitis. Brief review. Arch. Virol. 59, 1-15.

13) IZUI S., MCCONAHEY P., THEOFILOPOULOS A. N. and DIXON F. J. (1979): Association of circulating retroviral gp 70-anti-gp 70 immune complexes with murine systemic lupus erythematosus. J. exp. Med. 149, 1099-1116.

14) IZUI S., MCCONAHEY P. J., CLARK J. P., HANG L. M., HARA I. and DIXON F. J. (1981): Retroviral gp 70 immune complexes in NZBx NZW F_2 mice with murine lupus nephritis. J. exp. Med. 154, 517-528.

15) JACOBSE-GEELS H. E. L., DAHA M. R. and HORZINEK M. C. (1980): Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. J. Immunol. 125, 1606-1610.

16) MCGUIRE T. C., CRAWFORD T. and HENSON J. B. (1972): Equine infectious anemia: detection of infectious virus complexes in the serum. Immunol. Commun. 1, 545-551.

17) MORRISON W. I. and WRIGHT N. G. (1976): Detection of immune complexes in the serum of dogs infected with canine adenovirus. Res. Vet. Sci. 21, 119-121.

18) OLDSTONE M. B., DEL VILLANO B. C. and DIXON F. J. (1976): Autologous immune responses to the major oncornavirus polypeptides in unmanipulated AKR/J mice. J. Virol. 18, 176-181.

19) PRAGER D. and LIESS B. (1976): Nachweis von Immunkomplex-Komponenten in Nierenglomerula bei der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease. Zbl. Vet. Med. B, 23, 458-469.

20) SLAUSON D. O. and SANCHEZ-VIZCAINO J. M. (1981): Leukocyte-dependent platelet vasoactive amine release and immune-complex deposition in African swine fever. Vet. Pathol. 18, 813-826.

21) THEOFILOPOULOS A. N. and DIXON F. J. (1979): The biology and detection of immune complexes. Adv. Immunol. 28, 89-220.

22) THEOFILOPOULOS A. N. and DIXON F. J. (1980): Immune complexes in human diseases. Amer. J. Path. 100, 529-591.

23) TRAUTWEIN G. (1982): Immunkomplex-Krankheiten bei Mensch und Tieren. Zbl. Vet. Med. B, 29, 165-185.

24) TRAUTWEIN G. und MÜLLER R. - PEDDINGHAUS (1978): Klassifikation und Pathogenese von Glomerulopathien der Tiere. Dtsch. tierärztl. Wschr. 85, 205-212.

25) TRAUTWEIN G. and MÜLLER R. - PEDDINGHAUS (1981): Aleutian disease of mink: A systemic immune complex vascular disease of viral origin. pp. 96-105. In: H. Deicher and L. - Cl. Schulz (Ed.), Arthritis, Models and Mechanisms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

26) WILKIE B. N. (1976): Experimental hypersensitivity pneumonitis. Humoral and cell-mediated immune response of cattle to Micropolyspora faeni and clinical response to aerosol challenge. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 50, 359-373.

27) WRIGHT N. G., NASH A. S. and CORNWELL H. J. (1981): Experimental canine adenovirus glomerulonephritis: persistence of glomerular lesions after oral challenge. Brit. J. exp. Pathol. 62, 183-189.

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

G. Poli *

LE MALATTIE AUTOIMMUNI

SINTESI

Per molto tempo si è creduto che gli animali, in condizioni normali di salute, non fossero in grado di produrre alcun tipo di anticorpo verso i propri tessuti (antigeni *self*). Attualmente è invece acquisito che un certo grado di reattività immunitaria verso costituenti normali dell'organismo sia un evento fisiologico.

In effetti è stato dimostrato che, nella milza, è sempre presente un certo numero di linfociti reattivi verso i tessuti dell'ospite.

Infatti, la stimolazione di queste cellule, utilizzando mitogeni non specifici, quali le endotossine batteriche, è in grado di indurre una temporanea comparsa di autoanticorpi nel siero, a livelli rilevabili; questi anticorpi possono reagire con i tessuti normali dell'ospite ma non provocano danni. In genere, comunque, questi linfociti auto-reattivi vengono soppressi e pertanto non producono significative quantità di anticorpi.

In altre situazioni, una certa reattività verso gli auto-antigeni (risposta autoimmune) gioca un ruolo fisiologico. Per esempio, gli anticorpi anti-idiotipo, che compaiono naturalmente, hanno la funzione di agire quali regolatori fisiologici del sistema immunitario.

Talvolta, invece, la soppressione nelle cellule autoreattive può non funzionare: quando ciò avviene, alcuni cloni linfocitari, che normalmente sono quiescenti, iniziano a replicarsi e a produrre grandi quantità o di autoanticorpi o di linfociti T autoreattivi. Quando si realizza questa situazione, l'imponente risposta immunitaria verso

* Istituto di Microbiologia ed Immunologia della Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano.

cellule o tessuti normali determina fenomeni patologici anche imponenti che vengono per questo motivo, definiti malattie autoimmuni.

Per quanto riguarda i meccanismi che possono essere responsabili del difetto della normale tolleranza verso il *self* si possono ricordare:

1) l'esposizione di antigeni cellulari o tissutali precedentemente mascherati;

2) la comparsa di determinanti antigenici nuovi;

3) una cross-reattività degli antigeni dell'ospite con quelli di alcuni microrganismi;

4) lo sviluppo di cellule immunocompetenti precedentemente soppresse;

5) l'azione di virus che interferiscono con i meccanismi di controllo del sistema immunitario.

MALATTIE AUTOIMMUNI DEGLI ANIMALI DOMESTICI

Anemia emolitica autoimmune

Questa malattia rappresenta uno di quei disordini immunologici che si possono effettivamente definire «autoimmuni», in quanto compaiono autoanticorpi che sono responsabili direttamente della distruzione dei globuli rossi e, quindi, dell'anemia. Questa, pertanto, si distingue da quelle patologie in cui si può pure dimostrare nel siero la presenza di anticorpi contro i tessuti dell'ospite, ma tali anticorpi non giocano alcun ruolo nella patogenesi della malattia: in effetti possono essere il risultato piuttosto che la causa della condizione morbosa.

Trombocitopenia immuno-mediata

Questa malattia può comparire a seguito di interazioni diverse

del sistema immunitario con le piastrine. Il termine precedentemente usato di «porpora trombocitopenica idiopatica» appare pertanto limitativo in quanto in molti casi, nel cane, è stata dimostrata una eziologia immunomediata, primaria (autoimmune vera) o secondaria, attraverso il rilievo di anticorpi anti-piastrine e della loro capacità distruttiva.

Lupus erythematosus sistemico

Questa malattia, così chiamata per l'aspetto «lupino» che assume l'uomo a causa di particolari manifestazioni dermatologiche, non è confinata alla cute, ma può interessare diversi altri distretti dell'organismo, come dimostrato dal rilievo di autoanticorpi a diversa specificità.

Artrite reumatoide

Si tratta di una malattia grave e debilitante, conosciuta da tempo nell'uomo, che recentemente è stata descritta anche nel cane. Ricerche piuttosto approfondite non sono per ora state in grado di rilevare differenze significative della patologia nelle due specie e pertanto, il cane può rappresentare un modello sperimentale estremamente valido anche per lo studio dell'artrite reumatoide dell'uomo.

Malattie cutanee bollose autoimmuni

Recentemente, diverse malattie di questo tipo, che si pensava non potessero manifestarsi negli animali domestici, sono state riconosciute nel cane. In questa specie animale, l'epidermide è caratteristicamente molto sottile e ciò comporta una fase «bollosa» di durata molto breve e pertanto gli animali arrivano alla visita del veterinario presentando esclusivamente lesioni ulcerative e, successivamente, croste e cicatrici.

Per questo motivo, il riconoscimento di queste forme come «bol-

lose» è stato possibile solo grazie alla messa a punto di valide tecniche istologiche e immunologiche. La patogenesi è da riferire a reazioni autoimmuni nei confronti di antigeni cutanei e poiché la specificità degli autoanticorpi varia nelle diverse malattie si può giustificare la varietà dei rilievi clinico-patologici. Per la diagnosi si possono avere indicazioni utilizzando principalmente tre procedure e precisamente: l'esame istopatologico, l'immunofluorescenza diretta per la dimostrazione di depositi di anticorpi e complemento e l'immunofluorescenza indiretta per la ricerca di autoanticorpi circolanti.

Vengono considerate quali malattie cutanee bollose autoimmuni il: *pemphigus vulgaris, foliaceus vegetans, erythematosus* e il pemfigoide bolloso.

Altre malattie autoimmuni

Vengono ricordate, seppure brevemente, alcune altre patologie che hanno alcune caratteristiche in comune e precisamente:

a) Sono rare.

b) La loro patogenesi autoimmune non è ancora ben documentata.

Si ricordano in particolare: la *myasthenia gravis,* la *tiroidite autoimmune*, la *glomerulonefrite autoimmune*, il *lupus discoide*, la *dermatite erpetiforme*, e la *panniculite nodulare.*

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

C. GENCHI *

ALTERAZIONI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA NELLE INFESTIONI DA ELMINTI

I fenomeni immunitari che intervengono nell'infestione parassitaria sono complessi e non sempre comportano una efficace difesa dell'organismo nei confronti del parassita.

Il parassitismo infatti è il risultato di processi selettivi che hanno determinato l'adattamento di un organismo vivente (il parassita) ad un altro, da cui esso dipende per quanto riguarda le sue esigenze trofiche e riproduttive.

È evidente che se consideriamo questo fenomeno dal punto di vista immunologico, esso non può essere che la risultante di un certo grado di immunotolleranza e della capacità del parassita «di mascherarsi» per non essere identificato quale estraneo e quindi distrutto.

In questo senso molto chiarificatori sono gli studi di Capron e coll. (1968) sulla struttura antigenica degli elminti e sulle «comunità antigeniche» tra i parassiti ed i loro ospiti. Partendo dalle ipotesi sull'adattamento e sulla filogenesi del parassitismo (Chabaud 1955-1957; Sprent 1962; Dineen 1963; Inglis 1965), Capron (1968) non solo conferma dal punto di vista immunologico «le somiglianze» (comunità antigeni) che permettono al parassita di sfuggire almeno in parte alla ricognizione immunitaria, ma dimostra che questa tolleranza immunologica è più elevata quanto più spinti sono i processi di adattamento tra parassita ed ospite.

Tenuto conto che i trematodi sono filogeneticamente parassiti dei molluschi (Cameron 1964), è interessante notare come *Fasciola hepatica* induca la formazione di anticorpi precipitanti soprattutto in

* Istituto di Patologia Generale, Cattedra di Parassitologia Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano.

ospiti non abituali quali l'uomo ed il coniglio, mentre la risposta è molto meno evidente nell'ovino e nel bovino, ospiti abituali del parassita (Capron e coll. 1968).

La struttura antigene nel parassita è alla base della risposta immunitaria che con i suoi complessi fenomeni può rappresentare di per se stessa la componente preponderante della malattia parassitaria: basti pensare alle alterazioni patologiche dovute alla formazione di complessi antigene-anticorpo in corso di infestazione spontanea o sperimentale da *Schistosoma spp.* (Colley 1981).

Le acquisizioni sulla funzione antigene del parassita sono in questi ultimi anni enormemente aumentate e molto si è aggiunto alle prime teorie sulle comunità antigeni (Capron e coll., 1968) e sulle convergenze antigeniche (Hudson 1973; Ogilvie e Wilson, 1976). Ad esempio le rapide variazioni antigeniche dei protozoi endocellulari (*Babesia, Trypanosoma, Leishmania, Plasmodium*) possono determinare fenomeni di immunosoppressione che favoriscono la evasione della risposta immunitaria da parte del parassita e di altri agenti patogeni che possono venire a contatto dell'ospite (Terry e coll. 1980).

Ugualmente i nematodi possono evocare risposte contradditorie, che portano ad un «esaurimento» della matrice immunitaria, soprattutto se il ciclo endogeno del parassita è lungo ed interessa differenti organi, come nel caso degli ascaridi e dei nematodi bronco-polmonari: a fenomeni di questo tipo sarebbero da ascrivere le gravi infezioni batteriche e virali, sovente ad esito letale, che insorgono in concomitanza alle infestazioni ed alle reinfestazioni da nematodi (Woodruff e coll., 1966).

Infatti mentre in alcuni casi la risposta immunitaria anche se comporta fenomeni patologici nei confronti dell'organismo che la elabora può essere ancora considerata «nociva» per il parassita, in altri casi il bersaglio degli anticorpi non sono più solo i parassiti, ma strutture elaborate dall'organismo (blocco della risposta efferente), se non l'organismo stesso (induzione di fenomeni di autoimmunità).

Nel caso delle infestioni elmintiche possiamo affermare che:

— la risposta immunitaria è una importante componente selettiva nella dinamica dei fenomeni di interazione tra ospite e parassita;

— gli antigeni responsabili della risposta immunitaria diretta contro l'accrescimento del parassita e la sua replicazione, sono oggetto di una selezione convergente nei confronti dell'ospite o quanto meno vengono «mascherati» dalle proteine dell'ospite;

— la risposta immunitaria alle infestioni elmintiche si esercita a livelli soglia della informazione antigenica e i fenomeni di premunizione sono una normale componente della naturale interazione tra ospite e parassita, e dunque non rivestono solo un significato difensivo (Dineen e Wagland, 1982);

— antigeni in grado di stimolare la risposta immunitaria e che non derivano dalla attività riproduttiva del parassita, sono quelli più efficaci nell'evocare risposte difensive in quanto non sottoposti a selezioni convergenti nei confronti dell'ospite, ma sono anche quelli che possono comportare un eccesso di stimolazione con risposte patologiche (Cohen, 1982; Dineen e Wagland. 1982).

L'intreccio tra processi immunitari difensivi e patologici è molto stretto ed è difficile chiarire la genesi e la dinamica dei differenti fenomeni, sovente dovuti alla stimolazione simultanea e contradditoria della matrice immunitaria.

D'altronde la risposta difensiva è già di per se stessa la risultante di un complesso meccanismo conseguente ai fenomeni di resistenza naturale ed acquisita, specifica ed aspecifica, che necessita di rigorosi processi di immunoregolazione.

Appare dunque intuibile come un organismo antigenicamente complesso, in continuo cambiamento a seconda della localizzazione e del suo stadio evolutivo (o in rapida replicazione come nel caso dei protozoi), e che contrae stretti rapporti con l'ospite, possa indurre alterazioni della risposta immunitaria fino alle estreme conseguenze patologiche, inducendo la formazione di anticorpi diretti contro le strutture stesse dell'ospite.

Infatti la presenza del parassita può determinare nell'ospite la *evidenziazione dei così detti antigeni segregati* che possono diventare bersaglio della risposta immunitaria.

Numerosi autoanticorpi sono stati evidenziati in corso di schistosomiasi sia nell'uomo che negli animali da esperimento (Calley, 1980), e si possono mettere in evidenza soprattutto all'inizio della

risposta immunitaria, nella fase di aumento anticorpale, (Bout e coll., 1980) e potrebbero essere la conseguenza di una «evasione» dal controllo immunologico a causa dell'attivazione policlonale delle cellule B (Terry e coll. 1980).

Similmente una delle caratteristiche proprie delle tripanosomiasi africane è l'aumento degli anticorpi, soprattutto delle IgM. Nella fase precoce dell'infezione infatti si assiste ad una attivazione policlonale delle celule B, T e dei linfociti «Killer», dovuta apparentemente alla stimolazione di prodotti ad elevato peso specifico derivati dal metabolismo del protozoo e contenenti componenti delle membrane (Cohen, 1982). Ne deriverebbe un aumento di immunoglobuline non specifiche e la formazione di auto-anticorpi ed eventualmente un esaurimento del potenziale produttivo anticorpale con perdita della memoria B e T (Cohen, 1982). Seed e Gam (1967) suggeriscono che l'autoimmunità in corso di tripanosomiasi possa giocare un suo ruolo patogeno originale. IgM anticervello, fegato, cuore e rene sono state isolate in diverse forme di tripanosomiasi in animali di laboratorio infestati sperimentalmente (Houba e coll., 1969; Mackenzie e Borehan, 1974), forse dovute alla liberazione di antigeni dai tessuti danneggiati o in conseguenza di attivazioni policlonali (Vickerman e Barry, 1982). Gli elevati titoli di conglutinina che si osservano nei pazienti colpiti dalla malattia del sonno potrebbero essere dovuti ad autoanticorpi contro componenti alterate del complemento (Pautrizel e coll., 1962).

Forse il caso che interessa più da vicino la medicina veterinaria è la babesiosi per la quale fin dagli anni '60 furono chiamati in causa fenomeni di autoimmunità, responsabili dell'anemia che accompagna l'infezione del protozoo (Zuckerman, 1964; Schröeder e coll., 1966; Zwart e Brocklesby, 1979).

È evidente dai pochi esempi riportati che il parassita induce un «eccesso» di risposta immune che, se non regolata, determina conseguenze patologiche gravi: il modello della infestione protozoaria ha contribuito a chiarire molti di questi aspetti, tenuto conto che lo studio della risposta immunitaria nell'infestazione elmintica è molto complesso per l'elevato numero di antigeni che compongono questi organismi.

Fenomeni immunopatologici conseguenti all'infestazione elmintica

Le difese che l'organismo utilizza per resistere alla infestazione elmintica si basano su meccanismi non immunitari:

— *refrattarietà naturale,*

— *resistenza individuale*: la razza, l'età ed il sesso sono importanti fattori di resistenza individuale; nota è l'influenza esercitata sugli elminti dai fattori ormonali legati al sesso ed allo stato fisiologico dell'ospite quali la maturità sessuale e la gravidanza: (Szidat, 1971; Dineen e Kelly, 1972; Kelly e Dineen, 1973; Ngwenda, 1976; Dargie, 1982),

— *resistenze inter e intraspecifiche*: ad esempio la presenza di cestodi adulti a livello enterico rallenta o impedisce l'invasione somatica di forme larvali di questi parassiti (Tizard, 1977), e su meccanismi immunitari umorali e/o cellulari.

Tra i fattori umorali, oltre quelli non specifici, particolare importanza assumono nella rispota alla infestazione elmintica le immunoglobuline E. Infatti l'aumento dei livelli sierici di questi anticorpi, accompagnato da un incremento significativo del numero di eosinofili, basofili e *Mastzellen* (Capron e Capron, 1982), sono i segni «classici» delle infestazioni elmintiche.

In questi ultimi anni sono stati chiariti i meccanismi chemiotattici ed il ruolo delle linfochine eosinofiliche nei confronti dei parassiti.

Infatti gli eosinofili sono probabilmente le cellule più importanti nell'evoluzione dei meccanismi offensivi, sovente letali, nei confronti di questi particolari patogeni (Butterworth, 1980; Warren, 1980 - 1982).

Per quanto riguarda le IgE, fin dalla loro prima evidenziazione (Joansson & Bennich, 1967) fu chiaro il ruolo patogeno e non semplicemente «difensivo» sostenuto da questa classe di immunoglobuline (Ischizaka & Ischizaka, 1967). Ogilvie e Jones (1973) fornirono una suggestiva interpretazione del fenomeno, sostenendo che le IgE sono un residuo ancestrale di un meccanismo difensivo necessario quando anche l'uomo era obbligato a convivere con i parassiti. La genesi dei fenomeni di auto-eliminazione e di premunizione presenti

nelle popolazioni animali ed umane che vivono a stretto contatto con i parassiti, sembrano dare ragione a questa ipotesi (Larsh e Race, 1975; Tizard, 1977). Negli animali domestici le IgE sono state messe in evidenza relativamente di recente (Nielsen e coll. 1976, 1977). Ancora nel 1970 non vi erano segnalazioni certe della presenza di questi anticorpi negli animali domestici, eccetto per il cane (Herbert, 1970).

Negli animali domestici, soprattutto nei piccoli e nei grandi ruminanti, non è sempre facile controllare il ruolo patogeno sostenuto da queste immunoglobuline.

È noto che le difese messe in atto contro *Fasciola hepatica,* soprattutto nella specie bovina, sono da ascrivere in larga parte ad una risposta cellula-mediata (Corba e coll., 1971; Armour e Dargie, 1974; Genchi e coll., 1973; Doy e coll., 1980; Duffs e coll., 1980). D'altronde nella fase di migrazione nel parenchima epatico delle adolescarie l'infiammazione allergica sostenuta dalle IgE e gli eosinofili hanno una importante funzione nell'ostacolare l'invasione del parassita (Doy e coll., 1980). Elevati livelli sierici di questi anticorpi permangono anche nei soggetti affetti da distomatosi cronica (Genchi e coll., 1973, 1974) probabilmente in conseguenza ai fenomeni di reinfestazione a cui gli animali sono soggetti nel corso della loro carriera produttiva.

Il coinvolgimento delle IgE nella infezione da *Fasciola hepatica,* assume un particolare significato patologico: infatti i metaboliti del parassita ed i prodotti derivati dal catabolismo cellulare lungo i tragitti parassitari, probabilmente derivati anche dall'effetto citotossico operato sulle *Mastzellen* dal legame antigene-IgE determinata la liberazione di sostanze vasoattive (ammine e *Slow Reaction Substance of Anaphylaxis*: SRS-A). Tale fenomeno può coinvolgere anche gli epatociti non direttamente interessati dalla migrazione del giovane distoma: ne consegue l'alterazione delle strutture della cellula, con liberazione di enzimi citoplasmatici unicrosomiali con conseguente drastica diminuzione delle attività metaboliche e disintossicanti del fegato (citocromo P-450 e glicuronazione) (Maffei Facino e coll., 1981, 1983; Genchi e coll., 1981).

Significativi sono anche gli elevati livelli di IgE specifici raggiunti nell'uomo in caso di distomatosi (Genchi e Falagiani, 1983) dove la risposta iperergica potrebbe essere giustificata dallo scarso

adattamento di questa specie animale alla infestazione da *Fasciola hepatica.*

Reazioni anafilattiche di tipo immediato sono probabilmente alla base anche delle gravi sintomatologie cliniche che si osservano in corso di ostertagiosi bovina di tipo II, causata dal risveglio delle larve ipobiotiche, e dalle forme tardive di broncopolmonite parassitaria (*Dictyocaulus viviparus* (Jørgensen, 1981; Euzéby, 1982).

Perché la reazione anafilattica sfoci nel dramma clinico sono comunque necessarie particolari condizioni (entità della carica parassitaria, sincronizzazione dei fenomeni di ipobiosi larvale, ecc.), tipiche del pascolo e difficilmente realizzabili nei nostri allevamenti intensivi.

Resta comunque il fatto che la componente allergica nelle infestazioni elmintiche, anche se asintomatica, complica notevolmente il quadro di malassorbimento intestinale e di alterato metabolismo epatico conseguente alla presenza di parassiti (Euzéby, 1971; Genchi e coll., 1981; Genchi, 1982).

Un ruolo particolare assumono le IgE nella invasione da parte dei nematodi in ospiti paratenici (aspecifici) (Beaver e coll., 1952). In questo ambito le indagini più approfondite sono state condotte in corso di Toxocariasi umana che si differenzia in due forme cliniche: sindrome da *larva migrans* viscerale e *larva migrans* oculare (per una rassegna: Ehrhard e Kernbauman, 1979; Brunello e coll., 1982).

L'aumento dei livelli sierici di questa classe di immunoglobuline e la presenza di IgE specifiche è stata messa in evidenza da Genchi e Falagiani (1980), Genchi e coll. (1982) Brunello e coll. (1981 - 1983), Desonitz e coll. (1981) e Rockey e coll. (1981).

La forma più grave sicuramente è quella oculare, anche per la difficoltà di una diagnosi precoce (Zinkham, 1978). Recentemente Rockey e coll. (1981) e Genchi e coll. (1983) hanno avanzato l'ipotesi che le lesioni oculari potrebbero essere conseguenti anche all'azione lesiva delle IgE, che legandosi con l'antigene parassitario, determinerebbero la degranulazione delle *Mastzellen* uveali, con il conseguente richiamo di eosinofili e formazione di essudato della coroide, con evidenti fatti infiammatori (Rockey e coll., 1981). Tale ipotesi troverebbe conferma nel comportamento delle IgE specifiche in corso di migrazione oculare di larve di *Toxocara canis* (Genchi e coll., 1983).

Poche conferme ci sono fino ad ora su possibili reazioni citotossi-

che, mediate da anticorpi (IgG, IgM, IgA) contro strutture cellulari o antigeni di membrana, conseguenti alle infestazioni da elminti (Ogilvie e Mackenzie, 1981) mentre è stata dimostrata la formazione di immunocomplessi anomali, con effetto patologico. Le indagini più approfondite sono state condotte nelle infestazioni da trichinella e da schistosoma (Warren 1978 e, b). Dopo la sensibilizzazione operata dalle larve in migrazione e dal parassita adulto, soprattutto nella schistosomiasi, gli antigeni provenienti dalle uova possono indurre reazioni crociate con antigeni di altri stadi del parassita: infatti poco tempo dopo l'ovo-deposizione, vi è un marcato aumento degli anticorpi circolanti. È possibile che in questa fase in cui è presente un eccesso di antigene, si formino degli immunocomplessi (Warren, 1978; Colley 1981) che a seconda delle loro origini o delle loro dimensioni possono comportare gravi danni ai tessuti, in particolare alle strutture glomerulari del rene e dell'occhio, come nel caso delle filariosi umane (Ogilivie e Mackenzie, 1981).

Alterazioni patologiche possono derivare anche da reazioni di ipersensibilità ritardata. Il modello più studiato è ancora quello della schistomatosi (Warren 1978 a, 1982; Colley 1981), ma è possibile che in corso di infestazione da filarie cutanee (*Dirofilaria spp., Onchocerca spp. Setaria spp.*), possono essere dovute a fenomeni di ipersensibilità ritardata, che nell'uomo si manifestano soprattutto nei soggetti con infestazioni relativamente contenute, mentre in quelle massive sembra sussistere uno stato anergico (Ogilvie e Mackenzie, 1981), a conferma della interferenza dei parassiti sulle capacità reattive dell'ospite.

Sicuramente una «rilettura» in chiave immunologica e immunopatologica delle infestazioni parassitarie aprirebbe in medicina veterinaria nuove prospettive nella comprensione della patogenesi e della clinica di molte malattie parassitarie. Ad esempio di grande importanza sarebbe definire il ruolo sostenuto dalle larve infestanti e dai parassiti adulti nel mantenimento dello stato immunitario dell'organismo ospite e sulle conseguenti reazioni immunopatologiche. Infatti nelle infestazioni elmintiche dell'uomo si è visto che l'induzione immunitaria determinata dai diversi stadi del parassita è fondamentale per il controllo ed il decorso della malattia, oltre che nello stimolare la formazione di capsule fibrose, atte ad isolare l'organismo parassita.

Inoltre anche se recenti indagini hanno evidenziato che nel bovi-

no e nella pecora infestati da strongili gastro-intestinali non vi sono deficit nella risposta cellulo-mediata (Ross e Halliday, 1979), la sua efficacia sembra limitata a fenomeni di premunizione, mentre l'inoculazione di un estratto dializzato di linfociti sensibilizzati, provenienti da animali infestati, è in grado di potenziare la risposta specifica nei confronti dei parassiti. L'effetto di immunopotenziamento della risposta cellulo-mediata è di evidente importanza nello sviluppo della resistenza (Klesius, 1981).

Si tratta evidentemente di fenomeni complessi, lo studio dei quali trova in Medicina Veterinaria ulteriori difficoltà nelle caratteristiche immunitarie, sovente diverse, delle varie specie animali di interesse zooeconomico e zooiatrico. Di certo parte della sintomatologia tipica delle malattie parassitarie è ascrivibile a risposte immunopatologiche che possono innescare reazioni il cui bersaglio è sovente imprevedibile e di importanza vitale.

BIBLIOGRAFIA

1) Armour J. & Dargie J. D. (1974): Immunity to *Fasciola hepatica* in the rat: successful transfer of immunity by lymphoid cells and serum. Exp. Parasitol. *35,* 318.

2) Beaver P. C., Snyder H., Carrera G., Dent J., Lafferty J. (1952): Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. Pediatrics, *9,* 7.

3) Bout D. M., Rousseaux R., Carliery, Capron A. (1980): Kinetics of classes and sub-classes of total immoglobulins and specific antibodies to *Schistosoma mansoni* during murine infections. Parasitology, *80,* 247.

4) Brunello F., Falagiani P., Genchi C. (1981): Impiego del RAST per la determinazione delle IgE specifiche verso gli antigeni larvali di *Toxocara canis* in una sospetta epidemia intrafamiliare di toxocariasi. Parassitologia, *23,* 129.

5) Brunello F., Genchi C., Falagiani P. (1982): Larva migrans viscerale da *Toxocara canis.* Recenti Progressi Med., *73,* 65.

6) Brunello F., Genchi C., Falagiani P. (1983): Detection of larva-specific IgE in human toxocariasis. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. *77,* 279.

7) BUTTERWORTH A. E. (1980): Eosinophils and immunity to parasites. Trans. Royal Soc. Trop. Med. *74*, suppl, 38.

8) CAMERON T. W. N. (1964): Host specificity and the evolution of helminthic parasites. Advanc. Parasit. *2*, 1.

9) CAPRON A., BIGUET J., VERNES A., AFCHAIN D. (1968): Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol., *16*, 121.

10) CAPRON M. & CAPRON A. (1982): Role of mast cells and basophils in immune defence against parasites. Zentralblatt f. Bakt., Suppl. 12.

11) CHABAUD A. G. (1955): Essai d'interpretation phylétique des cycles evolutifs chez les nématodes parasites des vertébrés. Conclusions taxonomiques. Ann. Parasit. hum. comp. *30*, 30.

12) CHABAUD A. G. (1957): Spécificité parasitaire chez les nématodes parasites des vertébrés. In 1er symposium sur la spécificité parasitaire des parasites des vertébrés. P. Attinger, Neuchatel; cit. da CAPRON e coll. (1968).

13) COHNEN S. (1982): Survival of parasites in the immunocompetent host. In COHEN S. & WARREN K. S. Imunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, 138-161.

14) COLLEY D. G. (1981): Immune responses and immunoregulation in experimental and clinical schistosomiasis. In J. M. MANSFIELD: Parasitic diseases. Vol. 1: The immunology. Marcel Dekker Inc.

15) CORBA J., ARMOUR J., ROBERTS R. J., URQUHART G. B. (1971): Transfer of immunity to *Fasciola hepatica* infection by lymphoid cells. Res. Vet. Sci. *12*, 292.

16) DARGIE J. D. (1982): The influence of genetic factors on the resistance of ruminants to gastrointestinal nematode and trypanosoma infections. In Owen D. G. Ed.: Animal models in parasitology. MacMillian Press. Ltd.

17) DESOWITZ R. S., RUDOY R., BARNWELL J. W. (1981): Antibodies to canine helminth parasite in asthmatic and nonasthmatic children. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. *65*, 361.

18) DINEEN J. K. (1963): Immunological aspect of parasitism. Nature, *197*, 268.

19) DINEEN J. K. & KELLY J. D. (1972): The suppression of rejection of *Nippostrongylus brasiliensis* in lactating rats: the nature of immunological defect. Immunology *22*, 1.

20) DINNEN J. K. & WAGLAND B. M. (1982): Immunoregulation of parasites in natural host-parasite systems, with special reference to the gastrointestinal nematodes of sheep. In Symons L.E.A., Donald A. D., Dineen J. K.: Biology and control of endoparasites. Academic Press, 297.

21) Doy T. G., Hughes D. L., Harness E. (1980): The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted *Fasciola hepatica* in vitro. Res. Vet. Sci. *29,* 98.

22) Duffus W. P. H., Thorner K., Oliver R. (1980): Killing of juvenile *Fasciola hepatica* by purified bovine eosinophil proteins. Clin. exp. Immunol. *40,* 336.

23) Ehrhard T. & Kernbaum S. (1979): *Toxocara canis* et toxocarose humaine. Bull. Inst. Pasteur, *77,* 225.

24) Euzeby J. (1971): Les dystrophies des helminthoses. Folia Vet. Lat. *1,* 317.

25) Euzeby J. (1982): L'action pathogène des helminthes chez les bovidés. Atti Giornata di studio su «Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino», Brescia, maggio 1982.

26) Genchi C. (1982): Le strongilosi dei bovini. Praxis Vet., *3,* 6-10.

27) Genchi C. e Falagiani P. (1980): Indagine preliminare sulla diffusione di *larva migrans* viscerale di *Toxocara* sp. nella popolazione umana. Immunodiagnosi con il Rast. Parassitologia *22,* 314.

28) Genchi C. e Falagiani P. (1983): Osservazioni personali.

29) Genchi C. e Sartorelli P. (1974): Osservazioni *in vitro* sulla liberazione di istamina nel sangue di bovini distomatotici: sensibilizzazione passiva di leucociti. Clin. Vet., *97,* 11.

30) Genchi C., Falagiani P., Brunello F. (1982): Toxocariasis: defection of larva-specific IgE by rats in health blood donors and patients (preliminary results). Acta Med. Pat. Infect. Trop. *1,* suppl. 1, 141.

31) Genchi C., Falagiani P., Brunello F., Sioli C. (1983): Il ruolo dell'immunologulina E nella toxocariasi oculare. In corso di stampa.

32) Genchi C., Locatelli A., Sartorelli P. (1973): Aspetti immunologici della distomatosi bovina. Arch. Vet. It., *24,* 123.

33) Genchi C., Porcelli F., Traldi G., Curatolo C., Agnes F. (1981): Alcune considerazioni sulla infestazione sperimentale del ratto con *Fasciola hepatica,* con particolare riferimento alla dinamica cellulare dell'epatocita. Parassitologia, *23,* 184.

34) Herbert W. J. (1970): Veterinary Immunology. Blackwell Scientific Pubblications.

35) Houba V., Brown K. N., Allison A. C. (1969): Heterophile antibodies, M-antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. Clin. exp. immunol. *4,* 113.

36) Hudson R. J. (1973): Moderated immunologic responsiveness in parasitic infections. Advanc. Vet. Sci. Comp. Med. *17,* 87.

37) Inglis M. G. (1965) in A. E. Taylor: Evolution of parasites. Blackwell Scientific Publications Oxford.

38) Ishizaka K. & Ishizaka T. (1967): Identification of gamma E-antibodies as a carrier of reaginic activity. J. Immunol., *99,* 1187.

39) Joansson S. G. O. & Bennich H. (1967): Immunological studies of an atipycal (myeloma) immunoglobulin. Immunol., *13,* 381.

40) Jirgensen R. J. (1981): Studies on the lungworm *Dictyocaulus viviparus* (Bloch, 1782) and its epidemiology in young cattle with a description of an attempt to present parasitic bronchitis. Acta Vet. Scandinavica. Suppl. 76.

41) Kelly J. D. & Dineen J. K. (1973): The suppression of rejection of *Nippostrongylus brasiliensis* in lewis strain rats treated with ovine prolactine. Immunology, *24,* 551.

42) Klesius P. H. (1981): Modulation of cell-mediated responses with dialysable leukocyte extract containing transfer factor. In Butler J. E.: The ruminant immune system. Adv. Exp. Med. Biol. *137,* 293.

43) Larsh J. F. Jr. & Race G. J. (1975): Allergic inflammation as a hypotesis for the expulsion of worms from tissues: a review. *37,* 251.

44) Maffei Facino R., Carini M., Bertuletti R., Genchi C., Malchiodi A. (1981): Decrease of the *in vitro* drug-metabolizing activity of the hepatic mixed function oxidase system in rats infected experimentally with *Fasciola hepatica*: farmacological implications. Pharm. Res. Com., *13,* 731.

45) Maffei Facino R., Carini M., Nava M. L., Genchi C. (1983): Impaired cytochrome P-450-dependent metabolism of the flukicidal agent nitroxynil in bovine fascioliasis. Toxicol. Letters, in corso di stampa.

46) Mackenzie A. R. & Boreham P. F. L. (1974): Autoimmunity in the trypanosome infections. Immunology, *26,* 1925.

47) Ngwenda (1976): Responce of ovine prolactin treated mice to initial infection with *Trichinella spiralis.* J. Parasitol. *69,* 871.

48) Nielsen K. H. & Wilkie B. N. (1977): Bovine reaginic antibody. II. Preparation of an anti-reaginic immunoglobulin. Int. Archs. Allergy appl. Immunol. *53,* 174.

49) Nielsen K., Holmes W., Wilkie B., Tizard I. (1976): Bovine reaginic antibody I. Rat mast cell degranulation by bovine allergic serum. Int. Archs. Allergy appl. Immunol., *51,* 441.

50) Ogilvie B. M. & Jones V. E. (1973): Immunity in the parasitic relationship between helminths and hosts. Progr. Allergy, *17,* 99.

51) Ogilvie B. M. e Mackenzie C. D. (1981): Immunology and immunopatology of infections caused by filarial nematodes. In Mansfield J. M. Parasitic diseases. Vol. I, The immunology, 227-289.

52) Ogilvie B. M. & Wilson R. J. M. (1973): Evasion of the immune

response by parasites. Brit. Med. Bull. *32*, 177-181.

53) PAUTRIZEL R., DURRET J., TRIBOULEY J., RIPERT (1962): Application de la réaction de conglutination à la diagnotsic sérologique des trypanosomes. Bull. Soc. Path. Exot., *55*, 392.

54) ROCKEY J. H., DONNELLY J. J., STROMBERG B. E., LATIES A. M., SOULSBY E. J. L. (1981): Immunopathology of ascarid infection of the eye. Arch. Ophthalmol., *99*, 1831.

55) ROSS J. G., HALLIDAY W. G. (1979): Investigation of transfer factor activity in the transfer of immunity to *Trichostrongylus axei* infections in sheep. Res. Vet. Sci., 27, 258.

56) SCHROEDER W. F., COX H. W., RISTIC M. (1966): Anemia, parasitaemia, erythrophagocytosis and haemoagglutinins in *Babesia rodhaini* infection. Am. Trop. Med. Parasitol. *60*, 31.

57) SEED J. R. & GAM A. A. (1967): The presence of antibody to a normal liver antigen in rabbits infected with *Trypanosoma gambiense*. J. Parasitol. *53*, 946.

58) SPRENT J. F. A. (1962). In LEEDER G. W. The evolution of living organism. University Press, Melbourne.

59) SZIDAT L. (1971): Neue Aspekte der Echinococcenproblems. Angew. Parasit., *12*, 133-143.

60) TAI POH-CHUN (1980): Interaction of eosinophils, immunoglobulin and complement. Trans. Royal Soc. Trop. Med. *74*, suppl., 19.

61) TIZARD I. R. (1977): An introduction to veterinary immunology. W. B. SAUNDERS COMPANY.

62) TERRY R. J., HUDSON K. M., FAGHIBI - SHIRAZI (1980): Polyclonal activation by parasites. Janssens Research Foundation Series *2*, 259.

63) VICKERMANN K. & BARRY J. D. (1982): African trypanosomiasis. In COHEN S. & BARRY K. S. Immunology of Parasitic Infections. Blackwell Scientific Publications, 204-260.

64) WARREN K. S. (1978 a): Worms. In Samter M.: Immunological diseases. Little Brown & Company. Boston - cit. da WARREN K. S. (1982). Mechanisms of immunopathology in parasitic infections.

65) WARREN K. S. (1978 b): The pathology, pathobiology and pathogenesis of schistosomiasis. Nature, *273*, 609.

66) WARREN K. S. (1980): A perspective summation. In MAHMOUD A. A. F. & AUSTEN K. F.: The eosinophil in Health and Disease. Grune & Stratton, New York.

66) WARREN K. S. (1982): Mechanism of immunopathology in parasitic infections. In COHEN S. & WARREN K. S.. Immunology of parasitic infections. Blackwell Scientific Publications, 116-137.

68) WOODRUFF A. W., BISSERU B., BOWE J. C. (1966): Infection with

animal helminth as a factor in causing poliomyelitis and epilepsy. Brith. Med. J. *50,* 1576.

69) ZINKHAM W. H. (1978): Visceral larva migrans. Am. J. Dis. Child., *132,* 627.

70) ZUCKERMAN A. (1964): Autoimmunization and other types of indirect domage to host cells as factor in certain protozoan diseases. Exp. Parasitol. *15,* 138.

71) ZWART D. & BROCKLESBY D. W. (1975): Babesiosis non-specific resistance, immunological factor and pathogenesis. Adv. Parasitol. *17,* 49.

Atti della Giornata di studio su:
Immunopatologia veterinaria

Scuola per la Ricerca Scientifica - Brescia, 26 Giugno 1983

S. Cerruti Sola *

ASPETTI IMMUNOLOGICI DELLA PATOGENESI DELL'ENCEFALITE CIMURROSA DEL CANE

L'encefalite cimurrosa del cane è una malattia demielinizzante causata dal virus del cimurro, un paramyxovirus antigenicamente correlato con il virus del morbillo dell'uomo e della peste bovina (Appel, 1971).

L'encefalite cimurrosa è considerata un modello per lo studio di disordini neurologici associati a paramyxovirus nell'uomo (Koestner, 1975) e della sclerosi multipla (Dal Canto e Rabinowitz, 1982).

Le numerose ricerche condotte negli ultimi anni nel tentativo di chiarire il complesso meccanismo alla base della patogenesi della demielinizzazione non hanno ancora portato a risultati conclusivi.

Già da tempo è noto come il decorso della malattia nella sua forma sistemica sia influenzato dalla risposta immunitaria umorale (Appel, 1969).

Studi condotti su animali sperimentalmente infettati hanno dimostrato che, soltanto nei soggetti che non sviluppano una risposta anticorpale adeguata, il virus del cimurro è in grado, dopo una prima fase di replicazione negli elementi linfoidi del sangue e dei vari organi, di colonizzare epiteli e tessuto nervoso.

Secondo recenti ricerche (Krakowka e coll., 1975; Ho e Babiuk, 1980; Appel e coll., 1982), anche l'efficienza dei meccanismi immunitari cellulo-mediati è fondamentale al fine di limitare la diffusione del virus nell'organismo.

Alla luce delle attuali conoscenze è altrettanto chiaro (Wisniewski e coll., 1972; Cerruti Sola e coll., 1983) che il comportamento del sistema immunitario nei diversi soggetti non soltanto condizio-

* Istituto di Patologia Generale e Anatomia Patologica e Patologia Aviare - Università di Torino.

na la progressione dell'infezione, ma anche l'instaurarsi e lo sviluppo della demielinizzazione.

Nel corso di infezioni sperimentali si è infatti osservato come le lesioni encefaliche vadano incontro ad una evoluzione temporale (Mc Cullough e coll., 1974; Raine, 1976; Vandevelde e coll. 1982 b). In corrispondenza del 21° giorno circa P.I., esse consistono essenzialmente in ipertrofia degli astrociti, accompagnata da demielinizzazione dapprima lieve, poi aggravantesi fino alla formazione di un vero e proprio stato spongioso. La localizzazione preferenziale corrisponde alle aree sottomeningee e subependimali di midollo allungato, cervelletto e zone limitrofe al IV ventricolo. In questo stadio le lesioni possono andare incontro a processi di remielinizzazione e guarigione. Intorno al 30° giorno, negli animali che sopravvivono, la demielinizzazione è intensa; spesso sono anche presenti cellule giganti multinucleate di origine gliale.

Queste lesioni, comunemente classificate di tipo acuto, corrispondono, come dimostrato da studi recenti (Vandevelde e coll., 1982b; Cerruti Sola e coll., 1983), ad un periodo di completa inerzia del sistema immunitario caratterizzato, oltre che da una marcata linfopenia nel sangue periferico, dall'assenza di proliferazione dei linfociti coltivati «in vitro» in presenza di mitogeni policlonali.

Negli animali che sviluppano questo tipo di alterazioni encefaliche, sono inoltre assenti, sia nel siero sia nel liquor cerebro-spinale, anticorpi contro il virus del cimurro e contro i principali costituenti della mielina; negativo appare anche il reperto, nella sede delle lesioni, di immunoglobuline locali, la cui presenza è invece dimostrata nella successiva fase della malattia (Vandevelde e coll., 1982a-b).

È pertanto opinione condivisa da molti ricercatori che la demielinizzazione nella fase acuta si sviluppi indipendentemente dall'intervento del sistema immunitario, il quale rivestirebbe invece un ruolo fondamentale nel determinare la successiva evoluzione delle lesioni.

Infatti intorno al 42° giorno P.I. alcuni animali sviluppano, nell'ambito delle lesioni preesistenti, una reazione flogistica di tipo non purulento, associata ad un aggravamento dello stato spongioso, che può portare alla formazione di vere e proprie aree malaciche.

In questi soggetti si osserva costantemente una ripresa della funzionalità del sistema immunitario, testimoniata dalla capacità prolife-

rativa dei linfociti e dalla presenza, in alcuni casi, in siero e liquor, di anticorpi contro il virus del cimurro ed i costituenti dellla mielina.

Le ipotesi circa il meccanismo della demielinizzazione nella fase acuta vertono in favore dell'azione diretta del virus sul tessuto cerebrale.

La presenza dell'agente infettante nell'ambito delle lesioni è provata dal riscontro di corpi inclusi (Vandevelde e coll., 1981) e di antigeni virali (Kristensen e Vandevelde, 1977), dalla formazione di cellule giganti, probabilmente conseguente all'azione citocinetica del virus, dai fenomeni di degenerazione e necrosi cellulare.

Oscuro rimane comunque il meccanismo in base al quale il virus sarebbe in grado di danneggiare le guaine mieliniche. Infatti l'infezione sistemica degli oligodendrociti non è stata dimostrata con l'impiego di metodi immunocitochimici (Kristensen e Vandevelde, 1977) e raramente è stata osservata al microscopio elettronico (Raine, 1976).

La recente dimostrazione della distruzione segmentale delle guaine mieliniche nelle lesioni acute (Higgins e coll., 1982) depone tuttavia a favore di un'alterazione dell'oligodendroglia.

Un attualissimo studio di Vandevelde e coll. (1983), in cui una serie di encefali interessati da demielinizzazione viene esaminata con tecniche immunoistologiche per la dimostrazione di proteine associate alla mielina, nega che nel cimurro la perdita della proteina basica della mielina (MBP) preceda la scomparsa della glicoproteina associata alla mielina (MAG), evento invece stabilito in malattie conseguenti all'infezione degli oligodendrociti.

Probabilmente il danneggiamento degli astrociti è fondamentale nel processo di distruzione della mielina (Frauchiger e Fankhauser, 1970).

Recenti studi ultrastrutturali hanno dimostrato ipertrofia ed iperplasia dell'astroglia (Higgins e coll., 1982), attività fagocitaria (Raine, 1976) fusione delle membrane cellulari di astrociti infetti (Summers e coll., 1979) «strappo» delle guaine mieliniche mediante l'inserzione di prolungamenti cellulari tra i vari strati concentrici che le compongono (Raine, 1976; Higgins e coll., 1982).

La presenza del tessuto danneggiato dalla invasione e replicazione virale potrebbe inoltre stimolare le cellule locali (astroglia e microglia) a rilasciare enzimi idrolitici.

La produzione di una linfochina — interleuchina 1 — da parte

di astrociti murini coltivati *in vitro* dimostrata recentemente da Fontana e coll. (1982) rende ancora più verosimile l'ipotesi che le cellule gliali infette rilascino fattori in grado di richiamare cellule immunocompetenti nella sede delle lesioni.

Se l'apparizione tardiva di elementi linfocitari sia collegata alla presenza di antigeni virali o ad una reazione di tipo autoimmune diretta contro costituenti normali od alterati del tessuto nervoso, rimane argomento controverso.

La persistenza del virus nel tessuto celebrale è dimostrata (Tsai e coll., 1982), ma la sporadicità e l'inconsistenza dei dati relativi alla presenza di anticorpi neutralizzanti contro il virus del cimurro nel sangue di animali con malattia cronica (Vandevelde e coll., 1982a-b) sembrerebbe escludere la possibilità di un meccanismo di citotossicità umorale.

Per quanto riguarda l'ipotesi di una reazione di tipo autoimmune, è stato dimostrato che antisieri contro tessuto cerebrale, mielina purificata e frazioni della mielina provocano demielinizzazione od inibiscono la mielinizzazione nelle colture di tessuto nervoso (Bornstein e Raine, 1976; Seil, 1977); demielinizzazione è inoltre stata ottenuta «in vitro» mediante siero proveniente da animali affetti da encefalite cimurrosa (Koestner e coll., 1974).

Il ruolo di questi anticorpi nella patogenesi delle lesioni nervose nella fase cronica non è tuttavia chiarito.

La risposta contro la mielina e le sue componenti è infatti, anche se presente, piuttosto debole e soltanto alcuni soggetti sviluppano un titolo anticorpale relativamente elevato (Vandevelde e coll., 1982a-b), specialmente nel liquor.

Il riscontro di anticorpi specifici in questa sede è d'altronde giustificato dalla presenza di numerose cellule recanti Ig sulla superficie nelle lesioni e nelle zone in prossimità del liquor (Vandevelde e coll., 1982a-b).

Il reperto di anticorpi sierici contro la mielina in cani infetti dal virus del cimurro in assenza di lesioni cerebrali (Krakowka e coll., 1973) suggerisce che queste immunoglobuline rappresentino in realtà un epifenomeno. Un supporto a questa teoria viene fornito da un recente esperimento (Cerruti Sola e coll., 1983) in cui linfociti sensibilizzati nei confronti di antigeni cerebrali sono stati ritrovati sia

in animali con alterazioni encefaliche di tipo cronico, sia in soggetti senza lesioni.

D'altronde merita sottolineare che, se la demielinizzazione nella fase cronica dipendesse da una reazione autoimmune sistemica diretta contro componenti della mielina alternati durante la fase precoce di distruzione della sostanza bianca, le lesioni sarebbero probabilmente disseminate, come nella encefalite allergica sperimentale, e non si manifesterebbero come un ulteriore sviluppo delle lesioni acute, nelle stesse aree di predilezione. La responsabilità di una risposta immunitaria locale nella progressione della demielinizzazione trova una convincente testimonianza nel reperto, nell'ambito del tessuto danneggiato, di Ig, parte delle quali appaiono per di più legate a guaine mieliniche in via di disintegrazione (Vandevelde e coll., 1982a-b).

La presenza contemporanea di cellule Ig negative probabilmente linfociti T-e di anticorpi favorisce poi l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo di citotossicità cellulo-mediata dipendente dagli anticorpi, mentre le difficoltà tecniche finora incontrate nella dimostrazione della frazione C_3 del complemento nell'ambito delle lesioni non permettono di escludere l'intervento di meccanismi quali la fissazione del complemento.

Una recente teoria suggerisce inoltre (Krakowka e coll., 1981) che la demielinizzazione autoimmune sia basata su anticorpi linfocitotossici, formatisi in seguito alla fase linfotropica dell'infezione, in grado di reagire con il tessuto cerebrale per via di antigeni comuni. Infine, non si può assolutamente escludere che la progressione della demielinizzazione nello stadio cronico della malattia, piuttosto che rappresentare una lesione immunomediata, possa essere il risultato non specifico di una violenta flogosi diretta contro la persistenza del virus; è dunque possibile che l'attivazione dei macrofagi da parte di immunoglobuline o linfochine possa risultare nella cosiddetta «demielinizzazione *bystander*» (Wisniewski e coll., 1980).

Oltre all'incertezza riguardo alla natura del meccanismo alla base della demielinizzazione, rimane oscuro perché alcuni cani sviluppino una infiammazione progressiva ed altri no.

Differenze nell'evoluzione collegate all'attività dei vari ceppi virali sono chiaramente stabilite, mentre finora non è stata trovata alcuna correlazione tra antigeni di istocompatibilità e decorso della malattia.

È possibile che una differente suscettibilità delle varie sottopopolazioni di linfociti, come suggerito da Appel e coll. (1982), giochi un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione cimurrosa.

BIBLIOGRAFIA

1) APPEL M. J. G. (1969): Pathogenesis of canine distemper, Am. J. Vet. Res., 30 (7): 1167-1182.
2) APPEL M. J. G., SHEK W. R. e SUMMERS A. B. (1982): Lymphocyte mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus, Inf. Immun., 37: 592-600.
3) BORNSTEIN M. B. e RAINE C. S. (1976): The initial structural lesion in serum induced demyelination in vitro. Lab. Invest., 35: 391-401.
4) CERRUTI SOLA S., KRISTENSEN F., VANDEVELDE M., BICHSEL P. e KIHM U. (1983): Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions. J. Neuroimmunol., 4: 77-90.
5) DAL CANTO M. C. e RABINOWITZ S. C. (1982): Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. Ann. Neurol., 11: 109-127.
6) FONTANA A., KRISTENSEN F., DUBS R., GEMSA D. e WEBER E. (1982): Production of prostaglandin E and an interleukin-like factor by cultured astrocytes and C_6 glioma cells. J. Immunol., 129: 2413-2419.
7) FRAUCHIGER E. e FANKHAUSER R. (1970): Demyelinating diseases in animals. In: Vinken P. e Bruyn G. W. (eds), Handbook of clinical neurology, Vol. 9, Amsterdam, North Holland.
8) HIGGINS R. J., KRAKOWKA S., METZLER A. E. e KOESTNER A. (1982): Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. Acta Neuropathol. (Berl), 58: 1-8.
9) Ho C. K. eK BABIUK L. A. (1980): Immune mechanisms against canine distemper. Immunology, 39: 231-237.
10) KOESTNER A., MCCULLOUGH B., KRAKOWKA G. S., LONG J. F. e OLSEN R. F. (1974): Canine distemper, a virus-induced demyelinating encephalomyelitis. In Zeman W. e Lenette E. H. (eds), Slow virus diseases, William and Wilkins, Baltimora.
11) KOESTNER A. (1975): Animal model of human disease. Subacute

sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis. Am. J. Pathol. 78: 361-364.

12) KRAKOWKA S., MC CULLOUGH B., KOESTNER A. e OLSEN R. (1973): Myelin specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. Infect. Immun., 8: 819-827.

13) KRAKOWKA S., COCKERELL G. e KOESTNER A. (1975): Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function in vitro and in vivo. Infect Immun., 11: 1069-1078.

14) KRAKOWKA S., WALLACE A. I. e KOESTNER A. (1981): Shared antigenic determinants between brain and thymus-derived lymphocytes in dogs. Acta Neuropathol. (Berl), 554: 75-81.

15) KRISTENSEN B. e VANDEVELDE M. (1977): Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin embedded tissue. Am. J. Vet. Res., 39 (6): 1017-1021.

16) MC CULLOUGH B., KRAKOWKA S. e KOESTNER A. (1974): Experimental canine distemper virus-induced demyelination. Lab. Invest. 31: 216-222.

17) RAINE C. S. (1976): On the devolpment of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. J. Neurol. Sci. 30: 13-28.

18) SEIL F. J. (1977): Tissue culture studies of demyelinating disease. A critical review. Ann. Neurol., 2: 345-355.

19) SUMMERS B. A., GREISEN H. A. e APPEL M. G. J. (1979): Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. Acta Neuropathol. (Berl) 46: 1-10.

20) TSAI S. C., SUMMERS B. A. e APPEL M. J. G. (1982): Interferon in cerebrospinal fluid. A marker for viral persistence in canine distemper encephalomyelitis. Arch. Virol. 72 (4): 257-265.

21) VANDEVELDE M., FANKHAUSER R., KRISTENSEN F. e KRISTENSEN B. (1981): Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. Acta Neuropathol. (Berl), 54: 31-41.

22) VANDEVELDE M., KRISTENSEN F., KRISTENSEN B., STECK A. J., e KIHM U. (1982 a): Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection. Acta Neuropathol. (Berl) 56: 1-8.

23) VANDEVELDE M., HIGGIRS R. J., KRISTENSEN B., KRISTENSEN F., STECK A. J. e KIHM U. (1982 b): Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathological and immunohistological studies. Acta Neuropathol. (Berl) 56: 285-293.

24) VANDEVELDE M., BICHSEL P., CERRUTI SOLA S., STECK A., KRISTENSEN F. e HIGGINS R. J. (1983): Glial proteins in canine distem-

per virus induced demyelination: a sequential immunocytochemical study. Acta Neropathol. (Berl), 59 (4): 269-276.

25) WISNIEWSKI H., RAINE C. S. e KAY W. J. (1972): Observations on viral demyelinating encephalomyelitis. Canine distemper. Lab. Invest. 26 (5): 589-599.

26) WIESNIEWSKI H., BROSNAN C. F. e BLOOM B. R. (1980): Bystander and antibody-dependent cell-mediated demyelination. In: Davison A. N. e Cuzner M.I. (eds), The suppression of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Academic Press, London, New York, Toronto, Sidney, S. Francisco.