

G. CEI e M. T. PICCIOLI MARINO

BIBLIOTECA
JORGE D. WILLIAMS

COLECCION HERPETOLOGICA
Y BIBLIOTECA
Dr. José Miguel Cej

**Sul valore sistematico dell'assenza
o della scarsa attività del veleno mucoso
nelle Rane rosse**

Estratto dagli Atti della Società Toscana di Scienze Naturali
residente in Pisa — Memorie, Vol. LIV

P I S A
INDUSTRIE GRAFICHE V. LISCHI E FIGLI
1947

Sul valore sistematico dell'assenza
o della scarsa attività del veleno mucoso
nelle Rane rosse

(NOTA PRELIMINARE)

RIASSUNTO . — Il veleno mucoso della *Rana graeca* e della *Rana dalmatina* possiede scarsa attività tossica a paragone del veleno mucoso della *Rana esculenta* e a somiglianza dell'analogo veleno della *Rana temporaria*, dotato soltanto di un debole effetto irritativo locale.

Anche per questo carattere fisiologico le Rane rosse o terrestri possono quindi distinguersi dalle Rane verdi.

Il veleno mucoso della *Rana dalmatina* o della *Rana graeca* parrebbe inoltre dotato di un apprezzabile potere immunizzante nei confronti del veleno mucoso della *R. esculenta*, a differenza del veleno mucoso di *Rana temporaria*, sprovvista di tale azione secondo la PHISALIX. Alla tossicità del muco cutaneo si accompagnano in tutte queste forme analoghi rapporti di tossicità del siero.

È conosciuta fino dai tempi di LAURENTI (1768) la grande diversità intercorrente tra l'azione fisiologica del veleno mucoso della *Rana esculenta* e quella dell'analogo veleno della *Rana temporaria*. LAURENTI stesso dichiara ¹⁾ che le Lucertole, animali di solito molto sensibili ai veleni degli Anfibi, possono tuttavia mordere impunemente, e senza alcun risentimento, la Rana rossa o temporaria e che dei cani che erano stati forzati a bere acqua dove avevano soggiornato a lungo parecchie di tali Rane non avevano per questo accusato affatto, in seguito, alcun visibile e apprezzabile disturbo.

¹⁾ LAURENTIUS., *Specimen medicum, exhibens synopsis Reptilium emendatam cum experimentis circa venena et antidota Reptilium austriacorum*. Viennae, 1768 (p. 136).

La stessa cosa venne affermata più recentemente anche dal DEHAUT ¹⁾ e dalla PHISALIX ²⁾, la quale anzi osservava, a proposito della tossicità generale del muco, talmente diversa in due specie così vicine, quali *R. esculenta* e *R. temporaria*, come un carattere fisiologico di questo genere già sarebbe stato di per sè sufficiente a distinguere tra loro sistematicamente le due forme.

Secondo la PHISALIX il muco della *Rana temporaria* sarebbe dotato esclusivamente di una azione irritativa locale debolissima nè avrebbe dunque azione generale tossica nè vaccinante (cfr. *Proteus anguineus* [Gidon]), a differenza purtuttavia del veleno granuloso, che mantiene anche in quella specie un'attività assai notevole (morte di un coniglio dopo 20'-35' mediante iniezione endovena di una quantità di veleno corrispondente al veleno di 15-35 pelli di Rana per ogni Kg. in peso dell'animale). Invece nella *Rana esculenta* il veleno della secrezione mucosa dorsale, e soprattutto ventrale, è attivissimo, e secondo le ricerche di PAUL BEET e della PHISALIX può condurre a morte nello spazio di 1 ora con la sintomatologia caratteristica (agitazione seguita da stupore, paresi, rallentamento del ritmo respiratorio e cardiaco) una *Rana esculenta* inoculata in peritoneo col prodotto del lavaggio in soluzione fisiologica di soli cinque individui della sua stessa specie. Anche le Cavie, i Rettili, ma specialmente gli Uccelli e i Conigli si dimostrerebbero sensibilissimi al veleno delle Rane verdi; questi ultimi, ad esempio, morrebbero istantaneamente a seguito dell'inoculazione endovena del muco ottenuto dal lavaggio in soluzione fisiologica di una sola *Rana esculenta*.

Data la notevole affinità filetica che lega tra di loro, in un gruppo morfologicamente e fisiologicamente ben distinto, le diverse specie olartiche di Rane rosse o temporarie ³⁾, abbiamo quindi cercato di prendere in esame diverse di tali forme, onde constatarvi l'eventuale valore sistematico del comune carattere fisiologico dell'inattività, o scarsa

¹⁾ DEHAUT E. G., *Les venins des Batraciens et les Batraciens venimeux*. Paris, 1910.

²⁾ PHISALIX M., *Animaux venimeux et venins*. Masson, Paris, 1922.

³⁾ BOLKAY ST. J., *Ueber die Herkunft und verwandtschaftlichen Beziehungen der südeuropaischen Braunfrösche zueinander und zu denubrigen nordlichen Braunfroschen*. Glaznik Zem. Muz. Bosn. Herc., 35, 113-122, 1923.

CEI G., *Analisi biogeografica e ricerche biologiche e sperimentali sul ciclo sessuale annuo delle Rane rosse d'Europa*. Suppl. Monitore Zoologico Italiano, Anno LIV, 1944.

attività, del veleno mucoso, già dimostrata nella tipica *Rana temporaria*, che venne contrapposta infatti da tale punto di vista alla *R. esculenta*, possedente muco ad alto potere tossico. Furono da noi utilizzati numerosi esemplari presi allora nel loro ambiente (mesi di Marzo-Aprile — durante l'epoca degli amori) e appartenenti alla *Rana dalmatina* Bonap. (Pisa, Siena) e alla *R. graeca* Boul. (dintorni di Firenze) oltre che, per controllo, alla stessa *R. esculenta*.

Riassumiamo quindi in breve le esperienze eseguite e le loro conclusioni.

A) ESPERIENZE SU TOPI ALBINI ADULTI (peso medio 25 gr.).

Furono iniettati 3 individui dello stesso peso e della stessa età, rispettivamente con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente il muco di 3 esemplari di rana, tanto della specie *esculenta* che delle specie *dalmatina* e *graeca*. A tali esemplari, prelevati di fresco dal loro ambiente e all'incirca delle stesse dimensioni e peso ¹⁾, venne estratto il muco suddetto in condizioni sperimentali identiche e secondo il metodo di estrazione (per sudorazione) seguito e descritto dalla PHISALIX nel suo trattato sul veleno degli Anfibi (Cfr. PHISALIX, *op. cit.*, pag. 73-74).

I risultati furono i seguenti:

1) Il soggetto che fu iniettato con la soluzione fisiologica contenente la quantità di veleno mucoso emessa da 3 esemplari di *Rana esculenta*, nelle condizioni sperimentali di estrazione suddette, ebbe immediato malessere al momento dell'iniezione, seguito da torpore, respirazione affannosa, conati di vomito e progressiva paresi posteriore. Dopo transitori e brevi intervalli di ripresa i sintomi si aggravarono sensibilmente (soprattutto la paresi, lo stupore e i disturbi cardio-respiratori).

Si ebbe decesso con emolisi, emorragie interne e arresto del cuore in sistole, dopo circa 11 ore.

2) Il soggetto iniettato nelle stesse condizioni sperimentali del precedente e con la stessa quantità di veleno mucoso, corrispondente a quanta ne viene emessa da 3 esemplari di *Rana graeca*, trattati secondo i medesimi procedimenti di estrazione, non sembra dare immediati segni di reazione all'atto dell'iniezione, alternando tuttavia, dopo circa 10'-15', dei periodi di vivacità e attività normale a periodi di malessere e di stupore evidenti. Nelle ore successive

¹⁾ Gli esemplari impiegati si aggiravano per lo più, per il loro peso, su i 10 grammi, con qualche scarto individuale fino a 12-14 e rispettivamente fino a 6-7 grammi. Il loro peso medio comunque, calcolato per ognuna delle tre specie utilizzate sull'intera massa degli individui adoperati nelle esperienze, si può sempre considerare di circa 10 grammi per esemplare; ciò anche agli effetti della quantità di veleno mucoso emessa in media per sudorazione da ciascun individuo.

si assiste ad un aggravarsi dei sintomi, alla comparsa della paresi e si ha il decesso, col quadro caratteristico dell'intossicazione da veleno mucoso, *dopo circa 20 ore*.

3) Il soggetto trattato in condizioni identiche alle precedenti con la medesima quantità di veleno mucoso di *Rana dalmatina* (quantità emessa da 3 esemplari dello stesso peso) non sembra pure reagire all'atto dell'iniezione. Dopo un transitorio periodo di torpore esso sembra ristabilirsi, per lo meno nelle 24 ore successive. Al secondo giorno ricompaiono segni di malessere, progressivamente accentuati, che conducono *dopo 3 giorni e 20 ore* al decesso del soggetto, attraverso una lunga fase agonica, accompagnata dalla solita paresi posteriore e dagli altri sintomi caratteristici.

* * *

Abbiamo voluto confortare queste esperienze esaminando anche la tossicità del siero nelle stesse specie. La PHISALIX afferma infatti (*op. cit.*, pag. 149-154) che le forme aventi muco più velenoso hanno anche siero più tossico. Furono così iniettati con cc. 0,5 di siero, prelevato rispettivamente da esemplari delle 3 diverse specie di *Rana*, della stessa età e in normali condizioni¹⁾, altri 3 topi albi della medesima età e peso. Si ebbero i risultati seguenti:

1) Il soggetto iniettato con siero di *Rana esculenta* accusò forte malessere all'atto dell'iniezione, torpore, respiro affannoso, pelo irto, movimento irregolari e scomposti. Dopo 45' sopravvennero malessere e stupore profondi, conati di vomito e irregolarità cardio-respiratorie; dopo 1h 30' paresi iniziale posteriore e emorragie locali; dopo 2h paresi totale. La morte sopravvenne *dopo 3h30'*.

All'autopsia si osservò congestione, cuore in sistole, emolisi

2) Il soggetto iniettato con siero di *Rana graeca* presentò all'atto dell'iniezione una reazione proporzionalmente assai minore; dopo una prima fase di malessere apparentemente superata sopravvenne in breve e si accentuò la paresi degli arti posteriori accompagnata dalla solita sintomatologia caratteristica. Il decesso sopravvenne *dopo 8h25'*.

3) Il soggetto iniettato con siero di *Rana dalmatina* non sembrò affatto reagire all'atto dell'iniezione. Dopo circa 5' si ebbero tuttavia tremito e altri segni di malessere, da cui parve riprendersi dopo circa 30', alternando per qualche ora pause di torpore e di malessere a periodi di vivacità.

Dopo un'apparente ripresa si ebbe decesso *dopo 2 giorni e 12 ore*.

Riassumendo, appare da questi primi esperimenti che l'azione tossica del veleno mucoso cutaneo si rivela particolarmente intensa nella Rana esculenta, molto meno nella Rana graeca e ancor meno nella Rana dalmatina, e che proporzioni di tossicità analoghe sembrano riscontrarsi nel siero delle 3 forme.

B) ESPERIENZE SUI PASSERACEI: *Serinus serinus* L., *Passer italiae* (Vieill).

1) *Azione tossica del veleno mucoso di Rana esculenta.*

a) Passero adulto del peso di gr. 15, iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente muco di *R. esculenta* equivalente ad 1/6 della quantità emes-

¹⁾ Il siero fu estratto con la solita tecnica di centrifugazione, direttamente dal sangue prelevato mediante tubi di vetro capillari paraffinati dal ventricolo del cuore ancora pulsante degli esemplari sacrificati.

sane in media nella sua acqua di lavaggio da un esemplare adulto di circa gr. 10.

Si ha immediatamente agitazione accentuata, poi stupore profondo.

Il soggetto resta per lunghi tratti immobile, a occhi chiusi, a zampe contratte anche supino. Si hanno disturbi respiratori e tremito. La morte sopravviene 4h30' dopo l'iniezione.

b) *Serinus* adulto del peso di gr. 10,400 iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana esculenta* equivalente a 1/3 della quantità emessane in media nella sua acqua di lavaggio da un esemplare adulto dello stesso peso medio. Si ha all'atto dell'iniezione agitazione estrema, poi grave malessere e torpore. Rapida paresi, gravi disturbi cardio-vascolari con rallentamento del ritmo respiratorio, stato agonico dopo 10', decesso dopo 17'. All'autopsia emolisi e sintomi caratteristici negli organi interni.

c) *Serinus* adulto del peso di gr. 13,850, iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana esculenta* equivalente a 1/3 della quantità emessane in media nella sua acqua di lavaggio da un esemplare adulto dello stesso peso medio. Gli esemplari di *Rana esculenta* impiegati per l'estrazione del veleno mucoso erano stati già utilizzati 48h prima allo stesso scopo e nelle stesse condizioni sperimentali. I sintomi immediati furono minori che nei soggetti precedenti. Si ebbero torpore, disturbi respiratori e tremiti durante le prime ore. Questi in seguito sembrano attenuarsi, tuttavia il soggetto entra nuovamente in crisi e con i sintomi caratteristici, decedendo dopo circa 13h30'.

d) *Serinus* adulto del peso di gr. 12,700 iniettato con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana esculenta* equivalente alla intera quantità emessane in media nell'acqua di lavaggio da un esemplare adulto dello stesso peso medio. Gravi sintomi immediati, stupore e disturbi respiratori con paresi accentuata e tremito. Nelle ore successive all'iniezione si hanno periodi di apparente ripresa, alternati a periodi di completo torpore.

Dopo circa 12h i sintomi sembrano attenuarsi e il soggetto riprende una certa vivacità che si mantiene entro le 24 ore successive all'iniezione.

In seguito i sintomi si ripresentano e si accentuano e si ha decesso in condizioni analoghe al soggetto precedente dopo 32 ore.

e) *Serinus* adulto del peso di gr. 10,920 iniettato con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana esculenta* equivalente alla quantità emessane in media nella loro acqua di lavaggio da 3 esemplari adulti dello stesso peso. Reazione immediata all'atto dell'iniezione con sintomi gravi e torpore. Dopo alterni periodi di stupore e di apparente ripresa, si ha stato agonico e decesso in condizioni caratteristiche dopo 3 giorni e 14 ore. Il veleno usato per queste esperienze era stato tratto da esemplari di *Rana* già utilizzati allo stesso scopo 48h prima.

f) *Serinus* adulto di gr. 10,500 iniettato con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana esculenta* nella stessa dose del soggetto e). Reazione violenta all'atto dell'iniezione, stupore immediato e sintomi accentuati con tremito, paralisi, diarrea e alterazione del ritmo respiratorio. Lungo periodo agonico e decesso dopo 6 ore.

g) *Serinus* adulto di gr. 10 iniettato con la stessa dose di veleno mucoso del soggetto precedente. Viva agitazione all'atto dell'iniezione; dopo 2'-3' malessere e stupore profondi con paralisi e tremito. Seguono disturbi respiratori e diarrea. Si hanno intervalli di apparente ripresa, quindi ricaduta definitiva in stupore e decesso, con periodo agonico lunghissimo, dopo circa 40 ore.

Concludendo, l'azione tossica del veleno mucoso di *Rana esculenta*, si manifesta nei passeracei, con conseguenze letali, già con dosi equivalenti all'incirca a 1/6 del veleno mucoso emesso nella propria acqua di lavaggio da un esemplare del peso medio di gr. 10. Le dosi equivalenti sia a circa 1/3 del veleno mucoso emesso da un esemplare dello stesso peso medio, sia alla intera quantità emessa in identiche condizioni da un esemplare analogo, sia alla quantità ottenibile da tre esemplari dello stesso peso medio e in identiche condizioni, risultano sempre letali al *Serinus*, sia pure attraverso differenze di reazione apprezzabili (decessi dopo 17' e fino a dopo 40h. Fino a dopo 3 giorni con veleno ottenuto da *Rane esculente riutilizzate*).

2) *Azione tossica del veleno mucoso di Rana graeca.*

a) *Serinus* del peso di gr. 12,600 iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana graeca* equivalente a 1/3 della quantità di veleno mucoso emessa nella propria acqua di lavaggio da un esemplare adulto del peso medio di gr. 10. Nessuna reazione apparente, neppure transitoria. L'animale si mantiene in ottime condizioni dopo oltre due mesi dall'esperienza.

b) *Serinus* del peso di gr. 13,570 iniettato con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana graeca* equivalente alla quantità emessane in media nella loro acqua di lavaggio da 3 esemplari adulti dello stesso peso medio. Lieve reazione momentanea all'atto dell'iniezione, breve periodo di torpore, sopravvivenza in condizioni di piena normalità.

3) *Azione tossica del veleno mucoso di Rana dalmatina.*

a) *Serinus* del peso di gr. 13 iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente muco di *Rana dalmatina* equivalente a 1/3 della quantità emessane in media nella sua acqua di lavaggio da un esemplare adulto del solito peso medio. Non si ha nessuna reazione apparente, neppure transitoria. L'animale è in ottime condizioni dopo oltre due mesi dall'esperienza.

b) *Serinus* del peso di gr. 11,850 iniettato con la stessa dose di veleno mucoso del soggetto precedente. Comportamento identico.

c) *Serinus* del peso di gr. 12,970 iniettato con cc. 0,35 di soluzione fisiologica contenente veleno mucoso equivalente alla quantità emessane in media nell'acqua di lavaggio da un esemplare adulto dello stesso peso medio. Malore intenso al momento dell'iniezione, penne irte, conati di vomito e rigurgito, disturbi respiratori e prolungato torpore. I sintomi tendono a diminuire dopo circa 20 ore e nei giorni successivi il soggetto si ristabilisce e sopravvive.

d) *Serinus* del peso di gr. 12,530 iniettato con la stessa dose di veleno mucoso del soggetto precedente. Reazione e sintomi presso a poco identici. Anche in questo caso si ha sopravvivenza.

e) *Serinus* del peso di gr. 12,300 iniettato con cc. 1,05 di soluzione fisiologica contenente muco equivalente alla quantità emessane in media nell'acqua di lavaggio da 3 esemplari adulti dello stesso peso.

Agitazione vivace al momento dell'iniezione, poi malessere e profondo stupore, tremiti intensi, respirazione affannosa, penne irte e ali aperte. Dopo qualche tempo il malessere si accentua e sopravviene il decesso dopo circa 14h.

f) *Serinus* del peso di gr. 10,500 trattato con la stessa quantità di veleno del soggetto precedente. Al momento dell'iniezione si ha agitazione, poi torpore accentuato e immobilità, rigurgito, dopo circa 20h il soggetto sembra riprendersi pur ricadendo a intervalli in prolungate crisi di stupore.

Dopo alcuni giorni il soggetto appare normalmente ristabilito e sopravvive, trovandosi in ottime condizioni dopo 12 giorni, allorchè venne sacrificato per altre ricerche.

Concludendo, l'azione tossica del veleno mucoso di Rana graeca e di Rana dalmatina è anche nei passeracei molto meno accentuata di quella del veleno delle Rane verdi. Nel Serinus iniettato con dosi corrispondenti ad 1/3 del veleno mucoso emesso in media, nella propria acqua di lavaggio, da un esemplare di queste Rane del peso medio di gr. 10, la reazione è quasi inavvertibile. Con dosi equivalenti al veleno mucoso emesso da un esemplare dello stesso peso medio si ha reazione avvertibile, talora grave, ma senza esito letale. Con dosi equivalenti al veleno emesso nelle stesse condizioni da 3 esemplari dello stesso peso si può avere in certi soggetti il decesso dopo diverse ore, in altri più resistenti sintomi gravissimi ma sopravvivenza.

4) Osservazioni preliminari sul potere immunizzante del veleno mucoso delle Rane rosse.

A seguito della distinzione fatta negli Anfiibi dalla PHISALIX (op. cit., pag. 88-91) tra « sécrétions muqueuses venimeuses et vaccinantés » (*Siredon, Salamandra, Discoglossus, Rana esculenta*, ecc.), « sécrétions muqueuses non venimeuses mais vaccinantés » (nettamente: *Siren lacertina*; scarsamente: *Pellobates cultripés*) e « sécrétions muqueuses ni venimeuses ni vaccinantés » (*Proteus anguinus, Rana temporaria*), era senza dubbio opportuna, sempre dal punto di vista sistematico, una prima indagine prospettiva sull'eventuale azione immunitaria del veleno mucoso della *Rana dalmatina* e della *Rana graeca*. Proprio la *Rana temporaria* infatti, la loro più vicina congenere per tanti caratteri fisiologici e strutturali, si dimostrerebbe sprovvista di tale potere vaccicante rispetto al proprio veleno e al veleno di altre specie, provocando soltanto una molto modesta reazione immunitaria (2 mesi), in determinate condizioni, rispetto al virus rabico (direttamente inoculato nel cervello del Coniglio a distanza di tre giorni dalla iniezione del veleno mucoso).

Abbiamo così provato a saggiare l'eventuale reazione immunitaria dei *Serinus*, trattati in precedenza con veleno mucoso di *Rana dalmatina* e di *Rana graeca*, nei confronti di dosi di veleno mucoso di *Rana esculenta* abitualmente mortali nei soggetti di controllo.

Abbiamo finora ottenuto i risultati seguenti:

I) INDIVIDUI INIETTATI CON UNA QUANTITÀ DI VELENO MUCOSO DI *Rana dalmatina* EQUIVALENTE A 1/3 DELLA QUANTITÀ EMESSANE NELLA PROPRIA ACQUA DI LAVAGGIO DA UN ESEMPLARE DI QUESTA SPECIE (PESO MEDIO gr. 10).

Soggetto a) Iniettato dopo 8 giorni con soluzione fisiologica contenente veleno mucoso pari a 1/3 della quantità emessane nella propria acqua di lavaggio da una *Rana esculenta* del solito peso medio.

Si ebbero gravissimi sintomi all'atto dell'iniezione: stupore e malessere accertati, tremore e accenno a paresi; dopo alcune ore si notò un graduale miglioramento, deciso dopo circa 12h e quasi completo dopo 24h.

Quindi sopravvivenza in condizioni normali.

Soggetto b) Iniettato dopo 10 giorni con la stessa quantità di veleno mucoso di *Rana esculenta*. Si ebbe reazione fortissima e immediata, poi prolungato stupore con sintomi caratteristici, quindi lenta ripresa e sopravvivenza.

II) INDIVIDUI TRATTATI CON DOSI IMMUNIZZANTI DI VELENO MUCOSO DI *Rana dalmatina* EQUIVALENTI ALL'INTERA QUANTITÀ EMESSANE IN MEDIA DA UN ESEMPLARE DEL SOLITO PESO NELLA PROPRIA ACQUA DI LAVAGGIO.

Soggetto c) Iniettato dopo 10 giorni con soluzione fisiologica contenente veleno mucoso di *Rana esculenta* pari alla intera quantità ceduta in media nella propria acqua di lavaggio da un individuo del solito peso considerato. Si ebbe reazione apprezzabile per quanto relativamente modesta. Torpore e malessere di non lunga durata, accompagnati da tremiti e disturbi respiratori. Quindi lenta ripresa e successiva sopravvivenza.

Soggetto d) Iniettato dopo 10 giorni con una dose di veleno mucoso di *Rana esculenta* equivalente alla quantità emessane in media nella propria acqua di lavaggio da 3 esemplari dello stesso peso medio.

Si ebbero sintomi immediati e gravissimi, con tremiti, stupore profondo e rapida paresi posteriore, seguita da collasso e da decesso dopo circa 30'.

III) INDIVIDUI TRATTATI CON DOSI IMMUNIZZANTI DI VELENO MUCOSO DI *Rana graeca* EQUIVALENTE A 1/3 DELLA QUANTITÀ EMESSANE NELLA PROPRIA ACQUA DI LAVAGGIO DA UN ESEMPLARE DI QUESTA SPECIE (PESO MEDIO gr. 10).

Soggetto e) Iniettato dopo 8 giorni con soluzione fisiologica contenente veleno mucoso di *Rana dalmatina* pari alla quantità emessane nella propria acqua di lavaggio da 3 esemplari del solito peso medio considerato. Si ebbero immediatamente affanno e stupore prolungato, seguiti da tremito e da malessere. Dopo circa 6h-8h i sintomi diminuiscono, attenuandosi completamente dopo 24h, con successiva sopravvivenza.

Soggetto f) Iniettato dopo 10 giorni con soluzione fisiologica contenente veleno mucoso di *Rana esculenta* pari alla intera quantità cedutane in media nella propria acqua di lavaggio da un esemplare del peso medio considerato. Reazione in questo caso fortissima, con la solita sintomatologia caratteristica e accentuata. Allo stupore prolungato seguì una apparente ripresa, poi vi fu un nuovo collasso e sopravvenne il decesso dopo 45h.

Riassumendo queste esperienze preliminari, possiamo dunque rilevare come sembri esistere per il veleno mucoso della *Rana graeca* e della *Rana dalmatina*, entro certi limiti quantitativi che per il momento non ci è dato definire, un potere immunizzante apprezzabile nei confronti del veleno mucoso di altre specie, e in particolare della *Rana esculenta*. Questo potere immunizzante o « vaccinante », secondo il termine usato dalla PHISALIX, parrebbe consentire ai Passeracei del genere *Serinus* di tollerare, sia pure con grave malessere, delle dosi mortali di veleno mucoso di *Rana esculenta*, se trattati in precedenza con le stesse quantità di veleno mucoso di *Rana dalmatina*. Se trattati in precedenza con quantità di veleno mucoso di *Rana dalmatina* o *graeca* sensibilmente inferiori, la reazione immunitaria o vaccinante non parrebbe invece sufficiente a consentire la sopravvivenza dei soggetti.

C) ESPERIENZE SULLE CAVIE ADULTE (peso medio 450 gr.).

La cavia adulta è notoriamente poco sensibile al veleno mucoso della Rana. Abbiamo potuto constatare come, iniettandole in peritoneo una quantità di veleno mucoso di *Rana dalmatina* o di *Rana graeca* equivalente a circa 1/3 del veleno mucoso emesso nella propria acqua di lavaggio da un solo esemplare delle suddette specie non si ottenga alcun sintomo di malessere. Anche iniettando delle dosi di veleno mucoso dodici volte più forti della dose approssima-

tiva precedente non si riescono ad ottenere che modesti sintomi di torpore e di malessere neppure accompagnati da ipotermia. Iniettando invece in peritoneo a cavie dello stesso peso delle dosi di veleno mucoso equivalenti all'incirca alla quantità ceduta da un esemplare, e rispettivamente da 2 esemplari, di *Rana esculenta* (peso medio considerato) nella propria acqua di lavaggio, si poterono riscontrare sintomi molto più netti e accentuati, con agitazione furiosa all'atto dell'iniezione, successivo stupore e disturbi affannosi respiratori, ipotermia, diarrea, e modesta paresi degli arti posteriori. Con alternative di tremiti spastici e con brevi ricadute in stupore i disturbi diminuiscono dopo alcune ore e i soggetti tornano quindi a ristabilirsi.

I sintomi sono all'incirca gli stessi (ipotermia compresa), soltanto molto più lievi, iniettando in peritoneo circa 1/3 della quantità di veleno mucoso ottenibile per sudorazione da una *Rana esculenta*.

* * *

Un controllo comparativo empirico di alcuni dei sintomi suddetti (ipotermia ad es.) si può inoltre ottenere ripetendo le antiche osservazioni di PAUL BERT sugli effetti dell'ingestione di acqua dove abbiano soggiornato forzatamente a lungo delle Rane delle diverse specie.

Così, dopo ingestione forzata di 45 cc. di acqua di fonte filtrata, prelevata da 200 cc. di questo liquido dove avevano soggiornato per 48h due Rane esculente, la cavie accusano disturbi caratteristici (torpore, diarrea, tremiti e transitoria paresi) accompagnati da decisa ipotermia (fino a 36,7°C, dopo 3 ore dalla ingestione forzata, contro i 39°-39°,2C normali in questi Roditori omeotermi: cfr. GLEY E., *Traité élémentaire de Physiologie*. Paris, Baillière, 1918, pag. 795, sec. Ch. Richet).

Altre Cavie, invece, trattate in condizioni identiche, ma con ingestione forzata della stessa quantità di acqua dove avevano soggiornato per lo stesso tempo rispettivamente esemplari di *Rana graeca* e di *Rana dalmatina* non accusarono alcun disturbo apprezzabile nè rivelarono alcun fatto di ipotermia ai ripetuti controlli termometrici rettali.

CONSIDERAZIONI GENERALI E CONCLUSIONI

Le deduzioni consentite da queste nostre prime ricerche derivano direttamente dall'esposizione delle esperienze.

A parità di condizione di estrazione di veleno, utilizzando esemplari di rana presso a poco dello stesso peso (circa gr. 10) e trattati secondo le indicazioni tecniche riportate dalla PHISALIX, si ebbero infatti nei topi e nei passeracei dei fenomeni tossici gravissimi e costantemente seguiti da decesso dopo un periodo più o meno lungo, impiegando veleno mucoso di *Rana esculenta*, sia pure in dosi relativamente deboli, mentre il quadro sintomatologico tipico apparve sempre assai meno grave e il numero dei de-

cessi limitatissimo nei soggetti delle stesse specie iniettati anche con dosi proporzionalmente più forti di veleno mucoso di *Rana graeca* e di *Rana dalmatina*.

Ad esempio, nel topo si ebbe decesso dopo circa 11 ore impiegando veleno mucoso di *Rana esculenta*, dopo un tempo quasi doppio con la stessa quantità di veleno mucoso di *Rana graeca* e dopo circa 3 giorni e 20 ore con la stessa quantità di veleno mucoso di *Rana dalmatina*. Nel *Serinus* e nel Passero la mortalità fu completa (talora dopo soli 17²), su 7 soggetti sperimentati, trattati con quantità di veleno mucoso di *Rana esculenta* variabili tra circa 1/6 del veleno mucoso emesso da un esemplare nella propria acqua di lavaggio e l'intera quantità emesane nelle stesse condizioni di «sudorazione» da 3 esemplari del medesimo peso medio. In 8 esemplari di *Serinus*, invece, trattati in identiche condizioni sperimentali con quantità di veleno mucoso di *Rana graeca* e di *Rana dalmatina* oscillanti tra circa 1/3 del veleno mucoso emesso da un esemplare delle suddette specie nella propria acqua di lavaggio e l'intera quantità ottenibile da 3 esemplari dello stesso peso medio, i fenomeni tossici furono molto più lievi, specialmente con le dosi meno elevate. Vi si poté constatare inoltre un solo caso di decesso e dopo 14h (con una dose elevata di veleno mucoso di *Rana dalmatina*). Nelle Cavie adulte, notoriamente molto resistenti all'azione del veleno mucoso degli Anfibi, fu ottenuta col veleno di *Rana esculenta* una sensibile reazione generale accompagnata da sintomi caratteristici (paresi transitoria, diarrea, ipotermia). Nessuna reazione apprezzabile si constatò al contrario col veleno mucoso di *Rana graeca* e di *Rana dalmatina*, inoculato quest'ultimo fino in quantità doppia della massima dose inoculata del veleno mucoso di *Rana esculenta*.

Gli effetti del veleno mucoso furono d'altra parte controllati sui topi albini mediante inoculazione di una eguale quantità di siero delle tre specie di rana da noi studiate. Senza dubbio anche nel presente caso sembra esistere stretta correlazione tra tossicità del siero e tossicità del veleno cutaneo. 0,5 cc. di siero di *Rana esculenta* uccidono così un topo albino dopo 3h30' dal momento dell'inoculazione, mentre occorrono 8h25' con la medesima quantità di siero di *Rana graeca* e 2 giorni e 12 ore con la medesima quantità di siero di *Rana dalmatina*. È altresì evidente la sintomatica corrispondenza tra questi dati e quelli che abbiamo riferito poco prima circa gli effetti tossici del veleno mucoso cu-

taneo. Aggiungiamo infine di aver sempre constatato nei soggetti da noi sacrificati una notevole uniformità e costanza della sintomatologia caratteristica che accompagna l'azione paralizzante e il decesso.

Altro problema affrontato nelle nostre esperienze, sebbene ancora in via preliminare, è quello del potere immunitario del veleno mucoso delle rane rosse nei confronti dello stesso veleno di altre specie.

Secondo la PHISALIX la *Rana temporaria* avrebbe muco debolmente velenoso e con potere vaccicante scarsissimo, anzi nullo rispetto al veleno mucoso della *Rana esculenta*. Niente possiamo dire per adesso su quella specie non avendola avuta a nostra disposizione per le presenti ricerche.

Siamo invece in grado di affermare, circa i veleni mucosi della *Rana dalmatina* e della *Rana graeca*, che una certa attività immunizzante verso dosi all'incirca equivalenti di veleno mucoso di *Rana esculenta* sembra esistere ed è comprovata dalla completa sopravvivenza, dopo aver tollerato gravissimi e tipici disturbi tossici, di tutti e tre gli esemplari di *Serrinus* trattati in precedenza con veleno mucoso di *Rana dalmatina* e quindi inoculati (dopo 10 giorni) con la stessa quantità di veleno mucoso di *Rana esculenta*, sempre mortale nei controlli. Si ebbe invece costante mortalità nei soggetti trattati in precedenza con veleno mucoso di *Rana dalmatina* o *Rana graeca* e inoculati in seguito (dopo 10 giorni) con dosi rispettivamente molto più elevate di veleno mucoso di *Rana esculenta*. Questo comportamento caratteristico della reazione immunitaria sembrerebbe dunque indicarci come questa avvenga attraverso un determinato meccanismo di equilibrio (antigeni-anticorpi) di cui evidentemente non siamo in grado di formulare alcuna espressione quantitativa, allo stato tuttora preliminare delle nostre indagini.

Teniamo comunque a porre in evidenza, perchè tale era l'obbiettivo delle nostre osservazioni da un punto di vista più precisamente zoologico, come anche la stessa reazione immunitaria legata alla presenza di antigeni e di conseguenza il potere « vaccicante » interspecifico — secondo la definizione della PHISALIX — siano relativamente più intensi nella *Rana dalmatina* e nella *Rana graeca* che non nella *Rana temporaria*, quasi sprovvista delle suddette caratteristiche fisiologiche, secondo dati sperimentali addotti dalla PHISALIX stessa (*op. cit.*, pag. 88-91). Costatazione analoga consegue altresì dallo studio comparativo degli effetti del veleno mucoso nelle tre specie. La *Rana*

graeca e ancor di più la *Rana dalmatina* sembrano possedere muco cutaneo di gran lunga meno velenoso di quello delle rane verdi, ma evidentemente più ricco di sostanze tossiche del muco emesso dalla *Rana temporaria*, dotato semplicemente d'una modesta azione irritativa locale (GIDON, 1897, ¹). Risultati poco dissimili appare inoltre rivelarci l'esame comparativo della tossicità generale del siero. Dovremmo quindi ritenere interamente distinguibili dalle rane verdi per il carattere sistematico della velenosità elevata o scarsa del muco cutaneo, non soltanto la *Rana temporaria* ma anche le congeneri *Rana dalmatina* e *Rana graeca*. Queste parrebbero d'altronde possedere nella loro secrezione mucosa delle sostanze tossiche proporzionatamente più attive di quelle della secrezione della temporaria e inoltre con proprietà «vaccinanti» contro i veleni mucosi delle quali si ritengono ordinariamente sprovviste le Rane temporarie, il cui muco sembra soltanto esplicare una certa azione immunizzante contro il virus rabico. Sotto questo aspetto perciò la *Rana graeca* e la *Rana dalmatina* parrebbero occupare una posizione di relativa «intermedietà» fisiologica tra le rane verdi, a alto potere tossico e vaccinante, e la specializzata *Rana temporaria*, il che in realtà concorderebbe con quanto si conosce dalla morfologia e dalla fisiologia comparata circa i rapporti sistematici e filogenetici intercorrenti tra queste specie (cfr. CEI, *op. cit.*, 1944).

Vogliamo bensì aggiungere alcune parole di autocritica a questa nostra nota preliminare. Niente di nuovo essa apporta infatti sulla natura e sulla specificità biochimica della componente tossica della secrezione mucosa, ben distinta dalla mucina e di natura proteica, sulla quale ben poco o nulla si sapeva al momento della messa a punto della PHISALIX (1922) e sulla quale d'altronde non ci constano essere da allora apparse ulteriori ricerche. Nè ci fu fino a qui possibile di eseguire una titolazione sufficientemente precisa della quantità di veleno estratta per sudorazione agli esemplari di rana utilizzati e quindi delle dosi iniettate, volta a volta, nei vari soggetti in esperimento ²). Ci siamo così dovuti

¹) GIDON F., *Venins multiples et toxicité humorale chez les Batraciens indigènes*. Thèse Méd., Paris, 1897.

²) Fu per ora soltanto eseguita con bilancia di precisione la misura del residuo totale secco ottenibile in essicatore a CaCl₂ dalla soluzione del veleno

contentare di ripetere in condizioni identiche la solita tecnica di estrazione del veleno mucoso e il suo dosaggio empirico secondo il metodo sperimentale fisiologico seguito e riferito dalla PHISALIX. Ci è mancata quindi di conseguenza la possibilità di uno studio più preciso del meccanismo dell'immunità interspecifica.

Se abbiamo dovuto limitarci a tale stadio di indagini approssimative sullo schema e ad analogia delle ricerche della PHISALIX, senza poter discendere ad ulteriori e più moderni dettagli, ciò si deve, oltre che ai mezzi di ricerca consentitici dal nostro Laboratorio, anche alla grande difficoltà di procurarsi materiale in natura, considerata la relativa rarità e scarsità delle catture di esemplari delle specie suddette.

I risultati di questa prima ridotta serie di indagini ci sembrano tuttavia tali da giustificarne una ulteriore estensione; cosa che contiamo di fare in un prossimo futuro ove possiamo disporre dei necessari mezzi di analisi e sperimentali nè ci venga meno il rifornimento di materiale dalle nostre campagne.

Istituto di Zoologia dell'Università di Firenze

mucoso emesso da ciascun esemplare nella propria acqua di lavaggio (sol. fis.). Vi sono scarti individuali relativamente poco rilevanti, anche con esemplari di statura diversa. Il residuo totale secco così ottenuto ascende in media per ciascun esemplare a circa gr. 0,022; escluso il contenuto in sali residui della sol. fis., detto valore medio in peso del residuo totale secco s'abbassa a gr. 0,0057.