

Immunologia

L'immunologia permette di valutare la situazione immunitaria di un individuo.

Storia dell'immunologia

I concetti dell'immunologia furono intuiti intorno al 1800.

- Il primo esempio fu quello di Jenner: si rese conto che mungitori delle vacche presentavano sulle mani lesioni riconducibili al virus del vaiolo e non contraevano il vaiolo umano. Egli intuì che fosse possibile impiegare il materiale purulento contenuto nelle pustole del vaiolo vaccino (da qui il termine) per proteggere l'uomo da quello umano.
- Prime vaccinazioni contro il vaiolo: il virus del vaiolo vaccino veniva scarificato sul braccio dell'uomo (adesso il vaiolo è eradicato)
- Pasteur: si rese conto che i polli erano affetti da una patologia particolare, chiamata colera aviaria. Questi polli avevano in comune particolari microrganismi, che se inattivati e somministrati su polli sani, questi non contraevano il colera. L'agente eziologico, se coltivato in laboratorio anziché nell'ospite naturale, perdeva parte della sua virulenza. Questo processo di riduzione è detto "attenuazione".
- Pasteur: primo vaccino contro la rabbia
- Pasteur: primo vaccino per il carbonchio ematico (causato da *Bacillus anthracis*)

Nel corso degli esperimenti sulla tossina difterica, Emil Von Behring e Shibasaburo Kitasato dimostrarono che il sangue degli animali immunizzati contiene una sostanza definita antitossina, capace di neutralizzare l'azione patogena della tossina stessa e che il loro siero di sangue, trasferito ad altri animali, conferisce immunità verso la difterite. Si parla di sieroterapia, possibile inoculando siero di un soggetto immune per combattere e curare l'infezione già in atto, mentre le vaccinazioni introdotte da Pasteur, rappresentano un mezzo profilattico, ovvero diretto a prevenire l'insorgenza del processo infettivo. La scoperta di Von Behring segna un notevole progresso nella lotta contro le malattie infettive, permettendo anche la distinzione tra immunità attiva e passiva. Le sostanze presenti nel siero, ed in grado di inattivare/uccidere le tossine ed i batteri, vennero indicate con il termine "anticorpi". Le sostanze capaci di stimolare la comparsa di anticorpi vennero denominati antigeni. La sieroterapia, utilizzata fino agli anni 90 prevedeva la somministrazione di siero di persone (animali) guarite da una certa patologia infettiva a pazienti infetti. Il limite di questa applicazione era che alla seconda somministrazione di siero proveniente dalla stessa specie (Es. 2 somministrazioni di siero di cavallo sull'uomo) il paziente andava incontro a morte per shock anafilattico via della sensibilizzazione e la successiva reazione immunitaria con liberazioni di grandi quantità di istamina.

Tutti gli organismi sono dotati di difese innate rappresentate da barriere anatomiche e difese fisicochimiche (NB proteggono solo da microrganismi extracellulari):

- **Via nasale:** presenza di peli che si oppongono alla colonizzazione; presenza di mucina che serve ad inglobare i microrganismi e neutralizzarli. L'immunità mucosale si ha solo se si è già entrati in contatto con il microrganismo.
- **Via orale:** presenza di lisozima e ptialina nella saliva che si oppongono alla moltiplicazione; inoltre nello stomaco il microrganismo trova pH molto acido (3) sfavorevole alla moltiplicazione di alcuni di loro. Alcuni microrganismi come *Helicobacter pylori* resiste a pH acido perché è in grado di scindere l'urea (presente nel muco, contenente mucina, presente nello stomaco) e liberare NH₃, che in soluzione acquosa da una base (NH₄H idrato ammonico), innalzando il pH; succhi pancreatici e bile sono altri elementi sfavorevoli alla moltiplicazione batterica.
- Anche la **peristalsi** è un movimento che si oppone anch'esso alla moltiplicazione dei microrganismi.
- **Via oculare:** il secreto lacrimale contenente lisozima che protegge l'occhio
- **Via cutanea:** il sebo protegge l'individuo dalla colonizzazione della cute
- Presenza di varie flore microbiche negli organismi, che impediscono la colonizzazione da parte di altri microrganismi

Se l'aggressore riesce a superare queste barriere fisico-chimiche, l'organismo mette in atto dei meccanismi molto rapidi come prima linea di difesa contro gli invasori. Il più importante di questi sistemi innati è l'infiammazione (o flogosi), che concentra diverse cellule e molecole ad attività difensiva nei siti di invasione microbica, richiamando globuli bianchi dalla circolazione sanguigna, così che questi possano attaccare e distruggere i diversi aggressori.

Le cellule che per prime riconoscono e rispondono ai microrganismi invasori sono i macrofagi, cellule dendritiche e mastociti. Queste cellule sono disseminate nell'organismo ma si ritrovano soprattutto a livello delle superfici (cute e mucose) dove è più probabile incontrare gli aggressori. Tuttavia, il processo infiammatorio tipico dell'immunità innata non è infallibile e quindi l'organismo ha elaborato degli ulteriori meccanismi di difesa di secondo intervento, adattativi e altamente specifici, rivolti verso lo specifico agente estraneo che è riuscito a superare le prime difese non specifiche.

Per stimolare questa seconda linea di difesa, il materiale estraneo deve essere catturato, processato e presentato in modo corretto a cellule che lo possano riconoscere e, di conseguenza, dare il via ai processi che porteranno alla sua distruzione.

Una volta eliminato l'aggressore, l'organismo si può dedicare allo sviluppo di un'immunità adattativa che servirà in caso di seconda attacco da parte dello stesso aggressore. La peculiarità dei meccanismi di difesa di secondo intervento, che vengono innescati dai primi e che collaborano con questi, è quella di essere altamente specifici: sono cioè rivolti verso una sola entità estranea.

Gli organismi hanno tanti meccanismi di difesa:

- **Immunità umorale** è la risposta difensiva si esplica tramite la sintesi, da parte dei linfociti B, di molecole (anticorpi o immunoglobuline), presenti in forma libera nel torrente circolatorio e nelle varie secrezioni, e che proteggono da microrganismi extracellulari
- **Immunità cellulo-mediata**, che protegge dai microrganismi che sono penetrati dentro le cellule (intracellulari) e che non sono stati bloccati dalle difese o dall'immunità umorale. Questa risposta difensiva si realizza attraverso l'attivazione e l'amplificazione clonale di cellule citotossiche (sottopopolazione di linfociti T), che distruggono l'agente estraneo o la cellula infetta, direttamente o indirettamente (protegge dai microrganismi intracellulari)
- **Immunità innata**: svolta dalle cellule natural killer, che servono come prima linea di difesa contro virus, batteri e parassiti. Hanno caratteristiche simili sia ai linfociti Thelper che Tcitotossici: come i primi producono e secernono citochine, come i secondi distruggono le cellule bersaglio con un meccanismo d'azione peculiare. Come tutti i linfociti, anche le cellule NK sono dotate di una memoria immunologica e sono in grado di montare una risposta secondaria efficace verso diversi antigeni una volta che li incontrano di nuovo.

Nella maggior parte delle malattie infettive l'immunità umorale e quella cellulo-mediata rappresentano un unico insieme integrato e interagiscono di continuo fra loro, formando veri e propri circuiti che controllano e modulano l'attività del sistema immunitario nel suo complesso.

L'immunità può essere:

- trasmessa attraverso la placenta dalla madre, solo in alcune specie (non duratura, protegge nei primi mesi di vita)
- trasmessa con il colostro (importante soprattutto per i ruminanti, che non la ricevono con la placenta). Negli allevamenti è fondamentale somministrare il colostro a tutti gli animali (ci sono anche banche del colostro). La placenta del cane invece fa passare circa il 20% degli anticorpi dalla madre al feto. Per fare le vaccinazioni bisogna aspettare che si sia esaurita questa immunità passiva, che dura qualche mese.
- Acquisita tramite vaccinazione o in seguito all'infezione
- Naturale: es. il cavallo non si infetta con il colera. Ha anticorpi naturali contro il colera. Allo stesso modo, tante malattie infettive degli animali non si ritrovano nell'uomo.

Selezione per il self e per il non self:

1. **self**= tutto ciò che fa parte dell'individuo, fisiologicamente non viene attaccato dal sistema immunitario (tranne per patologie autoimmuni)
2. **non self**= l'individuo è programmato per reagire verso ciò che non è self

Al momento in cui la sostanza estranea entra nell'organismo, per stimolare il sistema immunitario, deve avere caratteristiche particolari:

- deve essere una sostanza estranea all'individuo,
- deve avere un elevato peso molecolare,
- deve presentare una struttura complessa (con legami complessi).

Le sostanze che non sono self vengono dette immunogene (scatenano la risposta immunitaria).

La reazione immunitaria da parte dell'individuo alla sostanza estranea inoculata prevede che vengano sintetizzati degli elementi che vanno ad aggredire la sostanza.

Differenza tra antigene e immunogeno

Un antigene può essere definito semplicemente come una sostanza in grado di legarsi al recettore di un linfocita B o T, mentre un immunogeno è una sostanza in grado di indurre una risposta immunitaria. Una molecola è, in genere, contemporaneamente un antigene ed un immunogeno.

- › La maggior parte degli antigeni è estranea **all'organismo** e vi può penetrare per una qualsiasi via. Questi antigeni vengono definiti **eteroantigeni** ed includono agenti infettivi e parassitari, sostanze ambientali e sostanze chimiche.
- › Esiste poi un'altra classe di antigeni, presenti su cellule e tessuti: questi includono gli **alloantigeni** presenti su cellule o tessuti di un individuo innestati in un altro individuo della stessa specie (es. trapianto).
- › **Xenoantigeni**, presenti su cellule o tessuti di un individuo innestati in un altro individuo di un'altra specie animale (es. trapianto di una valvola cardiaca suina nell'uomo).
- › **Autoantigeni (o antigeni self)**, presenti su cellule o tessuti di un individuo che in determinate circostanze vengono anormalmente riconosciuti dal proprio sistema immunitario e danno vita a patologie autoimmuni

La sorveglianza operata dal SI a livello biomolecolare si basa proprio sulla ricerca e sull'individuazione di ciò che è estraneo all'organismo (non self), discriminando da ciò che invece fa parte dell'organismo stesso (self): questa capacità è alla base di ogni reazione immunologica. Ci sono anche altre molecole, dette **apteni**, che sono esclusivamente antigeniche: sono infatti troppo piccole per stimolare una risposta immunitaria ed hanno bisogno di legarsi ad una proteina carrier per stimolare la risposta umorale o cellulo-mediata.

Più un antigene è chimicamente complesso e di grandi dimensioni e più sarà immunogeno. Per esempio, i **lipopolisaccaridi** batterici sono ottimi immunogeni, a differenza dei **polisaccaridi semplici** (es. amido) che non lo sono in quanto vengono degradati prima che il SI riesca a riconoscerli. I **lipidi**, invece, hanno uno scarso potere immunogeno a causa della loro ampia distribuzione, relativa semplicità, instabilità strutturale e rapido metabolismo. Gli **acidi nucleici** dei mammiferi hanno uno scarsissimo potere antigenico data la loro relativa semplicità e flessibilità e dato che vengono degradati molto rapidamente. Abbiamo poi le **proteine**, gli antigeni più potenti soprattutto per le dimensioni ed il SI acquisito per catturare, processare e riconoscere le pt estranee.

Molti apteni hanno una notevole importanza clinica: per esempio l'antibiotico *penicillina* è una piccola molecola non immunogena che, una volta degradata dall'organismo, forma un gruppo molto reattivo che si lega alle proteine sieriche, quali albumina, a formare un complesso che viene riconosciuto come **epitopo estraneo** in alcuni individui a dare vita ad una risposta immunitaria.

Dal momento che la stragrande maggioranza degli antigeni è strutturalmente complessa, su un antigene vi sono spesso numerose regioni distinte, ciascuna delle quali viene riconosciuta ed interagisce singolarmente con il SI. Queste piccole porzioni di antigene vengono definite "**epitopi**" o "**determinanti antigenici**" ed ognuna di queste è in grado di reagire con il sito combinatorio di uno specifico anticorpo o con lo specifico recettore di un linfocita T. In genere il numero di epitopi su una molecola è direttamente correlato alla sua dimensione. Ogni proteina possiede in superficie un'enorme costellazione dei più diversi determinanti antigenici, ciascuno dei quali verrà riconosciuto in maniera specifica dal SI. Alcuni epitopi sono più efficaci di altri nello stimolare una risposta immunitaria per le loro caratteristiche intrinseche e vengono, perciò, definiti immunodominanti.

Il sistema immunitario innato viene attivato quando l'organismo si accorge di essere attaccato grazie al riconoscimento di segnali di allarme generati sia da microrganismi invasori (esogeni) sia da cellule morte o che stanno morendo (endogeni). I segnali esogeni sono costituiti da molecole prodotte dagli invasori, chiamate PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern; i segnali endogeni consistono in molecole rilasciate da cellule danneggiate, morte o morenti, chiamati DAMP, Damage Associated Molecular Pattern. PAMP e DAMP sono riconosciuti da particolari recettori deputati al riconoscimento dei pattern, localizzati su diverse cellule sentinella presenti nell'organismo.

- › **PAMP**. I microrganismi non solo si replicano molto rapidamente, ma sono anche molto diversi e possono mutare e cambiare molte delle loro molecole di superficie rapidamente. Per questa ragione, il SI innato non deve cercare di riconoscere tutte le molecole microbiche possibili, ma si limita a legare e rispondere a molecole abbondanti ed essenziali per la sopravvivenza dei patogeni, molecole che non cambiano rapidamente e sono condivise da intere classi di microrganismi, e possono essere definite come pattern molecolari conservati presenti su un ampio range di possibili microrganismi aggressori.

Le strutture di superficie dei batteri e le appendici batteriche rappresentano i più importanti antigeni di questi microrganismi. A questi si aggiungono il DNA batterico e altre proteine ad elevata attività antigenica.

- › Parete cellulare: LPS
- › Capsula batterica: Antigeni K, capsula di natura polisaccaridica con buona attività immunogena
- › Pili e fimbrie: su alcuni gram-, condizionano adesività ed hanno un ruolo essenziale nella colonizzazione (antigeni F)
- › Flagelli: costituiti da una singola molecola proteica, ripetitiva, la flagellina che però risulta instabile e non rappresenta un buon antigene a meno che non venga polimerizzata. Gli antigeni flagellari sono denominati collettivamente antigeni H.

- > Dna batterico: avendo un DNA diverso da quello delle cellule eucariotiche, è un grado di stimolare l'immunità innata, ma essendo all'interno del corpo batterico, è meno importante nello stimolare un'immunità protettiva
- > Altri antigeni batterici tra cui *porine* (gram-), *heat-shock proteins* (batteri che se sottoposti a condizioni di stress variano pH e calore), *esotossine* in grado di produrre anticorpi specifici.
- > Antigeni virali: la struttura antigenica più rilevante nei virus è rappresentata dal capsido proteico in grado di stimolare la produzione di anticorpi specifici. Nei virus provvisti di envelope, sono presenti strutture antigeniche di natura lipoproteica e glicoproteica in grado di stimolare anticorpi produttivi in quanto reagiscono specificatamente con proiezioni di superficie dell'envelope stesso (i peplomeri) che i virus utilizzano per adsorbirsi alla cellula ospite e quindi infettarla. Gli anticorpi non sono però in grado di raggiungere e neutralizzare i virus nascosti all'interno delle cellule infette.
- > **DAMP**. Un processo infiammatorio può essere stimolato non solo da un'infezione microbica ma anche da un trauma fisico e danno cellulare. Diversi PRR riconoscono non solo i PAMP di microrganismi aggressori, ma anche molecole rilasciate dai tessuti morti, morenti o danneggiati: tali molecole, DAMP o allarmine, vengono rilasciate quando una cellula muore o si ha un danno.

Quindi:

- **Immunogeno**= sostanza che se inoculata stimola una reazione immunitaria (deve avere le caratteristiche particolari di cui sopra)
- **Antigene**= è una sostanza che reagisce con i prodotti del sistema immunitario. L'antigene in alcuni casi può essere immunogeno, ma non è detto che lo sia. L'antigene può essere anche una piccola parte dell'immunogeno. L'antigene è una struttura complessa, al cui interno si trovano diversi determinanti antigenici (o epitopi), i quali vanno ad interagire con le sostanze prodotte dall'individuo. Gli antigeni sono quindi un insieme di determinanti antigenici.

L'organismo produrrà anticorpi verso i flagelli, verso la capsula, verso la membrana citoplasmatica e così via... ciò significa che quando si inocula questa cellula, questa viene aggredita, scomposta e processata, per esporre sulla propria superficie i determinanti antigenici, verso i quali il sistema immunitario produrrà anticorpi.

Altre strutture importanti presenti nei batteri e nelle varie sostanze, che pur essendo estranee all'organismo non sono in grado di per se di stimolare una reazione immunitaria (probabilmente perché sono micromolecole), vengono chiamate apteni (antigeni non immunogeni). A volte però può essere utile e necessario avere anticorpi contro gli apteni, soprattutto in diagnostica, per riconoscere il microrganismo. Per individuare gli apteni, vanno legati a un carrier (molecola di dimensioni maggiori, estranea all'organismo) così da renderli macromolecole, in grado di stimolare una reazione immunitaria (vengono resi gli apteni immunogeni). Quando i macrofagi (derivanti dai monociti) fagocitano questa sostanza, la processano e la espongono (associato all'antigene di istocompatibilità)*, sulla superficie ci saranno gli apteni, verso cui verranno prodotti anticorpi.

Gli antigeni esogeni sono catturati e processati dalle cellule dendritiche o da altre cellule presentanti l'antigene e quindi presentati ai linfociti Thelper, che, se attivati in maniera corretta, danno il via ad una risposta immunitaria secernendo citochine, dividendosi e differenziandosi. Le altre popolazioni linfocitarie (linfociti T citotossici e linfociti B) possono rispondere a un antigene solo se ricevono un segnale di stimolazione da parte dei linfociti T helper.

Ciascun linfocita è dotato di diversi recettori per gli antigeni e ciascuno ha compiti caratteristici: i linfociti T helper regolano le risposte immunitarie, i linfociti T citotossici distruggono le cellule che mostrano antigeni endogeni e i linfociti B producono anticorpi.

Elementi presenti nel sangue facenti parte del sistema immunitario:

- **Leucociti:** le prime difese in assoluto sono rappresentati dagli elementi della serie bianca. Tali cellule derivano da una cellula staminale totipotente localizzata nel midollo osseo. Di questi leucociti, due tipi sono specializzati nella fagocitosi e nell'uccisione dei microrganismi aggressori:
 1. *Neutrofili:* rispondono rapidamente, fagocitando e distruggendo prontamente gli aggressori, ma hanno vita molto breve e devono essere velocemente rimpiazzati. Sono cellule di pronto intervento, con un'azione che si esaurisce però con la distruzione del materiale estraneo, senza che quest'ultimo venga coinvolto nella risposta immunitaria.
 2. *Macrofagi:* derivano dai monociti. Si muovono più lentamente ma sono più longevi e sono capaci di fagocitosi ripetute. I macrofagi sono cellule di secondo intervento e svolgono un ruolo fondamentale nell'attivazione della risposta immunitaria, in quanto prendono l'elemento estraneo, lo fagocitano, lo processano e lo espongono e lo presentano esponendo i peptidi utili a stimolare il sistema

immunitario, innescando così tutti i meccanismi delle difese specifiche (successivo intervento dei linfociti)

3. *Eosinofili*: sono in grado di fagocitare piccole particelle, ma sono molto più adatti a una distruzione extracellulare di grossi parassiti (es. elminti). I loro granuli contengono una miscela di mediatori infiammatori in grado di uccidere batteri ed elminti.
4. *Mastociti*: sono molto importanti nell'infiammazione, in quanto, dopo aver incontrato un aggressore, vanno incontro a degranolazione, rilasciando rapidamente istamina e altri mediatori del processo infiammatorio, dando il via a flogosi acuta. Sono inoltre ampiamente coinvolti nei fenomeni che si osservano nel corso delle allergie
5. *Basofili*: anch'essi degranolano, e sono responsabili come i mastociti anche di fenomeni allergici e anafilattici, intervenendo maggiormente negli stati allergici cronici.
6. *Piastrine*: intervengono nella coagulazione del sangue e nei processi infiammatori.

➤ **Linfociti** rappresentano le cellule cardine del sistema immunitario, e nel sangue rappresentano i globuli bianchi più abbondanti

1. *Linfociti B*: evidenziati per la prima volta nel pollo, negli uccelli maturano nella Bursa di Fabrizio. Nei ruminanti maturano nelle placche di Peyer, e negli altri mammiferi nel midollo osseo, dove, in tutti i casi, originano da una cellula staminale. Sono responsabili della produzione di anticorpi (immunoglobuline), una volta trasformati in plasmacellule, e sono quindi **responsabili dell'immunità umorale**. Sono in grado di riconoscere un antigene libero tramite i loro recettori di superficie. La caratteristica principale di queste cellule è quella di sintetizzare gli anticorpi o immunoglobuline Ig. Infatti i linfociti B si differenziano per la classe anticorpale che producono. Nei mammiferi esistono 5 diverse classi di immunoglobuline: IgM, IgG, IgA, IgE, IgD

2. *Linfociti T*: originano da una cellula staminale del midollo osseo, e, in tutte le specie, maturano nel timo; sono in circolo nel torrente ematico e risiedono soprattutto nella milza, pronti ad intervenire ogni qualvolta si rende necessario. Sono suddivisi in diverse sottopopolazioni che regolano la risposta immunitaria adattativa o che svolgono un'azione effettrice citotossica, che nell'insieme rappresentano le cellule caratteristiche della **risposta immunitaria cellulo-mediata**. Hanno sempre bisogno dell'intervento di una cellula che in qualche modo presenti loro l'antigene correttamente esposto sulla superficie cellulare. I linfociti T sono geneticamente programmati per dare origine a popolazioni diverse, sia per funzioni sia per la presenza di marker di membrana caratteristici. Si riconoscono anzitutto due tipi principali di linfociti: quelli ad attività regolatrice sono i T helper, che sono ulteriormente suddivisi in popolazioni differenti, e quelli ad attività effettrice sono i T citotossici.

Tra le due linee linfocitarie c'è un collegamento, dato dai linfociti T helper, che portano alla secrezione di elementi che potenziano l'azione degli anticorpi.

Altre forme di protezione sono date da:

- **Citochine**: le diverse cellule del sistema immunitario possono sintetizzare e secernere centinaia di proteine diverse, chiamate citochine, che controllano le diverse risposte immunitarie agendo come mediatori proinfiammatori.
- **Complemento**: sistema costituito da diverse proteine, fondamentale per le difese dell'individuo. L'attivazione di queste proteine dà luogo ad una reazione a cascata che genera una serie di risposte biologiche rivolte all'eliminazione diretta (lisi) o indiretta (fagocitosi) dei microrganismi patogeni. Queste proteine vanno a legarsi ogni qualvolta si forma il complesso antigene-anticorpo (non immunogeno, perché è l'antigene che reagisce con l'anticorpo). Quando si ha la reazione antigene-anticorpo, il complemento si attiva e si lega e distrugge il complesso.
- **Properdina**: funzione simile, è una via alternativa al complemento.
- **Anticorpi derivanti dalla madre** (tramite colostro o placenta), da **vaccinazioni**, o da **malattia già contratta**

I LINFOCITI NEL DETTAGLIO

Tutti i linfociti derivano da una cellula staminale totipotente nel midollo osseo.

Per legare gli antigeni, i linfociti T e B utilizzano recettori diversi ma appartenenti tutti alla stessa superfamiglia delle immunoglobuline.

Maturazione dei linfociti B

- La prima cellula identificabile come appartenente alla linea dei linfociti B, è la cellula pre-B, caratterizzata dalla presenza di IgM citoplasmatiche ma non di membrana

- lo stadio successivo è la cellula B immatura (o vergine/naive, poiché non ha ancora incontrato l'antigene), caratterizzata dalla presenza di IgM anche sulla membrana
- Si passa poi alle cellule B mature (o committed/armate), che acquistano poi la capacità di produrre una determinata classe anticorpale (IgG, IgA, IgE) e sono in grado di riconoscere gli antigeni grazie agli anticorpi esposti (IgM o γ globuline).

NB: le IgM sono espresse sulla membrana citoplasmatica come monomeri, dette anche γ globuline (la forma pentamerica viene prodotta e secreta dalle plasmacellule). Inoltre, le IgD, come le IgM, vengono espresse su tutti i linfociti B: il loro ruolo sembra quello di partecipare alla sintesi delle Ig verso la classe che verrà successivamente, prodotta per combattere al meglio l'aggressore.

- La forma finale di maturazione dei linfociti B, stimolati da un antigene, è la plasmacellula, in grado di produrre più di 2000 molecole anticorpali al secondo. Queste si formano in seguito al legame tra gli anticorpi IgA/ γ globuline e i determinanti antigenici associati all'antigene di istocompatibilità.

NB Ogni plasmacellula secreta anticorpi dotati della medesima specificità di quelli presenti in membrana che sono serviti a riconoscere originariamente l'antigene.

NB Le plasmacellule possono migrare nel midollo osseo o nei tessuti mucosi e sopravvivere per anni continuando a produrre bassi livelli di anticorpi. Gli anticorpi prodotti da queste cellule forniscono una protezione immediata nei confronti di successive infezioni da parte dello stesso microbo. Una protezione ancora più efficace è fornita dalle cellule della memoria che si differenziano rapidamente in seguito all'attivazione in plasmacellule.

La parte deputata al legame con l'antigene non è altro che un anticorpo legato alla membrana cellulare: quando un linfocita incontra l'antigene per il quale è specifico, lo lega grazie a questa immunoglobulina di superficie, e in seguito a una stimolazione, risponde secernendo i suoi recettori nei liquidi corporei sotto forma di anticorpi. Gli anticorpi circolanti, quindi, altro non sono, che dei recettori solubili.

Oltre alla produzione di plasmacellule e quindi anticorpi, si ha la stimolazione delle cellule della memoria: sono cellule nelle quali viene memorizzato ciò che succede a livello delle plasmacellule. In una successiva esposizione a questo specifico antigene, non sarà necessario fare tutti i passaggi di cui sopra, poiché queste cellule, se rincontrano questo antigene, sono già "allertate" per produrre e secernere anticorpi.

Successivamente si ha una stimolazione per i linfociti T, se si tratta di antigeni T-dipendenti. Alcuni antigeni non sono T-dipendenti (ovvero sono T-indipendenti), come ad esempio l'LPS, a scarso potere immunogeno, per cui non stimolerà completamente la reazione: si arriva alla produzione di plasmacellule ma non alla stimolazione delle cellule della memoria. Si avrà una produzione di anticorpi momentanea, che nel tempo scompare. Questo non succede con i T-dipendenti.

Maturazione dei linfociti T: doppia selezione

Prima di lasciare il timo per spostarsi "in periferia" i timociti immaturi devono sostenere con successo 2 prove (doppia selezione), in quanto hanno due compiti contrastanti: da un lato infatti devono riconoscere gli antigeni estranei, ma contemporaneamente non devono rispondere ai normali costituenti dell'organismo (antigeni self)

Tabella 25.1 Caratteristiche distintive dei linfociti B e T

Caratteristica	Linfociti B	Linfociti T
Cellule cardine di	Immunità umorale	Immunità cellulo-mediata
Maturazione in	Midollo osseo, borsa di Fabrizio, placche di Peyer	Timo
Localizzazione principale	Corticale dei linfonodi, follicoli linfatici e zona marginale della milza, midollo osseo	Paracorticale dei linfonodi, guaine linfoidi periarteriolarie della milza
Sottopopolazioni	Diverse a seconda delle classi anticorpali prodotte; in alcune specie B1 e B2	Helper e citotossici
Circolanti	Poco	Molto
Marker di superficie principali	Immunoglobuline	CD2, CD3, CD4 o CD8
Recettore per l'antigene	BCR (B Cell Receptor)	TCR (T Cell Receptor)
Antigeni riconosciuti	Proteine o altre molecole estranee libere	Proteine estranee esposte su molecole MHC
Prodotti secreti	Immunoglobuline	Citochine

Cellule cardine del sistema immunitario

- Primo passo per le reazioni immunitarie: subito dopo i neutrofili (fagocitano e distruggono) troviamo i macrofagi (fagocitano la sostanza estranea, la processano, espongono la sequenza sulla superficie associata all'antigene di istocompatibilità). Dopodiché questo prodotto è presentato ai linfociti...
- Differenziazione in funzione degli antigeni: alcuni son chiamati T dipendenti (generalmente sono antigeni complessi, e sono anche immunogeni), altri T indipendenti (non avremo l'intervento dei Thelper ma andremo direttamente sui B).

Per attivare la risposta immunitaria negli antigeni T dipendenti, serve l'intervento dei linfociti T helper (differenziabili in CD cioè class of differentiation) che daranno il consenso alla reazione coi linfociti B: quando c'è l'intervento dei linfociti Thelper avremo un'immunità duratura (tale reazione svilupperà completamente tutto il sistema immunitario, ovvero avremo sia le plasmacellule che la stimolazione sulle cellule della memoria), quindi avremo produzione di anticorpi circolanti ma anche immunità cellulare (cellule della memoria = l'individuo memorizza il microrganismo con cui è entrato in contatto e al secondo contatto si ha direttamente la produzione di anticorpi e risposta immunitaria). Quando si hanno antigeni T indipendenti si va subito sui linfociti B e si producono anticorpi per breve tempo, ma le cellule della memoria non sono stimulate, quindi, se si rientra in contatto, bisogna ripartire da capo.

- Vengono prodotte poi le **IgM** a partire da plasmacellule, a livello di organi linfoidi secondari (linfonodi, milza ...). Sono la classe anticorpale più importante, e quella più rappresentata nel siero dopo le IgG. All'inizio della malattia infettiva le IgM sono la prima classe di immunoglobuline ad essere secrete (e che compare per prima nel sangue), e sono quelle che vanno a neutralizzare più elementi estranei. Quelle presenti nei preB e Bcommitted sono monomeriche: presentano un frammento costante FC e un frammento variabile FAB (fragment antigen binding, è il frammento che lega i determinanti antigenici). Un antigene, si lega al FAB, ma può avere altri siti recettoriali liberi a cui si può legare un altro anticorpo. Le IgM prodotte dalle plasmacellule sono invece pentameriche, così da poter legare un numero maggiore di determinanti antigenici (10 siti recettoriali). Queste 5 immunoglobuline sono tenute insieme dalla catena J (joint). Hanno quindi peso molecolare molto elevato e hanno origine proteica (infatti ad es. se inoculo una IgM di topo in un coniglio, sarà immunogeno e verranno prodotti anticorpi antiIgM → importante in diagnostica). A causa appunto delle loro dimensioni elevate, raramente escono dai vasi e raggiungono liquidi tissutali, anche in caso di infiammazione acuta; sono attive principalmente a livello ematico. È importante che ci siano queste immunoglobuline nella prima fase dell'infezione perché appunto neutralizzano un'enorme quantità di determinanti antigenici. Sono gli anticorpi maggiormente prodotti in seguito al primo incontro con un antigene (risposta primaria) e la loro produzione continua anche durante la risposta secondaria, durante la quale vengono però mascherate dalla grande quantità di IgG. Sono più efficaci delle IgG nelle loro funzioni di attivazione del complemento, opsonizzazione, neutralizzazione virale e agglutinazione, soprattutto per via dei loro 10 siti combinatori. Le IgM sono le prime che compaiono, dopo circa 10gg dall'infezione.
- Poi verranno prodotte le **IgG**, da plasmacellule, a livello della milza. Sono monomeriche e legano solo 2 determinanti antigenici. Hanno un peso molecolare molto inferiore alle IgM e sono la classe di Ig che permane per più tempo. Quando si arriva al massimo della produzione di IgM cominciano ad esser secrete le IgG (circa 15gg dopo la comparsa delle IgM). Man mano che aumentano le IgG diminuiscono le IgM. Quindi se vado a cercare le IgM le trovo solo se l'infezione è recente, perché dopo un po' scompaiono e trovo solamente le IgG. Essendo piccole, possono facilmente fuoriuscire dai vasi e giocare un ruolo importante nell'infiammazione, durante la quale l'aumentata permeabilità capillare permette a tali anticorpi di partecipare attivamente alle difese a livello dei tessuti e superfici corporee. Essendo molto piccole, inoltre, sono gli unici anticorpi a poter attraversare la barriera placentare e raggiungere il feto. Svolgono diverse funzioni quali agglutinazione, opsonizzazione e neutralizzazione virale; sono inoltre in grado di attivare il complemento, ma solo quando sulla superficie dell'antigene da distruggersi si unisce un numero sufficiente di IgG.
- Le **IgA** sono immunoglobuline circolanti, sieriche (le trovo nel siero) monomeriche. Vengono prodotte da plasmacellule localizzate a livello delle superfici corporee (intestino, app.respiratorio, ghiandola mammaria, app.urinario, cute, occhi). Nella maggior parte dei mammiferi la loro concentrazione sierica è < IgM. In genere vengono secrete sottoforma di dimeri, tenuti insieme da una catena joint (come IgG). Esistono anche IgAS (dimeriche), ovvero IgA secretorie, che possono rimanere adese alle superfici protette dall'azione degli enzimi proteolitici grazie a una glicoproteina che possiedono. Svolgono un ruolo chiave nella difesa dei distretti come mucose (immunità mucosale) dalle invasioni microbiche. Dopo una sensibilizzazione delle mucose, si ha una secrezione che permette di depositare le IgAS sulle mucose, che neutralizzerà l'agente eziologico.

- **IgE** sono prodotte da plasmacellule localizzate soprattutto a livello delle superfici corporee, mentre hanno una bassissima concentrazione a livello sierico, per questo motivo non possono agire legandosi semplicemente agli antigeni come fanno le altre immunoglobuline, ma funzionano da molecole di traduzione del segnale. Sono infatti piccoli anticorpi (sono monomeriche) che si legano sulla membrana dei mastociti e dei granulociti basofili e quando un antigene si fissa a queste IgE legate, stimola il rapido rilascio di molecole infiammatorie, con conseguente infiammazione acuta e stimolazione delle difese locali. Si trovano infatti nel caso di reazioni allergiche.
- Nell'uomo e in altre specie animali (non tutte!) sono state rilevate anche le **IgD**. Rappresentano un recettore di membrana che si ritrova sulla superficie dei linfociti B, e solo una piccola parte di questi viene secreta nel sangue. Il loro ruolo non è ancora chiarito del tutto, ma sembrano svolgere un'azione fondamentale nella differenziazione dei linfociti B.

Attività degli anticorpi

Malgrado gli anticorpi siano fondamentali per le difese dell'organismo contro diversi tipi di invasore, in realtà non uccidono né distruggono nessuno, semplicemente "etichettano" l'aggressore e lasciano ad altri (cellule o molecole) il compito di ucciderlo. Pertanto la formazione del complesso antigene-anticorpo innesca a sua volta altri meccanismi difensivi dell'organismo, che sono diretti ad inattivare, sequestrare o distruggere l'elemento estraneo.

Tra i principali meccanismi d'azione messi in atto dagli anticorpi per proteggere l'ospite troviamo:

- **attività neutralizzante:** gli anticorpi reagendo con tossine o virus ne bloccano l'azione nociva neutralizzandone l'infettività
- **attività agglutinante:** gli anticorpi reagiscono con antigeni particolari causandone l'agglutinazione e stimolandone la fagocitosi
- **attività precipitante:** gli anticorpi reagiscono con antigeni solubili, trasformandoli in precipitati solidi, e pertanto inattivi
- **attività opsonizzante:** dopo aver reagito con l'antigene, gli anticorpi divengono altamente reattivi verso i recettori di membrana di macrofagi e neutrofili. Questo legame tra porzione Fc dell'anticorpo e fagociti può avvenire direttamente oppure a seguito del legame con la frazione C3b del complemento, ne consegue una rapida ingestione e distruzione del complesso a-a.
- **attivazione (fissazione) del complemento:** gli anticorpi di classe IgG e IgM sono in grado di fissare il complemento, cioè di attivare quella serie di enzimi del sangue capaci di lisare a cascata gli invasori con cui hanno reagito.

La maggior parte degli anticorpi è in grado di esplicare più di uno dei meccanismi difensivi descritti.

Gli anticorpi, legandosi ai microbi, prevengono l'infezione delle cellule dell'ospite, quindi neutralizzano i microbi. Infatti, l'azione neutralizzante degli anticorpi costituisce l'unico meccanismo dell'immunità adattativa che impedisce l'insorgere di un'infezione; questo spiega come mai uno dei principali obiettivi delle vaccinazioni sia di attivare una potente risposta anticorpale. Le IgG rivestono i microrganismi e li rendono facile bersaglio per la fagocitosi poiché le cellule fagocitiche (neutrofili e macrofagi) esprimono recettori per alcune porzioni delle IgG. Le IgG e le IgM attivano la via del complemento, la quale a sua volta produce componenti in grado di promuovere la fagocitosi e l'eliminazione dei microbi. Le IgA sono secrete a livello delle cellule degli epitelii mucosali per neutralizzare i microbi presenti nel lume dei tessuti mucosi, quali l'albero respiratorio e il tratto gastrointestinale, impedendo che i microbi inalati o ingeriti possano infettare l'ospite

Immunità umorale: come funziona

Le immunoglobuline sieriche rientrano nell'immunità umorale, e possiamo sfruttare sia per comprendere gli anticorpi, che per fare diagnosi sierologica.

Nell'immunità umorale intervengono IgG e IgM (Anche IgA ma sono trascurabili). Queste immunoglobuline (o anticorpi) hanno recettori (Y), dove in ogni braccio della Y si ha un FAB (fragment antigen binding, ovvero frammento variabile) a cui si legano i determinanti antigenici, e un FC (frammento costante). Una volta prodotte, queste immunoglobuline sono circolanti, e trovano l'antigene: siccome sono state selezionate verso un antigene, essendo specifiche, lo riconoscono e lo bloccano. L'antigene si lega al FAB e viene neutralizzato (sull'altro FAB si può legare una proteina di superficie).

Su FC c'è un recettore che si scopre solo quando si ha la formazione del complesso antigene anticorpo. Sul recettore si va a legare il complemento, il cui ultimo enzima della cascata è la poliperforina che si lega al FC e distrugge il complesso antigene-anticorpo.

Tutti i complessi antigene-anticorpo devono essere distrutti altrimenti ostruirebbero le vene, inoltre quest'azione è importante perché ogni volta che ho un patogeno nel sangue esso è così neutralizzato.

Es: *Leptospirosi nel cane*: la leptospira entra per via orale, oculocongiuntivale, soluzioni di continuo, via sessuale...; essa ha 3 movimenti (rotazione, flessione, traslazione tutti movimenti che permettono di penetrare fino al torrente ematico) e arriva alla sua sede elettiva: rene. Nei confronti della leptospira ci si difende con difese naturali e anticorpi (immunità umorale è fondamentale). Quando l'anticorpo riconosce la leptospira, l'anticorpo si lega alla leptospira (antigene) e si forma il complesso antigene anticorpo. A livello della frazione costante dell'anticorpo (FC) si scopre il recettore per il complemento e si hanno le reazioni a cascata.

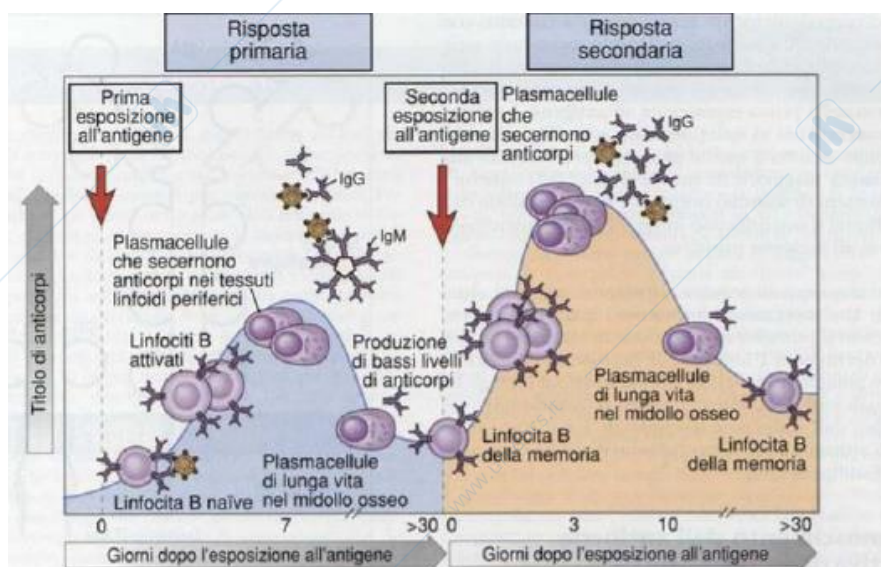


Tabella 9-1. Caratteristiche delle risposte anticorpali primaria e secondaria

Caratteristica	Risposta primaria	Risposta secondaria
Lasso di tempo dopo l'immunizzazione	Abitualmente 5-10 giorni	Abitualmente 1-3 giorni
Picco della risposta	Minore	Maggiore
Isotipo anticorpale	Abitualmente IgM > IgG	Aumento relativo delle IgG e, in certe situazioni, delle IgA o delle IgE
Affinità anticorpale	Affinità media minore, maggiore variabilità	Affinità media maggiore (maturazione dell'affinità)
Indotta da	Tutti gli immunogeni	Solo antigeni proteici
Immunizzazione richiesta	Dosi relativamente elevate di antigeni, in modo ottimale con adiuvanti (per antigeni proteici)	Basse dosi di antigeni; gli adiuvanti possono non essere necessari

Immunità cellulo-mediata: come funziona

Ci sono microorganismi che una volta penetrati nei macrofagi si oppongono alla formazione del fago lisosoma (struttura che serve a eliminare la cellula infettante). Essi allora rimangono vivi e vitali nei macrofagi (inibiscono il loro attacco) e si fanno trasportare verso le sedi elettive.

Ex: *micobatteri tubercolari*: entrano di solito per via respiratoria e ne colonizzano la mucosa moltiplicandosi. Essi sono riconosciuti estranei, per cui vengono attaccati dagli elementi della serie bianca: neutrofili (fagocitano e distruggono) e macrofagi (i micobatteri si fanno fagocitare e trasportare fino ai linfonodi).

Da qui possono succedere varie cose a seconda della situazione immunitaria dell'individuo: se un individuo ha le difese alte vanno nei linfonodi, inattivati e si calcificano; se l'individuo ha delle difese basse, le cellule che hanno subito l'attacco non riescono a contrastare i microorganismi (inibiscono la formazione del fago-lisosoma, per cui si moltiplicano nella cellula fino a farla scoppiare, escono tutti i microorganismi e poi si fanno rifagocitare fino ad arrivare nella sede elettiva).

Per questo motivo, in questa situazione, gli anticorpi (immunità umorale) possono fare poco: possono aiutare quando il microorganismo è nel torrente ematico (batteriemia, setticemia), ma quando il microorganismo viaggia nella cellula (spesso si fa trasportare proprio dai macrofagi) gli anticorpi non possono entrare nella cellula.

Le cellule parassitate si fanno però riconoscere, inviando messaggi, per far organizzare le altre cellule a respingerlo. Le cellule parassitate (ad esempio macrofagi, o cellule di qualsiasi tessuto) secernono una sostanza, l'interferone, per farsi riconoscere come parassitate, e non farsi parassitare a loro volta. Così le altre cellule neutralizzano il parassita (immunità cellulo-mediata).

Senza questo tipo di immunità cellulo-mediata non si potrebbe far fronte alle infezioni virali, poiché sono microorganismi intracellulari, così come alcuni batteri (NB nel caso del virione o batterio intracellulare l'immunità umorale agisce solo quando questo esce dalla cellula, finché è dentro la cellula non può agire)

Anche in questo caso, come abbiamo visto nelle cellule della memoria nei linfociti B, ci sono anche le cellule della memoria nei linfociti T, quindi cellule che alla seconda esposizione del microorganismo reagiscono subito senza rifare tutto il percorso.

Tipologie di linfociti e funzioni

I linfociti Thelper si suddividono in Th1 e Th2, che entrano in funzione con gli antigeni T-dipendenti. Quando questi lavorano vengono stimulate le plasmacellule (linfociti B) e le cellule della memoria. Con gli antigeni T-dipendenti si ha una stimolazione delle cellule della memoria, che solitamente con i T-indipendenti non avviene poiché hanno un potere immunogeno minore.

Tutti i linfociti T hanno un recettore specifico chiamato CD3. Inoltre possono presentare altri recettore come CD4 e CD8, attraverso i quali si possono differenziare.

Si hanno diverse tipologie di linfociti T:

- piccoli linfociti, che vengono riattivati nel ricircolo di linfociti
- Thelper: potenziano la risposta immunitaria. Hanno i recettori CD3, CD4+, CD8- *
 - Thelper 1: stimolano la produzione e l'aumento dei macrofagi, e di conseguenza aumentano le difese. Successivamente danno il consenso ai linfociti B, di organizzarsi e produrre anticorpi (nel caso dei T-dipendenti)
 - Thelper2: sono legati ai linfociti Tcitotossici
- Tcitotossici: riconoscono le cellule infette (non self), le attaccano e le distruggono
- Tsuppressor: attaccano e bloccano il meccanismo immunitario, interrompendo la produzione di linfociti, quando l'infezione è risolta.

*Gli altri linfociti T hanno i recettori CD3, CD4-, CD8+.

Terminata l'azione dei Thelper, questi ritornano piccoli linfociti, che però al momento della 2° infezione funzionano come le cellule della memoria, siccome sono sensibilizzati, si attivano subito. I T-helper stimolano i linfociti B per la produzione di anticorpi (da linfociti B a plasmacellule, ovvero cellule che secernono anticorpi). I T-helper stimolano anche le cellule della memoria in modo che al secondo contatto col patogeno non devono ripartire da capo per la difesa, quindi non devono rifare il percorso da cellule staminali, linfociti preB ecc ma direttamente portano alla produzione di anticorpi (IgG) e T-citotossici. I linfociti B possono essere attivati anche senza la presenza dei Thelper, quando reagiscono con gli antigeni lipopolisaccaridici.

Inoltre, quando una cellula è parassitata si scatenano varie reazioni tra cui la produzione di **interferone**: prodotto in seguito a infezione intracellulare. È una sorta di messaggio lanciato dalla cellula parassitata per avvertire le altre cellule. Ogni qualvolta in cui è presente l'interferone significa che il sistema immunitario ha reagito con un microrganismo intracellulare.

IN SINTESI

immunità umorale → legata agli anticorpi

immunità cellulo mediata → per microrganismi intracellulari (virus, clamidie, rickettsie, salmonelle, brucella, micobatterio della tubercolosi, listeria monocitogenes). Anche l'immunità cellulo-mediata può essere utilizzata per fare diagnosi (dosaggio γ -interferon, intradermotubercolinizzazione, prova della tubercolina).

Dagli anticorpi alla diagnosi sierologica: il complesso antigene-anticorpo per la diagnosi. La produzione di anticorpi ci è di vantaggio anche nella diagnostica: es. se voglio vedere se un animale è infetto da leptospira cerco nel sangue gli anticorpi. Se questi sono presenti significa che l'animale è stato a contatto l'agente eziologico. Devo allora scoprire se li ha perché è vaccinato o perché è stato precedentemente infettato.

La sierologia ci permette di capire se un individuo è immune o meno. Per saperlo bisogna fare una titolazione del sangue per cercare gli anticorpi, che, se presenti, vuol dire che la persona è stata a contatto con quel microrganismo. Così facendo però si analizza solo l'immunità umorale.

Altri **test come l'Amantoux** per la tubercolosi "analizzano" anche l'immunità cellulo-mediata. È un test allergico impropriamente detto che produce, oltre alla sensibilizzazione del sistema immunitario (con produzione di anticorpi), anche la sensibilizzazione delle cellule, che non permettono l'entrata del microrganismo. Inoculando la tubercolina prodotta dai micobatteri si ha rossore, dolore o tumefazione l'individuo è sensibilizzato alla tubercolosi e ha un complesso primario (complesso di lesioni che si determinano nell'organismo quando viene a contatto per la prima volta con il bacillo della tubercolosi).

La **profilassi** delle malattie infettive prevede il controllo e l'eradicazione delle malattie infettive, che si fanno tramite test sierologici per la messa in evidenza di anticorpi o di ipersensibilità ritardata, cioè cellulo-mediata.

La **sierologia** è quindi la scienza che ci permette di mettere a punto i piani di profilassi. Il compito fondamentale per chi lavora in questo settore è evitare il diffondersi di malattie contagiose per l'animale e per l'uomo.

Il **controllo e l'eradicazione** delle malattie infettive sono importanti anche dal punto di vista socioeconomico, soprattutto in veterinaria e negli allevamenti.

DIAGNOSTICA SIEROLOGICA

Posso impiegare gli anticorpi che sono in circolo per fare diagnosi di malattia infettiva, tramite diagnosi indiretta, che costa notevolmente meno rispetto a quella diretta. Si prende un campione del sangue, che coagulando, si separa il siero, contenente anticorpi, dal resto. La strategia che dà la possibilità di mettere in evidenza gli anticorpi è data dall'utilizzo di antigeni specifici per quella determinata malattia. Gli anticorpi che possono essere presenti sono IgM, IgA e IgG, ma in particolar modo IgG (IgM se l'infezione è recente).

Gli elettroliti presenti nel sangue sono dati dalla soluzione fisiologica. Per cui sia il siero che l'antigene vanno messi in soluzione fisiologica. Se si dimostra la presenza degli anticorpi nel sangue, significa che l'animale è stato in contatto con quel microrganismo.

Per evitare la diffusione delle malattie infettive è necessario avere dei mezzi per inquadrarle, per vedere e valutare la loro diffusione. Alcune malattie infettive sono regolamentate dalla profilassi di stato: le ASL sono adibite al controllo di queste malattie, col fine dell'eradicazione.

Ad esempio molte regioni italiane sono indenni da brucellosi, tubercolosi, leucosi, mentre il vaiolo è stato completamente eradicato. Questo è successo perché si hanno strumenti per valutare la diffusione di una malattia infettiva, tramite diagnosi diretta (si mette in evidenza l'agente eziologico, ovvero il microrganismo) o indiretta (si mettono in evidenza gli anticorpi diretti contro il microrganismo).

Utilizzo degli anticorpi per la diagnosi di malattie infettive

L'antigene è rappresentato da diversi determinanti antigenici. L'antigene, essendo immunogeno, se introdotto nell'organismo stimola una reazione immunitaria: l'elemento verrà fagocitato dai macrofagi, scomposto, ed esposto con l'antigene di istocompatibilità, che serve ad identificare il microrganismo (permette il riconoscimento tra self e non-self), e fa sì che inneschi la reazione immunitaria.

Se si prendono le Ig e si mettono a contatto col microrganismo, queste troveranno sul microrganismo dei determinanti antigenici a cui si legheranno. Tutto questo succede se e solo se il siero che viene prelevato dagli animali viene immesso in una soluzione contenente elettroliti, ovvero la soluzione fisiologica.

- Per vedere se l'animale è stato a contatto con un certo microrganismo a partire dagli anticorpi, bisogna innanzitutto fare un antigene, coltivando i microrganismi in coltura pura e raccogliendole.
- Si inattiva il microrganismo con aldeide formica (formalina).
- Se questo antigene reagisce con il siero di un animale, significa che questo è stato a contatto con il microrganismo.

TEST DELL'AGGLUTINAZIONE (NB l'agglutinazione si ha anche in vivo!)

- Si ha un campione di sangue intero, si centrifuga e si raccoglie il siero
- Si fanno diluizioni scalari del siero (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 ...) partendo da 0,8ml SF+0,2siero (1:5). Si prende poi 0,5ml delle varie diluizioni e si aggiungono via via a 0,5ml SF. In questo modo si dimensiona la diluizione del siero.
- Si introduce l'antigene in quantità e diluizione uguale a quella del siero (es. 0,5ml antigene diluito 1:5 + 0,5ml siero diluito 1:5 → si avrà una diluizione totale 1:10 → le diluizioni raddoppieranno via via, per questo si parte dalla diluizione 1:5, così da avere anche la diluizione finale 1:10, altrimenti si andrebbe a 1:20, se si partisse da 1:10)
- Gli anticorpi reagiranno con l'antigene, se tra i due c'è un rapporto di quantità razionale. Se c'è un eccesso di antigene o un eccesso di anticorpi, tutto ciò non succede.
- Va trovata una giusta diluizione dell'antigene, che messa a contatto col siero provochi il legame antigene-anticorpo
- I FAB delle IgG andranno a legarsi ai determinanti antigenici formando un reticolo →

Teoria del reticolo

- Il reticolo darà origine al fenomeno dell'agglutinazione, che avviene solo con titolazione ottimale.
- Nelle provette si vedrà un intorbidimento dato dal precipitato sul fondo, per accumulo di complessi antigene-anticorpo, e una chiarificazione superiore, se è avvenuta l'agglutinazione.
- Se gli anticorpi non si legano all'antigene non si ha chiarificazione.
- Si dirà che il siero è positivo a 1:10, 1:20...e così via.

Con questo test il campione può essere più o meno positivo alle varie diluizioni scalari.

Il test della siero-agglutinazione si può fare anche su un vetrino.

TEST CON PRECIPITATO

Analogo al test dell'agglutinazione, solo che si fa quando si lavora con proteine, ad esempio esotossine, che reagiranno con gli anticorpi (non antigeni corpuscolati, provenienti da cellule batteriche).

IMMUNODIFFUSIONE IN GEL DI AGAR

Radiale:

- Si mette un gel di agar particolare (con maglie molto larghe, penetrabile, che consente la diffusione) su una piastra Petri. Contemporaneamente all'Agar si mette anche l'antigene noto.
- Si fanno dei pozzetti sulla piastra
- Al centro si mettono due sieri noti, uno sicuramente positivo e uno sicuramente negativo
- Negli altri pozzetti si mettono i sieri degli animali che si vogliono testare per questo antigene
- Se nel siero in esame ci sono gli anticorpi, intorno al pozzetto si forma un precipitato, perché sia antigene che anticorpo diffondono. L'antigene tende ad andare verso l'anticorpo, e viceversa, e si forma intorno al pozzetto un alone di precipitazione per la formazione del complesso antigene-anticorpo.
- La precipitazione depone per la positività.

Bidimensionale:

- Si fa con lo stesso gel di agar di cui sopra, su una piastra Petri
- Si fanno: 1 pozzetto al centro e 8 pozzetti intorno a quello centrale
- Nel pozzetto centrale si mette l'antigene
- Nei pozzetti intorno si mette 1 siero positivo e 1 siero negativo
- Negli altri 6 pozzetti si mettono i sieri in esame
- L'antigene al centro tenderà a diffondere, così come gli anticorpi (se presenti)
- Si avrà una banda di precipitazione a metà fra il siero in esame e l'antigene, se il campione è positivo.

IMMUNOFLUORESCENZA (prevede l'impiego del microscopio).

Viene usata solitamente per mettere in evidenza gli antigeni.

Diretta (si cercano gli antigeni)

- Si fissano i campioni in formalina
- Si includono in paraffina liquida (calda)
- Si fanno sezioni al microtomo e si poggiano su un vetrino.
- Si coniuga il siero all'isotiocianato di fluorescina (Sostanza fluorescente)
- Se il microrganismo è presente nel campione, il siero contenete anticorpi specifici contro di esso ci si legherà.
- Quando si forma il complesso antigene-anticorpo, si lega anche la fluorescina, che sarà visibile al microscopio a fluorescenza.

Indiretta (si cercano gli anticorpi)

- Su un vetrino con pozzetti si mette l'antigene e si fissa
- Si diluisce opportunamente il siero e si mette nei pozzetti dove c'è l'antigene
- Se il siero contiene anticorpi si ha la formazione del complesso antigene-anticorpo
- Si lava con acqua il vetrino. Se il campione è positivo, gli anticorpi rimangono legati agli antigeni fissati al pozzetto
- Per visualizzare il complesso antigene-anticorpo, bisogna mettere in evidenza l'Ig legata all'antigene: lo si fa producendo e utilizzando anticorpi contro quella Ig, a cui si andranno a legare (es. se voglio testare il siero di cane, lo inoculo in un coniglio e questo produrrà anticorpi anti-Ig di cane, che utilizzerò per verificare la formazione del complesso antigeneanticorpo).

NB: nel coniglio dopo 21gg si avrà l'effetto booster ovvero un picco anticorpale alla seconda inoculazione)

- Coniugo il siero anti-IgG di cane preparato sul coniglio all'isotiocianato di fluorescina e lo metto sul vetrino
- Se nel siero in esame si era formato il complesso antigene-anticorpo con gli antigeni presenti nel pozzetto, le anti-IgG di cane riconosceranno gli anticorpi di cane e ci si andranno a legare (formando un complesso antigene-anticorpo-anti anticorpo- fluorescina), ed essendo coniugate saranno visibili al microscopio a fluorescenza.

ELISA reazione immuno-enzimatica

1. **Diretta** necessitano di: siero, antigene. Si utilizza per cercare gli antigeni, e solitamente si fa su sezioni di campioni. L'enzima utilizzato è la perossidasi o la fosfatasi. Dal momento che il siero contiene anticorpi specifici per l'antigene, si lega. Ma se si lega il siero si legherà anche l'enzima.

Con questa tecnica bisogna aggiungere al vetrino un substrato metabolizzabile dall'enzima, che comporta un cambiamento di colore.

Nel caso di utilizzo di perossidasi si avrà un'intensa colorazione marrone scuro, che depone per la positività.

2. **Indiretta** necessitano di: siero, antigene, anticorpo coniugato con enzima.
 - Si hanno piastre a 6 pozzetti con fondo piatto su cui si fa aderire l'antigene

- Si aggiunge il siero in esame. Se contiene anticorpi si forma il complesso antigene-anticorpo
- Si lava
- Si mette l'anti-anticorpo legato a perossidasi o fosfatasi, che si lega al complesso antigene-anticorpo
- Grazie al substrato metabolizzabile (cromogeno), l'enzima svilupperà colore
- Si ferma la reazione enzimatica, che altrimenti andrebbe avanti all'infinito con un acido, solitamente acido citrico (una reazione enzimatica si può bloccare con la temperatura o con il Ph)

È molto simile all'immunofluorescenza indiretta, ma in questo caso è necessario avere un cut-off *, ovvero "tagliafuori", che dia un valore al di sopra del quale i sieri sono positivi, e al di sotto del quale i sieri sono negativi.

* Per **stabilire il valore si cut-off**:

- si prendono 10 campioni di siero sicuramente negativi (testati con altra tecnica!)
- si fa il test elisa indiretta e si prendono i valori di questi sieri, facendo la lettura con il fotodensitometro (o spettrofotometro), il cui valore che ci viene fornito varia a seconda della densità di colorazione del mezzo attraversato dal raggio luminoso
- si fa la media aritmetica di questi 10 valori e si aggiungono 3 deviazioni standard
- siero > valore di cut off → siero positivo
- siero < valore di cut off → siero negativo

3. **Competizione** necessitano di: siero, antigene, anticorpi monoclonali* (vedi sotto). Consente di differenziare animali infetti da animali vaccinati. Se si inocula il vaccino vivo delecto** (vedi a fine le tipologie di vaccini) in un animale, questo produrrà anticorpi, verso tutte le parti del virus, tranne quelle delecte. Al contrario, un animale infetto ha gli anticorpi verso anche la parte del virus delecta. In questo modo si può differenziare un animale vaccinato da un animale infetto, grazie agli anticorpi monoclonali.

In sintesi:

- su piastre a fondo piatto si fa aderire l'antigene
- si aggiunge il siero in esame e l'anticorpo monoclonale coniugato
- se il siero appartiene a un animale vaccinato, i suoi anticorpi non si legheranno nel sito della parte delecta, dove si legheranno esclusivamente gli anticorpi monoclonali, e si avrà un forte sviluppo di colore in seguito all'aggiunta del substrato per l'enzima
- se il siero appartiene a un animale infetto, i suoi anticorpi si legheranno anche al sito della parte delecta, dove si legherà anche un po' dell'anticorpo monoclonale coniugato. Si avrà uno sviluppo di colore notevolmente inferiore rispetto all'animale vaccinato.

Anche qui va fatta una taratura del metodo tipo valore "cut-off" per discriminare positivi e negativi.

4. **Sandwich** necessitano di: siero, antigene, anticorpi monoclonali* (vedi sotto)
- Si ha un siero policlonale diretto verso diversi determinanti antigenici
 - Si mette il campione, che se contiene l'antigene, si legherà al policlonale, formando il complesso antigene-anticorpo
 - Si lava
 - Per mettere in evidenza l'avvenuta formazione del complesso antigene-anticorpo si utilizza l'anticorpo monoclonale, diretto verso l'antigene, coniugato con perossidasi
 - Se positivo si ha un forte sviluppo di colore per metabolizzazione del substrato cromogeno

*anticorpi monoclonali: sono anticorpi che si legano solo a uno/massimo due determinanti antigenici.

Come si realizza un anticorpo monoclonale da utilizzare nella sierologia in vitro?

Se si vuole indirizzare un anticorpo verso un particolare distretto bisogna lavorare in primis sull'animale utilizzato per produrre anticorpi (solitamente topi da lab.), che deve essere spf (specific pathogen free), ovvero libero da specifici agenti patogeni (sono stati altamente selezionati per questo). Si inocula l'antigene in questi topi, e si innesca il meccanismo dell'immunità umorale, sensibilizzando le plasmacellule e le cellule della memoria, con produzione di IgG e IgM. Per esser sicuro che i topi abbiano una produzione anticorpale importante, dopo 21gg si re-inocula l'antigene: grazie alle cellule della memoria che riconoscono l'antigene si avrà un'immediata produzione di anticorpi IgG con un picco anticorpale (effetto booster). In questo modo sono sicuro che il topo è immunizzato nei confronti dell'antigene e che produca gli anticorpi diretti verso i vari determinanti antigenici dell'antigene.

Se si preleva la milza di questo topo, questa contiene linfociti B già pronti per sviluppare anticorpi contro il microrganismo. Questa linea cellulare, se propagata in vitro, non "regge", si può propagare 1 o 2 volte e poi muore. Per cui si prepara una linea cellulare che riesca a propagarsi, ovvero una linea cellulare tumorale, più precisamente mieloma di topo, e si mette insieme alle cellule della milza, per far sì che si realizzi un'ibridoma fra cellule tumorali

e linfociti presenti nella milza. Si seleziona con varie colture questa linea cellulare ibridata e si espande, così si avrà una linea cellulare che produrrà sempre anticorpi contro il microrganismo scelto.

Il problema è selezionare quel clone tra gli anticorpi, contro un preciso determinante antigenico.

Vanno via via espansi i vari cloni, finché non si trova l'anticorpo contro quel preciso determinante antigenico che si vuole (con la sierologia si verifica se e dove l'anticorpo si lega, rispetto ai determinanti antigenici). Una volta trovato, si seleziona e si espande. A questo punto si avranno gli anticorpi monoclonali.

Per espandere ulteriormente gli anticorpi monoclonali si può indurre un'ascite nel topo: si prendono le cellule che secernono l'anticorpo monoclonale e si inoculano insieme al pristano (macromolecola complessa che stimola il processo flogistico) nel peritoneo di un topo. Dal momento che si ha un processo infiammatorio, la linea cellulare introdotta viene inglobata, e si avrà a livello del peritoneo, una massiccia produzione di anticorpi, insieme alla massiccia produzione di liquido dovuta alla flogosi. Quindi ci ritroveremo un liquido nel peritoneo del topo, ricco di anticorpi monoclonali, che si potrà prelevare e purificare per cromatografia, per ottenere l'anticorpo monoclonale puro, diretto verso 1 o 2 determinanti antigenici ben precisi.

IMMUNO BLOTTING (blotting= trasferimento)

Permette di individuare quali sono gli elementi immunogeni di un microrganismo, importante per la realizzazione di vaccini che coprano quei determinanti ben precisi. È una tecnica molto complessa e costosa, ma molto affidabile e sicura. Se un animale è positivo all'immunoblotting, è sicuramente positivo al 100%.

Le proteine se sottoposte a elettroforesi su gel di poliacrilammide, si separano in funzione del peso molecolare. Partendo da questo presupposto:

- Si prende un microrganismo, si tratta con un sonicatore (emette ultrasuoni e si rompe il microrganismo).
- Si prende il sonicato e si fa l'elettroforesi
- Il gel di poliacrilammide con le varie bande si mette su acetato di cellulosa (carta)
- Si pongono questi due elementi in un campo elettrico e si ha il blottaggio: le bande presenti sul gel si trasferiscono sulla carta
- La carta contenente le bande (non visibili) si mette in un pozzetto
- Nel pozzetto si aggiunge il siero dell'animale
- Se il siero contiene anticorpi, si andranno a legare sulle bande proteiche specifiche presenti sulla carta, formando il complesso antigene-anticorpo (con IgG o IgM)
- Per mettere in evidenza il complesso antigene-anticorpo si utilizza un anti-Ig marcata.

In questo modo si coloreranno le bande (se positivo)

FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO

Tecnica molto praticata poiché ha dei costi molto bassi.

Il complemento è un insieme di 18 proteine presenti nel siero di sangue di tutti gli animali a sangue caldo.

Il complemento ha un compito importantissimo, perché questo insieme di proteine si attivano a cascata, fino ad arrivare all'ultima proteina (poliperforina), che è quella fondamentale, perché si va a legare al FC, nel suo sito apposito (che si scopre quando si forma il complesso antigene-anticorpo), facendo lisare l'antigene.

Il complemento si può attivare tramite 2 vie:

- Classica: prevede la formazione del complesso antigene-antico, per cui si scopre sul FC il recettore C9 per il complemento. Il C3 si attiva solo in presenza di ioni calcio Ca^{2+}
- Alternativa/properdina: si può attivare sul C3. Si ha quando si ha a che fare con germi gram-, ovvero quando si ha la liberazione dell'LPS. Se si ha LPS (per morte dei microrganismi e liberazione di endotossine) i va direttamente al C3 in presenza di ioni magnesio.

C1 → C1q → C1r → C1s → C2 → C4 → Ca^{2+} → C3 (via classica)

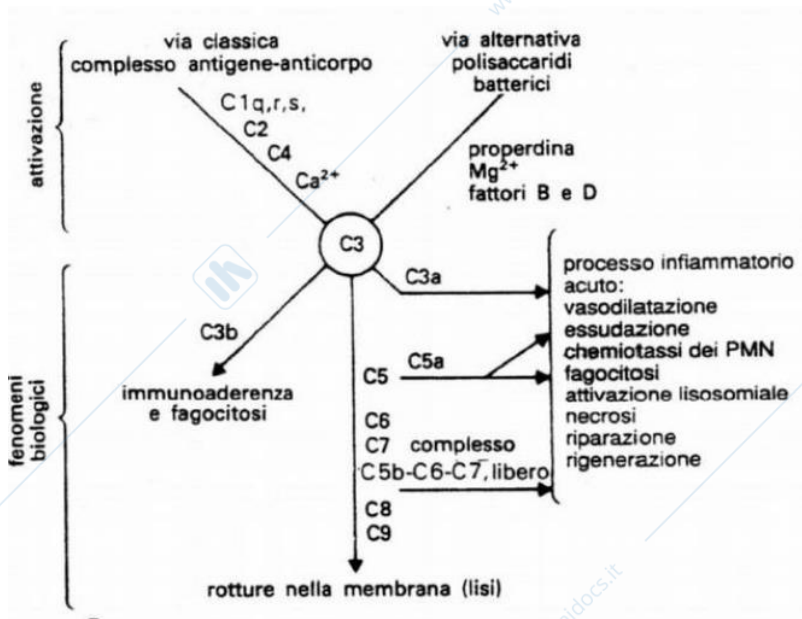
Mg²⁺ → C3 (via alternativa/properdina)

C1r fa da coenzima a C1q, che farà da coenzima a C1r e così via...

Dal C3 si può proseguire in vari modi:

- **C3 → C3a (e si avrà infiammazione)**
- **C3 → C3b (si avranno varie reazioni biologiche)**

- $C3 \rightarrow C5 \rightarrow C5a \rightarrow C6 \rightarrow C7 \rightarrow C5b \rightarrow C6 \rightarrow C7 \rightarrow C8 \rightarrow C9 \rightarrow \text{LISI!!!}$



NB sia IgG che IgM hanno sul FC il recettore per il complemento. Le IgM legano più complemento, essendo pentamerica.

Si può tradurre questa cosa che succede in vivo, in vitro:

- Si ha un antigene e si vuole vedere se in un campione ci sono anticorpi verso questo antigene.
- Va scomplementato il siero in esame, ovvero togliere il complemento che è naturalmente presente. Per fare questo si mette a 56°C x 45min (sono proteine, col calore si denaturano)
- Si aggiunge il siero alla reazione; se ci sono gli anticorpi, si forma il complesso antigeneanticorpo.
- Alla miscela si aggiunge il siero di cavia, contenente di per sé il complemento, che si fisserà al FC dell'anticorpo, se si è formato il complesso.
- Per vedere se il complemento si è fissato al complesso antigene-anticorpo si aggiungono alla reazione un antigene noto e il suo corrispettivo anticorpo noto. Questi due sono dati rispettivamente da GR di montone e emolisina * (anticorpo contro GR, prodotta su un'altra specie)

In questo modo si avranno:

- 1° sistema: antigene + siero in esame scomplementato + complemento (siero cavia)
- 2° sistema: GR montone + emolisina (dove sicuramente si forma il complesso) → sistema rivelatore con GR a 2-6%
- Se nel 1° sistema, il siero in esame contiene anticorpi (positivo) e si forma il complesso antigene-anticorpo, il complemento si legherà a questo sistema. Se il siero è invece negativo, il complemento non si legherà poiché non si è formato il complesso antigene-anticorpo. Quando si aggiunge il secondo sistema, in cui c'è il complesso antigene-anticorpo (sicuramente), il complemento si legherà a questo sistema, sul FC dell'emolisina (anticorpo anti-GR), e si avrà la lisi dei GR.
- > Campione positivo: si ha un precipitato di GR perché non vengono lisati, e precipitano naturalmente.
- > Campione negativo: si ha la lisi dei GR

*NB fare prima una titolazione dei GR, per avere risultati attendibili. Per standardizzare i GR, si aggiungono a dell'acqua distillata così da avere emolisi e fuoriuscita di emoglobina, che se messa su un fotometro se ne può misurare la densità.

Bisogna stabilire anche la quantità di emolisina che si deve mettere, per avere un giusto rapporto tra antigene e anticorpo, altrimenti si ha l'effetto paradossale: questo avviene quando si ha un eccesso o di antigene o di anticorpo oppure quando si ha un titolo anticorpale troppo elevato che non mantiene il rapporto antigene/anticorpo corretto, che viene raggiunto solo dopo alcune diluizioni (tipo un campione è negativo a 1:10, 1:20, 1:401:640 ma raggiunge la positività a 1:2560). Tutti gli elementi che si aggiungono a una reazione devono essere opportunamente titolati e diluiti correttamente.

Determinare ...

- **unità di emolisina:** quantità di emolisina che alla più alta diluizione del complemento da lisi completa.
- **unità di complemento:** quantità di complemento, che alla più alta diluizione di emolisina, da lisi completa.

...ci permette di avere risultati attendibili. Va verificato se per 1,2,3 ... unità di complemento si ha la lisi oppure no.

NB: ogni sistema diagnostico per le malattie infettive ha una diluizione standard.

NB: va usato sempre anche un siero sicuramente negativo per avere un controllo

NB Sieri con potere anticomplementare: Alcuni sieri presentano questo potere, ovvero inibiscono il complemento, o meglio, si forma il complesso antigene-anticorpo, ma non si lega il complemento. Questo siero, pur essendo magari positivo, non permette la fissazione del complemento, che si legherà sempre ai GR dando negatività del campione. Quindi prima di fare il test con la fissazione del complemento bisogna verificare se il siero ha potere anti-complementare. Si verifica mettendo: siero+complemento+GR+emolisina → si dovrebbe avere la lisi dei GR, ma non si ha emolisi se il siero è anti-complementare.

DOSAGGIO γ -INTERFERON (diagnostica che sfrutta imm. cellulo-mediata)

- si prende un campione di sangue con anticoagulante
- si centrifuga per ottenere il plasma, contenente gli elementi della serie bianca
- a contatto con l'antigene, il plasma stimola la produzione di γ -interferon, se i linfociti T presenti nel plasma sono stati sensibilizzati (e quindi sono stati a contatto con il microorganismo)
- Per dosare la quantità di γ -interferon che è stata prodotta si fa l'elisa sandwich (l'interferone è di natura proteica e si comporta da antigene nell'elisa)

INTRADERMOTUBERCOLINIZZAZIONE (MANTOUX)

Test per verificare la positività alla tubercolosi nell'uomo. (diagnostica che sfrutta imm. cellulo-mediata, ipersensibilità di tipo 4)

- Si appoggia una spilla a 3 punte su cui c'è dell'antigene nel braccio della persona, così che l'antigene penetri nel derma
- Se l'individuo è stato a contatto con la tubercolosi, nel punto di inoculo arriveranno i linfociti T citotossici, e si avrà arrossamento e aumento di volume; questo dipende per la positività al test.

PROVA DELLA TUBERCOLINA

Test per verificare la positività alla tubercolosi nel bovino (diagnostica che sfrutta imm. cellulo-mediata).

- con una siringa particolare si inocula l'antigene in sede intradermica
- dopo 72h, nel punto di inoculo si avrà un aumento di volume e arrossamento, e talvolta una crosta, se l'animale è positivo.

NB: la positività si misura tramite lo spessore del pomfo che si crea

Nel caso di animali dubbi, si può ripetere la prova solo dopo 42 giorni, poiché l'animale alla prima prova si è sensibilizzato, e alla seconda, se fatta subito, verrebbe positivo.

TIPOLOGIE DI VACCINI

I vaccini si possono classificare in modi diversi ma la classificazione oggi più seguita a livello mondiale è quella che li suddivide in due grandi categorie:

1. **Vaccini infettivi.** Sono quelli che, una volta somministrati, sono in grado di replicarsi nell'organismo ospite e di causare un'infezione (diversa da malattia, in quanto è successiva all'infezione che causa danni ai tessuti ed una sintomatologia). Se somministrati correttamente ad un animale immunocompetente, tali vaccini lo proteggono efficacemente e per lungo tempo.
2. **Vaccini non infettivi.** Sono quelli che vengono trattati in modo tale da perdere la capacità di replicarsi nell'organismo ospite. Proprio per tale motivo sono meno efficaci dei precedenti e richiedono in genere dosi ripetute e più ravvicinate per stimolare una valida protezione e molto spesso associati ad un adiuvante che ne potenzia l'immunogenicità.

VACCINI INFETTIVI

Costituiti da microrganismi vivi che infettano le cellule ospiti e si replicano in queste. Comportandosi da antigeni endogeni, quindi, vengono processati dalle cellule infette e stimolano di conseguenza una risposta cellulo-mediata.

- › Vaccini vivi attenuati. Sono quelli maggiormente utilizzati in MV. Sono costituiti da microrganismi completi, il cui potere patogeno è stato diminuito o eliminato del tutto con trattamenti e procedure diverse, mantenendo nel contempo l'immunogenicità e capacità di replicarsi. L'attenuazione di microrganismi omologhi mediante passaggi seriali in un ospite non naturale o in colture cellulari ottenute da animali di specie diversa o anche della stessa specie animale cui è destinato il vaccino con comparsa di mutanti avirulenti. Un tipo particolare di vaccini attenuati è rappresentato dai cosiddetti mutanti temperatura-sensibili (ts) cioè microrganismi che si replicano bene a basse temperature (permissive) ma poco o per nulla

a T più elevate. Un metodo più moderno di attenuazione è l'applicazione di tecniche di ingegneria genetica che rendono il microrganismo vivo geneticamente modificato. Tali vaccini possono essere caratterizzati anche da una doppia delezione, diventando così dei vaccini marker. Tuttavia, quando si ricorre a vaccini vivi attenuati bisogna tenere in considerazione specifici problemi di sicurezza, che sono peraltro molto rari. Alcuni vaccini possono mantenere una virulenza residua non solo per l'animale per cui sono destinati, ma anche per altri animali, tornando virulenti o diffondendosi ad animali non vaccinati. Un altro problema è la possibile contaminazione con altri microrganismi e la minore stabilità e le specifiche condizioni di conservazione

- › Vaccini eterologhi. Comprendono quei microrganismi che sono antigenicamente correlati al patogeno bersaglio ma che sono adatti ad un'altra specie ospite. Es. uso del vaccino del morbillo umano per proteggere i cani dal cimurro
- › Vaccini a vettore ricombinante. L'allestimento di questi vaccini prevede di sfruttare un microrganismo vettore vivo che può essere ingegnerizzato per fargli poi esprimere, una volta inoculato nel soggetto da vaccinare, proteine virali appartenenti ad uno o più patogeni, proteggendo così l'ospite nei confronti di una o più malattie infettive.
- › Vaccini marker. Applicando tecniche di ingegneria genetica è possibile ottenere microrganismi geneticamente modificati, privati per delezione genomica, dei geni di virulenza come quelli contro la malattia di Aujeszky del suino e dell'IBR del bovino. Il ricorso a tale tipo di vaccino rende quindi possibile discriminare tra un animale vaccinato ed un animale infetto in quanto il secondo avrà gli anticorpi diretti contro la proteina gE (quindi deleta), assenti nel vaccinato.

VACCINI NON INFETTIVI

I vaccini non infettivi sono costituiti da microrganismi uccisi o da parti di questi o ancora da loro prodotti e quindi non infettano le cellule ospiti: agendo da antigeni esogeni, stimolano di conseguenza soprattutto una risposta umorale.

- › Vaccini inattivati o spenti. Sono costituiti da microrganismi interi ed antigenicamente intatti a cui è stata eliminata completamente la virulenza mediante inattivazione fisica (calore/radiazioni) o chimica (formalina). I microrganismi perdono così la capacità di replicarsi e di causare malattia, mentre conservano intatte le loro proteine costitutive ed il loro potere immunogeno.
- › Vaccini a subunità (di sintesi e ricombinanti). Oggi è possibile identificare singoli epitopi e proteine ad attività protettiva presenti sui microrganismi patogeni e produrli mediante sintesi oppure mediante la ricombinazione del DNA; in questo caso si produce in vitro una notevole quantità di proteine immunogene inserendo il gene codificante per tali proteine in batteri o lieviti, che diventano così delle vere "fabbriche" di antigeni. L'antigene preformato (pt ricombinante) è prodotto in grande quantità ex vivo e poi somministrato all'animale in seguito a purificazione.
- › Vaccini a DNA. I vaccini a Dna nudo rappresentano senza dubbio quelli più moderni ed innovativi. In questo caso il gene che codifica per l'antigene viene inserito in un plasmide che viene poi utilizzato come vaccino ed inoculato in un animale senza la necessità di un microrganismo vettore. Il principio di questi vaccini è la transfezione mediante plasmide delle cellule ospiti al sito di inoculo.

ALTRI VACCINI

- › Vaccini stabulogeni e autovaccini. I *vaccini stabulogeni* sono prodotti veterinari preparati a partire da microrganismi patogeni o loro prodotti tossici, isolati da soggetti colpiti dalla forma clinica. Sono vaccini inattivati e addizionati ad adiuvanti che ne potenziano l'azione immunogena e agiscono secondo una duplice azione: preventiva sui soggetti non ancora colpiti dalla forma infettiva e curativa per i soggetti con la forma morbosa in atto.

Gli *autovaccini*, o vaccini autologhi, sono utilizzati per il trattamento dei singoli animali nei confronti delle malattie infettive ad andamento cronico e sono allestiti a partire da microrganismi isolati dal paziente stesso nel quale verranno successivamente reinoculati.

- › Vaccini non diretti contro agenti infettivi. Es. vaccini antitumorali

In veterinaria si utilizzano molto i vaccini spenti e i vaccini vivi attenuati.

IPERSENSIBILITA' E IPERATTIVITA' IMMUNITARIA

Quando c'è una eccessiva funzionalità del sistema immunitario, sia per quanto riguarda l'immunità umorale che quella cellulo-mediata, nei confronti di antigeni e varie sostanze. Questo si traduce in particolari sintomatologie come allergie, atopie, intolleranze immunomediatae, e varie manifestazioni patologiche e alterazioni anatomo-

funzionali. I motivi sono sempre molteplici, alcuni dei quali sono genetici, o patologici, indotti da altre cause non strettamente correlate al sistema immunitario.

Definizione precisa:

Insieme di manifestazioni patologiche, e alterazioni non soltanto funzionali ma anche anatomiche (tipologie, quantità e distribuzione delle cellule), provocate dalla reazione con un antigene o con la cellula (linfocita B), o con i prodotti della reazione stessa.

L'ipersensibilità è suddivisa in vari momenti:

- sensibilizzazione: l'organismo si sensibilizza a un determinato antigene
- latenza: periodo variabile in termine di tempo. L'organismo non reincontra l'antigene.
- Intolleranza immunitaria: al re-incontro dell'antigene. Coinvolge i linfociti T o prodotti dei linfociti B (IgE)

Ipersensibilità immediata VS ipersensibilità ritardata

Dopo la sensibilizzazione e dopo il periodo di latenza, al re-incontro con l'antigene si può avere una reazione immediata, o molto ritardata. Quella immediata coinvolge l'immunità umorale e si ha una reazione entro pochi minuti/ore. Quella ritardata coinvolge l'immunità cellulo-mediata (T, citochine) e si ha una reazione dopo 24-72h. Tutto dipende molto anche dalla quantità di antigene introdotto e dal soggetto. Nella maggior parte degli allergeni sono apteni e non antigeni.

Classificazione secondo Gell e Coombs

- Immediata
 - TIPO 1/anafilattica. Coinvolge allergie, atopie e anafilassi.
 - TIPO 2/citotossica. In questo caso gli antigeni self reagiscono con anticorpi non self (es: iperattività dovuta a trapianti, trasfusioni non omologhe)
 - TIPO 3/ da immunocomplessi. Si formano complessi antigene-anticorpo che possono precipitare o subito o dopo che hanno circolato in determinati distretti dell'organismo, dando patologie varie.
- Ritarda/ TIPO 4/cellulare.

TIPO 1

Comprende 2 grosse problematiche:

- **Anafilassi:** fenomeno allergico generalizzato. Porta a conseguenze gravi/letali se non trattata.
- **Allergia propriamente detta:** fenomeno < diffuso a livello sistemico (concentrato in determinate sedi anatomiche) e < grave rispetto all'anafilassi.

Come avviene il fenomeno (meccanismo patogenetico dell'allergia):

Gli allergeni penetrano nell'organismo, che reagisce producendo tante IgE (che già non è normale!! solitamente verrebbero prodotte IgM e IgG). Le IgE si fissano con il FC in punti specifici della membrana dei basofili e dei mastociti. Quando i mastociti sono ricoperti di IgE (armati), dopo un periodo di latenza, alla seconda esposizione degranulano per combinazione di allergene+IgE. I granuli contengono varie sostanze, mediatori chimici dell'infiammazione, come istamina, prostaglandine, serotonina ... che determinano varie sintomatologie come broncocostrizione, vasodilatazione, abbassamento pressione sistemica, aumentano l'attività secernente degli adenomeri ghiandolari delle ghiandole esocrine, dando lacrimazione, attivazione delle piastrine, determinando nei casi più gravi la CID coagulazione intravasale disseminata...

Allergie propriamente dette:

Se il fenomeno di ipersensibilità è localizzato su distretti specifici come apparato gastroenterico, cute, bronchi, ecc, si possono avere le atopie (che non hanno un luogo specifico)

Anafilassi:

Reazioni allergiche sperimentalmente indotte o naturali che coinvolgono però tutto l'organismo.

Soggetto atopico: soggetto predisposto a sviluppare allergia più o meno caratterizzata da una forma allergica specifica, respiratoria piuttosto che cutanea, gastroenterica ecc....

Come nascono le allergie?

Esiste una predisposizione ereditaria alle atopie. Si eredita non tanto l'allergia a un determinato antigene, ma la predisposizione ad essere allergici/atopici.

Quando avviene la commutazione di classe durante la maturazione dei linfociti B, verso la produzione di una classe anticorpale piuttosto che un'altra, i recettori di membrana passano da IgM ad IgE grazie alle IgD e una citochina particolare (interleuchina 4, prodotta dai linfociti Th2, invece dell'interferone gamma).

A seconda che si abbia, per ereditarietà genetica, un rapporto tra Th1 e Th2 a favore dei Th2, si avrà una commutazione di classe ad opera delle IgD, verso le IgE, per la maggiore produzione di interleuchina 4.

In un soggetto normale, il rapporto è a favore dei Th1, e la commutazione di classe avverrà maggiormente verso la produzione di IgG, grazie alla produzione di interferone gamma. È il rapporto Th1/Th2, geneticamente predisposto, che determina l'insorgenza delle allergie/predisposizione alle atopie.

In sostanza, i linfociti B saranno sensibilizzati alla produzione di IgE.

L'anafilassi invece, pur coinvolgendo tutto l'organismo, ha comunque dei bersagli specifici, in relazione alla distribuzione dei mastociti (fattore molto individuale, e poco genetico). A seconda degli animali si hanno vari organi da shock primari, a cui sarà legata la sintomatologia:

- Cane: fegato. In anafilassi la funzionalità del fegato si riduce a 0. Per cui la sintomatologia da shock anafilattico nel cane è caratterizzata da agitazione, vomito, minzione e defecazione incontrollate, collasso del soggetto, atassia (debolezza muscolare), depressione respiratorie, coma, morte.
- Gatto: polmone
- Coniglio: cuore, polmone
- Roditori: polmone, intestino
- Bovino: polmone
- Pecora: polmone
- Cavallo: polmone, intestino (cieco). Sintomatologia prevalente: enterocolite di tipo emorragico
- Suino: polmone

Le allergie, rispetto all'anafilassi, sono malattie allergiche più localizzate, caratterizzate da una più limitata produzione di IgE, sensibilizzazione prevalente dei mastociti, in distretti localizzati dell'organismo. In alcuni animali c'è una predisposizione di razza alle allergie. Tutti gli allergeni, da un p.v. chimico, sono riconducibili a proteine, le sostanze ad azione immunogena maggiore.

DIAGNOSI ALLERGOLOGICA:

- Prove in vivo: Tantissime delle patologie allergiche esistenti, per poter essere diagnosticate, devono essere analizzate mediante una reazione ad una quantità irrisoria della sostanza, in maniera da non scatenare anafilassi (scarificazione, prick test, intradermoreazioni)
- Prove in vitro: Oppure possono essere diagnosticate mediante la ricerca delle IgE specifiche, o delle IgE totali per vedere se il soggetto è generalmente predisposto alle allergie (tecniche immuno-enzimatiche). Inoltre ci sono i RAST test (radio allergo sorbent test) e RIST test (radio immuno sorbent test), molto simili all'ELISA. Nel primo caso si verifica l'ipersensibilità verso un allergene specifico, nel secondo si verifica la presenza di IgE totali (ovvero se il soggetto è allergico o meno).

TIPO 2

Fenomeni citotossici mediati da IgG o IgM, normali anticorpi dell'immunità umorale, diretti verso antigeni cellulari. La distruzione della cellula bersaglio (GR per la maggior parte) avviene per azione del complemento.

Gli iso-antigeni, ovvero antigeni fissi sulle cellule dei soggetti, agiranno contro cellule autologhe o eterologhe.

Questo avviene perché i linfociti B committed riconoscono come non self determinate strutture antigeniche veicolate da cellule (GR), determina grazie anche ai Th2 l'espansione clonale dei cloni deputati alla produzione massiva di anticorpi diretti contro l'antigene non riconosciuto, o direttamente, o mediata dal complemento.

In sostanza, se viene riconosciuto come non self l'antigene adeso alla cellula, parte la cascata del complemento per via classica.

Altrimenti la distruzione della cellula avviene per fenomeni di cito-tossicità anticorpo-dipendenti.

Questo meccanismo è alla base dei fenomeni dovuti alla trasfusione di sangue non compatibile.

Gli iso-antigeni sono macromolecole polisaccaridiche, con determinati recettori.

L'origine di questi anticorpi è molto vecchia: filogeneticamente parlando c'è stato un contatto, a carico dell'app. digerente con tantissimi iso-antigeni esterni, derivanti da batteri, piante, ecc introdotti con l'alimenti. Il sistema immunitario, tramite ingestione, ha sostanzialmente conosciuto il mondo esterno, e si è auto-costruito antigeni propri (come ABO del sangue).

Come ipersensibilità di 2° tipo si ha la reazione a particolari farmaci come antibiotici.

L'antibiotico può dare lisi dei GR (raramente), se si lega ad un altro farmaco (o direttamente o tramite eccipienti che attivano la farmaco-cinetica), può andare ad attivare (non per via classica) il complemento, che si lega a cellule vicine (self), e vengono lisate. Oppure la molecola antibiotica (soprattutto aminoglicosidi o macrolidi), se si lega direttamente al GR, lo modifica a livello antigenico superficiale, e lo fa riconoscere come estraneo al sistema immunitario, e si ha lisi dei GR.

Alcune molecole (penicilline, cefalosporine, beta-lattamici in generale) modificano direttamente la membrana cellulare del GR, che non verrà più riconosciuta come self, e quindi si avrà lisi dei GR. In questi casi si possono avere anemie dovute alla somministrazione di farmaci e ipersensibilità citotossica.

*se gli antibiotici/farmaci si legano alle albumine sieriche, si ha invece un'ipersensibilità allergica di 1° tipo

Reazioni immuno-patologiche in corso di malattie infettive: come i farmaci, anche alcuni antigeni batterici/virali/protozoari alterano i GR (e non solo) con conseguente lisi, attivazione del complemento o fagocitosi da parte dei macrofagi (con meccanismi di cui sopra).

TIPO 3 (immunocomplessi=complesso antigene-anticorpo ma in vivo!)

Quando gli anticorpi (prevalentemente IgG) presenti negli organismi, si legano ai corrispondenti antigeni liberi (nel sangue o in distretti anatomici), si formano gli immunocomplessi, che si depositano nel sito di formazione degli stessi o in altri distretti, portati in giro dal circolo linfocematogeno, determinando l'attivazione del complemento, in modo particolare delle frazioni glicoproteiche C3 C5a, richiamando neutrofili e con liberazione di enzimi lisosomiali (litici), con produzione di anafilotossine e liberazione alla fine di istamina (le anafilotossine stimolano la degranolazione dell'istamina da parte dei basofili e dei mastociti, come nell'ipersensibilità di tipo 1°).

Il fatto che gli immunocomplessi si depositino subito oppure no, dipende da come sono fatti, poiché non sono tutti uguali: possono essere in eccesso di antigene o in eccesso di anticorpi. L'anticorpo, rispetto all'antigene, è molto più grosso, per cui:

- gli immunocomplessi in eccesso di anticorpo, sono poco solubili e facilmente precipitabili, per cui si depositano subito (fenomeno di Arthus)
- gli immunocomplessi in eccesso di antigene, sono più solubili e possono essere trasportati, e precipitare in distretti specifici dell'organismo, dando luogo a delle particolari forme di patologia.

Solitamente precipitano negli organi in cui c'è un'alta pressione e un basso flusso sanguigno, ovvero nelle articolazioni, nel glomerulo renale, nella retina, nel mio cardico (glomerulonefriti da immunocomplessi, endocarditi, "malattie da siero"). Queste patologie si hanno anche in seguito alla somministrazione di siero eterologo in grandi quantità. Il tipo di patologia dipenderà quindi molto dal rapporto quantità di antigeni/quantità di anticorpi.

TIPO 4

Viene coinvolto il sistema immunitario cellulo-mediato (no umorale) e si ha una risposta ritardata nel tempo (dopo giorni, almeno 24h, spesso 71) dopo l'inoculazione dell'antigene. Rappresenta una risposta anormale in seguito alla forte sensibilizzazione all'antigene. Questo tipo di ipersensibilità viene molto sfruttata in termini diagnostici, in patologie per le quali si riesce ad avere, da parte dell'agente eziologico responsabile della patologia, una proteina modificata.

Gli antigeni proteici purificati vengono inoculati nel derma e che determinano per sensibilizzazione dei linfociti T risposta localizzata. Quando si presenta di nuovo l'antigene si ha il rilascio di linfocine, vasodilatazione ... localizzata (intraderma), per raccolta in sito di sostanze come macrofagi e infiammazione.

Questo tipo di ipersensibilità è utilizzata ad es nella prova della tubercolina.

Si può avere anche una risposta più massiva in alcuni casi, se la prima sensibilizzazione è forte.

I Tcitotossici vanno, direttamente o indirettamente, a lisare le cellule che sono state attaccate.

I due tipi fondamentali di ipersensibilità di 4° tipo sono:

- **allergia in corso di malattie infettive:** reazione cellulare cellulo-mediata quando un particolare agente eziologico è responsabile di infiammazione cronica intracellulare (micobatteri, brucella, clamidia ...)
- **dermatite allergica da contatto:** avviene per contatto con diverse sostanze antigeniche, Sali metallici, formaldeide, coloranti, vernici, cosmetici, farmaci topici, sostanze plastiche.

Il sistema immunitario, a volte si sbaglia anche in un altro senso, oltre a reagire troppo, può reagire contro se stesso → *malattie autoimmuni*.

NB Si ha fisiologicamente una produzione di anticorpi anti-anticorpi per smaltire l'eccesso di anticorpi prodotti. Questi anticorpi a loro volta dovranno essere smaltiti per cui verranno prodotti altri anticorpi e così via, con un meccanismo di feedback regolatore.