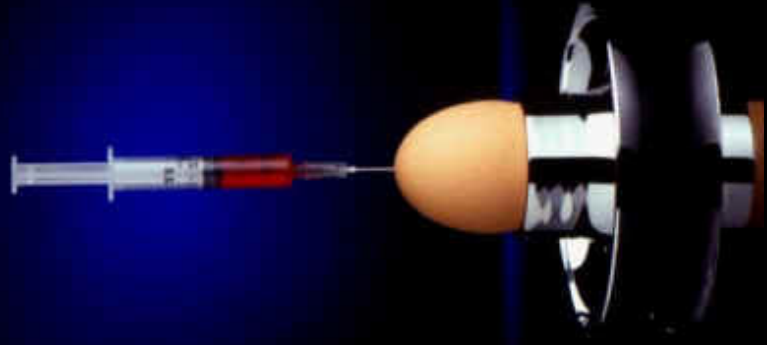


# L'impiego degli Anticorpi



# Agenda

- Immunizzazione
- Vaccini
- Antisieri
- Anticorpi monoclonali



# Agenda

- Immunizzazione
- Vaccini
- Antisieri
- Anticorpi monoclonali



# IMMUNIZZAZIONE

## ATTIVA

### Vaccinazione:

Pratica di profilassi immunitaria cioè di prevenzione delle malattie infettive, ottenuta stimolando il sist.immunitario del soggetto con vaccini.

## PASSIVA

Trasferimento di anticorpi specifici.

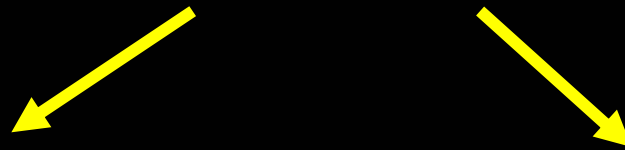
**IMMUNITA'**



# IMMUNITA'

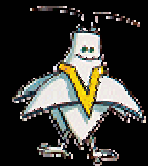
(condizione di refrattarietà ad un agente infettivo)

- **ATTIVA:** in quanto è generata direttamente dalla stimolazione del sistema immunitario a seguito di una stimolazione antigenica (compare dopo 15-20 gg e dura mesi o anni).
- **PASSIVA:** quella che si ottiene trasferendo in un soggetto Ab di un altro soggetto immune (immediata ma di breve durata).



**ARTIFICIALE:** si ottiene mediante immunizzazione passiva

**NATURALE:** placenta, colostro, latte.



# IMMUNITA' PASSIVA NATURALE

Trasferimento Ab materni al feto attraverso la placenta e al neonato attraverso il colostro e il latte. Il tasso di Ab è elevato solo durante le prime 24 h dopo la nascita.

Le IgG arrivano al neonato attraverso il colostro per fornirgli una protezione sistemica.

Le IgM arrivano dal latte per una protezione locale.

A decrescere anche le altre Ig.

La durata dell'immunità è variabile a seconda della specie (6 mesi nel cavallo, 2-3 mesi nel cane e nel gatto, 4 mesi nel bovino, 1-2 mesi nel suino e 3 mesi nella pecora).



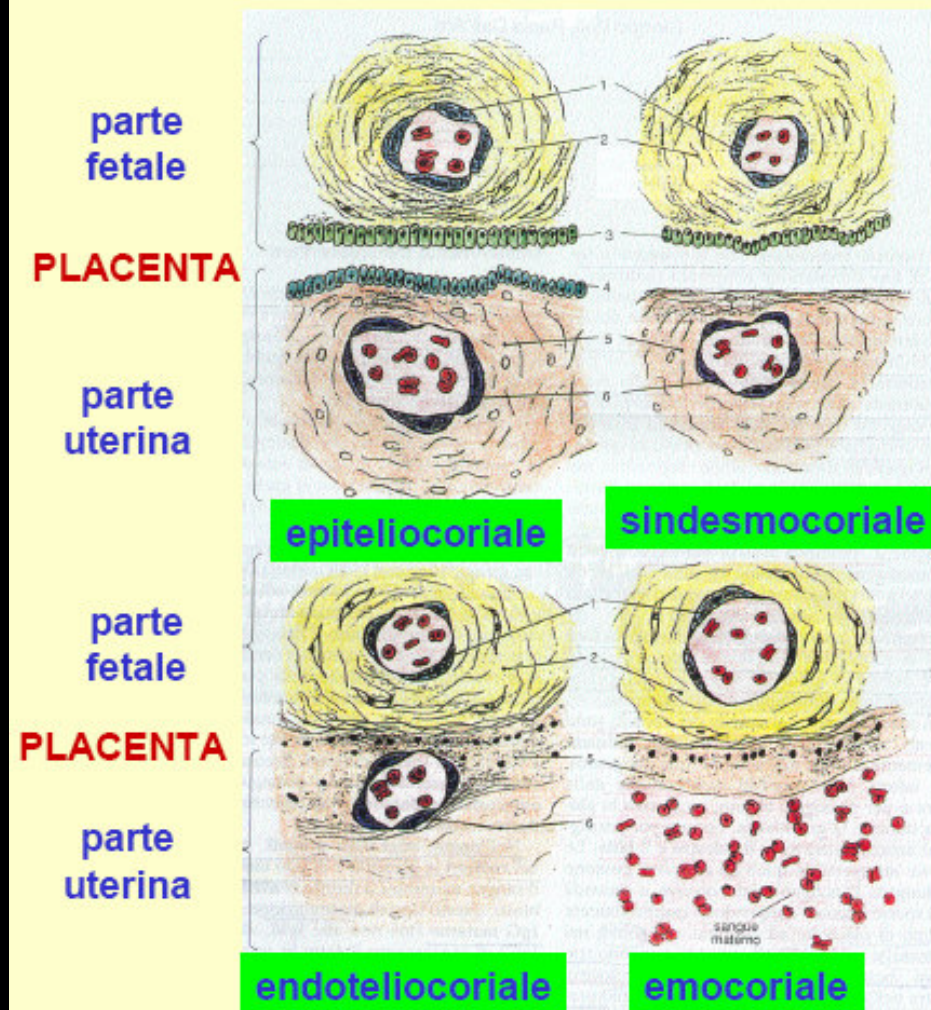
**Placenta epiteliocoriale**  
(suini,cavalli)e **sindesmocoriale**  
(ruminanti):

- No passaggio transplacentare delle Ig
- Ab ricevuti solo attraverso il colostro,ricchissimo di Ab:IgG,IgA,IgM nelle ultime settimane della gravidanza.

**Placenta endotelicoriale**  
(cani e gatti):solo IgG al feto.

**Placenta emocoriale**  
(uomo,altri primati,coniglio):

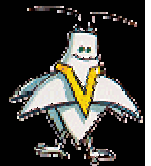
- IgG materne al feto.
- IgA (per proteggere l'apparato gastro-intestinale) attraverso il colostro e il latte materno.



1: endotelio dei vasi sanguigni fetali; 2: connettivo del corion; 3: epitelio coriale; 4: epitelio dell'utero; 5: connettivo dell'endometrio; 6: endotelio dei vasi sanguigni materni. (Grosser)

# Agenda

- Immunizzazione
- Vaccini
- Antisieri
- Anticorpi monoclonali





## Storia:

Nel 1778, il medico inglese **EDWARD JENNER** utilizzò il pus di una vacca infetta da vaiolo per immunizzare il figlio dalla malattia.

Vista la provenienza del materiale immunizzante, rimase il nome di vaccino (dal latino *vaccinus*: "di vacca") a tutti i composti analoghi.

(L'eradicazione del Vaiolo si ebbe solo nel 1980).



# IMMUNIZZAZIONE ATTIVA

## VACCINAZIONE

Preparazione antigenica → VACCINO:

- **Microrganismo (batterio, virus, protozoo)**
- **Frazioni glicoproteiche del M.o.**
- **Tossine del M.o.**

Somministrata per via parenterale o orale.

2 ml = quantità standard inoculazione di un vaccino.

Il soggetto è immune dopo 15-30 gg attraverso le fasi di Processazione, Presentazione, Attivazione e Proliferazione clonale.

Il **VACCINO** per essere efficace deve:

- **PERDERE** quegli attributi che consentono al M.o. di danneggiare l'ospite.
- **MANTENERE** le caratteristiche antigeniche del patogeno.
- **INDURRE** una risposta immunitaria specifica (umorale o cellulo-mediata).



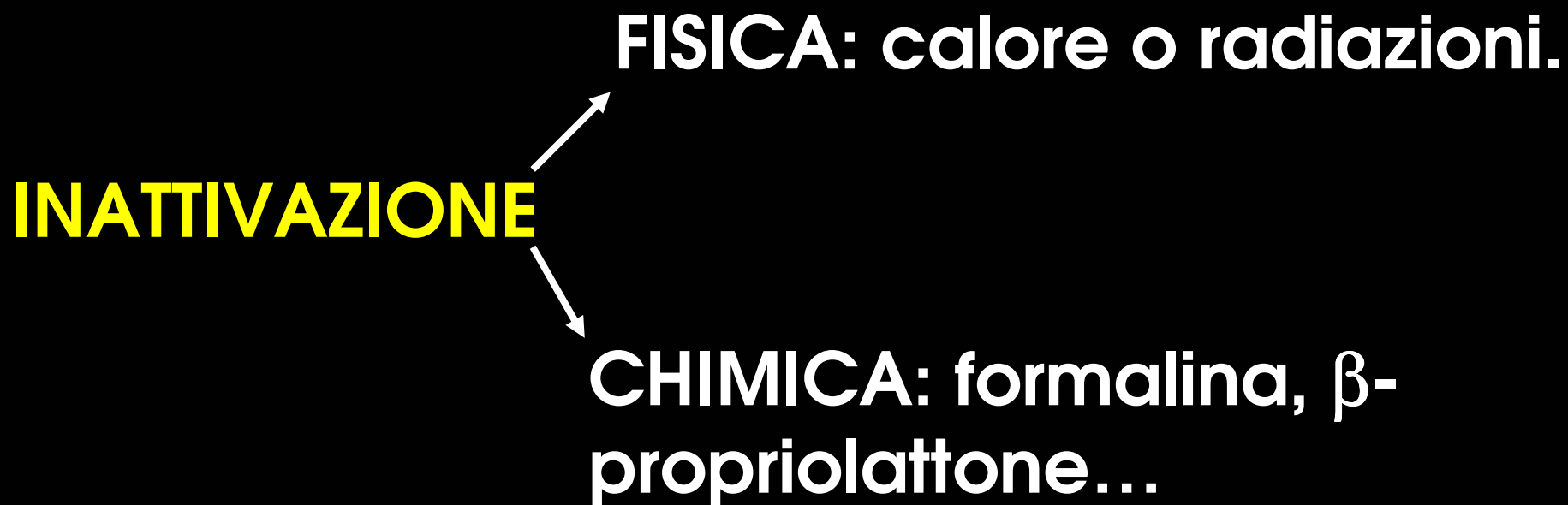
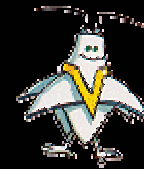
# Vaccini Inattivati (spenti o uccisi):

- M.o. completi (virus o batteri)
- Stipiti virulenti inattivati totalmente: eliminata la virulenza senza alterare gli Ag di superficie.

La capacità replicativa, quindi la virulenza, è insita nell'Ac. Nucleico e l'inattivazione avviene a questo livello.

Es: VS Rabbia, Influenza, morbo di Aujeszky, Afta, Rotarivirus, malattie delle mucose.

Possiamo includere in questo tipo di vaccini anche le **ESOTOSSINE BATTERICHE**, modificate con formalina, in modo che perdano il loro potere tossico, ma conservino le proprietà Antigeniche. Queste sono dette **ANATOSSINE**.



**+ ADJUVANTI (più spesso emulsioni di oli minerali) che potenziano l'immunogenicità.**

# Pregi e difetti:

- Inducono l'immunità senza rischi d'infezione
- Possono essere usati in animali non in perfette condizioni
- Danno una buon risp. Umorale
- Sono però meno efficaci nella risp.cellulo-mediata
- Si può avere un'eccessiva alterazione del m.o. con scomparsa di alcuni disegni antigenici

Per mantenere un buon livello di immunità:

- Sono necessarie numerose vaccinazioni con richiami semestrali o annuali
- È necessario un alto titolo virale



# Vaccini vivi attenuati:

- M.o. completo (batterio o virus)
- Potere patogeno viene attenuato con diverse procedure

## **ATTENUAZIONE:**

1. Passaggio in:
  - specie animali non recettive
  - colture cellulari
  - uova embrionate

La maggior parte dei vaccini umani e veterinari sono stati allestiti con questa procedura: Febbre gialla, Morbillo, Rabbia, Peste bovina, IBR, Cimurro.

2. Impiego di virus sierologicamente correlati provenienti da un'altra specie animale (vaccini eterologhi però sospesi per motivi etici).
3. Somministrazione di un m.o. patogeno attraverso una via non naturale
4. Impiego di mutanti "temperatura sensibili" (es: malattie respiratorie del bovino).

# Pregi

Le somministrazioni ad un organismo inducono un'infezione molto blanda con stimolazione bilanciata delle risp. immunitaria (umorale, locale, cellulo-mediata).

Possono essere somministrati localmente per contatto diretto con le mucose.

Evocano una risposta verso tutti gli Ag del patogeno.

I dosaggi necessari risultano più bassi: minor costi.

Immunità di maggiore durata e più efficace.



# Difetti

**Occorre mantenere la catena del freddo per mantenere inalterate le caratteristiche del vaccino.**

**Per alcuni virus gli stipiti vaccinali possono dare infezione latente.**

**Rischio di violenza residua o retromutazioni.**

**Rischio di contaminazioni dei prodotti vaccinali.**

**Uso sconsigliato per femmine in gravidanza, in soggetti immunodepressi e in animali troppo giovani.**

# Vaccini purificati costituiti da subunità



Costituiti da quelle frazioni di virioni che sono coinvolte nella virulenza e quindi nelle reazioni immunitarie anti-infettive:

- proteine del capside (virus nudi)
- Le GP di superficie (virus con envelope)

Sono estratti con mezzi chimici.

Concentrati.

Somministrati con aggiunta di adjuvanti o complessi immunostimolanti (iscom).

Sono sprovvisti di potere infettante poiché non contengono l'Ac.nuclico virale.

Es: VS Epatite virale B, V.Epatite A, V.di Epstein-Barr, Influenza.

# Pregi e Difetti

- Buona stabilità
- Trascurabile tossicità
- NO infettività residua
- NO fenomeni allergici
- Buona risp. Umorale
- Scarso stimolo dell'immunità locale e cellulo-mediata
- Ridotto potere immunogeno per le piccole dimensioni delle frazioni antigeniche e l'incapacità di replicarsi.



# Vaccini a delezione genica

Si creano stipiti attenuati mediante manipolazione genetica.

- Si sequenzia il genoma del m.o.
- Si identificano i geni responsabili della virulenza.
- Si eliminano (delezione).

Se la delezione avviene a livello di proteine immunogene non essenziali per la replicazione del m.o. si potranno individuare:

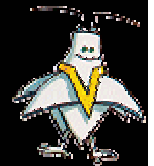
## GLI ANIMALI VACCINATI

Non producono Ab verso la proteina il cui gene è stato deleto.

## GLI ANIMALI INFETTI

A contatto con il virus selvaggio producono Ab verso la proteina.

Es: VS Malattia di Aujeszky (*Porcine Herpesvirus*), IBR.



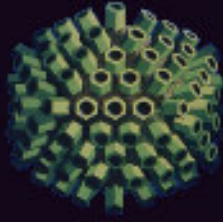
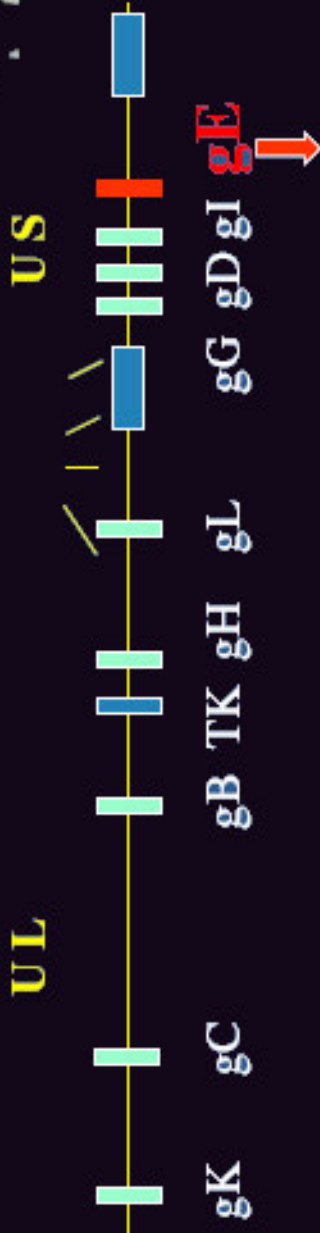


# Vaccini IBR deleti (marker g E -)



**DNA**

136 kb



Delezione nei vaccini marker

gB gD gH gK gL: essenziali per la replicazione virale

gG gI gC **gE TK**

: non essenziali per la replicazione virale,  
ma influenzano l'interazione virus-ospite e la virulenza



delezione genomica



attenuazione ma conservata replicazione *in vitro*



# Vaccini sintetici

Sintesi di sequenze amminoacidiche che rappresentano gli epitopi del m.o. e stimolano una risp. anticorpale di tipo protettivo.

Le sequenze amminoacidiche sono esposte esternamente e sono idrofiliche.

Es: VS Afta Epizootica

## Pregi

simili a quelli dei vaccini deleti.

## Difetti

Ridotto potere immunogeno per le piccole dimensioni dei peptidi e infatti devono essere coniugati a proteine "carrier".



# Vaccini a virus ricombinanti

Si manipola il genoma di alcuni virus con tratti del corredo genetico del virus per il quale si vuole vaccinare:

Corredo genetico di un virus

+

Un gene di codifica per un GP estranea

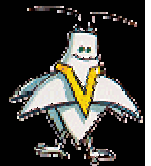
Es: Afta epizootica, Rabbia, Leucemia Felina.

## Pregi

- Resistenti agli agenti fisico-chimici
- Hanno genoma consistente e corposo
- Si possono inserire più geni che codificano per proteine di diversi virus (vaccini polivalenti)

# Agenda

- Immunizzazione
- Vaccini
- Antisieri
- Anticorpi monoclonali





# IMMUNIZZAZIONE PASSIVA

## ARTIFICIALE:

Trasferimento di ANTICORPI SPECIFICI (siero immune).

Per avere una protezione immediata verso un determinato patogeno o tossina, l'inoculazione di Ab specifici è estremamente valida.

Diversamente dall'immunità attiva che si istaura dopo 15-20 gg ma che perdura per mesi o anni, L'IMMUNITA' PASSIVA fornisce protezione immediata ma di breve durata (20-30gg).

# Siero immune e Iperimmune

Il SIERO IMMUNE si ottiene artificialmente e contiene alte concentrazioni (alto titolo) di Ab nei confronti di un determinato Ag; Contiene però anche altri Ab, a meno che non sia preso da un animale notobiotico (animale allevato in ambiente sterile che viene a contatto solo con l'Ag di cui si vuole il siero immune). Il siero immune di referenza si ottiene inoculando un Ag in una cavia e ripetendo l'inoculazione a distanza di 30 gg; dopo 30 gg dalla seconda inoculazione si salassa l'animale. Se l'inoculazione dell'Ag si ripete per più di 2 volte si parla di SIERO IPERIMMUNE. La differenza tra i due tipi di sieri è che quest'ultimo è scarsamente immunologico e quindi necessita di più inoculazioni.

Immunità passiva artificiale:

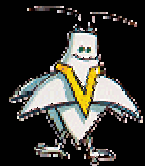
**Antisieri prodotti immunizzando un animale di specie diversa**

Un esempio sono le Ig contro la tossina *tetanica*.

Queste vengono prodotte immunizzando ripetutamente il cavallo con il tossoide ( o anatossina) tetanico e concentrando la frazione gammaglobulinica del siero del sangue.

L'antisiero ottenuto può essere inoculato e quindi proteggere dall'effetto letale della tossina un individuo a rischio.

Questi tipi di antisiero vengono preparati anche contro il botulismo, il veleno di serpenti e di ragni.



**Immunità passiva artificiale:**

**Antisieri provenienti dalla stessa specie**

**Il loro impiego impedisce la comparsa di fenomeni anafilattici (reazioni allergiche causate da ipersensibilità e allergia verso una sostanza antigenica).**

**Il rischio è limitato a causa della minore immunogenicità del siero di un individuo per un altro della stessa specie.**



**Immunità passiva artificiale:**

**Sieri iperimmuni (antisieri) ottenuti da  
individui che hanno superato la malattia  
naturale o che sono stati vaccinati**

**Esistono antisieri di uomo contro il morbillo, la pertosse, il tetano e la rabbia.**

**In campo veterinario sono stati allestiti quelli:  
nel cavallo contro il tetano; nel bovino per  
la protezione verso il carbonchio ematico;  
nel cane contro il cimurro; nel gatto contro  
la panleucopenia.**



# Agenda

- Immunizzazione
- Vaccini
- Antisieri
- Anticorpi monoclonali



**Immunità passiva artificiale:**

**Anticorpi monoclonali (mAb)**

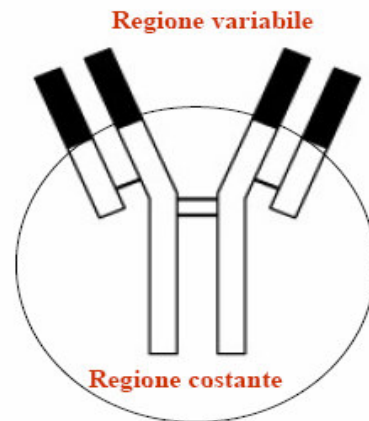
**Anticorpi di una singola classe anticorpale e diretti verso un singolo determinante antigenico.**

**Diversi da quelli policlonali che invece appartengono a diverse classi di Ig e sono diretti contro tutti gli eventuali Ag presenti nel m.o.**

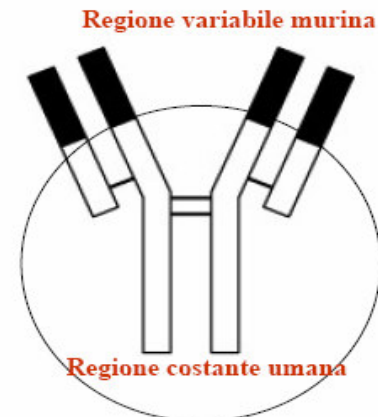
**Attualmente vengono utilizzate Ig murine che in altre specie possono indurre la temuta sensibilizzazione.**

## Anticorpi monoclonali chimerici

Ab monoclonale murino



Ab monoclonale chimerico



Per risolvere questo problema sono state messe a punto tecniche di transfezione che consentono di creare nuovi Ab con l'inserimento nelle cell mielomatose di topo di un'associazione di geni murini e umani, in modo che la cell produca Ab le cui regioni variabili (Fab) sono codificate da geni di topo, mentre le regioni costanti (Fc) sono codificate da geni umani.

Questi sono detti mAb chimerici.

Questi hanno la specificità di legame con l'Ag propria del monoclonale murino, ma le funzioni effettrici proprie degli Ab umani. Sono caratterizzati quindi da un'elevata specificità per il patogeno o la tossina e nel contempo innocuità per il ricevente.

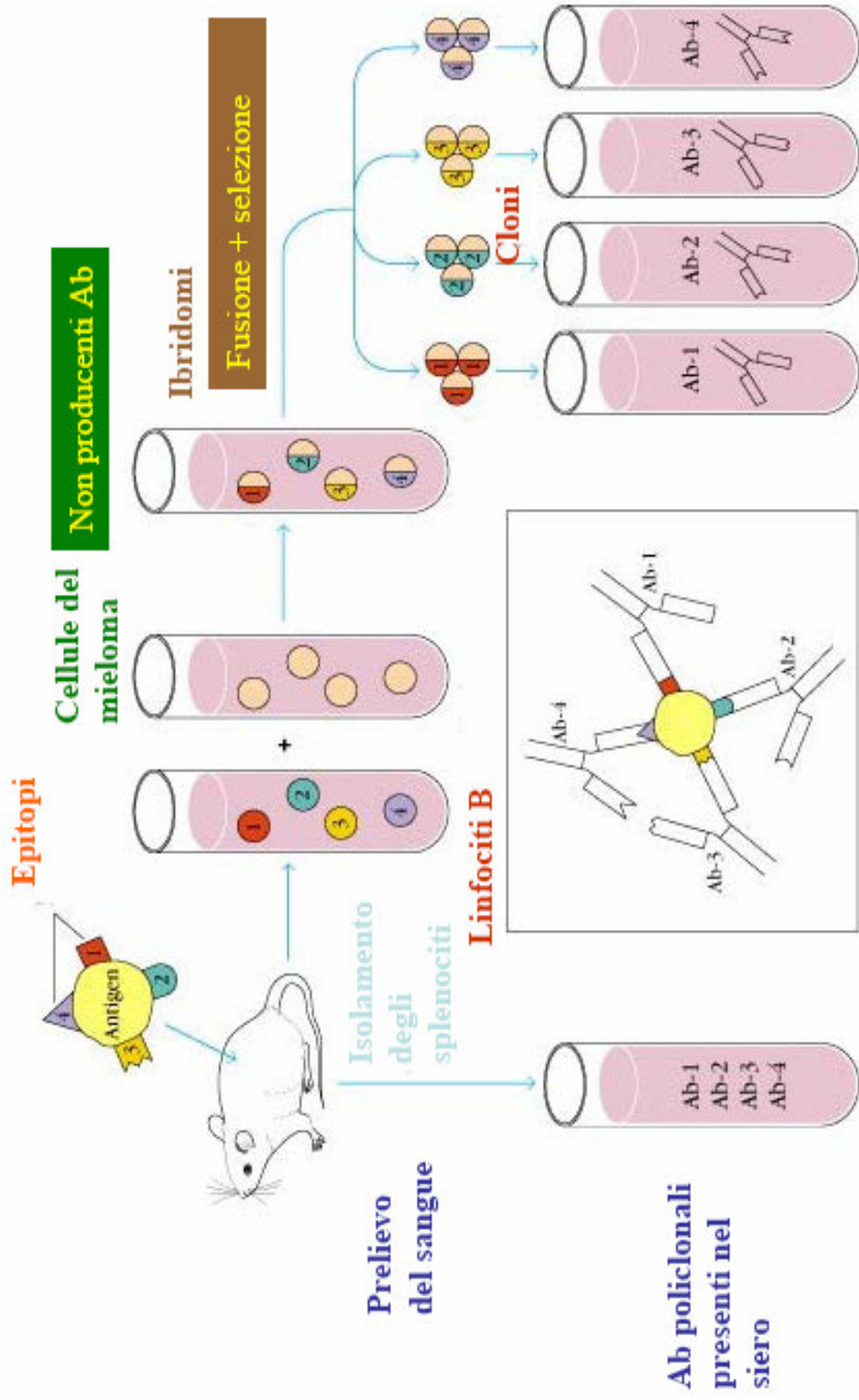


## **Come si ottengono gli Anticorpi monoclonali:**

- Inoculazione ripetuta dell'antigene contro cui si vogliono produrre Ab in un topo.
- Asportazione della milza dell'animale dopo alcune settimane.
- Ibridazione cellulare: IBRIDOMA (1 cell splenica immunocompetente + 1 cell di un mieloma multiplo con la capacità di crescere illimitatamente).
- Individuazione, mediante clonazione e screening dei cloni ottenuti, delle singole cellule che producono gli Ab di interesse: fonte inesauribile di Ab monospecifici.



# Preparazione degli anticorpi monoclonali



Ab monoclonali prodotti dagli ibridomi

## **Impiego degli Anticorpi monoclonali:**

**Vengono utilizzati contro alcune infezioni virali, per evitare il rigetto da trapianto, come strumento di diagnosi nei test di gravidanza, o per individuare malattie infettive come l'epatite C. Sono usati anche contro i tumori con grande successo, infatti questi Ab sono in grado di riconoscere la cell del tumore che normalmente non viene riconosciuta dagli altri Ab prodotti dall'organismo. Questo avviene perché questi tipi di Ab sono prodotti in laboratorio a partire dall'antigene specifico della singola cell tumorale con la risposta che vede l'Ab dirigersi in modo selettivo proprio contro quelle cell che possiedono quel determinato Ag.**

