

Il sistema complemento

- Il **sistema del complemento**, insieme agli anticorpi, è un elemento essenziale del sistema immunitario nei meccanismi di difesa umorali contro gli agenti infettivi.
- Esso è costituito da una serie di proteine circolanti e di membrana, capaci di interagire reciprocamente e con le membrane cellulari.
- L'attivazione a *cascata* delle sue proteine solubili, che convenzionalmente vengono chiamate *componenti*, è alla base di attività biologiche varie come la lisi cellulare, batterica o virale; queste si introducono nelle membrane degli agenti patogeni provocando su di esse pori che portano alla lisi.
- Durante l'attivazione del complemento si ha inoltre il reclutamento di varie cellule immunocompetenti, quali cellule fagocitarie (monociti, macrofagi, polinucleati), linfociti B e linfociti T.

Il termine complemento è stato coniato da Jules Bordet circa un secolo fa e si riferisce alla funzione delle proteine che lo compongono: **esse complementano la funzione degli anticorpi nell'eliminazione dei microbi.**

Charles Bordet, nel 1919, vinse il premio Nobel, grazie alla scoperta delle proteine del complemento.

Egli aveva osservato che, il siero fresco contenente anticorpi specifici verso un batterio X (siero immune) era in grado di lisare (distruggere) i batteri X contenuti in una coltura cellulare.

Ma se lo stesso siero immune veniva riscaldato a $56^{\circ} C$ prima di essere aggiunto alla coltura batterica perdeva la capacità di lisi nei confronti dei batteri X.

Siccome a $56^{\circ} C$ gli anticorpi non vengono danneggiati, doveva esserci qualche altra molecola in grado di complementare la funzionalità degli anticorpi.

La dimostrazione della presenza delle proteine del complemento nel siero, venne ottenuta da Jules Bordet in seguito all'osservazione che, aggiungendo alla coltura batterica e al siero immune preriscaldato a $56^{\circ} C$, un siero fresco non immune e quindi non contenente gli anticorpi verso i batteri X, i batteri venivano nuovamente lisati.

Nel siero sono contenute dunque delle proteine termolabili che aiutano gli anticorpi nella lisi dei batteri.

**Queste proteine vennero così chiamate
proteine del complemento o sistema del complemento.**

Il sistema del complemento consiste di circa **trenta proteine** presenti in tutti i liquidi organici, che vengono indicate con la lettera **C** seguita da numeri progressivi. In condizioni fisiologiche queste proteine sono inattive.

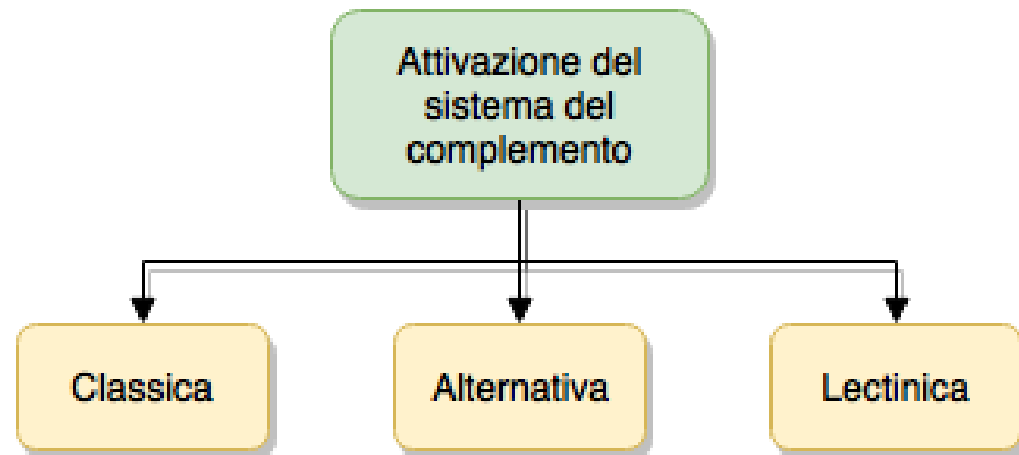
Circa il **90% delle proteine del complemento vengono sintetizzate nel fegato** mentre il restante 10% viene sintetizzato principalmente dai monociti, macrofagi e fibroblasti.

L'attivazione delle proteine del complemento comporta una sequenza di proteolisi in cui ciascuna proteina viene divisa in due parti. Di queste due parti una funziona come enzima proteolitico e fa continuare la reazione, l'altra invece funziona come "anafilotossina" cioè come molecola che viene rilasciata nel microambiente e stimola i processi infiammatori.

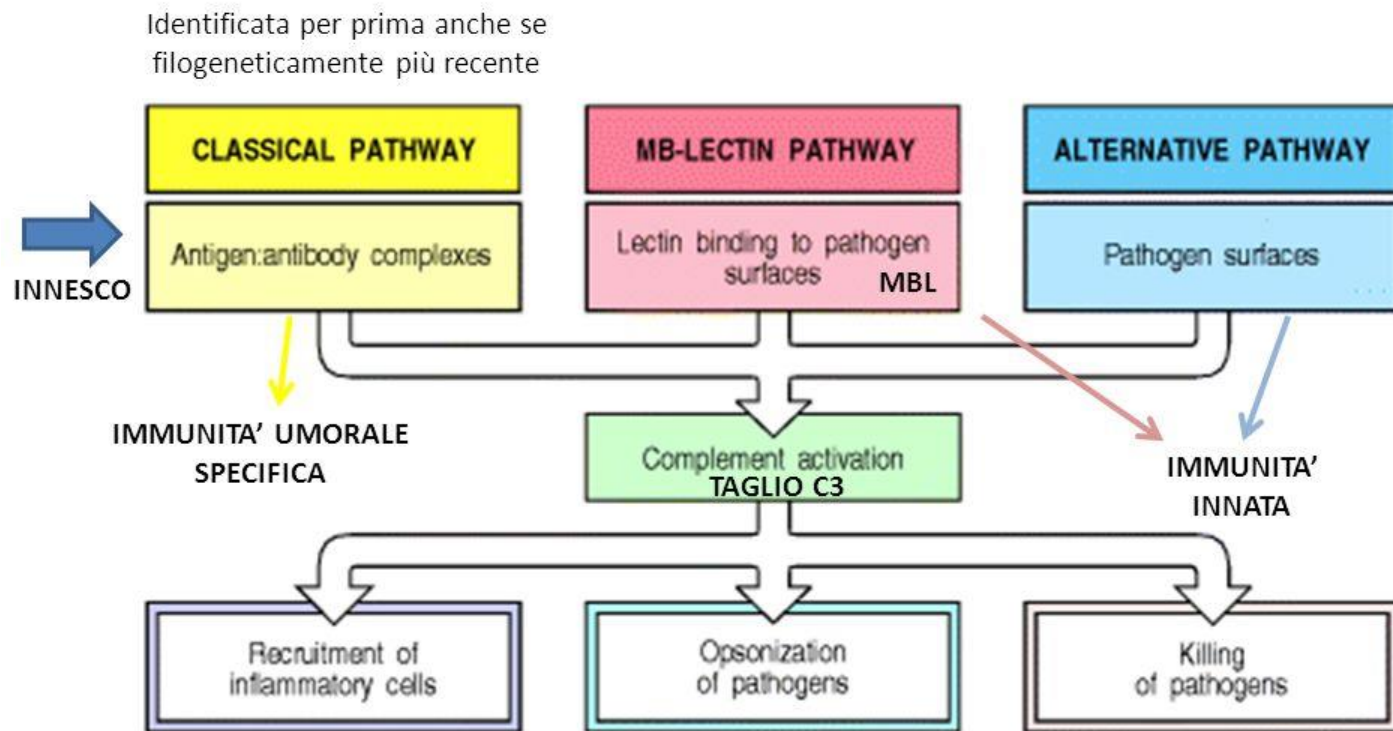
L'attivazione può avvenire attraverso una "**via classica**"
(formazione di complessi antigene-anticorpo)
od "**alternativa**"
(es. endotossine, polisaccaridi complessi, IgA).

Il punto chiave è rappresentato, in entrambi i casi, dall'attivazione della frazione C3.

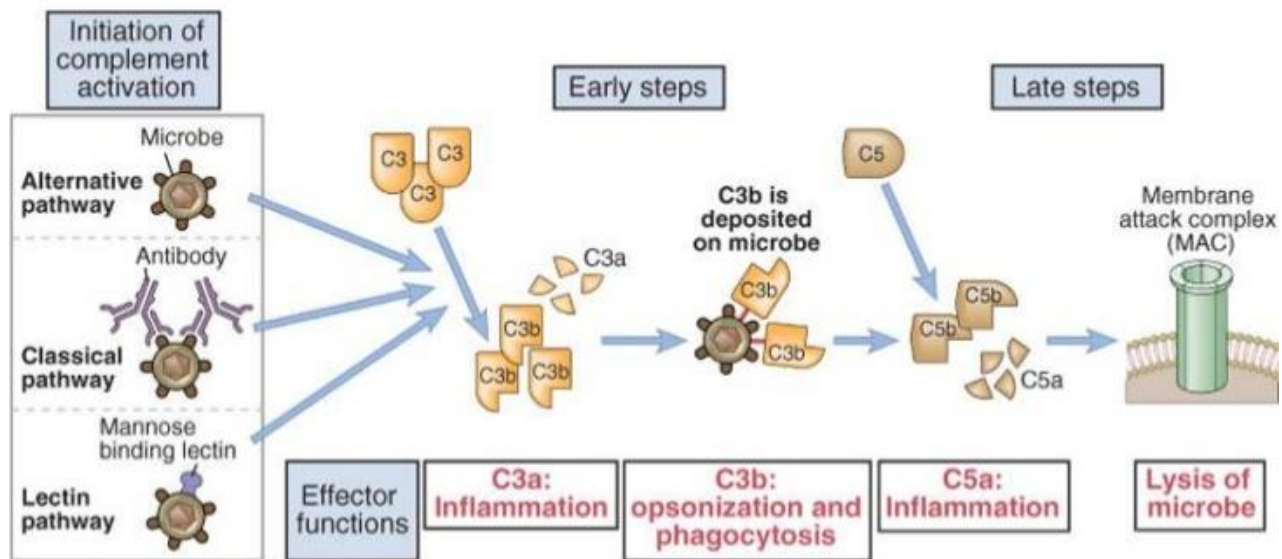
In generale, possiamo dire, che entrambe le vie vengono attivate mediante meccanismi e molecole diverse, ma il risultato di questa complicata rete di attivazione è quello di avere il microorganismo ricoperto dal fattore C4b C2b detto anche C3 convertasi.

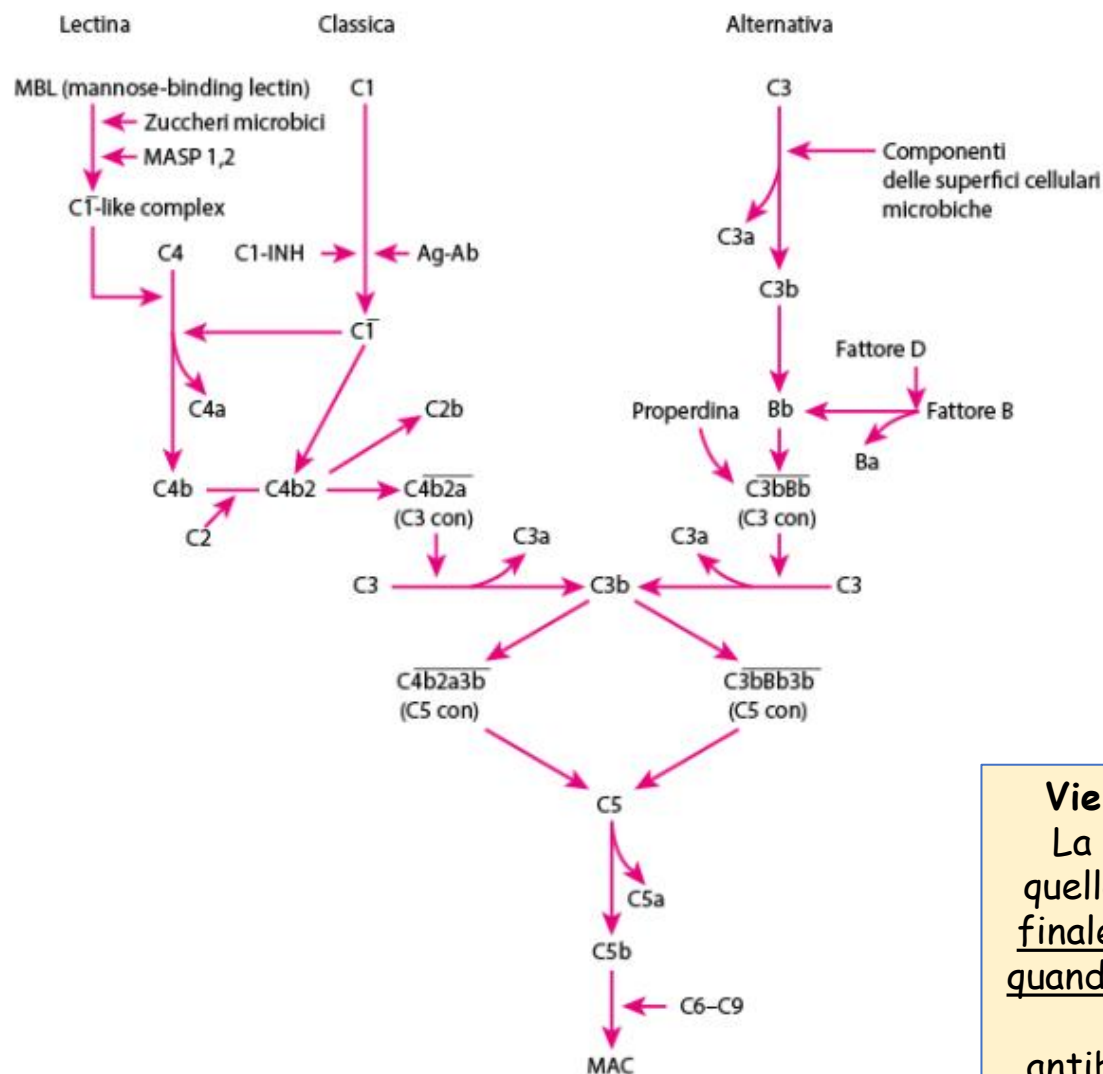


vie di attivazione



Sistema del complemento.





Vie di attivazione del complemento

La via classica, quella della lectina e quella alternativa convergono in una via finale che è comune a tutte e tre le vie, quando la C3 convertasi (C3 con) divide il

C3 in C3a e C3b. Ab o Ac =

antibody/anticorpo; Ag = antigene; C1-INH = C1 inhibitor;

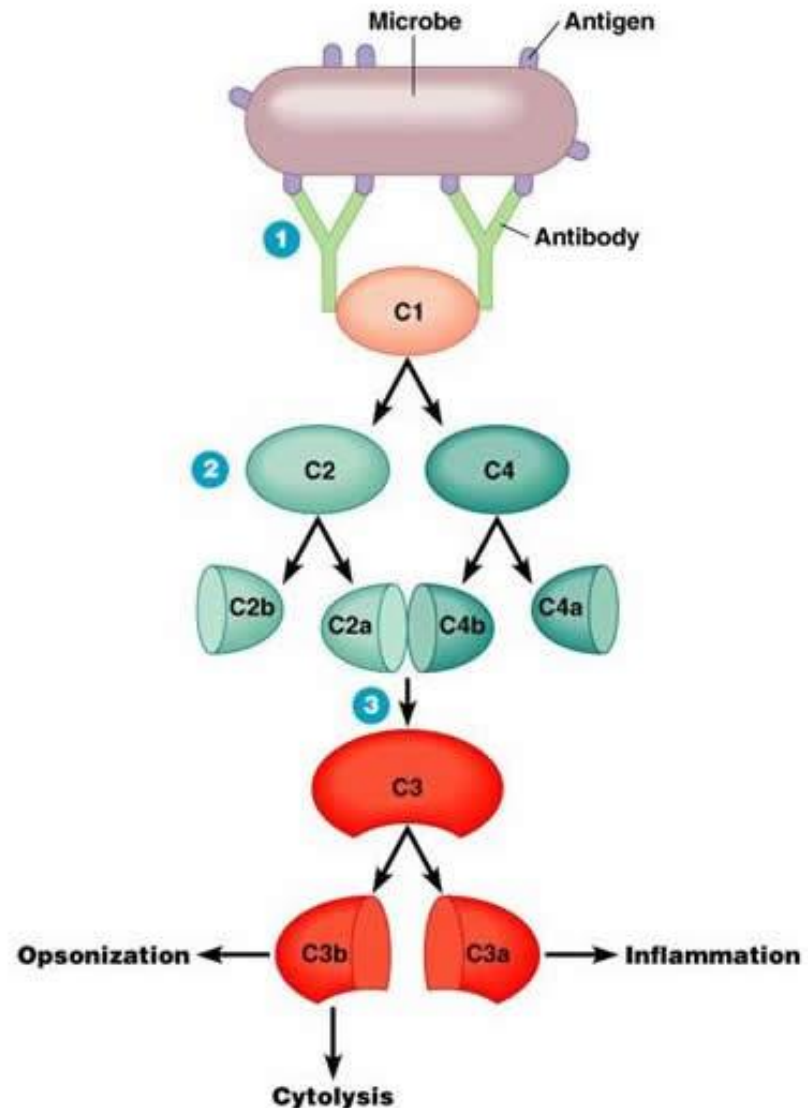
MAC = membrane attack complex;

MASP = MBL-associated serine protease;

MBL = mannose-binding lectin.

Classical Pathway

C1 binds to antigen - antibody complexes.
(Antibody binding to antigen is called "antigen fixation"; when an antigen-antibody complex binds C1 this is called "complement fixation")
C2 and C4 associate and this acts as C3 convertase.



- 1 C1 is activated by binding to antigen-antibody complexes.
- 2 Activated C1 splits C2 into C2a and C2b and C4 into C4a and C4b.
- 3 C2a and C4b combine and activate C3, splitting it into C3a and C3b (see also Figure 16.9).

Alternative Pathway

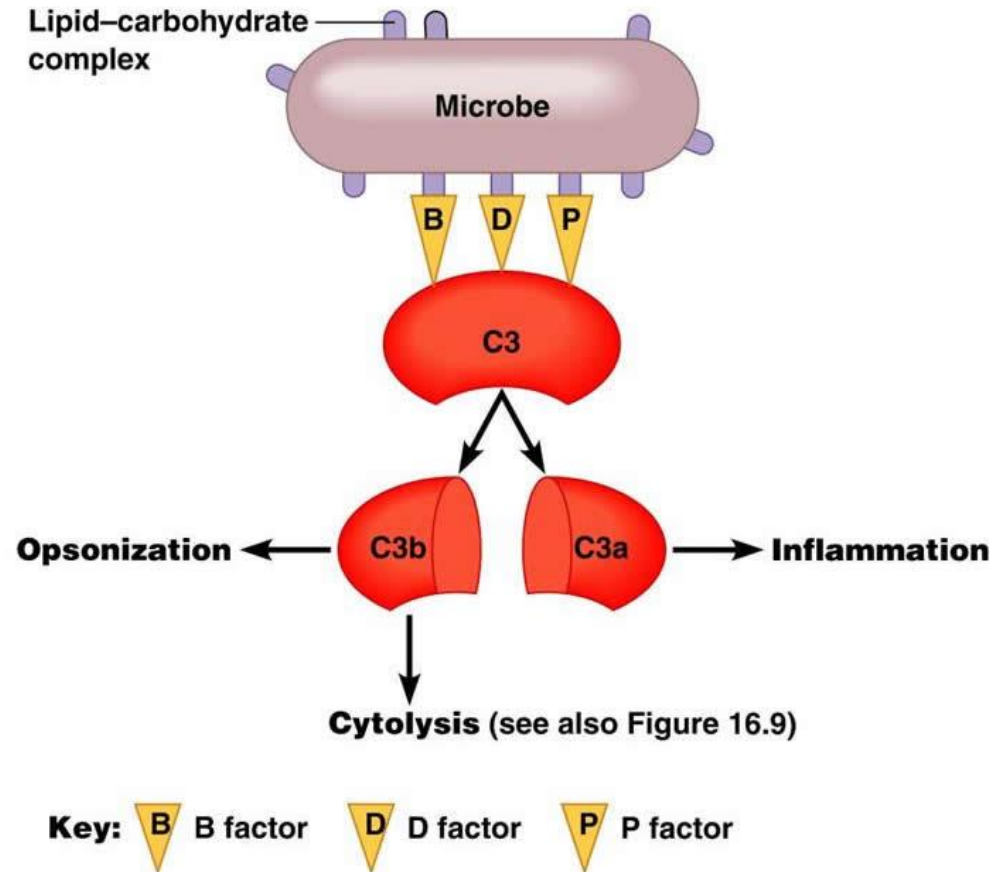
Factor B, factor D, factor P, and C3b bind to certain cell wall polysaccharides (i.e. peptidoglycan) to activate C3b.

C3 undergoes autolysis to provide C3b, which is very unstable and has a short half-life.

Factor B stabilizes the C3b.

Factor D cleaves factor B to produce a C3b-factorBb molecule; this acts as C3 convertase.

Properdin, Factor P, stabilizes the C3b-factorBb C3 convertase.

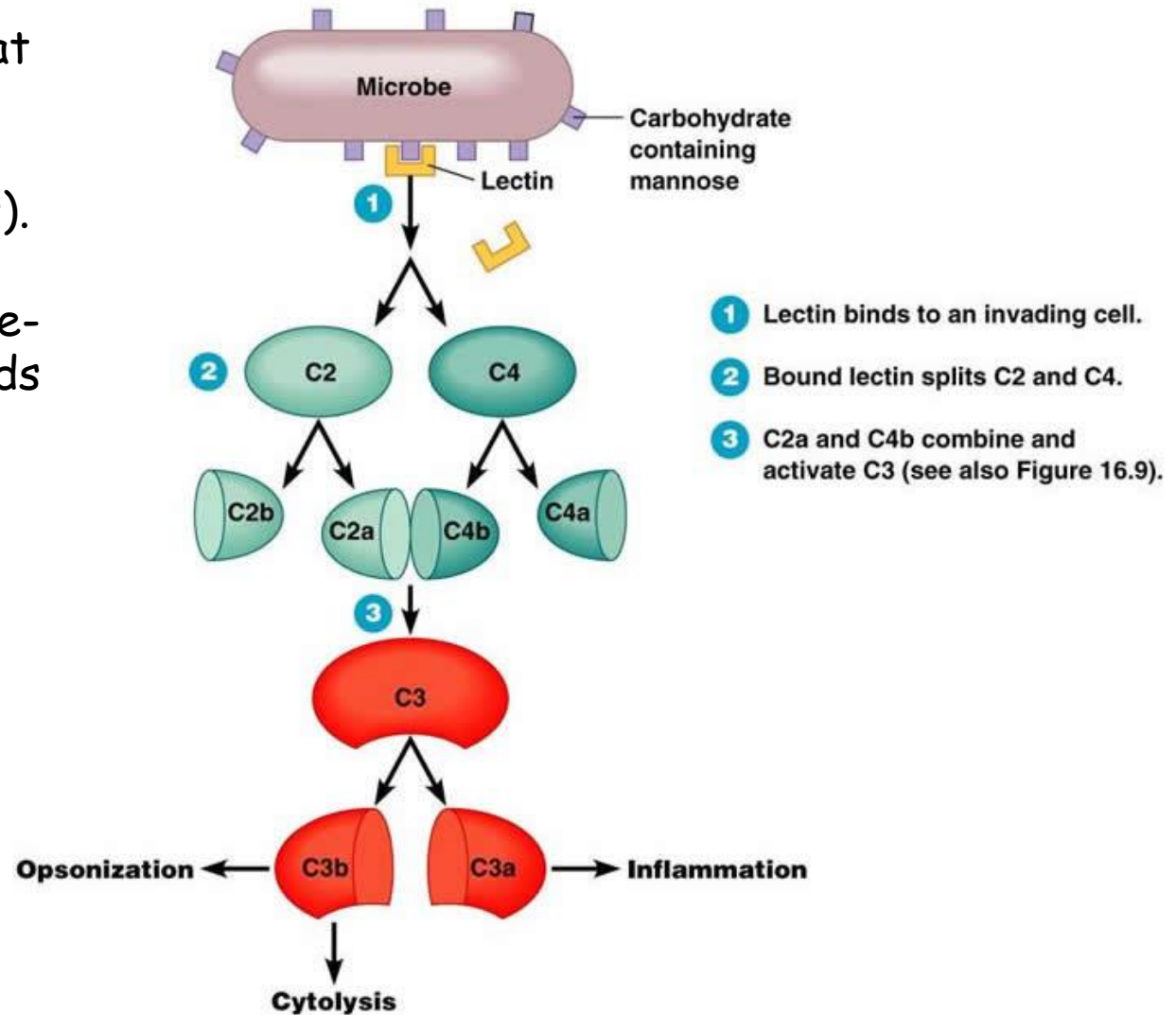


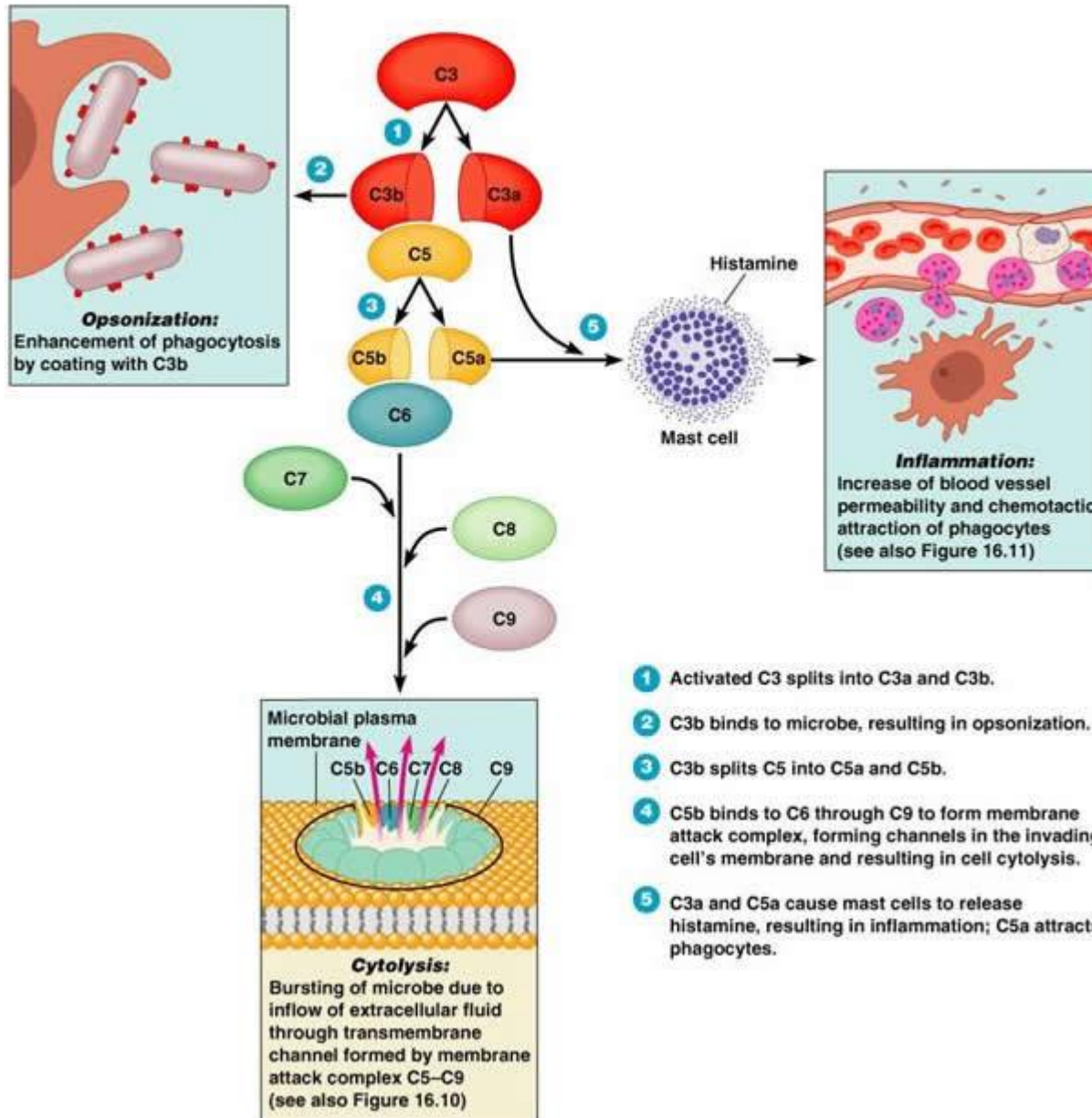
The Lectin Pathway:

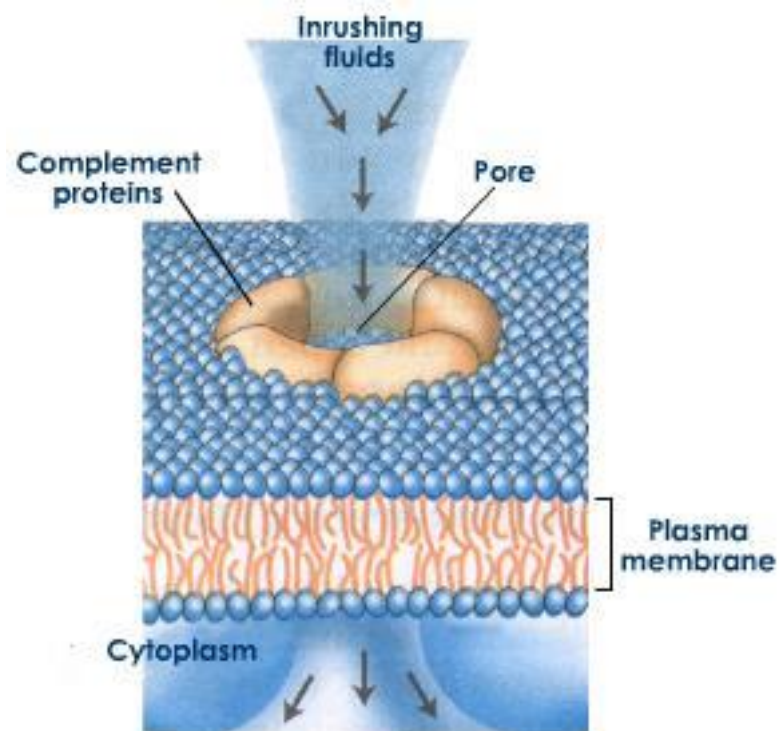
Phagocytosis by macrophages induces release of chemicals that stimulate the liver to produce carbohydrate binding proteins (lectins).

One such lectin, mannose-binding lectin (MBL) binds to mannose on bacterial cells walls and on some viruses.

MBL opsonizes and activates C2 and C4 to activate C3.







Complement proteins creating a hole
in the plasma membrane

Altre funzioni del sistema del complemento:

- **Eliminazione dei complessi antigene-anticorpo**

In seguito alla risposta immunitaria rivolta verso un determinato antigene solubile, l'individuo reagisce con la formazione di anticorpi; questi si legano all'antigene relativo con formazione di complessi immuni circolanti (complessi antigene-anticorpo).

Se di dimensioni idonee e in quantità sufficiente gli immunocomplessi possono depositarsi sulle pareti vasali promuovendo una reazione infiammatoria dannosa all'organismo.

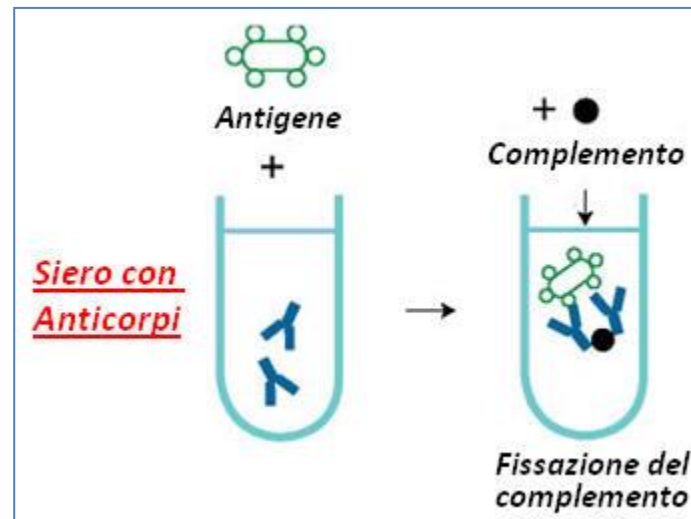
Il complemento legandosi ai complessi immuni ne promuove la solubilizzazione e la rimozione da parte delle cellule fagocitiche.

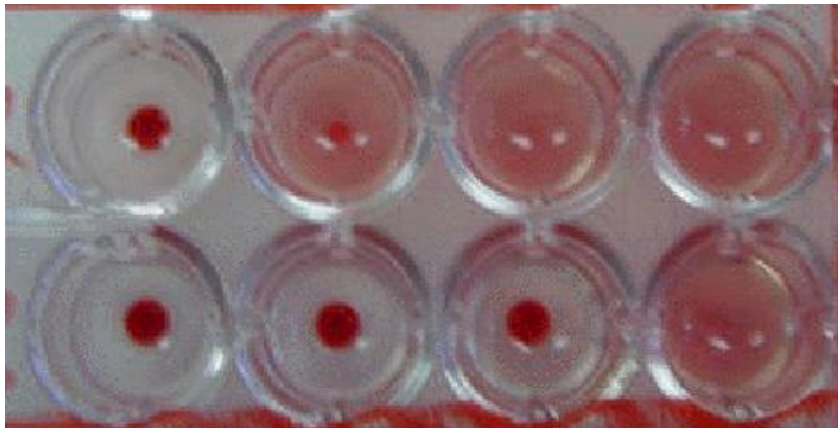
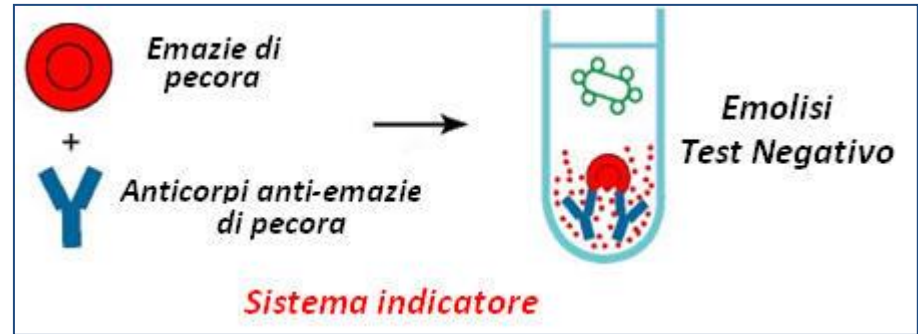
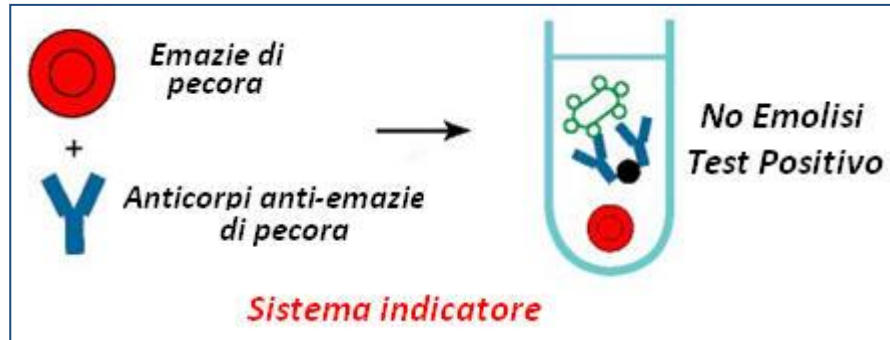
- **Attivazione dei B-linfociti**

Una proteina prodotta nella scissione del C3, chiamata C3d, interagisce con il rispettivo recettore espresso sulla membrana dei B-linfociti, recettore CR2 (CD21), innescando l'inizio della risposta umorale, cioè della produzione di anticorpi.

Reazione di Fissazione del Complemento

Con il primo step della reazione di FC si inattiva il complemento presente nei sieri da esaminare tramite un'incubazione in bagnomaria a 56° per 30 minuti.
Si diluiscono i sieri da 1/8 a 1/256 (6 diluizioni) e si aggiungono gli antigeni virali specifici





Le righe 1 e 2 sono ottenute con campioni di siero rispettivamente in fase acuta e convalescente. (usate diluizioni 1 a 2 dei sieri). Dal 1° al 4° pozzetto si passa dalla diluizione iniziale di 1/8 a 1/16 a 1/32 a 1/64 (ultimo pozzetto).

Il primo campione è positivo solo alla diluizione 1/8 mentre il secondo campione è positivo anche alla diluizione di 1/32.

L'incremento del titolo è significativo e indica una infezione recente.

Agar gel immunodiffusione (AGID) per la ricerca di anticorpi verso virus influenzali di tipo A

**L'AGID, per le specie pollo e tacchino, è considerata metodica
di riferimento o *gold standard*.**

Il test è in grado di evidenziare la reazione antigene-anticorpo
attraverso la formazione di un complesso insolubile, visibile
sotto forma di bande di precipitazione, a partire da reagenti
(antigene e anticorpo) solubili.



MATERIALI

Reagenti

Antigene virale inattivato (specifico per agar geldiffusione)

Siero iperimmune specifico per l'antigene in esame
(siero positivo di riferimento)

Acqua distillata

Cloruro di sodio (NaCl)

Agar Noble

Sieri in esame

..

Strumenti

Piastre Petri da 90 mm di diametro

Vetreria sterile (cilindri graduati e becher)

Forno a microonde

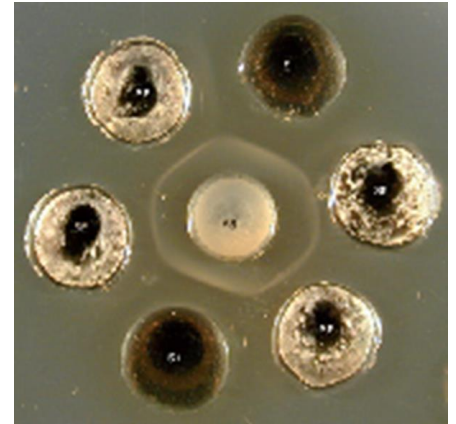
Bilancia tecnica

Micropipette a volume variabile 5-50 μ l

Stampo in acciaio

Illuminatore a luce diffusa (o lampada da tavolo)

Camera umida



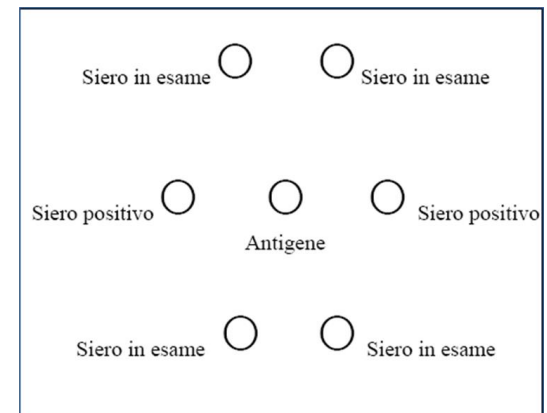
Il test di immunodiffusione su gel di agar (AGID) rileva gli anticorpi circolanti contro gli antigeni specifici del gruppo influenzale di tipo A, vale a dire la ribonucleoproteina (RNP) e la proteina matrice (M)

AGID non è raccomandato per la rilevazione degli anticorpi del virus dell'influenza A (IAV) nelle anatre e in altri uccelli selvatici a causa della variazione nella risposta immunitaria e della produzione incoerente di anticorpi contro l'RNP

L'AGID viene allestito utilizzando uno schema di sei pozzetti attorno a un pozzetto centrale nell'agar.

La base del test AGID è la migrazione simultanea di antigene e anticorpi l'uno verso l'altro attraverso una matrice di gel di agar. Quando l'antigene e gli anticorpi specifici entrano in contatto, si combinano per formare un precipitato che rimane intrappolato nella matrice del gel e produce una linea visibile.

La linea della precipitina si forma dove la concentrazione dell'antigene e degli anticorpi è ottimale.

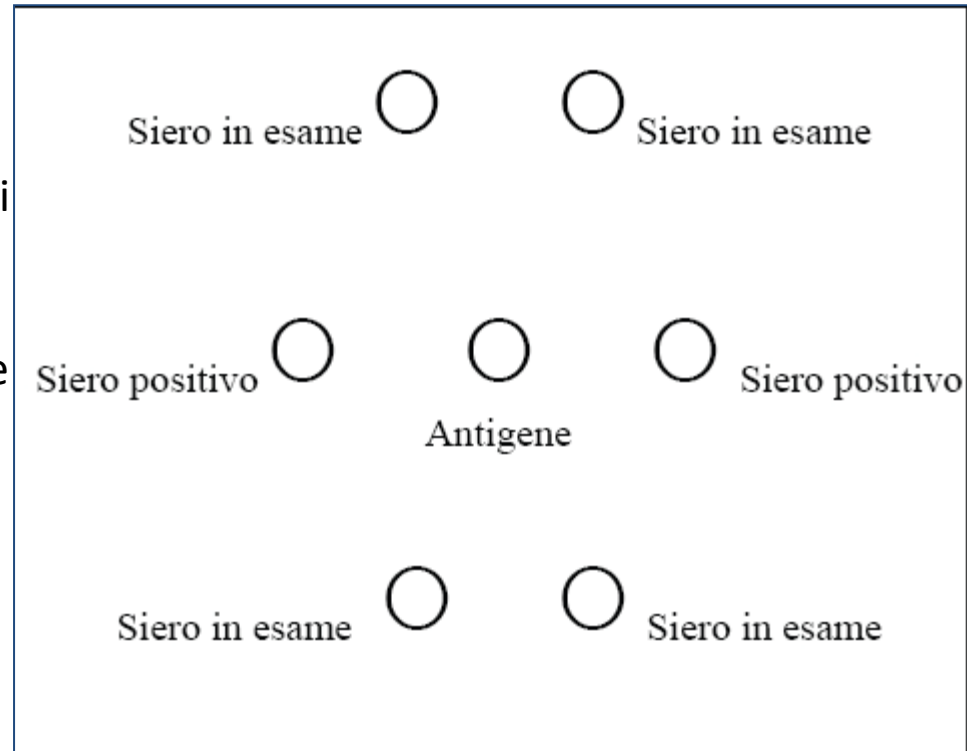


Esecuzione dell'analisi

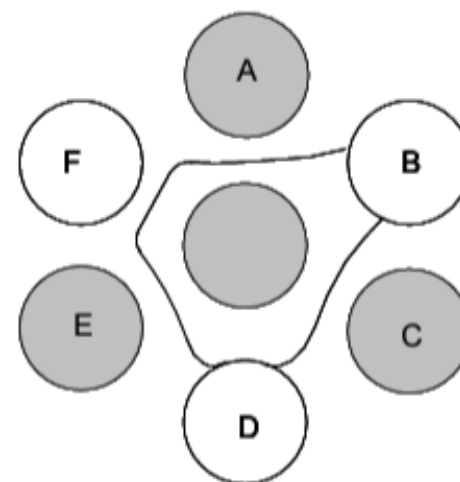
Portare a temperatura ambiente un numero sufficiente di piastre per i campioni in esame e contrassegnare le piastre sulla parte laterale con il numero identificativo dei campioni
Praticare sullo strato di agar fori come indicato nello schema, aspirando/rimuovendo l'agar dai pozzetti

Distribuire 25 μ l di antigene (Ag) nel pozzetto centrale e 25 μ l di antisiero positivo (S+) in due pozzetti periferici diametralmente opposti, e i sieri in esame (SE) nei rimanenti pozzetti, in senso orario

Incubare le piastre in camera umida a temperatura ambiente per 48 ore

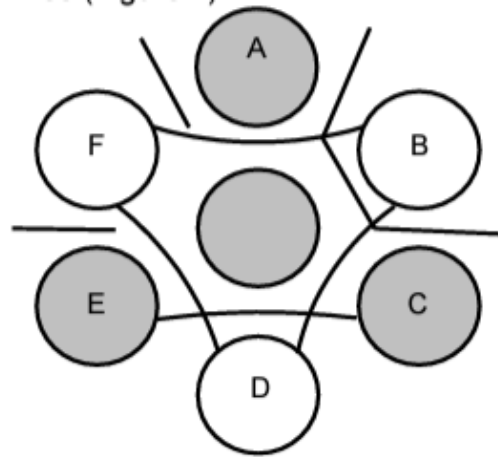


Reazione positiva: le linee di controllo si uniscono e formano una linea continua (linea di identità) con la linea tra il siero del test e l'antigene. La posizione della linea dipenderà dalla concentrazione di anticorpi nel campione sconosciuto. I campioni debolmente positivi potrebbero non produrre una linea completa tra l'antigene e il siero del test, ma potrebbero solo piegare la punta o l'estremità della linea di controllo verso l'interno verso il pozzetto del test



Pattern di test di immunodiffusione con antigene di riferimento nel pozzetto centrale;
siero di controllo di riferimento positivo nei pozzetti A, C ed E;
siero del test negativo nel pozzetto B;
siero del test positivo nel pozzetto F;
e siero del test debolmente positivo nel pozzetto D.

Linee non specifiche: queste linee vengono occasionalmente osservate tra l'antigene e il pozzetto del siero del test. Le linee di controllo passeranno attraverso la linea non specifica e proseguiranno nel pozzetto del siero in esame. La linea non specifica non forma una linea continua (linea di identità) con le linee di controllo positivo



Pattern di test di immunodiffusione con esempi di formazione di linee non specifiche (pozzetti **B**, **D** e **F**). Queste reazioni non sono specifiche per l'IAV e dovrebbero essere ignorate finché è possibile visualizzare le linee specifiche della precipitina. Se le linee specifiche della precipitina sono troppo deboli per l'interpretazione, il campione deve essere segnalato come "QCF" (fallimento del controllo di qualità).