

Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 89 - Maggio 1994 - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATFA Genova

www.medicalsystems.it
http://medicalsystems.editoria.com

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano



Giuseppe Fanetti

Il sistema ABO

**Dalla sierologia alla
genetica molecolare**

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

89

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1994

Caleidoscopio

Italiano

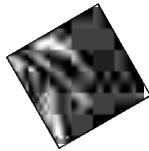


Giuseppe Fanetti

Servizio di Immunoematologia e Trasmfusionale
Ospedale "Le Scotte" Siena

Il sistema ABO

**Dalla sierologia alla
genetica molecolare**



Direttore Responsabile
Sergio Rassu

89

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1994

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Con il termine di gruppo sanguigno viene individuato un sistema di antigeni localizzato sulla membrana dei globuli rossi la cui sintesi avviene con una precisa regolazione genetica. Nel caso del gruppo ABO la sintesi è sotto il controllo degli alleli A1, A2, B, 0 i cui loci sono localizzati sul braccio lungo del cromosoma 9.

Sulla membrana antigenica sono in realtà presenti oltre 300 determinanti antigenici la cui struttura è determinata dai geni localizzati su numerosi loci cromosomici. La conoscenza di questi aspetti della Medicina rappresenta la base teorica della Medicina Trasfusionale di oggi.

L'uso del sangue come medicamento, somministrato sia localmente che per via orale, risale a tempi remoti. La prima esperienza di trasfusione si registra, tuttavia, solo nel 1818 quando James Blundell trasfuse un uomo con il sangue di un altro uomo dopo precedenti esperimenti fatti tra animale-animale e animale-uomo.

Prima ancora che Landsteiner, nel 1900, dimostrasse l'agglutinazione dei globuli rossi umani da parte del siero umano, la trasfusione divenne un popolare mezzo terapeutico.

Da allora le conoscenze si sono accumulate rapidamente: venne descritto il sistema ABO (per questo motivo Landsteiner ricevette il premio Nobel per la Medicina), il gruppo MN, P, il sistema Rh e successivamente tanti altri ma di interesse sicuramente inferiore a quello ABO che costituisce il tema di questa interessante monografia.

Abbiamo già avuto modo di conoscere ed apprezzare il dottor Giuseppe Fanetti che ha collaborato a questa collana sia dal 1986 e che, divenuto Primario del Centro di Immuno-ematologia e Trasfusionale dell'Ospedale "Le Scotte" di Siena, succedendo alla sua Maestra, la Prof.ssa A. Maria Befani, continua ancora a collaborare con uguale entusiasmo di anni fa.

Il dottor Fanetti è Specialista in Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, in Tecnica e Direzione Ospedaliera ed in Immunoematologia.

Assistente presso il Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale dell'Ospedale di Siena ne è diventato successivamente Aiuto Corresponsabile e quindi Primario.

Il dottor Fanetti è inoltre docente di Biochimica Ematologia, immunoematologia Forense e Immunologia nelle Scuole di Specializzazione di Biochimica Clinica, Medicina Legale e Ostetricia.

Tutto questo rappresenta una ulteriore garanzia per questo volume così affascinante che ripercorre con la profonda conoscenza di un esperto tutti gli aspetti teorici e tecnici del sistema ABO arrivando ad esaminarne i più moderni legati allo sviluppo delle sonde molecolari.

Sergio Rassu

Introduzione

Il sistema ABO è il primo sistema gruppo-ematico conosciuto ed è quello che ha portato un primo contributo determinante alla conoscenza degli antigeni gruppoematici e ad un corretto impiego della terapia trasfusionale.

I determinanti antigenici di questo sistema, che assumono complesse relazioni topochimiche con la membrana eritrocitaria, sono presenti anche in altre cellule, in secreti ed escreti dell'organismo. Esso presenta alcune caratteristiche peculiari rispetto ad altri sistemi gruppo-ematici come la presenza pressochè costante di anticorpi "naturali" corrispondenti agli antigeni assenti sulle proprie emazie e, per la sua particolare biosintesi, ha permesso lo sviluppo di importanti acquisizioni, non solo in campo immunoematologico, ma anche biochimico, genetico, immunologico e trapiantologico.

Non solo, ma la scoperta di cambiamenti di questi antigeni durante l'ontogenesi e nell'oncogenesi, ha ridestato un nuovo interesse nei suoi confronti.

Per questi motivi abbiamo ritenuto opportuno sintetizzare in queste note l'evoluzione delle ricerche su questo sistema, iniziando da quelle empiriche di Landsteiner che ne hanno permesso la scoperta ed una prima caratterizzazione sierologica a quelle biochimiche che hanno chiarito la biosintesi dei suoi antigeni, fino alle più recenti che utilizzano metodiche di biologia molecolare.

Quest'ultime, iniziate da pochi anni, lasciano prevedere notevoli sviluppi che, ovviamente, non si limitano ad una miglior conoscenza di questo sistema e dei suoi sottogruppi, ma anche di altri sistemi gruppo-ematici non ancora sufficientemente conosciuti o, attualmente, definiti solo con metodiche sierologiche o biochimiche.

Sierologia del sistema ABO

L'identificazione di questo sistema gruppoematico o, più esattamente isto-ematico, dato che è presente in molti tessuti dell'organismo, si deve a Landsteiner il quale nel 1900, mettendo a contatto il siero con gli eritrociti di persone diverse, osservò che alcuni, a differenza di altri, davano luogo ad una agglutinazione delle emazie.

Egli concluse che questo era dovuto alla presenza o all'assenza sulla superficie eritrocitaria di due antigeni o agglutinogeni definiti A e B.

Dato inoltre che l'esperimento venne effettuato su persone mai trasfuse o quantomeno non immunizzate, Landsteiner dedusse che ogni individuo possiede nel suo siero anticorpi naturali diretti verso l'antigene assente nei suoi eritrociti.

Pertanto il soggetto, se appartenente al gruppo A, deve possedere nel siero anticorpi anti-B, se di gruppo B, anticorpi anti-A e, se di gruppo 0, anti-A e anti-B.

Nel 1902 Von Decastello e Sturli, continuando questi esperimenti, identificarono il gruppo AB.

Questo sistema gruppo-ematico, intendendo per sistema gruppoematico, un gruppo di determinanti antigenici controllati da geni che occupano lo stesso locus cromosomico o loci tra loro strettamente "linked" poteva essere definito, sulla base delle conoscenze dell'epoca, composto da quattro gruppi (Tabella 1).

Gruppo	Reazione delle emazie con i sieri:		Reazione di emazie con fenotipo:	
	anti-A	anti-B	A	A
A	+	-	-	+
B	-	+	+	-
O	-	-	+	+
AB	+	+	-	-

Tabella 1. Definizione seiologica del sistema ABO.

Queste ricerche permisero anche di stabilire che la tipizzazione del fenotipo ABO comporta necessariamente:

- la ricerca degli antigeni (Agglutinogeni) sugli eritrociti: Prova diretta
- la ricerca degli anticorpi (Isoemoagglutinine) nel siero: Prova indiretta

Gli antigeni di questo sistema furono individuati, oltre che su gli eritrociti, in molti tessuti, nella saliva, nel latte ed in altri secreti ed escreti e fu dimostrato che nella loro biosintesi erano coinvolti anche altri sistemi genetici.

Nel 1924 Bernstein definì le modalità con cui questi antigeni vengono ereditati ed ipotizzò l'esistenza di un singolo locus con tre alleli A, B e 0 con i geni A e B codominanti ed entrambi dominanti su 0 recessivo o, come in seguito venne definito, "amorfo", cioè incapace di codificare alcun antigene.

Ciascun genitore trasmette al figlio uno dei tre possibili alleli che possono dar luogo ai fenotipi ed ai genotipi come indicato nella successiva (Tabella 2).

Fenotipo ABO	Genotipo	
A	— — A/A	— — A/O
B	— — B/B	— — B/O
O		— — O/O
AB		— — A/B

Tabella 2. Possibili genotipi dei 4 fenotipi ABO secondo Bernstein.

La genetica di questo sistema si ampliò in seguito alle scoperte di Van Durgen e Hirszelfeld i quali, nel 1911, notarono che, se alcuni sieri anti-A, ottenuti da soggetti di fenotipo B, venivano adsorbiti con emazie di alcuni soggetti di fenotipo A, essi continuavano ad agglutinare gli eritrociti di molti soggetti di gruppo A.

Essi conclusero che dovevano esistere due tipi di antigeni A, denominati A1 e A2 e che i sieri anti-A contengono due tipi di anticorpi:

- anti-A che reagisce con tutte le emazie A o AB
- anti-A1 che reagisce solo con eritrociti A1 o A1B.

Evidentemente per l'adsorbimento dei sieri anti-A erano state utilizzate emazie A2 che, legandosi all'anti-A, avevano lasciato nel siero la specificità anti-A1.

La genetica di questo sistema doveva così ammettere che il locus ABO è occupato da quattro alleli: A1, A2, B e 0 e non da tre, come stabilito in precedenza e questo, ovviamente, comportava l'esistenza di 6 fenotipi e 10 genotipi, infatti il numero di genotipi possibili per un numero di alleli o complessi genici n è dato dalla formula:

$$n/2 (n + 1)$$

Era stato inoltre notato che alcuni soggetti, in base ai risultati delle indagini sierologiche, non potevano essere classificati né come A1, né come A2 e furono così definiti A "intermedi" o A "int".

Fenotipi	Genotipi
A1	— —
	A1/A1
	— —
A2	A1/A2
	— —
	A1/O
A2	— —
	A2/A2
	— —
B	A2/O
	— —
	B/B
A1B	— —
	B/O
	— —
A2B	A1/B
	— —
O	A2/B
	— —
	O/O

Tabella 3. Possibili fenotipi e genotipi secondo Van Dungen e Hirszfeld.

Al fine di definire le caratteristiche di questi sottogruppi Hirszfeld avanzò l'ipotesi dell'esistenza di uno spettro di antigeni A di "forza" progressivamente decrescente da A₁ fino a O. In parallelo a questo decremento di reattività si aveva un incremento di reattività verso un "precursore" definito H.

In seguito alla scoperta del fenotipo "Bombay" da parte di Bhende e Coll. ed ai successivi studi di Ceppellini e Levine e Coll. degli anni '50, Watkins e Morgan ipotizzarono che su una sostanza di base, o sostanza precursore, agisse un altro sistema genetico, diallelico: Hh, indipendente dall'ABO.

Il fenotipo Bombay poteva essere il risultato del rarissimo genotipo omozigote h/h che impediva la trasformazione sull'emazie della sostanza di base in antigene H, essendo il gene h "amorfo", cioè incapace di produrre alcun antigene.

Secondo questa ipotesi una coppia di geni alleli Hh controlla la produzione di un antigene H trasformando una sostanza definita "precursore" di natura mucopolisaccaridica. Il gene H è dominante su h che è recessivo o, più esattamente "amorfo", comunque non in grado di convertire la sostanza precursore in antigene H e questo avviene nei soggetti omozigoti hh.

Una volta formatosi l'antigene H, agiscono, i geni del sistema ABO e, mentre i primi due: A e B, agiscono sull'antigene H producendo quantitativi o tipi diversi di antigeni A o B a seconda che l'individuo sia A₁, A₂ o sia provvisto di altri "sottogruppi" di A e B, il gene 0, essendo "amorfo", non effettua alcuna conversione dell'antigene H cosicché l'eritrocita contiene solo i determinanti antigenici H.

I rarissimi soggetti di fenotipo "Bombay", che, come abbiamo visto, sono omozigoti hh, non sono in grado di trasformare la sostanza "precursore" in antigene H e pertanto i loro eritrociti non presentano nessun antigene né del sistema Hh, né del sistema ABO, ma, avendo ereditato i geni ABO, possono trasmetterli alla loro prole. Il loro fenotipo viene descritto come Oh.

Secondo ricerche successive e tipizzando altre famiglie con questo fenotipo particolare, sono stati trovati alcuni soggetti che non mostravano una assenza completa degli antigeni A e B infatti i loro eritrociti, se cimentati con sieri anti-A o anti-B, mostravano una seppur debole agglutinazione.

Questi fenotipi furono definiti: para-Bombay e fu ipotizzato che, pur in presenza del gene h in forma omozigote, si possa formare una modesta quantità di antigene H, sulla quale si legano i determinanti antigenici A o B.

L'antigene H è sierologicamente riconoscibile da due tipi di anticorpi: il primo è un'agglutinina "fredda" che compare nel siero di soggetti, normalmente A₁ o A₁B, sulle cui emazie l'antigene H è presente in scarsa quantità, l'altro è prodotto dai rarissimi soggetti di fenotipo "Bombay".

Altre ipotesi sulla genetica di questo sistema e, successive ricerche, hanno permesso di dimostrare la presenza degli antigeni codificati da questo siste-

ma anche nei secreti di alcuni soggetti dipendentemente da un altro sistema genetico *Se/se*, non solo, ma è stato anche dimostrato che in questa biosintesi interviene anche un sistema genetico *Le/le* che codifica gli antigeni Lewis, i quali, essendo circolanti nel plasma, vengono solo adsorbiti sulla membrana eritrocitaria.

Sottogruppi A1 e A2

La definizione dei sottogruppi A1 e A2 è stata oggetto di controversie ed è stato a lungo dibattuto se le differenze fra i due antigeni fossero qualitative o quantitative.

Il numero dei determinanti antigenici diminuisce effettivamente dal fenotipo A1 all'A2, ma il fatto che soggetti con fenotipo A2 o altri fenotipi A più "deboli" possano produrre anti-A1 confermò la presenza di differenze strutturali fra i vari antigeni A.

La tipizzazione dei due antigeni A1 e A2 può essere eseguita:

- sierologicamente, con l'impiego di siero anti-A1 di origine umana
- con "Lectina" anti-A1, estratta dai semi di *Dolichos biflorus*.

Anche con la immunodiffusione, utilizzando sieri immuni anti-A, fu dimostrato che, mentre esiste una identità tra cellule contenenti A1 e A2, era presente nelle cellule A1 una "banda" addizionale di precipitato assente in A2.

Un'altra ipotesi imputava la differenza, non solo al diverso numero dei determinanti antigenici, ma anche alla loro accessibilità differenziale agli anticorpi IgM o IgG.

Fenotipi A e B deboli

Oltre all'antigene A2 fu successivamente individuato un antigene, definito A3, che mostrava, una volta cimentato con sieri anti-A, una agglutinazione definita a "campo misto" o "mixed-field" in quanto, insieme ad alcune emazie agglutinate, si notano altre che non mostrano tale reazione. Sono stati inoltre identificati altri fenotipi, sia A che B, che mostravano reazioni sierologiche particolari e comunque diverse rispetto ai "classici" antigeni A e B. Per questo sono stati definiti: fenotipi deboli.

L'identificazione sierologica di questi può richiedere, oltre alle tecniche di agglutinazione e di adsorbimento-eluzione, anche l'analisi, nei soggetti secreti, della saliva, nonché le modalità di trasmissione.

L'identificazione di questi fenotipi, se può essere relativamente semplice per gli antigeni deboli A, è normalmente più complessa per gli antigeni B in quanto molti di questi presentano delle caratteristiche peculiari nell'ambito delle singole famiglie.

Alcune proprietà immunoematologiche che hanno in comune i Fenotipi A e B "deboli", utili in laboratorio per la loro identificazione, possono essere così sintetizzate:

- la loro agglutinabilità risulta spesso migliorata se vengono utilizzati sieri anti-A,B provenienti da soggetti O immunizzati verso le glicoproteine purificate A e B per la possibile presenza di anticorpi "cross-reagenti"
- il pretrattamento con enzimi, particolarmente con la papaina, facilita la loro agglutinazione
- benchè il loro potere agglutinante sia inferiore agli eritrociti A e B "normali", i fenotipi "deboli" presentano una miglior possibilità di eluizione degli anticorpi, se adsorbiti, in conseguenza della minor affinità degli anticorpi specifici. Questo permette di effettuare tipizzazioni migliori con le modifiche di adsorbimento-eluizione che con quelle di emoagglutinazione
- alcuni di questi fenotipi deboli possono essere messi in evidenza con anticorpi monoclonali.

Questa situazione sierologica crea evidentemente difficoltà nella tipizzazione di questi eritrociti in quanto si può avere una discrepanza fra la ricerca degli agglutinogeni sugli eritrociti, che risultano di fenotipo O e l'assenza di isoemoagglutinine anti-A.

Da questo si comprende come sia necessario, allorchè viene fatta una tipizzazione di questo sistema, eseguire la ricerca sia degli agglutinogeni sulle emazie che dei rispettivi anticorpi nel siero.

L'importanza pratica dell'identificazione di questi fenotipi è ovvia se si considera il caso in cui questa tipizzazione riguarda non tanto un ricevente terapia trasfusionale, tipizzato erroneamente come O, in quanto sarà trasfuso esclusivamente con sangue O, ma il caso in cui l'errata tipizzazione riguarda un donatore "A o B debole", tipizzato come O ed il suo sangue trasfuso ad un ricevente O.

Non solo, ma una errata tipizzazione di questi fenotipi può creare dei problemi di ordine Medico-Legale, come vedremo successivamente a proposito del fenotipo "cis-AB", in caso di disconoscimento della paternità.

Le caratteristiche sierologiche dei principali fenotipi "deboli" dell'antigene A sono riassunte nella successiva Tabella 4.

Il fenotipo cis-AB”

Nel 1964 fu descritta una famiglia in cui due figli di un padre con fenotipo 0 e quindi con genotipo O/O e di una madre con fenotipo A2B, risultavano entrambi di fenotipo A2B, come se i geni A e B, invece di essere in posizione **trans**, situati cioè ciascuno su un cromosoma della stessa coppia, fossero situati l'uno accanto all'altro sullo stesso cromosoma e quindi in posizione **cis** (Fig. 1).

Successivamente sono state descritte altre famiglie con questo tipo di trasmissione genetica degli antigeni del sistema ABO.

Abbiamo ritenuto opportuno segnalare questo fenotipo, sia per sottolineare, come abbiamo detto in precedenza per i” fenotipi deboli”, le conseguenze Medico-Legali che possono derivare da un mancato riconoscimento nelle perizie per l'esclusione di paternità, sia perchè, come vedremo nel capitolo dedicato alla biologia molecolare di questo sistema, sono state recentemente impiegate le biotecnologie per caratterizzarlo a livello di genetica molecolare.

Prima di concludere questa parte dedicata alla scoperta e caratterizzazione sierologica del sistema ABO, riteniamo opportuno ricordare che questi antigeni compaiono più precocemente nei tessuti ecto ed endodermici rispetto al tessuto emopoietico e quindi agli eritrociti che, come è noto è di natura mesenchimale. Nella successiva figura 2 abbiamo schematizzato l'ontogenesi di questi antigeni nei vari tessuti e la loro correlazione con altri sistemi genetici coinvolti nella loro biosintesi.

Le strutture con attività gruppo-specifica ABO sono state identificate in tutti gli organismi, dall'E. Coli all'uomo e, nella filogenesi, gli antigeni ABH sulla membrana eritrocitaria dell'uomo risultano di più recente comparsa.

A3:	Le emazie reagiscono con un campo misto, con anti-A, B. Nel siero non sono presenti anti-A (reattivi con emazie A2). La saliva dei Secretori (Se) contiene antigeni A e H. Non reagiscono con la lectina anti-A1 di <i>Dolichos biflorus</i>
A int:	L'emazie reagiscono fortemente con gli antisieri policlonali anti-A e anti-A,B. Nel siero non è presente anti-A. La saliva dei Se contiene antigeni A e H
Ax:	Le emazie vengono agglutinate più fortemente a campo misto da anti-A,B policlonali che da anti-A policlonale. Non reagiscono con lectina anti-A1 da <i>Dolichos biflorus</i>
Am:	Gli eritrociti con questo fenotipo non sono agglutinati o solo molto debolmente con i sieri anti-A e non mostrano nessuna agglutinazione o debolissima con i sieri anti-AB né con lectina anti-A1. Nella saliva dei Se è presente sia la sostanza H che A, mentre il loro siero non contiene né anti-A, né anti-A1
A end:	L'emazie non reagiscono con lectina anti-A1. Nel siero non sono presenti anti-A1 né anti-A2
A el:	L'emazie non vengono agglutinate nella prova diretta né con lectina anti-A1. Si evidenzia solo con metodiche di adsorbimento-eluzione. Il siero non contiene anti-A reattivi con emazie A2
A bantu:	L'emazie non reagiscono con lectina anti-A1
A lae:	L'emazie non vengono agglutinate nella prova diretta ma si evidenzia solo con metodiche di adsorbimento-eluzione
A finn:	L'emazie non reagiscono con lectina anti-A1 e, nel siero non è presente anti-A reattivo con emazie A2h
A hAm:	L'emazie hanno una quantità della sostanza H inferiore alla norma

Tabella 4. Caratteristiche sierologiche dei principali sottogruppi di A.

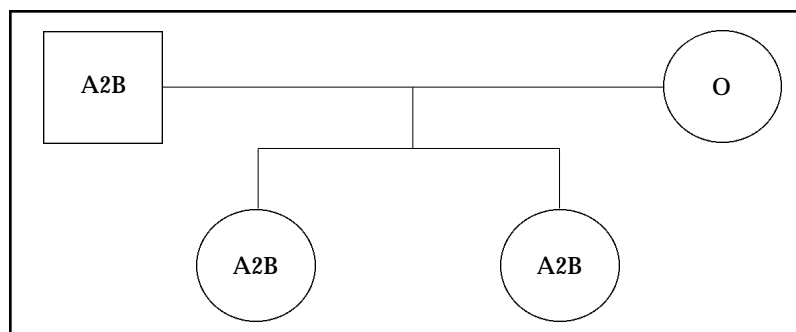


Figura 1. Trasmissione del fenotipo cis-AB.

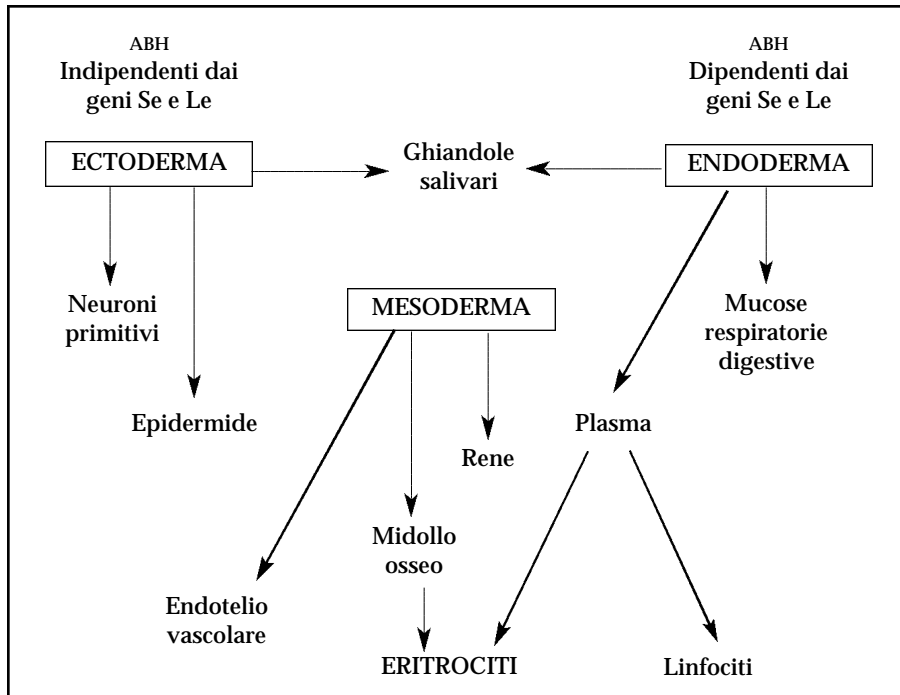


Figura 2. Ontogenesi degli Antigeni ABH.

Specie	Mucosa digestiva	Epidermide	Endotelio vascolare	Eritrociti
Ratto	+	+	-	-
Coniglio	+	-	-	-
Marmoset	+	+	-	-
Babbuino	+	+	+	-
Uomo	+	+	+	+

Legenda: += presenza, -= assenza degli antigeni ABO

Tabella 5. Presenza in vari tessuti di varie specie degli antigeni ABH.

Gli anticorpi del sistema ABO

Abbiamo in precedenza visto come questo sistema isto-ematico sia stato scoperto e caratterizzato grazie alle sue peculiari proprietà sierologiche. Infatti, alla presenza o assenza dei suoi antigeni (agglutinogeni), corrisponde l'assenza o la presenza nel siero dei rispettivi anticorpi (isoemoagglutinine). Abbiamo anche visto come sia indispensabile per la sua tipizzazione la duplice ricerca degli antigeni sugli eritrociti e dei rispettivi anticorpi nel siero per cui riteniamo opportuna una breve sintesi di questi, senza ricordare le varie ipotesi formulate per la loro produzione, che esulano dalle presenti note. Ci limitiamo cioè alla descrizione del loro comportamento sierologico esclusivamente in funzione della determinazione degli antigeni eritrocitari ABO.

Gli anticorpi di questo sistema che si riscontrano regolarmente in corrispondenza dell'assenza dei rispettivi antigeni sugli eritrociti venivano definiti naturali.

Nel corso della vita e, sotto l'influenza di diverse stimolazioni antigeniche, possano comparire anticorpi della stessa specificità dei naturali, ma con differenti proprietà.

Questi vengono definiti: Immuni.

Relativamente alla specificità degli anticorpi di questo sistema ista-ematico è come vedremo successivamente, rivolta verso i trisaccaridi immunodominanti:

- anti-A: N-Acetilgalattosamina 1->3 Fucosio 1->2 galattasio-R
- anti-B: Galattosio 1->3 Fucosio 1->2 galattosio-R

Nei soggetti con fenotipo O sono stati messi in evidenza anticorpi monospecifici anti-A, anti-B e anti-A,B.

Questi ultimi sono anticorpi che presentano una affinità con entrambi i trisaccaridi immunodominanti.

La loro formazione è condizionata dai classici meccanismi della tolleranza immunitaria e sembrano essere prodotti da una sottopopolazione di linfociti B, CD 5 positivi.

La distinzione in anticorpi "naturali" come appartenenti alla classe IgM ed "immuni" appartenenti alla classe IgG è relativa in quanto entrambe le classi sono presenti sia tra i naturali che tra gli immuni anche se le IgM sono prevalenti tra i primi e le IgG tra i secondi. Inoltre sono presenti anche anticorpi della classe IgA.

Relativamente alle sottoclassi, le IgG1 e IgG2 sono quelle maggiormente rappresentate, mentre le IgG3 e le IgG4 sono presenti in minima quantità

Anticorpi naturali

Comprendono l'anti-A dei soggetti B, l'anti-B dei soggetti A e l'anti-A, anti-B e anti-A,B dei soggetti O.

Oltre questi si devono ricordare gli anticorpi "irregolari" anti-A1 che si ritrovano nei soggetti con fenotipo A2 e A2B e l'anti-H che si può ritrovare in alcuni soggetti A1, A1B, B ed in tutti i soggetti con fenotipo "Bombay".

Anti-A1: come abbiamo visto in precedenza i sieri dei soggetti B e O contengono una miscela di anti-A e anti-A1. L'anti-A1 è anche presente nell'1-2% dei soggetti A2 e nel 25% dei soggetti A2B. E' generalmente presente nei soggetti Ax e A el ed incostantemente nei soggetti con fenotipo Ax e A el.

Anti-A: esistono tre tipi di anti-H: uno attivo a 37°C che si osserva nei soggetti con fenotipo Bombay, uno "freddo" con optimum termico a 4°C che si osserva prevalentemente nei soggetti A1, A1B o B non secretori di sostanze gruppo-specifiche ed uno che viene formato come autoanticorpo.

In generale le loro proprietà possono essere riassunte come illustrato di seguito.

Anticorpi "naturali"

- sono presenti secondo il fenotipo del soggetto
- compaiono senza una apparente stimolazione antigenica
- sono agglutinanti in salina
- sono prevalentemente IgM, ma anche IgG e IgA
- hanno un "optimum" termico a 4°C, ma conservano la loro attività agglutinante anche a 37°C
- generalmente non sono emolitici
- sono termolabili: vengono distrutti a 70°C in 10 minuti e a 63°C in 1 ora (questa proprietà viene utilizzata in laboratorio per la diagnostica della Malattia emolitica del neonato da ABO)
- sono neutralizzabili dalle sostanze gruppo specifiche umane ed animali (sostanze di Witebsky)

Anticorpi “immuni”

- compaiono in seguito ad una stimolazione antigenica
- non sono agglutinanti in salina, ma necessitano di “adiuvanti” come enzimi, albumina o il test all’antiglobulina per dare la reazione di emagglutinazione
- sono costituiti in prevalenza da IgG che attraversano la placenta, ma possono anche appartenere alla classe IgM
- l’optimum di reazione è a 37°C
- sono emolitici
- resistono alle temperature che distruggono le IgM
- sono difficilmente neutralizzabili dalle sostanze gruppo specifiche

Autoanticorpi

Si possono, seppure raramente, riscontrare autoanticorpi anti-A, anti-B e anti-H. Questi vengono messi in evidenza o con il test all’antiglobulina o con tecniche di fissazione-eluziane.

Anticorpi monoclonali

La tecnologia degli ibridomi per la produzione degli anticorpi monoclonali ha permesso la produzione di anticorpi specifici anche per il sistema ABO.

Questi vengono utilizzati nel Laboratorio di Immunoematologia sempre in maggior misura in quanto mostrano una avidità e specificità paragonabile e, molte volte superiore, rispetto ai policlonali, non solo, ma con questo tipo di anticorpi è possibile evidenziare dei fenotipi Ax, ed altri fenotipi “deboli”, non dimostrabili con i policlonali.

Vengono inoltre impiegati anche per lo studio di determinanti antigenici particolari di questo sistema.

Questa biotecnologia presenta inoltre il vantaggio, nella produzione degli antisieri per la tipizzazione del sistema ABO, di evitare l’immunizzazione dei donatori.

È noto infatti che la produzione dei sieri policlonali anti-A e anti-B può essere ottenuta dal siero di donatori rispettivamente B ed A, ma i migliori reagenti vengono ottenuti immunizzando donatori volontari con le sostanze gruppo-specifiche. I primi contengono tuttavia anche anticorpi specifici ver-

so altri determinanti antigenici presenti sulle emazie che devono essere eliminati per evitare reazioni aspecifiche nella tipizzazione del fenotipo ABO. I secondi, ottenuti con l'immunizzazione volontaria di donatori, è una pratica non esente da rischi ed i reagenti non sono sempre soddisfacenti in termini di qualità. Necessitano inoltre accurati controlli per ogni lotto usato.

Gli anticorpi monoclonali viceversa presentano il vantaggio della specificità, costanza nel tempo ed una migliore "versatilità" per l'impiego con strumenti automatici.

Nella parte successiva, dedicata alla biochimica di questo sistema gruppo ematico, vedremo che le glicosiltransferasi ABO aggiungono gli specifici idrati di carbonio a residui di galattosio fucosilato per formare gli apteni trisaccaridici che servono come gruppi immunodominanti per i gruppi ABO. Questi apteni trisaccaridici sono legati a molecole con attività ABH, integrali di membrana o solubili, tramite 5 o 6 catene con struttura diversa. Le catene tipo 1 e tipo 2 con gli epitopi A e B saranno successivamente esaminate, ma recentemente sono state descritte anche catene Tipo 3, 4, 5 e 6.

Tutte queste strutture hanno una specifica azione immunogena e cioè sono in grado di produrre una risposta anticorpale. In particolare:

- gli epitopi ABO sugli eritrociti sono prevalentemente legati a catene Tipo 2 per cui una eventuale immunizzazione provoca una risposta immune con produzione di anticorpi emolitici
- gli epitopi ABO sulla catena Tipo 1 sono stati trovati nel fegato e sembrano coinvolti nella produzione di anticorpi responsabili del rigetto nel trapianto di questo organo
- anticorpi specifici verso le catene Tipo 3 e Tipo 4 sembrano essere implicati nel rigetto del trapianto di cuore e di rene, organi nei quali gli epitopi ABO sono legati a queste catene.

Gli anticorpi anti-A presenti nei sieri iperimmuni riconoscono gli epitopi ABO indipendentemente dal tipo di catena alla quale sono legati.

Metodiche sierologiche per la tipizzazione degli antigeni ABO

La fenotipizzazione eritrocitaria di questo sistema deve essere eseguita, sia con la ricerca degli antigeni (agglutinogeni) sugli eritrociti con una reazione di emoagglutinazione: Test diretto, sia con una indagine sul siero per la identificazione degli anticorpi (isoemoagglutinine) usando emazie con fenotipo noto: A, Al, B, 0 ed un autocontrollo con il siero del soggetto da tipizzare cimentato con i propri eritrociti: Test indiretto.

Le due indagini, come abbiamo visto in precedenza, si completano reciprocamente e ciascuna serve come controllo dell'altra.

Una eventuale discrepanza tra il Test diretto e l'indiretto può essere dovuta a:

- errori tecnici
- caratteristiche fenotipiche particolari dell'emazie
- caratteristiche particolari del siero
- poliagglutinabilità degli eritrociti

Riassumeremo successivamente le cause di alcune discrepanze che più frequentemente si possono riscontrare nel laboratorio di Immunoematologia per questa fenotipizzazione.

Errori tecnici

Gli errori tecnici possono essere dovuti a: reagenti, strumenti, interpretazione dei risultati.

Questi errori possono condurre a risultati: falsamente positivi a falsamente negativi.

I più comuni errori tecnici sono

- Non corretta identificazione dei campioni o dei materiali impiegati
- Errori di interpretazione e di registrazione dei risultati
- Omessa aggiunta dell'antisiero nella prova diretta e del siero nella prova indiretta
 - Rapporto siero/emazie non corretto
 - Una eccessiva centrifugazione che può portare a risultati falsamente positivi o una centrifugazione insufficiente che può portare a risultati falsamente negativi.

Caratteristiche fenotipiche particolari delle emazie

- Se gli eritrociti sono sospesi nel loro stesso siero, un eventuale impilamento può simulare una agglutinazione. Questo fenomeno può essere causato da una disproteinemia, dalla presenza di macromolecole estranee o dalla presenza, nel sangue del funicolo, di gelatina di Wharton.

- Il campione da tipizzare può essere composto da una miscela di diverse popolazioni eritrocitarie se il "propositus" è stato recentemente trasfuso o ha ricevuto un trapianto di midollo.

- L'espressione degli antigeni A e B può essere particolarmente debole in presenza di un genotipo raro o in pazienti emopatici.

- L'emazie possono essere poliagglutinabili per la presenza sulla superficie cellulare di strutture abnormi acquisite o ereditarie o per l'esposizione di "criptoantigeni" cross-reagenti in seguito ad infezioni.

- Presenza di una attività "B-like" acquisita derivante dall'azione di germi Gram negativi deacetilanti o da patologie neoplastiche.

- Se il test è eseguito su eritrociti sospesi nel proprio siero, gli anticorpi presenti nel reagente possono essere neutralizzati dalla presenza nel siero, in elevata concentrazione di sostanze gruppосpecifiche A o B.

Caratteristiche particolari del siero

- Disproteinemie, iperfibrinogenemie, "plasma-expanders", mezzi di contrasto, farmaci, possono determinare la formazione di impilamenti delle emazie che possono essere scambiati per una agglutinazione
- Nel siero può essere presente un anticorpo irregolare o un autoanticorpo anti-I in grado di reagire con antigeni presenti su emazie A1 o B utilizzate per l'esecuzione del test. L'anti-A1 presente nel siero dei soggetti A2 o A2B è in grado di agglutinare emazie A1.
- Nei neonati non sono presenti nel siero anticorpi specifici per questo sistema in quanto non ancora iniziata la sintesi, ma possono essere presenti anticorpi IgG acquisiti dalla madre durante la vita fetale.
- Nei soggetti anziani o in pazienti con immunodeficit congeniti o acquisiti il titolo degli anticorpi può essere ridotto o addirittura non essere presenti.

Poliagglutinabilità degli eritrociti

Gli eritrociti vengono definiti “poliagglutinabili” allorchè si ha una reazione di emoagglutinazione con la maggioranza dei sieri umani “normali”.

Si tratta di una reazione antigene-anticorpo aspecifica dovuta alla presenza sulle emazie o di un antigene anormale o di un antigene “criptico” che viene esposto e riconosciuto dalla maggioranza dei sieri che contengono il corrispondente anticorpo.

Questo fenomeno può essere:

- determinato geneticamente (Cad e Hemptas)
- acquisito e provocato:
 - da microorganismi (T,Tk,B acquisito)
 - fenomeni pre-leucemici (Tn)

Gli eritrociti poliagglutinabili presentano le seguenti caratteristiche:

- sono agglutinati dalla maggior parte dei sieri di adulti
- non sono agglutinati da sieri di cordone
- non mostrano il fenomeno dell'autoagglutinazione
- sono evidenziati dall'impiego di alcune lectine che ne permettono la classificazione (Tab. 6)

Un ulteriore metodo di identificazione è l'impiego di anticorpi monoclonali, dopo adsorbimento dal terreno di coltura impiegato per la loro produzione, degli anticorpi specifici verso gli antigeni responsabili della poliagglutinabilità.

	T	Tn	Tk	Cad
Arachis hypogea	++++	-	++++	-
Salvia sclarea	-	++++	-	-
Glycine soja	++++	++	-	++
Dolichos biflorus	-	++++	-	++++

Tabella 6. Classificazione degli eritrociti poliagglutinabili.

Biochimica del sistema ABO

Le indagini sierologiche effettuate su questo sistema, oltre alla sua identificazione e caratterizzazione, hanno permesso di chiarire che gli antigeni ABH sono presenti, non solo sugli eritrociti, ma anche in molti altri tessuti e nei secreti di circa il 75% degli individui, definiti per questo secretori, dipendentemente da un altro sistema genetico *Se/se*.

E' stato inoltre dimostrato che nella loro biosintesi intervengono altri sistemi genetici come il sistema *H/h*, *Le/le*, *P*, *T/Tn*, *I/i* con modalità più complesse rispetto agli antigeni proteici.

Il classico concetto: un gene, un antigene, non può quindi essere applicato a questi antigeni, dato che si verifica per la sintesi di questi il fenomeno della epistasi, una situazione cioè in cui l'espressione fenotipica di un genotipo ad un locus dipende dal genotipo di altri loci.

La localizzazione dei geni che codificano gli antigeni ABO è infatti nella parte distale del braccio lungo del cromosoma 9 mentre i geni del sistema *H/h* che, come vedremo, codificano l'antigene H, substrato accettore dei disaccaridi immunodominanti A e B, è localizzato nel cromosoma 19.

Le conoscenze successive di questa sistema sono state possibili grazie a studi biochimici ed impiegando metodiche sempre più specifiche. Le prime indagini sierologiche venivano infatti effettuate, oltre che sugli eritrociti, tramite l'isolamento e la purificazione delle sostanze A, B e H da secrezioni biologiche a causa delle difficoltà di ottenere adeguate quantità di sostanze attive dagli eritrociti.

Ulteriori studi biochimici su questo sistema iniziarono negli anni '60 ed in parte hanno confermato le precedenti indagini sierologiche e cioè che le specificità ABH sono legate alla componente saccaridica ed al tipo di legame che quattro zuccheri assumono nella parte terminale di una catena saccaridica definita sostanza di base sulla quale, secondo l'ipotesi di Watkins e Morgan si ha la biosintesi degli antigeni ABH, ma anche di altri come i Lewis, P, I e i. I saccaridi immunodominanti sono elencati nella figura 3.

In base alle conoscenze genetiche e biochimiche fu ipotizzata che l'espressione degli antigeni ABH fosse controllata da geni alleli a "semialleli" A e B in grado di legare gli zuccheri immunodominanti su due catene definite Tipo 1 e Tipo 2, sulle quali agisce in precedenza il gene H che, a sua volta, lega una molecola di fucosio su una struttura definita "sostanza precursore" per formare l'antigene H.

- D-Galattosio	○
- L-Fucosio	△
- N-Acetil-D-Galattosamina (NacGal)	■
- N-Acetil-Glucosammina (NacGluc)	□

Figura 3. Saccaridi immunodominanti.

Gli eritrociti di fenotipo O si caratterizzano per l'assenza sia degli antigeni A che B sulla membrana eritrocitaria, ma come vedremo successivamente, presentano una maggior quantità di sostanza H.

Gli eritrociti con fenotipo AB presentano i due saccaridi immunodominanti.

L'approccio biochimico per lo studio di questi determinanti antigenici iniziò con l'impiego di enzimi che "isolavano" le varie specificità dalla intera sostanza gruppo-specifica.

In particolare le sostanze A e B, dopo trattamento enzimatico, furono convertite in modo da dare una specificità H con il rilascio rispettivamente di N-acetilgalattosamina e galattosio.

Successivamente, con l'impiego di una fucosidasi fu modificata la specificità H in Le(a) liberando L-fucosio. Infine, con un ulteriore enzima, la sostanza Le(a) perse la sua specificità e rimase una struttura che reagiva fortemente con un antisiero anti-pneumococco Tipo XIV il quale risultò quindi il precursore molecolare a cui vengono aggiunte le varie unità saccaridiche responsabili delle specificità antigeniche.

Facendo il "percorso" inverso si è potuti risalire alla intera struttura delle catene che determinano le specificità ABH.

Uno schema della biosintesi degli antigeni A,B,H e Lewis è riassunto nella figura 7.

Questi studi hanno quindi confermato l'ipotesi di Watkins e Morgan che prevedevano la progressiva azione dei geni H, A e B, ma anche Lewis, i quali, tramite la sintesi di glicosiltransferasi, catalizzata l'aggiunta a queste catene gli idrati di carbonio in diverse posizioni, determinando le varie specificità immunodominanti.

Nella successiva figura 4 sono sintetizzati, in parallelo ai geni di questo sistema, gli enzimi da essi codificati, gli antigeni, nonché la struttura biochimica dei monosaccaridi immunodominanti.

Le catene tipo 1 e tipo 2 differiscono tra loro per il tipo di legame con cui il galattosio (Gal) terminale si unisce con la N-acetilglucosamina sul terminale secondo lo schema successivo (Figura 5).

Il C in posizione 1 del galattosio, uno zucchero a 6 atomi di C può legarsi sia al C in posizione 3 che a quello in posizione 4 della N-Acetil glucosamina (NacGluc) come indicato nello schema precedente.

Le catene tipo 1 e tipo 2 si ritrovano prevalentemente nelle secrezioni, nei liquidi biologici ed in vari tessuti mentre sugli eritrociti vengono sintetizzate catene tipo 2. Le catene tipo 1 che si ritrovano su queste cellule sono dovute ad un adsorbimento dal plasma.

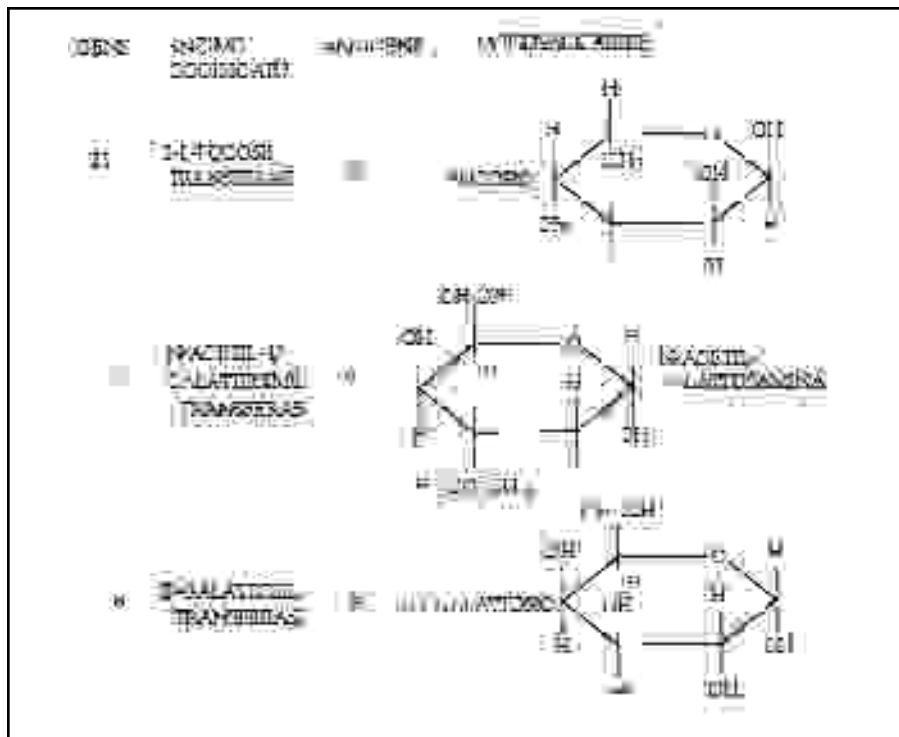


Figura 4. Geni, enzimi, antigeni e epitopi del sistema ABH.

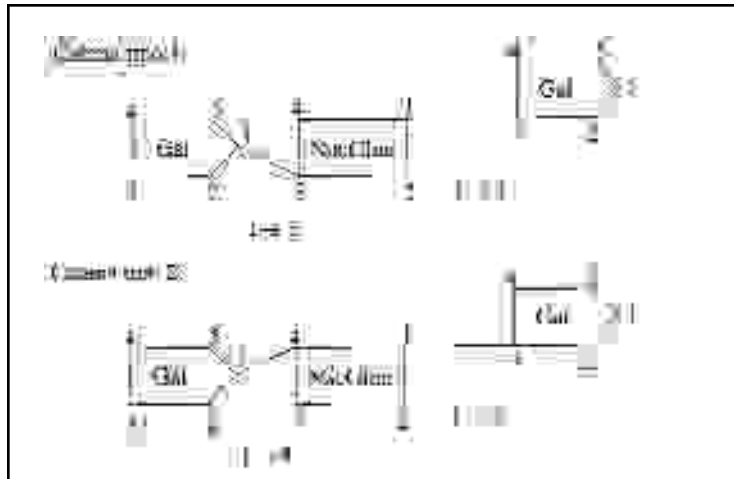


Figura 5.

Questi studi biochimici hanno quindi permesso di comprendere le specificità immunodominanti A e B e, dalla successiva Figura 6, si può notare la loro sorprendente somiglianza.

La differenza è infatti determinata unicamente dalla sostituzione del radiale in posizione 2: un gruppo $-NH-CO-CH_3$, caratteristico di A che, sostituito da OH, determina la specificità B.

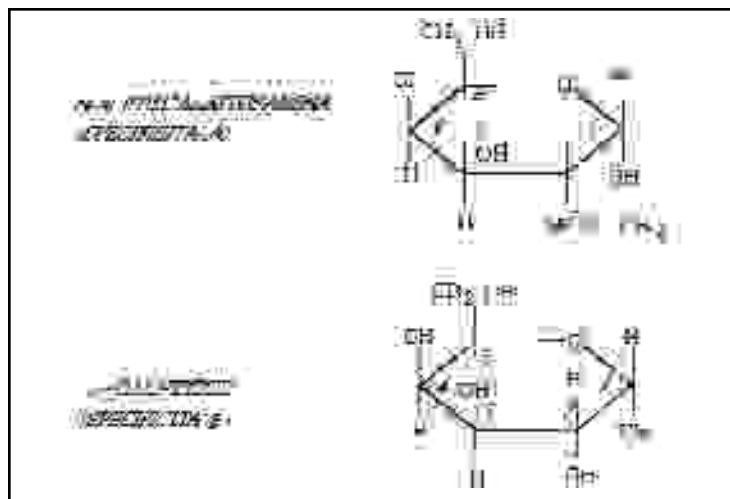


Figura 6. Carboidrati responsabili delle specificità A e B.

Gene	Struttura chimica	Specificità
<p>Gruppo sanguigno A</p> <p>Struttura chimica</p>		<p>Tipi A1, A2, A3</p>
<p>Gruppo sanguigno B</p> <p>Struttura chimica</p>		<p>Tipi B1, B2, B3</p>
<p>Gruppo sanguigno H</p> <p>Struttura chimica</p>		<p>Tipi H1, H2, H3</p>
<p>Gruppo sanguigno Lewis</p> <p>Struttura chimica</p>		<p>Tipi X, Y, Z</p>

Figura 7. Struttura chimica proposta da Watkins per le sostanze gruppo-specifiche A, B, H e Lewis.

Analizzando lo schema precedente riteniamo utili alcune considerazioni che permettono di meglio comprendere e spiegare la presenza di questi determinanti antigenici, non solo sulla membrana eritrocitaria, ma anche in altri liquidi biologici, nonché le interazioni che si hanno con altri sistemi genetici ad esso correlati.

E' opportuno comunque precisare che alcune reazioni che avvengono nella biosintesi di questi antigeni ed in particolare alcune relative al sistema Lewis, come vedremo successivamente, sono state oggetto di revisione nel corso di ulteriori e più recenti ricerche.

- Gli oligosaccaridi immunodominanti A e B possono essere aggiunti solo a catene in cui sia già presente fucosio e questo spiega anche il motivo per cui, allorchè H è assente, come nei soggetti se/se, non possano comparire nei secreti le sostanze A e B.

- La catena tipo 1 ha il terminale beta-galattosio legato in posizione 1>3 mentre la catena tipo 2 in posizione 1>4. Il gene H è in grado di controllare l'aggiunta dell'antigene H nella posizione terminale di entrambi i tipi di catena con l'aggiunta di L-fucosio. Anche il gene Lewis (Le) aggiunge L-fucosio, ma in posizione subterminale, per produrre Le(a) solo ad una catena di tipo 1. Pertanto, quando sono presenti entrambi i geni H e Le, le sostituzioni con L-fucosio sono presenti in due posizioni di una catena tipo 1 e questo dà origine ad una struttura con specificità Le(b) che risulta pertanto prodotta dalla interazione dei geni H e Le.

- Le varie glicosiltransferasi non effettuano sempre la conversione di tutte le catene disponibili ed inoltre esiste una competizione per i vari substrati essenziali: i geni H e Le ad esempio sono in competizione mediante la sostanza precursore per le catene di tipo 1.

- Quando H è assente come nel caso dei non secretori, sono presenti nelle secrezioni considerevoli quantità di sostanza Le(a), ma nei secretori, predominano H e Le(b) e Le(a) risulta presente in quantità modestissima.

- H e Le(b) coesistono in quanto solo la catena tipo 1 può essere convertita in Le(b).

- Quando sono presenti entrambe le transferasi H ed A, molte delle catene precursori sono convertite, prima in strutture H attive e poi in strutture A attive; una conversione simile viene effettuata in B dalle transferasi H e B.

I terminali N-acetilgalattosamina e D-galattosio delle catene "mascherano" la specificità H della struttura a cui sono aggiunte, ma, come detto in precedenza, poichè le conversioni non sono mai complete, un soggetto che abbia per esempio i geni A, H, Se e Le avrà nella saliva gli antigeni A, H, Le(a) e Le(b) anche se Le(a) sarà presente in piccola quantità e la quantità di H sarà naturalmente inferiore di quanto lo sia nelle persone di gruppo O nei cui fluidi H rimane non convertita in tutte le catene di tipo 2, anche se molte di tipo 1 saranno convertite in Le(b).

La presenza comunque di questi antigeni nei vari tessuti e liquidi biologici esula dalle presenti note che si limitano alla analisi di questi antigeni sulla membrana eritrocitaria.

Abbiamo comunque riassunto nella successiva Tabella 7 le combinazioni geniche che danno origine alle attività A, B, H, Le(a) e Le(b) sugli eritrociti e nei secreti.

E' opportuno precisare che, relativamente agli antigeni Lewis, sono state identificate ulteriori specificità: c, d, x, ma, in base a queste più recenti ricerche, è stata negata l'appartenenza di questi antigeni ad un vero e proprio sistema gruppo-ematico.

Gli idrati di carbonio presenti sugli eritrociti possono venir legati, tramite il D-glucosio e la sfingosina o molecole di acidi grassi, in questi casi la sostanza gruppo-ematica è un glicosfingolipide oppure la catena oligosaccaridica è legata ad una catena peptidica, generalmente tramite la N-acetil-D-glucosamina ed asparagina ed allora la sostanza è una glicoproteina.

Le glicoproteine che si trovano prevalentemente nelle secrezioni le catene oligosaccaridi che sono legate, tramite la N-acetil-D-galattosamina o serina o treonina.

Gli antigeni eritrocitari ABH presenti sulla membrana eritrocitaria sono costituiti prevalentemente da glicosfingolipidi e ciascun lipide della molecola è formato da un residuo di sfingosina al quale è attaccata in acido grasso ed una catena saccaridica.

Combinazioni geniche	Antigeni sugli eritrociti					Sostanze nei secreti				
	A	B	H	Le(a)	Le(b)	A	B	H	Le(a)	Le(b)
ABO.H.Se.Le	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ABO.H.sese.Le	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
ABO.H.Se.lele	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
ABO.H.sese.lele	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ABO.hh. Se o sese.Le*	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ABO.hh. Se o sese.lele*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Genotipo Bombay

Tabella 7. Combinazioni geniche che danno luogo all'attività A, B, H, Le(a) e Le(b) sugli eritrociti e nei secreti.

Il composto formato dalla sfingosina e l'acido grasso dà origine a ceramidi i quali costituiscono una parte del "bilayer" della membrana eritrocitaria.

Le catene stearylliche sono localizzate sulle porzioni degli sfingolipidi orientate verso la superficie esterna della membrana e, oltre alle specificità ABH, contengono le specificità degli altri sistemi genetici correlati: H/h, I/i e P.

Ciascuna catena è sintetizzata tramite l'aggiunta sequenziale di una molecola saccaridica iniziando dal glucosio più "interno" e tutte le catene oligosaccaridi che "immunodominanti" sono legate con un legame 0-glicosidico, tramite il glucosio, al C in posizione 1 della sfingosina.

I carboidrati terminali associati ai glicolipidi sono analoghi a quelli legati alle glicoproteine, tuttavia lo "scheletro" delle due strutture biochimiche è diverso, segno di vie biosintetiche differenti. I carboidrati con attività ABH associati ai glicolipidi di membrana formano strutture definite paraglobosidi. Le strutture saccaridiche con attività ABH sono eterogenee e variano da catene semplici e relativamente corte a strutture complesse e molto ramificate. Queste differenti ramificazioni sono state associate alle differenze sierologiche riscontrate ad esempio nei fenotipi A1 e A2 e sono state oggetto di dibattito fra i vari ricercatori. Alcuni ipotizzavano infatti che i due geni A1 e A2 producessero transferasi con diversa attività enzimatica, mentre per altri, le differenze fenotipiche dei due antigeni si dovevano ricondurre ad una diversa accessibilità delle transferasi ai vari substrati diversamente ramificati.

Le ricerche biochimiche sulle transferasi con metodiche radioimmunologiche, cromatografiche e termodinamiche hanno dimostrato che gli alleli A1 e A2 producono due molecole con diversa attività enzimatica: pH, punto isoelettrico, costante di Michaelis e questo poteva spiegare le differenze che si riscontrano negli antigeni prodotti dai due alleli.

Impiegando la cromatografia su colonna e su strato sottile i glicolipidi ABH, estratti dalle membrane eritrocitarie, mostravano diverse "bande" caratteristiche. Due delle componenti che migrano "velocemente", definite Aa H1 e Ab H2 e due componenti che migrano lentamente, definite Ac H3 e Ad H4, furono assegnate a specie "ramificate" e "non ramificate" che portavano rispettivamente i determinanti A e H.

In base a queste ricerche fu ipotizzata anche che le specificità A1 e A2 derivassero da ramificazioni complete e incomplete cioè queste strutture subirebbero una conversione più o meno ampia ed in particolare, mentre nelle emazie A1 sarebbero trasformati tutti i substrati H: H1, H2, H3 e H4, nelle emazie A2 sarebbero trasformati solo i substrati H1 e H2 o, secondo altre e più recenti ricerche, le transferasi codificate dagli alleli A2 o "A deboli" sarebbero relativamente incapaci di catalizzare l'aggiunta dell'N-acetilgalattosamina ad H, a differenza dell'allele A.

E' stato inoltre dimostrato che le glicosiltransferasi sono enzimi che catalizzano reazioni di transglicosilazione tra un complesso "zucchero-nucleotide" che finge da "donatore" su un substrato "accettore" e sono coinvolte nella biosintesi di gliconiugati come glicoproteine, glicosaminoglicani e glicolipidi.

Nel caso del sistema ABH, secondo queste ricerche, la biosintesi poteva essere spiegata come schematizzato nella successiva Figura 8.

Ulteriori progressi nelle conoscenze sulla biochimica degli antigeni di questo sistema si sono avuti grazie alle più recenti metodologie di chimica analitica come la spettrometria di massa, la spettroscopia NMR (Nuclear magnetic resonance) nonché con l'impiego della Western blot e degli anticorpi monoclonali.

Queste e, come vedremo successivamente, le biotecnologie, hanno dimostrato che le glicosiltransferasi A e B sono delle proteine di 41 Kd composte da 353 aminoacidi con un residuo di 21 peptidi che è clivato dopo la sintesi ed è quindi assente nella farina solubile della molecola. La diversa specificità verso gli idrati di carbonio di queste glicosiltransferasi derivano dalla presenza di quattro diversi aminoacidi nelle loro catene.

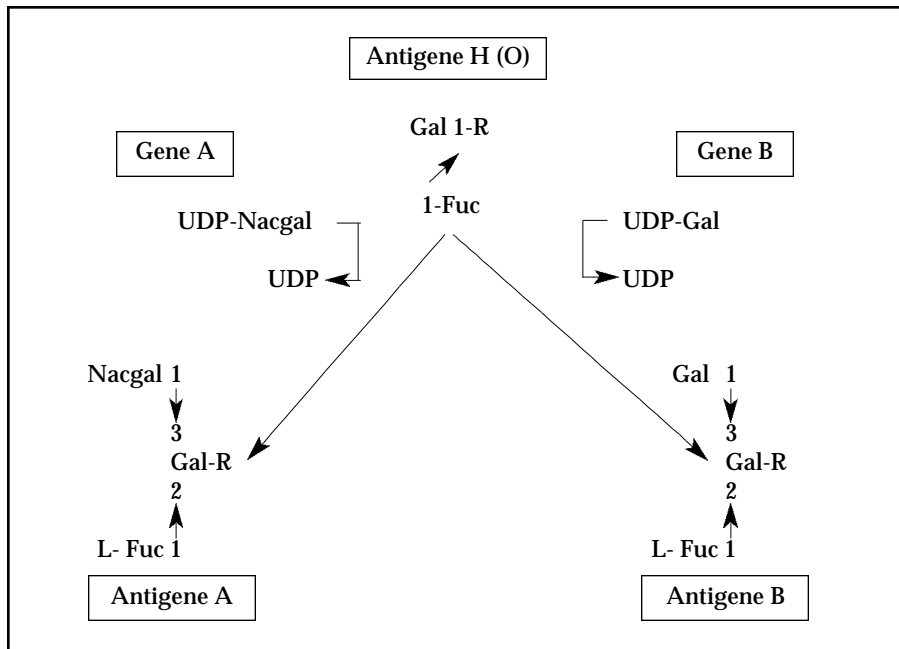


Figura 8.

I determinanti antigenici ABH vengono sintetizzati su catene oligosaccaridiche legate a lipidi (glicosfingolipidi), o proteine (glicoproteine) a come oligosaccaridi isolati.

Nelle glicoproteine con attività ABH la glicosilazione può avvenire nel sito dell'asparagina, legando la N-acetilgalattosamina ad un gruppo amminico: N-linked o della serina o treonina, legando la N-acetilgalattosamina tramite l'ossigeno: O-linked.

L'estensione e la costruzione delle catene oligosaccaridiche differisce nei vari glicoconiugati.

Gli N-linked vengono glicosilati con una struttura ramificata di mannosio che, successivamente, si estende con un numero variabile di catene di N-acetil-lattosamina. Gli O-linked sono stati identificati come costruiti o su una catena disaccaridica o su strutture complesse e ramificate di lactosamina.

Con la citometria a flusso si è inoltre potuto caratterizzare la disposizione ed il numero dei determinanti di questo sistema sulla membrana, nella successiva Tabella 8 sono riportati i risultati di queste ricerche su alcuni fenotipi eritrocitari in parallelo a risultati ottenuti con altre metodologie.

Abbiamo visto in precedenza che le catene che determinano i vari polimorfismi ABH sono diversamente distribuite nei vari tessuti e liquidi biologici, non solo, ma tramite l'interazione con altri sistemi genetici sono correlate con altri antigeni gruppo-ematici.

Ad esempio gli antigeni I e i sono correlati dal punto di vista topochimico con gli antigeni ABH infatti la specificità I è presente nei precursori delle sostanze ABH.

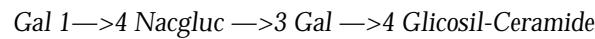
E' interessante a questo proposito ricordare che l'antigene I è il prodotto di una conversione dell'antigene i infatti gli eritrociti, mentre alla nascita presentano una reattività i, questa si converte dopo la nascita in I.

Questo cambiamento, in base agli studi biochimici sopra ricordati, sembra derivare dalla progressiva "ramificazione" che gli antigeni H della catena Tipo 2 subiscono durante lo sviluppo.

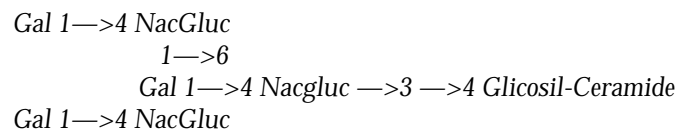
Fenotipo	citofluorimetria	altri metodi
A1	1.07 ± 0.28	0.81 - 1.17 x 10 ⁶ /RBC
A2	0.21 ± 0.09	0.24 - 0.29 x 10 ⁶ /RBC
A1B	1.98 ± 0.58	0.46 - 0.85 x 10 ⁶ /RBC

Tabella 8. Numero di determinanti antigenici su eritrociti A determinati in citofluorimetria e con altri metodi.

In particolare, mentre l'antigene i è costituito da una catena lineare e ripetitiva:



l'antigene I è invece formato da una catena "ramificata":



Modifiche dell'espressione di questi antigeni sono state trovate associate ad alcune patologie, casi in aumento della espressione di i ed una depressione di I è stata riscontrata in alcune leucemie acute, in stati di emolisi cronica ed in alcune forme diseritropoietiche congenite.

Autoanticorpi "freddi" anti-I e/o anti-i si riscontrano frequentemente nelle malattie emolitiche autoimmuni idiopatiche o secondarie ad infezioni virali.

La "perdita" dei determinanti A è stata dimostrata in alcune leucemie. In alcuni casi di neoplasie, particolarmente del colon con infezioni sovrapposte, si è notata la comparsa insolita di una reattività B negli eritrociti, prevalentemente in soggetti AI: il cosiddetto "B acquisito". Questo fenomeno è legato alla deacetilazione della N-acetil-galattosamina per cui il determinante antigenico viene riconosciuto non più dai sieri anti-A bensì dagli anti-B.

Questa situazione può essere riconosciuta con l'impiego di anticorpi monoclonali anti-B con specificità più "stretta".

Lo studio biochimico degli antigeni della membrana eritrocitaria su soggetti "normali" o con varie emopatie ed in soggetti portatori dei cosiddetti fenotipi silbenti o minis-minus, cioè soggetti con depressione totale o parziale di alcuni antigeni, effettuato in parallelo agli studi sulla struttura molecolare della membrana eritrocitaria ha permesso di suddividere questi antigeni in tre gruppi principali:

- antigeni la cui funzione è legata esclusivamente alla composizione delle catene carboidratiche
- antigeni associati alle sialoglicoproteine A, B e C
- antigeni di natura glicoproteica o polipeptidica

Questi studi hanno inoltre permesso di chiarire che questi antigeni sono tutti esposti alla superficie della membrana: quelli di natura glicosfingobipidica fanno parte della lamina esterna dello strato bilipidico costitutivo della membrana mentre quelli di natura proteica sono associati alle proteine intrinseche che attraversano la membrana oppure alle proteine GPI-linked

situate all'esterno della cellula ed ancorate a questa da parte di glicosil-fosfatidil-inositolo.

Queste ed altre ricerche hanno permesso anche di comprendere che queste molecole sono funzionalmente collegate con le proteine del membranoscheletro enitrocitario e svolgono, oltre che funzioni di trasporto e recettoriali anche stabilizzatrici per la cellula, particolarmente allorchè essa attraversa i sinusoidi splenici.

Biologia molecolare del sistema ABO

Negli anni '80, utilizzando tecniche di biologia molecolare, è iniziato un nuovo approccio per lo studio di questo sistema e si è cercato di individuare il meccanismo genetico che controlla, a livello molecolare, l'espressione degli antigeni ABO.

Con le stesse metodologie, sono stati effettuati studi per definire anche i sottogruppi di questa ed anche di altri sistemi gruppo-ematici come il Kell, Rh, Duffy e MNSs.

Dato che le biotecnologie stanno trovando in crescente impiego, non solo in studi di genetica di "base", ma anche nella diagnostica delle emopatie, nella ricerca di acidi nucleici virali in campioni biologici ed in particolare nel sangue, nonché in indagini di attribuzione ed esclusione di paternità, tutti argomenti che interessano gli Immunoematologi ai quali sono rivolte le presenti note, abbiamo ritenuto opportuno descrivere alcune nozioni su queste metodologie relative allo studio del sistema ABO.

Prima di descrivere le metodologie che hanno permesso di comprendere il meccanismo di azione a livello molecolare dei geni che partecipano alla biosintesi degli antigeni A e B e spiegano il polimorfismo di questo sistema isto-ematico, abbiamo ritenuto opportuno ricordare brevemente alcune nozioni sulla sintesi proteica per chiarire in particolare l'assenza di questi antigeni nel fenotipo O.

La sintesi proteica

La molecola di DNA, artefice principale della sintesi proteica, è come noto, caratterizzata da una struttura a doppia elica e possiede alcune proprietà peculiari:

- quella di produrre copie di se stessa: Replicazione
- quella di dirigere la sintesi dell'RNA: Trascrizione.

Queste proprietà permettono alle cellule di produrre polipeptidi con una sequenza aminoacidica codificata in funzione delle basi nucleotidiche del corrispondente DNA il quale, come è noto, porta "impresso" il codice che dirige la sintesi proteica.

Per poter produrre in polipeptide è necessario che il segmento di DNA che lo codifica venga "copiato" in un RNA messaggero (RNAm) provvisto di una sequenza di basi complementare al DNA.

Nella sequenza del RNAm trascritto sono codificate in maniera complementare al DNA che è servito da “stampo” le triplette che formeranno le sequenze aminoacidiche del polipeptide.

L'unità del codice è il codone, ossia una tripletta di basi specifica per ogni aminoacido, cosicchè la sequenza dei nucleotidi dell'RNAm determina l'ordine degli aminoacidi nella catena polipeptidica (Figura 9):

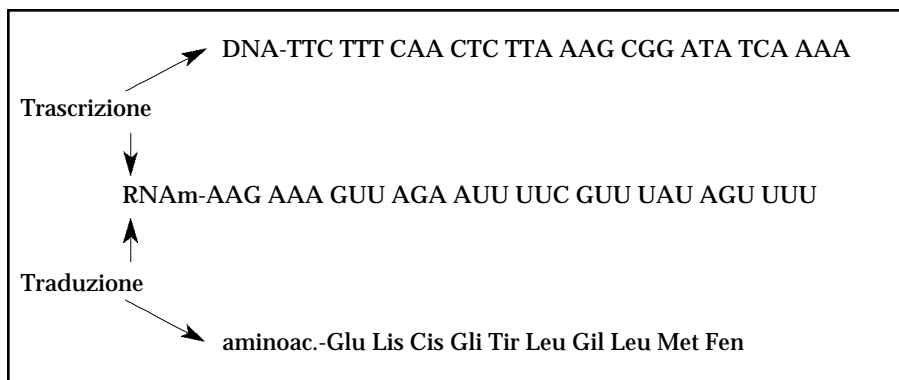


Figura 9.

Cornice di lettura

In una sequenza di RNAm le triplette che, come abbiamo visto, indicano in aminoacido, vengono lette tre per volta iniziando da un codone AUG che funge da segnale per l'inizio della traduzione.

Se la lettura delle triplette avviene saltando un nucleotide della catena di RNAm, ad esempio per una delezione, tutta la lettura viene ad essere modificata:

Triplette di basi	ABC/ DEF/	GHI/ MN/ OPQ	
aminoacidi	a1-- a2--	a3 -- a4 -- a5	polipeptide

Se una mutazione porta alla delezione ad esempio della base G, i primi due aminoacidi della catena polipeptidica saranno normali, ma il resto della

sequenza di base verrà letta in modo non corretto perché la cornice di lettura risulta spostata dalla delezione di G.

Lo spostamento della cornice di lettura avviene anche in caso di inserzione di una base in una tripletta.

		G
	ABC/ DEF/ HIL/ MNO/ PQR	
aminoacidi	a1 — a2	ax — a5 — a6
polipeptide	normale	alterato

Una volta sintetizzato, l'RNAm con l'RNA di trasferimento (RNAt) e l'RNA ribosomiale (RNAr) danno infine origine ai polipeptidi che, nel caso del sistema ABO, come abbiamo in precedenza visto, sono le transferasi responsabili delle specificità A e B.

Le conoscenze di questa biosintesi hanno permesso di chiarire, come vedremo successivamente, che l'assenza degli antigeni A e B nel fenotipo O, derivano dalla delezione di una singola base nucleotidica nella porzione del DNA codificante le transferasi e responsabile dello spostamento della cornice di lettura con conseguente sintesi di una proteina sprovvista di attività transferasica.

Un ulteriore contributo alla conoscenza dei meccanismi che stanno alla base della genetica molecolare del sistema ABO è venuto dalla caratterizzazione e l'isolamento in farina solubile della transferasi A da tessuto polmonare e dalla mucosa intestinale.

Con l'impiego delle biotecnologie è possibile infatti, avendo una proteina purificata, l'isolamento e la clonazione del suo gene o del suo DNA complementare (DNAc) che, a sua volta, può servire come sonda per identificare il gene in una Genoteca, determinare la sua sequenza nucleotidica e conoscere quindi la sua struttura a livello molecolare.

Ricordiamo che le genoteche o "library" sono collezioni di tante sequenze isolate che possono essere studiate e caratterizzate separatamente fra loro.

Si parla di library genomica, se i frammenti di DNA clonato originano direttamente dal genoma cellulare, digerito mediante enzimi di restrizione, oppure di library a cDNA se le molecole di DNA clonate sono ottenute ricopiando, mediante transcriptasi inversa, le molecole di RNAm presenti in una cellula.

In una genoteca è passibile identificare il clone che porta un gene o comunque una sequenza nucleotidica particolare.

I base ↓	II base → U	C	A	G	III base ↓
U	Phe <input type="checkbox"/> Leu <input type="checkbox"/>	Ser <input type="checkbox"/>	Tyr <input type="checkbox"/> FINE FINE	Cys <input type="checkbox"/> FINE Try	U C A G
C	Leu <input type="checkbox"/>	Pro <input type="checkbox"/>	His + <input type="checkbox"/> Gin <input type="checkbox"/>	Arg + <input type="checkbox"/>	U C A G
A	Ileu <input type="checkbox"/> INIZIO	Thr <input type="checkbox"/>	Asn <input type="checkbox"/> Lys + <input type="checkbox"/>	Ser <input type="checkbox"/> Arg + <input type="checkbox"/>	U C A G
G	Val <input type="checkbox"/>	Ala <input type="checkbox"/>	Asp- <input type="checkbox"/> Glu- <input type="checkbox"/>	Gly <input type="checkbox"/>	U C A G

Figura 10. Schema di triplette espresse nel "linguaggio" dell'RNAm.

Naturalmente i due tipi di genoteca non sono equivalenti e vengono utilizzati per scopi diversi: la library genomica viene utilizzata per individuare e mappare geni a frammenti di DNA a livello del genoma, mentre la library a cDNA è utilizzata per vedere se un certo gene è trascritto sotto forma di RNAm nonché per caratterizzare le differenze esistenti fra la forma genomica di un gene ed il suo trascritto.

Utilizzando quindi una sequenza amminoacidica parziale della transferasi A e, tramite tecniche di clonazione e successivo sequenziamento, è stato possibile identificare la sequenza nucleotidica del DNA che codifica la sintesi di queste proteine.

La costruzione di quattro genoteche di cDNA, ottenute da linee cellulari di isto-gruppo ABO conosciuto, ha permesso di dimostrare che esse esprimono RNAm simili a quelli della transferasi A.

La successiva caratterizzazione dei vari cloni di cDNA ha inoltre permesso di identificare alcune differenze nucleotidiche che potevano essere responsabili del polimorfismo ABO.

In particolare sono state individuate quattro differenze nucleotidiche fra gli alleli A e B che codificano per quattro diversi aminoacidi responsabili della diversa struttura primaria delle transferasi A e B e quindi della loro diversa specificità zucchero-nucleotide che è, come abbiamo visto, alla base della biosintesi degli antigeni A e B.

Relativamente ai cDNA degli alleli O è stata confermata la singola delezione nucleotidica nella porzione codificante del DNA responsabile della spostamento della cornice di lettura e della sintesi di una proteina sprovvista di attività transferasica.

Le differenze puntiformi nelle sequenze nucleotidiche riscontrate sono riassunte nella tabella 9.

Con le biotecnologie è stato possibile confermare il polimorfismo di questo sistema isto-ematico anche con lo studio del DNA genomico ottenuto da linee cellulari con fenotipo ABO conosciuto.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei cloni di cDNA ha permesso infatti di identificare dei "siti di taglio" per enzimi di restrizione specifici per ciascun allele ABO nelle posizioni nelle quali era stata osservata una sostituzione nucleotidica ed ha permesso anche la conferma della delezione di una base nell'allele O.

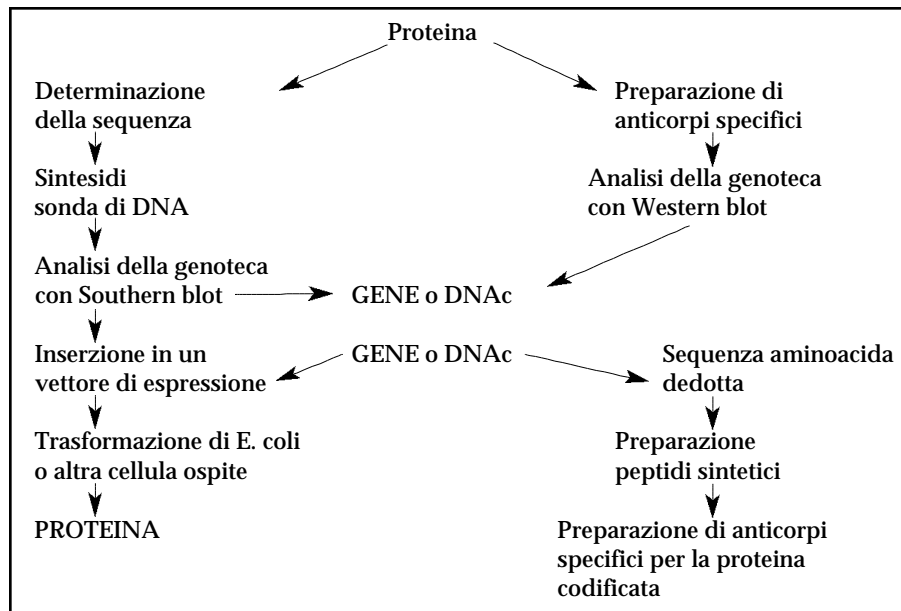


Figura 11. Esempi di applicazioni della biotecnologie.

Gli enzimi di restrizione, come è noto, passano ad essere utilizzati per caratterizzare, a livello molecolare, in tratti di DNA, in gene o l'intero genoma.

La "digestione" del DNA con questi enzimi permette infatti di mappare con precisione i "siti di riconoscimento" e, se questa viene fatta utilizzando più enzimi, si ottiene una "mappa" dettagliata.

Piccole differenze fra molecole di DNA infatti possono essere identificate separando i loro frammenti di restrizione mediante gel-elettroforesi in quanto i vari frammenti migrano nel gel con una velocità inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

Le differenze puntiformi delle catene nucleotidiche che caratterizzano gli alleli A, B e 0 sono alla base della "creazione" e della "eliminazione" di siti di restrizione specifici per alcuni di questi enzimi e sono state utilizzate, in associazione con la Reazione di polimerizzazione a catena (PCR), per effettuare, con una metodologia relativamente semplice e veloce, la genotipizzazione del sistema ABO in cellule ematiche o su micro quantità di campioni biologici.

ALLELI:	A	B	O
Base n°			
258	G	G	Delezione
523	C	G	C
700	G	A	G
793	C	A	C
Legenda: G = guanina C = citosina A = adenina			

Tabella 9. Differenze nucleotidiche riscontrate fra gli alleli ABO.

Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

La PCR è una biotecnologia che permette l'amplificazione di sequenze specifiche di DNA. I tratti della sequenza di DNA da amplificare sono delimitati dall'impiego di due oligonucleotidi sintetici: Primer che "ibridizzano", cioè si legano in maniera complementare al DNA "stampo".

Il processo di amplificazione si realizza attraverso la denaturazione, appaiamento ed estensione tramite variazioni di temperatura di una miscela contenente il segmento di DNA da amplificare, i primer, nucleotidi che daranno origine ai nuovi frammenti di DNA da amplificare e la Taq-poli-merasi.

Alla fine della procedura il frammento di DNA in esame viene amplificato milioni di volte.

Tale metodologia è attualmente usata, oltre che in studi di genetica di base e applicata, nella diagnostica virologica e nella Medicina Forense in quanto, una dei grandi vantaggi dell'impiego della PCR è quella di poter utilizzare microcampioni biologici senza la necessità di estrarre e purificare gli acidi nucleici.

E' possibile comunque ipotizzare che, con le ricerche applicative attualmente in corso, la completa automazione del procedimento ciclico di amplificazione e di tutte le fasi della procedura, questa metodica possa trovare applicazione anche nel Laboratorio di Immunoematologia, sia per la tipizzazione tessutale (HLA), ma anche eritrocitaria.

Studi sono attualmente in corso per l'identificazione negli amniociti di donne Rh negative, di antigeni Rh fetali per il monitoraggio e la profilassi della malattia emolitica del neonato.

Amplificando con la PCR i frammenti di restrizione ottenuti "digerendo" le catene nucleotidiche che formano gli alleli ABC è stato possibile risalire alla genotipizzazione di questo sistema. L'analisi dei frammenti di restrizione, ottenuti dopo digestione con gli enzimi Kpn I e Alu I, permette l'osservazione di segmenti di DNA di diverso peso molecolare, in funzione del genotipo ABO del campione in esame, che verranno individuati nel gel come "bande fluorescenti" alla luce U.V. per la presenza nei frammenti stessi dell'Etidio Bromuro.

Una di queste metodiche prevede una prima fase in cui vengono amplificate con questa biotecnologia le sequenze nucleotidiche del DNA appar-

tenenti al locus ABO all'interno delle quali sono compresi i nucleotidi 257 e 700 che, come abbiamo visto in precedenza, permettono di differenziare, il primo (258), il gene O dal gene A, il secondo (700) il gene O dal gene B.

In particolare, utilizzando una coppia di primers, che per semplificare indicheremo P1 e P2, viene amplificata una sequenza di 200 paia di basi (pb) che include il nucleotide 258 mentre, con un'altra coppia di primers, indicata con P3 e P4, viene amplificato un segmento di DNA di 128 pb. che comprende il nucleotide n.700.

Una volta ottenuta l'amplificazione dei due frammenti, si procede ad analisi di restrizione degli stessi mediante digestione enzimaticautilizzando, per l'amplificato con P1 e P2 l'enzima di restrizione Kpn I che ha un sito di clivaggio GGTAC/C e per il frammento amplificato con i primers P3 e P4 l'enzima di restrizione Alu I che ha un sito di clivaggio AG/CT.

Dallo schema successivo possiamo notare come la delezione, ovvero l'assenza nella posizione 258 della Guanina (G), sul frammento di DNA amplificato dai primers P1 e P2, caratteristica dell'allele O, si determina, a tale livello, la creazione di uno specifico sito di restrizione per l'enzima Kpn I:

253	258	Alleli
GTGGTGACCCCT		A e B
GTGGT- ACCCCT		O

	Kpn I	

Il "taglio enzimatico" con l'enzima Kpn I è quindi indicativo della presenza dell'allele O per la delezione della Guanina e la formazione del sito di clivaggio per l'enzima di restrizione.

La non "digestione" con questo enzima di restrizione è invece indicativo dell'assenza dell'allele O e quindi della presenza degli alleli A e/o B.

Le varie combinazioni genotipiche possibili possono essere così schematizzate:

- nella omozigosi O/O si ha la formazione di due siti di restrizione per Kpn I e la digestione dei frammenti di 199 pb. in due frammenti di 171 pb e 28 pb (Figura12);

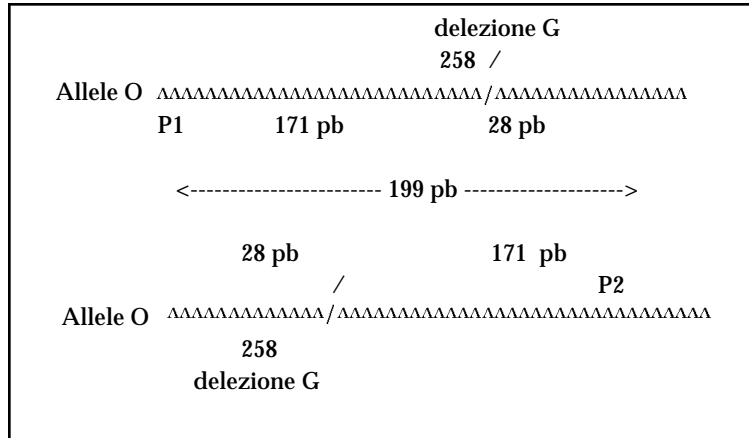


Figura 12.

- nella eterozigosi O/A o O/B si ha la formazione di un singolo sito di clivaggio per Kpn I sull'allele O e nessuna digestione negli alleli A e/o B per cui si avrà la formazione di tre frammenti di DNA: uno di 200 pb derivanti dall'allele O che, come abbiamo visto in precedenza, un sito di clivaggio per Kpn I.

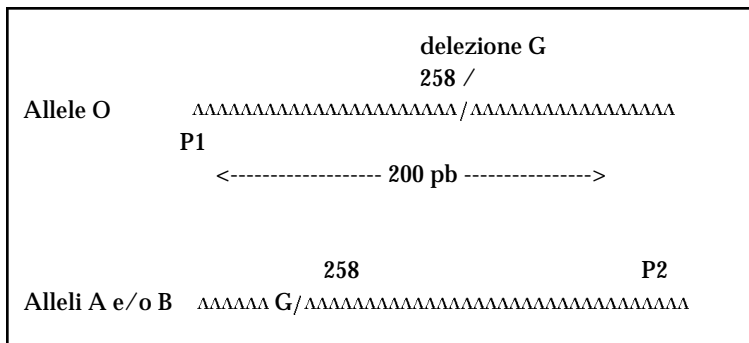


Figura 13.

- nel caso dell'assenza dell'allele O come nei genotipi A/A, B/B o A/B si avrà la formazione esclusiva di frammenti di 200 pb dovuti all'assenza del sito di clivaggio per Kpn I.

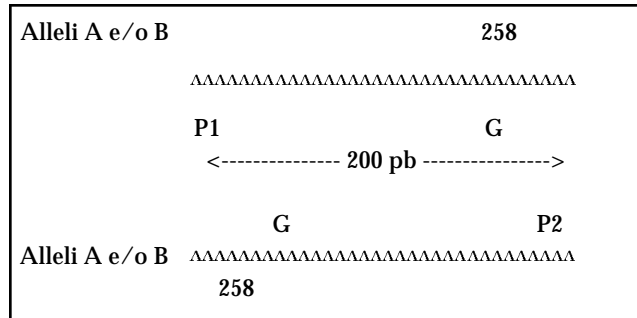


Figura 14.

Nella Figura 15 è rappresentata la disposizione delle “bande fluorescenti” visibili in gel d’agarosio, dopo separazione elettroforetica dei frammenti di DNA amplificati con i primer P1 e P2 e contenenti il nucleotide 258 che si originano dalla digestione con Kpn I nei diversi genotipi del sistema ABO.

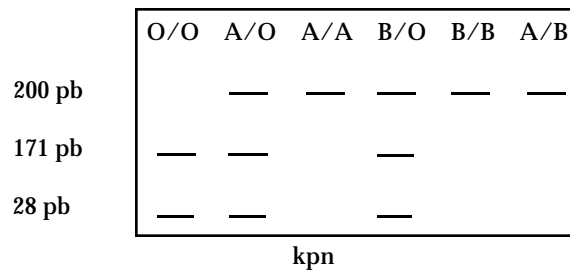


Figura 15.

Con un procedimento analogo ed utilizzando due primers, definiti P3 e P4, viene amplificata una sequenza di cDNA del locus ABO di 128 pb contenente il nucleotide n. 700.

Il trattamento di questi frammenti amplificati con l’enzima di restrizione Alu I permette di differenziare gli alleli A e O dall’allele B in quanto, mentre i primi due alleli contengono nella posizione 700 la guanina (G), l’allele B contiene l’adenina (A) e, la presenza di quest’ultimo nucleotide crea un sito di clivaggio per questo enzima di restrizione come rappresentato nella figura 16.

Comparando quindi i risultati delle digestioni enzimatiche con Kpn I e Alu I si può quindi risalire all'attribuzione del genotipo ABO nel campione in esame.

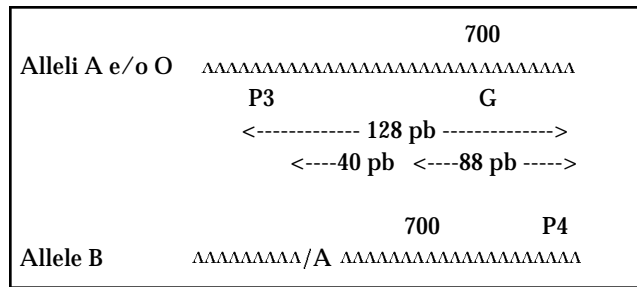


Figura 18.

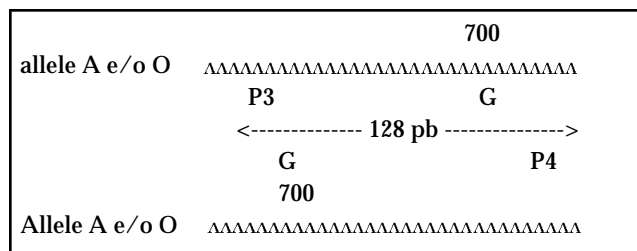


Figura 19.

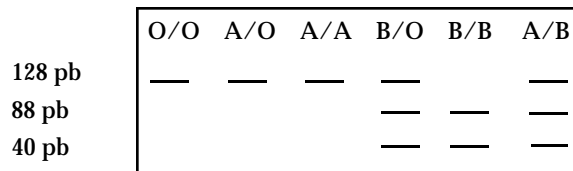


Figura 20.

	Kpn I	Alu I
Digestione completa	O/O	B/B
Digestione parziale	A/O, B/O	A/B, B/O
Assenza di digestione	A/A, A/B, B/B	A/A, A/O, O/O

Tabella 10. Interpretazione del genotipo ABO dai prodotti di amplificazione del cDNA con gli enzimi di restrizione Kpn I e Alu I.

Conclusioni

Allo stato attuale delle conoscenze, le ricerche biochimiche e di biologia molecolare effettuate sul sistema isto-ematico ABO hanno permesso di chiarire che:

I geni A e B codificano delle glicosiltransferasi che catalizzano su varie molecole lipidiche e proteiche l'inserimento di oligosaccaridi immunodominanti responsabili delle specificità A e B mentre il gene O dà origine ad una molecola sprovvista di tale attività enzimatica.

Le regioni codificanti degli alleli A e B mostrano tra loro un elevato grado di omologia (99%) e le differenze fra i due alleli si limitano a sette nucleotidi. Quattro di queste provocano cambiamenti nelle sequenze delle proteine codificate (transferasi), ed in particolare provocano il cambiamento di quattro aminoacidi.

Le altre tre sequenze nucleotidiche diverse sono silenti, non provocano cioè nessun cambiamento della sequenza aminoacidica delle transferasi.

Queste sostituzioni aminoacidiche sono alla base della diversa specificità delle transferasi nelle reazioni zucchero-nucleotide che portano alla biosintesi degli antigeni A e B che, come abbiamo visto nella parte dedicata alla biochimica di questo sistema, risultano essere: UDP-Nacgluc per l'antigene A e UDP-Gal per l'antigene B.

In particolare delle 4 sostituzioni aminoacidiche, mentre la prima (arginina in A, glicina in B), non riveste importanza nella determinazione di questa specificità, la terza e la quarta sostituzione (leucina e glicina in A, metionina e alanina in B) e, in minor misura la seconda sostituzione, (glicina in A e serina in B) modificano la flessibilità delle due proteine e questo sembra essere la causa delle due diverse specificità zucchero-nucleotide.

Nei soggetti con fenotipo O si ha la delezione di un singolo nucleotide che dà luogo ad uno spostamento della cornice di lettura che provoca la traduzione, da parte dell'RNAm, di una proteina enzimaticamente inattiva.

Differenze a livello delle sequenze nucleotidiche sono state individuate anche fra gli alleli A1 e A2. In particolare sono state identificate una sostituzione ed una delezione di singole basi nella sequenza codificante dell'ultimo esone dell'allele A2.

La delezione della singola base è localizzata nella porzione che codifica la parte carbossi-terminale della transferasi, nella zona cioè dove risiede il sito attivo della proteina e questa sembra essere la causa della debole attività e della diversa cinetica di questa transferasi che provoca una differenza qualitativa e quantitativa nei carboidrati che costituiscono l'antigene A2.

La causa della debole attività transferasica dei fenotipi A3, B3 e degli altri fenotipi più "deboli" sembra dovuta alla sostituzione di una singola base. Questo provoca un cambiamento di un aminoacido con conseguente modifica dell'alfa-elica della proteina codificata e decremento della sua attività transferasica.

Nel caso dei fenotipi deboli e particolarmente i fenotipi B sembra comunque che la genetica molecolare sia eterogenea e si diversifichi tra i vari fenotipi.

- Cis-AB: anche per questo raro fenotipo che fu inizialmente ipotizzato essere il frutto di un crossing-over intragenico fra gli alleli A e B sono state effettuate ricerche di genetica molecolare. Da queste sembra che una mutazione puntiforme che avviene nel DNA di questi soggetti dia origine ad una transferasi con attività bifunzionale.

Da quanto in precedenza descritto si può comprendere come queste biotecnologie siano di estrema utilità non solo per una maggior comprensione della genetica molecolare del sistema ABO, ma possano servire anche per lo studio di altri sistemi gruppo-ematici.

Dato inoltre che questi geni sono stati conservati nel corso della evoluzione, probabilmente ci permetteranno di meglio comprendere le loro funzioni biologiche che, allo stato attuale delle conoscenze, non sono ancora sufficientemente chiarite.

E' prevedibile inoltre che i fenotipi eritrocitari e particolarmente i "rari" o alcuni ancora non individuati potranno essere accuratamente documentati anche nel DNA senza le ricerche sierologiche le quali, almeno a breve termine, non potranno ovviamente essere sostituite.

Non solo, ma se si considera che l'espressione di questi antigeni isto-ematici va incontro a notevoli cambiamenti durante la differenziazione e l'oncogenesi si comprende anche l'interesse pratico che tali ricerche possono avere in futuro.

Bibliografia

- 1) Abe K. et al.: The antibody specific to type 1 chain blood group A determinant. *J.Immunol.* 1984; 132: 1951.
- 2) Anstee D.J.: Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. *Vox Sang.* 1990; 58: 1.
- 3) Badet J.: Activités glucosyltransferasique sérique associées à la biosynthese des antigènes de groupes sanguins A et B. Application à l'étude de sujets B normaux et cis-AB. *Rev Fr. Transf. Immunohémat.* 1976; 105: 19.
- 4) Berneman Z.N. et al: Flow-Cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. *Vox Sang.* 1991; 61: 265.
- 5) Cartron J.P.: Etude quantitative et thermodynamique des phénotypes érythrocytaires: "A faibles". *Rev. Fr. Transf.Immuno hémat.* 1976; 19: 35.
- 6) Cartron J.P., Mulet C.: Etude des activités 2-L-fucosyltransférase des sérum et des membranes érythrocytaires de sujets Bombay et "para-Bombay". *Rev. Franc. Transf. Immunohemat.* 1978; 21: 29.
- 7) Ceppellini R.:Physiological genetics of human blood factors. In: Wolstenholme GEW, O'Connor CM Eds.London: Churchill 1959; 241: 61.
- 8) Clausen H., Hakomori S.: ABH related histo-blood group antigens; Immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang.* 1989; 56: 1.
- 9) Clausen H. et al: Isolation and characterization of novel glycolipids with blood group A-related structures. *J.Biol. Chem.* 1987; 262: 14228.
- 10)Donald A.S.R.: A-active trisaccharides isolated from A1 and A2 blood group specific glycoproteins. *Eur J. Biochem.*1981; 120: 243.
- 11) Hirszfeld L., Kostuch Z.:Das Wesen der Blutgruppe O.Klin Wschr. 1938; 17: 1047.
- 12) Iseki S., Masaki S. Transformation of blood group substance by bacterial enzyme. *Proc. Jap. Acad. Sci.* 1953; 137: 1187.

- 13) Issit P.D.: Applied Blood Group Serology. 3rd Ed: Montgomery Scient. Publ. Florida Miami. 1989
- 14) Landsteiner K.: Uber Agglutinationserscheinungen des normalen menschlichen Blutes. Wien. Kim. Wschr. 1901; 14: 1132.
- 15) Lee J.C et al.: ABO genotyping by polymerase chain reaction. J of Forensic Sciences. 1992; 37: 1269.
- 16) Moore S. et al.: A mouse monoclonal antibody with anti-A,(B) specificity wich agglutinates Ax cells. Vox Sang. 1984; 47: 427.
- 17) Moreno C. et al.: Immunochemical studies on blood groups. LI. A comparative study of the reaction of A1 and A2 blood group glycoproteins with human anti-A. J. Exp. Med 1971; 134: 439.
- 18) Morgan W.T.J., Watkins W.M.: Genetic and biochemical aspects of human blood group A-,B-,H-,Lea and Leb specificity. Br. Med Bull. 1969; 25: 30.
- 19) Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 1987; 155: 335.
- 20) Oriol R. et al.: Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. Vox Sang. 1986; 51: 161.
- 21) Race R.R., Sanger R.: Blood groups in man. 6th ed. (Blackwell Scientific. Oxford. 1975)
- 22) Race C et al.: An alfa-D-galactosyl-transferase associated with the blood group B character. Biochem. J. 1968; 107: 733.
- 23) Rouger Ph., Salmon Ch.: A new approach to the thermodynamic study of ABO antibodies. Immunology. 1979; 37: 547.
- 24) Salmon. Ch. et al.: Quantitative and thermodynamic studies of erythrocytic ABO antigens. Transfusion. 1976; 16: 580.
- 25) Salmon Ch. et al.: Le complexe cis-AB du systeme ABO. Rev. Fr. Transf. Immunohemat. 1975; 18: 11.
- 26) Watkins W.M.: Blood group substances. Science 1966; 152: 172.

- 27) Watkins W.M., Morgan WTJ.: Possible genetical pathways for the biosynthesis of blood group mucopolysaccharides. *Vox Sang.* 1959; 4: 97.
- 28) Yamamoto F. et al.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345: 229.
- 29) Yamamoto F. et al.: Cloning and characterization of DNA to human UDP-GalNac Transferase (Histo-blood Group A Transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.* 1990; 265.2. 1146.
- 30) Yamamoto F., Hakomori S.: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem.* 1990; 31:19257.
- 31) Yamamoto et al.: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: cis-AB alleles. *Vox Sang.* 1993; 64: 120.
- 32) Yamamoto F. et al.: Molecular Genetic Analysis of the ABO blood group system: 1 Weak Subgroups: A3 and B3 alleles. *Vox Sang.* 1993; 64: 116.
- 31) Yoshida A.: Identification of genotypes of blood group A and B. *Blood* 1980; 55: 119.

Indice

Editoriale	»	3
Introduzione	»	5
Sierologia del sistema ABO	»	6
Sottogruppi A1 e A2	»	10
Fenotipi A e B deboli	»	10
Il fenotipo cis-AB”	»	12
Gli anticorpi del sistema ABO	»	15
Anticorpi naturali	»	16
Anticorpi “immuni”	»	17
Autoanticorpi	»	17
Anticorpi monoclonali	»	17
Metodiche sierologiche per la tipizzazione degli antigeni ABO . . .	»	18
Errori Tecnici	»	20
Caratteristiche fenotipiche particolari delle emazie	»	20
Caratteristiche particolari del siero	»	21
Poliagglutinabilità degli eritrociti	»	22
Biochimica del sistema ABO	»	23
Biologia molecolare del sistema ABO	»	35
La sintesi proteica	»	35
Cornice di lettura	»	36
Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)	»	41
Conclusioni	»	47
Bibliografia	»	49
Indice	»	52

Caleidoscopio

Italiano

1. Rasso S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rasso S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rasso S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rasso S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rasso S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroenzimologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rasso S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:

- L'amenorrea.* Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale.* Luglio '87.
 29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche.* Settembre '87.
 30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica.* Novembre '87.
 31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali.* Gennaio '88.
 32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario.* Febbraio '88.
 33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress.* Marzo '88.
 34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro.* Maggio '88.
 35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare.* Giugno '88.
 36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2).* Luglio '88.
 37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia.* Novembre '88.
 38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili.* Gennaio '89.
 39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie.* Febbraio '89.
 40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni.* Marzo '89.
 41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie coloretali.* Aprile '89.
 42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina.* Maggio '89.
 43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I.* Giugno '89.
 44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.* Luglio '89.
 45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.* Settembre '89.
 46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio.* Ottobre '89.
 47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.* Gennaio '90.
 48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana.* Febbraio '90.
 49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito.* Marzo '90.
 50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio.* Aprile '90.
 51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri.* Maggio '90.
 52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo.* Giugno '90.
 53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva.* Luglio '90.
 54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergeo-acari.* Agosto '90.
 55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C).* Settembre '90.
 56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali.* Ottobre '90.
 57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).* Gennaio '91.

58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immuno-scintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Basaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Maggio '94.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 12, numero 89

Direttore Responsabile

Sergio Rasso
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rasso@ssnet.it

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater

EDITORE

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciassi

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL:<http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite[®], Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/1984
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Settembre 1994
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano