

**Immunoematologia
eritrocitaria – il sistema
ABO**

**Nuove metodiche in
biologia molecolare.**

Cenni storici

- 1900 Karl Landsteiner (A, B, O)
- 1902 Von Decastello & Sturli (AB)
- La presenza o l'assenza di due soli antigeni (A e B) condizionava la presenza di 4 gruppi ematici
- Il sist. ABO è l'unico sistema gruppo ematico in cui sono invariabilmente presenti nel siero dei soggetti normali gli anticorpi contro gli antigeni assenti sugli eritrociti

Cenni storici

- Espresi debolmente a partire dalle 5-6 sett. gestazionali
- Raggiungono il completo sviluppo a 2-3 anni e restano costanti per tutta la vita
- Gli anticorpi “naturali” (IgM) sono in genere assenti alla nascita e compaiono a 4-6 mesi di vita

Cenni storici

gruppo	N°ISBT	Frequenza popol. europea	Antigene sull'emazia	Anticorpo nel siero
A	ABO1	41,7%	A	Anti-B
B	ABO2	8,5%	B	Anti-A
AB	ABO3	3,0%	A e B	-
O		46,7%	-	Anti-A e anti-B

Cenni storici locus ABO

- I prodotti degli alleli del sistema ABO vengono ereditati secondo le classiche regole della genetica mendeliana considerando che:
 - A) A e B sono co-dominanti
 - B) O è recessivo

Cenni storici locus ABO

genotipo	fenotipo
AA e AO	A
BB e BO	B
AB	AB
OO	O

Cenni storici locus ABO

- L'elemento fondamentale degli antigeni del sistema ABO presenti sulle emazie è un polisaccaride di tipo 2

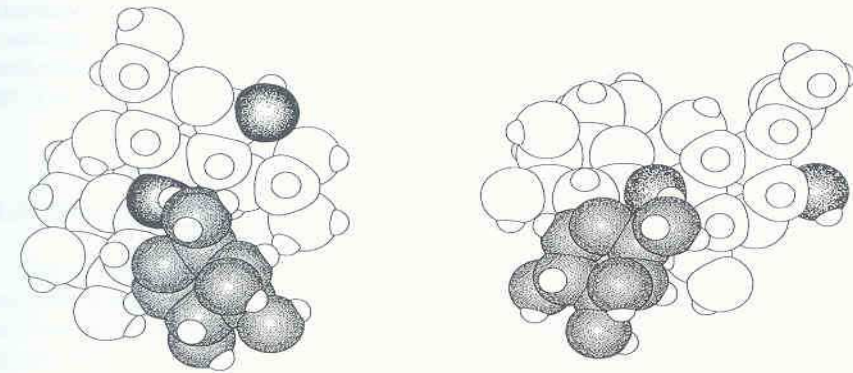
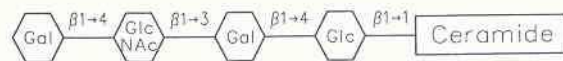
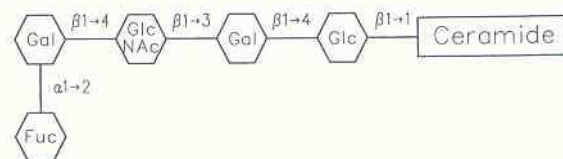


Figure 5.3: Three-dimensional models of H type-1 (left) and H type-2 (right) determinants.

Neolactotetraosylceramide (Paragloboside)



H Substance



- Sul polisaccaride di tipo 2 viene legata una molecola di fucosio a produrre la sostanza H

Cenni storici locus ABO

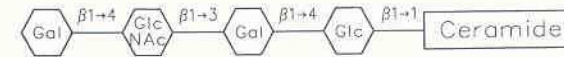
A-transferasi:

- l'allele A codifica per un enzima (α 1,3-N-acetilgalattosamminil-transferasi) che lega una molecola di N-acetilgalattosamina alla sostanza H

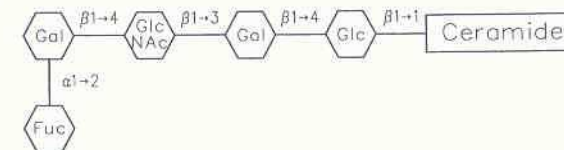
B-transferasi:

- l'allele B codifica per un enzima (α 1,3-galattosil-transferasi) che lega una molecola di galattoso alla sostanza H

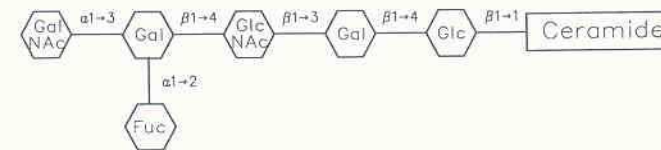
Neolactotetraosylceramide (Paragloboside)



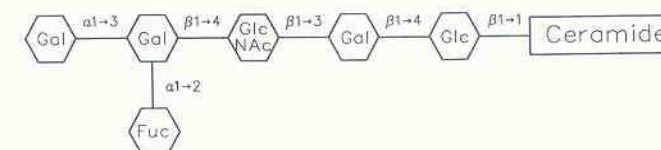
H Substance



A Substance



B Substance



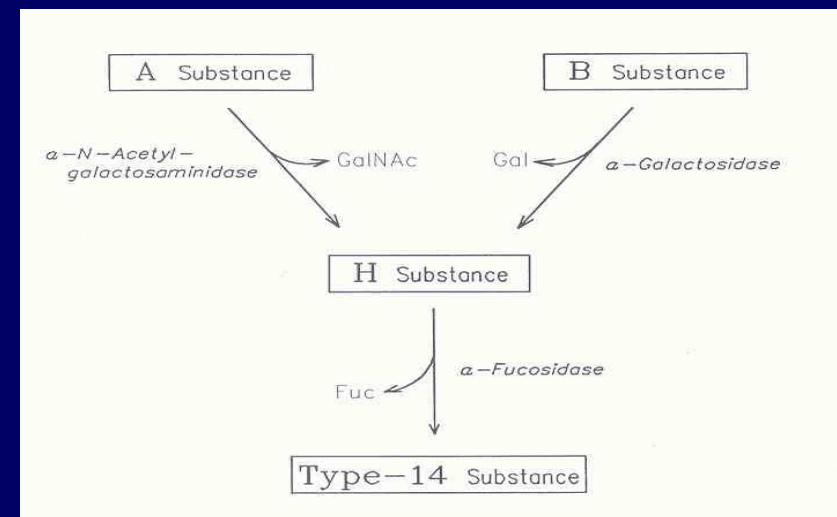
Cenni storici locus ABO

- Sost. A, sost. B e sost. H sono **glicoproteine** o **glicosfingolipidi** i cui determinanti antigenici immunodominanti sono correlati a specifici zuccheri



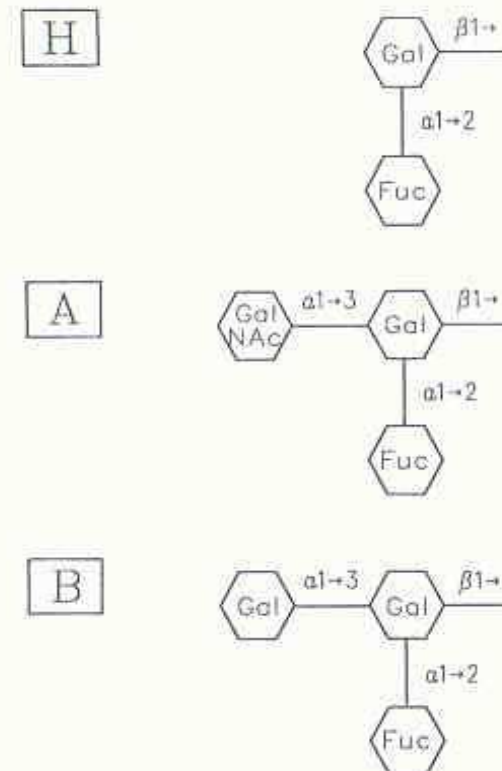
Sostanza	Zucchero immunodominante
A	N-acetilgalattosamina
B	galattoso
H	fucoso

- I determinanti antigenici presenti su sostanza A, sost. B e sost H sono clivabili mediante digestione enzimatica



Cenni storici locus ABO

- In realtà i determinanti antigenici del sistema ABO pur dipendendo dalla presenza di uno zucchero immunodominante sono costituiti da una struttura tridimensionale che coinvolge più zuccheri



Locus coinvolti:

- **ABO locus:** 3 alleli (A, B, O) localiz. sul crom. 9 (9q34.1-q34.2)
- **Hh locus:** 2 alleli (H, h) localiz. sul crom. 19 (19q13.3)
- **Secretor locus:** 2 alleli (Se, se) localiz. sul crom. 19 (19q13.3), closely linked al locus H

Locus H

- L'allele H determina la produzione della sost. H che costituisce il precursore su cui agiscono i prodotti degli alleli A e B determinando la sintesi degli antigeni A e B
- L'allele h è inattivo e non dà luogo alla produzione di precursori

genotipo	fenotipo
HH	H
Hh	H
hh	-

Locus H

- la **sost. H** è quindi presente sulle emazie di tutti i soggetti il cui genotipo è HH o Hh
- Cimentando le emazie di differente fenotipo ABO con reagenti anti-H si osserva che l'intensità della agglutinazione decresce in funzione del fenotipo stesso (O, A₂, B e A₁)
- La presenza di un genotipo hh determina la mancata produzione della sost. H (fenotipo Bombay e Parabombay)

Table 5.5: Number of ABH determinants per erythrocyte

Blood group of erythrocytes	A sites	B sites	H sites
A₁	0.81–1.17 x 10 ⁶ ^[a]	–	0.07–0.17 x 10 ⁶ ^{[c][e]}
B	–	0.61–0.83 x 10 ⁶ ^[a] 2.2 x 10 ⁶ ^[b]	0.40–0.47 x 10 ⁶ ^{[c][e]}
O	–		1.59–1.74 x 10 ⁶ ^[c] 1.7–1.9 x 10 ⁶ ^[d]

^[a] Quantitative immunoabsorption, from Economidou et al. [103].

^[b] Assay of the immunodominant α -galactose, from Harpaz et al. [185].

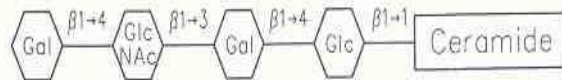
^[c] Conversion of H sites into A determinant structures using the A transferase from human serum, from Schenkel-Brunner [431]. Using the A transferase from hog gastric mucosa [437,446] a value of 3 x 10⁶ ABH sites was obtained (since the hog enzyme is not defined as exactly as the human transferase these results are probably due to non-specific transfer of N-acetylgalactosamine residues).

^[d] Lectin absorption, from Matsumoto et al. [321].

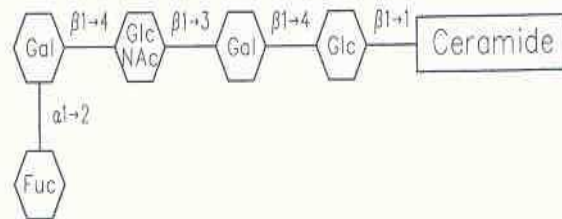
^[e] Schenkel-Brunner (1981), unpublished results.

Locus H

Neolactotetraosylceramide (Paragloboside)



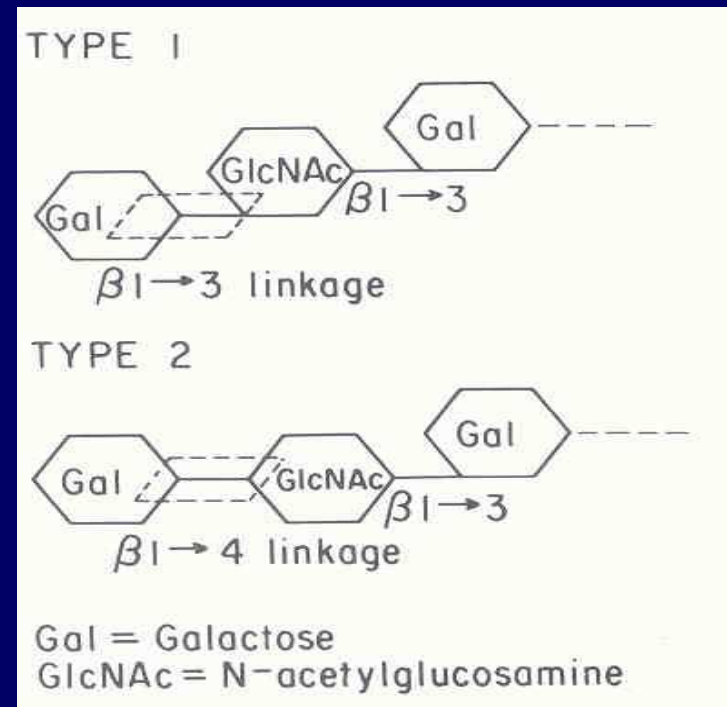
H Substance



- **H transferasi:** in realtà l'allele H codifica per un enzima (**α1,2-fucosil-transferasi**) che lega una molecola di fucoso ad un precursore polisaccaridico di tipo 2

Secretor locus Se/se

- Gli antigeni del sistema ABO possono essere presenti in forma solubile nelle secrezioni sierose e mucose e nel plasma
- In questo caso sono coinvolti precursori polisaccaridici di tipo 1 o di tipo 2



Secretor locus Se/se

- La capacità di secernere glicoproteine con caratteristiche antigeniche A, B o H è regolata dal locus Se/se
- Allele Se: codifica per una α 1,2 fucosil-transferasi che lega una molecola di fucoso ad un precursore polisaccaridico di tipo 1 (secretor transferasi)
- Allele se: inattivo

genotipo	fenotipo
SeSe	secretore
Sese	Secretore
sese	Non secretore

Secretor locus Se/se

Stato secretore	Frequenza in Europa*	genotipo	Fenotipo	
			Antigeni sulle emazie	Specificità secrete
Secretori	77%	A	A	A (H)
		B H Se	B	B (H)
		O	H	H
Non secretori	23%	A	A	-
		B H sese	B	-
		O	H	-

* *Race and Sanger 1975*

Caratteristiche del locus ABO

- 7 esoni distribuiti in uno spazio di 18 kb
- Range dimensionale degli esoni: 28-688 bp
- La maggior parte della coding sequence è localizzata negli esoni 6 e 7 (77%)
- **A₁ transferasi (ABO*A101)**: 1062 basi che codificano una glicoproteina di 41 kDa, 1 N-glicosilazione in pos. 113
- **B transferasi (ABO*B101)**: differisce per 7 nucleotidi di cui 3 silenti e 4 strutturali = 4 sost. aminoacidiche

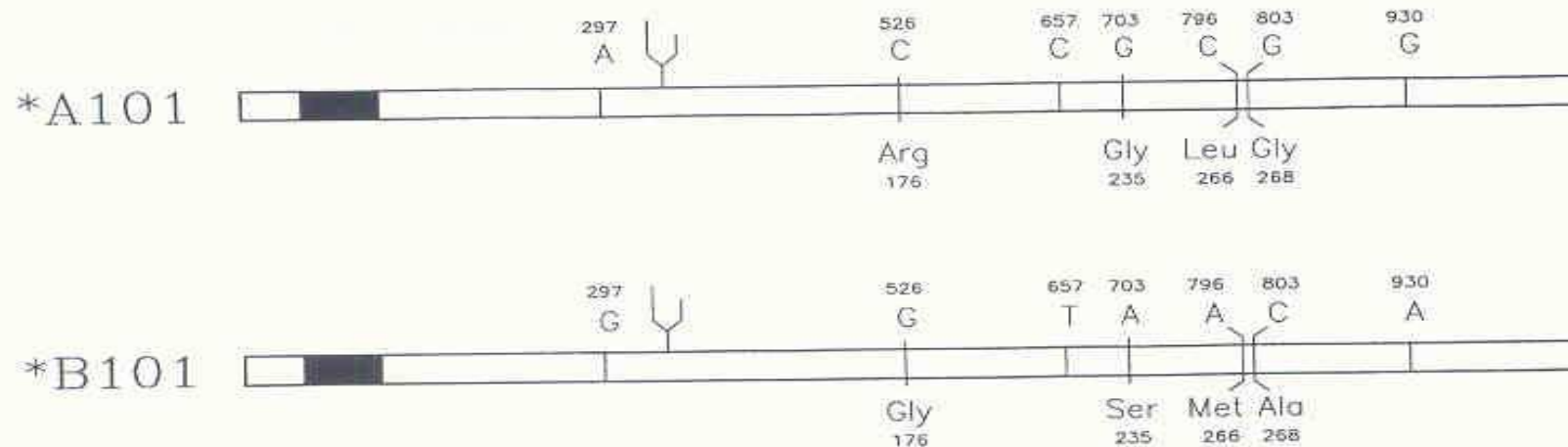


Figure 5.21: Amino acid sequences of A_1 and B alleles.

■: transmembrane domain, Y: N-glycan.

Provisional nomenclature of the genes according to Ogasawara et al. [355].

According to Yamamoto et al. [547].

Si conoscono alcune **varianti alleliche di A_1** tra cui:

- **ABO* A_{102}** : frequente nella razza mongolica, attività enzimatica 90% (sost. Pro-leu in pos.156)
- **2 varianti ibride (A e B, B e O) codificanti entrambi per A_1**

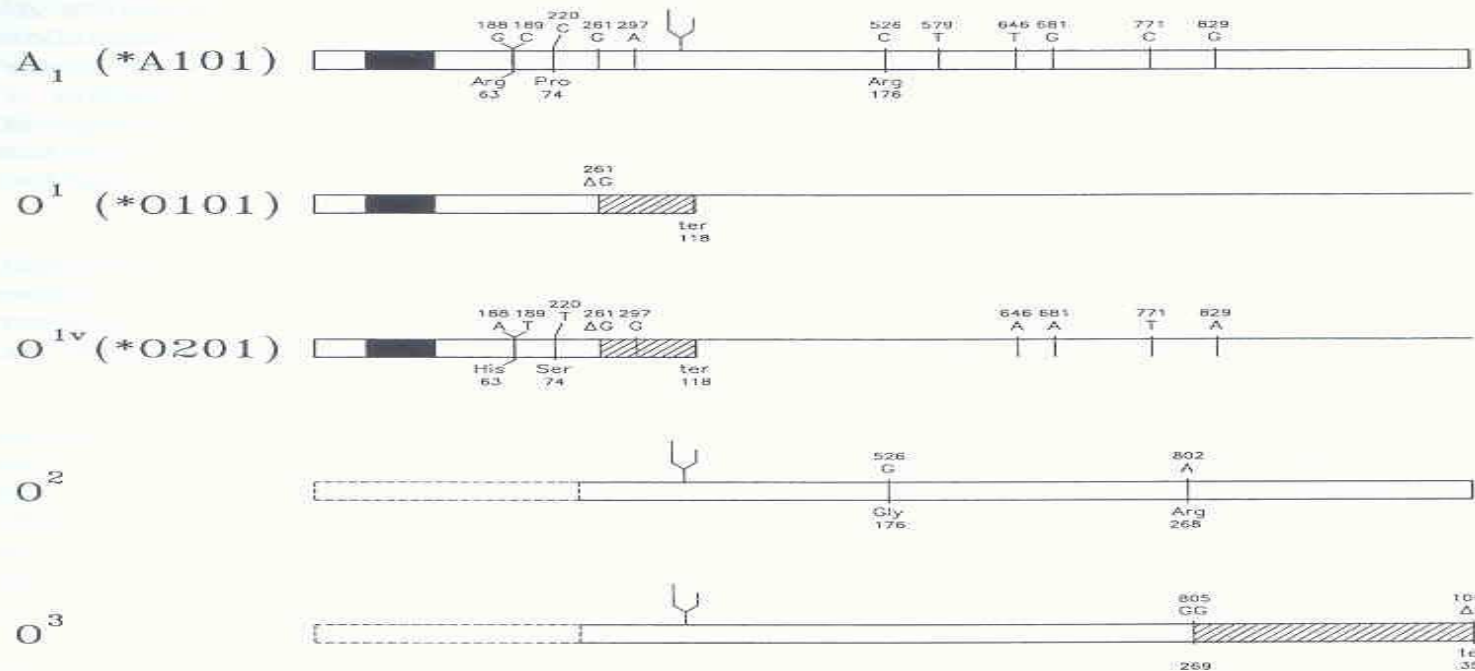


Figure 5.22: Amino acid sequences of the most frequent O alleles.

□ = sequence not determined, ■ = transmembrane domain,
 ▨ = additional domain at the C-terminus due to frameshift,
 Y = N-glycan.

Provisional nomenclature as proposed by Olsson et al. [358] and Ogasawara et al. [355] (in brackets).
 According to Yamamoto et al. [545,547] and Olsson et al. [358,359]

- Si conosce una serie di diversi **alleli O**: si tratta in genere di mutazioni del gene A₁ che causano la produzione di una proteina inattiva
- O¹: è la più comune
- O²: è meno comune (le altre sono molto rare)

Caratteristiche del locus H

- 4 esoni
- La coding sequence è localizzata nell'esone 4
- **H transferasi (FUT1)**: codifica una glicoproteina di 365 aa 41 kDa, 2 N-glicosilazioni in pos. 65 e 327
- Presente solo nel midollo osseo e sulla linea eritroide, assente nelle mucose

Caratteristiche del locus Se

- 2 esoni
- La coding sequence è localizzata nell'esone 2
- **Secretor transferasi (FUT2)**: codifica una glicoproteina di 332-343 aa con 3 N-glicosilazioni in pos. 177, 271 e 297
- Presente solo nei tessuti di origine entodermica (es. intestino e polmone) ma non nel midollo osseo e nella linea eritroide
- Gli alleli **se** sono tutti varianti tronche dell'allele Se

Fenotipo Bombay e Parabombay

- BOMBAY: Bhende 1952 = totale assenza di attività ABH su eritrociti e nei secreti
- PARABOMBAY: assenza di attività ABH su eritrociti ma non nei secreti

Table 5.20: Genotypes of H-deficient phenotypes.

Genotype	Trivial name	ABH substances in	
		Erythroid cells	Secretions
H/H, Se/-	ABH-Secretor	+	+
H/H, se/se	ABH-nonsecretor	+	-
h/h, Se/-	Parabombay	-	+
h/h, se/se	Bombay	-	-

Fenotipo Bombay e Parabombay

- Bombay (O_h): deficit di H transferasi (molte le mutazioni identificate) in soggetti se/se
- Freq. 1:312.000 in europa (1:7.600 nell'etnia Marathi in India)
- Trattando con papaina si distinguono O_h , O_h^A , O_h^B e O_h^{AB}
- Presenza di anti A, anti B e anti H nel siero

Sottogruppi e varianti ABH

- Nel corso degli anni sono state identificate numerose varianti sierologiche dei gruppi A, B ed H
- Si tratta di varianti molto rare (eccetto A2 che è comune – 22%-in Europa)
- In questi sottogruppi l'attività A, B ed H risulta significativamente ridotta o non evidenziabile sebbene gli eritrociti mantengano la capacità di adsorbire i rispettivi anticorpi

Determinazione gruppo ABO

Emazie paziente con sieri test (test diretto)		Siero paziente con emazie test (test indiretto)			Interpretazione
Anti A	Anti B	Emazie A	Emazie B	Emazie O	Gruppo ABO
-	-	+	+	-	O
+	-	-	+	-	A
-	+	+	-	-	B
+	+	-	-	-	AB

Sottogruppi A

Table 5.12: Number of blood group A determinants on erythrocytes from adults belonging to different A subgroups.

Blood group		Number of A determinants	
A ₁		810,000 –	1,170,000
A ₂		160,000 –	440,000
A ₃	average value	40,600 –	118,000
	agglutinated cells	98,700 –	187,000
	non-agglutinated cells	21,300 –	38,000
A _x	average value	7,500 –	10,500
	agglutinated cells	10,800 –	22,500
	non-agglutinated cells	7,300 –	8,800
A _{end}	average value	2,100 –	2,700
	agglutinated cells	69,000 –	137,000
	non-agglutinated cells	0	
A _m		100 –	1,900
A _{el}		100 –	1,400
A _y		100 –	1,900

The values were solely obtained by serum absorption: A₁ and A₂ by Economidou et al. [103], those of the 'weak A' variants by Cartron et al. [53].

Reattivi utilizzati

- **Anti A₁**: si utilizzano sieri anti A₁ di origine umana o una lectina estratta dai semi di **Dolichos biflorus**

NB nella pratica non è necessario determinare a quale sottogruppo appartenga il donatore o il ricevente eccetto nel caso in cui il ricevente A₂ o A₂B possieda nel siero anticorpi anti-A₁

A₂ con anti-A₁: 1-8%

A₂B con anti-A₁: 22-35%

Tuttavia questi anticorpi di solito hanno scarsa rilevanza clinica a meno che non reagiscano a 37°C

Reattivi utilizzati

- **Anti A,B**: si utilizzano sieri anti A,B di origine umana (da soggetti O)

Riconoscono un epitopo comune ad A e B e reagiscono più intensamente di anti-A ed anti-B con alcuni sottogruppi deboli (in particolare con A_x)

Reattivi utilizzati

- **Anti H:** si utilizzano sieri anti H di origine umana o una lectina estratta dai semi di **Ulex Europaeus**
- Esistono almeno due classi di anti-H umani:
 - 1) Agglutinina fredda derivata da soggetti A_1 o A_1B sulle cui emazie vi è scarsa quantità di sost. H. che in genere non reagisce a 37°C
 - 2) Ab anti H ad elevata ampiezza termica prodotti in soggetti O_h

Sottogruppi A

Table 5.13: Serological characterisation of A subgroups

Sub-group	Reaction of erythrocytes ^[a,b] with				Antibodies in serum ^[c]		Blood group substance in Saliva of ABH-secretors (Ratio A:H) ^[e]
	anti-A	anti-(A+B)	anti-A ₁ ^[d]	anti-H	anti-A ₁	anti-A	
A ₁	++++	++++	+++	-	- ^[f]	-	A + H (3.1±1.2)
A ₂	+++	+++	-	+++	+/- ^[g]	-	A + H (2.1±0.5)
A _{int}	++++	++++	++	+++			A + H
A ₃	++[M]	++[M]	-	++++	+/-	-	A + H (1.2±0.5)
A _x	-/(+)	+/ ⁺	-	++++	+	-/(+)	A _x ^[h] + H (0.5)
A _m	(+)/-	(+)	-	++++	-	-	A + H (3.2±1.0)
A _{end}	(+)[M] ^[i]	(+)[M]	-	++++	+/-	-	H
A _{finn}	(+)[M]	(+)[M]	-	++++			H
A _{bantu}	+/ ⁺ [M]	+/ ⁺ [M]	-	++++			H
A _{el}	-	-	-	++++	++	+/-	H
A _y	-	-	-	++++	-	-	(A)+ H (0.5 - 1.0)
A _{lee}	-	-	+++	++++			H

[M] Mixed-field agglutination (few small agglutinates in a pool of free red cells),

[a] all erythrocytes bind anti-A, no reaction with anti-B,

[b] degree of agglutination ranging from +++++ (strong) to + (weak) and (+) (very weak); - (no agglutination),

[c] + antibody present, (+) reduced amount of antibody, - antibody absent; all sera contain anti-B,

[d] anti-A₁ lectin of *Dolichos biflorus*,

[e] after Cartron [53],

[f] in the case of A₂B frequently anti-H,

[g] in the case of A₂B frequently anti-A₁,

[h] A substance detected by inhibition of the donor's own red cell agglutination by anti-A sera,

[i] slow agglutination (2-3 min).

From Salmon & Cartron, CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science (D. Seligson, ed.), Table 12, p. 80. By permission of CRC Press, Inc. USA

Sottogruppi B

Tab. 5.16: Serological characterisation of B subgroups.

Sub-group	Reaction of erythrocytes ^[a,b] with			Antibodies in serum ^[c]			Blood group substance in saliva of ABH-secretors
	anti-B	anti-(A+B)	anti-H	anti-A ₁	anti-A	anti-B	
B	++++	++++	+	+	+	-	B + H
B₃	+++[M]	+++[M]	+++	+	+	-	(B) + H
B_x	(+)	(+)	+++	+	+	(+) ^[d]	(B) ^[e] + H
B_m	-	-	+++	+	+	-	B + (H)
B_{el}	-	-	+++	+	+	+/-	H

[M] Mixed-field agglutination

^[a] Degree of agglutination ranging from +++++ (strong) to + (weak) and (+) (very weak); - (no agglutination),

^[b] The red cells of all subgroups bind anti-B,

^[c] + Antibody present, (+) reduced amounts of antibody, - antibody absent

^[d] Occasionally anti-B antibodies are present which do not react with the donor's own red cells

^[e] B substance detected by inhibition of the donor's own red cell agglutination by anti-B sera.

From Salmon & Cartron, CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science (D. Seligson, ed.). Table 24, p. 89) by permission of CRC Press, Inc., Boca Raton, USA

Esempi di allele depression

- In genere l'attività A e B nei soggetti AB è minore per entrambe le sostanze rispetto ai soggetti rispett. A o B (competizione per la sost. H)
- Genotipo A_2B = viene espresso come A_3B
- Genotipo A_1B = viene talvolta espresso come A_2B

Cis AB

- I soggetti cis AB trasmettono i caratteri fenotipici A e B come un singolo carattere (per cui se il partner è di gruppo O i figli potranno risultare di gruppo AB o O).....
- In genere l'intensità della reazione con anti A ed anti B risulta più debole della norma (simile a soggetti A₂B con bassa reattività B, talvolta a campi misti) e con forte reattività con anti H
- 2 possibili assetti genetici:
 - Cis AB type 1: è presente un allele che codifica per una transferasi bifunzionale
 - Cis AB type 2: sono presenti in sequenza sullo stesso cromosoma i due alleli che codificano per A e B

B acquisito

- Modificazione transitoria del gruppo eritrocitario con comparsa di reattività B
- Causa: inf. Batterica (e.coli, clostridium tertium, bacillus cereus), gangrena gassosa, neoplasie intestinali
- Meccanismo coinvolto: produzione di enzimi di origine batterica in grado di deacetilare l'antigene A che diventa sensibile agli anticorpi anti-B
- Coinvolge solo soggetti A (quasi escl. A1)
- Caratteristiche sierologiche:
 - Test diretto: AB (con B in genere debole)
 - Test indiretto: presenza di anti-B
 - Le emazie cimentate con siero autologo non agglutinano
 - Nella saliva presenza della sola reattività A
- Probabilm il fenomeno è raro perché le emazie con B acquisito vengono eliminate più rapidamente

Ruolo della diagnostica molecolare in immunoematologia

- Le tecniche di biologia molecolare hanno profondamente mutato le conoscenze della genetica dei gruppi sanguigni
- Esistono margini per il loro utilizzo in situazioni particolari, soprattutto per superare i limiti delle tecniche di emoagglutinazione, talvolta insufficienti a completare o pienamente definire la determinazione di un gruppo sanguigno
- **Difetti:** elevato costo, scarsa diffusione (soprattutto di metodiche in kit che non necessitano di elevata specializzazione), inidoneità ad affrontare situazioni complesse in tempi brevi (es. in urgenza trasfusionale)
- **Al momento attuale le metodiche tradizionali restano insostituibili nella diagnostica quotidiana, anche complessa, e difficilmente verranno sostituite dalla biologia molecolare, da riservarsi solo a casi particolarmente selezionati.**

Ruolo della diagnostica molecolare in immunoematologia

- Tipizzazione di pazienti sottoposti di recente a trasfusioni massive o periodicamente trasfusi a brevi intervalli
- **Identificazione dei feti a rischio di MEN**
- Tipizzazione di pazienti le cui emazie risultano saturate da anticorpi (AHG dir.+)
- Tipizzazione per antigeni “weakly” o “partially” expressed
- Determinazione dello stato di omozigosi per il gene RHD
- Risoluzione di discrepanze nella determinazione dei gruppi ABO ed Rh
- Screening di massa per donatori negativi per un antigene
- Identificazione dell'origine degli eritrociti circolanti in corso di trapianto di cellule staminali
- Riconoscimento di paternità e medicina forense
- Diagnosi di “null syndromes” caratterizzati da alterazioni morfologiche e/o funzionali delle emazie