تشخیص آلل‌های HLA-DR با روش PCR-SSP و مقایسه نتایج روش سرولوژیک با آن

مینوادیب Ph.D.[☆]، مجید یاران M.T.[☆]، عباس رضایی Ph.D.[☆]، قاسم سلگی M.Sc.[☆♦]

☆ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکدهٔ پزشکی، گروه ایمونولوژی

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۲/۱۴

* **هدف:** مقایسه نتایج بدست آمده در روش سرولوژیک جهت تشخیص آلل‌های HLA-DR با نتایج روش جدید PCR-SSP

* **مواد و روشها:** تعداد ۵۵ نمونه خون محیطی بطور تصادفی از مراجعین به آزمایشگاه پیوند اعضاء در اصفهان گرفته شد و تشخیص آلل‌های HLA-DR با هر دو روش مولکولی و سرولوژی صورت گرفت. روش سرولوژی با استفاده از ۳۰ نوع آنتی‌سرم مختلف جهت تشخیص آلل‌های HLA-DR انجام شد و برای روش PCR-SSP پرایمرهای اختصاصی برای آلل‌های HLA-DRB1*01-10 (به غیر از DR6, 8, 10) و نیز HLA-DR52 و DR53 مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج DNA با استفاده از سیزده جفت پرایمر اختصاصی برای هر نمونه و بطور جداگانه واکنش PCR انجام گردید. در این تحقیق کنترل مثبت داخلی قطعه‌ای از توالی سومین اینترون لوکوس DR بود. پس از انجام PCR محصولات واکنش بر روی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز شده و در نهایت عکسبرداری از ژل، تفسیر و مقایسه نتایج صورت گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج ۳۱ نمونه (۵۶/۳درصد) کاملاً مطابق روش سرولوژی بود. ۱۲ مورد (۲۲درصد) در سرولوژیک هتروزیگوت و در مولکولی هموزیگوت تشخیص داده شدند. ۷ مورد (۱۲/۷درصد) در هر دو روش هتروزیگوت بودند اما در یک آلل اختلاف داشتند. ۲ مورد (۳/۶درصد) در روش سرولوژیک هموزیگوت و در مولکولی هتروزیگوت بودند و نیز یک مورد (۱/۸درصد) در هر دو روش هموزیگوت بود اما بدین صورت که در سرولوژی HLA-DR14 و در مولکولی HLA-DR11 مشخص شد. و نهایتاً ۲ مورد از ۵۵ نمونه (۳/۶درصد) در روش سرولوژیک قابل تشخیص نبودند. در نهایت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و به کمک آزمونهای غیر پارامتریک (تست Mc Nemar) انجام شد.

نتایج در مورد آلل‌های DR3 از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان داده است (P=0.035).

* **نتیجه‌گیری:** نتایج بدست آمده از روش سرولوژیک معمول به میزان ۴۳/۷درصد با نتایج روش PCR-SSP اختلاف داشت و این بیانگر خطای زیاد روش سرولوژی و یا به عبارت دیگر صحت بیشتر روش PCR-SSP برای DR-Typing می‌باشد.

کل واژگان: آلل‌های HLA-DR، PCR-SSP، روش سرولوژی

مقدمه

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (Major Histocompatibility Complex) یک قسمت از ژنوم است که اولین بار به دنبال رد پیوند پوست در موشهای غیر همسان از نظر ژنتیکی کشف شد. در انسان این کمپلکس را تحت عنوان آنتی ژنهای لکوسیتی انسان (Human Leukocyte Antigens) می‌شناسند که بر اساس ساختمان توزیع بافتی و عملکرد به دو دسته مجزا تقسیم می‌شوند (HLA class I and class II) (۱). ژنهای کد کننده مولکولهای HLA-I و HLA-II پلی مورف‌ترین سیستم ژنتیکی در ژنوم انسان هستند، به طوری که برخی از لوکوس‌ها (مثلاً لوکوس B یا DRB1) بیش از ۳۰۰ آلل دارند (۱، ۲). در ابتدا این آنتی ژنها توسط روش‌های سرولوژیک شناسایی شدند اما با توجه به تنوع شدید آنها و محدودیت آنتی سرم‌های تک خاصیتی برای تشخیص هر یک از این آنتی ژنها در سالهای اخیر با استفاده از روش‌های مولکولی تشخیص آلل‌های II، HLA-I با صحت بیشتر در مقایسه با روش سرولوژی و در سطح DNA امکان‌پذیر شده است (۳، ۴).

روش‌های HLA Typing بر پایه DNA نسبت به روشهای سرولوژی از حساسیت، صحت و قدرت تشخیصی بسیار بیشتری برخوردار هستند (۵). با به کارگیری این‌گونه روشها ناسازگاریهای فاحش و مشخص نشده از نظر HLA در میان بیماران و دهنده هایی که قبلاً با روش سرولوژی و (MLC) بعنوان سازگار در نظر گرفته شده بودند آشکار شده است (۵، ۶).

تکنیک‌های مولکولی نشان دادند که پلی مورفیسم متنوع و مشخص شده برای HLA توسط روش‌های کلاسیک سرولوژی در حال حاضر بسیار کمتر از مقدار واقعی است (۷). بر پایه اطلاعات موجود در مورد تنوع سکانسی در بین آلل‌های II، HLAI انواع روش‌های بر اساس PCR از جمله SSP، RFLP، SBT، SSCP، SSOP و DNA chip به منظور HLA Typing توسعه یافته و در کلینیک بکار می‌روند (۸). تکثیر به کمک پرایمرهای اختصاصی برای سکانس‌ها (SSP) از جمله تکنیک‌های مولکولی است که بطور گسترده انجام HLA Typing در حد سرولوژی تام متوسط و باکارایی بالا استفاده می‌شود (۹).

هدف از این مطالعه انجام HLA-DR Typing با روش PCR-SSP و مقایسه نتایج روش سرولوژیک با این روش در تشخیص آلل‌های مذکور بود. بدین منظور پرایمرهای اختصاصی برای سکانس‌های مطابق با آلل‌های تعریف شده در سرولوژی (DR1-18 و DR52 و DR53) مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل حذف مراحل تخصصی بعد از PCR انجام HLA Typing از روش ژنوم با حساسیت و اختصاصیت بیشتر ظرف مدت ۳ ساعت انجام‌پذیر است و همین دلیل استفاده از روش PCR-SSP را در آزمایشگاه پیوند ممکن می‌سازد (۱۰).

مواد و روشها

در این تحقیق ۵۵ نفر از افراد دهنده وگیرنده که به آزمایشگاه پیوند اصفهان مراجعه کرده بودند و نیز یک خانواده ۶ نفری به صورت تصادفی انتخاب شده و به منظور تشخیص آلل‌های HLA-DRB1/B3/B4 با دو روش سرولوژی (میرولنفوسیتوتوکسیسیتی) و PCR-SSP مورد آزمایش قرار گرفتند. یک خانواده ۶ نفری به عنوان افراد کنترل بوده و در این تست سالم بودن یا نبودن تاثیری در نتایج ندارد.

* روش سرولوژی

آنتی ژنهای HLA-DR1-DR18 علاوه بر DR52 و DR53 با روش میکرولنفوسیتوتوکسیسیتی و به کمک آنتی سرم‌های تجاری (میکروپلیت‌های تهیه شده از سازمان انتقال خون ایران) تشخیص داده شدند.

* روش PCR-SSP

ابتدا DNA ژنومیک به روش Salting out اصلاح شده از نمونه‌های خون محیطی استخراج شد. به این صورت که ۲ میلی‌لیتر خون را با ۸ میلی لیتر بافر لیز شماره یک

(0.32M Sucrose, 5mM MgC12,6H20, 12mM Tris HCl pH 7.5, 1% V/V Triton X-100) مخلوط کرده و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰g لکوسیتها رسوب داده می‌شوند بعد از شستن رسوب با آب مقطر آن را در ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز شماره دو (0.375M NaCl, 0.12 EDTA pH8.0) و ۲۵ میکرولیتر SDS ۱۰درصد و ۲۲۰ میکرولیتر ۴(NaCl۰۴M) حل نموده و به شدت مخلوط می‌کنیم، پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰۰g بلافاصله با افزودن محلول NaCl(6M) پروتئین‌ها رسوب داده می‌شوند. مایع رویی حاوی DNA را به یک تیوب جدید منتقل کرده و دو برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه می‌کنیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰g مایع رویی را به آرامی تخلیه نموده و ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰درصد به DNA افزوده و چندین بار مخلوط می‌کنیم و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰g DNA رسوب داده می‌شود.

در نهایت پس از خشک شدن رسوب آن در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل می‌کنیم و بعد از تعیین غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر UV، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومیک برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتری جهت PCR استفاده شد. برای تشخیص آلل‌های HLA-DR توسط روش PCR-SSP ۱۴ تیوب واکنش به صورت جداگانه برای هر نمونه تهیه گردید. ده عدد برای تشخیص آلل‌های HLA- DRB1 01, 03, 04, 07, 09, 11, 15, 16 و سه عدد برای تشخیص DR52 و DR53 و در نهایت یک تیوب کنترل منفی (فاقد DNA).

مخلوط ۲۰ میکرولیتری واکنش PCR شامل 1.5mM pH8.3 HC1 Tris 0.01W/V gelatin 50nM KC1, 10nmM MgC12, و ۲۰۰ میکرومولار از dNTP Mix (سینا ژن) و ۱ میکرومولار از پرایمرهای اختصاصی برای هر یک از آلل‌های مذکور (سکانس پرایمرهای از منبع شماره ۱۰ و تهیه آنها از شرکت فرانسوی Genesetologies بوده است) ۰/۲ میکرومول از پرایمرهای کنترل داخلی (جهت تکثیر قطعه‌ای از سومین

اینترون ژنهای DRB1) و در نهایت ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز و در نهایت ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومیک بود. مرحله تکثیر DNA در دستگاه PCR (مدل Techne Genius) انجام شد. به طوری که بعد از دناتوره شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه DNA طی ۳۰ سیکل (دناتوره شدن DNA در ۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه چسبیدن پرایمر به DNA الگو در ۶۱درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلی مریزه شدن بازهای آلی در ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر شد. بعد از تکثیر حضور یا عدم حضور محصول PCR با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲درصد مشخص شد. با افزودن ۵ میکرولیتر (40% W/V Sucrose, 0.25% Bromophenol Blue) به مخلوط واکنش PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن در را در چاهکهای ژل ریخته و ژل را به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در ۷۵ ولت و در بافرژ (45mM Tris Base, 45mM Boric Acid, 1mM EDTA pH 8.0) 0.5X TBE الکتروفورز می‌کنیم. بعد از رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید (1ug/ml) به مدت ۱۵ دقیقه و پس از شستشوی ژل، توسط دستگاه UV Transillumimatore مورد بررسی قرار گرفته و عکسبرداری از ژل به عمل آمد. در پایان نتایج به دست آمده از هر دو روش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و تست Mc Nemar از دسته آزمونهای غیر پارامتریک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

ابتدا نمونه‌های تهیه شده از آزمایشگاه پیوند مورد آزمایش قرار گرفتند. در این تحقیق اختلاف نتایج بدست آمده از هر دو روش به شرح زیر بود: ۱۲ مورد از ۵۵ نمونه (۲۲درصد) در سرولوژی هتروزیگوت و در روش SSP هموزیگوت تشخیص داده شدند. ۲ مور (۳/۶درصد) در سرولوژی هموزیگوت و در SSP هتروزیگوت بودند. ۷ مورد (۱۲/۷درصد) در هر دو روش هتروزیگوت بودند اما در یک آلل اختلاف داشتند. تنها یک مورد (۱۸درصد) در هر دو روش هموزیگوت بود اما به این صورت که در PCR-SSP آلل DR11 و در سرولوژی DR14 تشخیص داده شد. ۲ نمونه (۳/۶درصد) در روش سرولوژی قابل تشخیص نبودند در حالی که همه ۵۵ نمونه در روش PCR-SSP تشخیص داده شدند. و در نهایت ۳۱ مورد (۵۶/۳درصد) از ۵۵ نمونه در هر دو روش نتایج یکسان داشتند.

جدول ۱: درصد اختلاف دو روش PCR و سرولوژی در تشخیص آلل‌های HLA-DR

PCR-SSP Vs Serology	HLA-DRB1/B3/B4	
	No of case	%
Compelet Matched Sample	31	56.3
Antigen Vs Blank	2	3.6
Antigen Vs Antigen	7	12.7
Blank Vs Antigen	12	22.0
Homozygote (DR11 Vs DR14)	1	1.8
Typed Vs Undetectable	2	3.6
Total	55	100

شرح جدول فوق به این صورت است:
Anti Vs Blank یعنی اینکه در سرولوژی یک آلل تشخیص داده نشده است (منفی کاذب).
Anti Vs Antigen به این معنی است که در سرولوژی آلل مذکور به اشتباه مشخص شده است.
Blank VS Antigen یعنی اینکه شخص در اصل هموزیگوت است و آلل دوم در سرولوژی مثبت کاذب می‌باشد

جدول شماره یک انواع اختلاف برای آلل‌های HLA-DR بین دو روش سرولوژی و PCR-SSP را نشان می‌دهد.

جدول ۲: توزیع اختلاف دو روش در بین آلل‌های HLA-DR

HLA-DR specifity	Discripancy Rate
HLA-DRB1*01(n=3)	33.0%
HLA-DRB1*15(n=15)	20.0%
HLA-DRB1*16(n=2)	0.0%
HLA-DRB1*03(n=21)	42.0%
HLA-DRB1*04(n=23)	28.0%
HLA-DRB1*11(n=33)	24.0%
HLA-DRB1*07(n=4)	0.0%
HLA-DRb1*09(n=1)	100.0%
HLA-DRB3* (n=43)	9.0%
HLA-DRB4* (n=26)	25.0%

در جدول شماره دو توزیع اختلاف در میان آلل‌های HLA-DR بین روش سرولوژی و PCR-SSP نشان داده شده است. بیشترین اختلاف در مورد آلل DR3 مشاهده می‌شود.

در ضمن تعداد ۳۰ نمونه در سه موقعیت زمانی مختلف توسط روش PCR-SSP مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج آنها به صورت Blind بررسی شد. تکرار پذیری نتایج در هر سه زمان ۱۰۰درصد گزارش شد.

حساسیت و ویژگی روش سرولوژی در مقایسه با PCR-SSP به ترتیب ۷۷درصد و ۹۲درصد و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب ۸۰درصد و ۹۳درصد به دست آمد. در ضمن برای تایید صحت روش PCR-SSP و حصول اطمینان از اینکه روش درست راه اندازی شده است یا نه تشخیص آلل‌های HLA-DR برای یک خانواده ۶ نفری انجام گرفت تا چگونگی انتقال ژنها از والدین به فرزندان مشخص شود. نتایج حاصله و توراث هاپلوتایپ‌ها کاملاً از الگوی ژنتیک مندلی تبعیت می‌کرد.

بحث

آنتی‌ژنهای HLA موانع اصلی در پیوند اعضاء و بافتها در بین افراد هستند (۱۱). در رابطه با نقش تطابق HLA در عواقب پیوند مشخصات کیفیت DR Typing یک موضوع مهم می‌باشد. مطالعات اخیر در مورد نقش سازگاری HLA در پیوند کلیه متفقاً با هم نشان داده‌اند که به موازات افزایش عدم سازگاری HLA، کاهش در میزان بقاء پیوند دیده می‌شود (۴، ۱۲). مطالعات اولیه Opelz و همکارانش نشان داد که از میان ۱۰۷ پیوند سازگار از نظر DR، B، HLA-A با روش سرولوژی وقتی که مجدداً با روش RFLP آزمایش شدند ۲۹ مورد عدم تطابق در آلل‌های اصلی DR داشتند. و پیوند در این گونه مواردکه در آنها عدم تطابق در DR مشخص نشده نسبت به مواردی که سازگاری HLA در آنها تایید شده بود میزان ۲۲درصد بقاء کمتری را نشان دادند (۱۲). اختلاف قابل توجه در آزمایش HLA Typing برای افراد سالم دهنده‌های مغز استخوان و دهنده‌های داوطلب ضرورت به کارگیری

روش‌های مولکولی (LA-DNA Typing) را نشان می‌دهند (۱۳).

امروزه روش‌های بر اساس PCR جهت تشخیص آلل‌های II HLA-I به دلیل سهولت سرعت دقت و قدرت تفکیک بالا و قابلیت اتوماتیک شدن توسعه یافته‌اند و می‌توانند در هر سطحی از تفکیک آللی (پایین متوسط یا بالا) هم در موارد تشخیصی و هم در مطالعات تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرند (۱۲، ۱۴، ۱۵). در حال حاضر بسیاری از آزمایشگاههای پیوند برای تشخیص آلل‌های HLA-DR از روش‌های مولکولی استفاده می‌کنند و یافته‌های موجود انگیزه به کارگیری این روشها جهت HLA-Typing را بالا می‌برد (۱۶، ۱۷). مقایسه دو روش سرولوژی و مولکولی نشان داده پیوندهایی که با روش مولکولی تعیین تطابق صورت گرفته نسبت به آنهایی که با روش سرولوژی انجام شده، بقا بیشتری داشته و این حالت بیانگر اختلاف در صحت (خطای کمتر)و نه در قدرت تشخیص بیشتر آللها می‌باشد (۲۰، ۲۱).

در این تحقیق بیشترین اختلاف بین دو روش به این صورت بود که در ۲۲درصد نمونه‌ها با سرولوژی یک آلل اضافی تشخیص داده شده بود (مثبت کاذب). همچنین ۱۲/۷درصد اختلاف به دلیل تشخیص غلط در سرولوژی بود تا اینکه اصلاً تشخیص داده نشود (جدول ۱). لازم به ذکر است که دقت و صحت هر دو روش فقط از نظر تشخیص آلل‌های HLA-DR تعریف شده و در سرولوژی با یکدیگر مقایسه شد و در واقع پرایمرهای بکار رفته اختصاصی برای تشخیص همین آللها بودند. با این وجود نتایج روش سرولوژی به میزان ۴۳/۷درصد با نتایج روش PCR-SSP اختلاف داشت و این بیانگر خطای بالای روش سرولوژی یا به عبارت دیگر صحت بیشتر روش PCR-SSP در DR Typing می‌باشد. چون در این گونه روش‌ها عواملی نظیر کمیت و کیفیت سلول زنده بودن آن فقدان آنتی سرم تک خاصیتی تفاوت در زمان و دمای انکوباسیون دقت در مشاهده پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ و... که از متغیرهای روش سرولوژیک هستند دخالت ندارند (۷، ۱۶). نتایج دو روش در مورد آلل DR3 از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (P=0.035) و علت این اختلاف زیاد فقدان آنتی‌سرم تک خاصیتی برای DR3 و نیز مخلوط بودن آن با آنتی‌سرمهای DR5 و DR11 در میکروپلیت‌های استفاده شده بود. در مورد DR9 اگر چه اختلاف دو روش ۱۰۰درصد است اما چون تنها در یک نمونه این حالت رخ داده است از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (P=1.000). همچنین دو مورد عدم توانایی تشخیص در روش سرولوژی و نیز یک مورد تشخیص کاملاً غلط (برای DRB 1) نتایج قابل قبولی برای بیماران پیوندی نمی‌باشد. تحقیقات متعددی در همین زمینه میزان اختلاف روش سرولوژی را با روش‌های مولکولی ۱۰درصد تا ۵۷درصد گزارش کرده‌اند (۲۱-۱۷). این‌گونه نتایج انگیزه بیشتری را برای بکارگیری روش‌های مولکولی HLA Typing در تست‌های سازگاری نسجی فراهم می‌کند (۱۹). در حال حاضر بسیاری از آزمایشگاههای پیوند از تکنیک‌های DNA Typing برای تشخیص آلل‌های HLA-DR استفاده می‌کنند (۶). تکنیک PCR-SSP بسته به روش استخراج DNA که در این تحقیق سدیم‌پرکلرات بوده است ظرف مدت ۳ ساعت برای DR Typing قابل انجام است و از طرفی نیاز به مراحل تخصصی بعد از PCR ندارد و با انجام یک ژل الکتروفورز حضور یا عدم حضور باند که اساس روش است بررسی می‌شود. این روش برای موارد اورژانسی نظیر پیوند کلیه از جمله نسبت به روش سرولوژی و دیگر روش‌های مولکولی در ارجحیت می‌باشد چون از سرعت بالایی برخوردار است (۱۰). مزایای دیگر این روش به‌طور خلاصه عبارتند از عدم محدودیت در نمونه مورد نیاز (یعنی به غیر از لنفوسیت از هر نوع نمونه‌ای که حاوی سلول باشد می‌توان استفاده کرد) قابلیت تغییر در قدرت تشخیصی (Intermediate Low و یا High) (۷، ۱۶) سهولت در تهیه مواد لازم برای این روش و با ثبات بودن آنها (۱۲، ۱۴) عدم موارد مثبت و منفی کاذب (۱۴، ۱۵، ۲۲) عدم تکثیر ژنهای کاذب (۲۳) کارایی بالا صحت بیشتر قابلیت اتوماتیک شدن و... (۱، ۷، ۱۶).

References

1. Erlich HA, Opelz G, Hansen J: HLA-DNA Typing and Transplantation. Immunity 2001; 14: 347-356
2. Turner D, Apke S, Brown J, Brown C, Mc Whinnie A, Madrigal A, Navarrete C: HLA-B typing by Reference Strand Mediated Conformation Analysis using a capillary- based semiautomated genetic analyzer. Human Immunol 2001; 62: 414-418
3. Anderson G: Evolution of the human HLA-DR reigion. Frontiers in Bioscience 1998; 27(3): 739-745
4. Zafar MN, Ahmed N, Naqvi A, Rizvi A: Impact of DNA typing on a living-related donor renal transplant program. Transplantation Proceeding 1999; 31: 3335
5. Petersdorf EW, Mickelson EM, Anasetti C, Martin PJ, Woolfery AE, Hansen JA: Effect of HLA mismatches on the outcome of hematopoietic transplants. Current Opinion in Immunol 1999; 11: 521-526
6. Grams SE, Wu J, Noreen HJ, Mangaccat J, Cognato MA, Johnson S, Segall M, Williams TM, Begovich AB: Three new DP alleles identified in a study of 800 unrelated bone marrow donor-recipient pairs. Tissue Antigens 2001; 58: 272-275
7. Adorno D, Canossi A, Papola F, Ozzella G, Piazza A, Di Rocco M, Liberator G, Maccarone D, Casciani CU: Comparison between HLA class I PCR-ARMS and serological typing in cadaveric kidney transplantation. ransplantation Proceeding 1997; 29: 1423-1425
8. Ma:sh SGE, Nomenclature for factors of the HLA system. Tissue Antigens 2000; 56: 103-104
9. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christian F: LA-DRB1 DNA sequencing based typing

: an approach suitable for high hroughput typing including unrelated bone marrow registry donors. Tissue Antigens 2001; 57(1): 46-52
10. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DR Typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. An Alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 1992; 39: 225-235
11. Thorsby E: Invited Anniversary Review: HLA associated diseases. Human Immunol 1997; 53: 1-11
12. Michael Cecka J: The Role of HLA in Renal Transplantation. Human Immunol 1997; 56: 6-16
13. Noreen HJ, Yu N, Setterholm M, Ohashi M, Baisch J, Endres R, et al: Validation of DNA-based HLA-A and HLA-B testing of volunteers for a bone marrow registry Through parallel testing with serology. Tissue Antigens 2001; 57(3): 221-228
14. Chen M, Brian F, Duffy T: New aspects in Histocompatibiliy Testing. Laboratory Medicine Newsletter march 1996; 4: 3
15. Olerup O, Zetterquist H: HLA-DRB1*01 subtyping by allele specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. Tissue Antigens 1991; 37: 197-204
16. Katsuyama Y, Liu CY, Arakura A, Fukushima H, Ota M: Validation of HLA-DR locus typing in forensic specimens by combining PCR-SSP with PCR-RFLP. ournal of Forensic Sciences Philadelphia, 1997; 42(5): 929-934
17. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Trejaut J, Dunckley H, Chapman J, Fisher G, et al: Analysis of Discrepancy between serological and DNA-RFLP Typing for HLA-DR in kidney graft recipients. Transplant Proceeding 1992; 24: 2478
18. Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Schwarz V: Collaborative Transplant Study : Clinical Implication of DNA typing in organ transplantation. Transplantation Proceeding 1997; 29: 1524-1527
19. Mylitineos J, Lempert M, Scherer S, Schwarz V, Opelz G: Comparison of serological and DNA PCR-SSP Typing Results for HLA-A and HLA-B in 421 black individuals, A collaborative transplant study report. Human Immunol 1998; 59: 512-517
20. Schaffer M, Olerup O: HLA-AB typing by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: more accurate, less errors, and increased resolution compared to serological typing. Tissue Antigens 2001; 58(5): 299-307
21. Cermakova Z, Kolarikova H: Serological versus molecular HLA-DR typing of cadaveric donors in conditions of regional tissue typing laboratory. Bone Marrow Transplant 1998; 22 Suppl 4: S47-8
22. Savelkoul FHM, De Bruyn-Geraets DP, Van den Berg-Loonen EM: High resolution HLA-DRB1 SSP typing for cadaveric donor transplantatio. Tissue Antigens 1995; 45: 41-48
23. Knipper AJ, Hinney A, Schuch B, Enczmann J, Uhreberg M, Warnet P: Selection of unrelated bone marrow donors by PCR-SSP typing and subsequent non radioactive sequence-based typing for HLA-DRB 1/3/4/5, DQB1 and DPB1 alleles.Tissue Antigens 1994; 44: 275-284