

## Bioquimia

Volumen 29  
Volume

Número 4  
Number

Octubre-Diciembre 2004  
October-December




*Artículo:*

### Inmunología

Los métodos serológicos y moleculares  
en la tipificación de los antígenos de  
leucocitos humanos Mini-revisión

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

**Otras secciones de  
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in  
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[www.Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

# Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de los antígenos de leucocitos humanos

## Mini-revisión

Lizette Bonet-Roselló,\* Zuzet Martínez-Córdova\*

### RESUMEN

Diferentes estudios han confirmado la influencia de la compatibilidad de los antígenos de leucocitos humanos (HLA) en la supervivencia del injerto, así como la fuerte asociación de estas moléculas con ciertas enfermedades. En los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos de tipificación HLA basados en técnicas moleculares, las que ofrecen flexibilidad de resolución, reproducibilidad y exactitud superiores, al ser comparadas con los métodos serológicos tradicionales. El objetivo de esta revisión es comparar las técnicas serológicas y moleculares mostrando sus principios, ventajas y los resultados experimentales.

**Palabras clave:** HLA, tipificación HLA, técnica serológica, técnica molecular.

### ABSTRACT

*Different studies have confirmed the influence of the human leukocyte antigens (HLA) matching on graft survival and the strong association of these molecules with certain diseases. Over the last few years, new HLA typing methods have been developed based on molecular techniques, which offer flexibility of resolution, improved reproducibility and greater accuracy compared to traditional serological methods. The aim of this review is to compare the serological and molecular methods, showing their basis, advantages and experimental results.*

**Key words:** HLA, HLA typing, serological method, molecular technique.

### INTRODUCCIÓN

El complejo mayor de histocompatibilidad es conocido en el hombre como antígenos de leucocitos humanos (HLA). Los genes que codifican estas proteínas de membranas se sitúan en el brazo corto del cromosoma seis, y conforman el complejo genético más polimórfico que existe.

Los antígenos HLA por su estructura, función y distribución tisular se dividen en clase I y II. Los antígenos de clase I son codificados por los *loci* A, B y C, y se expresan en la mayoría de las células nucleadas y

plaquetas. Su función es presentar péptidos intracelulares procesados a los linfocitos T CD<sup>8+</sup>. Por su parte, los de clase II, son codificados por los *loci* DP, DQ y DR, y aunque se localizan en las células presentadoras de antígenos profesionales (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B), pueden encontrarse tras la estimulación con interferón  $\gamma$ , en las células endoteliales, epiteliales y linfocitos T. Los mismos presentan a las células T CD<sup>4+</sup>, péptidos procedentes de antígenos exógenos que penetran en la célula por endocitosis.

La estructura de las moléculas HLA A, B y C es de dos cadenas. La cadena pesada o  $\alpha$  con un peso molecular de 45 kD está unida de forma no covalente a una proteína no polimórfica, la  $\beta_2$  microglobulina, con un peso molecular de 12 kD, determinada por un gen en el cromosoma 15. Toda la molécula está anclada en la membrana celular por la cadena  $\alpha$ , la cual se puede dividir en tres regiones: una extracelular hidrofílica, una región transmembranal hidrofóbica y una región intracelular hidrofílica. La región extracelular se divide en los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ , con un predominio de los determinantes antígenicos en los dos primeros.

\* Departamento de Inmunología, Instituto de Nefrología, Ciudad de La Habana, Cuba.

#### Correspondencia:

Lizette Bonet Roselló. Santa Catalina 661 apartamento 9, entre Goss y La Sola, Víbora. Ciudad de La Habana, Cuba.  
e-mail: lizette.bonet@infomed.sld.cu

Recibido: 15-01-2004

Aceptado: 04-10-2004

En lo referente a la molécula HLA clase II, se debe señalar que es un heterodímero constituido por dos cadenas de glicoproteínas, una  $\alpha$  y una  $\beta$ , de 31-34 kD y de 26-29 kD, respectivamente, en asociación no covalente. Al igual que las cadenas pesadas clase I, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  tienen tres regiones: la extracelular, una transmembrana y la intracelular. La región extracelular hidrofílica de la cadena  $\alpha$  contiene dos dominios denominados  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , mientras que en la cadena  $\beta$  estos dominios se denominan  $\beta_1$  y  $\beta_2$ .<sup>1-3</sup>

La tipificación HLA ha sido de vital importancia en la medicina de los trasplantes y en la evaluación de la asociación HLA-enfermedad.<sup>1,4,5</sup> Entre los mecanismos que explican esta relación se encuentran el reconocimiento directo o indirecto que hace el receptor de las moléculas HLA no compatibles del donante con la consiguiente estimulación de su respuesta inmune,<sup>2</sup> y el papel que pueden desempeñar determinadas especificidades HLA en la presentación de péptidos endógenos como etiología de enfermedades autoinmunes.<sup>3</sup>

Específicamente en el trasplante renal, fueron Patel y cols.<sup>6</sup> los primeros en mostrar los efectos benéficos de la compatibilidad HLA de la pareja donante-receptor, aspecto que ha sido corroborado por numerosos investigadores que señalan que la pareja HLA compatible tiene un mejor pronóstico en la supervivencia del injerto, que aquellas que no lo son. El rechazo de los injertos no compatibles es inevitable, y sólo retardado por una potente y constante terapia inmunosupresora.<sup>3,7-9</sup>

Entre los métodos para la determinación de los antígenos HLA se destacan los serológicos y los basados en las técnicas de genética molecular, los cuales han cumplido un papel protagónico en su contexto. El objetivo de esta revisión es mostrar las características de estos métodos, haciendo alusión a los aspectos que justifican la amplia aplicación de la biología molecular en este campo.

## TIPIFICACIÓN HLA POR TÉCNICAS SEROLÓGICAS

El ensayo de microlinfocitotoxicidad se ha convertido en la técnica serológica estándar para la tipificación HLA. El mismo fue desarrollado por Terasaki y McClelland en 1964<sup>10</sup> y ha contado con la ventaja de ser técnicamente simple y rápido. Su principio está basado en poner en contacto linfocitos aislados del sujeto a estudiar con un panel de aloanticuerpos o anticuerpos monoclonales anti-HLA capaces de reconocer determinadas especificidades antigénicas. Tras la adición de suero de conejo como fuente de complemento

y los periodos de incubación respectivos en cada etapa, una reacción positiva es indicadora de que la reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar, y como consecuencia, la activación de la vía clásica del complemento con la formación del complejo de ataque a la membrana que causa la muerte celular, la cual es visualizada microscópicamente con el uso de fluorocromos como el bromuro de etidio, o de colorantes como el azul tripán y la eosina. Cada reacción es evaluada por el porcentaje de células muertas y los resultados son registrados de acuerdo a un sistema internacionalmente establecido.<sup>11</sup>

Es de señalar que se pueden encontrar anticuerpos contra moléculas HLA en mujeres múltiples y en pacientes que han recibido transfusiones de sangre y trasplantes de órganos y tejidos. Sin embargo, la principal fuente de los antisueros HLA es la proveniente de mujeres múltiples al exponerse las mismas a los antígenos HLA no compatibles del padre presentes en el feto.<sup>11,12</sup>

El suero para un tipaje ideal debería ser monoespecífico, pero los aloanticuerpos observados en un antisero simple son usualmente poliespecíficos debido a la presencia de anticuerpos independientes dirigidos contra más de una especificidad HLA o a la reactividad de un anticuerpo con un determinante antigénico público, que es aquél compartido por varios antígenos para conformar un grupo de reactividad cruzada. Algunos sueros se convierten en monoespecíficos al ser diluidos, mientras que otros pierden la actividad para todas las especificidades simultáneamente.<sup>11,12</sup>

En el caso de los anticuerpos monoclonales de origen murino, éstos han presentado el inconveniente de ser dirigidos contra los epítomos comunes más que contra los determinantes polimórficos privados de las moléculas HLA. Además muchos de estos anticuerpos no fijan el complemento.<sup>12</sup>

Aunque la serología ha sido utilizada por más de 30 años para identificar los tipos HLA, son precisamente la reactividad cruzada de los antisueros, con su repercusión en la especificidad del ensayo,<sup>11,12</sup> y los problemas existentes para su adquisición, como consecuencia de su principal fuente y de un mercado cada día más escaso debido al desarrollo de la biología molecular, sus principales limitaciones.

## TIPIFICACIÓN HLA POR BIOLOGÍA MOLECULAR

El alto grado de polimorfismo del sistema HLA no puede ser completamente analizado por la técnica anterior, de ahí que los investigadores han tenido ante

sí el gran reto de desarrollar una técnica que pueda resolver las múltiples diferencias alélicas y sea compatible con el uso rutinario en laboratorios que realizan determinaciones de HLA.<sup>13,14</sup>

El genotipaje HLA comenzó a mediados de la década de 1980 utilizando la técnica de Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP). En este método se aprovecha el conocimiento de la secuencia nucleotídica encontrada en exones e intrones de los genes HLA, para utilizar enzimas de restricción capaces de cortar al ácido desoxirribonucleico (ADN) en puntos específicos, que originarán un patrón de bandas característico del alelo en cuestión.

La amplificación de fragmentos de ADN mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) añadió sensibilidad al genotipaje HLA. Los métodos más difundidos que utilizan la PCR incluyen la amplificación de ADN con *primers* de secuencia específica (PCR-SSP) y la amplificación de ADN seguida de la hibridización con sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSOP).

En el caso de la técnica PCR-SSP se procede al montaje de diversas reacciones de PCR para cada *locus*, utilizándose en cada una de ellas un conjunto de *primers* o cebadores, en número variable, cuyas secuencias discriminan las diferentes variantes que puede presentar el *locus*, de forma tal que sólo se produce reacción de amplificación cuando el ADN contiene el alelo que corresponde al grupo de *primers* de la reacción particular. En cambio, el método SSOP incluye la amplificación del ADN de una región dada, su unión a un soporte sólido y desnaturalización, y la adición de sondas marcadas con biotina, digoxigenina o P32, entre otros. En el caso del SSOP-inverso, son las sondas las unidas a este soporte. Las condiciones específicas de hibridización permitirán la formación de híbridos cuando existan secuencias completamente complementarias. El perfil obtenido será característico de cada alelo y se detectará por quimioluminiscencia o autorradiografía.<sup>12,15</sup>

Otros métodos como la secuenciación del ADN y la formación de *heteroduplex* han sido utilizados para evaluar la histocompatibilidad.<sup>16,17</sup> El primero ha permitido no sólo revelar microheterogeneidades dentro de alelos conocidos, sino identificar nuevos alelos. En cambio la técnica basada en la formación de *heteroduplex*, no permite definir alelos, sino diferencias entre individuos, permitiendo aceptar o eliminar donantes potenciales en un corto periodo de tiempo.<sup>17</sup>

Los métodos de biología molecular para la tipificación HLA presentan múltiples ventajas sobre los serológicos. La biología molecular provee más información

sobre las variaciones genéticas debido a que los anticuerpos disponibles en serología pierden la capacidad para identificar todos los productos de los alelos HLA; el tipo de célula, la viabilidad celular y la expresión del antígeno sobre su superficie no son generalmente importantes; las sondas y *primers* utilizados en esta metodología son fácilmente regenerados, y cuando nuevos alelos son identificados, nuevas sondas y *primers* son diseñados para identificarlos, ofreciendo mayor exactitud y flexibilidad de resolución comparada con los métodos serológicos tradicionales.<sup>15</sup>

Lo anteriormente expuesto, y el desarrollo de variantes capaces de brindar un resultado de forma rápida,<sup>13,18</sup> han contribuido a la difusión de las técnicas de genotipaje HLA.

### COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES EN EL TIPAJE HLA

La importancia de las técnicas moleculares en el trasplante fue mostrada por primera vez por Opelz y cols. (1991) en el *Collaborative Transplant Study*.<sup>19</sup> Con la aplicación del genotipaje (RFLP) fue posible identificar diferencias HLA en la pareja donante-receptor dados como idénticos por serología. La correlación de estos resultados con la supervivencia del injerto mostró una mayor supervivencia del injerto al año cuando el donante y el receptor eran HLA-DR idénticos por técnicas serológicas y moleculares que cuando sólo lo eran por serología (87 vs 69%,  $p < 0.02$ ); observándose que aproximadamente el 25% de los tipajes serológicos eran incorrectos.

De forma detallada Opelz publicó las discrepancias obtenidas en los antígenos HLA-DR asignados por las técnicas serológicas y moleculares. En este estudio fueron analizadas en 8 laboratorios de biología molecular, 8,212 muestras con determinaciones serológicas previas, procedentes de 101 centros de trasplantes (*Cuadro I*). Esta investigación también mostró que del 20.9% de los blancos asignados por serología, sólo la mitad fue confirmada como homocigóticos por RFLP, mientras que en el resto, un segundo antígeno fue determinado.<sup>20</sup>

Con la participación de este investigador se analizó en 1997 si la compatibilidad HLA clase I obtenida por técnicas moleculares mejoraba el efecto de la compatibilidad HLA en el trasplante renal. Para ello se seleccionaron 215 parejas donante-receptor HLA A, B y DR compatibles mediante la evaluación por métodos serológicos, y se procedió al análisis retrospectivo del tipaje HLA clase I mediante el uso de PCR-SSP y

**Cuadro I.** Discrepancias obtenidas entre RFLP y la serología en la determinación de los antígenos HLA-DR.

Número de laboratorio	Número de muestras	% de discrepancias en la asignación de subtipos	% de discrepancias en la asignación de amplias especificidades
1	4165	26.0	23.7
2	1254	29.8	27.5
3	890	27.3	25.5
4	761	24.6	22.7
5	621	29.5	27.9
6	295	24.1	21.7
7	139	27.3	26.6
8	87	37.9	37.9
Total	8212	26.9	24.9

Tomado de: Opelz G, 1992.<sup>20</sup>

PCR-SSOP. Se obtuvo que un 10.4% de los donantes y un 6.5% de los receptores mostraron discrepancias HLA A o B. Las causas más comunes de estas diferencias fueron la asignación errónea de especificidades o blancos en serología. Mediante el genotipaje se permitió definir los subtipos A y B en 118 casos, en los cuales sólo una amplia especificidad se había determinado. Un total de 183 trasplantados HLA clase I compatibles por biología molecular tuvieron un 15 % de supervivencia del injerto al año superior que los 32 pacientes para los cuales el genotipaje reveló incompatibilidad HLA clase I.<sup>21</sup>

En otro estudio, 224 trasplantados renales con donantes cadavéricos fueron retrospectivamente analizados con el uso del RFLP y comparados con los resultados serológicos. En el 18.8% de los individuos se obtuvo una diferencia entre ambos métodos para al menos un antígeno, y se mostró una correlación entre la compatibilidad HLA por RFLP y el porcentaje de individuos con uno o más episodios de rechazo agudo (18 y 41.8% al año para 0 incompatibilidades y una mezcla de 1 y 2 incompatibilidades, respectivamente,  $p < 0.05$ ). No hubo correlación entre la compatibilidad HLA obtenida por serología y los parámetros indicadores de rechazo agudo.<sup>22</sup>

Así mismo, Adam y cols. (1994)<sup>23</sup> tiparon a 102 individuos sanos (204 alelos HLA-DR) mediante el método de linfocitotoxicidad y de RFLP-Taq I. En este caso hubo un 69.9% de concordancia entre ambos métodos. Los tipajes DR incorrectos por serología, se debieron entre otros, a la incapacidad para distinguir entre dos alelos con un epítipo común.

La comparación entre PCR-SSP y serología en la tipificación HLA ha sido realizada en numerosos centros, donde como regla general se demostró la mejor resolución y exactitud de la primera. Uno de ellos ob-

tuvo del 3-24% de errores en serología para la determinación de los antígenos A y B; la mayor fuente de errores fue en pacientes con desórdenes hematológicos (24%), mientras que en los pacientes con afecciones renales en lista de espera existió un 11% de discrepancias.<sup>24</sup> Por otro lado, Tan y cols. (1997)<sup>25</sup> señalan un 30.2% de discrepancias entre estos métodos (35.6% para los receptores de riñón y 21.3% para los donantes). Las diferencias consistían fundamentalmente en 29 antígenos interpretados incorrectamente por serología y 20 blancos serológicos determinados por genotipaje.

Esta comparación por otros investigadores reveló en aproximadamente el 50% de los pacientes tipados por PCR-SSP, antígenos DR adicionales o sus subunidades,<sup>26</sup> así como falsas asignaciones por serología de antígenos A (9%), antígenos B (11%) y antígenos C (39%), como consecuencia de moléculas HLA de baja expresión, ausencias de reactivos serológicos y falsas asignaciones de antígenos dentro de un grupo de reactividad cruzada.<sup>27</sup>

Además de los efectos positivos de la biología molecular en el trasplante señalados anteriormente,<sup>20-22</sup> ésta también ha brindado un nuevo ímpetu al estudio de la asociación HLA-enfermedad. En la amplia variedad de alelos descubiertos se han encontrado marcadores más sensibles de susceptibilidad a los mismos. Se puede citar que mientras que algunos alelos HLA-DR4 están asociados con la susceptibilidad a la artritis reumatoide (DRB1\*0401, DRB1\*0404), otros no lo están (DRB1\*0402, DRB1\*0403).<sup>28</sup> Por otro lado, de los 20 subtipos de HLA B27 descritos hasta el 2000 por biología molecular, dos de ellos no estaban asociados a la espondilitis anquilosante (B\*2706 y B\*2709).<sup>29</sup>

El alto polimorfismo del sistema HLA ha convertido a la tipificación de los antígenos de este sistema en

un instrumento muy útil para campos tan dispares como la antropología y la medicina forense. No obstante, en esta revisión se ha hecho más énfasis en la asociación con enfermedades y sobre todo en su papel en los trasplantes debido a la repercusión de la compatibilidad HLA en la supervivencia de los órganos trasplantados. Con todo ello, cabe resaltar que el objetivo central de esta revisión es fundamentalmente metodológico y por ello como conclusión se considere qué estrategias para la tipificación HLA se deben desarrollar en cada laboratorio con el fin de extender el uso de la biología molecular en este campo y así brindar resultados confiables que repercutan en la mayor supervivencia del injerto, detección de marcadores sensibles de enfermedades y saltos cualitativos en los estudios de paternidad, evolutivos, y forenses, entre otros.

#### REFERENCIAS

- Howell WM, Navarrete C. The HLA System: an update and relevance to patient-donor matching strategies in clinical transplantation. *Vox Sang* 1996; 71: 6-12.
- González-Molina M, Alonso A. *Biología de la inmunosupresión*. Barcelona: Novartis Farmacéutica SA. 1999.
- McCluskey J, Au Peh C. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenetics* 1999; 1: 3-20.
- Giralt P, Urra JM, Sanabria C, Giralt J, Pérez MJ, Benito P. Biological differences on onset among type 1A diabetics in relation to HLA-DQ genetic markers. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 6-9.
- Pascual M, Mataran L, Jones G, Shing D, van der Slik AR, Giphart MJ, et al. HLA haplotypes and susceptibility to rheumatoid arthritis. More than class II genes. *Scand J Rheumatol* 2002; 31: 275-278.
- Patel R, Mickey MR, Terasaki PI. Serotyping for homotransplantation. XVI, analysis of kidney transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1968; 279: 501-506.
- Takemoto S, Terasaki PI, Cekca JM, Cho YW, Gjertson DW. Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. *N Engl J Med* 1992; 327: 834-839.
- Opelz G. HLA matching in Asian recipients of kidney grafts from unrelated living or cadaveric donors. The Collaborative Transplant Study. *Hum Immunol* 2000; 61: 115-119.
- Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002; 73: 1269-1273.
- Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.
- Martin S, Dyer PA. Identification and importance of MHC. The definition of HLA specificities by cytotoxicity. *Transplant Immunology* 1994; 2: 108-115.
- Colombe BW. Histocompatibility testing. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (Eds). *Basic & clinical immunology*. 8ª ed. USA: Appleton & Lange; 1994. p. 237-255.
- 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.
- Tiercy JM, Jeannet M, Mach B. A new approach for the analysis of HLA class II polymorphism: HLA oligotyping. *Blood Rev* 1990; 4: 9-15.
- Middleton D. Identification of MHC-molecular biology. *Transplant Immunology* 1994; 2: 111-115.
- Bettinotti MP, Mitsuishi Y, Bibee K, Lau M, Terasaki PI. Comprehensive method for the typing of HLA A, B and C alleles by direct sequencing of PCR products obtained from genomic DNA. *J Immunother* 1997; 20: 425-430.
- Dyer PA, Jawaheer D, Ollier B, Poulton K, Sinnott P, Thomson W. HLA allele detection using molecular techniques. *Disease Markers* 1993; 11: 145-160.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46: 355-367.
- Opelz G, Mytilineos J, Scherer S, Duncley H, Trejaut J. Survival of DNA HLA-DR typed and matched cadaver kidney transplants. Collaborative Transplant Study. *Lancet* 1991; 338: 461-463.
- Opelz G. *Discrepancies between serological and DNA typing*. Collaborative Transplant Study. Newsletter 3; 1992.
- Mytilineos J, Lempert M, Middleton D, Williams F, Cullen C, Scherer S, et al. HLA class I DNA typing of 215 'HLA A, B, DR zero mismatched' kidney transplants. *Tissue Antigens* 1997; 50: 355-358.
- Nataf S, Hourmant MH, Herry P, Cesbron A, Bonneville F, Cheneau ML, et al. Kidney transplantation and HLA-DR compatibility evaluated by genomic analysis: one center study. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 1993; 36: 179-189.
- Adam K, Vavatsi N, Mytilineos J, Kouidou S, Polymenidis Z, Trakatellis A, et al. HLA class II DNA-RFLP typing in 102 individuals from Northern Greece. *Transpl Int* 1994; 7 (Suppl 1): S522-S526.
- 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: 299-307.
- Tan J, Xie T, Xu Q. HLA-DR typing by standard serology and PCR amplification with sequence-specific primers: a comparative study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1997; 77: 28-30.
- Woszczek G, Borowiec M, Mis M, Gorska M, Kowalski ML. Comparison of serological and molecular (PCR-SSP) techniques of HLA-DR typing in clinical laboratory routine. *Ann Transplant* 1997; 2: 39-42.
- Kulcsarova E, Kralovicova J, Parnicka Z, Ferencik S, Buc M. Comparison of the results of HLA typing using serologic and molecular genetics methods. *Bratisl Lek Listy* 2000; 101: 134-137.
- Nelson JL, Mickelson S, Masewicz S. Dw14 (DRB1\*0404) is a Dw4-dependent risk factor for rheumatoid arthritis: rethinking the 'shared epitope' hypothesis. *Tissue Antigens* 1991; 38: 145-151.
- van der Linden S, van der Heijde D. Clinical aspects, outcome assessment, and management of ankylosing spondylitis and postenteric reactive arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 263-268.