



Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp
Kandidatexamen i biomedicinsk laboratorievetenskap
VT 2017

Jämförelse mellan två analyskit för typning av det humana leukocytantigenet HLA-B*57

Cornelia Håkansson

Sektionen för lärande och miljö

Populärvetenskaplig sammanfattning

Ibland behöver vårt immunförsvar lite extra hjälp på traven mot patogener (sjukdomsframkallande organismer) som tar sig in i vår kropp. Vissa patogener kan slukas av immunceller (fagocyter) eller ta sig in i våra celler utan att immunförsvaret reagerar, men en smart mekanism har utvecklats just för detta. Mekanismen kallas human leukocyt antigen (HLA) som är ett protein som sitter på våra celler men också finns hos alla ryggradsdjur. Detta protein transporteras faktiskt från cellens insida och ut, vilket gör att det kan föra med sig peptider från insidan av cellen. HLA är ett så kallat antigenpresenterande protein som vårt immunförsvar skannar av regelbundet och när det märker att något främmande presenteras så signalerar immunförsvaret till cellen att "begå självmord" (apoptos). Humant Immunbrist-virus (HIV) är ett virus som infekterar celler som uttrycker CD4 (en sorts markör) på ytan, exempelvis makrofager och T-hjälparceller som ingår i vårt immunförsvar. Detta gör att dessa sjunker i antal, vilket innebär att immunförsvaret blir försvagat. Obehandlat HIV leder till AIDS, därför finns bromsmediciner så som Abacavir. Detta läkemedel har visat goda resultat men dessvärre drabbas 5–8% av patienterna som tar detta av hypersensitivitetsreaktioner (HSR; feber, utslag, symptom från magen/tarm och lungor). Forskare har visat att HSR är starkt relaterat till HLA-B*57:01 allelen (ärfdig variant av HLA anlaget). Men dessa reaktioner går att förhindra; man kan ta reda på om personer har denna specifika allel genom att "screena" en persons HLA eller "typa" HLA. I denna studie jämfördes två olika analysvarianter innehåller reagenser för att kunna typa HLA i 20 olika DNA prover, Olerup SSP® HLA-B*57:01 och Inno-train HLA-READY GENE B57. Dessa analyser jämfördes mot varandra för att fastställa skillnader mellan dem, både vad gäller resultat, kostnader och analysstider. Metoden som användes vid båda analyserna var Polymerase Chain Reaction (PCR), ett sätt att kopiera upp en specifik del i ens DNA i miljontals kopior, för att göra det möjligt att tolka resultaten och fastställa HLA-typ. Resultaten från de två olika analyserna som jämfördes visade att båda kunde användas för att typa HLA korrekt, trots att alla resultaten från första körningen med Inno-train inte stämde. Dessa stämde efter en andra körning. Däremot stämde alla resultat från Olerup från första början. Analysstiderna skiljer sig inte nämnvärt, avseende kostnader är Inno-train billigare per prov men Olerup är billigare långsiktigt. Även om båda fungerar bör fler analyser utföras för att fastställa vilken kommersiell analysmetod som är lämpligast. Kommentar. Kit är ett uttryck som läsaren inte förstår.

Författare

Cornelia Håkansson

Titel

Jämförelse mellan två analyskit för typning av det humana leukocytantigenet HLA-B*57.

Handledare

Prof. Leg. BMA Bodil Hernroth, Högskolan Kristianstad

Leg. BMA Rebecca Rappner, Klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Lunds Universitetssjukhus

Examinator

Prof. Leg BMA Ann-Sofi Rehnstam-Holm, Högskolan Kristianstad

Sammanfattning

Humana leukocytantigen (HLA) är en typ av proteiner som uttrycks på alla cellers yta, de karakteriseras som antigenpresenterande och är en mekanism som ryggradsdjur utvecklat för att lokalisera infekterade eller defekta celler. HLA presenterar peptider från cellens insida för immunförsvaret, vilket i sin tur aktiverar andra delar av immunförsvaret eller inducerar apoptos om främmande peptider presenteras. HIV är ett virus som infekterar celler som uttrycker CD4 på ytan, så som makrofager och T-hjälparceller som ingår i immunförsvaret. Dessa sjunker i antal och immunförsvaret blir försvagat. Obehandlad HIV leder till AIDS, därför är bromsmediciner som Abacavir viktigt. Abacavir har visat goda resultat, dock drabbas 5-8% av hypersensitivitetsreaktioner. Forskare har visat att dessa reaktioner är starkt relaterade till HLA-B*57:01 allelen. Genom screening av denna allel kan behandling med Abacavir undvikas för denna grupp patienter.

Syftet med denna studie var att jämföra två olika kit, Olerup SSP® HLA-B*57:01 och Inno-train HLA-READY GENE B57, för typning av HLA-B*57 i 20 olika DNA prover. Dessa jämfördes med den befintliga metoden för HLA-typning som används på klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Universitetssjukhuset, Lund. Jämförelsen grundade sig på skillnader mellan kiten, både vad gäller resultat, kostnader och analystider.

Proverna analyserades med PCR innan de separerades på agarosgel med gelelektrofores. Resultaten tolkades enligt tillverkarnas anvisningar. Resultaten visade att båda metoderna kan typa HLA korrekt. Alla resultat med Olerup stämde. Däremot blev 8 av 20 prover fel vid första körningen med Inno-train men resultaten stämde efter omkörning. Avseende kostnader är Inno-train billigare per prov men Olerup skulle bli billigare långsiktigt. För att verkligen fastställa vilket kit som är mest lämpligt behövs fler analyser utföras.

Ämnesord

HIV, HLA, Abacavir, Hypersensitivitet, PCR

Abstract

Human leukocyte antigen (HLA), a protein present on the surface of our cells, is characterized as antigen-presenting a mechanism vertebrates have developed to locate infected or defect cells. HLA presents peptides which are brought from the cell's inside to be presented for the immune system.

HIV is a virus that infects cells that express CD4 on the surface, such as macrophages and T-helper cells. When these are decreasing, the immune system gets weakened. Untreated HIV leads to AIDS, therefore are inhibiting pharmaceuticals like Abacavir important. Abacavir has shown good results, unfortunately 5-8% gets hypersensitivity-reactions. Scientists have shown that these reactions are strongly related to the HLA-B*57:01 allele. By screening for this allele, treatment with Abacavir could be avoided for this group of patients.

The purpose of this study was to compare two different kits, Olerup SSP® HLA-B*57:01 and Inno-train HLA-READY GENE B57, for screening of HLA-B*57 in 20 different DNA samples. These have previously been typed with the established method at the clinical immunology and transfusion medicine, Lund University Hospital. The comparison was based on differences between the kits, both in terms of results, costs and analytical times.

PCR was run before the samples were separated on gel with electrophoresis. The results were interpreted in accordance to the manufactures instructions. The results showed that both methods could type HLA correctly. All results from Olerup was correct. However, 8 out of 20 samples showed wrong results at the first run with Inno-train. These were correct after a second run. In terms of costs, Inno-train is cheaper per test, but Olerup would be cheaper in the long term. To really determine which kit is most suitable, more analyzes are required.

Keywords

HIV, HLA, Abacavir, Hypersensitivity, PCR

Innehåll

| | |
|--|----|
| 1. Inledning | 6 |
| 1.1. HIV | 6 |
| 1.2. HLA..... | 6 |
| 1.3. Abacavir | 8 |
| 1.4. PCR | 8 |
| 2. Syfte | 9 |
| 3. Material och Metod..... | 10 |
| 3.1. Urval av prover..... | 10 |
| 3.2. Jämförelse av kit för HLA-typning | 10 |
| 3.3. HLA-typning med Olerup kit (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Olerup SSP® HLA-B*57 kit) | 11 |
| 3.4. HLA-typning med Inno-train HLA-Ready Gene B57 kit | 12 |
| 3.5. Beredning av 2% agarosgel..... | 12 |
| 3.6. Tolkning av geler..... | 12 |
| 3.6.1. Olerup (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Olerup SSP® HLA-B*57 kit) | 12 |
| 3.6.2. Inno-train | 13 |
| 3.7. Kvalitetskontroller och Miljöaspekter..... | 13 |
| 3.8. Statistik..... | 13 |
| 4. Resultat..... | 13 |
| 4.1. Subtypning med befintligt Olerup kit, Olerup SSP® HLA-B*57 | 13 |
| 4.2. HLA-typning med Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit | 14 |
| 4.3. HLA typning med Inno-train HLA-READY GENE B57 kit..... | 15 |
| 4.4. Jämförelse av analysresultaten | 16 |
| 5. Diskussion..... | 18 |
| 6. Slutsats | 19 |
| Referenser | 21 |
| Bilagor..... | 23 |

1. Inledning

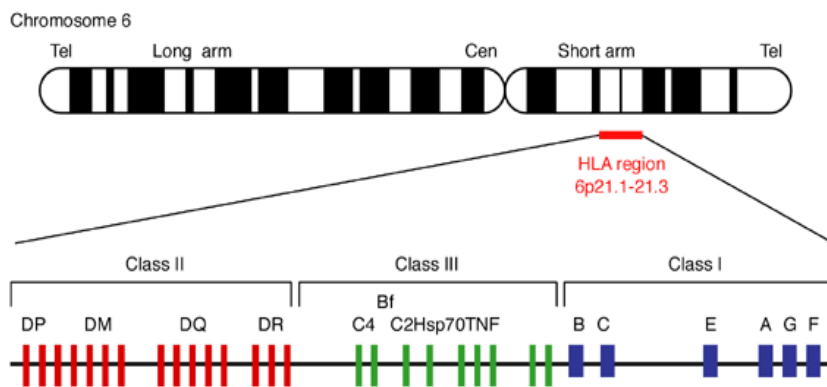
1.1. HIV

I Afrika söder om Sahara är Humant Immunbrist-Virus (HIV) mest utbredd och globalt har över 30 miljoner människor avlidit av Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Enligt världshälsoorganisationen WHO lever cirka 37 miljoner människor med HIV/AIDS idag (World Health Organization, 2016). HIV är ett retrovirus som har ett hölje och genomgår omvänd transkription. Definitionen av HIV/AIDS är ett positiv HIV test som uppfyller minst ett av följande kriterier: 1) Antalet CD4 T-celler (T-hjälparceller) är mindre än 200/ μ l i blodet, eller att totala CD4 T-cellerna är mindre än 14% bland lymfocyterna, 2) CD4 T-cellerna är mer än 200/ μ l och patienten har någon sjukdom, som candidiasis, isosporiasis, histoplasmosis m. fl. I friska människor utgör CD4 celler cirka 70% av alla T-celler. Obehandlad HIV leder till AIDS, därför är det extremt viktigt med behandling. Förloppet för insjuknande är följande: som vid alla virusinfektioner stiger antalet lymfocyter och därmed sjunker först antalet HIV-virus. Men eftersom HIV infekterar celler som uttrycker CD4 på ytan, så som makrofager och T-hjälparceller, sjunker dessa i antal och immunförsvaret blir försvagat och tillslut övermannat av viruset. När antalet CD4 celler i blodet är under 200/ μ l får patienten lätt infektioner. CD4-positiva celler är viktiga komponenter i immunförsvaret och när dessa blir infekterade kan vanliga bakterier, svampar och virus lätt sprida och föröka sig. Dessa infektioner är vanliga dödsorsaker hos patienter med HIV/AIDS och den allra vanligaste är lunginflammation. När HIV diagnostiseras letar man oftast efter antikroppar mot viruset i blodet. Enzym Immuno Assay (EIA or ELISA) används vid screening av till exempel donerat blod. Ett positivt resultat måste bekräftas med HIV immunoblot (Western blot) eller med immunofluorescence (Madigan et al, 2015).

1.2. HLA

Major Histocompatibility Complex (MHC) är en typ av proteiner som uttrycks på alla cellers yta. MHC-regionen som nedärvs på kromosom 6 hos människa (figur 1) finns hos alla ryggradsdjur. Mänskligt MHC kallas Human Leukocyte Antigen (HLA) (Madigan et al, 2015). HLA-genkomplexet består av cirka 4 Mbp som i sin tur kodar för tre klasser; HLA klass I, HLA klass II, samt HLA klass III. HLA proteiner (integralt membranprotein) karakteriseras som antigenpresenterande. Detta är en mekanism som

ryggradsdjur utvecklat för att lokalisera infekterade celler eftersom intracellulära patogener annars inte lämnar några markörer eller spår på utsidan av cellen (Madigan et al, 2015; Berg et al, 2012). HLA klass I proteinerna HLA-A, B och C finns på alla människans celler som har cellkärna och presenterar peptider för cytotoxiska T-celler (Tc-celler). Dessa peptider kommer från cytoplasmatiska proteiner. Peptiderna transporteras från cytoplasman till endoplasmatiskt retikulum (ER) av TAP (Transporter Associated with antigen processing Protein). I ER bildar peptiderna ett HLA-klass I-peptidkomplex som transporteras till plasmamembranet där peptiderna presenteras. Tc-celler har specifika receptorer som känner igen främmande peptider som presenteras av HLA-klass I och inducerar apoptos (självmord) i den infekterade cellen. HLA klass II proteinerna DR, DQ och DP finns på makrofager och dendritiska celler och presenterar peptiderna för T-hjälparceller (Th-celler). Peptiderna kommer från material som tagits upp via endocytos eller fagocytos. Det kan exempelvis vara en viruspartikel som fångats av och binder till ett membranbundet immunoglobulin på en B-cell, eller bakterier som fagocyterats. Peptider från dessa bildar ett HLA-klass II-peptidkomplex och transporteras från fagolysosomen till plasmamembranet för att presenteras för Th-celler. Istället för att döda den presenterande cellen, signalerar Th-cellen att den hittat främmande material och "kallar på hjälp" genom att aktivera B-cellen att bilda antikroppar och stimulera makrofager att fagocytera (Berg et al, 2012). HLA klass III generna kodar för proteiner associerade med immunrelaterade funktioner, till exempel komplementproteinerna C4 och C2 och cytokinet Tumor Necrosis Factor (TNF). Klass I och klass II är peptidbindande proteiner, medan klass III inte är strukturellt relaterade till dessa (Madigan et al, 2015) och kodar i egentlig mening inte för HLA molekyler (Choo, 2007). HLA-regionen är känd för att vara den mest polymorfa hos människor (Choo, 2007). Den stora variationen beror på att klyftan som binder antigener (t.ex. peptider från patogener) har olika "former" beroende på varierande aminosyror i regionen (Illing et al, 2012; Choo, 2007). Man kan säga att dessa skiljer sig så mycket från individ till individ att de kan kallas ett molekylärt fingeravtryck (Hartwell et al, 2011).



Figur 1. Schematisk bild av HLA komplexet på kromosom 6 (preimplantationgeneticdiagnos u.å).

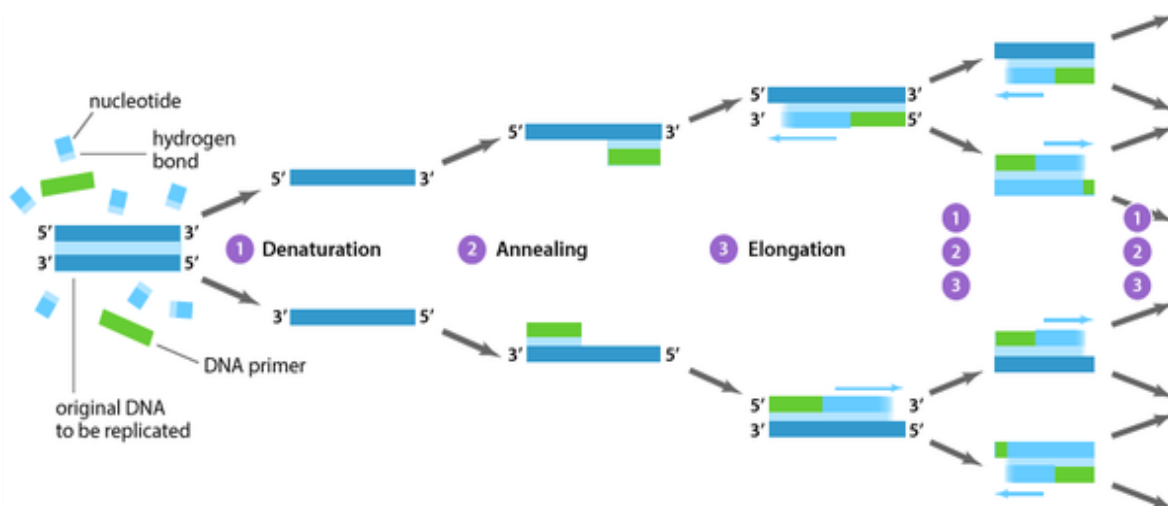
1.3. Abacavir

Abacavir är ett läkemedel som används vid HIV infektion. Det fungerar som en nucleoside reverse-transcriptase inhibitor och har visat goda resultat då det används för att förhindra att HIV utvecklas till AIDS. Läkemedlet kan dock ge negativa effekter i form av hypersensitivetsreaktioner (Abacavir Hypersensitivity Syndrome; AHS) som drabbar 5–8% av patienterna någon gång under de första 6 veckorna av behandlingen. Symtomen kan exempelvis vara feber, gastrointestinala problem och respiratoriska symtom. AHS är starkt relaterad till HLA-B*57:01 allelen och en studie har visat att screening av allelen minskar risken för att patienterna utvecklar hypersensitivitet (Mallal et al, 2008). Studien visade också denna alleltyp är ovanlig (6%) i den kaukasiska populationen.

1.4. PCR

Polymerase chain reaction (PCR) används för att kopiera upp en specifik DNA sekvens i miljontals kopior som därefter kan detekteras. PCR har sedan 1983 då Kary Mullis introducerade metoden blivit globalt använd inom molekylärbiologin (Seidman et al, 2009). PCR kan exempelvis användas för att se om en specifik gen finns i ett prov. Metoden utnyttjar höjning av temperatur som gör att DNA-strängarna (templat DNA) separerar (figur 2). Då kan specifika primers binda till den DNA sekvens som ska kopieras, förutsatt att den finns närvarande. DNA polymeras bygger sedan från primern en ny DNA sträng genom att binda nukleotider komplementära till den specifika sekvensen. Denna process upprepas 20 till 40 cykler. Den amplifierade PCR produkten kan därefter detekteras i relation till en storleksmarkör med hjälp av gelelektrofores som

separerar DNA fragmenten efter storlek. DNA:t färgas t.ex. med Syber safe som fluorescerar och kan fotograferas med UV-ljus, och DNA syns då som band på gelen (Seidman et al, 2009). Reaktionen sker ofta i små brunnar som innehåller alla reagens. HLA har tidigare vanligtvis bestämts med lymfocytotoxicitetstest, men detta har bytts ut mot PCR-baserad DNA typning, så kallad singel specific primer (SSP)-PCR. Denna metod skiljer olika alleler under PCR processen, ett post-PCR steg behövs alltså inte som vid andra PCR-tekniker. SSP-PCR kortar ner tiden och gör post-PCR steget i form av gelelektrofores med storleks separation enklare (Olerup u.å). Eftersom SSP-PCR tekniken endast detekterar specifika DNA sekvenser, är det en passande metod för HLA-typning. Specifika primers för exempelvis HLA-B*5701 sekvensen kan användas (Parasannanavar et al, 2013).



Figur 2. Bild över hur DNA strängarna separerar och kopieras med primers under PCR (Quora u.å).

2. Syfte

På Klinisk Immunologi och Transfusionsmedicin på Universitetssjukhuset i Lund används en metod som endast grundtypar HLA, men intresset är stort för ett kit som även subtypar HLA-B*57. Syftet med denna studie var att jämföra den befintliga metoden (Olerup SSP® HLA-B*57 kit) för HLA-typning med två andra kit (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Inno-train HLA-Ready Gene B57 kit) som finns på marknaden. Jämförelsen grundar sig på skillnader mellan kiten, både vad gäller resultat, kostnader och analystider.

3. Material och Metod

3.1. Urval av prover

Totalt 20 stycken förpreparerade DNA prover analyserades, varav 14 stycken redan var grund- och subtypade och 6 stycken som endast var grundtypade och skulle subtypas. Proverna eftersöktes i ”DoReMi” som är ett internt program för provhantering och resultatredovisning och i ”SCORE” som är Olerups egen mjukvara för tolkning av SSP; proverna togs fram från långtidsförvaring i -20°C. De DNA prover som användes i denna studie hade tidigare extraherats från blod genom att använda ett automatiserat instrument för DNA preparering; Qiagen EZ1 Advanced XL. Maskinen laddas med färdiga kit som innehåller alla olika reagens som behövs för att bland annat lysa cellerna, binda DNA till magnetkuler, tvätta bort hemoglobin och annat debris och eluera ut DNA. När processen var klar gjordes koncentrationsbestämning vid 260 nm i en spektrofotometer (Thermo Scientific NanoDrop 2000C) innan de placerades för långtidsförvaring. Inget etiskt tillstånd bedömdes behövas då provernas identitet skyddades med en specifik sifferkombination (LID).

3.2. Jämförelse av kit för HLA-typning

Proverna HLA-typades med kit från två olika företag; Olerup SSP AB och Inno-train. Två olika kit från Olerup användes under analysarbetet, ett är det befintliga (Olerup SSP® HLA-B*57) som subtypar HLA-B*57 prover. Det andra är ett nytt som både grund- och subtypar prover för HLA-B*57 (Olerup SSP® HLA-B*57:01). Olerup använder samma instruktioner för alla SSP-PCR metoder. Det tredje kitet kommer från Inno-train (Inno-train HLA-READY GENE B57) som både grund- och subtypar prover, men visar enbart om subtypen är HLA-B*57:01-positiv eller inte. Det finns vissa skillnader mellan företagens metoder, bland annat PCR programmeringen (tabell 1.) som utfördes med PCR Applied Biosystems (USA) och separationen med gelelektrofores (VWR, USA). Gelerna fotograferades i UV-ljus (Alpha Innotech, USA). Tolkningen av gelerna utfördes på olika sätt för de olika kiten, Olerup är kopplat till ett program (SCORE), medan Inno-train tolkas manuellt direkt från gelbilden.

Tabell 1. Skillnader i PCR programmeringen mellan Olerup (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Olerup SSP® HLA-B*57 kit) och Inno-train.

| PCR programmering | Olerup SSP | Inno-train SSP |
|----------------------|--------------------|--------------------|
| 1. 1X cykel | 94 °C, 2 minuter | 96 °C, 2 minuter |
| 2. 10X cykler | 94 °C, 10 sekunder | 96 °C, 15 sekunder |
| | 65 °C, 60 sekunder | 65 °C, 60 sekunder |
| 3. 20X cykler | 94 °C, 10 sekunder | 96 °C, 15 sekunder |
| | 61 °C, 50 sekunder | 61 °C, 50 sekunder |
| | 72 °C, 30 sekunder | 72 °C, 30 sekunder |
| 4. Hold | 4 °C ∞ | 4 °C ∞ |

3.3. HLA-typning med Olerup kit (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Olerup SSP® HLA-B*57 kit)

I mjukvarans försättsblad anges DNA provets koncentration och antal brunnar för att beräkna de volymer av destillerat vatten, PCR lösning och DNA som behövs för rätt reaktionsförhållande i MasterMixer. Strips (Olerup SSP AB, Sverige) med förpipetterade primermixar tas fram och PCR lösning för amplifiering bereds i ett rör utan DNA. 10 µl av lösning tillsätts i brunn avsedd för non template control (ntc). Beräknad mängd DNA tillsätts till röret som vortexas och 10 µl av lösningen tillsätts till varje brunn med primermix. Samma procedur görs för alla prover. Stripsen förseglas med film och körs i vald PCR-maskin (Applied Biosystems, Veriti 96 well thermal cycler, USA). Proverna körs enligt PCR programmet som beskrivs i tabell 1. När PCR:en är färdig placeras en 2%-ig agarosgel i ett elektrofores-bad (VWR, USA) med 0,5 x TBE-buffert och med en 8-kanals pipett överförs innehållet (cirka 9,5 µl) från brunnarna till motsvarande brunnar i gelen och 5 µl storleksmarkör (Olerup SSP AB, Sverige) överförs till brunnarna i mittersta raden. Elektroforesbadet kopplas till ett spänningsaggregat (VWR, USA) och gelen körs under 12 minuter på 240V. Därefter tas gelen ur badet och placeras under en UV-

kamera (Alpha Innotech, USA). Gelen fotograferas med LID och redigeras innan den sparas i bildhanteringsprogrammet Picasa.

3.4. HLA-typning med Inno-train HLA-Ready Gene B57 kit

Strips (Inno-train, Tyskland) med förpipetterade primermixar tas fram och mastermix prepareras enligt beskrivning från företaget med destillerat vatten, ReadyPCR lösning och Taq-polymerase (5 U/ μ l). 10 μ l av lösningen tillsätts till rör avsedd negativ kontroll. Därefter tillsätts 9 μ l mastermix till resterande rör. 1 μ l av vardera DNA prov tillsätts sedan till respektive rör märkta med LID och korkarna sätts på. Proverna körs i vald maskin enligt PCR programmet som beskrivs i tabell 1. När PCR:en är klar separeras och detekteras DNA med hjälp av elektrofores så som beskrivits ovan men gelen körs under 30 minuter på 160V. Därefter tas gelen ur badet och placeras under en UV-kamera (Alpha Innotech, USA). Gelen fotograferas och redigeras innan den sparas i bildhanteringsprogrammet Picasa.

3.5. Beredning av 2% agarosgel

6 gram agaros (Lonza, USA) vägs upp på en våg (ACCULAB, USA) och hålls sedan över i en glasflaska. 300 ml 0,5 x TBE Buffert tillsätts till glasflaskan och lösningen får koka i mikrovågsugn (Whirlpool, USA) cirka 4–5 minuter tills agarosen lösts upp och vätskan är klar. 8 ml sterilt vatten tillsätts för att kompensera för vätskeförlust. Flaskan sätts i vattenbad tills temperaturen sjunkit till cirka 70°C, därefter tillsätts 30 μ l Sybr Safe (Invitrogen, USA). Lösningen blandas och fördelas sedan i tre gelformar, kammar sätts i. Gelen får stelna under 20–30 minuter innan kammen tas bort och den kan användas.

3.6. Tolkning av geler

3.6.1. Olerup (Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och Olerup SSP® HLA-B*57 kit)

När gelbilderna redigerats och sparats i Picasa, skrivs dessa ut för att kunna klistras in i tolkningsprotokoll. På tolkningsprotokollet finns en tabell som motsvarar brunnarna i gelen, varje brunn har ett nummer. Syns ett band på gelbilden, markeras representativ brunn med rosa överstrykningspenna i tolkningsprotokollet. När alla band markerats på tolkningsprotokollet ska HLA-typ bestämmas. Olerup har ett arbetsblad för varje kit där Amplicon size och Internal control band bedöms med hjälp av gelbilden. Detta worksheet (bilaga 1) har också en lista över olika HLA-B*57 subtyper. Med hjälp av de

rosamarkerade brunnarnas nummer sammanställs dessa för att hitta motsvarande kombination i listan och bestämma HLA-typen. Olerup är också kopplat till SCORE, där aktuellt LID kan sökas upp. Därefter kan lokus och lot-nummer för primers läggas in, sedan kan specifika amplifieringar från gelbilden markeras. SCORE analyserar detta och ger en egen HLA tolkning. Detta kan jämföras med det man kommit fram till själv för att se om resultaten blir lika.

3.6.2. Inno-train

När gelbilderna redigerats och sparats i Picasa, skrivs dessa ut. Ett worksheet från Inno-train följde med kitet, dit bild kunde klistras in och amplifieringar antecknas. Inno-train kitet tolkas inte med något program, utan endast manuellt med hjälp av gelerna. Detta kit visar endast om provet är HLA-B*57:01 positivt eller negativt.

3.7. Kvalitetskontroller och Miljöaspekter

Leveranskontroller görs på kit från Olerup enligt vissa kriterier exempelvis vid ny tillverkningsserie (lot-nummer). Instrument, såsom PCR-maskinen, kontrolleras med jämna intervaller av personal från avdelningen Medicinsk Teknik och är märkt med ett unikt id. Service görs av företag enligt upphandlad plan (EZone, Qiagen). Pipetter kontrolleras enligt specifikt schema av ansvarig på laboratoriet och kontrollvägning av våg görs varje vecka. I PCR-rummet används speciella rockar, handskar, samt skoskydd. Inget som tas in i rummet tas ut till det övriga laboratoriet igen. Alla reagens och kit finns deklarerad i miljöledningssystemet KLARA. Om exempelvis ett nytt reagens ska införas måste det registreras där och en riskbedömning göras. Speciella avfallsbehållare och lådor finns för riskavfall och plast, m.m.

3.8. Statistik

Överensstämmelsen mellan de jämförda kiten ämnas undersökas med Chi2-test (Excel).

4. Resultat

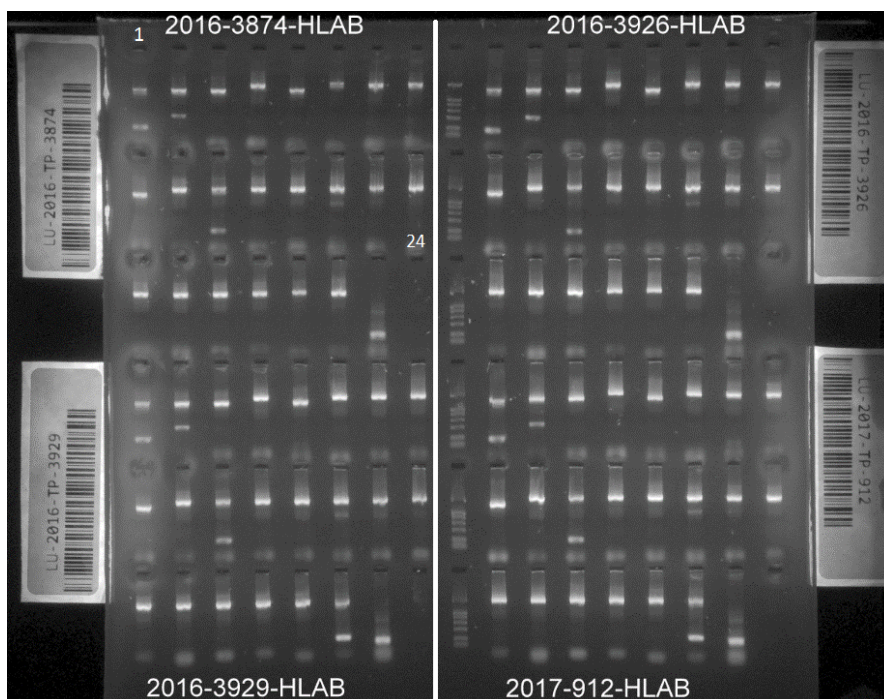
4.1. Subtypning med befintligt Olerup kit, Olerup SSP® HLA-B*57

Sex stycken prover subtypades med det befintliga kitet från Oleup, eftersom dessa endast var grundtypade. Resultaten från gelbilderna visade att tre prover var HLA-B*57:01-positiva. Utav de tre proverna som inte var positiva för HLA-B*57, gav ett prov inga

band alls på gelen. Vid sök i DoReMi visade tidigare analyser att provet var HLA-B*18:35. De två andra proverna hade båda band i brunn 9, men typning kunde inte fastställas utifrån detta eftersom amplifiering i brunn 9 kan tyda på flera olika grund- och subtyper. Eftersökning i DoReMi visade att ett prov var HLA-B*42:49 och att det andra var HLA-B*15:40. Negativ kontroll blev godkänd.

4.2. HLA-typning med Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit

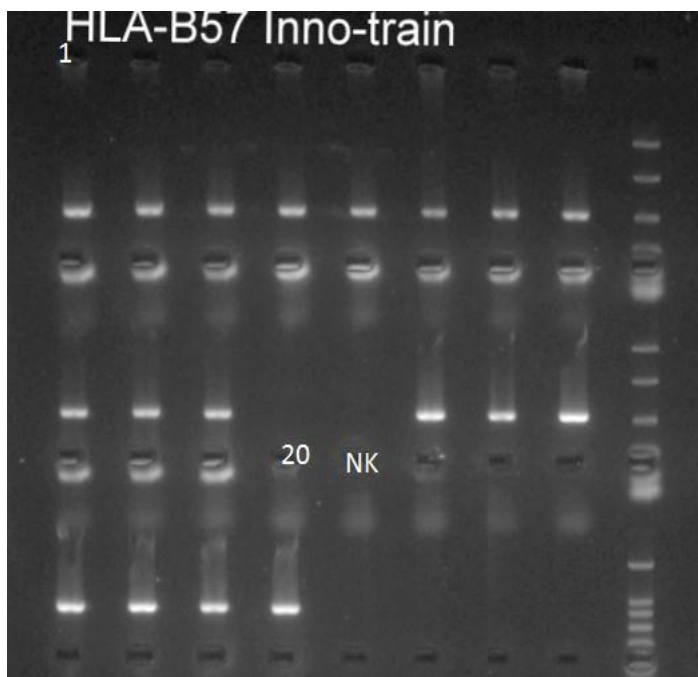
10 av 20 prover och två kontroller kördes med det nya Olerup kitet, vid första körningen. Tre stycken geler användes, fyra prover per gel. Första körningen visade att alla prover hade grund- och subtypningen av HLA-B*57:01, exempel visas i figur 3 och resultat i tabell 2. Resultaten kontrollerades och bekräftades med hjälp av DoReMi. Kontrollerna som ingick i kitet blev godkända och visade HLA-B*57:01 respektive HLA-B*58:01, dessa visas inte i gelbilden. Vid andra körningen med det nya kitet från Olerup kördes de 10 sista proverna och två medföljande kontroller på tre geler, fyra prover per gel. Fyra prover visade grundtypen HLA-B*57, två av dessa prover var HLA-B*57:01. Ett prov var HLA-B*57:03 och det andra provet var HLA-B*57:02. Resterande sex prover hade inte grundtypen HLA-B*57, utan var efter kontroll i DoReMi följande: HLA-B*42:49, HLA-B*15:40, HLA-B*18:35, HLA-B*35:47, HLA-B*15:18, samt HLA-B*07:13. Kontrollerna som ingick i kitet blev godkända och visade HLA-B*57:01 respektive HLA-B*58:01, dessa visas inte i gelbilden.



Figur 3. Gelbild från första körning med Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit. Figuren illustrerar att det gick att påvisa grund- och subtypning i alla prover. Varje prov har 24 brunnar (tre rader) och inkluderar sub-typning, sista brunnen för varje prov (brunn 24) är negativ kontroll. Brunnarna i mitten innehåller DNA-stege som storleksmarkör.

4.3. HLA typning med Inno-train HLA-READY GENE B57 kit

Alla 20 prover kördes samtidigt med kitet från Inno-train, på en gel. Av de 20 brunnarna i gelen med prov, uppvisade 18 stycken band (figur 4). Endast 12 av 20 resultat stämde efter kontroll med tidigare analyser (tabell 2). Av de 12 prover som tidigare blivit grund och subtypade som HLA-B*57:01, stämde 11 stycken vid denna körning. 7 stycken prover som inte är HLA-B*57:01 blev positiva för HLA-B*57:01, alltså blev totalt 8 av 20 resultat felaktiga. Negativ kontroll blev godkänd. Sex stycken prover av de åtta som inte stämde kördes om, eftersom endast sex analysmöjligheter kvarstod i strip som medföljde kitet. Vid omkörningen fick en av sex brunnar band som motsvarade HLA-B*57:01 positiv. Vid omkörningen stämde alla resultat med tidigare analyser, de som inte är HLA-B*57:01 fick inga band. Negativ kontroll blev godkänd.



Figur 4. Gelbild från elektrofores med Inno-train HLA-READY GENE B57 kit. Varje brunn innehåller ett prov, de med ett tydligt band indikerar HLA-B*57:01. Första provet är markerat med 1. Sista provet är markerat med 20. NK= negativ kontroll. Längst till höger finns DNA-stege som storleksmarkör.

4.4. Jämförelse av analysresultaten

Resultaten som erhöles med Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit och resultaten från Inno-train HLA-READY GENE B57 kit stämde efter omkörningen med Inno-train till 100% med de resultat som erhöles från det Olerup kit som tidigare använts (bilaga 1). Eftersom överensstämmelse mellan metoderna var 100% ansågs ingen bekräftelse med Chi2-test behövas. Avseende prisskillnader (tabell 3) mellan metoderna kostar Olerup (Olerup SSP® HLA-B*57:01) cirka 114 kr/prov och Inno-train kostar cirka 62 kr/ prov (priserna är uträknade med erhållen rabatt från företagen, som kan variera). Skillnaden blir cirka 50 kronor. Det befintliga kitet från Olerup kostar cirka 190 kr/prov. Exemplet i tabellen visar en prisskillnad på 7500 kr mellan Olerup HLAB*57:01 och Inno-train om en beställning skulle göras en gång per månad under ett år.

Tabell 2. Resultat från Olerup SSP® HLA-B*57 kit, Olerup SSP®

HLA-B*57:01 kit och Inno-train HLA-READY GENE B57 kit.

| Prov/LID | Olerup SSP® HLA-B*57 kit | Olerup SSP® HLA-B*57:01 kit | Inno-train HLA- READY GENE B57 kit | Omkörning av misslyckade analyser med Inno-train |
|----------|-----------------------------|--------------------------------|--|---|
| 1105 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 99 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 384 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 732 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 557 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 225 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 3874 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 3929 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 3926 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 824 | HLA-B*57:02 | HLA-B*57:02 | Misslyckad analys | HLA-B*57:02 |
| 825 | HLA-B*57:03 | HLA-B*57:03 | HLA-B*57:03 | |
| 1051 | HLA-B*35:47 | HLA-B*35:47 | Misslyckad analys | HLA-B*35:47 |
| 1083 | HLA-B*15:18 | HLA-B*15:18 | Misslyckad analys | HLA-B*15:18 |
| 1136 | HLA-B*07:13 | HLA-B*07:13 | Misslyckad analys | HLA-B*07:13 |
| 912 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 803 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | |
| 307 | HLA-B*57:01 | HLA-B*57:01 | Misslyckad analys | HLA-B*57:01 |
| 1033 | HLA-B*42:49 | HLA-B*42:49 | Misslyckad analys | HLA-B*42:49 |
| 1045 | HLA-B*15:40 | HLA-B*15:40 | Misslyckad analys | HLA-B*15:40 |
| 1046 | HLA-B*18:35 | HLA-B*18:35 | Misslyckad analys | HLA-B*18:35 |

Tabell 3. Beräkningar av kostnader för de olika kiten. Aktuella rabatter erhöles från företagens fakturor.

| | Olerup SSP® HLA-B*57 (befintlig metod) | Olerup SSP® HLA-B*57:01 | Inno-train HLA- READY GENE B57 |
|--|--|----------------------------|--------------------------------------|
| Cirka kostnad Utan rabatt/kit | 2550 kr | 1500 kr | 3990 kr |
| Cirka kostnad Med rabatt/kit | 2300 kr | 1370 kr | 1995 kr |
| Antal tester / kit | 12 st | 12 st | 32 st |
| Kostnad/ test med rabatt | 190 kr / test | 114 kr / test | 62 kr / test |
| Exempel: kostnad / år om beställning görs 1 gång / månad. | 27 600 kr | 16 440 kr | 23 940 kr |

5. Diskussion

I denna studie användes SSP-PCR för att detektera HLA-B*57:01 allelen. Detta är för närvarande den mest använda metoden för HLA-typning (De Spiegelaere et al, 2015). Andra metoder för att typa HLA är exempelvis DNA sequence-based typing (SBT) och kvantitativ PCR (Q-PCR) (Stocchi et al, 2012).

De tydligaste resultaten från denna studie var de som erhöles från Olerup där samtliga typningar överensstämde med den befintliga metoden, medan resultaten från Inno-train inte blev lika trovärdiga. Efter första analysomgången gav 8 av 20 prover fel resultat. Dock stämde de 6 typningarna som kördes om i andra analysomgången och kontrollerna blev godkända. Felen som uppstod vid typning kan ha berott på pipetteringsfel eller provförväxling, och på oerfarenhet då det var första gången det kitet användes på laboratoriet.

Själva utförandet av de olika kiten skiljer sig till viss del. Dispensering av lösningar och DNA till stripsen utförs på olika sätt. Med Olerup tillsätts DNA:t i större volym till mastermixen medan man i Inno-train metoden tillsätter endast 1 µl DNA separat till respektive rör efter att mastermix tillsatts. Det ger en ökad risk för att DNA inte överförs korrekt till rören. Med kitet från Olerup hade det märkts eftersom den slutliga volymen (PCR lösning + Taq enzym, vatten och DNA) är uträknad för att räcka till ett visst antal brunnar och det blir enkelt att observera om något gått fel. Även tolkningen av resultaten skiljer mellan de olika metoderna. Eftersom Olerups kit inte bara indikerar HLA-B*57:01, utan även andra sub-typningar, ger detta en mer komplex bild än Inno-train som inte kräver tolkningsprotokoll då gelen endast visar om provet är positivt för HLA-B*57:01 eller inte. Det tar således lite längre tid att tolka Olerup resultaten, men i övrigt skiljer sig analysiderna marginellt mellan kiten, både vad gäller förarbetet och PCR-amplifieringen.

Avseende kostnader har Inno-train det billigaste priset per prov, dessutom innehåller detta kit fler än dubbelt så många tester som Olerups kit. Med de gällande avtal som Region Skåne upprättat med Olerup kan deras kit dock på sikt vara ett billigare alternativ. Vid val av kit bör behovet av sub-typning övervägas, det är värdefull information som ger en mer omfattande och säkrare typning och som möjligen är värt kostnaden. I framtiden skulle en direkt sub-typning säkerligen kunna utnyttjas ännu bredare, då forskningen går framåt och andra HLA-relaterade sjukdomar sannolikt kommer att upptäckas. Även andra användningsområden, så som en mer skraddarsydd behandling mot olika sjukdomar

skulle kunna utvecklas genom att se en persons HLA-typ. Ankyloserande spondylit (AS) är exempelvis starkt associerat med HLA-B*27 (Akkoç et al, 2017), och celiaki (glutenintolerans) är associerat med alleler i HLA-DQ regionen (Joda et al, 2015).

Farmakogenetisk testning, som är till för att hitta det mest effektiva läkemedlet och optimal dos för en specifik patient, används inte allmänt eller rutinmässigt för att optimera läkemedelsval (Mallal et al, 2008). Dock har farmakogenetisk testning för HLA-B*57:01 resulterat i minskade fall av hypersensitivitetsreaktioner till följd av Abacavir användning (Martin et al, 2013), en god anledning till att fortsätta med dessa typer av analyser och forskning kring HLA-relaterade sjukdomar.

Analyskit för sub-typning är dyra och ett billigare alternativ där man bara fastställer HLA-typ kan vara mer ekonomiskt. För snabbare och mindre kostsam HLA-typning har monoklonal antikropp specifik för HLA-B*57 screening tagits fram. Då fastställs först om patienten är positiv för HLA-B*57 innan man sub-typar (Kostenko et al, 2011). Med ett sub-typningskit får man dock svar direkt om patienten är 57:01, vilket gör att man kan agera snabbare om en patient redan får Abacavir eller om man planerar att sätta in läkemedlet. Motsvarande strategi har man redan på laboratoriet i Lund, men med den skillnad att de använder ett SSP-PCR kit från Olerup som endast typar HLA-B. En annan studie beskriver olika sätt att typa HLA för att detektera HLA-B*57:01 allelen, där en ofta använd analys baseras på användandet av oligonukleotid-prober som endast amplifierar denna allel (Martin et al, 2013). Denna analys liknar de som erhålls från Inno-train kitet, antingen är patienten positiv för HLA-B*57:01 eller inte. Författarna fastställer att analyser med denna typ av allelspecifik-PCR har nästintill perfekt överensstämmelse med analyser med sekvensbaserad typning.

6. Slutsats

Båda metoder, Olerup SSP® HLA-B*57:01 och Inno-train HLA-READY GENE B57, fungerade och gav korrekta resultat jämfört med Olerup SSP® HLA-B*57 kitet, men fler analyser bör utföras för att säkerställa att felen som uppstod med Inno-train inte berodde på mänskliga faktorn. Först då kan man fastställa vilket kit som är mest lämpligt.

Tackord

Stort tack till Bodil Hernroth & Rebecca Rappner för handledningen. Tack till personalen på Klinisk immunologi och transfusionsmedicin på Lunds Universitetssjukhus för all hjälp och för material till studien.

Referenser

- Bender, K., Buckley, D., Madigan, M., Martinko, J., & Stahl D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. London: Pearson. Utgåva? ISBN nummer?
- Beni, V., Frank, R., Höth, J., Joda, H., Katakis, I., Lind, K., O'Sullivan, C.K., Strömbom, L. & Willems, A. & (2015). Modified primers for rapid and direct electrochemical analysis of coeliac disease associated HLA alleles. *Biosensors and Bioelectronics* 73:64-70.
- Berg, J.M., Stryer, L., & Tymoczko, J.L. (2012). *Biochemistry*. Bedford: W.H. Freeman and Co. Utgåva? ISBN nummer?
- Bharadwaj, M., Chen, K., Foley, B., Holdsworth, R., Hudson, F., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Lucas, A., Lynch, K., Mallal, S., McCluskey, J., Nicholson, I., Nguyen, J., Rossjohn, J., Tait, B.D. & Wu, A.H.B. (2011). Rapid screening for the detection of HLA-B57 and HLA-B58 in prevention of drug hypersensitivity. *Tissue Antigens* 78:11–20.
- Bonczkowski, P., Callens, S., Coucke, P., De Spiegelaere, W., De Wit, S., Emonds, M.P., Kabeya, K., Kiselinova, M., Malatinkova, E., Philippé, J., Ruelle, J., Sermijn, E., Trypsteen, W., Vervisch, K., Verhofstede, C., Vogelaers, D., Van Acker, P., Van Sandt, V., & Vandekerckhove, L. (2015). Comparison of Methods for In-House Screening of HLA-B*57:01 to Prevent Abacavir Hypersensitivity in HIV-1 Care. *Plos One* 10(4): e0123525.
- Cascella, R., Giardina, E., Novelli, G., Pirazzoli, A., Stocchi, L. & Zampatti, S. (2012). The Pharmacogenomic HLA Biomarker Associated to Adverse Abacavir Reactions: Comparative Analysis of Different Genotyping Methods. *Current Genomics* 13: 314-320.
- Chen, Z., Dudek, N.L., Illing, P.T., Kostenko, L., & Vivian, J.P. (2012). Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 486: 554-558.
- Choo, S.Y. (2007). The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* 48: 11-23.
- Goldberg, M.L., Hartwell, L.H., Hood, L., Reynolds, A.E., & Silver, L.M. (2011). *Genetics: From Genes to Genomes*. New York: McGraw Hill.
- Ghosh, K., Parasannanavar, D.J. & Rajadhyaksha, A. (2013). Application of a Simple In-House PCR-SSP Technique for HLA-B* 27 Typing in Spondyloarthritis Patients. *Arthritis* 2013:1-4.
- Kroetz1, D.L. & Martin, M.A. (2013). Abacavir Pharmacogenetics – From Initial Reports to Standard of Care. *Pharmacotherapy* 33:765-775. Moore, C.J., & Seidman, L.A. (2009). *Basic Laboratory Methods for Biotechnology*. London: Pearson.
- World Health Organization. (2016). *HIV/AIDS*. www.who.int [2017-05-02].
- Olerup. (u.å). *Instructions for Use*. www.Olerup.com [2017-05-01].
- Preimplantation genetic diagnosis. (u.å). *The HLA complex*. www.preimplantationgeneticdiagnosis.it [2017-05-10].

Quora. (u.å). *What is the main function of primers in PCR?* www.quora.com [2017-05-10].

Bilagor

Bilaga 1. Exempel på ett Worksheet från Olerup SSP, för tolkning av HLA-B*57:01.

| Well No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| HLA-B allele ^{1,2,3} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:01:01-57:01:22 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:02:01-57:02:02, 57:12, 57:42 | 1 | | | | | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:03:01-57:03:02, 57:17, 57:66, 57:70 | 1 | 2 | | | | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:04 | 1 | | 3 | | | | | | | | | | | | | | | 17 | | | | |
| *57:05, 57:11, 57:28N, 58:36 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:06, 57:18, 57:27 | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:07, 57:46 | 1 | 2 | | | 5 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:08 | 1 | 2 | | | | 6 | | | | | 11 | 12 | | | | | | | | | | |
| *57:09 | 1 | | | | | 6 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:10, 57:44, 57:73 | 1 | 2 | | | | | | 8 | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:13 | 1 | | | | | | | 7 | | 10 | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:14:01-57:14:02, 57:25, 57:31, 57:50 | 1 | 2 | | | | | | 7 | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:15, 57:29 | 1 | 2 | | 4 | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:16 | | 2 | | | | 5 | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:19, 57:30, 57:52, 57:61 | 1 | | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:20, 57:62 | | 2 | | 4 | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:21, 57:33, 57:74 | 1 | 2 | | | | | | | 9 | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:22, 57:43 | 1 | 2 | | | | | | | | 10 | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:23, 57:26, 57:34, 57:64 | 1 | 2 | | | 5 | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:24 | 1 | | | | | | | 7 | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:32 | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:35, 57:38, 57:60 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | 12 | | | | | | | | | | |
| *57:36 | | 2 | | | | | | | | | 11 | 12 | | | | | | | | | | |
| *57:37, 57:79N | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | 18 | | | |
| *57:39 | 1 | 2 | | | | 6 | | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:40 | 1 | 2 | | | | | | | 9 | | w | | | | | | | | | | | |
| *57:41, 57:68 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | 17 | | | | |
| *57:45, 57:69 | | 2 | | | | | | | | | 11 | | 13 | | | | | | | | | |
| *57:47, 57:54, 57:59, 57:77 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | 14 | | | | | | | | |
| *57:48, 57:55-57:56, 57:78 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | 15 | | | | | | | |
| *57:49, 57:58, 57:71 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | 13 | | | | | | | | | |
| *57:51 | | 2 | | | | | | 8 | | | 11 | | 13 | | | | | | | | | |
| *57:53 | 1 | 2 | | | | | | 7 | | | | | | | | | | | | | | |
| *57:57 | 1 | 2 | | | | 6 | | | | | 10 | | | | | | | | | | | |
| *57:63 | 1 | | | | | 6 | | | | | 10 | | | | | | | | | | | |
| *57:65 | 1 | 2 | | | | 6 | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *57:67 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | 16 | | | | | |
| *57:72 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | 19 | |
| *57:75 | 1 | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | 20 |
| *57:76 | 1 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 19 |
| *07:120, 15:214, 18:81, 35:250, 40:150, 51:165 | | | | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *07:219 | | | | | | | | 8 | | | | | 13 | | | | | | | | | |
| *07:227 | | | | | | | | 7 | | | 10 | | | | | | | | | | | |
| *14:20, 35:127, 51:186 | | | | | | | | | 9 | | | | | | | | | | | | | |
| *15:33, 15:116, 15:248, 40:63, 40:92, 44:36, 44:169, 44:182, 46:43, 49:22, 51:126, C*03:87:01-03:87:02, C*03:129, C*03:232, C*03:234, C*05:27, C*05:39, C*08:115, C*17:07 | | | | | | | | | | | | | | 14 | | | | | | | | |
| *15:87 | | | | | | | | | | | | 12 | | | | | | | | | | |
| *15:340, 40:218, 46:28, 51:58, A*33:12 | | | | | | | | | | | | | | | 15 | | | | | | | |
| *35:208 | | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | | | | | |
| *40:30, 40:34 | | 2 | | | | 6 | 7 | | | | | | | | | | | | | | | |
| *44:153 | | 2 | 3 | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | 17 | | |
| *55:14 | | 2 | | | | 5 | | | | | 10 | 11 | | | | | | | | | | |
| *58:12, A*02:42, A*02:285, A*02:310 | | | | | | | | | | | | | 13 | | | | | | | | | |
| *58:14 | | 2 | | | | | | | | | 11 | | | | | | | 16 | | | | |
| *58:41 | | | | | | | | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| *58:54 | | | | | | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C*06:72 | | | | | | 5 | 7 | | | w | 11 | | | | | | 16 | 17 | | | | |
| Well No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | |

Negative Control