



Tervise
Arengu
Instituut

Kuiva veretäpi meetodi kasutamine C-hepatiidi viiruse markerite tuvastamiseks narkootikume süstivate inimeste seas

Tallinn 2023

Kuiva veretäpi meetodi kasutamine C-hepatiidi viiruse markerite tuvastamiseks narkootikume süstivate inimeste seas

Maria Vikentjeva, Irina Rešetnjak,
Tatiana Kuznetsova, Julia Geller, Sigrid Vorobjov

Tervise Arengu Instituudi missioon on olla teaduspõhiste tervislike valikute kujundaja.

Retsensent: Diva Eensoo

Väljaande andmete kasutamisel viidata allikale.

Soovitatav viide käesolevale väljaandele: Vikentjeva M, Rešetnjak I, Kuznetsova T, Geller J ja Vorobjov S. Kuiva veretäpi meetodi kasutamine C-hepatiidi viiruse markerite tuvastamiseks narkootikumide süstivate inimeste seas. Tallinn: Tervise Arengu Instituut; 2023.

ISBN 978-9949-666-40-9 (pdf)

Sisukord

Joonised	4
Tabelid	4
Laboratoorne töö	5
Lühendid	5
Lühikokkuvõte	6
Summary	6
Резюме	7
Sissejuhatus ja taust	9
Projekti eesmärgid	10
1 Metoodika	11
1.1 Vere kogumine	11
1.2 Kuiva veretäpi proovide ettevalmistamine	11
1.3 Immuunanalüüsi testsüsteem HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks	12
1.4 Kuiva veretäpi proovide elueerimine antikehade tuvastamiseks	12
1.5 Optilise tiheduse piirväärtuse määramine	14
1.6 Statistiline analüüs	14
1.7 HCV RNA eraldamine	14
1.8 HCV RNA tuvastamine ja genotüübi määramine	15
2 Tulemused ja arutelu	16
2.1 HCV-vastaste antikehade tuvastamine kuiva veretäpi proovides	16
2.2 HCV RNA eraldamine DBS-proovidest	22
3 Kokkuvõtte	23
Kasutatud kirjandus	24

Joonised

Joonis 1. Kuiva veretäpi proovi valmistamine laboritingimustes, kasutades Whatman 903 filterpaberit.....	11
Joonis 2. DBS-proovide ettevalmistamise skeem järgnevals HCV-vastaste antikehade analüüsiks.....	13
Joonis 3. ROC-analüüsi visualiseerimise näide	17
Joonis 4. ROC-analüüsi abil piirväärtuse valik HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks 20 µl proovi kasutamisel ELISA reaktsioonis.....	18
Joonis 5. ROC-analüüsi abil piirväärtuse valik HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks 35 µl proovi kasutamisel ELISA reaktsioonis	19
Joonis 6. Kuiva veretäpi proovide optilised tihedused (OD), sõltuvalt eeltöötlemise variatsioonidest ning võetava proovi mahust (20 µl ja 35 µl) ning nende paiknemine vastavalt piirväärtuse arvutamise meetodile.....	20
Joonis 7. DBS proovide valik ja RNA analüüsimeetod ja tulemused	22

Tabelid

Tabel 1. Elueerimispuhvrite ja DBS-i läbimõõtude variatsioonid	13
Tabel 2. Vereseerumi proovide ja kuiva veretäpi proovide erinevate eeltöötlemise variatsioonide ELISA positiivsete tulemuste keskmine optiline tihedus (OD)	16
Tabel 3. Arvutatud piirväärtuste tundlikkus ja spetsiifilisus erinevate kuiva veretäpi töötlemise variantide juures.....	21

Laboratoorne töö

Irina Rešetnjak, Tatjana Kuznetsova, Jelena Jakovleva, Sofia Sidorova, Larissa Starkova, Maris Salekešin ja Sigrīd Vorobjov

Lühendid

CO	<i>Cut-off</i>	Piirväärtus
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Veiseseerumist albumiin
DBS	<i>Dried blood spot</i>	Kuiv veretäpp
EIA	<i>Enzyme immunoassay</i>	Immunoensüümmeetodid (üldistav nimetus)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Immunoensümeetria; ensüümipõhise immunosorbendi analüüsimeetod
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>	C-hepatiidiviirus
NSI	<i>Person who inject drugs (PWID)</i>	Narkootikume süstiv inimene
OD	<i>Optical density</i>	Optiline tihedus
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>	Fosfaatpuhvri soolalahus
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Polümeraas ahel reaktsioon
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>	Vastuvõtja tööomadused, suhtelise toimimise karakteristik
Var. nr		Variatsiooni number
WHO	World Health Organization	Maailma Terviseorganisatsioon

Lühikokkuvõte

Antud uuringu eesmärk oli hinnata C-hepatiidi viiruse vastaste (edasivi HCV-vastaste) antikehade määramise ning viiruse genotüüpimise võimalust kasutades vereseerumi asemel kuiva veretäpi (inglisk *dried blood spot*, DBS) meetodit. Selleks kasutati paralleelselt nii seerumite kui ka kuivade veretäppide proove, mis olid kogutud narkootikumide süstivatelt inimestelt 2020. aasta uuringu raames. Vereseerumiproovide kasutamine HCV-vastaste antikehade ning viiruse määramiseks peetakse nakkuse tuvastamise „kullastandardiks“ ning enamasti antikehade komerts- ehk kaubanduslike tuvastamissüsteemide (nt ELISA) on arendatud just vereseerumitega kasutamiseks. Kuid erinevalt vereproovist on kuiva veretäpi proovi käitlemine vähem nõudlik ning seda on kergem narkootikumide süstivatelt inimestelt koguda. Antud uuringus hinnati komertsiaalse HCV ELISA-testisüsteemi tundlikkust ja spetsiifilisust kuiva veretäpi kasutamisel. Saadud tulemused lubasid valida veretäpi suuruse, proovide eeltöötlemiseks vajalike elueerimispuhvrite optimaalse koostise ja mahu kombinatsiooni, mille juures analüüsitulemused on maksimaalselt võrreldavad „kullastandardiga“ ning mille juures saab DBS samaväärselt kasutada kui vereseerumite jaoks väljatöötatud HCV-vastaste antikehade tuvastamise ELISA-testisüsteemidega.

Uuringu tulemusena tuvastati parim kuiva veretäpi läbimõõdu ning puhverlahuste kombinatsioon: 12 mm täpi läbimõõt, puhverlahusega 300 µl ning ELISA reaktsioonis kasutatud proovi maht 35 µl, juhendi järgi võetava 20 µl asemel HCV antikehade tuvastamisel.

Kuigi HCV RNA tuvastamine ei olnud uuringu põhieesmärk, katsuti DBS-proovidest teostada ka HCV RNA määramist ning genotüüpimist, kasutades samu meetodeid ning sarnast töökäiku nagu ka vereseerumi proovide korral. Kui vereseerumi proovidest tuvastati HCV RNA 139-s 195-st ehk 71,3% proovidest, millest 130 tuvastati HCV-vastaste antikehade positiivsetest vereseerumi proovidest ning 9 anti-HCV negatiivsetest. DBS RNA eraldamine teostati sarnastes tingimustes nagu vereseerumi proovidest, ainult pikendati inkubatsiooni etappi, mis oli liidetud proovi elueerimisega. HCV RNA õnnestus õigesti tuvastada 65% DBS proovidest.

Vereseerumi ja DBS proovidest tuvastatud genotüübid langesid täielikult kokku. Tuvastati kaks HCV genotüüpi 1a ja 1b. 1a genotüübi järjestused on sarnased järjestustega, mida on tuvastatud Ameerikas, Kanadas, Austraalias ja 1b genotüübi järjestused on sarnased järjestustega, mida on tuvastatud Ameerikas, Iisraelis, Šveitsis, Belgias, Iirimaa. Tulemustest järeldub, et DBS proov on sobilik ja piisav materjal ka HCV genotüüpide määramiseks.

Summary

The aim of this study was to evaluate the possibility of determining anti-HCV antibodies and virus genotyping using the dried blood spot (DBS) method instead of blood serum. For this purpose, both serum and dry blood spot samples collected from people who inject drugs as part of the study 2020 were used in parallel. The use of blood serum samples to determine anti-HCV antibodies and the virus itself is considered as the "gold standard" in detecting infection, and most commercial antibody detection systems (e.g., ELISA test systems) have been developed specifically for use with blood sera. However, unlike a blood sample, a dry blood spot sample is less demanding to handle and is easier to collect from people who inject drugs. In this study, the sensitivity and specificity of the commercial HCV ELISA test system were evaluated when using a DBS. The obtained results allowed to choose the optimal combination of the size of the blood spot, the optimal composition and volume of the elution buffers required for the pretreatment of the samples, at which the analysis results are maximally comparable to the "gold standard" and at which the dry blood spot can be equally used in the ELISA test systems for the detection of anti-HCV antibodies developed for blood sera.

As a result of the study, the best combination of dry blood spot diameter and buffer solutions was identified: 12 mm spot diameter, 300 µl of buffer solution and 35 µl of the sample used in the ELISA reaction, instead of the 20 µl taken according to the instructions for detecting HCV antibodies.

Although detection of HCV RNA was not the main aim of the study, the method was also assessed though without additional validation, i.e. following manufacturer's instructions as for serum samples. HCV RNA from blood serum samples was detected in 139 out of 195 samples, of which 130 were detected from anti-HCV positive blood serum samples and 9 from anti-HCV negative blood serum samples. Isolation of DBS RNA was performed under similar conditions to blood serum samples, except for an extended incubation step combined with a sample elution step. In the results, HCV RNA detection was successful in 65% of the DBS samples.

The genotypes detected in the dry blood spot samples completely coincided with the genotypes detected in the same blood serum samples. Two HCV genotypes 1a and 1b had been identified. Genotype 1a sequences are similar to sequences detected in America, Canada, Australia and genotype 1b sequences are similar to sequences detected in America, Israel, Switzerland, Belgium, Ireland. The analysis of the nucleotide sequences of the obtained HCV gene segments showed 100% identity between the samples analyzed in pairs, from which it can be concluded that the dry blood spot sample is a suitable and sufficient material for determining the genotypes of the HCV.

Резюме

Целью данного исследования была оценка возможности определения антител к вирусу гепатита Ц (ВГЦ) и генотипирования вируса при использовании сухой капли крови (СКК) вместо сыворотки крови. Для этой цели параллельно использовались образцы сыворотки и сухой капли крови, взятые у людей, употребляющих инъекционные наркотики, в рамках исследования 2020 года. Использование образцов сыворотки крови для определения анти-ВГЦ-антител и обнаружения самого вируса считается «золотым стандартом» для выявления гепатитной инфекции, и большинство коммерческих систем обнаружения антител (например, тест-система ИФА) разработаны специально для использования с сывороткой крови. Однако, в отличие от образца крови, сухой образец капли крови менее требователен в обращении, и его легче взять у людей, употребляющих инъекционные наркотики. В этом исследовании оценивали чувствительность и специфичность при использовании сухой капли крови в коммерческом ките ИФА. Полученные результаты позволили выбрать оптимальное сочетание размера пятна крови, оптимального состава и объема элюирующих буферов, необходимых для предварительной обработки образцов, при котором результаты анализа максимально сопоставимы с «золотым стандартом» и при котором СКК можно в равной степени использовать в тест-системах для выявления антител к ВГЦ, разработанных для сывороток крови.

В результате исследования выявлено наилучшее сочетание диаметра СКК и буферного раствора: диаметр пятна 12 мм, 300 мкл буферного раствора и 35 мкл пробы, используемой в реакции ИФА, вместо 20 мкл, требующихся по инструкции тест-системы.

Хотя обнаружение РНК ВГЦ не являлось основной целью исследования, метод также проверялся на совместимость с использованием СКК. РНК из образцов сыворотки крови была обнаружена в 139 из 195 образцов, из которых 130 была обнаружена из анти-ВГЦ-положительных и 9 из анти-ВГЦ-негативных образцов сывороток крови. Выделение РНК из СКК проводили в условиях, аналогичных условиям выделения из сывороток крови, за исключением удлинённой стадии инкубации, объединённой со

стадией «размачивания» СКК образца. В результате обнаружение РНК было успешным в 65% образцов сухих капель крови.

Генотипы, выявленные в образцах сыворотки крови и СКК, полностью совпали. Было выявлено 2 группы ВГЦ: 1a и 1b. Полученные нуклеотидные последовательности генотипа 1a аналогичны последовательностям из Америки, Канады, Австралии, а последовательности генотипа 1b аналогичны последовательностям из Америки, Израиля, Швейцарии, Бельгии, Ирландии. Анализ нуклеотидных последовательностей полученных участков ВГЦ показал 100% идентичность между парными образцами, из чего можно сделать вывод, что СКК является подходящим и достаточным материалом для определения генотипов вируса гепатита Ц.

Sissejuhatus ja taust

Paljude nakkushaiguste uuringuteks, näiteks antikehade, antigeenide või nakkustekitaja otseseks tuvastamiseks, kasutatakse enamasti patsiendi või uuritava veenist võetud vereproovi, millest sõltuvalt uurimismetoodikast kasutatakse kas täisverd, vereseerumit või vereplasmata. Kuid on juhtumeid, kui vereproovi võtmine veenidest on raskendatud. Näiteks inimestel, kes tarvitavad narkootilisi aineid süstimise teel ehk NSI-del, kuna nende veenid on sageli kehavad, mis teeb verevõtmise protsessi raskemaks. Kuiva veretäpi meetod (ing k *dried blood spot*, DBS) on alternatiivne verekogumise meetod, mis võimaldab koguda vereproove piiratud võimalustega tingimustes, kui näiteks nõutav (meditsiini) personal, ruumid või transpordivõimalused on puudulikud. DBS-proovideks võetakse verd sõrmeotsast, mitte veenist, ning protseduuri tegemiseks ei nõuta tervishoiutöötajat. Samuti, DBS-proov nõuab palju väiksemaid veremahtusid võrreldes verevõtmisega veenist (alla 1 ml vs. 2–10 ml). Lisaks, kogutud DBS-proove ei pea tsentrifuugima, neid saab säilitada kuni 2 nädalat toatemperatuuril või pikemat aega –80 C juures külmutatuna ning neid saab ka transportida ilma jahutusega [1–5].

Kuiva veretäpi proove on juba kasutatud mitmetes haigustekitajate uuringutes, näiteks HIV, inimese B- ja C-hepatiidi, herpes ja dengue viiruse vastaste antikehade või viiruse tuvastamiseks immunokromatograafiliste ribad (*line-blot*), ELISA- ja PCR-analüüside abil [6]. Enamik immunoloogilisi ja molekulaarseid nakkushaiguste tuvastamise meetodeid põhineb ja on standarditud kui katsematerjalina kasutatakse vereseerumit või -plasmata, DBS-proovide samaväärseks kasutamiseks tuleb igat meetodit eelnevalt valideerida kasutusel olevates laboritingimustes [7, 8].

Varasemalt on juba kirjeldatud DBS-proovide kasutamine HCV-vastaste antikehade määramiseks erinevate EIA-komplektide (ing k *kit*) kasutamisel, mida iseloomustab komplektide tundlikkuse ja spetsiifilisuse määr [8–11]. TAI VIO laboris kasutatava HCV-vastaste antikehade tuvastamise ELISA-testsüsteemi tootja ei ole uurinud võimalust kasutada DBS-proove, kuigi on olemas sama tootja uuring anti-HBV ehk inimese B-hepatiidi vastaste markerite määramiseks DBS-proovidest [12].

Lisaks sellele, et laboriseadmete turul on olemas erinevate tootjate väljatöötatud testsüsteemid nakkushaiguste markerite määramiseks erinevatest proovidest, on ka teaduspublikatsioonides kirjeldatud erinevaid DBS-proovide ettevalmistamise ja eeltöötlemise tingimusi, mis eelnevad analüüsi läbiviimisele. On kirjeldatud erinevate DBS-proovi suuruste kasutamist, samuti proovi lahustamiseks vajaliku puhvrilahuse koostist ja mahtu. Lisaks erinevale töötlusele on valminud DBS-proovide kasutamisel analüüside tulemuste tõlgendamise juhiseid.

On näidatud, et veres sisalduv viiruse hulk ehk viiruskoormus, samas ka antikehade kontsentratsioon, on sõrmest võetud kapillaarveres ning veenist võetud vereproovis sama [13, 14]. Sellele tuginedes võeti uuritavatelt täisvereproovid veenist, millest laboritingimustes valmistati DBS-proovid ja vereseerumi proovid. Tuginedes nendele teadmistele kasutati DBS-proovide kasutamise parema protokolliga väljatöötamiseks veenist võetud vereproovi, millest laboritingimustes tehti DBS-proov ning paralleelseks uurimiseks eraldati samast proovist ka vereseerum, et tulemused oleksid usaldusväärselt võrreldavad.

Eestis on DBS-proove kasutatud juba HIV määramiseks [15]. DBS-meetodi kasutamine võimaldab laiendada nii uuringute sihtrühmi kui ka uuringutesse kaasatud inimeste arvu mitte ainult teatud riskirühmades, vaid ka rahvastiku-uuringutes üldelanikkonna seas. See võimaldab kasutada kodutestimise põhimõtet – inimene saab ise võtta sõrmest vereproovi mugavates kodutingimustes ja saata selle laborisse. Näiteks on sellist lähenemist kasutatud Prantsusmaal [16].

Projekti eesmärgid

Käesoleva projekti eesmärk oli välja selgitada HCV-vastaste antikehade ja viiruse tuvastamise ning selle genotüüpimise võimalikkus DBS-proovides ning võrrelda saadud tulemusi vereseerumiproovide vastavate tulemustega. Selleks, et leida sobiva DBS-proovi töötlemistingimuste kombinatsioon, teostati paralleelseid katseid DBS-proovide, et hinnata HCV antikehade tuvastamise analüüsi tundlikkust ja spetsiifilisust võrreldes neid vereseerumiproovide standarditud ELISA-testi tulemustega. Võrreldavad töötlemistingimused olid veretäpi suurus, eeltöötlemiseks/proovi lahustamiseks vajaliku puhverlahuse koostise ja mahu kombinatsioon ning piirväärtuse ehk positiivse tulemuse arvutamise meetod.

1 Metoodika

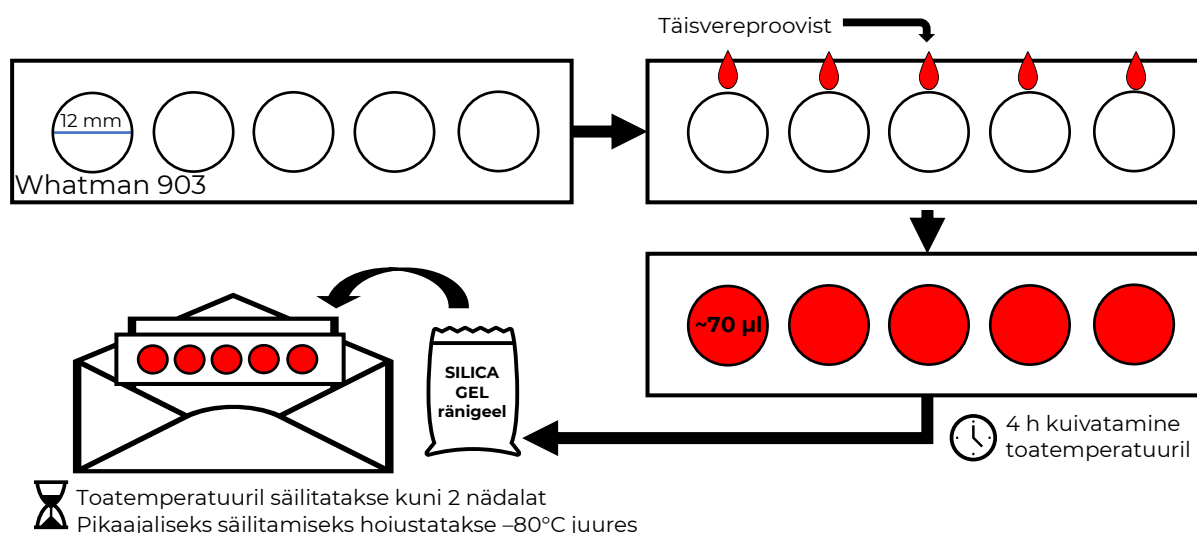
1.1 Vere kogumine

Vereproovide kogumine toimus 2020. aastal Tervise Arengu Instituudi uimastite ja nakkushaiguste epidemioloogia osakonna läbi viidud narkootikume süstivate inimeste riskikäitumise ning HIV ja HCV serolevimuse uuringu raames Kohtla-Järvel [17]. NSI-delt koguti veeniveri kahte BD Vacutaineri vaakumkatsutisse, vastavalt koagulandiga ja ilma.

Seerumi saamiseks tsentrifuugiti antikoagulandita katsuteid toatemperatuuril ning seejärel eraldati seerum uude katsutisse ja sügavkülmutati hoiustamiseks -80°C juures. Antikoagulandiga täisverega katsutid hoiustati -80°C juures tsentrifuugimata kujul ja neid kasutati hiljem DBS-proovide valmistamiseks.

1.2 Kuiva veretäpi proovide ettevalmistamine

DBS-proovid valmistati täisvereproovist, kasutades selleks spetsiifilist veretäppide jaoks ettenähtud filterpaberi Whatman 903 kaarte (Cytiva, Ameerika Ühendriigid), mille peal on eelprinditud 12 mm läbimõõduga viis ringi. Kasutades ühekordse otsikuga laboripipetti, kanti täisvereprooviga katsutist kaardi igale ringile veretäpp, ligikaudu 70 μl verd iga täpi jaoks. Igast täisvereproovist valmistati kolm DBS-prooviga täidetud kaarti. Täpitud verega kaarte kuivatati lahtisel kujul kaitstud kohas toatemperatuuril 4 tunni jooksul. Seejärel asetati kuivanud proovidega kaardid paakumisvastaste ränigeeli kotikestega varustatud lukuga fooliumkottidesse ja hoiti toatemperatuuril ühe nädala jooksul. Pikaajaliseks hoiustamiseks paigutati kaartidega fooliumkotid -80°C juurde sügavkülma (Joonis 1) [11, 14, 18, 19].



Joonis 1. Kuiva veretäpi proovi valmistamine laboritingimustes, kasutades Whatman 903 filterpaberit

1.3 Immuunanalüüsi testsüsteem HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks

Immuunanalüüsid HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks teostati, kasutades kaubanduslikku ELISA-testsüsteemi Murex Anti-HCV, v. 4 (DiaSorin, Lõuna-Aafrika Vabariik). Antud testsüsteem on Maailma Terviseorganisatsiooni eelkvalifitseeritud *in vitro* diagnostikatoodete nimekirjas HCV-diagnostika kasutamiseks ning omab vastavussertifikaati laboratoorseks diagnoosimiseks [20]. Selle ettekirjutatud hinnanguline tundlikkus seerumiproovide kasutamisel on >99%.

Vereseerumi proove analüüsiti HCV-vastaste antikehade olemasolu suhtes vastavalt tootja juhendile. Kõiki DBS-proove analüüsiti eelpool mainitud testsüsteemi abil kaks korda: 1) kasutades 20 µl proovi vastavalt tootja juhendile ning 2) modifitseeritud kujul, mille järgi analüüsimiseks võetud proovi kogust suurendati 35 µl-ni. Muud analüüsi läbiviimise etapid teostati vastavalt tootja juhendile.

1.4 Kuiva veretäpi proovide elueerimine antikehade tuvastamiseks

Selleks, et hinnata DBS-proovide kasutamise võimalust ELISA-testsüsteemis varem publitseeritud tööde alusel [7, 8, 9, 12, 16, 21–27], valiti erinevad proovide eeltöötlemise variatsioonid (Tabel 1), mis erinesid veretäppide suuruse ning elueerimispuhvrite koostise ja mahu poolest:

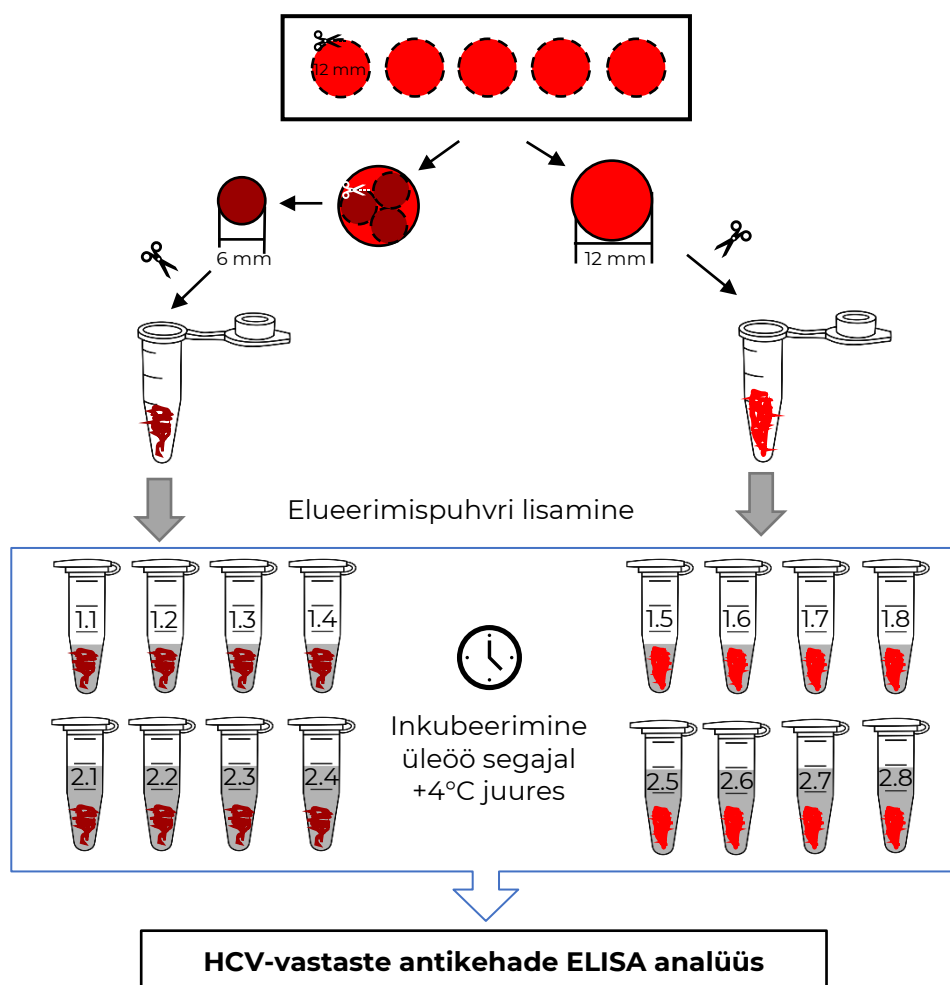
1. Analüüsimiseks võetud DBS-ringi läbimõõt: 6 mm või 12 mm;
2. Elueerimispuhvri koostis:
 - 2.1. fosfaatpuhvri soolalahus (ing k *phosphate-buffered saline*, PBS, pH = 7,2);
 - 2.2. PBS + 0,5% veiseseerumist albumiini (ing k *bovine serum albumin*, BSA);
 - 2.3. PBS + 5% BSA + 0,2% Tween 20;
 - 2.4. PBS + 0,2% Tween 20 + 0,005% naatriumasiid (NaN_3);
3. Elueerimispuhvri maht (300 µl või 700 µl).

Kõik puhvrid valmistati Tervise Arengu Instituudi viroloogia ja immunoloogia osakonnas.

12 mm läbimõõduga proovid lõigati välja steriilsete kääridega eeljoonistatud ringi järgi ja 6 mm proovid lõigati Harris Uni-Core I.D. 6.0 mm (Merck, USA) lõikamisriista abil. Selleks, et DBS-prooviga paberitükid 1,5 ml mikrokatsutis oleksid täielikult kaetud elueerimispuhvriga, lõigati need väiksemateks tükkideks. Mikrokatsutid paigutati orbitaalsele segajale ning asetati üleöö inkubeerima +4°C juures (Joonis 2). Pärast inkubeerimist mikrokatsutid tsentrifuugiti toatemperatuuril 10 minuti jooksul 2200 x g juures, ning ülemine eraldatud vedelikukiht viidi üle uude 1,5 ml mikrotuubi, mida kasutati seejärel HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks.

Tabel 1. Elueerimispuhvrite ja DBS-i läbimõõtude variatsioonid

Var. nr	Kuiva veretäpi proovi suurus ja elueerimispuhvri koostis	Var. nr	Kuiva veretäpi proovi suurus ja elueerimispuhvri koostis
1.1	6 mm DBS ring + 300 µl PBS	2.1	6 mm DBS ring + 700 µl PBS
1.2	6 mm DBS ring + 300 µl PBS + 0,5% BSA	2.2	6 mm DBS ring + 700 µl PBS + 0,5% BSA
1.3	6 mm DBS ring + 300 µl PBS + 5% BSA + 0,2% Tween 20	2.3	6 mm DBS ring + 700 µl PBS + 5% BSA + 0,2% Tween 20
1.4	6 mm DBS ring + 300 µl PBS + 0,2% Tween 20 + 0,005% NaN ₃	2.4	6 mm DBS ring + 700 µl PBS + 0,2% Tween 20 + 0,005% NaN ₃
1.5	12 mm DBS ring + 300 µl PBS	2.5	12 mm DBS ring + 700 µl PBS
1.6	12 mm DBS ring + 300 µl PBS + 0,5% BSA	2.6	12 mm DBS ring + 700 µl PBS + 0,5% BSA
1.7	12 mm DBS ring + 300 µl PBS + 5% BSA + 0,2% Tween 20	2.7	12 mm DBS ring + 700 µl PBS + 5% BSA + 0,2% Tween 20
1.8	12 mm DBS ring + 300 µl PBS + 0,2% Tween 20 + 0,005% NaN ₃	2.8	12 mm DBS ring + 700 µl PBS + 0,2% Tween 20 + 0,005% NaN ₃



Joonis 2. DBS-proovide ettevalmistamise skeem järgnevas HCV-vastaste antikehade analüüsimiseks

1.5 Optilise tiheduse piirväärtuse määramine

Iga ELISA-analüüsi kvaliteedi hindamiseks ja tulemuste tõlgendamiseks tuleb arvestada nn piirväärtusega. Kuna ELISA-testi tulemused loetakse proovide optilise tiheduse järgi, siis piirväärtus (ing k *cut-off*, CO) on selline optilise tiheduse (ing k *optical density*, OD) väärtus, millest suurem tulemuse korral loetakse analüüsitud proov positiivseks. ELISA-testsüsteemides lähtutakse tavaliselt vereseerumite proovide kasutamisel iga testsüsteemi tootja juhistest.

Kuiva veretäpi proovide jaoks aga puuduvad standardsed juhised piirväärtuste arvutamiseks, kuna kasutatud testsüsteem on välja töötatud ja sertifitseeritud vereseerumite analüüsimiseks.

Et antud uuringus kasutatud süsteemi oleks võimalik kohandada DBS-proovide kasutamiseks, tuleb leida sobilik piirväärtuse arvutamise meetod. Selleks valiti teadusartiklitele [8, 16, 23, 24, 26, 28-31] tuginedes kolm erinevat meetodit:

1. kasutades tootja juhises toodud arvutusjuhised (edaspidi CO1);
2. kasutades kõikide vereseerumnegatiivsete proovide arvutatud keskmist OD väärtust pluss kolmekordne standardhälve (edaspidi CO2; $CO2 = OD_{neg\ kesk} + 3SD$);
3. kasutades ROC (ing k *receiver operating characteristic*) kõvera analüüsi (edaspidi CO3).

1.6 Statistiline analüüs

Seerumiproovide testitulemusi kasutati „kullastandardina“ ehk HCV-vastaste antikehade tuvastamisel loeti positiivsed seerumiproovid nn „tõeliselt positiivseks“ (ing k *true positive*), ning eeldati, et vastavad DBS-proovid peavad olema samuti positiivsed. Vereseerumi proovid, mis osutusid HCV antikehade suhtes negatiivseks, loeti „tõeliselt negatiivseks“ (ing k *true negative*) ning vastavalt pidid samad DBS-proovid olema samuti negatiivsed.

Nakkushaiguste diagnostiliste testide kõige tähtsamad parameetrid on tundlikkus ja spetsiifilisus. Selleks, et hinnata DBS-proovide abil tehtud immuunanalüüsi tundlikkust ja spetsiifilisust, viidi läbi ka saadud tulemuste statistiline analüüs, milles võrreldi kõiki paarisproovide (ehk nii vereseerumi kui ka vastava DBS-proovi) OD väärtuseid omavahel, kasutades GraphPadPrism8, Microsoft Office Exceli statistikatarkvara ja Rstudio («cutpointr» pakett, maximize_metric parameetri kasutusel). Tundlikkus ehk tõeliselt positiivsete tulemuste määr (ing k *true positive rate*) näitab, kui hästi test suudab tuvastada tõeliselt positiivseid tulemusi ning välistada valenegatiivsust – mida vähem on valenegatiivseid tulemusi, seda kõrgem on tundlikkus. Arvutatakse: õige positiivsete tulemuste arv jagatud õige positiivsete ja vale negatiivsete tulemuste arvude summaga. Spetsiifilisus ehk tõeliselt negatiivsete tulemuste määr (ing k *true negative rate*) näitab, kui hästi test suudab tuvastada tõelisi negatiivseid ning välistada valepositiivsust – mida vähem on valepositiivseid, seda kõrgem on spetsiifilisus. Arvutatakse: õige negatiivsete tulemuste arv jagatud õige negatiivsete ja vale positiivsete tulemuste arvude summaga.

1.7 HCV RNA eraldamine

HCV RNA-d eraldati paralleelselt samadest proovidest – nii vereseerumi kui ka DBS-proovidest (paaris seerum/DBS-proov), kasutades QIAamp RNA minikomplekti (QIAGEN, Saksamaa). Seerumiproovidest eraldati RNA vastavalt tootja juhendile. HCV RNA eraldamiseks DBS-proovidest kasutati 12 mm läbimõõduga täppe ning eraldamise protokoll oli modifitseeritud lüüsimisaja pikendamisega kuni 1 tunnini, kuna DBS-proovi on raskem lüüsida (kuna on vaja ka lahustada) [32, 33].

1.8 HCV RNA tuvastamine ja genotüübi määramine

Selleks, et määrata HCV genotüüpi, kasutati polümeraasahelreaktsiooni (PCR), mis on sihitud 335 nukleotiidi pikkuse NS5B-piirkonna paljundamisele. Mainitud piirkond on laialdaselt kasutatud HCV genotüübi määramiseks ning on kasutusel ka TAI VIO laboris [34]. Peale PCR-i tulemuse visualiseerimist geelelektroforeesi abil, saadeti positiivsed paaris seerum/DBS PCR-proovid sekveneerimisele Eesti Biokeskusesse ning saadud tulemused analüüsiti BioEdit v7.2.6 tarkvara ja BlastN veebitarkvara abil. Analüüsitud järjestuse järgi määrati HCV genotüüp.

2 Tulemused ja arutelu

2.1 HCV-vastaste antikehade tuvastamine kuiva veretäpi proovides

DBS-proovide valmistamiseks kasutati kokku 195 täisvereproovi ning vastavaid seerumiproove analüüsiti samuti HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks. Nendest vereseerumitest 82,6% ehk 161 proovi andsid positiivse tulemuse ning ülejäänud 17,4% ehk 34 proovi andsid negatiivse tulemuse. Vereseerumite tulemusi kasutati hiljem DBS-proovide tulemuste võrdlusanalüüsiks, et tuvastada millised DBS-proovide eeltöötlingimused on paremad ning millise meetodi abil arvatud piirväärtus annab kõige tundlikumad ja spetsiifilisemad ELISA-testi tulemused.

Peamine leid DBS-proovide ettevalmistamise tingimuste valimisel HCV-vastaste antikehade analüüsiks on kuiva veretäpi suurema läbimõõdu kasutamine koos väiksema lahustuspuhvri mahuga. Selles uuringus olid vereseerumiproovide keskmised OD väärtused kõige paremini kooskõlas DBS-proovide tulemustega (ANOVA testi järgi $p > 0,05$, ehk statistiliselt erinevused on mitteolulised), kasutades täpi läbimõõtu 12 mm ja puhvri mahtu 300 μ l (var. nr 1.5-1.8, vt Tabel 1). Kuid puhvri enda koostise mõju neljast uuritud variatsioonist ja analüüsiks lisatud lahustunud proovi mahust (20 μ l või 35 μ l) ei olnud OD-le nii ilmne (ANOVA testi järgi $p > 0,05$) (Tabel 2).

Tabel 2. Vereseerumi proovide ja kuiva veretäpi proovide erinevate eeltöötlemise variatsioonide ELISA tulemuste keskmine optiline tihedus (OD)

Vereseerumi proovide keskmine OD	DBS-proovide keskmine OD							
4,046	1.1_20*	1.2_20	1.3_20	1.4_20	1.5_20	1.6_20	1.7_20	1.8_20
	2,493	2,385	2,757	2,306	3,356	3,513	3,660	3,521
	2.1_20	2.2_20	2.3_20	2.4_20	2.5_20	2.6_20	2.7_20	2.8_20
	1,678	1,623	1,709	1,547	2,388	2,449	2,905	2,727
	1.1_35	1.2_35	1.3_35	1.4_35	1.5_35	1.6_35	1.7_35	1.8_35
	3,127	2,981	3,096	2,896	3,644	3,608	3,735	3,720
	2.1_35	2.2_35	2.3_35	2.4_35	2.5_35	2.6_35	2.7_35	2.8_35
	2,339	2,230	2,124	2,175	3,021	3,044	3,208	3,342

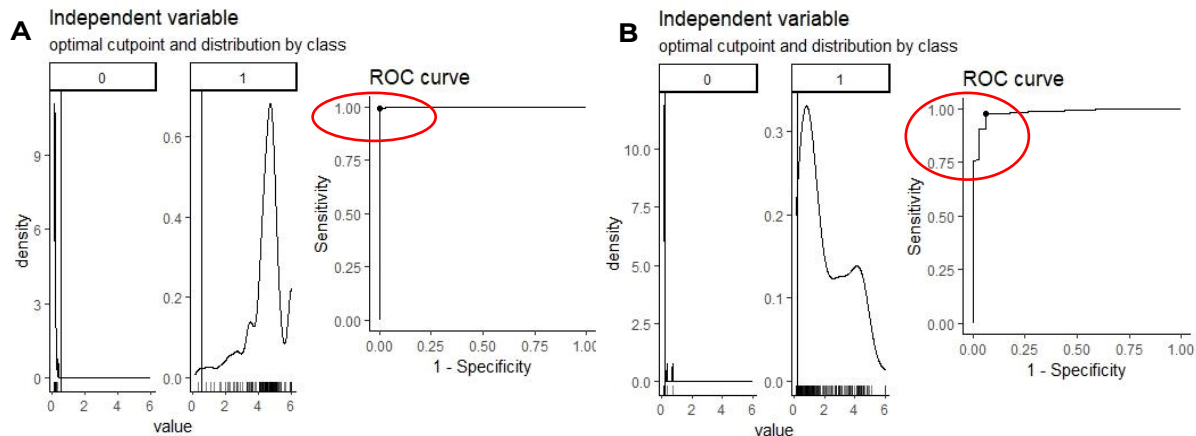
*Eeltöötlemise variatsiooni number (Tabel 1), allkriipsu järgnev number (20 või 35) on ELISA analüüsiks võetud proovide maht mikrolitrites

Piirväärtuste arvutamise viis testsüsteemi juhendi järgi (ehk CO1) põhineb negatiivsete kontrollide optilise tiheduse näitajatel ELISA teostamise jooksul, võttes arvesse iga reaktsiooni plaati eraldi. Kuna DBS-proovide optilise tiheduse näitajad osutusid seerumite näitajatest väiksemaks (Tabel 2), ei sobi CO1 piirväärtuste arvutamise meetod DBS-proovide tulemuste tõlgendamiseks: kuigi saavutatud spetsiifilisus oli 100%, oli tundlikkus võrreldes seerumiproovide näitajatega madalam ehk oli suur valenegatiivsete arv (Tabel 3).

CO2-meetod põhineb kõikide negatiivsete proovide keskmisel optilisel tihedusel, millele lisandub kolmekordne standarthalve. See võimaldab täpsemini arvutada piirväärtuse analüüsitud proovide realselt saadud tulemuste alusel, kuna arvestatakse suuremat hulka negatiivseid proove (võrreldes CO1-arvutusega). Samuti võimaldab lisanduv standarthalve

laiendada piirväärtuse alla jäävat tsooni, ehk suurendab positiivsena ja negatiivsena tõlgendatud proovide tulemuste vaheala, kus võivad paikneda ebaselge tulemusega proovid.

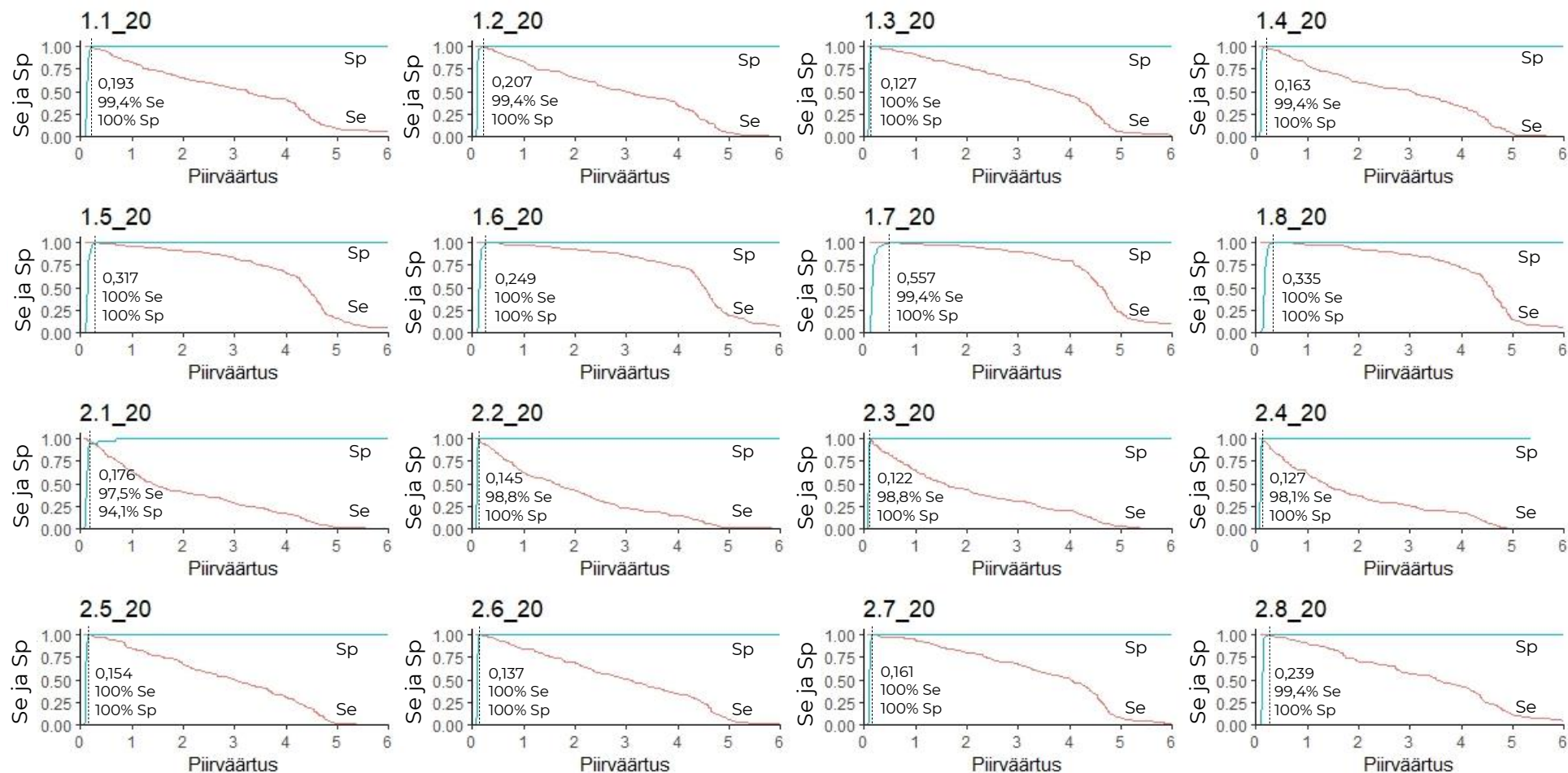
CO3-meetod nõuab statistika alustadmisi ning ROC-analüüsi võimaldavat statistikatarkvara. ROC-analüüs kujutab endast diagnostilise meetodi tundlikkuse ja spetsiifilisuse graafilist kujutamist (Joonis 3). Optimaalseks loetakse selline CO-väärtus, mille juures on tagatud kõrgemad tundlikkuse ja spetsiifilisuse näitajad (Joonis 4, **5Error! Reference source not found.**). Nagu CO2 arvutamine, nõuab ka CO3 arvutamine ROC-analüüsi abil piisavalt suurt algandmete valimit, mis tagab võrreldes CO1-ga meetodi suurema usaldusväärsuse.



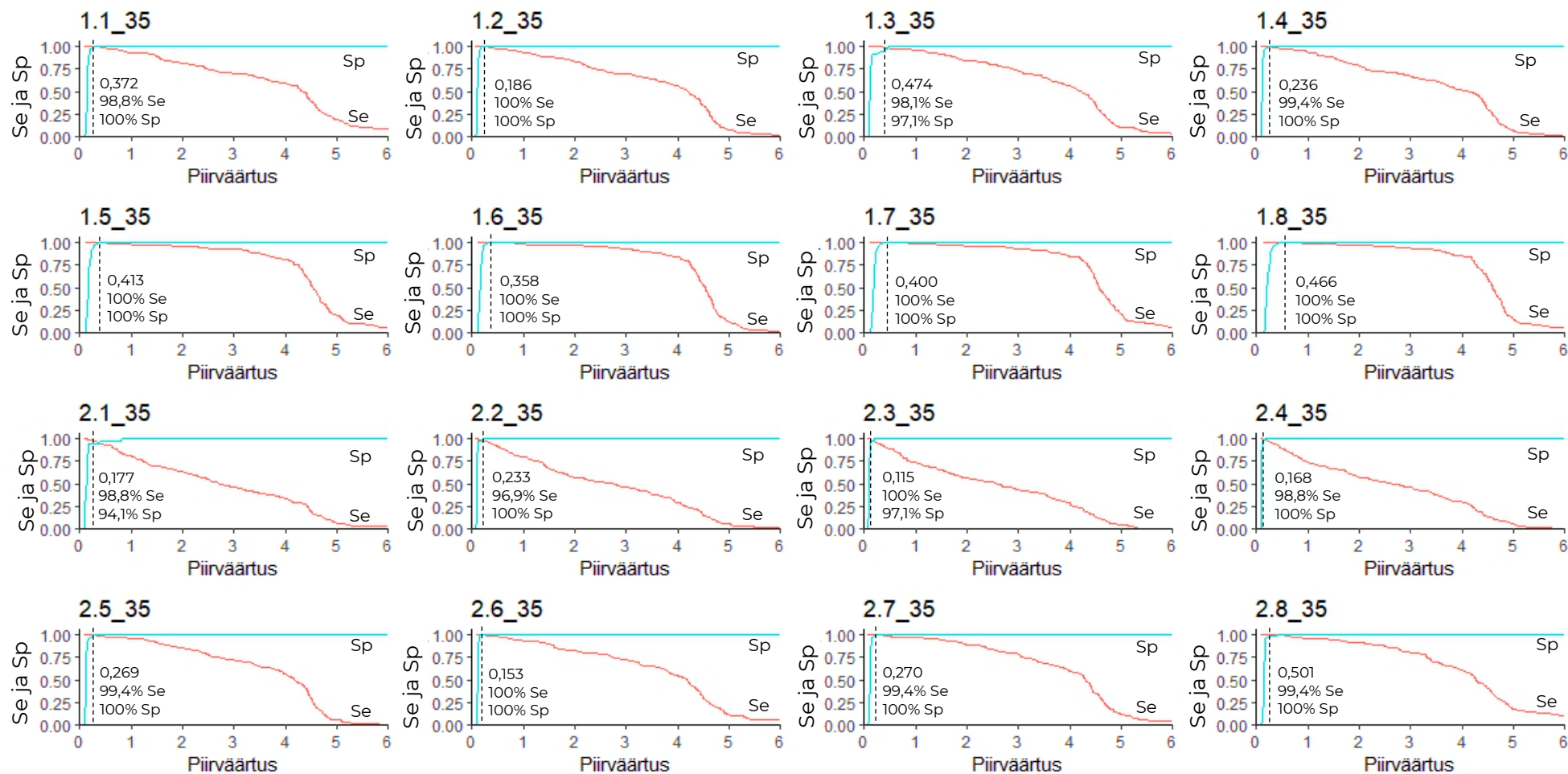
Joonis 3. ROC-analüüsi visualiseerimise näide. **A** – üks parimatest tulemustest variatsiooni 1.7_20 näitel ja **B** – kehvema tulemuse kombinatsioon 2.1_20 näitel. Parimate kriteeriumite valimisel peab ROC kõveral olema saavutatud maksimaalne tundlikkus (Y-teljel) maksimaalse spetsiifilisuse juures (X teljel)(joonistel punasega märgitud ala)

CO2 ja CO3 piirväärtuste arvutamise meetodid, võrreldes CO1 meetodi arvutamisega, annavad piirväärtuse, mille juures tulemused on kõrgema tundlikkusega (Tabel 3, Joonis 6). Kuigi mõningates variatsioonides arvutatud piirväärtuse juures spetsiifilisus vastupidi langeb (Tabel 3, Joonis 6). CO3-meetodiga arvutatud piirväärtused näitasid kõige kõrgema tundlikkusega tulemusi. Kõige lähedasemat CO2 ja CO3 piirväärtust ning 100%-list tundlikkust ja spetsiifilisust näitasid variatsioonid 2.5_20, 2.6_20 ja 2.6_35 (Tabel 1, 3). Suuremat CO2 ja CO3 piirväärtuste erinevust, kuid samuti 100%-list tundlikkust ja spetsiifilisust näitasid DBS-proovide ettevalmistamise variatsioonid 1.5_20, 1.8_20, 1.5–1.8_35 (Tabel 1, 3). Seega on ELISA-testi kasutamisel CO2 ja CO3 piirväärtuse arvutusmeetodid kõige sobilikumad DBS-proovide analüüsimisel (Joonis 6).

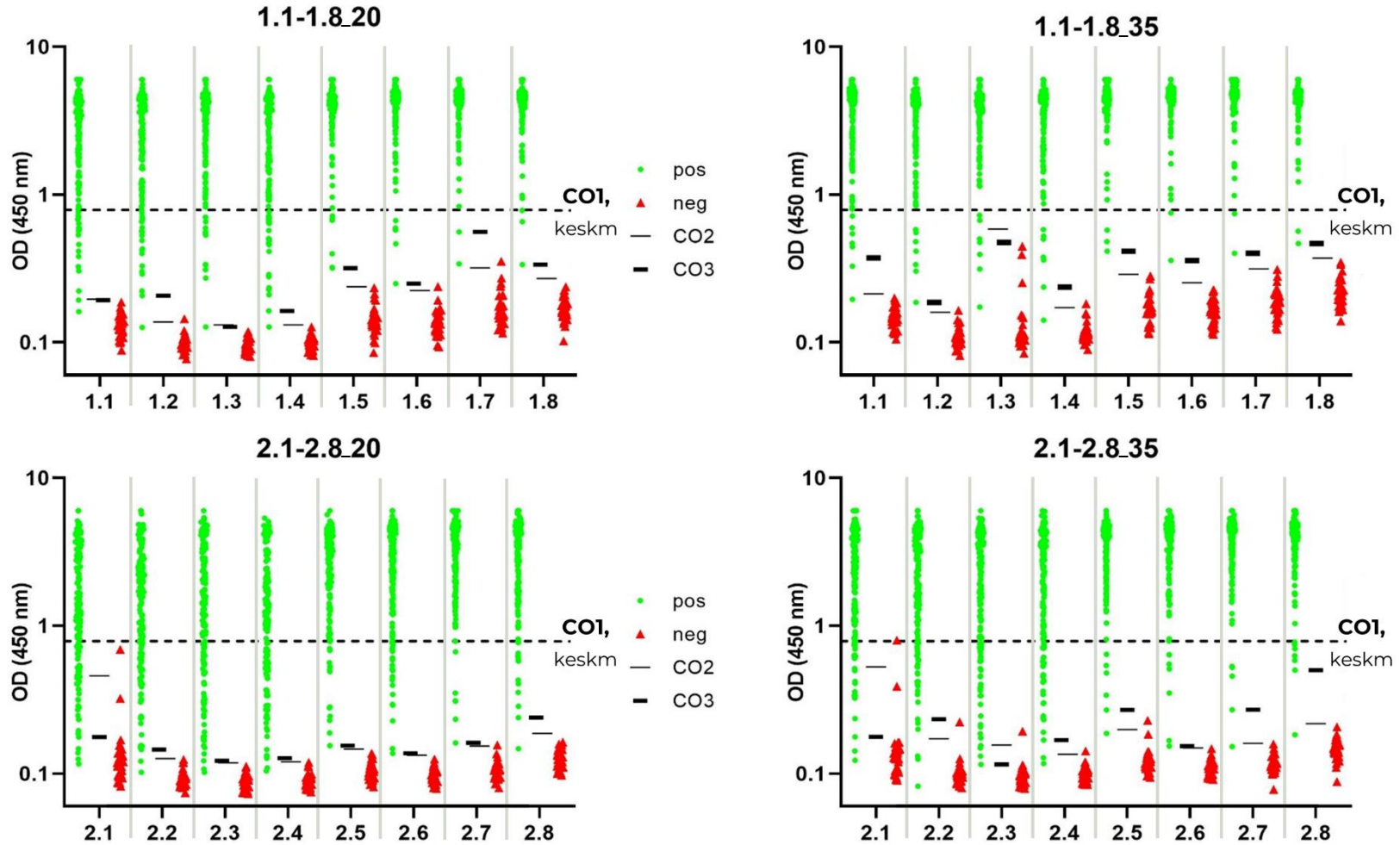
Seega, antud töö näitab, et DBS-proove võib samaväärselt kasutada HCV antikehade määramiseks NSI-tel. Samas tuleb rõhutada, et iga analüüsi teostav labor peab enda tingimustes ning vastavalt enda kasutatud ELISA-süsteemile, kui see ei ole ette nähtud DBS-proovidele, viima läbi meetodi valideerimise, kasutades käesolevas töös kirjeldatud CO2 ja CO3 arvutamise meetodeid. TAI VIO laboritingimustes sobivad NSI-telt saadud DBS-proovid kasutamiseks Murex Anti-HCV, v. 4 (DiaSorin, Lõuna-Aafrika Vabariik) ELISA-testsüsteemi abil HCV-vastaste antikehade määramiseks, kasutades DBS-proovi mõnda eeltötlusvariatsiooni: 1.8_20 või 1.5–1.8_35 (Tabel 1, 3).



Joonis 4. ROC-analüüsi abil piirväärtuse valik HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks 20 µl proovi kasutamisel ELISA reaktsioonis. Tundlikkuse (Se, punane joon) ja spetsiifilisuse (Sp, sinine joon) näitajad erinevate piirväärtuste korral. Vertikaalse punktiirjoonega on näidatud ROC-analüüsist tulenev valitud piirväärtuse väärtus (Tabel 3), mille juures tundlikkuse ja spetsiifilisuse summa on maksimaalne



Joonis 5. ROC-analüüsi abil piirväärtuse valik HCV-vastaste antikehade tuvastamiseks 35 µl proovi kasutamisel ELISA reaktsioonis. Tundlikkuse (Se, punane joon) ja spetsiifilisuse (Sp, sinine joon) näit erinevate piirväärtuste korral. Vertikaalse punktiirjoonega on näidatud ROC-analüüsist tulenev valitud piirväärtuse väärtus (Tabel 3), mille juures tundlikkuse ja spetsiifilisuse summa on maksimaalne



Joonis 6. Kuiva veretäpi proovide optilised tihedused (OD), sõltuvalt eeltöötlemise variatsioonidest ning võetava proovi mahust (20 µl ja 35 µl) ning nende paiknemine vastavalt piirväärtuse arvutamise meetodile. Positiivseks (pos, rohelised täpid) ja negatiivseks (neg, punased kolmnurgad) on tähistatud samade seerumiproovide ELISA-tulemuste alusel. CO1, CO2 ja CO3 piirväärtuste näitajate kohal asuvad proovitulemused peavad olema positiivsed antud piirväärtuse juures ning piirväärtusest allapoole peavad jääma negatiivsed. Optimaalse piirväärtuse valiku puhul peab sellest kõrgemale paigutama minimaalselt negatiivseid ja allapoole minimaalselt positiivseid proove

Tabel 3. Arvutatud piirväärtuste tundlikkus ja spetsiifilisus erinevate kuiva veretäpi töötlemise variantide juures

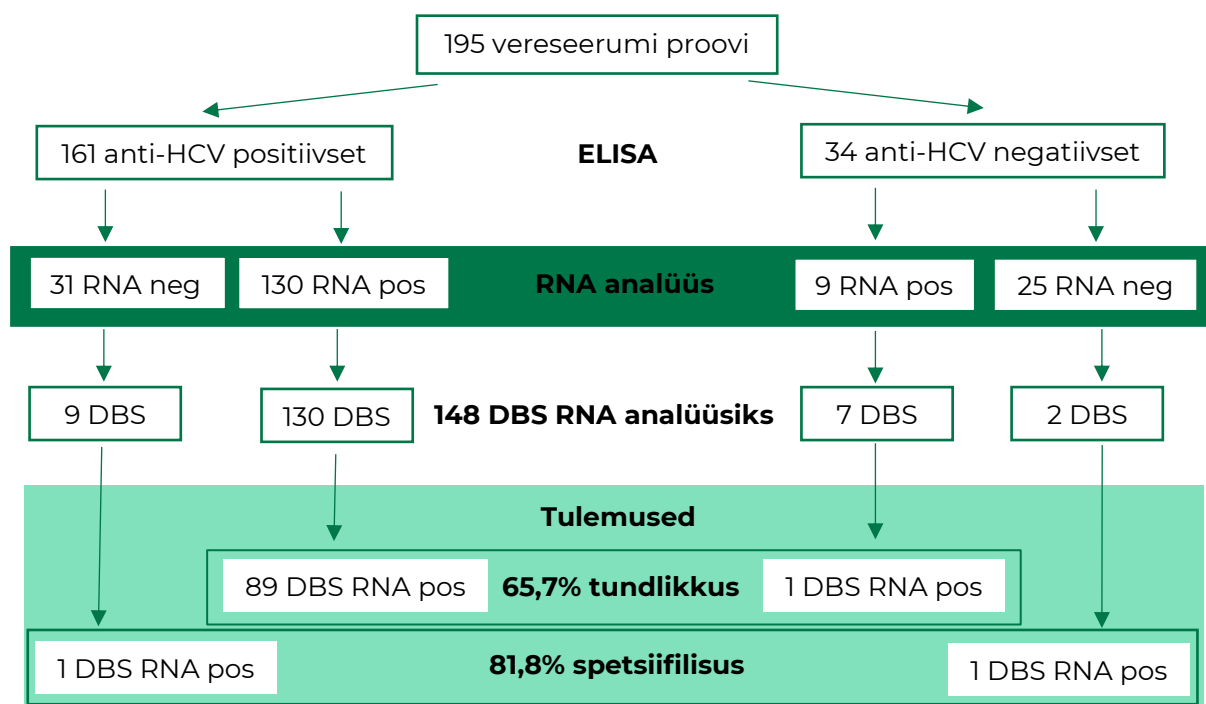
	Var. nr	1.1_20	1.2_20	1.3_20	1.4_20	1.5_20	1.6_20	1.7_20	1.8_20	1.1_35	1.2_35	1.3_35	1.4_35	1.5_35	1.6_35	1.7_35	1.8_35
CO1	Tundlikkus	86,3%	87,0%	93,2%	84,5%	96,3%	96,9%	98,8%	98,8%	95,0%	95,7%	95,7%	95,7%	98,1%	98,8%	98,8%	98,8%
	95% CI*	80,1-91,2	80,8-91,7	88,1-96,5	77,9-89,7	92,1-98,6	92,1-98,6	95,6-99,8	95,6-99,8	90,4-97,8	91,2-98,2	91,2-98,2	91,2-98,2	94,7-99,6	95,6-99,8	95,6-99,8	95,6-99,8
	Spetsiifilisus	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100
CO2	Cut-off, nm	0,196	0,137	0,131	0,131	0,239	0,224	0,319	0,270	0,213	0,160	0,583	0,172	0,288	0,253	0,313	0,371
	Tundlikkus	98,8%	99,4%	99,4%	99,4%	100%	100%	100%	100%	99,4%	100%	96,9%	99,4%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	95,6-99,8	96,6-100	96,6-100	96,6-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100	96,6-100	97,7-100	92,1-98,6	96,6-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100
	Spetsiifilisus	100%	97,1%	100%	100%	100%	97,1%	97,1%	100%	100%	97,1%	97,1%	97,1%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	92,9-100	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100	84,7-99,9	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	84,7-99,9	84,7-99,9	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100
CO3	Cut-off, nm	0,193	0,207	0,127	0,163	0,317	0,249	0,557	0,335	0,372	0,186	0,474	0,236	0,413	0,358	0,400	0,466
	Tundlikkus	99,4%	99,4%	100%	99,4%	100%	100%	99,4%	100%	98,8%	100%	98,1%	99,4%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	96,6-100	96,6-100	98,5-100	96,6-100	97,7-100	97,7-100	96,6-100	98,5-100	95,6-99,8	97,7-100	94,7-99,6	96,6-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100	97,7-100
	Spetsiifilisus	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	97,1%	100%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100
	Var. nr	2.1_20	2.2_20	2.3_20	2.4_20	2.5_20	2.6_20	2.7_20	2.8_20	2.1_35	2.2_35	2.3_35	2.4_35	2.5_35	2.6_35	2.7_35	2.8_35
CO1	Tundlikkus	72,7%	71,4%	71,4%	66,5%	91,9%	87,6%	95,7%	91,9%	83,9%	82,6%	76,4%	80,1%	96,3%	94,4%	96,9%	95,7%
	95% CI*	65,1-79,4	63,8-78,3	63,8-78,3	58,6-73,7	86,6-95,6	81,5-92,2	91,2-98,2	86,6-95,6	77,2-89,2	75,9-88,1	69,1-82,7	73,1-86,0	92,1-98,6	89,7-97,4	92,1-98,6	91,2-98,2
	Spetsiifilisus	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100
CO2	Cut-off, nm	0,458	0,126	0,118	0,120	0,146	0,133	0,153	0,187	0,526	0,172	0,156	0,135	0,198	0,149	0,160	0,217
	Tundlikkus	85,1%	98,8%	98,8%	98,1%	100%	100%	100%	99,4%	91,9%	98,1%	97,5%	98,8%	99,4%	100%	99,4%	99,4%
	95% CI*	78,6-90,2	95,6-99,8	95,6-99,8	94,7-99,6	97,7-100	97,7-100	97,7-100	96,6-100	86,6-95,6	94,7-99,6	93,8-99,3	95,6-99,8	96,6-100	97,7-100	96,6-100	96,6-100
	Spetsiifilisus	97,1%	100%	100%	100%	100%	100%	97,1%	100%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	97,1%	100%	100%	100%
	95% CI*	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	96,7-97,1	92,9-100	84,7-99,9	84,7-99,9	84,7-99,9	84,7-99,9	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100
CO3	Cut-off, nm	0,176	0,145	0,122	0,127	0,154	0,137	0,161	0,239	0,177	0,233	0,115	0,168	0,269	0,153	0,270	0,501
	Tundlikkus	97,5%	98,8%	98,8%	98,1%	100%	100%	100%	99,4%	98,8%	96,9%	100%	98,8%	99,4%	100%	99,4%	99,4%
	95% CI*	93,8-99,3	95,6-99,8	95,6-99,8	94,7-99,6	97,7-100	97,7-100	97,7-100	96,6-100	95,6-99,8	92,1-98,6	98,5-100	95,6-99,8	96,6-100	97,7-100	96,6-100	96,6-100
	Spetsiifilisus	94,1%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	94,1%	100%	97,1%	100%	100%	100%	100%	100%
	95% CI*	80,3-99,3	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	80,3-99,3	92,9-100	84,7-99,9	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100	92,9-100

*Usaldusintervall on arvutatud Clopper-Pearsoni täppismeetodi alusel

2.2 HCV RNA eraldamine DBS-proovidest

Sarnaselt ELISA-analüüsiga võeti vereseerumi proovidest HCV RNA tuvastamise tulemused standardiks, et hinnata ka HCV RNA tuvastamise kvaliteeti DBS-proovidest. Selles töös DBS-proovides antikehade analüüsiks kasutatud 195 proovist osutus vereseerumiproovide põhjal HCV RNA suhtes positiivseks 139 proovi, millest 130 proovi olid positiivsed ka HCV-vastaste antikehade suhtes ning ülejäänud 9 olid antikehade suhtes negatiivsed. Kokku võeti DBS HCV RNA analüüsiks 148 proovi ning tulemused olid järgmised: antikehade suhtes oli 139 HCV RNA-positiivset ning 9 HCV RNA-negatiivset proovi.

Kuna kasutatud RNA eraldamise meetod on heakskiidetud vereseerumi proovides, mitte DBS-iga kasutamiseks, siis mõned töösammud kohandati võrreldes algse tootjapoolse protokolliga. Et võimalikult paremini saada HCV RNA-d kuivanud DBS-proovist paberitükil, pikendati inkubatsiooni etappi, mis liideti kuiva proovi elueerimise etapiga. 139 vereseerumi RNA positiivsetest proovidest, andis DBS RNA analüüs tulemuseks 89 positiivset ja 49 negatiivset tulemust. Üheksast vereseerumi HCV RNA-negatiivsest proovist saadi DBS RNA analüüsiga 2 positiivset ja 7 negatiivset tulemust. Lõppkokkuvõttes, RNA tuvastamine õnnestus 65,7% DBS-proovidest (Joonis 7). Kuna kaks DBS-proovi osutusid HCV RNA suhtes valepositiivseks, avaldas käesolevas töös kasutatud HCV RNA eraldamis- ja tuvastamismeetod 81,8%-list spetsiifilisust.



Joonis 7. DBS proovide valik ja RNA analüüsimise skeem ning tulemused

Sekveneerimine paaris proovidest andis tulemuselt identsed nukleotiidjärjestused. Samuti oli võimalik tuvastada hepatiidi viiruse alamrühma nii vereseerumi kui ka DBS-proovidest. Kokku sekveneeriti 18 HCV RNA positiivset proovi (9 vereseerum/DBS paaris proovi), millest 7 paaris tuvastati HCV genotüüp 1a ning kahes paaris 1b genotüüp. Saadud 1a genotüübi järjestused on sarnased järjestustega, mida on tuvastatud Ameerikas, Kanadas, Austraalias ja 1b genotüübi järjestused on sarnased järjestustega, mida on tuvastatud Ameerikas, Iisraelis, Šveitsis, Belgias ja Iirimaa. Saadud HCV geenilõikude nukleotiidjärjestuste analüüs näitas 100%-list identsust paaris analüüsitud proovidega, millest järeldub, et kuiva veretäpi proov on sobilik ja piisav materjal ka HCV-viiruse genotüüpide määramiseks.

3 Kokkuvõtte

Piiratud tingimustes on DBS ideaalne meetod proovide kogumiseks, mis aitab lihtsustada uuringute läbiviimist riskirühmades, aga ka üleriigilistes rahvastiku-uuringutes. Nõuetekohase planeerimise ja eeluuringuga võib DBS kogumine toimuda meditsiinitöötaja ja laborivarustusega ning isegi kodus.

Vastavalt labori võimekusele ning eelneva valideerimisega laboritingimustes saab kasutada isegi kaubanduslikke ELISA-testsüsteeme, mille kasutamisel on võimalik saada seerumitega võrreldes samaväärseid tulemusi.

Antud töö raames andsid parimaid tulemusi variatsioonid 1.5–1.8_35, mis näitab, et antikehade testimiseks tuleks võtta 12 mm läbimõõduga DBS-proovid ja lahustada need 300 µl elueerimispuhvris, mille koostise variatsioonid ei andnud tulemustes olulist erinevust. Samuti tuleks kõige usaldusväärsemate ja vereseerumi tulemustega võrreldavate tulemuste saamiseks ELISA-reaktsioonis võtta lahustunud proovi suuremas koguses (35 µl).

Piirväärtuse arvutamiseks on kõigepealt vaja arvutada see kahe meetodi järgi. 2 indikaatori vahelist ala võib pidada nn „halliks tsooniks“ ehk et need proovid tuleks uuesti läbi lasta kahe järjestikkuse sarnase tulemuse saamiseni või jätta kahtluse alla ning võimalusel teostada analoogiline seerumianalüüs.

Üldiselt saab RNA-d DBS-proovidest eraldada, kuid kadude määr on liiga kõrge, lisaks esineb valepositiivseid tulemusi. DBS-proovidest eraldatud HCV RNA sobib ka sekveneerimiseks ja genotüüpimiseks. Kuid usaldusväärsema tulemuse saamiseks tuleb optimeerida RNA eraldamise ja tuvastamise meetodit, et tõsta tundlikkust ja spetsiifilisust.

Kasutatud kirjandus

1. Manak MM, Hack HR, Shutt AL, *et al.* Stability of Human Immunodeficiency Virus Serological Markers in Samples Collected as HemaSpot and Whatman 903 Dried Blood Spots. *J Clin Microbiol.* 2018;56(10):e00933-18.
2. WHO. WHO guidelines on hepatitis B and C testing: World Health Organization; 2017.
3. WHO. WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens. 2020.
4. ECDC. Public Health Guidance in Brief on HIV, Hepatitis B and C Testing in the EU/EEA: An Integrated Approach: Publications Office of the European Union; 2018.
5. Vinikoor MJ, Zurcher S, Musukuma K, *et al.* Hepatitis B viral load in dried blood spots: A validation study in Zambia. *J Clin Virol.* 2015;72:20-4.
6. Snijdewind IJ, van Kampen JJ, Fraaij PL, *et al.* Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Res.* 2012;93(3):309-21.
7. McDade TW. Development and validation of assay protocols for use with dried blood spot samples. *Am J Hum Biol.* 2014;26(1):1-9.
8. Villar LM, Cruz HM, Deodato RM, *et al.* Usefulness of automated assays for detecting hepatitis B and C markers in dried blood spot samples. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):523.
9. Marques BL, Brandao CU, Silva EF, *et al.* Dried blood spot samples: optimization of commercial EIAs for hepatitis C antibody detection and stability under different storage conditions. *J Med Virol.* 2012;84(10):1600-7.
10. McCarron B, Fox R, Wilson K, *et al.* Hepatitis C antibody detection in dried blood spots. *J Viral Hepat.* 1999;6(6):453-6.
11. Tuaillon E, Mondain AM, Meroueh F, *et al.* Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology.* 2010;51(3):752-8.
12. Flores GL, Cruz HM, Potsch DV, *et al.* Evaluation of HBsAg and anti-HBc assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status. *J Virol Methods.* 2017;247:32-7.
13. Bruns T, Steinmetzer K, Ermantraut E, *et al.* Hepatitis C virus RNA quantitation in venous and capillary small-volume whole-blood samples. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3231-40.
14. Villar LM, de Oliveira JC, Cruz HM, *et al.* Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J Med Virol.* 2011;83(9):1522-9.
15. Uusküla A, Abel K, Rajaleid K, *et al.* HIV levimuse ja riskikäitumise uuring Eesti kahe linna (Tallinna ja Kohtla-Järve) süstivate narkomaanide seas. Tallinn: Tervise Arengu Instituut; 2005.
16. Lydie N, Saboni L, Gautier A, *et al.* Innovative Approach for Enhancing Testing of HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C in the General Population: Protocol for an Acceptability and Feasibility Study (BaroTest 2016). *JMIR Res Protoc.* 2018;7(10):e180.
17. Salakešin M, Vorobjov S. HIVi levimuse ja riskikäitumise uuring narkootikume süstivate inimeste seas Kohtla-Järvel 2020. Tallinn: Tervise Arengu Instituut; 2021.
18. Marques BLC, do Espirito-Santo MP, Marques VA, Miguel JC, da Silva EF, Villela-Nogueira CA, *et al.* Evaluation of dried blood spot samples for hepatitis C virus detection and quantification. *J Clin Virol.* 2016;82:139-44.
19. Solmone M, Girardi E, Costa F, *et al.* Simple and reliable method for detection and genotyping of hepatitis C virus RNA in dried blood spots stored at room temperature. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3512-4.
20. WHO. WHO list of prequalified in vitro diagnostic products 2020. Kasutamise kuupäev: veebruar 2020; Kättesaadav: <https://www.worldhepatitisalliance.org/missing-millions/wp-content/uploads/2020/04/WHO-prequalifications-list-2020.pdf>.
21. Jackson K, Holgate T, Tekoaia R, *et al.* Evaluation of dried blood spots for hepatitis B and D serology and nucleic acid testing. *J Med Virol.* 2022;94(2):642-8.
22. Kumar A, Mhatre S, Dikshit R. Utility of dried blood spots in detecting helicobacter pylori infection. *Indian J Med Microbiol.* 2019;37(4):514-20.
23. Lange B, Cohn J, Roberts T, *et al.* Diagnostic accuracy of serological diagnosis of hepatitis C and B using dried blood spot samples (DBS): two systematic reviews and meta-analyses. *BMC Infect Dis.* 2017;17(Suppl 1):700.

24. Lee CE, Sri Ponnampalavanar S, Syed Omar SF, *et al.* Evaluation of the dried blood spot (DBS) collection method as a tool for detection of HIV Ag/Ab, HBsAg, anti-HBs and anti-HCV in a Malaysian tertiary referral hospital. *Ann Acad Med Singap.* 2011;40(10):448-53.
25. Mason LMK, Veldhuijzen IK, Duffell E, *et al.* Hepatitis B and C testing strategies in healthcare and community settings in the EU/EEA: A systematic review. *J Viral Hepat.* 2019;26(12):1431-53.
26. Shepherd SJ, Baxter RE, Gunson RN. Evaluation of the Abbott m2000 system for dried blood spot detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Virol.* 2019;110:7-10.
27. Gruner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots--preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp.* 2015(97).
28. Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr.* 2007;96(5):644-7.
29. Hazra A, Gogtay N. Biostatistics Series Module 7: The Statistics of Diagnostic Tests. *Indian J Dermatol.* 2017;62(1):18-24.
30. Lambert JR, Lipkovich I. A Macro For Getting More Out Of Your ROC Curve. In: *SAS Global Forum 2008. Paper 231-2008.*
31. Perkins NJ, Schisterman EF. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *American journal of epidemiology.* 2006;163(7):670-5.
32. Geretti AM, King S, Adjei-Asante K, *et al.* Hepatitis C Virus (HCV) RNA screening and sequencing using dry plasma spots. *J Clin Virol.* 2017;97:18-21.
33. Kumar A, Mhatre S, Godbole S, *et al.* Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): potential application in epidemiological research & bio banking. *Gates Open Res.* 2018;2:57.
34. Tallo T, Norder H, Tefanova V, *et al.* Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. *J Med Virol.* 2007;79(4):374-82.

