

COMUNICACIÓN BREVE

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v63.n4.50419>

Alta correlación en la detección de anticuerpos y antígenos de virus del dengue en muestras de suero y plasma

*High correlation in dengue antibodies and antigen detection using serum or plasma samples*Shirly Parra-Álvarez^{1,2} • Carolina Coronel-Ruiz^{1,2} • María G Castilla^{1,2} • Myriam L Velandia-Romero^{1,2} • Jaime E Castellanos^{1,2}

Recibido: 06/05/2015 Aceptado: 17/06/2015

¹ Universidad El Bosque - Grupo de Virología - Bogotá, D.C. - Colombia.² Colciencias - Red de Investigación Multidisciplinaria para la Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores - Bogotá, D.C. - Colombia.Correspondencia: Jaime E. Castellanos. Grupo de Virología, Universidad El Bosque. Carrera 9 No. 131A 02. Teléfono: +57 1 6489066. Bogotá, D.C. Colombia. Correo electrónico: castellanosjaime@unbosque.edu.co.

| Resumen |

Introducción. El diagnóstico adecuado de dengue por laboratorio es importante para la atención, así como para el control de brotes y epidemias. Hasta el momento, las pruebas ELISA para diagnóstico serológico de la infección se encuentran validadas en muestras de suero; sin embargo, en algunas ocasiones la cantidad o calidad de la muestra es inadecuada, o solo se tiene acceso a sangre anticoagulada tomada para el análisis de los parámetros hematológicos en el hemograma.

Objetivo. Evaluar el desempeño de cuatro pruebas ELISA en muestras de suero y plasma de casos sospechosos de dengue.

Materiales y métodos. Se procesaron 42 muestras —21 de suero y 21 de plasma— por las técnicas de ELISA de captura para IgM, ELISA de captura para IgG, ELISA indirecta para IgG y ELISA para la detección del antígeno viral NS1.

Resultados. El porcentaje de muestras positivas encontrado fue IgM 33.3%, IgG Captura 33.3%, IgG Indirecta 90.5%, NS1 23.8%. El 42.9% de las muestras fueron positivas por RT-PCR (n=9). Todas las pruebas se comportaron igual tanto en sueros como plasmas (coeficiente Kappa 1.0).

Conclusión. Los resultados obtenidos muestran una alta concordancia entre las mediciones realizadas en suero y en plasma, lo cual sugiere que la muestra de plasma puede utilizarse para el diagnóstico y la confirmación de los casos de dengue.

Palabras clave: Dengue; Suero; Plasma; Diagnóstico; Pruebas serológicas (DeCS).

Parra-Álvarez S, Coronel-Ruiz C, Castilla MG, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. Alta correlación en la detección de anticuerpos y antígenos de virus del dengue en muestras de suero y plasma. Rev. Fac. Med. 2015;63(4):687-93. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v63.n4.50419>.

Summary

Introduction. Appropriate dengue laboratory diagnosis is an important tool to manage the disease, as well to control possible outbreaks. Currently, ELISA dengue serological tests are validated to use with serum, however sometimes samples quality or quantity is inappropriate or there is only availability of anti-coagulated blood samples which have been used in total blood tests —haemogram—.

Objective. To assess the performance of four dengue ELISA tests in serum or plasma samples obtained from presumptive dengue cases.

Methodology. Forty two samples, 21 of serum and plasma each, were processed to dengue Capture IgM ultramicro-ELISA, Capture IgG ELISA, Indirect IgG ELISA and NS1 antigen ELISA. Nine out of 21 patients were diagnosed as dengue cases following the diagnostic algorithm.

Results. The percentage of positive samples found was Capture IgM 33.3%, Capture IgG 33.3%, Indirect IgG 90.5% and NS1 dengue antigen 23.8%. Comparing the results between all ELISA tests it can be said that they had similar

performances both in serum and plasma, the Kappa coefficient obtained was 1.0.

Conclusions. These results show a high concordance between the measurements carried out in serum and plasma, which leads to suggest the latter may be used as a tool in the diagnosis and confirmation of dengue cases.

Keywords: Dengue; Serum; Plasma; ELISA; Diagnostic (MeSH)

Parra-Álvarez S, Coronel-Ruiz C, Castilla MG, Velandia-Romero ML, Castellanos JE. [High correlation in dengue antibodies and antigen detection using serum or plasma samples]. Rev. Fac. Med. 2015;63(4):687-93. Spanish. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v63.n4.50419>.

Introducción

La infección por dengue es causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue DENV (DENV-1 al DENV-4), que hacen parte del género *Flavivirus* y la familia *Flaviviridae*. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en más de 100 países tropicales y subtropicales de los cinco continentes, es transmitida por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes Albopictus* y representa un problema de salud pública a nivel mundial por el aumento en la incidencia, la severidad de los casos y el incremento en frecuencia de las epidemias (1-4).

En Colombia, la incidencia de dengue sigue creciendo debido a la presencia del vector *Aedes aegypti* en 90% del territorio nacional, la introducción de *Aedes albopictus* y la circulación simultánea de los cuatro serotipos. Alrededor de 620 municipios de nuestro país, ubicados por debajo de 1800 m s. n. m., poseen condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa y pluviosidad que favorecen la presencia del vector (5,6).

En el año 2013 se presentaron en el país 125554 casos de dengue, de los cuales solo se confirmaron por laboratorio 64407 (51.3%) (8); del mismo modo, en el año 2014, a la semana epidemiológica 53, se notificaron 110473 casos, de los cuales solo se confirmó el 43.4% (9).

Para el diagnóstico de dengue es importante conocer las variaciones en los parámetros de laboratorio que pueden orientar al médico sobre la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente y sobre la identificación oportuna de los signos de alarma con el propósito de realizar el diagnóstico oportuno, el manejo adecuado de los casos y el tratamiento y vigilancia de la enfermedad (1,9,10). Además, para la

confirmación de los casos por laboratorio se recomiendan pruebas de diagnóstico serológico y virológico en muestras de suero pareadas —es decir tomadas en la fase febril y en la fase de recuperación— con el propósito de detectar tempranamente los casos severos, realizar el diagnóstico diferencial con otras etiologías y programar el desarrollo de actividades de vigilancia de la enfermedad y del control del vector (11,12,13).

En nuestro país, el protocolo para la confirmación de los casos por el laboratorio se basa fundamentalmente en la detección en suero de anticuerpos IgM específicos para dengue en una muestra tomada al paciente después del quinto día de inicio de los síntomas. La toma de una muestra de sangre adicional para obtener el suero y confirmar el diagnóstico de dengue genera rechazo, especialmente en pacientes pediátricos y sus padres; sin embargo, la mayoría de instituciones de salud toman muestras de sangre anticoagulada (EDTA) para el monitoreo de las variables hematológicas en el hemograma; por ello, el uso de plasma en las pruebas diagnósticas permite el diagnóstico y seguimiento de la infección por dengue, mejorando de este modo la cobertura y oportunidad de diagnóstico, lo cual es importante tanto para la atención de los pacientes como para la vigilancia epidemiológica (14).

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar el desempeño de las pruebas de diagnóstico serológico de dengue para la detección de anticuerpos IgM e IgG —por la técnica de captura y por la técnica indirecta— y de la proteína NS1 en muestras de suero y plasma de casos sospechosos de dengue.

Materiales y métodos

El protocolo para el ingreso de los pacientes al estudio y a la toma de la muestra de sangre contó con la aprobación del Comité de Ética del Centro de Investigación Científica Cauceseco.

Se realizó un muestreo por conveniencia, en el cual se colectaron 42 muestras de sangre, con y sin anticoagulante, de 21 pacientes con diagnóstico clínico de casos probables de dengue; pacientes atendidos en el Hospital de La Misericordia localizado en el municipio de San Antonio, en el departamento de Tolima, Colombia, durante los meses de mayo y junio del año 2013. El estudio se realizó en el marco del proyecto *Establecimiento de una plataforma para el diagnóstico integral de malaria y dengue en el contexto del síndrome febril en Colombia* financiado por Colciencias.

Los criterios de inclusión fueron: pacientes que consultaron por síndrome febril menor a 7 días, acompañado de dos o más signos como cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias,

entre otros. A los pacientes que cumplían con estos criterios se les explicó el objetivo y la metodología del estudio, y en el caso de los niños se indicó al acompañante. Aquellos pacientes que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado, posteriormente el médico les realizó el examen siguiendo la ficha clínica diseñada para el proyecto y se les tomaron las muestras de sangre para el hemograma y las pruebas de diagnóstico de dengue; inmediatamente después se realizó la separación por centrifugación del suero y del plasma y se almacenaron a -20°C hasta el momento del envío o transporte al Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque. Ya en Bogotá, las muestras de suero y plasma fueron descongeladas, alicuotadas y procesadas para las siguientes pruebas:

i) UMELISA Dengue IgM Plus (Tecnosuma): inmunoensayo de captura en el cual los pozos están sensibilizados con anticuerpos anti-IgM humano que reconocen las IgM de la muestra. Posteriormente se hace la incubación con antígenos recombinantes de DENV y luego con un anti-DENV biotinilado para finalizar con la adición del conjugado estreptavidina/fosfatasa alcalina y el sustrato de la enzima. La IgM puede detectarse entre el día tres y cinco después de la aparición de los síntomas y hasta tres meses después de inicio de los mismo (15).

ii) IgG de captura (Panbio, Alere): inmunoensayo de captura en el cual la superficie de los pozos se encuentra recubierta con anticuerpos anti-IgG humano que interactúan con las IgG de la muestra. Posteriormente se ponen en contacto con complejos previamente formados de antígeno viral recombinante/anticuerpos monoclonales biotinilados y la enzima peroxidasa, que genera el color al hidrolizar el sustrato. Esta técnica detecta los niveles altos de anticuerpos IgG específicos para la infección por DENV, indicando una infección secundaria en curso o muy reciente (16).

iii) IgG indirecta (Panbio, Alere): inmunoensayo indirecto en el cual los pocillos tienen adherido antígeno recombinante para los cuatro serotipos virales y al que se unirán los anticuerpos IgG específicos para dengue presentes en la muestra. Posterior a la incubación con anticuerpos conjugados con peroxidasa anti-IgG humano y el respectivo sustrato, se da el cambio de color en las muestras de personas que han tenido contacto con el virus (17).

iv) Dengue Early ELISA (Panbio, Alere): ELISA de captura en la cual los pocillos se encuentran revestidos con anticuerpos anti-NS1 y a los que se unirá el antígeno presente en la muestra. Posteriormente se adicionan anticuerpos anti-NS1 marcados con peroxidasa que, luego de adicionar el sustrato para la enzima, cambiarán de color. La señal positiva indica que el paciente se encuentra en fase viremia debido a

que esta glicoproteína viral es detectable entre el día cero y siete después de adquirida la infección, tanto en infecciones primarias como secundarias (18).

Para evitar variaciones, las muestras de cada paciente se procesaron simultáneamente en la misma placa. Adicionalmente, con el propósito de hacer el diagnóstico molecular de la infección por DENV, se realizó extracción de RNA para el procesamiento por RT-PCR. Una vez procesadas las muestras se llevó a cabo la clasificación de las infecciones de acuerdo con los resultados conjuntos de las pruebas y la correlación de las mismas considerando como casos de infección aguda aquellos positivos para antígeno viral NS1 o RT-PCR; así mismo las muestras que presentaran IgM o IgG de captura positivo se consideraron casos de infecciones agudas o recientes.

Con los resultados obtenidos en las pruebas de diagnóstico serológico se realizó el análisis de la información en Stata versión 11.0, se calculó la media de las mediciones en suero y plasma y se hizo un análisis de correlación de Spearman; además, se evaluó la concordancia mediante el cálculo del coeficiente *kappa*, se elaboraron las curvas de características operador-receptor (ROC) y se estimó el área bajo la curva ROC de las mediciones en el plasma y se compararon con las mediciones hechas en el suero.

Resultados

Se analizaron un total de 42 muestras: 21 de suero y las correspondientes 21 de plasma tomadas de pacientes durante la fase febril de la enfermedad. La descripción de los hallazgos para cada prueba se muestra en la Tabla 1; el porcentaje de hombres fue 38.1%. De acuerdo a las recomendaciones de la OMS y el Instituto Nacional de Salud, del grupo de 21 pacientes febriles se pudo confirmar el caso de dengue en 13 de ellos —infecciones activas o recientes—; en el resto de los pacientes ($n=8$), a pesar de que presentaban un cuadro clínico de dengue, las pruebas de diagnóstico fueron negativas. Nueve muestras resultaron positivas por RT-PCR (42.9%), en 5 de las cuales se detectó el serotipo DENV-1 (55.6%), en dos el serotipo DENV-2 (22.2%) y en dos más el serotipo DENV-3 (22.2%).

Al realizar el análisis comparativo de los resultados obtenidos en las muestras de suero y plasma para cada una de las pruebas serológicas se encontró un valor de *kappa* de 1.00 para las pruebas ELISA IgM, IgG Captura, IgG Indirecta y NS1, demostrando una concordancia absoluta entre las mediciones en suero y plasma —entre 0.81 y 1.00—, Tabla 2 (19,20). Por insuficiente volumen en tres de las muestras, solo se procesaron 18 de las mismas para ELISA IgM.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de diagnóstico.

Prueba	n	Muestra	Mediana	Rango	Positivo n (%)	Negativo n(%)
IgM	18	Suero	10.6	6.7-210	6 (33.3%)	14 (66.7%)
		Plasma	10.1	7.9-210		
IgG Captura	21	Suero	10.3	5.6-45.5	7 (33.3%)	14 (66.7%)
		Plasma	10.4	7.7-45.5		
IgG Indirecta	21	Suero	43.8	37.1-52.3	19 (90.5%)	2 (9.5%)
		Plasma	43.9	34.7-55.0		
NS1	21	Suero	1.8	1.4-8.5	5 (23.8%)	16 (76.2%)
		Plasma	2.0	1.5-8.2		

Fuente: Elaboración propia con base en las fichas de Laboratorio del Grupo de Virología.

Tabla 2. Evaluación de la concordancia de los resultados de las pruebas de diagnóstico serológico en muestras de suero y plasma.

Prueba	Plasma	Sueros		Total	Kappa	Error Estándar (SE)	P
		Positivo	Negativo				
IgM	Positivo	6	0	6	6 (33.3%)	14 (66.7%)	14 (66.7%)
	Negativo	0	12	12			
IgG Captura	Positivo	7	0	7	7 (33.3%)	14 (66.7%)	14 (66.7%)
	Negativo	0	14	14			
IgG Indirecta	Positivo	19	0	19	19 (90.5%)	2 (9.5%)	2 (9.5%)
	Negativo	0	2	2			
NS1	Positivo	5	0	5	5 (23.8%)	16 (76.2%)	16 (76.2%)
	Negativo	0	16	16			

Fuente: Elaboración propia con base en las fichas de Laboratorio del Grupo de Virología.

El análisis de sensibilidad y especificidad realizado, la elaboración de la curva ROC y el cálculo del área bajo la curva ROC para cada una de las pruebas aplicadas presentaron un

valor de 1.000. La curva ROC y las áreas son iguales para cada una de las ELISA probadas y realizadas en muestras de suero y plasma, Figura 2.

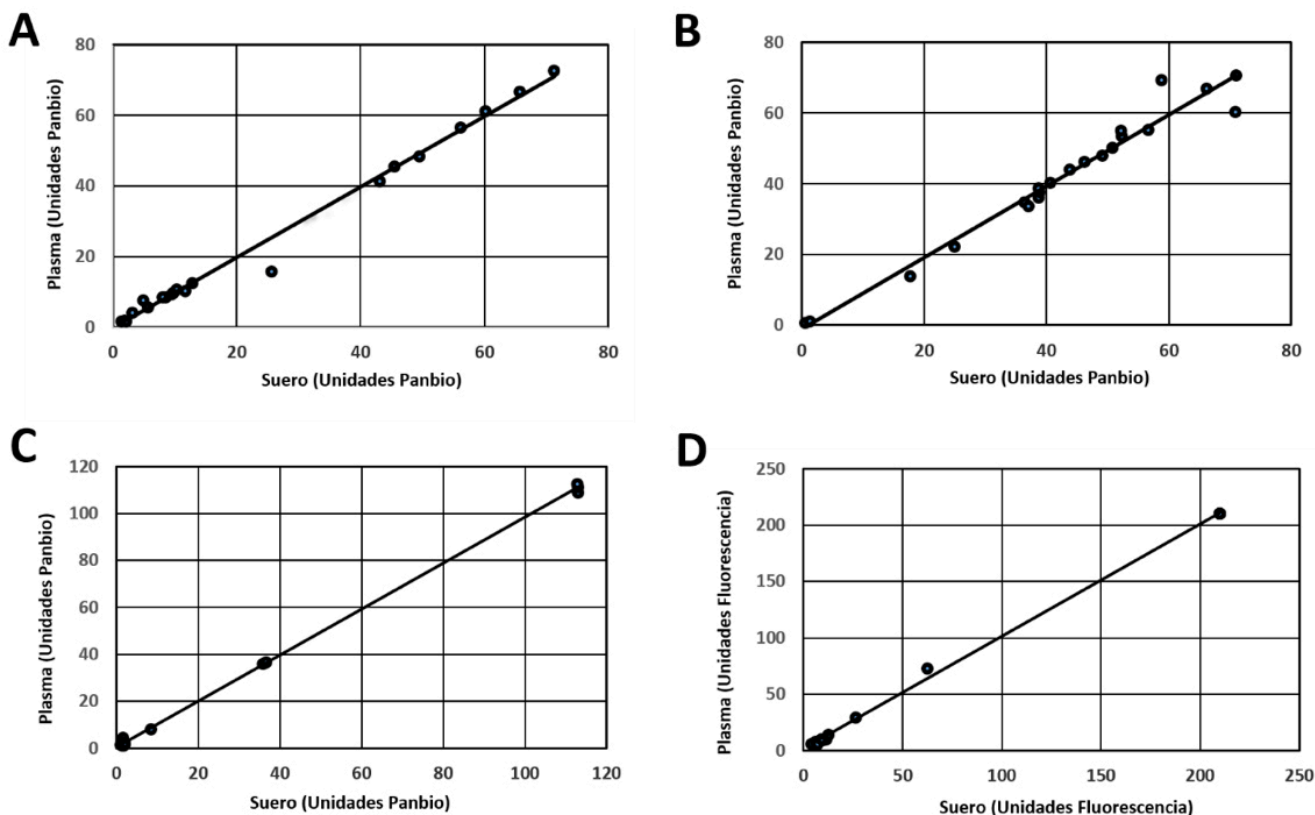


Figura 1. Correlación entre las mediciones realizadas en cuatro pruebas ELISA diferentes para dengue usando suero o plasma del mismo paciente. A. ELISA IgG de captura (coeficiente de correlación, 0.990). B. ELISA IgG indirecta (coeficiente de correlación, 0.965). C. ELISA para antígeno viral NS1 (coeficiente de correlación, 0.999). D. ELISA para IgM (coeficiente de correlación 0.999). Fuente: Elaboración propia.

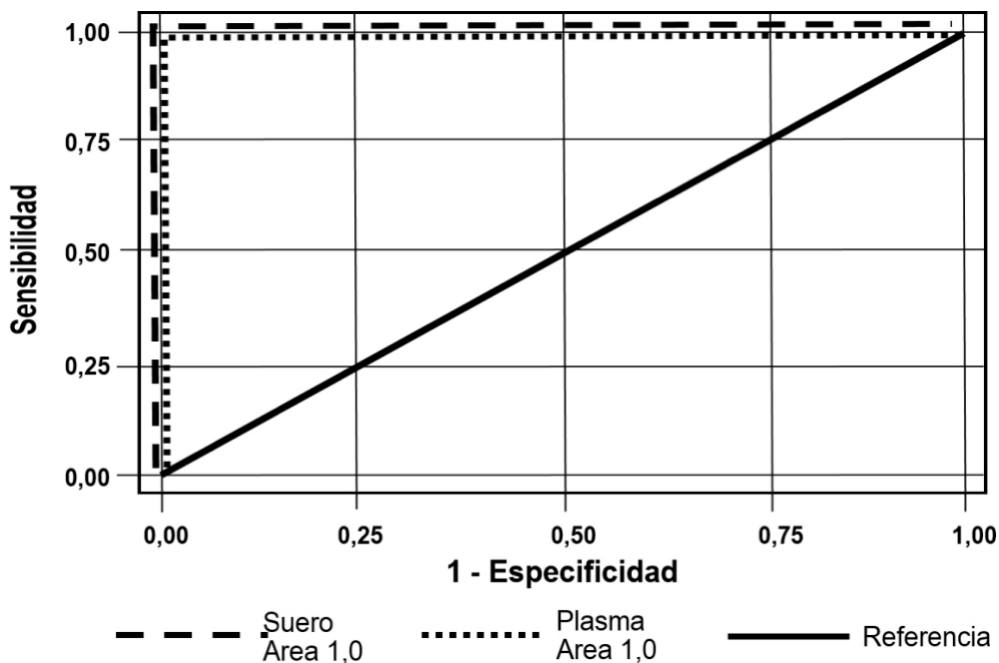


Figura 2. Ejemplo de una curva ROC para las pruebas ELISA usadas en la detección de anticuerpos y antígeno NS1. Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que el uso de plasma recolectado en tubos con EDTA tiene un comportamiento equivalente al obtenido en el suero cuando se aplican las pruebas ELISA para el diagnóstico de la infección por DENV, arrojando altos niveles de concordancia entre las pruebas así se use una u otra muestra. Tradicionalmente se ha creído que la adición de alguna sustancia química al tubo de recolección podría interferir con los resultados y por ello se prefiere sangre coagulada y sin ningún tipo de aditivo; sin embargo, hay pocas evaluaciones sobre la realidad de esta recomendación.

El plasma, a diferencia del suero, contiene fibrinógeno y mantiene los factores de la cascada de coagulación intactos, por lo que se recomienda la validación del uso de esta muestra para pruebas que se han ensayado en suero, determinando si ese contenido adicional de proteínas o de anticoagulantes podría reflejarse en una dificultad para la detección de metabolitos o anticuerpos (14,21). Yu *et al.* obtuvieron resultados similares al evaluar la concordancia de suero y plasma en el análisis de metabolitos (21).

Previamente, en un trabajo que evaluó el resultado de pruebas de anticuerpos contra el virus del herpes simplex tipo 2, se compararon los resultados obtenidos al procesar el plasma y los resultados iniciales obtenidos en los sueros; finalmente se concluyó que hubo una concordancia mayor a 99% (22).

En el caso del diagnóstico de tuberculosis se encontró también una altísima correlación entre las pruebas realizadas para la detección de anticuerpos contra polisacáridos o proteínas de la micobacteria, indistintamente del uso de plasma o suero de los pacientes (23). En estos dos casos se reporta que el tiempo de almacenamiento o congelación no tuvo efecto negativo en la concordancia de las pruebas, aunque otro tipo de pruebas pueden afectarse por la polimerización de la fibrina que ocurre con las muestras de plasma congeladas por largos tiempos.

De manera similar, en el trabajo realizado por Blacksell *et al.* (14) no se encontraron diferencias significativas en los valores de las Unidades Panbio de las pruebas ELISA IgM e IgG de captura, Dengue Early ELISA para el diagnóstico de dengue y las pruebas ELISA de Panbio para la detección combinada de anticuerpos IgM contra el virus de encefalitis japonesa. Otros autores han desarrollado estudios similares evaluando la concordancia de las mediciones en muestras diferentes a suero, como el estudio desarrollado por Dokubo *et al.* (24) en la detección de RNA y anticuerpos para virus de hepatitis C en muestras de plasma y muestras de sangre seca

sobre papel filtro, donde se mostró una sensibilidad superior a 70%, especificidad mayor a 90% y concordancia para la detección de anti-HCV buena de 0.69 —0.61-0.80— (24).

Aunque la mayoría de sistemas de diagnóstico para dengue se han desarrollado para hacerse con suero, en este trabajo se reporta que las muestras de plasma pueden ser igualmente útiles para el diagnóstico serológico; lo que abre la puerta al uso de muestras que se toman con otro propósito y con mayor frecuencia, como aquellas destinadas a hacer el seguimiento hematológico de los pacientes o incluso las que han permanecido congeladas por largos periodos. Todo ello puede aumentar el número de muestras procesadas y por ende el número de casos confirmados, lo cual es una situación deseable para contribuir al control de la epidemia de dengue en nuestro país.

Conclusión

Los resultados sugieren que puede utilizarse la muestra de plasma obtenida del tubo con anticoagulante EDTA para el diagnóstico serológico de la infección por dengue al emplear el kit de Tecnosuma para la detección de IgM y el de Panbio para la detección de IgG de captura, IgG Indirecta y NS1. Del mismo modo, se requieren desarrollar estudios en los cuales se evalúen kits de diferentes fabricantes y casas comerciales y evaluar si el mismo resultado se obtiene usando plasma recolectado en tubos con otro tipo de anticoagulante como heparina sódica, citrato de sodio, fluoruro u oxalato.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado por los autores.

Financiación

Trabajo realizado en el marco de la ejecución del Programa Red de Investigación Multidisciplinaria para la prevención y control de Enfermedades Transmitidas por Vectores financiado por el Contrato 360-2011 de Colciencias y el apoyo de la Universidad El Bosque.

Agradecimientos

Al Hospital de La Misericordia de San Antonio, Tolima.

Referencias

1. **Castellanos JE, Coronel-Ruiz C.** El diagnóstico en Dengue: un rompecabezas a resolver. *Rev Fac Med.* 2014;62(4):617–29. <http://doi.org/82d>.
2. **Velandia ML, Castellanos JE.** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio.* 2011;15(1):33-43. <http://doi.org/82f>.

3. **Guzman MG, Harris E. Dengue.** *Lancet.* 2015;385(9966):453–65. <http://doi.org/f2zjwg>.
4. **Simmons CP, Farrar JJ., van Vinh Chau N, Wills B. Dengue.** *N. Engl. J. Med.* 2012;355(15):1423–32. <http://doi.org/82g>.
5. Ministerio de Salud y Protección Social. Situación actual de dengue a semana 12 de 2013 periodo de analisis : 2008-2013. Bogotá, D.C.: Minsalud; 2013. p. 1-10
6. **Mercado-Reyes M.** Informe final dengue, Colombia, 2014. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2014.
7. **Mercado-Reyes M.** Informe del evento Dengue año 2013. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2012.
8. Instituto Nacional de Salud, Sistema de vigilancia y control en Salud Pública-SIVIGILA. Informe del evento dengue, hasta el período epidemiológico XIII. Bogotá, D.C.: INS; 2014.
9. Ministerio de la Protección Social República de Colombia, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Guía de Atención Clínica Integral del Paciente con Dengue. Bogotá, D.C.: INS;2010.
10. Organización Panamericana de la Salud. DENGUE. Guías de atención para enfermos en la región de las Américas. La Paz: OPS; 2010.
11. **Acosta-Bas C, Gómez-Cordero I.** Biología y métodos diagnósticos del dengue. *Rev. Biomed.* 2005;16:113-37.
12. **Guzmán MG, Kourí G.** Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int. J. Infect. Dis.* 2004;8(2):69–80. <http://doi.org/chnctf>.
13. **Halstead SB.** Dengue. *Lancet.* 2007;370(9599):1644–52. <http://doi.org/ftxmm3>.
14. **Blacksell SD, Lee SJ, Chanthongthip A, Taojaikong T, Thongpaseuth S, Hübscher T, et al.** Short Report: Comparison of Performance of Serum and Plasma in Panbio Dengue and Japanese Encephalitis Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Am. J. Trop. Med.* 2012;87(3):573-5. <http://doi.org/83v>.
15. Tecnosuma Internacional. UMELISA Dengue IgM Plus. La Habana: Tecnosuma Internacional; 2011.
16. Panbio. Inserto de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue para la detección de infecciones secundarias por dengue. Australia: catálogo No. E-DEN02G; 2008.
17. Panbio. Dengue IgG indirect ELISA. Australia: catálogo No. E-DEN01G; 2006.
18. Panbio. Dengue Early ELISA Procedure. Australia: catálogo No. E-DEN02P; 2011.
19. **Cortés-Reyes É, Rubio-Romero JA, Gaitan-Duarte H.** Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 2010;61(3):247–55.
20. **Landis JR, Koch GG.** The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74. <http://doi.org/dtzfj3>.
21. **Yu Z, Kastenmüller G, He Y, Belcredi P, Möller G, Prehn C, et al.** Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One.* 2011;6(7):e21230. <http://doi.org/bdx7kd>.
22. **Cherpes TL, Meyn LA, Hillier SL.** Plasma versus serum for detection of Herpes Simplex Virus type 2-Specific Immunoglobulin G Antibodies with a glycoprotein G2-Based Enzyme Immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(6):2758-9. <http://doi.org/fcfqwz>.
23. **Siev M, Yu X, Prados-Rosales R, Martiniuk FT, Casadevall A, Achkar JM.** Correlation between serum and plasma antibody titers to mycobacterial antigens. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2011;8(1):173-5. <http://doi.org/bff7tw>.
24. **Dokubo EK, Evans J, Winkelman V, Cyrus S, Tobler LH, Asher A, et al.** Comparison of Hepatitis C Virus RNA and antibody detection in dried blood spots and plasma specimens. *J. Clin. Virol.* 2014;59(4):223-7. <http://doi.org/83x>.