

García Cisneros, Santa<sup>1</sup>  
 Herrera Ortiz, Antonia<sup>1</sup>  
 Rojas Delgado, Héctor Ugo<sup>2</sup>  
 Olamendi Portugal, María<sup>1</sup>  
 Xibille Friedmann, Daniel Xavier<sup>2</sup>  
 Sánchez Alemán, Miguel Ángel<sup>1</sup>

## Validación del uso de gotas de sangre seca para la detección de anticuerpos IGG e IGA contra SARS-COV-2

## Validation of the use of dried blood spots for the detection of antibodies IGG and IGA against SARS-COV-2

Fecha de aceptación: enero 2024

### Resumen

**ANTECEDENTES.** Las gotas de sangre seca (*dried blood spots*, DBS) son una alternativa para identificar enfermedades. Se evaluó el uso de DBS para detectar anticuerpos IGG e IGA contra SARS-COV-2 mediante ELISA.

**MATERIAL Y MÉTODO.** Se formó un biobanco de muestras pareadas de plasma y DBS. Se evaluaron dos volúmenes para la elusión de los DBS, 250  $\mu$ l y 400  $\mu$ l, para detectar anticuerpos mediante pruebas comerciales. Se calculó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, correlación de Sperman, concordancia kappa y se realizaron gráficos Bland-Altman.

**RESULTADOS.** La sensibilidad y especificidad para anticuerpos IGG con DBS eluidos en 250  $\mu$ l fue 98.9 y 100%, y con 400  $\mu$ l fue de 97.4 y 100%. Los índices de IGG mostraron una mayor dispersión a partir del valor de 6. El presente estudio es de los primeros en reportar una validación de IGA con DBS, se encontró una sensibilidad y especificidad de 100 y 97.8%, así como una mayor dispersión a partir del índice de 12.

**CONCLUSIÓN.** Es factible utilizar DBS para detectar anticuerpos IGG e IGA contra SARS-COV-2 en estudios epidemiológicos, ya que presentan una buena concordancia y correlación con plasma.

**Palabra clave:** SARS-COV-2, sangre seca en papel filtro, anticuerpos, serología, ELISA.

### Abstract

**BACKGROUND.** Dried blood spots (DBS) are alternative to identify diseases. The use of DBS to detect antibodies IGG and IGA against SARS-COV-2 was evaluated by ELISA.

**MATERIAL AND METHOD.** A biobank of paired plasma and DBS samples was formed. Two volumes for DBS elution, 250  $\mu$ l and 400  $\mu$ l, were evaluated for antibody by commercial tests. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, Sperman correlation, and kappa concordance were calculated, and Bland-Altman graphs were performed. Results. The sensitivity and specificity for IGG antibodies with DBS eluted in 250  $\mu$ l was 98.9 and 100%, and with 400  $\mu$ l it was 97.4 and 100%. The IGG indices showed a greater dispersion from the value of 6. The present study is one of the first to report a validation of IGA with DBS, a sensitivity and specificity of 100 and 97.8% was found, as well as a greater dispersion at from the index of 12.

**CONCLUSION.** It is feasible to use DBS to detect IGG and IGA antibodies against SARS-COV-2 in epidemiological studies, since they show good concordance and correlation with plasma.

**Keywords:** SARS-COV-2, dried blood spots, antibodies, serology, ELISA.

<sup>1</sup> Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos

<sup>2</sup> Hospital General de Cuernavaca Dr. José G. Parres, Cuernavaca, Morelos

Correspondencia: Dr. Miguel Ángel Sánchez-Alemán

Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Avenida Universidad 655, Colonia Santa María Ahuacatlán, Cerrada Los Pinos y Caminera, C.P. 62100, Cuernavaca, Morelos, México.

Dirección electrónica: msanchez@insp.mx

Teléfono: (+52) 77 7329 3000

## Introducción

El COVID-19 es secundario a la infección viral del epitelio respiratorio por el SARS-COV-2, induce la respuesta inmune de anticuerpos IGA en mucosas, y a nivel sistémico anticuerpos IGG. La mayoría de las personas infectadas por SARS-COV-2 producen anticuerpos IGG e IGA dos semanas después del inicio de la enfermedad.<sup>1</sup> La mayor utilidad de las pruebas de anticuerpos es para detectar la seroconversión a nivel poblacional y con ello apoyar la vigilancia epidemiológica, se puede conocer qué tanto se ha extendido la infección a nivel poblacional, describir la tasa de infección y de letalidad, evaluar estrategias de prevención y contención, así como determinar niveles de vacunación.

El uso de sangre seca en papel filtro (DBS, *dried blood spots*) presenta ventajas en relación con el empleo de suero o plasma, principalmente en trabajo de campo en zonas distantes y en grandes poblaciones. Es una toma menos invasiva, requiere poco volumen de sangre, es sencillo, tiene un menor costo, no utiliza equipos y no requiere refrigeración. Las gotas de sangre se depositan en un papel filtro especial que mantiene proteínas, ácidos nucleicos y otros metabolitos; una vez secas, las muestras se colocan en bolsas plásticas con desecante hasta su traslado y almacenamiento, que se puede realizar a temperatura ambiente.<sup>2,3</sup> En cuanto a la estabilidad de los analitos presentes en las DBS, existen estudios que reportan buena calidad de las DBS después de varios meses e incluso años a temperatura ambiente, la calidad es comparable con muestras de plasma mantenidas a -20 °C.<sup>4</sup> Entre las desventajas del uso de DBS se encuentra que el volumen de la muestra es pequeño y se requieren ensayos de validación para cada biomarcador y técnica utilizada.<sup>3,5</sup>

Las DBS se han utilizado para detectar anticuerpos contra diferentes agentes infecciosos como virus de la hepatitis c, virus dengue, virus del herpes simple tipo 2 y VIH, además de utilizarse de manera rutinaria en el tamiz neonatal,<sup>5,6</sup> por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de DBS para la detección de anticuerpos IGG e IGA contra el SARS-COV-2 mediante una prueba de ELISA.

## Material y métodos

Se formó un biobanco de muestras pareadas de plasma y DBS que se colectaron en el Hospital Dr. José G. Parres de Cuernavaca, Morelos, México, durante el año 2020. Las muestras de plasma se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos, y se manejaron en campanas de bioseguridad nivel II con procedimientos de bioseguridad nivel III. Se colocaron 20 µl de plasma en papel filtro Whatman 903, se dejaron secar y se recortaron círculos de 5 mm de diámetro; todas las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento. Se detectaron anticuerpos IGG e IGA con los kits SARS-COV-2 IGG ELISA y SARS-COV-2 IGA ELISA (Euroimmun, Lübeck, Alemania). Las muestras de plasma se diluyeron 1:101 y se depositaron 100 µl en la placa antigenada; para la elusión del DBS se manejaron dos volúmenes, 250 µl y 400 µl, de buffer de dilución del kit comercial (un círculo en cada volumen) a temperatura ambiente durante una hora, se tomaron 100 µl

del eluido y se depositaron en la placa antigenada. A partir de aquí, las muestras de plasma o DBS siguieron el mismo protocolo recomendado por el fabricante, los lavados se realizaron con el equipo automatizado Combiwash Human Diagnostics y las lecturas ópticas con el espectrofotómetro Multiskan FC, Thermo Scientific. Una vez hechos los cálculos, las muestras con un índice  $\leq 0.99$  se consideraron como negativas, y aquellas con un índice  $\geq 1.0$  se tomaron como positivas. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) considerando la muestra de plasma como el estándar de referencia. Se evaluó la concordancia y la correlación entre plasma y DBS, además de obtener gráficas de Bland-Altman.

## Resultados

La sensibilidad y especificidad de las muestras de DBS para la detección de IGG fue alto para las dos condiciones de elusión empleadas. En el caso de la elusión con 250 µl, se encontró una sensibilidad y especificidad de 98.9 y 100%, respectivamente, así como un índice Kappa de concordancia de 0.986, tal como se presenta en la figura 1A. Se realizó una elusión mayor con 400 µl de buffer, la cual mostró una sensibilidad y especificidad de 97.4 y 100%, respectivamente, así como un VPN de 96.7%, como se aprecia en la figura 1B. Finalmente, se evaluó la detección de anticuerpos tipo IGA con una elusión de DBS en 400 µl, se determinó una sensibilidad de 100%, una especificidad de 97.7% y un VPP de 97.9%, como se observa en la figura 1C.

La correlación del índice de anticuerpos IGG en plasma/DBS-250 y plasma/DBS-400 fue  $r^2 = 0.840$  y  $r^2 = 0.820$ , respectivamente (figura 2a y c). Por otra parte, las curvas de Bland-Altman muestran una mayor dispersión del índice de anticuerpos a partir del valor de 6 (figura 2b y d). Al considerar sólo las muestras con índice de anticuerpos menor o igual a 6 se observó una mejor correlación:  $r^2 = 0.917$  y pendiente  $m = 1.018$  (DBS-250) y  $r^2 = 0.888$  y pendiente  $m = 1.031$  (DBS-400).

Figura 1A.

Anticuerpos IgG contra SARS-COV-2			
DBS-250		Plasma	
		Pos	Neg
	Pos	86	0
Neg	1	59	

Sensibilidad (ic 95%)	98.9 (93.2-100)
Especificidad (ic 95%)	100 (92.7-100)
VPP (ic 95%)	100 (94.5-100)
VPN (ic 95%)	98.3 (90.0-100)
Índice Yamar	99
Kappa	0.986

Figura 1b.

Anticuerpos IgG contra SARS-CoV-2			
DBS-400		Plasma	
		Pos	Neg
	Pos	75	0
Neg	2	59	
Sensibilidad (ic 95%)		97.4 (90.5-99.8)	
Especificidad (ic 95%)		100 (92.7-100)	
VPP (ic 95%)		100 (94.2-100)	
VPN (ic 95%)		96.7 (88.2-99.8)	
Índice Yamar		97	
Kappa		0.970	

Figura 1c.

Anticuerpos IgA contra SARS-COV-2			
DBS-400		Plasma	
		Pos	Neg
	Pos	46	1
Neg	0	42	
Sensibilidad (ic 95%)		100 (90.1-100)	
Especificidad (ic 95%)		97.7 (86.8-99.9)	
VPP (ic 95%)		97.9 (87.9-99.9)	
VPN (ic 95%)		100 (90.0-100)	
Índice Yamar		98	
Kappa		0.977	

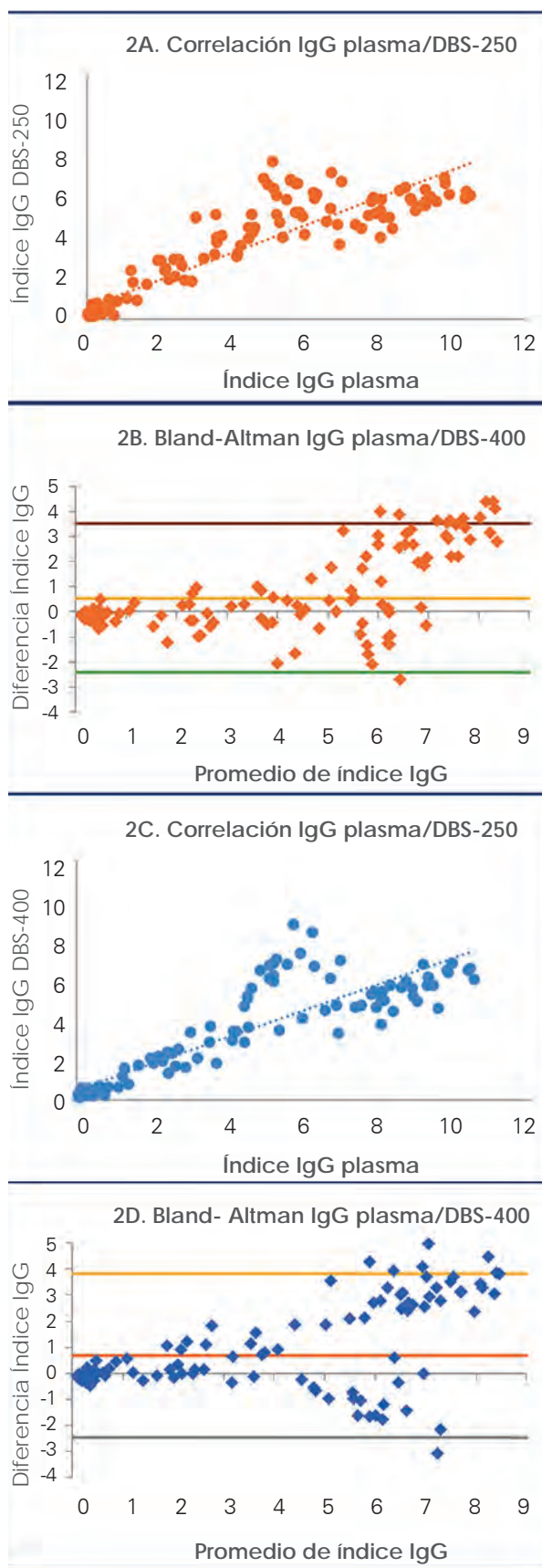
Detección de anticuerpos IgG e IgA contra SARS-COV-2, comparación entre muestras de plasma y DBS.

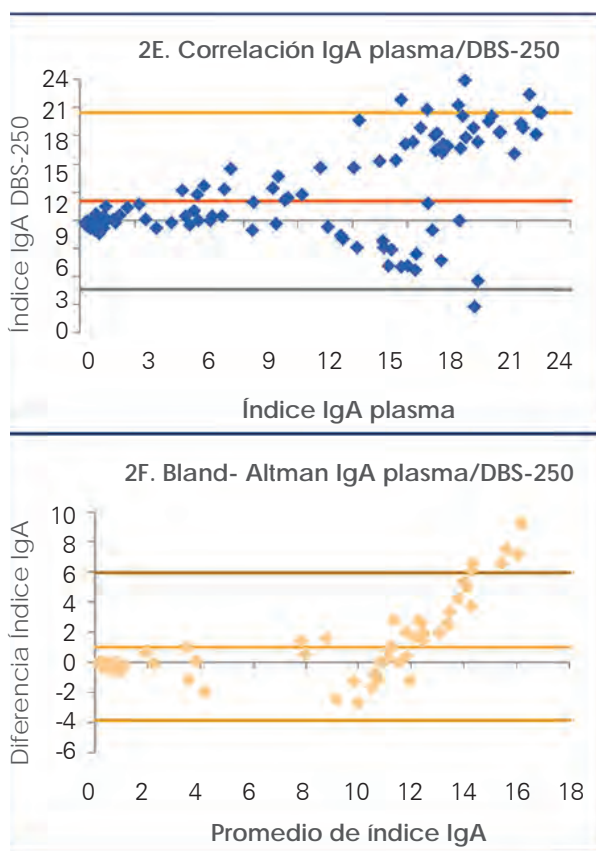
A: Muestra detección de anticuerpos IgG y DBS eluidos con 250 µl. B: Muestra detección de anticuerpos IgG y DBS eluidos con 400 µl. C: muestra detección de anticuerpos IgA y DBS eluidos en 250 µl.

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Las muestras presentaron un mayor índice de anticuerpos IgA con respecto a IgG tanto en plasma ( $12.20 \pm 0.79$  vs.  $5.81 \pm 0.26$ ,  $p < 0.001$ ) como con DBS-250 ( $9.70 \pm 0.49$  vs.  $4.93 \pm 0.18$ ,  $p < 0.001$ ). Se presentó una buena correlación en el índice de anticuerpos entre plasma y DBS-250 ( $r^2 = 0.911$ ), con una pendiente de  $m = 0.72$  (figura 2e), sin embargo, la gráfica de Bland-Altman tuvo una mayor dispersión a partir del valor del índice de 12 (figura 2f). Al utilizar los resultados con un índice menor o igual a 12 se obtuvo una correlación  $r^2 = 0.974$  y una pendiente  $m = 1.011$ .

Figura 2.





Correlación y gráficas de Bland-Altman para la detección de anticuerpos IgG e IgA contra SARS-COV-2, muestras de plasma y DBS. A, C y E: Muestra la correlación de Spearman entre plasma y DBS. A: Muestra la correlación de anticuerpos IgG de DBS eluidos en 250  $\mu$ l. C: Muestra la correlación de anticuerpos IgG de DBS eluidos en 400  $\mu$ l. E: Muestra la correlación de anticuerpos IgA de DBS eluidos en 400  $\mu$ l. B, D y F: Muestran las gráficas de Bland-Altman entre plasma y DBS. B: Compara anticuerpos IgG de plasma y DBS eluidos en 250  $\mu$ l, la media de diferencias es 0.543 y los límites de concordancia -2.41 y 3.50. D: Compara anticuerpos IgG de plasma y DBS eluidos en 400  $\mu$ l, la media de diferencias es 0.674 y los límites de concordancia -2.46 y 3.81. F: Compara anticuerpos IgA de plasma y DBS eluidos en 250  $\mu$ l, la media de diferencias es 0.72 y los límites de concordancia -3.88 y 5.96.

## Discusión

Los resultados de plasma y DBS para la detección de anticuerpos IgG contra el SARS-COV-2 tuvieron buena concordancia, así como una sensibilidad superior a 97% y una especificidad de 100% con ambos volúmenes de elución. La sensibilidad y la especificidad son similares a las descritas en un pequeño estudio ( $n = 20$ ) que reportó una sensibilidad y especificidad de 100% al usar una elución de 500  $\mu$ l.<sup>9</sup> Asimismo, Meyers y colaboradores<sup>10</sup> reportaron una sensibilidad y especificidad de 96.1 y 98.6%, respectivamente, utilizando un círculo de 6 mm, 250  $\mu$ l de elución y un buffer

precalentado a 37 °C con una muestra de 273, en ambos casos con la misma marca comercial que el presente estudio. En un trabajo con 54 muestras, el equipo de Walker determinó un valor de  $r^2 = 0.966$  y una pendiente de  $m = 0.969$ , mostrando una excelente correlación.<sup>11</sup> En nuestro estudio se mejoró la correlación de los anticuerpos IgG al utilizar índices por debajo del valor de 6, por lo que se recomienda hacer una dilución 1:2 del DBS eluido si se detectan concentraciones mayores a 6 de anticuerpos IgG para lograr una mejor cuantificación.

Como se mencionó anteriormente, una de las limitaciones del uso de DBS es la pequeña cantidad de muestra biológica; generalmente se realiza una sola prueba con un "círculo". Por lo tanto, el uso de una elución mayor (400  $\mu$ l) es una alternativa para hacer dos pruebas serológicas de forma simultánea. Es importante considerar que durante la elución el papel filtro absorbe aproximadamente 75-100  $\mu$ l del buffer.

En relación con la detección de anticuerpos IgA, se encontró un índice mayor que los anticuerpos IgG, similar a lo descrito antes.<sup>12-13</sup> Se han informado evaluaciones usando DBS para la detección de IgA, IgM e IgG simultáneamente,<sup>14,15</sup> sin embargo, sólo se encontró un informe para la detección única de IgA por DBS. Dicho estudio mostró una sensibilidad de 83.2% y una especificidad de 96.5%.<sup>16</sup> En el presente reporte se obtuvo una sensibilidad y especificidad cercana al 100% para la detección de IgA, así como una buena correlación entre los índices de anticuerpos en plasma y DBS-250, sin embargo, también se recomienda realizar una dilución 1:2 de la elución del DBS cuando el índice sea mayor a 12 para una cuantificación más precisa.

## Conclusión

El uso de DBS para la detección de anticuerpos IgG e IgA contra el SARS-COV-2 mostró una sensibilidad y especificidad superior a 97%, siendo ligeramente inferior al eluir DBS en 400  $\mu$ l; en consecuencia, se detectó un alto índice de Yamar (considerando simultáneamente sensibilidad y especificidad), así como una alta concordancia (pruebas k). Se puede afirmar que el uso de DBS para la detección y cuantificación de anticuerpos IgG e IgA contra el SARS-COV-2 es factible utilizando el kit comercial Euroimmun.

## Agradecimientos

Damos un reconocimiento especial al personal de salud que participó en el estudio. Agradecemos al Consejo de Ciencia y Tecnología de Morelos, al Centro de Innovación y Transferencia de Tecnología de Morelos y a los Servicios de Salud de Morelos por todas las facilidades brindadas para llevar a cabo el protocolo. Agradecemos también a los directores y personal del laboratorio del Hospital General de Cuernavaca Dr. José G. Parres.

Conflictos de interés: Los autores no reportan conflicto de intereses.

Fuente de financiamiento: este trabajo fue apoyado por la "Convocatoria Innovación-COVID-19", de la Secretaría de Economía del Estado de Morelos.

## Referencias

- Okba, N.M.A., Müller, M.A., Li, W., Wang, C., Geurtsvan Kessel, C.H., Corman, V.M. *et al.*, "Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease patients", *Emerg Infect Dis*, 2020, 26: 1478-1488.
- Enderle, Y., Foerster, K. y Burhenne, J., "Clinical feasibility of dried blood spots: analytics, validation, and applications", *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 25, 130: 231-243.
- Smit, P.W., Elliott, I., Peeling, R.W., Mabey, D. y Newton, P.N., "An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases", *Am J Trop Med Hyg*, 2014, 90: 195-210.
- Déglon, J., Thomas, A., Mangin, P. y Staub, C., "Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications", *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402: 2485-2498.
- Ross, R.S., Stambouli, O., Grüner, N., Marcus, U., Cai, W., Zhang, W. *et al.*, "Detection of infections with hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus by analyses of dried blood spots-performance characteristics of the ARCHITECT system and two commercial assays for nucleic acid amplification", *Virology*, 2013, 10: 72.
- Snijdewind, I.J., Van Kampen, J.J., Fraaij, P.L., Van der Ende, M.E., Osterhaus, A.D. y Gruters, R.A., "Current and future applications of dried blood spots in viral disease management", *Antiviral Res*, 2012, 93: 309-321.
- García-Cisneros, S., Sánchez-Alemán, M.A., Conde-González, C.J., Lara-Zaragoza, S.J., Herrera-Ortiz, A., Plett-Torres, T. *et al.*, "Performance of ELISA and Western blot to detect antibodies against HSV-2 using dried blood spots", *J Infect Public Health*, 2019, 12: 224-228.
- García-Cisneros, S., Olamendi-Portugal, M.L., Herrera-Ortiz, A., Conde-González, C.J., López-Gatell, H. y Sánchez-Alemán, M.A., "Detección de anticuerpos contra VIH a partir de muestras de sangre seca en papel filtro", *Salud Pública Mex*, 2017, 59: 602-603.
- Cholette, F., Mesa, C., Harris, A., Ellis, H., Cachero, K., Lacap, P. *et al.*, "Dried blood spot specimens for SARS-cov-2 antibody testing: a multi-site, multi-assay comparison", *PLoS One*, 2021, 16: e0261003.
- Meyers, E., Heytens, S., Formukong, A., Vercruyssen, H., De Sutter, A., Geens, T. *et al.*, "Comparison of dried blood spots and venous blood for the detection of SARS-cov-2 antibodies in a population of nursing home residents", *Microbiol Spectr*, 2021, 9: e0017821.
- Walker, G.J., Davis, R., Naing, Z., McEntee, B., Lu, Y., Denadija, T. *et al.*, "Serological detection of SARS-COV-2 IGG using commercially available enzyme immunoassays on dried blood spots collected from patients", *Microbiol Spectr*, 2021, 9 (3): e0124521.
- Montesinos, I., Gruson, D., Kabamba, B., Dahma, H., Van den Wijngaert, S., Reza, S. *et al.*, "Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-COV-2 antibodies", *J Clin Virol*, 2020, 128: 104413.
- Rikhtegaran Tehrani, Z., Saadat, S., Saleh, E., Ouyang, X., Constantine, N., DeVico, A.L. *et al.*, "Performance of nucleocapsid and spike-based SARS-COV-2 serologic assays", *PLoS One*, 2020, 15: e0237828.
- Morley, G.L., Taylor, S., Jossi, S., Pérez-Toledo, M., Faustini, S.E., Marcial-Juárez, E. *et al.*, "Sensitive detection of SARS-COV-2-specific antibodies in dried blood spot samples", *Emerg Infect Dis*, 2020, 26: 2970-2973.
- Cook, A.M., Faustini, S.E., Williams, L.J., Cunningham, A.F., Drayson, M.T., Shields, A.M. *et al.*, "Validation of a combined ELISA to detect IGG, IGA and IGM antibody responses to SARS-COV-2 in mild or moderate non-hospitalized patients", *J Immunol Methods*, 2021, 494: 113046.
- Maritz, L., Woudberg, N.J., Bennett, A.C., Soares, A., Lapierre, F., Devine, J. *et al.*, "Validation of high-throughput, semiquantitative solid-phase SARS coronavirus-2 serology assays in serum and dried blood spot matrices", *Bioanalysis*, 2021, 13: 1183-1193.