سنجش آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 به روش الایزا

• حیطه کاربرد :

کیت الایزای SARS-CoV-2 Antigen پیشتازطب، برای تشخیص کیفی وجود آنتی‌ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 از سواپ گرفته شده از نازوفارنکس انسان طراحی شده است. از این کیت به عنوان یک ابزار کمکی در تشخیص بیماران مبتلا به بیماری CO-VID-19 در ترکیب با سایر تظاهرات بالینی به کار می رود.

• مقدمه :

ویروس SARS-CoV-2 که در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین کشف شده و عامل بیماری COVID-19 میباشد، یک کروناویروس RNA دار تک رشته‌ای است. ژنوم این ویروس شباهت بسیاری با دیگر کروناویروسها بالاخص ویروس SARS-CoV و ویروسهای کرونای خفاش دارد. این ویروس در انسان باعث ایجاد عفونت و مشکلات تنفسی شدیدی میشود. پروتئینها(آنتی‌ژنها)ی زیادی در ساختار این ویروس شرکت دارند که شامل آنتی‌ژن spike(S), envelope(E), membrane(M) و nucleocapsid(N) میباشند و تحقیقات نشان داده است آنتی‌ژن N به عنوان فراوانترین آنتی‌ژن این ویروس بهترین گزینه برای استفاده در روشهای تشخیصی ایمونولوژیک میباشد. این ویروس از طریق انتقال فرد به فرد و توسط قطرات (Droplets) تنفسی ایجاد شده با سرفه یا عطسه‌ی بیماران مبتلا به

این عفونت افراد جدید را آلوده میکند.
کیت الایزای SARS-CoV-2 پیشتاز طب با تشخیص کیفی حضور این آنتی ژن از سواپ گرفته شده از نازوفارنکس انسان در بیماران مشکوک میتواند نقش تعیین کنندهای در تشخیص این بیماری داشته باشد.

• اساس آزمایش :

در این کیت چاهکهای پلیت توسط آنتی بادیهای ضد آنتی ژن N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده اند (coating) . در هنگام آزمایش ، نمونه های استخراج شده به داخل چاهکها ریخته می شوند . در صورت وجود آنتی ژنهای SARS-CoV-2 این آنتی ژن به آنتی بادیهای کف چاهک متصل می گردند .
پس از شستشو و خروج مواد اتصال نیافته با افزودن آنتی بادی ضد اپیتوپ دیگر آنتی ژن نوکلئوکپسید که به آنزیم HRP لیبل شده ، در صورت وجود آنتی ژن های نوکلئوکپسید SARS-CoV-2 ، آنتی بادی نشاندار شده نیز به آنها متصل می گردد . پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی ، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است . افزودن محلول متوقف کننده ، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

• محتویات کیت :

۱) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهک های پوشش داده شده با آنتی بادیهای ضد آنتی ژنهای N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2 .

۲) محلول استخراج (Extraction Buffer) : یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول جهت استخراج

آنتی ژن نوکلوکپسید از نمونه سواپ گرفته شده از نازوفارنکس.

۳) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول آنتی بادی ضد آنتی ژن نوکلوکپسید ویروس SARS-CoV-2 متصل شده به آنزیم پراکسیداز .

۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال ۲ میلی لیتری حاوی محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ ، حاوی آنتی ژن نوترکیب نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 .

۵) سرم کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال ۲ میلی لیتری حاوی محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و منفی از نظر آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 .

۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen–Substrate) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

۷) محلول شستشو (Wash Buffer) : یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (۲۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .

۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسید کلرید ریک ۱ نرمال .

۹) یک عدد برچسب مخصوص پلیت .

• مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .

۲) سمپلر های دقیق .

۳) آب مقطر .

۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد

• نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .

۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری کیفی آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS CoV-2 در نمونه استخراج شده از سواپ گرفته شده از نازوفارنکس انسانی طراحی و ساخته شده است .

۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg وآنتی بادیهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

۵) نمونه بیماران، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظرگرفته شوند. تمام محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

• شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .

۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .

۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .

۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید . قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستالها ، ویال را در ۳۷ در جه سانتی گراد قرار دهید . محلول شستشو را به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق نمایید ؛ این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

• جمع آوری و آماده سازی نمونه :

نمونه جمع آوری شده با سواپی از جنس داکرون از ناحیه نازوفارنکس در محیط VTM به حجم یک میلی لیتر استفاده گردد ، نمونه میتواند برای مدت حداکثر ۲ ساعت در دمای محیط، ۱ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد در محیط VTM نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت یک روز (تا

۳ روز) باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

- **آماده سازی اولیه نمونه ها :**

۱) ابتدا سواپ گرفته شده از ناحیه نازوفارنکس بیمار که را داخل لوله مخصوص نمونه گیری که در آن یک سی سی از محلول VTM ریخته شده قرار داده و بشدت حدود یک الی دو دقیقه ورتکس نمایید.

۲) سپس از محلول فوق مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به داخل یک لوله تمیز دیگر انتقال دهید.

۳) سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج را به لوله فوق انتقال داده و بشدت حدود یک الی دو دقیقه ورتکس نمایید.

۴) نمونه ها پس از دو دقیقه استخراج شده و آماده انجام تست می باشند.

۵) نمونه های استخراج شده را بایستی در اسرع وقت تست گذاشت. (حداکثر تا دو ساعت پس از استخراج).

توجه : کنترل های کیت آماده مصرف بوده و نیازی به استخراج ندارند .

- **توضیحات عمومی :**

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .

۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .

۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .

۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .

۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .

۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

• مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .

۲) ۲۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه های استخراج شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید ؛ دو چاهک اول را برای بلانک و دو چاهک بعدی را برای کنترل منفی در نظر بگیرید . سپس کنترل مثبت را به صورت دوپلیکیت ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید ؛ پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

۳) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . **برای شستشو توصیه ما استفاده از دستگاه الایزا واشر اتوماتیک است ؛ چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد .** در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته **سپس ۱۵ ثانیه صبر کرده(Soaking Time)** و بعد چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو ، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی **یک پارچه یا کاغذ نمگیر تمیز** بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید ؛ پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . (همانند بند ۳)

۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen–Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید ؛ چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .

۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمائید . توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به

عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

• ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

– جذب نوری کمتر از۰/۰۵ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .

– جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای کنترل منفی ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری ، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .

– جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

• محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج nm ۴۵۰ می توان استفاده نمود .

۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج nm ۴۵۰ و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm ۶۳۰ بخوانید .

۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .

۳) مقدار Cut-off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۱۵

۴) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی ، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut-off بدست آورید :

Cut-off Index (COI) = OD of sample/Cut-off value

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند . نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱– ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از نمونه سواپ نازوفارنکس تازه مجدداً آزمایش شوند .

• بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود یا مقادیر قابل تشخیص آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 می باشد . جواب مثبت نشان دهنده وجود آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2 می باشد.
نتایج این کیت نباید به عنوان تنها شاخص تشخیص بیماری استفاده شود.
در تفسیر نتایج این کیت باید به وجود علائم بالینی، فاصله زمانی بین شروع علائم و اخذ نمونه و سایر تست های تشخیصی از جمله تست های مولکولی و تصویربرداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس سایر موارد ذکر شده تفسیر شود. در صورت منفی بودن جواب آزمایش و شک به وجود بیماری توصیه می شود نسبت به اخذ نمونه مجدد و تکرار آزمایش پس از یک تا دو روز اقدام شود.
با وجود ویژگی مناسب این کیت، نتیجه مثبت کاذب آنتی ژن ممکن است مربوط به واکنش متقاطع

با آنتی بادیهای هتروفیل و یا دیگر عوامل رخ دهد. نتایج مثبت این کیت باید قبل از تصمیم گیری در مورد نتیجه آزمایش با یافته های بالینی انطباق داده شود.
نتیجه منفی نمیتواند وجود بیماری را رد نماید بویژه در افرادی که علایم بالینی دارند و یا با بیمار مبتلا تماس قبلی داشته است.

• شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۱۳۴ عدد نمونه مثبت تائید شده با روش مولکولی با این کیت آزمایش شدند که در مجموع تعداد ۱۱۸ مورد مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی ژن نوکلئوکپسیدSARS-CoV-2 ، ۸۸ درصد می باشد .

	CT	نمونه های مثبت با روش مولکولی	نمونه های مثبت با کیت الایزای پیشتاز طب زمان	میزان حساسیت به درصد
حساسیت	<۲۵	۸۲	۸۲	٪ ۱۰۰
	<۳۰	۱۳۴	۱۱۸	٪ ۸۸

۲) اختصاصیت : ۱۶۱ عدد نمونه منفی تائید شده با روش مولکولی آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۵۸ نمونه منفی بودند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۸/۱۳ درصد می باشد .

	نمونه های منفی با روش مولکولی	نمونه های منفی با کیت الایزای پیشتاز طب زمان	میزان اختصاصیت به درصد
اختصاصیت	۱۶۱	۱۵۸	٪ ۹۸/۱۳

۳) دقت آزمایش: جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) بوسیله نمونه منفی ،نمونه مثبت ضعیف و یک نمونه مثبت قوی و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله نمونه کنترل ساخته شده از آنتی ژن نوترکیب منفی، ضعیف و مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

آزمون دقت درون سنجی (Intra– assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۶	۰/۰۰۳۷	۶/۱۶
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۳۸۹	۰/۰۲۲	۵/۶۵
نمونه مثبت قوی	۲۰	۱/۴۵	۰/۰۵۷	۳/۹۳

آزمون دقت میان سنجی (Inter– assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه کنترل منفی	۲۰	۰/۰۵۱	۰/۰۰۳۷	۷/۲۵
نمونه کنترل متوسط	۲۰	۰/۴۷۸	۰/۰۳۲	۶/۶۹
نمونه کنترل قوی	۲۰	۲/۲۱	۰/۰۱۲	۵/۴۲

٤) بررسی واکنش متقاطع : برای انجام تعیین واکنش متقاطع از نمونه های مثبت تنفسی ویروسی و باکتریهای تجاری شامل :

نام ویروس جهت بررسی واکنش متقاطع	غلظت نهایی مورد استفاده	نتیجه تست
NL63 (Human coronavirus)	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Influenza A virus	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Influenza B Virus	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Rhinovirus 40	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Human coronavirus (HCoV), 229E	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
OC43	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Human parainfluenza virus 1	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Human respiratory syncytial virus	$2x10^6$ TCID50/ml	No cross reaction
Candida albicands gu5	1/20 dilution	No cross reaction
Staphylococcus salivarius 25975	$0.55x10^8$ CFU	No cross reaction
Streptococcus pyogenes strain Type 1	$0.55x10^3$ CFU	No cross reaction
Staphylococcus epidermidis 12228	$0.55x10^8$ CFU	No cross reaction
Pseudomona aeruginosa 27853	$0.55x10^8$ CFU	No cross reaction
Streptococcus pyogen 19615	$0.55x10^8$ CFU	No cross reaction

مورد بررسی قرار گرفت و هیچ گونه واکنش متقاطعی با این نمونه ها مشاهده نگردید.

۵) بررسی تداخل : برای انجام این تست با استفاده از عوامل مداخله گر بالقوه (هموگلوبین ، آلبومین انسانی و موسین) با غلظت های مشخص از آنها به نمونه استخراج شده از سواپ نازوفارنکس اضافه گردید ، میزان S/C نمونه ها با حالت قبل از افزودن عوامل مداخله گر مقایسه شد. این مطالعه با استفاده از راهنمای NCCLS EP7 انجام شد که نتایج آن در جدول زیر آمده است.

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	تفاوت نتایج (%)
هموگلوبین	۱ mg/ml	۰/۷۹ ۵/۱۳ ۱۱/۷	۰/۸۲ ۵/۲۳ ۱۱/۱	۳/۷۹ ۱/۹۵ -۵/۱۲
آلبومین انسانی	۳۰۰۰ mg/dL	۰/۷۹ ۵/۱۳ ۱۱/۷	۰/۷۶ ۴/۹۲ ۱۰/۸	-۳/۷۹ -۴/۰۹ -۷/۶۹
موسین	۱ mg/ml	۰/۷۹ ۵/۱۳ ۱۱/۷	۰/۷۷ ۵/۳۶ ۱۲/۰	-۲/۵۳ ۴/۴۸ ۲/۵۶

References :

1. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020;92(4):424–32.

2. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgA Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. J Med Virol [Internet]. 2020;0–1. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32104917

3. Li M, Jin R, Peng Y, Wang C, Ren W, Lv F, et al. Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnostic tools. medRxiv. 2020;(1):2020.02.20.20025999.

4. Xia N, Wang G, Gong W. Serological test is an efficient supplement of RNA detection for confirmation of SARS - CoV - 2 infection. Preprints. 2020;(March):1–6.

5. OKBA NMA, Muller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv [Internet]. 2020;2020.03.18.20038059. Available from: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1

6. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Tsoi HW, Fung AMY, Chan KH, et al. Detection of Specific Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. J Clin Microbiol. 2004;42(5):2306–9.

7. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):386–9.

8. Liu L, Liu W, Wang S, Zheng S. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. medRxiv. 2020;2020.03.06.20031856.

9. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv [Internet]. 2020;2020.03.02.20030189. Available from: https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189

10. To KK, Tak O, Tsang Y, Leung W, Tam AR, Wu T, et al. Articles Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2 : an observational cohort study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2020;3099(20):1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1