کیت سنجش آنتی بادیIgG اختصاصی آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 به روش الایزا

• حیطه کاربرد :

کیت الایزایSARS-CoV-2 anti-Spike IgG پیشتاز طب، برای تشخیص کمی وجود آنتی بادیهای IgG علیه آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم انسان طراحی شده است. از این کیت می‌توان برای شناسایی سطح آنتی بادی‌های IgG علیه آنتی ژن Spike در افراد بهبود یافته از بیماری کووید-۱۹ و یا به صورت بالقوه در افراد واکسینه شده با واکسن SARS-CoV-2 استفاده نمود. این کیت فقط برای مصارف تحقیقاتی (Investigational Use Only) بوده و نباید به تنهائی برای موارد تشخیص بالینی مورد استفاده قرار بگیرد.

• 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 ویروس کرونای خفاش دارد. این ویروس در انسان باعث ایجاد عفونت و مشکلات تنفسی شدیدی میشود. پروتئینها (آنتی ژنها)ی زیادی شامل آنتی ژن Spike(S), Envelope(E), Membrane(M) و Nucleocapsid (N) در ساختار این ویروس وجود دارند. تحقیقات نشان داده است، آنتی ژن S به عنوان آنتی ژن حاوی ناحیه RBD(Receptor Binding domain) ایمونوژن ترین

آنتی‌ژن جهت تولید آنتی بادی های مصونیت زا با قابلیت خنثی سازی می باشد که این آنتی بادی ها از اتصال ویروس به گیرنده ACE2 (Angiotensin Converting enzyme) در سطح سلول میزبان و ورود آن به سلول ممانعت می کنند.

کیت الایزای سنجش آنتی بادی IgG اختصاصی آنتی ژن Spike شرکت پیشتاز طب با تشخیص کمی حضور آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن Spike میتواند نقش تعیین کننده ای در تشخیص وجود آنتی بادیهای مذکور در سرم افراد بهبود یافته و همچنین افراد واکسینه شده داشته باشد.

• اساس آزمایش :

در این کیت چاهکهای پلیت توسط آنتی ژنهای Spike ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژن Spike این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. پس از شستشو با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 از نوع IgG، آنتی هیومن IgG 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) پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2.

۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ویال حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها.

۳) محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول آنتی بادی علیه آنتی بادی IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.

۴) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد آماده مصرف حاوی آنتی بادی از نوع IgG علیه آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 با غلظتهای ۰، ۵ , ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ RU/ml در بافر حاوی پروتئین به عنوان پایدار کننده و تیومرسال به عنوان نگهدارنده.
استانداردها به کمک آنتی بادی مونوکلونال انسانی ضد Spike بر مبنای RU/ml ارزش گذاری شده است.

۵) سرم کنترل پایین (Low Control Serum): یک ویال ۲ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی اختصاصی از نوع IgG علیه آنتی ژن Spike در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف) . غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

۶) سرم کنترل بالا (High Control Serum): یک ویال ۲ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی اختصاصی از نوع IgG علیه آنتی ژن Spike در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۵/۰ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف) . غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

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

۸) محلول شستشو (Wash Buffer): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۱۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت

۱/۱۰ رقیق نمایید .

۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال .

۱۰) 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 صرفاً جهت اندازه گیری IgG علیه آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 در سرم 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، استانداردها، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر 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 درجه سانتی گراد قرار دهید. محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ 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 :

سرم را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو 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 :

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .

توجه : کنترلهای کیت و استاندارد ها آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی 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) ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد ، کنترل و نمونه آماده شده را به داخل هر چاهک بریزید (پیشنهاد می گردد که از استانداردها، کنترل ها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو 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 و سپس 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 بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .

۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه 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 .

۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۴)

۷) 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 .

۸) 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 الایزاریدر با فیلتر nm ۴۵۰ استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمائید. توصیه میشود از فیلتر nm ۶۳۰ به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

• محاسبه نتایج :

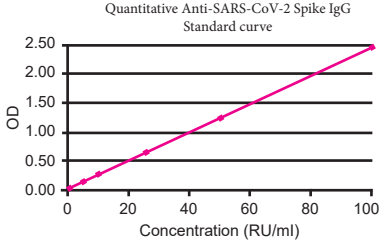
از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج nm ۴۵۰ میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج nm ۴۵۰ (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس nm ۶۳۰) بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

۴) اگر نمونه های مورد آزمایش نتایجی بالاتر از آخرین استاندارد را نشان دادند ، نمونه می بایست با محلول رقیق کننده رقیق گردد و جواب بدست آمده پس از ضرب در فاکتور رقت محاسبه گردد.

استانداردها (RU/ml)	جذب نوری
۰	۰/۰۱۵
۵	۰/۱۲
۱۰	۰/۲۳
۲۵	۰/۵۸
۵۰	۱/۲۵
۱۰۰	۲/۵



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

• ارزشیابی آزمایش :

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

– جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر، 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 ۱/۵ برای استاندارد ۱۰۰.

• مقادیر مورد انتظار:

بر مبنای نتایج حاصل از سنجش آنتی بادی اختصاصی Spike ویروس SARS-CoV-2 در نمونه سرم های افراد نرمال، میانگین و سه برابر انحراف معیار (SD) مبنای تعیین Cut-Off قرار گرفت. بر این اساس Cut-Off معادل (RU/ml)۸ محاسبه شد.

منفی	< 8RU/ml
مثبت	≥ 8RU/ml

• شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل تشخیص :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت آنتی بادی اختصاصی IgG بر علیه آنتی ژن Spike ویروس SARS CoV-2 قابل تشخیص در این کیت ۰/۶ RU/ml می باشد.

۲) حساسیت :

۱۰۹عدد سرم بیمار کووید–۱۹ تائید شده با روش مولکولی، علائم بالینی و تصویر برداری ریه با این کیت آزمایش شدند که ۱۰۷ مورد مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 ، ۹۸/۱۶ درصد می باشد. میانگین غلظت آنتی بادی در افراد بیمار مبتلا به کووید–۱۹، RU/ml ۸۴/۲ ، با ضریب اطمینان ۹۵درصد RU/ml ۹۸/۷–۷۸/۶ می‌باشد.

۳) اختصاصیت :

۱۰۲عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به دوسال قبل از پاندمی کووید–۱۹ که در شرایط مناسب نگهداری شده بود آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۰۱ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۹/۰۱ درصد می باشد. میانگین غلظت آنتی بادی در افراد نرمال ، RU/ml ۱/۴۸ ، با ضریب اطمینان ۹۵درصد RU/ml ۱,۲–۱,۷ می‌باشد.

– نمونه های دارای مقادیر بیش از ۱۰۰RU/ml می بایست توسط محلول رقیق کننده نمونه رقیق گردد و نتیجه حاصل در فاکتور رقت ضرب گردد.

– در صورت تمایل گزارش ارزش نمونه ها بصورت تیتراسیون می توان نمونه ها را با محلول رقیق کننده بصورت سریالی رقیق نموده و تیتر مثبت بر اساس میزان Cut-off گزارش گردد.

٤)صحت :

تعداد ۴۰ نمونه بیمار و ۳۲ نمونه نرمال قبل پاندمی به طور همزمان با کیت الایزای SARS-CoV-2 anti–Spike IgG پیشتاز طب و کیت تجاری معتبر تست شدند. میزان توافق کلی ۹۸/۶ درصد بین دو کیت محاسبه گردید. ضمنا نتایج حاصله بیانگر همبستگی ۹۹/۶ بین نتایج دو کیت می باشد.

با استفاده از کیت پیشتاز طب رقت های سریالی از ماده مرجع WHO-NIBSC ۲۰/۱۳۶ تست شد. اعداد

بالاتر از ۱بر مبنای RU/ml برای تبدیل به(Binding Antibody Unit per milliliter (BAU/ml می‌بایست در فرمول y=3x+20 قرار داده شود. در این فرمول X معادل اعداد بدست آمده برای RU/ml و y معادل نتیجه بر حسب BAU/ml می باشد.

جهت بررسی صحت کیت با استفاده از مواد رفرانس WHO-NIBSC ۲۰/۱۴۰, ۲۰/۱۴۲, ۲۰/۱۴۴, ۲۰/۱۴۸، صحت عملکردی کیت در شناسایی نمونه های مثبت و منفی تایید شد نتایج طبق جدول زیر می باشد:

نتایج حاصل از کیت پیشتاز (RU/ml)	نتایج تبدیل واحد شده از کیت پیشتاز (BAU/ml)	مقدار اعلام شده آنتی بادی IgG ضد Spike توسط NIBSC (BAU/ml)	NIBSC code
۸/۲	۴۴/۶	۴۶	۲۰/۱۴۰
<۰	۰	Negative	۲۰/۱۴۲
۹/۵	۴۸/۵	۵۰	۲۰/۱۴۴
۷۲	۲۳۶	۲۴۱	۲۰/۱۴۸

– برای کیت الایزای SARS-CoV-2 anti-Spike IgG پیشتاز طب بر مبنای ماده مرجع WHO-NIBSC:۲۰/۱۳۶ مقدار Cut-off معادل BAU/ml ۴۴ می‌باشد. موارد بالای BAU/ml ۴۴ به عنوان نمونه مثبت از نظر حضور آنتی بادی IgG ضد Spike محسوب می گردد. موارد بالای ۸RU/ml به عنوان نمونه مثبت از نظر حضور آنتی بادی IgG ضد Spike محسوب می گردد.

۵)دقت آزمایش :

جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله یک نمونه سرمی منفی و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف و یک نمونه سرمی مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است .

آزمون دقت درون سنجی (Intra–assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (RU/ml)	SD	CV (%)
نمونه منفی	۲۰	۵/۱	۰/۳۶	۷/۰۵
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۲۷/۴	۱/۷	۶/۲
نمونه مثبت قوی	۲۰	۵۳/۶	۲/۷	۵/۰۴

آزمون دقت میان سنجی :(Inter– assay)

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (RU/ml)	SD	CV (%)
نمونه منفی	۲۰	۵/۵	۰/۴۳	۷/۸۱
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۲۶/۷	۱/۸	۶/۷۴
نمونه مثبت قوی	۲۰	۵۵/۹	۳/۱	۵/۵۴

٦) واکنش متقاطع :

واکنش متقاطع سرمی با سرم های مثبت از نظر آنتی بادی ضد نوکلئوکپسید SARS-CoV-2 که فاقد آنتی بادی ضد آنتی ژن S این ویروس بودند (تعداد= ۵) و آنتی بادی های علیه HCV (تعداد= ۱۰) ، HBV (تعداد= ۱۰) و HIV (تعداد= ۱۰) مشاهده نشد.

۷) تداخل :

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله گر هموگلوبین، تری گلیسرید و بیلی روبین اضافه و تغییرات میزان ارزش نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله‌گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر (RU/ml)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله‌گر (RU/ml)	تفاوت نتایج(٪)
هموگلوبین	1mg/ml	7.6 53.6 10.3	7.3 53.8 10.6	-3.94 0.37 2.91
تری گلیسرید	3000mg/dL	7.6 53.6 10.3	7.8 54.1 10.1	2.63 0.93 -1.94
بیلی روبین	20mg/dL	7.6 53.6 10.3	7.4 55.1 10.6	-2.63 2.79 2.91

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-IgG 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 ClinMicrobiol. 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.