سنجش آنتی بادی IgM اختصاصی علیه ویروس SARS-CoV-2 به روش Capture الایزا

• حیطه کاربرد :

کیت الایزایSARS-CoV-2 IgM Capture پیشتاز طب، برای تشخیص کیفی وجود آنتی بادی های IgM علیه ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمکی در تشخیص بیماران مبتلا به بیماریCOVID-19 در ترکیب با سایر تظاهرات بالینی به کار می رود. این کیت فقط برای مصارف تحقیقاتی (Investigational use only) بوده و نباید به تنهایی برای 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 کورونا ویروس RNA دار تک رشته‌ای است. ژنوم این ویروس شباهت بسیاری با دیگر کوروناویروس‌ها بالاخص ویروس SARS–CoV و ویروس‌های کورونای 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. تحقیقات نشان داده است هوموتریمرهای پروتئین S که یک پروتئین به شدت گلیکوزیله شده می باشد نقش مهمی در ورود ویروس با اتصال به گیرنده هدف در

سطح سلول بازی می کند. به نظر می‌رسد پروتئینS نقش اصلی را در تعامل با سلول‌های میزبان دارد. از این رو ، پروتئین S بخصوص قطعه RBD (Receptor-Binding Domain) دارای ویژگی ایمنوژنیسیته بسیار بالایی است که منجر به تولید طیف متنوعی از آنتی بادی های خنثی کننده می شود. دمین پروتئین میخک S1 (spike) ، برای تشخیص سرولوژیکی آنتی بادی های SARS-CoV-2 از پروتئینهای S با طول کامل بسیار محافظت شده، اختصاصی تر است. از طرف دیگر ، آنتی ژن N به عنوان یکی از فراوان ترین آنتی ژن‌های این ویروس بهترین گزینه برای استفاده در روش های تشخیصی ایمونولوژیک می باشد. این ویروس از طریق انتقال فرد به فرد و توسط قطرات (Droplets) تنفسی ایجاد شده با سرفه یا عطسه ی بیماران مبتلا به این عفونت افراد جدید را آلوده می کند.

سیستم ایمنی انسان در مقابله با این ویروس دو نوع آنتی‌بادی IgM و IgG را تولید و به سیستم گردش خون وارد میکند. وجود آنتی‌بادیهای IgG وIgM علیه این ویروس نشان دهنده‌ی تماس فرد با ویروس و ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بدن بر علیه ویروس می باشد.

کیت های الایزای SARS-CoV-2 پیشتاز طب با تشخیص کیفی حضور این آنتی بادی ها در سرم یا پلاسمای بیماران مشکوک می تواند نقش تعیین کننده ای در تشخیص این بیماری داشته باشد.

• اساس آزمایش :

این کیت به روش Antibody capture طراحی شده است . چاهک های پلیت با Anti-human IgM antibody پوشانده شده اند. در هنگام آزمایش ، نمونه‌ها در داخل چاهک رقیق می‌شوند. داخل چاهکها ریخته می شوند. تمامی IgM های موجود در نمونه سرم (از جمله IgM های ضد SARS-CoV-2) به آنتی بادیهای کف چاهک متصل می شوند. پس از شستشوی اولیه ، آنتی بادیهای باند نشده جدا شده و در مرحله بعد کنژوگه کیت که شامل آنتی ژن‌های نوکلئوکپسید

N و اسپایک S ویروس SARS-CoV-2 کنژوگه شده با HRP می باشد، اضافه می گردد که آنتی ژن‌های فوق به IgM اختصاصی SARS-CoV-2 متصل شده و ایجاد کمپلکس می نماید . پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی ایجاد شده ، 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 Anti- human IgM .

۲) محلول آنزیم کنژوگه غلیظ ۲۰ x (Enzyme conj. 20x) : ویال حاوی آنتی ژنهای N و S ویروس، نشاندار شده با پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده .

۳) محلول رقیق کننده کنژوگه (Conj. Diluent) : ویال حاوی محلول بافری دارای پروتئین و نگهدارنده .

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

۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control): ویال حاوی محلول بافری ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده ، حاوی آنتی بادی IgM علیه SARS-CoV-2 .

۶) سرم کنترل منفی (Negative Control) : ویال حاوی محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgM علیه SARS-CoV-2.

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

۸) محلول شستشو (Wash Solution) : ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) . دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین .

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

۱۰) برچسب مخصوص پلیت .

توجه: لطفا برای آگاهی از مقادیر و حجم محتویات کیت به جدول محتویات داخل جلد بروشور مراجعه نمایید.

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

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

۲) سمپلر های ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق .

۳) بن ماری یا انکوباتور $37\ ^{o}C$.

۴) آب مقطر .

• نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

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

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

۳) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti SARS-CoV-2 IgM در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .

۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg وآنتی بادیهای ضد 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 نظر گرفته شوند. تمامی 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 یا پلاسما 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 محلولها :

جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید .

توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .

• آماده سازی محلول کونژوگه :

محلول کنژوگه آماده مصرف : برای تهیه مقدار کنژوگه مورد نیاز ، کنژوگه غلیظ را توسط محلول

رقیق کننده کنژوگه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید . بطور مثال برای تهیه ۱میلی لیتر محلول کنژوگه آماده مصرف ، ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کنژوگه غلیظ را با ۹۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده کنژوگه به خوبی مخلوط نمایید .

• 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) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده نمونه را به تمام چاهک ها اضافه کنید . سپس ۵۰ میکرو لیتر از کنترل ها و نمونه ها 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. پلیت را به آرامی به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید تا نمونه‌ها و کنترل‌ها به خوبی با محلول رقیق کننده مخلوط شوند، پس از پوشاندن چاهک‌ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهک‌ها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید .

۳) 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 .

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را داخل چاهکها به استثنای چاهک های 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 الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. 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 از ۰/۰۵ 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 ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .

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

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 + ۰/۲۰

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 سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

• بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی بادی IgM علیه SARS-CoV-2 می باشد. جواب مثبت نشان دهنده وجود آنتی بادی IgM علیه SARS-CoV-2 می باشد. با توجه به اینکه پاسخ سیستم ایمنی بدن در واکنش به عفونت ویروس عامل COVID-19 تاخیری است، نتیجه منفی آزمایشهای سرولوژی مبتنی بر آنتی بادی، عفونت SARS-CoV-2 را رد نمیکند (منفی کاذب). خصوصاً در افرادی که در تماس و مواجهه با ویروس قرار داشته اند. **به منظور رد عفونت در چنین افرادی، باید آزمایشهای پیگیرانه با استفاده از روشهای تشخیص مولکولی انجام شود.**

نتایج این کیت نباید به عنوان تنها شاخص تشخیص بیماری استفاده شود.

در تفسیر نتایج این کیت باید به نتیجه تست IgG و همچنین وجود علائم بالینی، فاصله زمانی بین شروع علائم و اخذ نمونه خون و سایر تست های تشخیصی از جمله تست های مولکولی و تصویربرداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس سایر موارد ذکر شده تفسیر گردد.

با وجود ویژگی مناسب این کیت، نتیجه مثبت کاذب آنتی بادی IgM ممکن است مربوط به واکنش متقاطع با آنتی بادی های از قبل تولید شده 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.

از آنجا که افراد حامل ویروس، در سیر عفونت و بیماری، میتوانند هم پاسخ آنتی بادی منفی و هم مثبت داشته باشند، نتایج آزمایش آنتی بادی نباید به تنهایی برای تشخیص بیماری و یا رد عفونت با SARS-CoV-2 و یا تعیین و اعلام وضعیت عفونت (infection status) مورد استفاده قرار گیرد (مثبت و منفی کاذب).

با توجه به اینکه از طریق آزمایش نمونه های سرمی آرشیوی مربوط به ماهها پیش از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، مشخص شده است که کورونا ویروسهایی نظیر OC43 ,NL63 ,HKU1 229E ممکن است باعث نتایج مثبت آزمایش سرولوژی شوند، این احتمال وجود دارد که نتیجه مثبت یک فرد ناشی از عفونت فعلی و یا قدیمی با کورونا ویروس‌های غیر از SARS-CoV-2 باشد. از

آنجائیکه دسترسی به نمونه کورونا ویروس‌های یاد شده برای تولید کننده میسر نبود، این مورد در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرد (مثبت کاذب).
نتیجه منفی نمی تواند وجود بیماری را رد نماید بویژه در افرادی که علایم بالینی دارند و یا با بیمار مبتلا تماس قبلی داشته است.
این تست برای غربالگری و بیماریابی و یا استفاده در سرویس های انتقال خون طراحی نشده است.

• شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : تعداد ۹۱ نمونه سرم در روزهای مختلف پس از شروع علایم بالینی از ۵۹ بیمار دارای علایم بالینی بستری در بیمارستان که تست RT-PCR مثبت داشتند گردآوری گردید . مدت زمان شروع علایم بالینی تا زمان اخذ نمونه از ۲ تا ۳۰ روز بود . علاوه بر این تعداد ۳۴ نمونه سرم از افراد بهبود یافته از بیماری که دارای علایم بالینی بوده و تست RT-PCR مثبت داشتند گرفته شد . تمامی نمونه ها با کیت مورد ازمایش قرار گرفت . حساسیت کیت بر اساس یافته های حاصل شده در جدول زیر آمده است .

روز بعد از شروع علایم بالینی	تعداد نمونه	موارد مثبت	موارد منفی	حساسیت ٪ (حدود اطمینان ۹۵درصد)
۰-۶ روز	۲۶	۸	۱۸	۳۰/۷ (۱۳-۴۸/۵ ٪)
۷-۱۴ روز	۴۸	۴۱	۷	۸۵/۴ ٪ (۷۵/۴ – ۹۵/۴ ٪)
بیشتر از ۱۵ روز	۵۱	۴۰	۱۱	۷۸/۴ ٪ (۶۷/۱-۸۹/۷٪)

۲) اختصاصیت : ۵۵۶ عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به یک تا دوسال قبل که در شرایط مناسب نگهداری شده بود آزمایش شدند که با روش این کیت ۵۵۳ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۹/۴ درصد(با حدود اطمینان ۹۵ درصد معادل٪۱۰۰– ۹۸/۸) می باشد .

۳) 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 جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۴۶	۰/۰۰۳	۶/۵
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۳۴	۰/۰۲	۵/۸
نمونه مثبت قوی	۲۰	۱/۳۷	۰/۰۶	۴/۳

آزمون دقت میان سنجی (Inter– assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۴۸	۰/۰۰۴	۸/۳
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۳۵	۰/۰۲۴	۶/۸
نمونه مثبت قوی	۲۰	۱/۳۴	۰/۰۸۷	۶/۵

٤) 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 S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

جدول نتایج:

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	۷/۴ ۱/۸ ۰/۵	۷/۳ ۱/۷ ۰/۴۸	−۱/۳ −۵/۶ −۴/۰
تری گلیسرید	۳۰۰۰ mg/dL	۷/۴ ۱/۸ ۰/۵	۷/۵ ۱/۸۵ ۰/۵	۱/۳ ۲/۷ ۰/۰
بیلی روبین	۲۰ mg/dL	۷/۴ ۱/۸ ۰/۵	۷/۴ ۱/۸۷ ۰/۵۳	۰/۰ ۳/۸ ۶/۰

علاوه بر این تعداد ۱۴ نمونه با تست ANA مثبت و ۲۰ نمونه مثبت با تست انتی بادی آنفلوانزا با روش HI (نمونه های پس از واکسیناسیون) با کیت مورد آزمایش قرار گرفت و همه نمونه‌ها از نظر انتی بادی IgM با این کیت منفی گزارش شدند .

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 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