บทปริทัศน์

Review Article

แนวทางชุดตรวจสำเร็จไวรัสก่อโรคโควิด-19

In Vitro Point-of-Care Diagnostic Assays for SARS-CoV-2 (COVID-19)

นราพร สมบูรณ์นะ[*] *ปวีณา อุยิง*[*] *วิชนันท์ วรรณศรีจันทร์*[†] *ณัฐกมล ธรณีนิติญาณ*[*]
ธนวันต์ อาชาวงศ์[*] *กรพินธุ์ สุภัทรนิยพงศ์*[*] *กฤติน วีระโสภณ*[*] *ชวิศา ขยันการ*[*]
Edo Danilyan[‡] *Michael Einstein Hermanto*[†] *ศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล*[*]
Naraporn Somboonn[*] *Paweena Ouying*[*] *Wichanan Wannasrichan*[†] *Natkamol Thoraneenitiyan*[*]
Thanawan Achawong[*] *Kornpin Supatniyapong*[*] *Kittin Weerasopon*[*] *Chavisa Khayunkan*[*]
Edo Danilyan[‡] *Michael Einstein Hermanto*[†] *Supasek Kadkankla*[*]

[*]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
[*]Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok
[†]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
[†]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok
[‡]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร
[‡]Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok

Corresponding author e-mail address: naraporn.s@chula.ac.th

Received: August 11, 2020
Revised: September 15, 2020
Accepted: September 24, 2020

Abstract

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes the currently pandemic contagious coronavirus disease 2019 known as COVID-19 disease in Thailand and worldwide. Development of diagnostic methods to reach people at the regional and local settings quickly and inexpensively are thereby necessary to help stop the spread of the COVID-19 infected people. The standard conventional diagnosis of COVID-19 in laboratory is using reverse transcription followed quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) techniques, which is specific and accurate but requires a high-priced analytical equipment and long-time analysis. Therefore, the invention and development of the SARS-CoV-2 (COVID-19) test kit for the local and point-of-care detection will help resolve these problems. Now, the COVID-19 test kits are classified by the detection of viral genetic material in respiratory secretions, and the detection of human blood immunity (immunoglobulin: Ig). This article presents information and details about these COVID-19 test kits, including limitations and ongoing researches for the more effective COVID-19 test kit.

Keywords: Coronavirus disease 2019 (COVID-19), point-of-care detection kit, *in vitro* diagnosis
Buddhachinaraj Med J 2020;37(2):247-57.

บทคัดย่อ

ไวรัสโควิด-19 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) ก่อให้เกิดโรคติดต่อ coronavirus disease 2019 (COVID-19) ที่กำลังระบาดในประเทศไทยและทั่วโลก โดยมีอัตราการแพร่กระจายโรคสูงมาก ดังนั้นการพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคให้สามารถเข้าถึงในระดับภาคสนามและท้องถิ่นรวดเร็วและราคาไม่แพงจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยหยุดยั้งการแพร่ระบาดของโรค ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยไวรัสก่อโรคโควิด-19 ด้วยวิธีมาตรฐานระดับห้องปฏิบัติการคือ RT-qPCR ซึ่งมีความจำเพาะและแม่นยำ แต่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ เครื่องมือมีราคาสูง และใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ค่อนข้างนาน ดังนั้นการคิดค้นพัฒนาชุดตรวจสำเร็จจึงเป็นอีกหนึ่งหนทางที่ช่วยให้การวินิจฉัยโรคโควิด-19 ได้รวดเร็วและทั่วถึง ซึ่งปัจจุบันได้วิจัยและพัฒนาชุดตรวจสำเร็จจำหน่าย โดยแบ่งเป็นการตรวจสารพันธุกรรมในสารคัดหลั่งทางเดินหายใจและการตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดของผู้ป่วย บทความนี้ได้นำเสนอข้อมูลและรายละเอียดของหลักการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จไวรัสก่อโรคโควิด-19 สนับสนุนความเข้าใจในการตรวจวินิจฉัยโรค รวมถึงข้อสนเทศเกี่ยวกับชุดตรวจสำเร็จและแนวทางนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จไวรัสก่อโรคโควิด-19 ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: โควิด-19, ชุดตรวจสำเร็จ, การวินิจฉัยในหลอดทดลอง (ภายนอกร่างกายมนุษย์)
พุทธชินราชเวชสาร 2563;37(2):247-57.

บทนำ

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ซึ่งก่อโรคโควิด-19 เป็นไวรัสที่อยู่ในลำดับ (order) *Nidovirales*, สกุล (family) *Coronaviridae,* สกุลย่อย (subfamily) *Coronavirinae* และจีนัส (genus) *Betacoronavirus* พันธุกรรม (genome) ของไวรัสนี้เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดบวก (positive-sense ssRNA) มีขนาด 29,903 ลำดับเบส วงจรชีวิตเริ่มต้นด้วยยีน *open reading frame 1a (ORF1a)* และ *ORF1ab* แสดงออกเป็นโปรตีน replicase polyprotein 1a (pp1a) และ pp1ab ซึ่งถูกตัดได้เป็นโปรตีน 16 ตัวที่ประกอบกันเป็น RNA replicase-transcriptase complex เพื่อสังเคราะห์สารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดลบและเป็นต้นแบบของการผลิตอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวชนิดบวกเป็นวัฏจักรต่อไป เพื่อใช้ในการ transcription ได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ DNA ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของขั้นการแสดงออกของโปรตีน (translation) คำว่า “corona” มาจากภาษาละตินแปลว่ามงกุฎซึ่งเป็นลักษณะของโปรตีน spikes ที่อยู่ล้อมรอบอนุภาคไวรัสสกุลย่อยนี้ การเข้าเซลล์เจ้าบ้านจะผ่านการจับกันระหว่างโปรตีน spikes บนไวรัสและโปรตีนตัวรับบนเซลล์เจ้าบ้าน (มนุษย์) แล้วไวรัสเข้าสู่เซลล์[1-3]

ปัจจุบันได้ค้นพบไวรัสโคโรนาทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ α, β, γ และ δ ซึ่งที่มีรายงานและตรวจพบในมนุษย์มี 2 สายพันธุ์ คือ *สายพันธุ์* α ได้แก่ human coronavirus 229E (HCoV-229E) และ NL63 กับ*สายพันธุ์* δ ได้แก่ Middle East respiratory syndrome virus (MERS-CoV), SARS-CoV, HCoV-OC43 และ HCoV-HKU1[4] ไวรัสโคโรนาเคยระบาดวงกว้างในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา โดยไวรัสกลุ่มนี้ทำให้ผู้ติดเชื้อเกิดภาวะ severe acute respiratory syndrome (SARS) ระบาดใน ค.ศ. 2002-2003 มีผู้ติดเชื้อสะสมรวม 8,096 คน และมีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 11 และ Middle East respiratory syndrome (MERS) ในค.ศ. 2012-2014 พบผู้ติดเชื้อมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 36[5-8] และในปี ค.ศ. 2019 เริ่มมีรายงานการเกิดโรคปอดบวมโดยไม่ทราบสาเหตุในเมืองอู่ฮั่น ประเทศจีน ในวันที่ 31 ธันวาคมและองค์กรอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้ประกาศการระบาดของไวรัสโคโรนาสายพันธุ์ใหม่ SARS-CoV-2[9] และจากผลการวิเคราะห์จีโนมคาดว่าอาจมีต้นตอมาจากค้างคาวในประเทศจีนเนื่องจากพบความเหมือนกันของลำดับสารพันธุกรรมระหว่าง SARS-CoV-2 และโคโรนาไวรัสในค้างคาวสูงถึงร้อยละ 96[10] ขณะที่พบความเหมือนกันของลำดับสารพันธุกรรมระหว่าง SARS-CoV-2 กับ SARS-CoV ร้อยละ 79.6 และกับ MERS-CoV ร้อยละ 50 ตามลำดับ[3,11]

การติดต่อของไวรัสโควิด-19 แพร่กระจายผ่านทางอากาศ (airborne transmission) และ droplets infection เช่น การสนทนา การไอ การจาม เมื่อสูดดมหรือสัมผัสกับสารคัดหลั่ง, น้ำลาย, น้ำมูก รวมถึงการอยู่ใกล้หรือสัมผัสกับผู้ป่วยก็จะติดเชื้อ ถ้าผู้ป่วยไอหรือจามใส่มือแล้วไปจับสิ่งของต่าง ๆ ไวรัสชนิดนี้จึงติดต่อและแพร่กระจายได้ง่าย โดยเฉพาะสถานที่ปิด เช่น สนามมวย, ผับ, บาร์, โบสถ์[1] ซึ่งมีรายงานการแพร่ระบาดครั้งแรกที่ตลาด Huanan seafood wholesale เมื่อปลายปี ค.ศ. 2019[12] และแพร่กระจายเป็นวงกว้างกว่า 200 ประเทศทั่วโลกเมื่อสิ้นเดือนสิงหาคม ค.ศ. 2020 โดยมีอัตราการเสียชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 3.5[13] และจากรายงานพบว่าไวรัสโควิด-19 สามารถติดต่อและแพร่ระบาดในอัตราที่สูงกว่า SARS-CoV และ MERS-CoV[14]

อาการของผู้ป่วยโควิด-19 มีตั้งแต่ไม่มีอาการ มีอาการระดับไม่รุนแรง เช่น มีไข้ ไอ (มีหรือไม่มีเสมหะ) เจ็บคอ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ หรือปวดหัว จนถึงอาการระดับรุนแรง เช่น ปอดบวม (pneumonia) จนถึงปอดบวมขั้นรุนแรง (severe pneumonia) เหล่านี้ทำให้เกิดอาการหายใจลำบาก หายใจถี่ ผู้ที่มีอาการดังกล่าวจำเป็นต้องตรวจสอบทรวงอกด้วย computerized/ tomography (CT) scan ซึ่งเป็นวิธีการวินิจฉัยโรคผ่านการถ่ายภาพ อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยด้วย CT scan มีราคาสูงและเป็นการวินิจฉัยหลังมีอาการทางปอดแล้วทำให้การรักษาล่าช้า รวมถึงความยากของการอ่านแปลผลเนื่องจากความเสียหายของปอดจากสาเหตุอื่น อาทิ แบคทีเรียก่อโรคปอดบวมสายพันธุ์อื่นก็ได้[15-16] ดังนั้นวิธีการวินิจฉัยที่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัสโควิด-19 ที่รวดเร็วและเข้าถึงง่ายจึงจำเป็นเพื่อควบคุมและรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีมาตรฐานการตรวจโควิด-19 ในห้องปฏิบัติการ

Reverse transcription, quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) เป็นเทคนิคประยุกต์จากเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase-chain reaction: PCR) ซึ่งเป็นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (ผลิตภัณฑ์เป้าหมายเพิ่มแบบสองยกกำลัง กล่าวคือ 30 รอบจากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 เส้นจะได้ปริมาณผลิตภัณฑ์ 2 ยกกำลัง 30) จึงทำให้การตรวจจับมีความไวและจำเพาะ และเพิ่มเติมคือเทคนิค qPCR อาศัยเครื่อง real time PCR thermal cycler และใช้การติดสีฟลูออเรสเซนต์กับผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบเป็นการติดตามปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่แสดงสีฟลูออเรสเซนต์[17] ซึ่งปัจจุบันเทคนิค RT-qPCR ถูกใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 โดยขั้น RT เปลี่ยนสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสโควิด-19 ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเรียกว่า complementary DNA (cDNA) สำหรับเทคนิค qPCR เพื่อเพิ่มและระบุปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอเป้าหมายแบบจำเพาะ ทั้งนี้ในการตรวจไวรัสโควิด-19 นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่เลือกใช้ยีน *ORF1ab* และ *N* ซึ่งมีความจำเพาะต่อจีโนมของไวรัสโควิด-19 และไม่เกิดปฏิกิริยาร่วม (cross reaction) กับ coronavirus สายพันธุ์อื่น โดยประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ยีน *ORF1ab* คือ 99.6% และ *N* คือ 95.4% ตามลำดับ ทั้งนี้กรรมวิธีการตรวจ one-step RT-qPCR กล่าวคือรวมขั้น RT และ qPCR ในหนึ่งขั้นตอน ใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาทีต่อยีน[18] โดยวิเคราะห์ยีน *N* พร้อมกับการวิเคราะห์ยีน *ORF1ab* เพื่อยืนยันการติดเชื้อ (confirmatory)[19]

อย่างไรก็ดีวิธี one-step RT-qPCR ยีน *N* และ *ORF1ab* มีขั้นตอนและเครื่องมือที่ยุ่งยาก ไม่เหมาะสมในการตรวจระดับท้องถิ่นและภาคสนาม จึงเป็นที่มาของการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จโควิด-19 ซึ่งนำเสนอในบทความนี้ประกอบด้วยข้อมูลรายละเอียดและข้อสนเทศเกี่ยวกับวิธีการวินิจฉัยในชุดตรวจสำเร็จโควิด-19 โดยแยกเป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสและการตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน และแนวทางการพัฒนาต่อยอดที่มุ่งหวังให้ความไวและความจำเพาะเทียบเท่าวิธีอ้างอิง RT-qPCR ยีน *N* และ *ORF1ab* แต่ให้ผลเร็ว ราคาไม่แพง อีกทั้งสามารถตรวจเองได้ในระดับท้องถิ่นและ ณ จุดตรวจ

วิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโควิด-19 ในชุดตรวจสำเร็จ

Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) หรือแลมป์

เทคนิคแลมป์ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2543 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะภายใต้บริษัท Eiken Chemical ประเทศญี่ปุ่น[20] โดยใช้หลักการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิเดียว (isothermal amplification) คือ 57-65 องศาเซลเซียส โดยอาศัยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถเติมนิวคลีโอไทด์ด้วยการแทนที่ดีเอ็นเอบนสายคู่สมเดิม (strand displacement) ด้วยเหตุนี้ในปฏิกิริยาจึงไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียสเพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกัน และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง thermal cycler หรือ PCR machine ดังเช่นในวิธี PCR และโอลิโกนิวคลีโอเทด์-ไพรเมอร์ 4-6 เส้น นอกจากนี้สารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสามารถตรวจได้ด้วยการวัดความขุ่น การวัดสีที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-เบส หรือการวัดปริมาณด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ[21-22] ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ เทคนิคนี้จึงเหมาะอย่างยิ่งสำหรับการตรวจระดับท้องถิ่นหรือภาคสนามที่ไม่มีเครื่องมือใดๆ โดยในช่วงแรกนั้นเทคนิคแลมป์ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ต่อมาได้พัฒนาให้สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอได้โดยอาศัยกระบวนการ reverse transcription (RT) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ดังเช่นใน one-step RT-qPCR ในการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสที่เป็นสายเดี่ยวให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ก่อน และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังกล่าวโดยใช้เทคนิคแลมป์ ซึ่งเทคนิคแลมป์นั้นต้องการเพียงเครื่องมือที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของปฏิกิริยาให้คงที่ในช่วง 57-65 องศาเซลเซียสเท่านั้น

กรรมวิธี RT-LAMP เป็นเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำ[10,20] แต่ค่าใช้จ่ายต่ำ ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ ไม่ต้องการอุปกรณ์เครื่องมือที่ซับซ้อน และสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 เช่น Yan และคณะ[22] ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *ORF1ab*และ *N* (ยีน *N* แสดงเป็นโปรตีน nucleocapsid ของโครงสร้างไวรัส), Lamb และคณะ[23] สามารถลดระยะเวลาในการตรวจเหลือเพียงน้อยกว่า 30 นาทีและตรวจไวรัสได้แม้มีอาร์เอ็นเอเริ่มต้นเพียง 1.02 เฟมโตกรัม, ส่วนกลุ่มวิจัยของ Yu และคณะ[24] สามารถลดระยะเวลาในการตรวจให้เหลือเพียง 25 นาทีและใช้ตัวบ่งชี้ค่าความเป็นกรด-เบสในการแปลผลด้วยสีด้วยตาเปล่า ในปัจจุบันจึงได้มีชุดตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค RT-LAMP จำหน่ายอย่างกว้างขวาง อาทิ Loopamp RNA Amplification Kit ของบริษัท Eiken Chemical Co., Ltd. (เมืองโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น) และ WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA) ของบริษัท New England BioLabs (รัฐแมสซาชูเซตส์ ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยทั้งสองผลิตภัณฑ์นี้รวมขั้น RT และ LAMP ในหนึ่งขั้นตอนและชุดตรวจ WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA) ยังมีความพิเศษที่ใช้เอนไซม์ *Bst* 3.0 DNA polymerase ที่นอกจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สูงแล้วยังเร่งปฏิกิริยา reverse transcription สามารถเปลี่ยนสายอาร์เอ็นเอไปเป็นสายดีเอ็นเอได้อีกด้วย เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน RT-qPCR เทคนิคแลมป์สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยอุณหภูมิเดียวจึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง อีกทั้งการอ่านผลยังสามารถทำได้ง่ายด้วยตาเปล่า จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญดังเช่นวิธีมาตรฐาน

Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

เทคนิค RPA ถูกพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2549 โดย Piepenburg และคณะ[25] ภายใต้บริษัท ASM Scientific (ในปัจจุบันคือบริษัท TwistDx™ Limited เมืองเคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ) หลักการของเทคนิค RPA อาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ recombinase ที่สามารถสร้างโมเลกุลเชิงซ้อนกับไพรเมอร์ (recombinase-primer complex) ในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวเพื่อให้บริเวณคู่สมของไพรเมอร์บนสายแม่แบบเปิดออก แทนที่จะใช้การเพิ่มอุณหภูมิอย่างในเทคนิค PCR จากนั้นโปรตีนเกาะสายเดี่ยวชื่อ single strand DNA binding protein (SSB) จะเข้าไปจับที่ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ว่างอยู่เพื่อป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอทั้งสองสายเข้าจับกันใหม่

แล้วกลายเป็นดีเอ็นเอสายคู่อีก หลังจากนั้นโมเลกุลเชิงซ้อนดังกล่าว (recombinase-primer complex) จะหลุดออกจากกันและถูกแทนที่ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase บนดีเอ็นเอสายเดี่ยว ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม และเนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นคล้ายคลึงกับในเซลล์มนุษย์ อุณหภูมิที่ใช้ในเทคนิคอาร์พีเอจึงอยู่ที่ช่วง 37-42 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือควบคุมอุณหภูมิ นอกจากนี้มีรายงานว่าเทคนิคนี้มีความจำเพาะและความไวสูงถึงแม้จะมีดีเอ็นเอเป้าหมายน้อยกว่า 10 สำเนาก็สามารถตรวจพบได้[25]

เทคนิค RPA จึงเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่น่าสนใจในการประยุกต์และพัฒนาสำหรับชุดตรวจวินิจฉัยไวรัสโควิด-19 เนื่องจากราคาไม่แพง รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และสามารถทำได้ที่อุณหภูมิร่างกายมนุษย์ (เช่น หนีบใต้รักแร้) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังไม่เป็นที่นิยมมากนักและมีชุดตรวจที่จำหน่ายจากบริษัทเดียวเท่านั้นคือ TwistAmp Basic Kit ของบริษัท TwistDx Limited เมืองเคมบริดจ์ ประเทศอังกฤษ จึงมีงานวิจัยที่นำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจหาโรคโควิด-19 ในจำนวนจำกัด เช่น งานวิจัยของ Zhang และคณะ[26] ใช้เทคนิคนี้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมยีน *ORF1ab* และ *S* (ยีน *S* แสดงออกเป็นโปรตีน spikes) ของไวรัสโควิด-19 ด้วย TwistAmp Basic Kit จากนั้นตรวจหายีนที่ได้เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค CRISPR/Cas13 ซึ่งอ่านผลจำเพาะกับลำดับเบสของยีน *ORF1ab* และ *S* โดยพบว่าการใช้เทคนิค RT-RPA ควบคู่กับ CRISPR/Cas13 ช่วยเพิ่มความจำเพาะของผลการตรวจได้เป็นอย่างมาก และพบขีดจำกัดความไวที่ระดับ 10 สำเนาของไวรัสโควิด-19 นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิค CRISPR/Cas12 ร่วมกับเทคนิคแลมป์โดยบริษัท Mammoth Biosciences เมืองซานฟรานซิสโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้เทคนิค RT-LAMP ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัสก่อนใส่ Cas12a-gRNA ซึ่งจำเพาะกับลำดับเบสของยีน *E* (envelope) และ *N* (nucleoprotein) ของไวรัส โดยมีความไวในการตรวจอยู่ที่ 10 สำเนาต่อไมโครลิตร ในเวลา 30-40 นาที ซึ่งสามารถจำแนกความต่างระหว่างไวรัส SARS-CoV-2 กับเชื้อไวรัสโคโรน่าตัวอื่นที่ใกล้เคียงกันได้[27]

วิธีตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดในชุดตรวจสำเร็จ

เมื่อร่างกายได้รับเชื้อไวรัสจะมีปฏิกิริยาตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันจะสร้างสารภูมิต้านทานเรียกว่าแอนติบอดี หรือ immunoglobulin (Ig) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว มีบทบาทสำคัญในการตรวจจับและทำลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว ทั้งนี้เรียกสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นแอนติบอดีว่า แอนติเจน (antigen) แอนตีบอดีแต่ละชนิดจะจดจำและจับแอนติเจนที่จำเพาะ (ในที่นี้คือไวรัสโควิด-19) เพื่อกำจัดออกจากร่างกาย โดยแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อไวรัสโควิด-19 คือ immunoglobulin M (IgM) และ IgG ซึ่ง IgM พบได้ทั้งในน้ำเหลืองและเลือด โดยทั่วไปจะพบเฉพาะในช่วงแรกของการได้รับเชื้อเท่านั้น ขณะที่ IgG เป็นแอนติบอดีที่พบได้ในเลือดเช่นกัน มักพบในช่วงหลังของการได้รับเชื้อและพบต่อเนื่องในระยะยาว เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Adams และคณะ[28] ที่ศึกษาแอนติบอดี IgM และ IgG ในพลาสมาของผู้ป่วยโรคโควิด-19 ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาภูมิคุ้มกันโดยอาศัยหลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติบอดีของร่างกายและแอนติเจนของเชื้อ ผู้วิจัยตรวจพบ IgM ในช่วงแรกและหายไป แล้วตรวจพบ IgA (พบมากที่เยื่อเมือกโดยเฉพาะเยื่อเมือกทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร ช่องคลอด น้ำตา น้ำลาย) หลังจากที่ผู้ป่วยมีอาการของโรคมาแล้วนานกว่า 10 วันและค่อยๆ ลดลง แต่ตรวจพบ IgG หลังมีอาการมาแล้ว 3 สัปดาห์และระดับเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 8 แต่ยังสามารถตรวจพบได้ ซึ่ง IgG ยังมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้[29-30]

ปัจจุบันได้พัฒนาชุดตรวจสำเร็จโควิด-19 ด้วยการตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดทั้ง IgM และ IgG ด้วยวิธีการที่หลากหลายนอกจากวิธี ELISA chemiluminescent ที่ใช้กันโดยทั่วไปต่อแอนติเจนที่เป็น spike protein และ nucleocapsid อาทิ วิธี immunochromatography assay ใช้หลักการเดียวกันกับวิธี ELISA แต่ตรึงแอนติบอดีหรือแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยสารมีสีไว้บนแผ่นกระดาษ เช่น กระดาษไนโตรเซลลูโลส ทำให้เมื่อแอนติบอดีและแอนติเจนจับกันสามารถอ่านผลได้ด้วยสีด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือตรวจวัด

วิธีดังกล่าวมักใช้ในการตรวจคัดกรองเบื้องต้น ส่วน Li และคณะ[31] ได้พัฒนาชุดตรวจสำเร็จ IgM และ IgG ด้วยวิธี lateral flow immunochromatographic assay (LFA) ซึ่งใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ผลเพียง 15 นาที โดยมีความไวร้อยละ 88.7 และความจำเพาะร้อยละ 90.6 โดยใช้ตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ, ปลายนิ้ว หรือซีรัม ซึ่งทุกตัวอย่างมีประสิทธิภาพในการตรวจในระดับใกล้เคียงกัน ในประเทศจีนได้พัฒนาชุดตรวจสำเร็จจากภูมิคุ้มกันต่อโควิด-19 อย่างแพร่หลาย เช่น ชุดตรวจสำเร็จที่ผลิตโดยบริษัท Zhu HaiLivZon Diagnostics Inc. ประเทศจีน ใช้หลักการ colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี ELISA พบว่าชุดตรวจสำเร็จที่ผลิตขึ้นมีความแม่นยำร้อยละ 82.4 ขณะที่วิธี ELISA มีความแม่นยำร้อยละ 87.3 ตามลำดับ โดยอ้างอิงวิธีมาตรฐาน RT-qPCR เป็นวิธีควบคุมในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ[32] ทั้งนี้ วิธีตรวจจากภูมิคุ้มกันยังไม่สามารถใช้ยืนยันผลได้ 100% เนื่องจากไม่ได้เป็นการตรวจวัดที่ไวรัสและปริมาณของไวรัสโดยตรง นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจสำเร็จโควิด-19 ที่มีจำหน่ายอื่นๆ ได้แก่ GT-100 SARS-CoV-2 IgG/IgMKit จากบริษัท Goldsite Diagnostics Inc. ประเทศจีนระบุว่าสามารถตรวจ IgM และ IgG ต่อไวรัสโควิด-19 จากเลือด พลาสมา หรือซีรัมที่ปริมาตรขั้นต่ำเพียง 20 ไมโครลิตร ใช้เวลาตรวจเพียง 12 นาที และใช้หลักการคล้ายกับ immunochromatography assay ที่กล่าวมาแต่ใช้สีเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์, ชุดตรวจ Rapid POC Kit ของบริษัท Assay Genie (Acro Biotech, Inc.) ประเทศไอร์แลนด์ ซึ่งแตกต่างกันตรงที่ใช้ colloidal gold immunochromatography ในการระบุผล, ชุดตรวจ COVID-19 IgM-IgG Rapid Test บริษัท BioMedomicsInc. ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งตรวจ IgM และ IgG โดยตรงจากการเจาะเลือดจากนิ้ว ใช้เวลาเตรียมตัวอย่างเพียง 1-2 นาที แสดงผลภายใน 15 นาที ชุดตรวจสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องด้วยผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นชุดทดสอบอย่างง่ายแบบกระดาษ และมีหลักฐานการใช้ตรวจจากตัวอย่างจริงทางคลินิก โดยพบค่าความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 89 และร้อยละ 91 ตามลำดับ, นอกจากนี้มีชุดตรวจ COVID-19 Coronavirus Rapid Test Cassette บริษัท SureScreen Diagnostics ประเทศอังกฤษ ซึ่งมีหลักการเดียวกันกับชุดตรวจ COVID-19 IgM-IgG Rapid Test แต่ต้องเก็บในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียสและชุดตรวจนี้มีค่าความไวร้อยละ 91 และความจำเพาะร้อยละ 99, ตัวอย่างสุดท้าย ได้แก่ ชุดตรวจ VivaDiag COVID-19 IgG-IgM test บริษัท VivaChek ประเทศจีน ใช้หลักการ GICA และตรวจหา IgM และ IgG จากตัวอย่างเลือดที่มีปริมาตรขั้นต่ำเพียง 10 ไมโครลิตร ใช้เวลาเตรียมตัวอย่าง 1-2 นาที และระยะเวลาวิเคราะห์ผลภายใน15 นาที อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจนี้ยังต้องเก็บอยู่ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส[33] (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ชุดตรวจสำเร็จจากรูปภูมิคุ้มกันต่อโควิด-19[32-33]

ชื่อชุดตรวจ	หลักการ	บริษัท/เมือง/ประเทศ	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)
The novel coronavirus IgG/IgM Antibody GICA kit	Colloidal gold Immunochromatographic assay (GICA)	บริษัท Zhu HaiLivZon Diagnosstics Inc./มณฑลกวางตุ้ง/ประเทศจีน	82.4	100.0
GT-100 SARS-CoV-2 IgG/IgM Kit	Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA)	บริษัท Goldsite Diagnostics Inc./เมืองเซินเจิ้น/ประเทศจีน	100 (IgG) 85 (IgM)	100.0
Rapid POC Kit	Colloidal gold immunochromatographic assay (GICA)	บริษัท Assay Genie (Acro Biotech, Inc.)/ เมืองดับลิน/ประเทศไอร์แลนด์	88.7	90.6
COVID-19 IgM-IgG Rapid Test	Lateral flow immunoassay (LFIA)	บริษัท BioMedomicsInc./ รัฐนอร์ทแคโรไลนา/ ประเทศสหรัฐอเมริกา	89.0	91.0
COVID-19 Coronavirus Rapid Test Cassette	Lateral flow immunoassay (LFIA)	บริษัท SureScreen Diagnostics/เมืองดาร์บี้/ ประเทศอังกฤษ	91	99
VivaDiag COVID-19 IgG-IgM test	Colloidal gold immunochromatographic assay (GICA)	บริษัท VivaChek/เมืองหางโจว/ ประเทศจีน	NA	NA

NA: not available

ในการวินิจฉัยโรคจากเลือดโดยทั่วไปนิยมตรวจหาแอนติบอดีของผู้ป่วยมากกว่าการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสและหลายชุดตรวจข้างต้นเลือกตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนของโปรตีน nucleocapsid ซึ่งเป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มจีโนมของไวรัสโควิด-19 ทั้งนี้การวิเคราะห์ IgM และ IgG ช่วยให้สามารถคาดการณ์ช่วงเวลาของการได้รับเชื้อของผู้ป่วยได้ โดยหากตรวจพบเพียง IgM แสดงว่าผู้ป่วยเพิ่งได้รับเชื้อ ในขณะที่หากตรวจพบ IgG จำนวนมากแสดงว่าผู้ป่วยติดเชื้อมานานกว่า 2-3 สัปดาห์แล้ว อย่างไรก็ตาม การวินิจฉัยโรคด้วยวิธีตรวจภูมิคุ้มกันนั้นจำเป็นต้องตรวจในระยะเวลาที่เหมาะสม โดยในช่วงแรกของการได้รับเชื้อผลตรวจอาจเป็นลบซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไม่ได้ติดเชื้อโควิด-19 แต่ในความเป็นจริงนั้นเนื่องด้วยระบบภูมิคุ้มกันยังไม่ทำงาน ทั้งนี้โดยปกติเมื่อร่างกายได้รับเชื้อโรคใดๆ บางคนอาจใช้เวลา 10-14 วันหรือหลังปรากฏอาการของโรค 5-7 วันเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดนั้นสามารถวิเคราะห์ได้ในเบื้องต้นเท่านั้นและต้องยืนยันผลด้วยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโควิด-19 ขณะเดียวกัน อนึ่ง ณ วันที่ 31 สิงหาคม พ.ศ. 2563 ยังไม่มีชุดตรวจสำเร็จชุดใดที่ผ่านการรับรองขององค์การอาหารและยา ประเทศไทย

วิธีตรวจหาสารก่อภูมิคุ้มกัน (แอนติเจน) ในเลือดในชุดตรวจสำเร็จ

แอนติเจน หรือ *สารก่อภูมิต้านทาน* เป็นสารแปลกปลอมจากเชื้อก่อโรค ซึ่งเมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์สำรวจพบจะกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีมาต่อต้านและทำลาย มีงานวิจัยที่พัฒนาวิธีตรวจผู้ป่วยโรคโควิด-19 โดยตรวจหาแอนติเจนของโปรตีน spike ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจับกับตัวรับบนเยื่อหุ้มเซลล์มนุษย์เพื่อเข้าสู่เซลล์ด้วยเทคนิค ELISA ผลการศึกษาพบว่าแอนติเจนของโปรตีน spike ของไวรัสโควิด-19 สามารถจับกับแอนติบอดีที่มาจากทั้งผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส SARS-CoV และโควิด-19 (SARS-CoV-2) นั่นคือการตรวจจับแอนติเจนไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 เนื่องจาก

ไม่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัสโควิด-19[34] นอกจากนี้ผลงานวิจัยของ Lung และคณะ[35] ตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในน้ำลายเป็นปริมาณมากในช่วงแรก จากนั้นลดลงเมื่อเวลาผ่านไป และอาจตรวจไม่พบในช่วงเวลาที่ไวรัสหลบภายในเซลล์มนุษย์ (หรือมีปริมาณแอนติเจนน้อยกว่าขีดจำกัดความไวของชุดตรวจ) นั่นคือการตรวจวินิจฉัยโรคจากการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสไม่ค่อยแม่นยำ

โดยสรุปการวินิจฉัยโรคด้วยวิธีตรวจภูมิคุ้มกันนั้นยังมีข้อจำกัดหลายประการ เนื่องจากต้องตรวจในระยะเวลาที่เหมาะสมจึงจะให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ โดยในช่วงแรกของการได้รับเชื้อผลตรวจอาจเป็นลบซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยไม่ได้ติดเชื้อโควิด-19 เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันยังไม่ทำงาน เพราะโดยปกติเมื่อร่างกายได้รับเชื้อโรคใด ๆ ที่เป็นสิ่งแปลกปลอมร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันมาต่อสู้กับเชื้อโรค ซึ่งอาจต้องใช้เวลาประมาณ 10-14 วัน หรือหลังปรากฏอาการของโรค 5-7 วัน ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 โดยการตรวจหาภูมิคุ้มกันในเลือดสามารถทำได้ในเบื้องต้นเท่านั้นและจำเป็นต้องยืนยันผลด้วยวิธีตรวจหาสารพันธุกรรม

วิจารณ์

RT-LAMP และ RT-RPA มีหลักการทำงานโดยเปลี่ยนสารพันธุกรรมที่เป็น RNA ของไวรัสโควิด-19 ให้เป็นดีเอ็นเอสายคู่และเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายของไวรัส โดยมีจุดที่เหนือกว่าวิธี RT-PCR และ RT-qPCR คือ ทั้งเทคนิค LAMP และ RPA สามารถทำงานได้ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ (isothermal amplification) จึงไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงอย่าง thermal cycler และใช้เวลาตรวจสั้นกว่าวิธี PCR และ qPCR ทั้งนี้ Yan และคณะ[36] ได้พัฒนาวิธี RT-LAMP ที่จำเพาะกับยีน *ORF1ab* และ *S* ซึ่งจาก 130 ตัวอย่างที่ยืนยันผลแล้วพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 โดยใช้ระยะเวลาในการตรวจเพียง 60 นาทีและสามารถแปลผลได้ด้วยตาเปล่า อย่างไรก็ตามหลังจากร่างกายผู้ป่วยเริ่มสร้างแอนติบอดี จำนวนไวรัสจะลดลงไปตามระยะเวลาจึงอาจให้ผลลบปลอม แต่ด้วยเทคนิค isothermal amplification คือการตรวจที่เพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายในระหว่างการตรวจ ปัญหานี้จึงน้อยกว่าในกรณีกลับกันของวิธีตรวจแอนติบอดีและแอนติเจนที่ตรวจจำนวนที่มีโดยตรงไม่เพิ่มจำนวนเป้าหมายก่อนการตรวจ

การตรวจ IgM/IgG มีข้อดีเหนือกว่าการตรวจสารพันธุกรรมไวรัสตรงที่เป็นการตรวจหาโปรตีนซึ่งมีความเสถียรสูงกว่า RNA ดังนั้นขั้นการเตรียมตัวอย่างในการตรวจ IgM/IgG จึงเรียบง่ายไม่ซับซ้อน และแอนติบอดีพบได้ทั่วไปในเลือดจึงสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ไม่ว่าจะเก็บเลือดจากส่วนใดของร่างกาย เช่น ปลายนิ้ว ต่างจากวิธีตรวจสารพันธุกรรมไวรัสโควิด-19 ที่ต้องเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งจากโพรงจมูก (nasopharyngeal) ซึ่งไม่สะดวกต่อคนไข้และผู้ตรวจ แต่การตรวจ IgM/IgG ก็มีข้อจำกัดคือช่วงเวลาที่ร่างกายกำลังสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสอาจให้ผลลบปลอมได้ ดังนั้นการตรวจ IgM/IgG จึงจำเป็นต้องทำควบคู่กับวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสโควิด-19 เพื่อยืนยันผลการทดสอบ

โดยสรุปไวรัสโควิด-19 มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ที่ติดเชื้อบริเวณปอดโดยอาศัยโปรตีน spike ในการเข้าสู่เซลล์มนุษย์ ระดับ RNA ของไวรัสจะแปรตามจำนวนไวรัสในร่างกาย แต่ปริมาณแอนติบอดีจะแปรตามจำนวนวันภายหลังการติดเชื้อและระดับภูมิคุ้มกัน เช่น ร่างกายของผู้ป่วยจะเริ่มตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัสในวันที่ 7-9 หลังรับเชื้อและเพิ่มขึ้นจนอยู่ในระดับคงที่ในช่วงประมาณวันที่ 19-21[37] ดังนั้น คาดว่าการตรวจโควิด-19 ด้วยวิธี IgM/IgG จะใกล้เคียงกับวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสประมาณวันที่ 7 หลังการติดเชื้อเป็นต้นไป การตรวจเชื้อทั้งสองแบบควบคู่กันจึงเป็นทั้งการยืนยันผลเชื้อไวรัสและสามารถประมาณระยะเวลาที่ผู้ป่วยรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้ นอกจากนี้วิธีตรวจทั้งสองแบบยังมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันโดยเฉพาะความเสถียรภายในตัวอย่างตรวจ วิธีเก็บตัวอย่าง ความสะดวก และความรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับผลทดสอบที่ยืนยันแล้วด้วยวิธี RT-qPCR แนวทางพัฒนาต่อไปจึงควรมุ่งเน้นที่การลดต้นทุนในการผลิตชุดตรวจสำเร็จให้มีราคาถูกลงเพื่อให้ทุกคนสามารถเข้าถึงการตรวจได้

เอกสารอ้างอิง

1. Viral Zone. Coronavirinae [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://viralzone.expasy.org/785
2. Viral Zone. SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) proteome [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://viralzone.expasy.org/8996
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020;579(7798):270-3.
4. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. Nat Rev Microbiol 2009;7(6):439-50.
5. Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med 2003;348(20):1967-76.
6. World Health Organization. Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS) [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://www.who.int/csr/sars/WHOconsensus.pdf?ua=1
7. WHO Mers-Cov Research Group. State of knowledge and data gaps of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in humans. PLoSCurr 2013;5. doi:10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8
8. Oboho IK, Tomczyk SM, Al-Asmari AM, Banjar AA, Al-Mugti H, Aloraini MS, et al. 2014 MERS-CoV outbreak in Jeddah--a link to health care facilities. N Engl J Med 2015;372(9):846-54.
9. Rolling updates on coronavirus disease (COVID-19) [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen
10. Fan Y, Zhao K, Shi ZL, Zhou P. Bat coronaviruses in China. Viruses 2019;11(3):210. doi:10.3390/v11030210
11. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. ACS Nano 2020;14(4):3822-35.
12. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. N Engl J Med 2020;382(13):1199-207.
13. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. J Med Virol 2020. doi:10.1002/jmv.25748
14. Wang Z, Ma W, Zheng X, Wu G, Zhang R. Household transmission of SARS-CoV-2. J Infect 2020. doi:https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.040
15. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected: Interim guidance [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected
16. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. J Pharm Anal 2020;5. doi:10.1016/j.jpha.2020.03.001

17. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996;6(10):986-94.
18. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. Clin Chem 2020; 66(4):549-55.
19. Vashist SK. *In vitro* diagnostic assays for COVID-19: Recent advances and emerging trends. Diagnostics 2020;10(4):202. doi:10.3390/diagnostics10040202
20. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000;28(12):E63.
21. Srimongkol G, Ditmangklo B, Choopara I, Thaniyavarn J, Dean D, Kokpol S, et al. Rapid colorimetric loop-mediated isothermal amplification for hypersensitive point-of-care *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene detection in milk and pork products. Sci Rep 2020;10:7768. doi:10.1038/s41598-020-64710-0
22. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Clin Microbiol Infect 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.04.001
23. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus (COVID-19) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. medRxiv 2020. doi:10.1101/2020.02.19.20025155
24. Yu L, Wu S, Hao X, Li X, Ye S, Han H, et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform iLACO. medRxiv 2020. doi:10.1101/2020.02.20.20025874
25. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. PLoSBiol 2006;4 (7):1115-21.
26. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [online]. 2020 [cited 2020 May 1]. Available from: https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf
27. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Singh J, Streithorst J, et al. Rapid detection of 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 using a CRISPR-based DETECTR lateral flow assay. medRxiv 2020. doi:10.1101/2020.03.06.20032334
28. Adams ER, Anand R, Andersson MI, Auckland K, Baillie JK, Barnes E, et al. Evaluation of antibody testing for SARS-Cov-2 using ELISA and lateral flow immunoassays. medRxiv 2020. doi:10.1101/2020.04.15.20066407
29. Li G, Chen X, Xu A. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. N Engl J Med 2003;349(5): 508-9.
30. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. JAMA 2020;323(22):2249-51.
31. 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 2020. doi:10.1002/jmv.25727
32. Xiang J, Yan M, Li H, Liu T, Lin C, Huang S, et al. Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold-immuno-

chromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19). medRxiv 2020. doi:10.1101/2020.02.27.20028787

33. Green K, Graziadio S, Turner P, Fanshawe T, Allen J. Molecular and antibody point-of-care tests to support the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19. CEBM Res 2020. Available from: https://www.cebm.net/covid-19/molecular-and-antibody-point-of-care-tests-to-support-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19/
34. Lv H, Wu NC, Tsang OTY, Yuan M, Perera RA, Leung WS, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoVinfections. bioRxiv 2020. doi:10.1101/2020.03.15.993097
35. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. 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 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1
36. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated is othermal amplification assay. Clin Microbiol Infect 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.04.001
37. 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. Clin Infect Dis 2020. doi:10.1093/cid/ciaa344