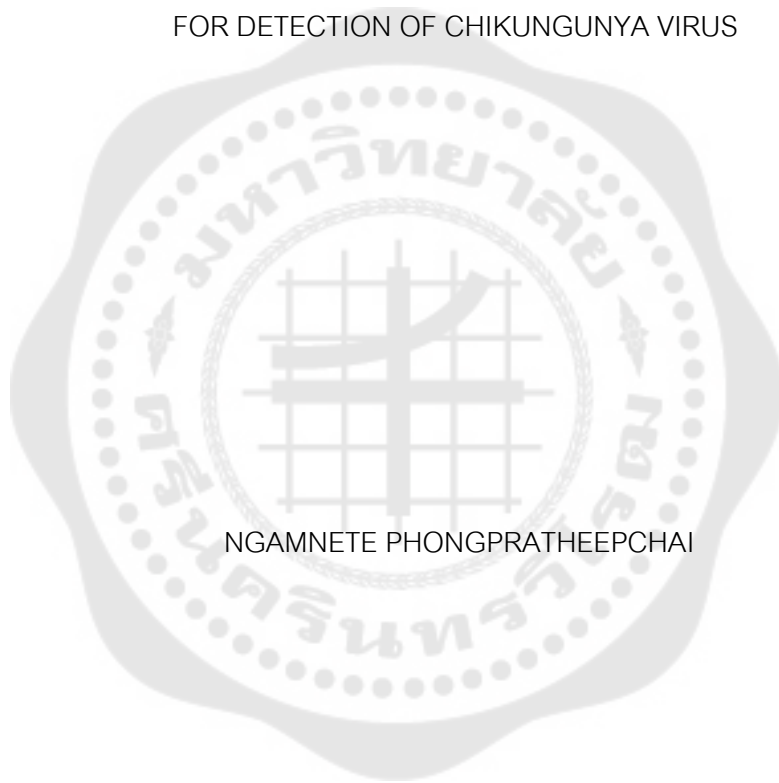




DEVELOPMENT OF DNA-LATERAL FLOW STRIP TEST  
FOR DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS



NGAMNETE PHONGPRATHEEPCHAI

Graduate School Srinakharinwirot University

2021

การพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอแบบแถบในการตรวจเชื้อไวรัสซิกาคุณภาพ



ปริญญาานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาอณูชีววิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF DNA-LATERAL FLOW STRIP TEST  
FOR DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of MASTER OF SCIENCE  
(Molecular Biology)

Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

THE THESIS TITLED  
DEVELOPMENT OF DNA-LATERAL FLOW STRIP TEST  
FOR DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS

BY  
NGAMNETE PHONGPRATHEEPCHAI

HAS BEEN APPROVED BY THE GRADUATE SCHOOL IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE MASTER OF SCIENCE  
IN MOLECULAR BIOLOGY AT SRINAKHARINWIROT UNIVERSITY

-----  
(Assoc. Prof. Dr. Chatchai Ekpanyaskul, MD.)  
Dean of Graduate School  
-----

ORAL DEFENSE COMMITTEE

..... Major-advisor	..... Chair
(Assoc. Prof.Somchai Santiwatanakul)	(Asst. Prof. Dr.Montri Yasawong)
..... Co-advisor	..... Committee
(Dr.Supatra Areekit)	(Assoc. Prof. Dr.Teeraporn Bureerug)
..... Co-advisor	
(Prof.Kosum Chansiri)	

Title	DEVELOPMENT OF DNA-LATERAL FLOW STRIP TEST FOR DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS
Author	NGAMNETE PHONGPRATHEEPCHAI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Somchai Santiwatanakul
Co Advisor	Dr. Supatra Areekit
Co Advisor	Prof. Kosum Chansiri

Chikungunya is a viral infection caused by the Chikungunya virus (CHIKV), which is spread from person to person by the bite of an infected *Aedes* mosquito. CHIKV is one of the major public health problems in tropical countries and an epidemic in new areas that increases year by year. Most infected patients often have severe joint pain that affects their daily activities. Currently, the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) methods have been widely used to detect CHIKV, but it is costly, time-consuming, and requires expertise. Hence, this study was focused on the development of reverse-transcriptase-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with a lateral flow dipstick (LFD) as the specific and sensitive tool for detection of CHIKV in comparison to RT-PCR. The data revealed that the limitation of RT-LAMP-LFD could detect CHIKV as less as 1 pg/ $\mu$ L, which is 1000 times more sensitive than the RT-PCR methods. In addition, the RT-LAMP-LFD showed no cross-reaction with other viruses and bacteria, such as Dengue virus serotypes 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus, and *Staphylococcus aureus*. In conclusion the RT-LAMP-LFD is an effective method for the detection of CHIKV, due to its convenience, as well as its high specificity, and sensitivity.

Keyword : Chikungunya virus, Reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification, Lateral flow dipstick

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation to Assoc. Prof. Dr. Somchai Santiwatanakul, my advisor for his valuable advice, helpfulness, understanding, and encouragement throughout this study. I am especially grateful to my co-advisor, Professor Dr. Kosum Chansiri and Dr. Supatra Areekit for their guidance, kindness, and valuable advice in this thesis would never be completed successfully. My special thanks to my committees, Asst. Prof. Dr. Montri Yasawong and Assoc. Prof. Dr. Teeraporn Bureerug for their constructive criticisms and corrections of my thesis.

I am deeply grateful to Graduate School, Srinakharinwirot University for providing scholarships to pursue a master's degree. I would like to thank the Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, and Center of Excellence in Biosensors, Srinakharinwirot University for supporting molecular equipment facilities. Also, thank the Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University for supporting the specimens. Special thanks to all my friends in this laboratory for their kind helpful assistance, friendship, and always kindness to me. This study was funded and completed with the support of a MED-GRAD-150 research grant from the Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

Finally, I am deeply grateful to my dear family for all love, understanding, and always being beside me. I would never have had success without them.

NGAMNETE PHONGPRATHEEPCHAI

## TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT .....	D
ACKNOWLEDGEMENTS.....	E
TABLE OF CONTENTS.....	F
LIST OF FIGURES .....	J
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
Background.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
1. Biology .....	3
2. Replication cycle of chikungunya virus .....	4
3. Transmission .....	5
3.1 Enzootic sylvatic cycle .....	5
3.2 Urban cycle .....	5
4. Symptoms .....	6
4.1 Acute phase .....	6
4.2 Chronic phase .....	7
5. Treatments .....	7
6. Prevention .....	7
7. Laboratory diagnostics .....	8
7.1 Virus Culture and Isolation .....	8
7.2 Serological testing.....	8
7.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	8

7.3 Molecular tests .....	8
7.3.1 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	8
7.3.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) .....	8
7.3.2.1 Detection of LAMP Product .....	10
8. Biosensors.....	10
9. Lateral Flow Dipstick (LFD).....	11
9.1 Sample pad .....	12
9.2 Conjugate pad.....	12
9.3 Reaction membrane .....	12
9.4 Absorbent pad.....	12
10. Detection of CHIKV .....	13
Objectives .....	14
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS .....	15
1. Sample collection.....	15
2. RNA extraction and reverse transcription .....	15
3. Conceptual diagram for development of detection methods for Chikungunya virus .....	15
4. PCR amplification of Chikungunya virus based on E1 gene.....	16
4.1 PCR primers .....	16
4.2 PCR optimization .....	17
4.2.1 Temperature optimization .....	17
4.2.2 Concentration of MgCl <sub>2</sub> .....	17
5. LAMP amplification of Chikungunya virus based on E1 gene.....	17



5.1 LAMP primers.....	17
5.2 LAMP optimization.....	18
5.2.1 Temperature optimization.....	18
5.2.2 Concentration of MgSO <sub>4</sub> .....	18
5.2.3 Concentration of dNTPs.....	18
6. Lateral Flow Dipstick assay (LFD).....	18
6.1 PCR-LFD.....	19
6.2 LAMP-LFD.....	19
6.2.1 Optimization of FITC-DNA probe.....	19
7. Analytical sensitivity test (Limit of Detection, LOD).....	19
8. Analytical specificity test.....	19
CHAPTER IV RESULTS.....	21
1. Optimization of PCR and LAMP of E1 gene.....	21
1.1 PCR amplification.....	21
1.2 LAMP amplification.....	22
1.3 The limit of detection (LOD) and specificity of PCR and LAMP assays of CHIKV.....	24
2. Lateral Flow Dipstick (LFD) detection.....	26
2.1 Optimization of DNA probe concentration.....	26
2.2 The limit of detection and specificity of PCR-LFD and LAMP-LFD.....	27
CHAPTER V DISCUSSION.....	30
APPENDIX.....	32
REFERENCES.....	42

VITA .....48



## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Taxonomy of chikungunya virus. ....	3
Figure 2 The structural genome of chikungunya virus. ....	4
Figure 3 Chikungunya virus replication cycle in host cells. ....	5
Figure 4 Transmission cycle of chikungunya virus. ....	6
Figure 5 Illustration of LAMP primers for LAMP reaction. ....	9
Figure 6 Principle of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. ....	10
Figure 7 Principle of Lateral Flow Dipstick (LFD). ....	11
Figure 8 The method schematic diagram for detection of chikungunya virus. ....	16
Figure 10 Optimized concentration of MgCl <sub>2</sub> analyzed. Lane M represents 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentration of MgCl <sub>2</sub> at 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM and 4.0 mM, respectively. Lane N represents the negative control. ....	22
Figure 11 Optimized temperature analyzed. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-10 represents different temperatures were 57 °C, 57.6 °C, 58.5 °C, 59.6 °C, 61 °C, 62.7 °C, 64.1 °C, 65.2 °C, 66.7 °C, and 67 °C, respectively and Lane N represents the negative control. ....	23
Figure 12 Optimized concentration of MgSO <sub>4</sub> analyzed. Lane M represents 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentration of MgSO <sub>4</sub> at 4.0 mM, 4.4 mM, 4.8 mM, 5.2 mM, 5.6 mM, 6.0 mM, and 6.4 mM, respectively. Lane N represents negative control. ....	23
Figure 13 Optimized concentration of dNTPs analyzed. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentrations of dNTPs at 0.8 mM, 1.0 mM,	

1.2 mM, 1.4 mM, 1.6 mM, 1.8 mM, and 2.0 mM, respectively. Lane N represents the negative control. ....24

Figure 14 The LOD of PCR and LAMP assays. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. (PCR) Lane 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 90 ng/μL, 9.0 ng/μL, 0.9 ng/μL, 90 pg/μL, 9.0 pg/μL, 0.9 pg/μL, 90.0 fg/μL and 9.0 fg/μL, respectively. (LAMP) Lane 1-8 represents the amplification product of DNA concentrations at 100.0 ng/μL, 10.0 ng/μL, 1.0 ng/μL, 100.0 pg/μL, 10.0 pg/μL, 1.0 pg/μL, 100.0 fg/μL and 10.0 fg/μL, respectively. Lane N represents the negative control.....25

Figure 15 Specificity test of PCR and LAMP assays. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-9 represents Chikungunya virus, Dengue virus serotype 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus, and *S. aureus* respectively. Lane N represents the negative control. ....26

Figure 16 Optimization of DNA probe of PCR and LAMP assays. Strips 1-3 represents DNA probe concentration 10 μM, 1 μM, and 0.1 μM respectively.....27

Figure 17 The LOD of PCR-LFD and LAMP-LFD assays. (PCR-LFD) Strips 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 90.0 ng/μL, 9.0 ng/μL, 0.9 ng/μL, 90.0 pg/μL, 9.0 pg/μL, 0.9 pg/μL, 90.0 fg/μL, and 9.0 fg/μL, respectively. (LAMP-LFD) Strips 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 100.0 ng/μL, 10.0 ng/μL, 1.0 ng/μL, 100.0 pg/μL, 10.0 pg/μL, 1.0 pg/μL, 100.0 fg/μL and 10.0 fg/μL, respectively. Lane N represents the negative control.....28

Figure 18 Specificity test of PCR-LFD and LAMP-LFD assays. Strips 1-9 represents Chikungunya virus, Dengue virus serotypes 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus and *S. aureus* respectively. Lane N represents the negative control.....29

# CHAPTER I

## INTRODUCTION

### Background

Chikungunya fever is a disease caused by the Chikungunya virus (CHIKV) belonging to the genus alphavirus and family Togaviridae. The virus was transmitted to humans through the bite of infected *Aedes* mosquitoes<sup>(1)</sup> causing joint inflammation and swelling which is the main organ that suffers from the infection and often debilitating<sup>(2)</sup>.

CHIKV outbreaks mostly occur in several countries of Africa, Asia, and the Indian subcontinent. In the few years, the virus has become one of the major problems in Southeast Asia such as Singapore, Malaysia, and Thailand<sup>(3)</sup>. In 1958, the first case of CHIKV infection in Thailand was reported in Bangkok and subsequently spread to other provinces. In 2009, a large outbreak of chikungunya fever of approximately 32,000 cases was announced by the Bureau of Epidemiology, Department of Disease Control, Ministry of Public Health Thailand<sup>(4)</sup>. On August 25, 2020, a total of 7,396 cases were testified from 72 provinces of Thailand which were able to spread in a new area<sup>(5)</sup>.

In general, the two species of *Aedes* mosquitoes causing chikungunya fever are *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* which are also vectors for transmission of dengue virus and zika virus<sup>(1,6)</sup>. In humans infected with CHIKV, acute symptoms usually appear 3-12 days after a bite from an infected mosquito. The common symptoms include fever, muscle pain, and joint pain<sup>(7)</sup>. However, occasionally the joint pain may be last for months or even years. The mortality rate following CHIKV infection is relatively low but, severe joint pain can affect long-term quality of life<sup>(8)</sup>.

Several methods have been employed for CHIKV diagnosis such as an antigen or serological test for IgM and IgG antibodies detection, viral culture for virus species identification at the early stages of illness, or molecular techniques such as reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), real-time RT-PCR and isothermal methods that are viral nucleic acid tests<sup>(9)</sup>. However, these methods required costly equipment, complicated procedures, and time-consuming which are not suitable for their use in the field investigation. Hence, this research will develop a rapid screening

test for CHIKV diagnosis based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with lateral flow dipstick (LFD). The test is easy to use, rapid, and low cost which will be beneficial for onsite diagnosis without complicated equipment. In addition, the rapid screening test will assist the epidemiological survey as well as prevention and control planning of the virus.



## CHAPTER II

### LITERATURE REVIEW

#### 1. Biology

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus belonging to the *Togaviridae* family (Figure 1) and is transmitted by *Aedes* species mosquitoes. It causes periodic outbreaks of chikungunya fever, which affects public health in several countries in subtropical and tropical regions.

Group : Group IV (+) ssRNA virus

Order : *Martellivirales*

Family : *Togaviridae*

Genus : *Alphavirus*

Species : *Chikungunya virus*

Figure 1 Taxonomy of chikungunya virus.

CHIKV is an enveloped, approximately 70 nm in diameter contains a positive single-stranded RNA genome with approximately 12 kb in length. The genome consists of two open reading frames (ORFs) that encode structural proteins such as capsid, E3, E2, 6K, and E1 and nonstructural proteins such as nsP1, nsP2, nsP3, and nsP4 (Figure 2). The genetic studies have elucidated that the virus has evolved into 3 different genotypes including West African genotypes, East/Central/South African (ECSA) genotypes, and Asian genotypes. The genetic differences between CHIKV lineages are also responsible for the different antigenic properties. In Africa, two genotypes, West African and ECSA genotypes, are commonly found and they are responsible for epidemics on the continent. In Asia, the epidemic is due to the Asian genotype and the ECSA genotype is often found in the Indian continent <sup>(10, 11)</sup>.

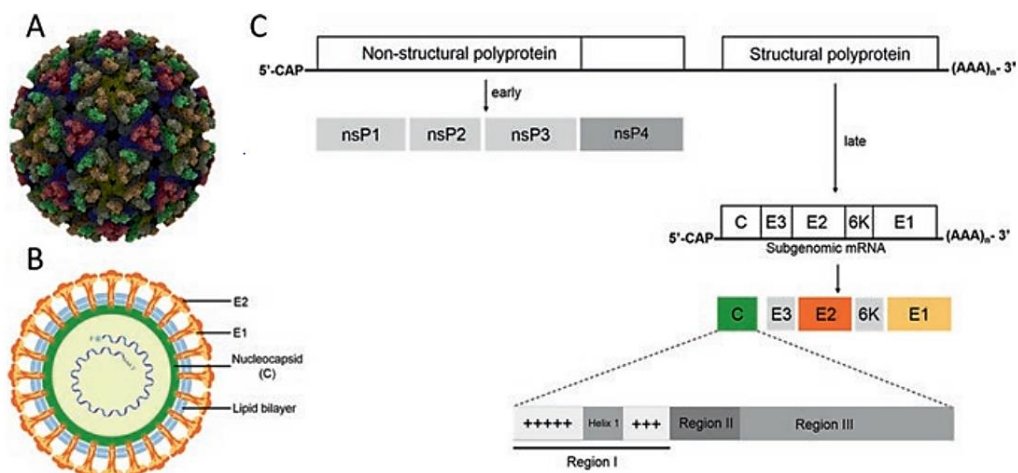


Figure 2 The structural genome of chikungunya virus. <sup>(11)</sup>

## 2. Replication cycle of chikungunya virus

The life cycle of CHIKV in host cells starts with the attachment to the host cell through the endocytosis receptor. The low pH environment within the endosome encourages, fusion and nucleocapsid are released into the cytoplasm. Then, the nucleocapsid is disassembled and release the RNA into the cell. The viral genome is translated by the host cell to create nonstructural proteins to produce P123 precursor and nsP4 protein, which can be combined with host proteins to form viral replication. Afterward, the enzyme catalyzes the synthesis of negative sense RNA which serves as a template for synthesis of the positive sense genome and sub-genome RNA as mRNA for the synthesis of the structured polyproteins. Later, free capsids are produced, released into the cytoplasm, and interact with envelope glycoproteins at the plasma membrane to form virions. Ultimately, the mature virions are released and spread to other cells <sup>(12, 13)</sup> (Figure 3).



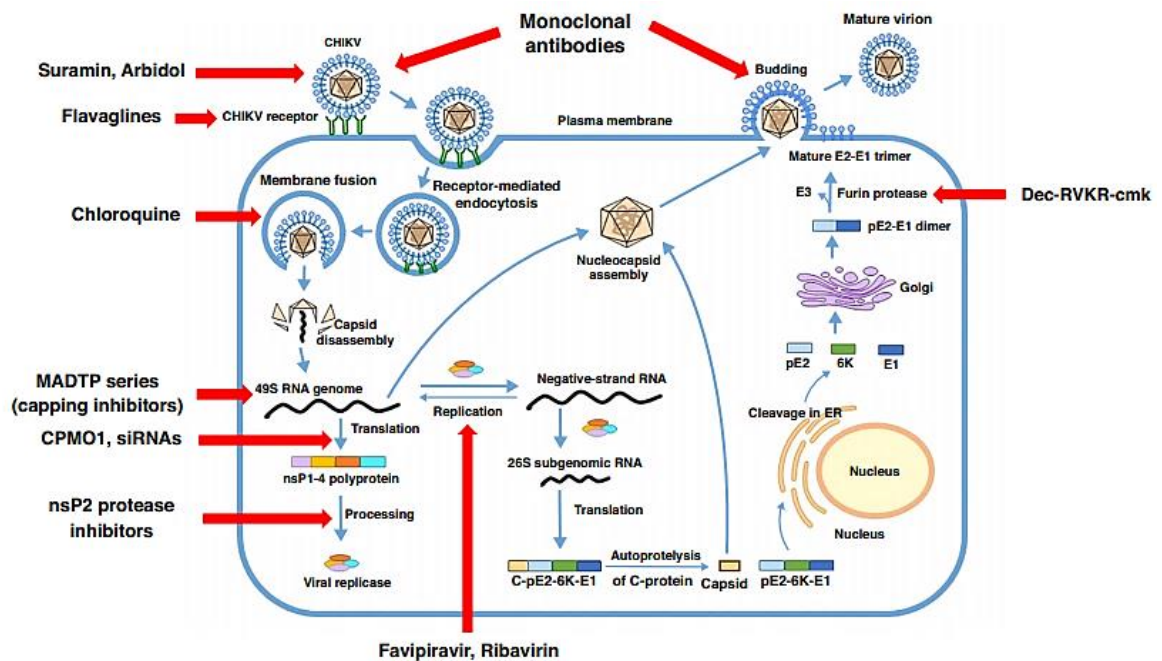


Figure 3 Chikungunya virus replication cycle in host cells. <sup>(12)</sup>

### 3. Transmission

Chikungunya virus is mainly transmitted to humans by the bites of female *Aedes* mosquitoes. However, transmission between mother and fetus may occur in some cases<sup>(14)</sup>. There are two different transmission cycles of CHIKV: a sylvatic cycle affecting human-mosquito-monkey/primates and an urban cycle affecting human-mosquito<sup>(15)</sup> (Figure 4).

#### 3.1 Enzootic sylvatic cycle

The enzootic cycle refers to the transmission of the virus from an infected animal to mosquitoes and then from the carrier mosquitoes to healthy humans. This cycle is common in African countries and the main transmitting is *Aedes* species of forest mosquitoes include *Aedes furcifer*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes taylori* and *Aedes Africanus*.

#### 3.2 Urban cycle

Urban cycle refers to the transmission of the virus from an infected human to mosquitoes and then from the carrier mosquitoes to healthy humans. In Asian countries, the main transmitting species are *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. In

this cycle, the human acts as major hosts, and the female mosquitoes act as vectors. *Aedes* mosquitoes adopt themselves in urban areas and it is the primary route of CHIKV transmission<sup>(16-18)</sup>

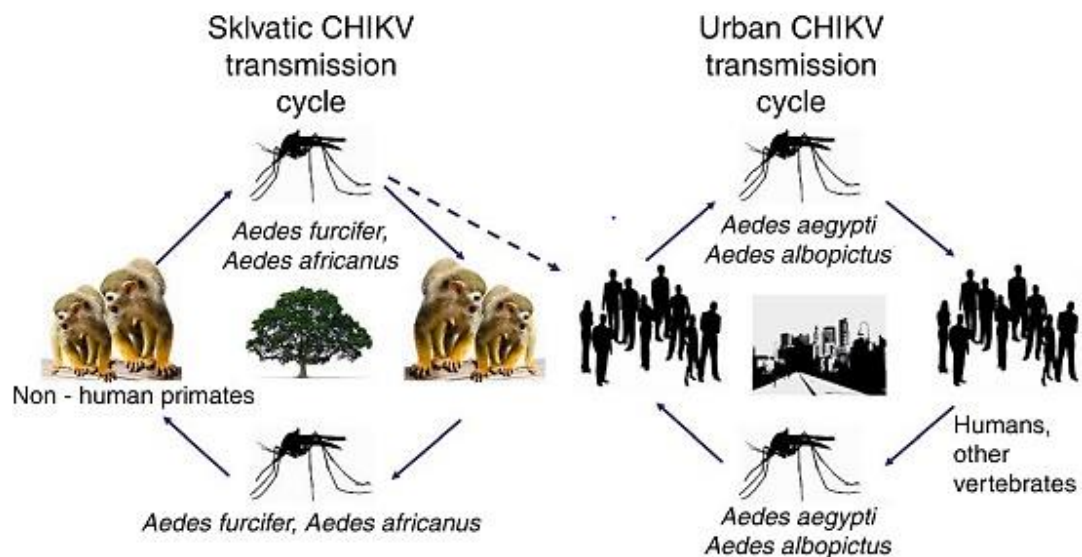


Figure 4 Transmission cycle of chikungunya virus.<sup>(15)</sup>

#### 4. Symptoms

After an infected mosquito bites, the particles of the virus accumulate in the skin, from which it eventually reaches the lymph nodes and the blood flow. It then spreads to target organs such as skin, muscles, and joints. The disease appears after 2-4 days of an incubation period. Symptoms begin suddenly with a high fever, muscle pain, severe pain in joints, and rash<sup>(19)</sup>. The most frequent positions of arthritis symptoms include ankles, wrists, toes, fingers, and knees. Generally, CHIKV infection is categorized into acute and chronic stages.

##### 4.1 Acute phase

The acute phase is the first three weeks of the disease. After the incubation period, the infected person will develop a high fever, joint pain, and intense myalgia which is often accompanied by rash, headache, and photophobia. These acute symptoms usually resolve within 1-2 weeks.

#### 4.2 Chronic phase

The symptoms of the chronic phase are similar to the acute stage, but joint pain usually lasts more than months to several years. The percentage of patients developing into the chronic stage ranges from 40–80%, which is more common in adults than children<sup>(20, 21)</sup>.

#### 5. Treatments

There is no specific drug for CHIKV infection treatment. According to the acute phase, the patients will be symptomatically treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs to relieve fever and pain such as ibuprofen, naproxen, acetaminophen, or paracetamol. However, aspirin should be avoided as it affects platelets. Patients with persistent joint pain may need long-term pain relievers or anti-inflammatory drugs, such as chloroquine and hydroxychloroquine will be used in the treatment of chronic arthritis<sup>(22, 23)</sup>. In addition, the small molecules with natural or synthetic origin such as ribavirin, chloroquine, and arbidol have been experimentally tested to treat CHIKV infection. These molecules can inhibit viral replication by blocking the spread of the virus at different stages. Currently, there is no licensed vaccine against CHIKV infection<sup>(20, 24)</sup>.

#### 6. Prevention

Presently, there are no specific drugs and vaccines against CHIKV. The best prevention is to avoid mosquito bites and eliminate stagnant water, which is the breeding ground for mosquitoes<sup>(25)</sup>. The common, simple, and effective ways on preventing mosquito-borne diseases are wearing long-sleeved shirts and long pants to sleep, sleeping with mosquito nets covering the bed, and using insecticide sprays and mosquito repellants. In addition, the environment around houses and buildings should be checked to make sure there is no standing water around the area where people live and eliminating these water sources can help decrease the prevalence of mosquitoes<sup>(26)</sup>.

## 7. Laboratory diagnostics

Laboratory diagnostics of CHIKV are counted on the blood sample.

### 7.1 Virus Culture and Isolation

Detection of CHIKV based on virus isolation from the blood patients during the first week of illness is cultured in various cell lines such as C6 / 36, BHK21, insect cells, HeLa, and Vero cells. The virus isolation method can isolate and identify the strain of the virus within 1-2 weeks and must be performed only in a BSL-3 laboratory to reduce the risk of virus transmission<sup>(27)</sup>.

### 7.2 Serological testing

#### 7.2.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA is a method for the detection of IgM and IgG antibodies in the patient blood based on the principle of the Antigen-Antibody complex. The IgM antibodies can be detected 3 days after the onset of symptoms and persist for several weeks up to 3 months while the IgG appears shortly after IgM antibodies and persists for years. However, detection of CHIKV by ELISA assay can cross-reaction with other flavivirus antibodies<sup>(9,28)</sup>.

### 7.3 Molecular tests

#### 7.3.1 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR is one of the most widely used tools for the detection of CHIKV viral RNA when a patient is in the acute stage of infection. The specific RT-PCR primers relied on three structural gene regions, Capsid (C), Envelope E-2, and Envelope E-1. The method is very specific and sensitive which typically takes 1-2 days. However, the disadvantage of this method is that it requires expensive tools and laboratory skills<sup>(27,29)</sup>.

#### 7.3.2 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an isothermal method for nucleic acid amplification widely applied in molecular biology laboratories. The LAMP technique is a gene amplification using 4 primers that are specific to 6 distinct regions on the target gene<sup>(30)</sup>.

The mechanism of operation of the LAMP consists of 2 steps: first, starting structure producing for creating a stem-loop on both sides of the target gene

and second, increasing gene amplification from the stem-loop by relying on DNA polymerase with strand displacement activity<sup>(31)</sup>.

In the LAMP reaction, starting the reaction to amplification the genetic material at a temperature of about 60°C - 63°C, which is a condition in which *Bst* DNA polymerase works well and use specific primers at different areas of the target gene. Primers for LAMP consist of outer primer (forward outer primer – F3 and backward outer primer - B3), inner primer (forward inner primer - FIP and backward inner primer - BIP), and sometimes there may be loops primer (loop forward primer - LF and loop backward primer - LB) can accelerate the gene amplification process. (Figure 5).

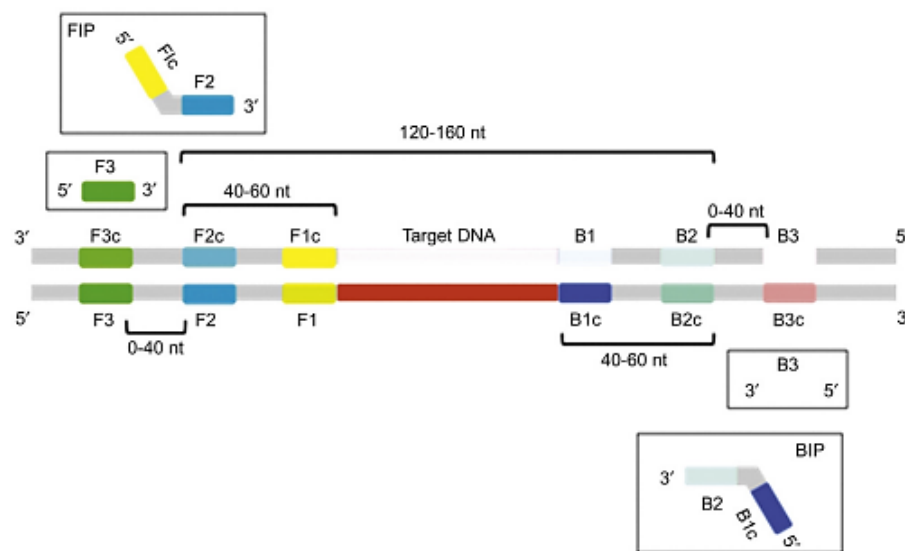


Figure 5 Illustration of LAMP primers for LAMP reaction.<sup>(29)</sup>

The LAMP reaction initiates from the F2 of the FIP primer binding to the F2c region on the DNA template, inducing the synthesis of the DNA strand. Then, F3 binds to the F3c of the DNA template to synthesize the DNA strand resulting in dropping out of the previously synthesized DNA strand. The DNA strands then form a stem-loop at the 5' end due to the hybridization of F1c and F1 regions. Like F2 of the FIP primers, B2 of BIP primers binds to the B2c region on the DNA template and induces the synthesis of the DNA strand. Both F2 and B2 simultaneously react causing the structure of the

DNA called a dumbbell-like structure, the amplification process continues by using a dumbbell-like structure as a template, resulting in creating different structures<sup>(32)</sup> (Figure 6).

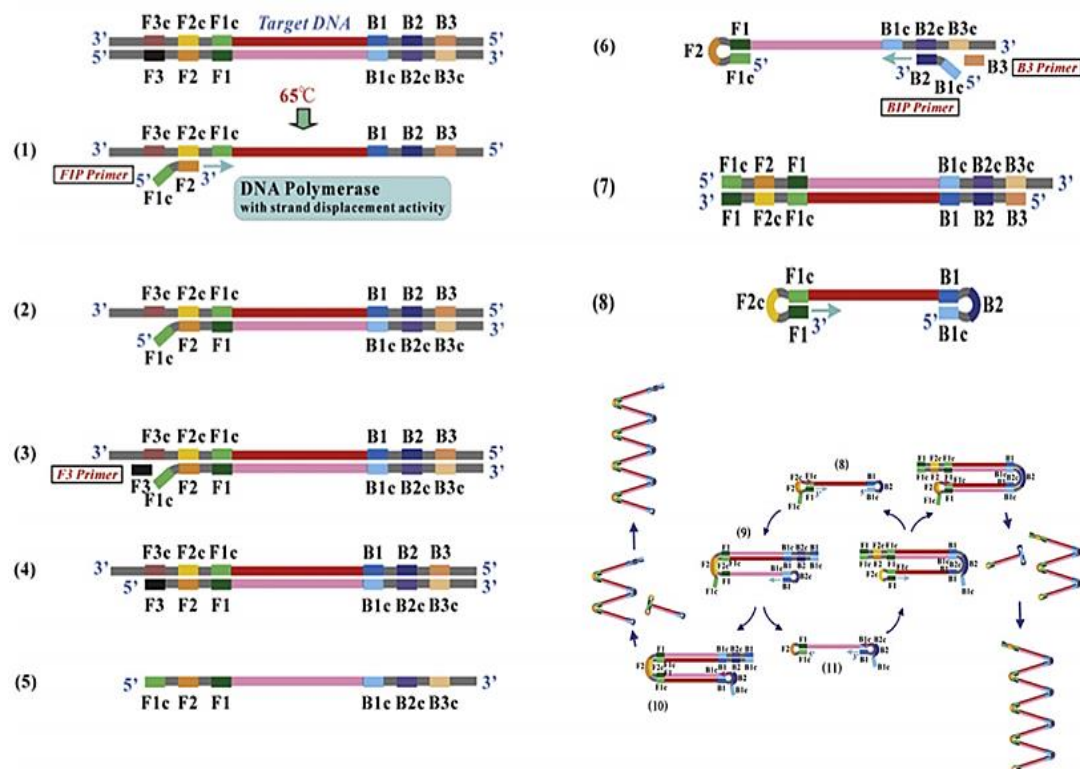


Figure 6 Principle of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method.<sup>(32)</sup>

### 7.3.2.1 Detection of LAMP Product

Detection of LAMP products can be tested out in several ways. Firstly, the turbidity due to the magnesium pyrophosphate reaction product can be observed by naked eyes. Secondly, the fluorescence SYBR Green I intercalated LAMP product can be examined under UV light. Lastly, fluorescence dye staining of LAMP products after agarose gel electrophoresis can be monitored under UV light<sup>(31, 33)</sup>.

## 8. Biosensors

Biosensors or biological analyzers are methods for the analysis of specific biological targets. Biosensors are relied on the principle of collaboration between

biological components and transducers to translate the result in the form of various signals such as colors or electrical signals<sup>(34)</sup>. The specific binding between ligands (analyze substrate) such as biomolecules, proteins, antigens, drugs, etc. and the specific biological receptors such as enzymes, nucleic acids, antibody, proteins, tissues that are immobilized on the surface of the signal transducer. The transducer then converts those characteristics into electrical signals or appropriate signal such as ionization, electrons, humidity, oxygen, heat, and color are transmitted to the detector for further analysis and display<sup>(35)</sup>.

### 9. Lateral Flow Dipstick (LFD)

LFD is a diagnostic method based on the chromatographic principle. This method is widespread due to its convenience and speed. Also, the specificity and sensitivity of the test results are reliable. The main components of the LFD nitrocellulose membrane strip consist of a sample pad, conjugate pad, reaction membrane, and absorbent pad (Figure 7). Each component of the LFD strip assesses solution transportation through the surface membrane. At present, it has been applied for PCR, LAMP, and RPA products detection.

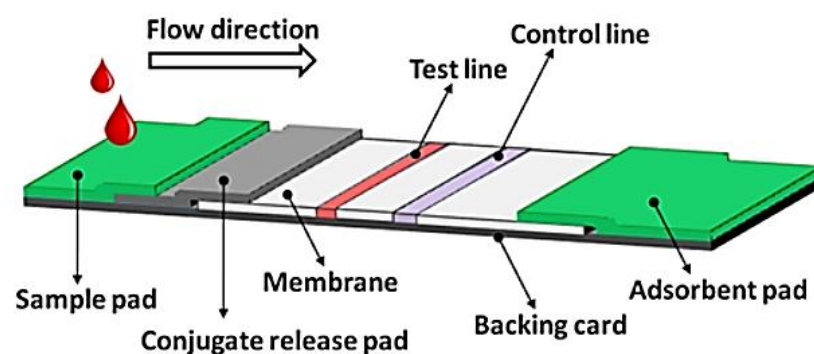


Figure 7 Principle of Lateral Flow Dipstick (LFD).<sup>(36)</sup>

### 9.1 Sample pad

The sample pad is the first area receiving the sample solution that needs to be inspected and put into this area before passing through the next part.

### 9.2 Conjugate pad

The sample solution from the sample pad will shift to the conjugate pad, which consists of antibodies specific to the target sample (Anti-Fluorescein isothiocyanate or FITC antibody) conjugated to a gold nanoparticle. Once the solution moves to the conjugate pad, it will be able to bind to the specific antibody and deliver it to the next area.

### 9.3 Reaction membrane

The reaction membrane is a hydrophobic nitrocellulose membrane in which marker molecules for example antibodies and biotin ligand are immobilized onto the test line and control line. If the sample solution contains the substance to be examined, the formation of particles on the test line will occur and appear as a band that can be seen by the naked eye.

### 9.4 Absorbent pad

The absorbent pad is the final area of the LFD which prevents the solution from flowing backward.

The process of LFD starts by dropping the DNA-DNA hybridization complex solution onto the sample pad. The complex mixture contains biotin-labeled DNA amplified products generated from the DNA amplification of biological target hybridizes with FITC labeled DNA probe which binds to the anti-FITC conjugated gold nanoparticles. After dropping, the complex solution then migrates to the conjugate pad via diffusion, binds to immobilized biotin receptor, and generates the red-purple color at the test line. Meanwhile, the free anti-FITC gold nanoparticles in the solution move to the anti-anti-FITC coated control line to form a complex and appear as the red-purple color. The interpretation can be accomplished in terms of the positive result is identified by the appearance of the red-purple color at both C and T lines while the negative result shows only the control line<sup>(36)</sup>.



## 10. Detection of CHIKV

There are several ways to diagnose CHIKV infection such as viral culture, ELISA, RT-PCR, and real-time PCR to confirm the disease, but these methods have limitations because they require equipment and skilled laboratory personnel and therefore are not widely used in many hospitals. In recent years, a test kit has been developed and widely used in the diagnosis of several human diseases, such as dengue virus infection, Influenza virus infection, rotavirus infection including developed a test kit for detecting CHIKV. Previous studies have developed an antigen detection test using the immunochromatographic (IC) method with mouse MAbs against the CHIKV E1 protein. In this study, B-7 cells infected with CHIKV were injected into mice to produce antibodies, then anti-CHIKV specific MAbs were immobilized on the nitrocellulose membrane for the test line to capture the CHIKV protein<sup>(37)</sup>. Generally, the diagnosis of CHIKV infection is based on clinical symptoms, which can be a misdiagnosis because the symptoms are similar to dengue fever. In a later study, a platform was developed to detect IgM and IgG antibodies of the dengue virus infection and CHIKV infection. The platform is designed to be able to multiplex detected four targets on a single strip based on antibody reactions to recombinant DENV1-4 and CHIKV E1, E1-A226 V, and E2 envelope proteins<sup>(38)</sup>. These detection kits were developed to support clinical evaluation of patients with suspected CHIKV infection, which are suitable for use in the field or in laboratories where there is a shortage of equipment. In addition, the correct diagnosis allows prompt treatment, reduces the spread, and controls the epidemic areas. However, the above test kits are required antibodies to be used in the detection of CHIKV infection, antibody production is costly and involves a complex process. Hence, test kits have been developed based on molecular techniques such as RT-PCR, LAMP, and RPA combined with LFD assay to optimize test kits, reducing complex processes and reducing costs.

### Objectives

1. To develop the LAMP-LFD test for detection of CHIKV the blood samples.
2. To investigate the analytical sensitivity (limit of detection) and specificity of LAMP-LFD test in comparison to RT-PCR.



## CHAPTER III

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. Sample collection

This project has been approved by Ethics Committees, Srinakharinwirot University (Ethics approval number SWUEC/X-450/2563) and by Ramathibodi Hospital, Mahidol University Ethics approval MURA2021/105 ). Chikungunya viral RNA specimens will be obtained from the Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University.

#### 2. RNA extraction and reverse transcription

The viral RNA was extracted from 200  $\mu$ L of patient plasma samples using the Nucleic acid extractions MagDEA<sup>®</sup> Dx reagents (Precision System Science, Chiba, Japan) according to the manufacturer's protocol. The genomic RNA extracted was stored at -80°C until use. The concentrations of genomic RNA were determined by using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific; Wilmington, DE, USA). The reverse transcription of CHIKV RNA was performed by using the SuperScript<sup>™</sup> III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA).

#### 3. Conceptual diagram for development of detection methods for Chikungunya virus

The method schematic diagram for the detection chikungunya virus in this study was shown in Figure 8.

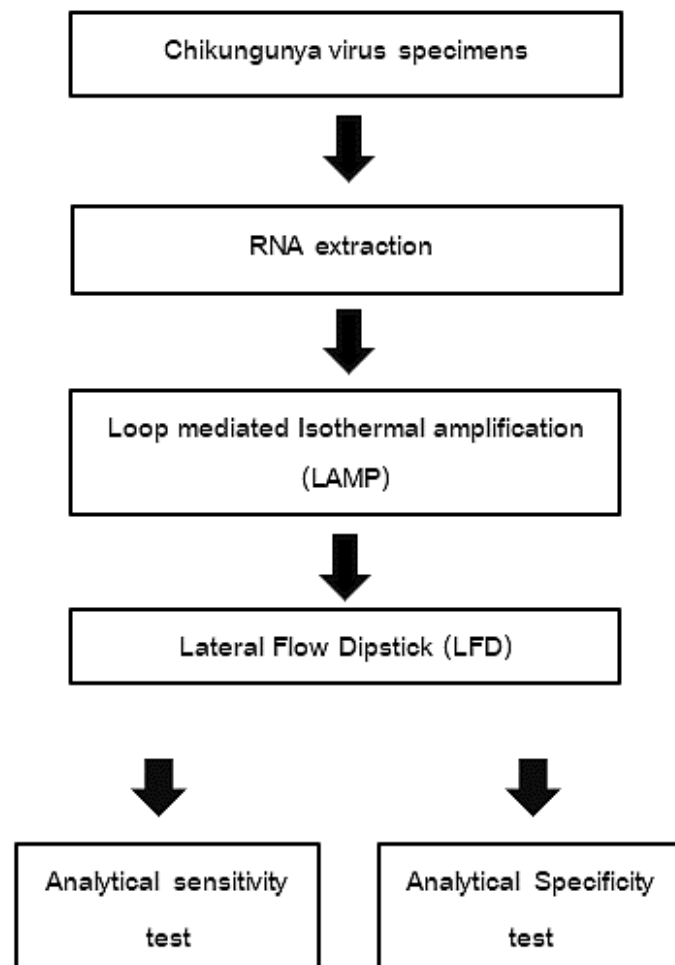


Figure 8 The method schematic diagram for detection of chikungunya virus.

#### 4. PCR amplification of Chikungunya virus based on E1 gene.

##### 4.1 PCR primers

The primers for PCR were designed based on the chikungunya virus envelope glycoprotein E1 gene retrieved from the NCBI database (GenBank accession number AB857841.1). A set of PCR primers including the forward primer (Biotin-CHIKV E1-F3) and the reverse primer (CHIKV E1-B3) were designed by using software Primer explorer V5 programmed ([http://primerexplorer.jp/lampv5\\_e/index.html](http://primerexplorer.jp/lampv5_e/index.html)). CHIKVE1-probe was designed in the region between CHIKV E1-F and CHIKV E1-R.

## 4.2 PCR optimization

The PCR reaction for detection of chikungunya virus based on E1 gene was accomplished in 25  $\mu\text{L}$  reaction containing 1X PCR buffer, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.05 U/ $\mu\text{L}$  Taq polymerase (Vivantis, Shah Alam, Selangor, Malaysia), 0.4 mM dNTPs mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0.4  $\mu\text{M}$  of each primer (CHIKV E1-F3 and CHIKV E1-B3), and 1  $\mu\text{L}$  of cDNA. The step of PCR amplification contains pre-denaturation step at 95  $^\circ\text{C}$  for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 95  $^\circ\text{C}$  for 30 seconds, annealing 56  $^\circ\text{C}$  for 30 seconds, extension 72  $^\circ\text{C}$  for 1 minute, and finally post-extension 72  $^\circ\text{C}$  for 5 minutes. The PCR amplicon was analyzed by using 2.0 % agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts. The DNA pattern was visualized under UV light by using gel-doc (UVITEC Cambridge).

### 4.2.1 Temperature optimization

The temperature optimization for PCR amplification was performed at 50  $^\circ\text{C}$  to 60  $^\circ\text{C}$  and the PCR amplicon was analyzed by using 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts.

### 4.2.2 Concentration of $\text{MgCl}_2$

The suitable concentration of  $\text{MgCl}_2$  for PCR amplification was performed at 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM, and 4.0 mM. The PCR amplicon was analyzed by using 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts.

## 5. LAMP amplification of Chikungunya virus based on E1 gene.

### 5.1 LAMP primers

The primers for LAMP were designed based on the chikungunya virus envelope glycoprotein 1 (E1) gene retrieved from the NCBI database (GenBank accession number AB857841.1). The set of LAMP primers includes the forward primer (Biotin-CHIKV E1-F3), the reverse primer (CHIKV E1-B3), the forward inner primer (CHIKV E1-FIP), and the reverse inner primer (CHIKV E1-BIP) was designed by using software Primer explorer V5 programmed (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>).

## 5.2 LAMP optimization

The LAMP reaction for detection of chikungunya virus based on E1 gene was accomplished in 25  $\mu$ L reaction containing 0.5 M Betaine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1x Thermopol buffer, 6 mM  $MgSO_4$ , 1.5 mM dNTPs mix, 0.32 U/ $\mu$ L *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA), 2  $\mu$ M of each inner primers (CHIKV E1-FIP and CHIKV E1-BIP), 0.2  $\mu$ M of each outer primers (CHIKV E1-F3 and CHIKV E1-B3), and 3 ng/ $\mu$ L of RNA template. The LAMP reaction mixture will be incubated at 63 °C for 60 minutes and the amplification products will be analyzed by using 2.0 % agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts. The DNA pattern will be visualized under UV light by using gel-doc (UVITEC Cambridge).

### 5.2.1 Temperature optimization

The temperature optimization for LAMP was performed at 57 °C to 67 °C for 60 minutes. The amplification products were analyzed by using 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts.

### 5.2.2 Concentration of $MgSO_4$

The suitable concentrations of  $MgSO_4$  for LAMP amplifications was performed at 4.0 mM, 4.4 mM, 4.8 mM, 5.2 mM, 5.6 mM, 6.0 mM, 6.4 mM and 6.8 mM. The amplification products were analyzed by using 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts.

### 5.2.3 Concentration of dNTPs

The suitable concentration of dNTPs for LAMP amplifications was performed at 0.8 mM, 1.0 mM, 1.2 mM, 1.4 mM, 1.6 mM, 1.8 mM, 2.0 mM and 2.2 mM. The amplification products were analyzed by using 2% agarose gel electrophoresis in 0.5X TAE buffer at 100 volts.

## 6. Lateral Flow Dipstick assay (LFD)

The specific 5' -Fluorescein isothiocyanate (FITC DNA probe will be designed between CHIKVE1-F and CHIKVE1-R regions based on the chikungunya virus envelope glycoprotein 1 (E1) gene retrieved from the NCBI database (GenBank, accession number AB857841.1) and will be synthesized by Bio Basic, Canada.

### 6.1 PCR-LFD

After the PCR assay, the DNA hybridization was performed by the addition of a 1  $\mu$ L FITC-DNA probe into a microcentrifuge tube containing 9  $\mu$ L of biotin-labeled PCR products. Then, the reaction was incubated at 56 °C for 10 minutes prior to the addition of 100  $\mu$ L of the assay buffer. Then, the LFD strips (Milenia Biotec, Germany) were placed into the hybridization mixture and left for another 5-10 minutes until the liquid reaches the top of the membrane. Finally, the reaction was terminated by dipping the strip into distilled water for a few minutes.

### 6.2 LAMP-LFD

After the LAMP assay, the DNA hybridization was performed by the addition of a 1  $\mu$ L FITC-DNA probe into a microcentrifuge tube containing 9  $\mu$ L of biotin-labeled LAMP products. Then, the reaction was incubated at 63 °C for 10 minutes before adding 100  $\mu$ L of the assay buffer. Then, the LFD strips (Milenia Biotec, Germany) were placed into the hybridization mixture and left for another 5-10 minutes until the liquid reaches the top of the membrane. Finally, the reaction was terminated by dipping the strip into distilled water for a few minutes.

#### 6.2.1 Optimization of FITC-DNA probe

The optimized concentration of the FITC-DNA probe was determined at 10, 1, and 0.1  $\mu$ M by following the protocol described in Materials and Methods 5.1.

## 7. Analytical sensitivity test (Limit of Detection, LOD)

The analytical sensitivity test of LAMP was performed by using a 10-fold serial dilution of genomic DNA of chikungunya virus (dilution from  $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ). The LAMP products from various cDNA concentrations were further analyzed by LFD in comparison to 2.0 % agarose gel electrophoresis.

## 8. Analytical specificity test

The analytical specificity test of LAMP assay for detection of chikungunya virus was investigated against Dengue virus serotype 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus (HCV) and *Staphylococcus aureus* tested FITC-DNA probe. The LAMP products

from various microorganisms were further analyzed by LFD in comparison to 2.0 % agarose gel electrophoresis.





## CHAPTER IV

### RESULTS

#### 1. Optimization of PCR and LAMP of E1 gene

##### 1.1 PCR amplification

Optimization of PCR of envelope glycoprotein E 1 gene, when the PCR was carried out at 50 °C to 60 °C and the concentration of MgCl<sub>2</sub> was varied from 1.0 mM to 4.0 mM, the appropriated temperature and final concentration of MgCl<sub>2</sub> were 56 °C and 2.0 mM, respectively (Figure 9 and 10). The condition was used for all PCR tests in this study.

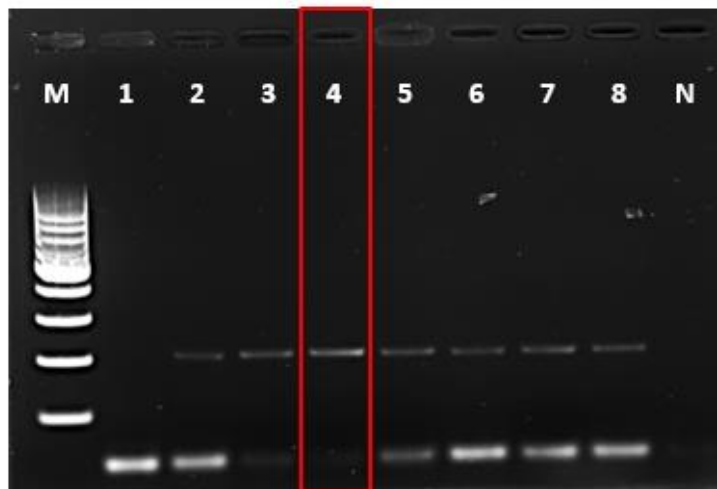


Figure 9 Optimized temperature analyzed. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-8 represents different temperatures were 60 °C, 59.4 °C, 58.3 °C, 56.3 °C, 53.9 °C, 52 °C, 50.7 °C, and 50 °C, respectively and Lane N represents the negative control.

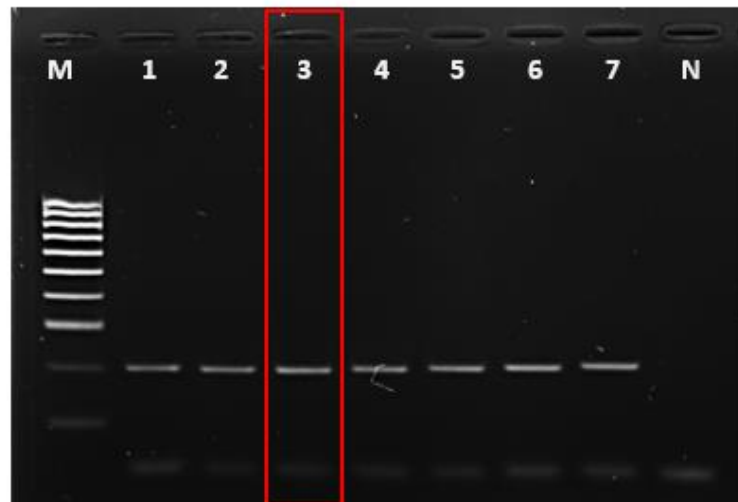


Figure 9 Optimized concentration of MgCl<sub>2</sub> analyzed. Lane M represents 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentration of MgCl<sub>2</sub> at 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM and 4.0 mM, respectively. Lane N represents the negative control.

### 1.2 LAMP amplification

The optimized temperature and final concentration of MgSO<sub>4</sub> and dNTPs for the E1 gene were 63 °C, 5.6 mM, and 1.4 mM, respectively (Figures 11-13). In this study, the condition was used for all LAMP tests.



Figure 10 Optimized temperature analyzed. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-10 represents different temperatures were 57 °C, 57.6 °C, 58.5 °C, 59.6 °C, 61 °C, 62.7 °C, 64.1 °C, 65.2 °C, 66.7 °C, and 67 °C, respectively and Lane N represents the negative control.



Figure 11 Optimized concentration of  $\text{MgSO}_4$  analyzed. Lane M represents 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentration of  $\text{MgSO}_4$  at 4.0 mM, 4.4 mM, 4.8 mM, 5.2 mM, 5.6 mM, 6.0 mM, and 6.4 mM, respectively. Lane N represents negative control.

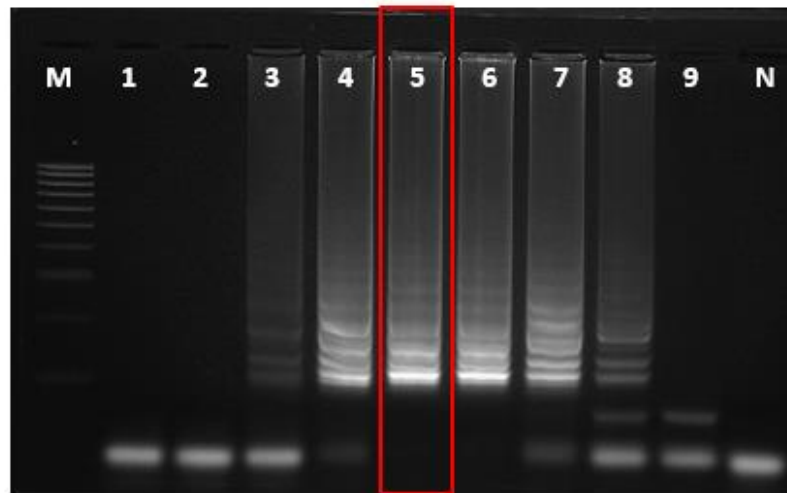


Figure 12 Optimized concentration of dNTPs analyzed. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-7 represents different concentrations of dNTPs at 0.8 mM, 1.0 mM, 1.2 mM, 1.4 mM, 1.6 mM, 1.8 mM, and 2.0 mM, respectively. Lane N represents the negative control.

### 1.3 The limit of detection (LOD) and specificity of PCR and LAMP assays of CHIKV

Optimized conditions described above was used to examine the LOD and specificity of CHIKV. The LOD of PCR and LAMP assays were 0.9 ng/ $\mu$ L. According to specificity test, the LAMP assay showed no cross reaction against other treated virus and bacteria include Dengue virus type 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus and *S. aureus* while PCR was positive to Dengue virus type 1 and *S. aureus*. (Figure 14 and 15)

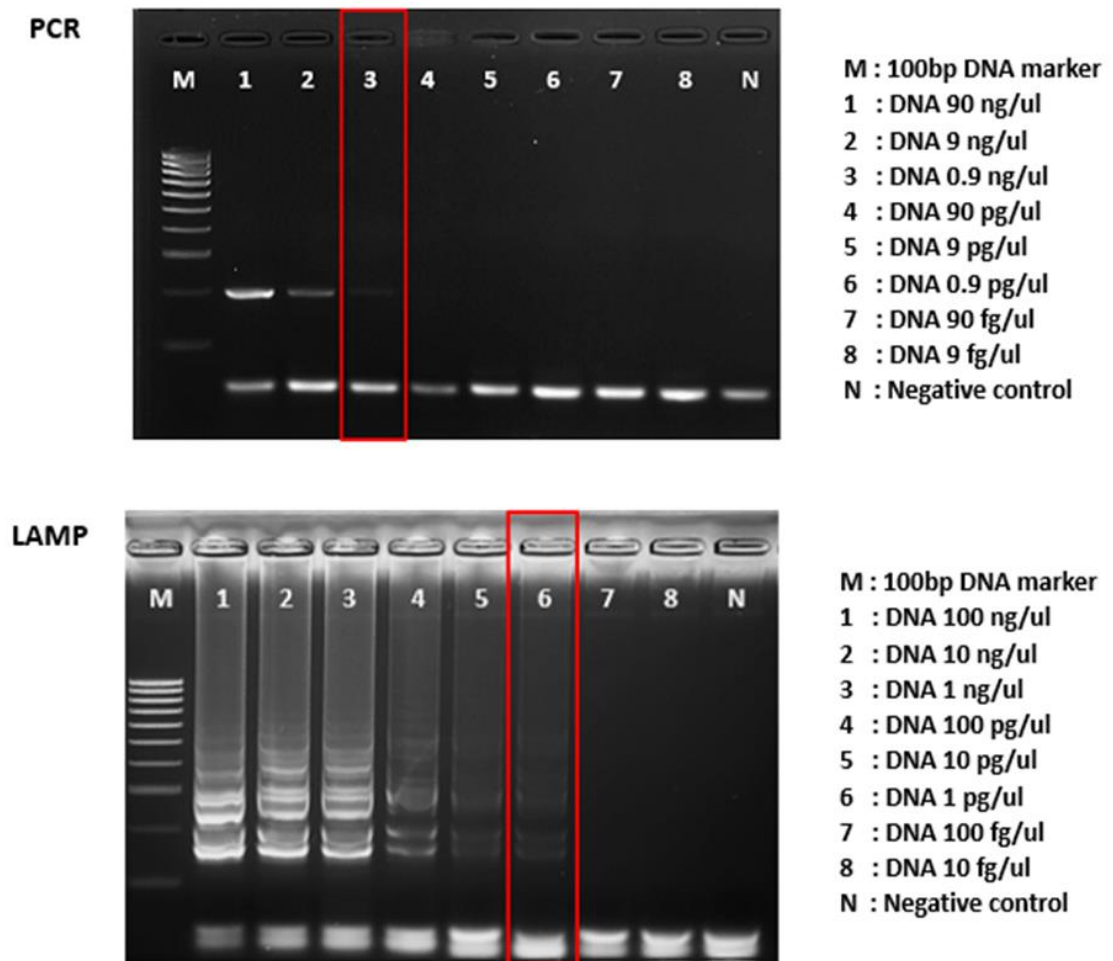


Figure 13 The LOD of PCR and LAMP assays. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. (PCR) Lane 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 90 ng/ $\mu$ L, 9.0 ng/ $\mu$ L, 0.9 ng/ $\mu$ L, 90 pg/ $\mu$ L, 9.0 pg/ $\mu$ L, 0.9 pg/ $\mu$ L, 90.0 fg/ $\mu$ L and 9.0 fg/ $\mu$ L, respectively. (LAMP) Lane 1-8 represents the amplification product of DNA concentrations at 100.0 ng/ $\mu$ L, 10.0 ng/ $\mu$ L, 1.0 ng/ $\mu$ L, 100.0 pg/ $\mu$ L, 10.0 pg/ $\mu$ L, 1.0 pg/ $\mu$ L, 100.0 fg/ $\mu$ L and 10.0 fg/ $\mu$ L, respectively. Lane N represents the negative control.

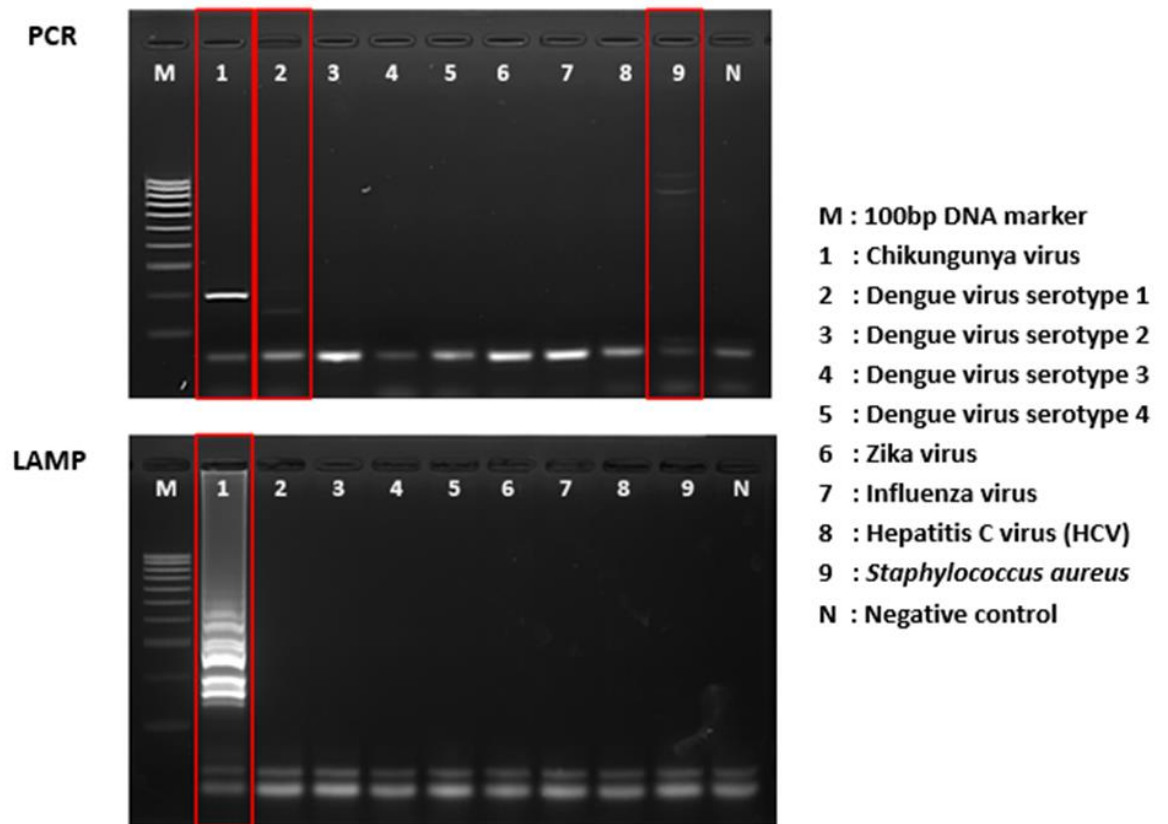


Figure 14 Specificity test of PCR and LAMP assays. Lane M represents a 100 bp DNA ladder. Lane 1-9 represents Chikungunya virus, Dengue virus serotype 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus, and *S. aureus* respectively. Lane N represents the negative control.

## 2. Lateral Flow Dipstick (LFD) detection

### 2.1 Optimization of DNA probe concentration

The optimization of DNA probe concentration of PCR and LAMP assays was 1  $\mu$ M(Figure 16).

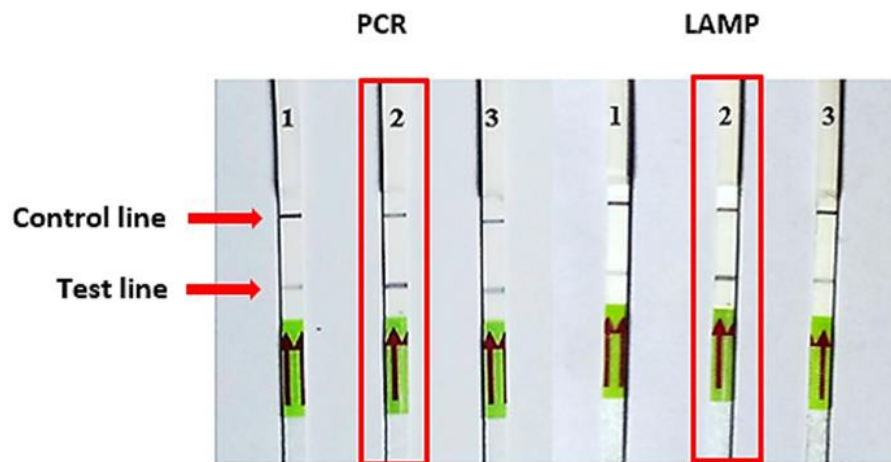


Figure 15 Optimization of DNA probe of PCR and LAMP assays. Strips 1-3 represents DNA probe concentration 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , and 0.1  $\mu\text{M}$  respectively.

## 2.2 The limit of detection and specificity of PCR-LFD and LAMP-LFD

The LOD of PCR-LFD and LAMP-LFD assays were 0.9 ng/ $\mu\text{L}$  and 1 pg/ $\mu\text{L}$ , respectively. Specificity test, both assays showed no cross-reaction against other treated viruses and bacteria include Dengue virus serotypes 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus, and *S. aureus*. (Figures 17 and 18)



Figure 16 The LOD of PCR-LFD and LAMP-LFD assays. (PCR-LFD) Strips 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 90.0 ng/ $\mu$ L, 9.0 ng/ $\mu$ L, 0.9 ng/ $\mu$ L, 90.0 pg/ $\mu$ L, 9.0 pg/ $\mu$ L, 0.9 pg/ $\mu$ L, 90.0 fg/ $\mu$ L, and 9.0 fg/ $\mu$ L, respectively. (LAMP-LFD) Strips 1-8 represents amplification product of DNA concentrations at 100.0 ng/ $\mu$ L, 10.0 ng/ $\mu$ L, 1.0 ng/ $\mu$ L, 100.0 pg/ $\mu$ L, 10.0 pg/ $\mu$ L, 1.0 pg/ $\mu$ L, 100.0 fg/ $\mu$ L and 10.0 fg/ $\mu$ L, respectively. Lane N represents the negative control.



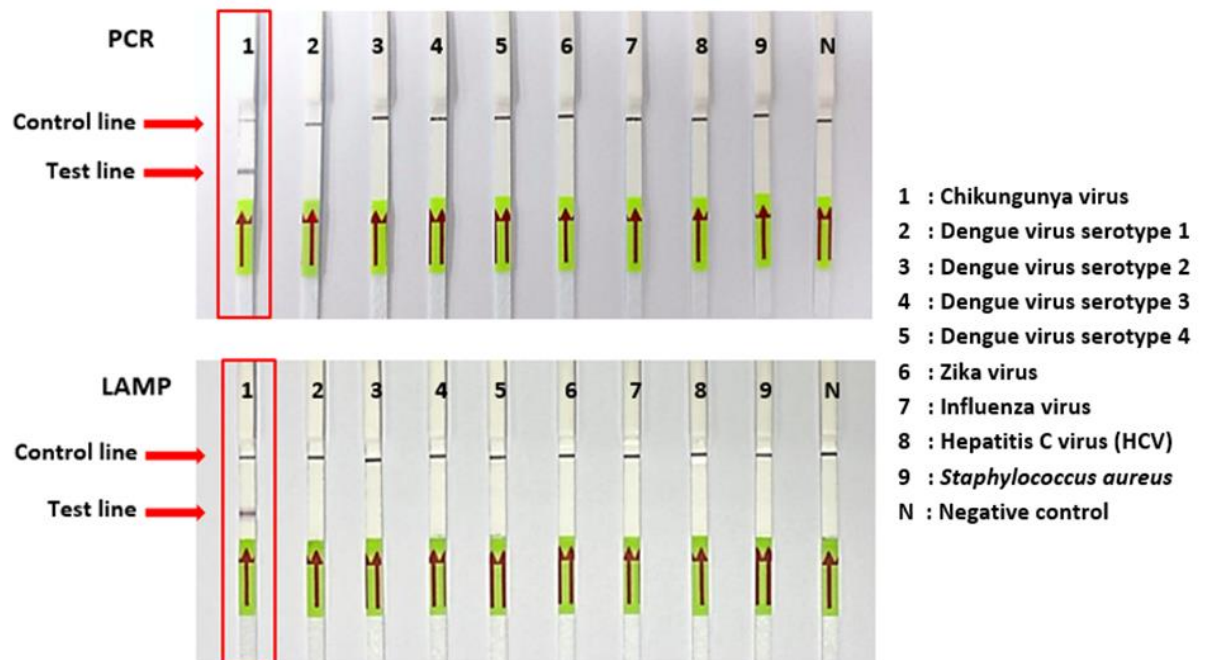


Figure 17 Specificity test of PCR-LFD and LAMP-LFD assays. Strips 1-9 represents Chikungunya virus, Dengue virus serotypes 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus and *S. aureus* respectively. Lane N represents the negative control.

## CHAPTER V

### DISCUSSION

Chikungunya is a mosquito-borne disease that is the leading cause of severe joint pain in humans, these symptoms often affect the patient's daily life and last for a long time, which has long-term consequences<sup>(39)</sup>. Chikungunya spreads globally, especially in the tropical areas, including Thailand, where more than 100,000 new cases are reported each year. The diagnostic of CHIKV based on laboratory can be used viral culture, serological test, and molecular technique. However, the gold standard method for lab-based diagnosis of CHIKV is the RT-PCR assay<sup>(40)</sup>.

In the last decade, nucleic acid-based amplification methods have been established for the detection of mosquito-borne diseases, including real-time PCR, conventional PCR and LAMP<sup>(41-43)</sup>. Although the real-time PCR and conventional PCR have high sensitivity and specificity, these assays have several limitations due to them require expensive tools, high cost, and time-consuming. The LAMP assay does not require expensive and complicated facilities. Hence, it is suitable for use as a rapid screening test for CHIKV at the outbreak areas as well as beneficial for prevention and control planning of the virus.

Herein, the RT-LAMP was developed for the detection of CHIKV by using specific primers and probes. The envelope glycoprotein 1 (E1) gene was selected as the DNA target sequence for all primer designs in this study<sup>(44, 45)</sup>. The glycoprotein E1 gene is widely used as the primer design template for CHIKV due to the E1 region can be cover three different genotypes of CHIKV. Besides, the probe was also designed from the E1 gene to enhance the specificity of CHIKV detection. The RT-LAMP assay was easily performed at the temperature of 63°C using a heating box before detection on the LFD. The overall process was rapid when compared to the RT-PCR technique, as it can be achieved within approximately 60-80 minutes (Table 1).

The results showed that in the analytical sensitivity test, the RT-LAMP-LFD and RT-LAMP-AGE could detect DNA of CHIKV as less as 1.0 pg/μL, which was 1000 times more sensitive than the RT-PCR-LFD and RT-PCR-AGE (0.9 ng/μL). Previously, the RT-

LAMP was shown to be more sensitive than RT-PCR for diagnosis of Zika virus<sup>(46)</sup> and Senecavirus A<sup>(47)</sup>.

According to analytical specificity test, the RT-LAMP-LFD, RT-LAMP- AGE, and RT-PCR-LFD assay showed no cross-reactions against other strains including Dengue virus type 1-4, Zika virus, Influenza virus, Hepatitis C virus, and *S. aureus*, respectively whereas RT-PCR-AGE was positive to Dengue virus type 1 and *S. aureus*. (Table 1). This indicates that a DNA probe designed specifically for the CHIKV E1 gene reduces the incidence of cross-reaction. As a result, no cross-reactions were found in all the LFD assays.

In conclusion, the RT-LAMP-LFD techniques have high sensitivity and specificity. In addition, RT-LAMP-LFD was promising for further routine usage as an on-site simple and rapid test due to its strongest benefits on the utilization of a single temperature, less time-consuming, compromising cost, less equipment for operation, and the proper on-site inspection. As stated by all the previous reasons, the RT-LAMP-LFD is very useful for the improvement of infection-controlling to reduce the spread of the disease.

Table 1 Comparison of methods.

Method	LOD	Specificity	Time (Hr.)
RT-PCR-AGE	0.9 ng/ $\mu$ L	Cross-hybridization	2.5-3
RT-PCR-LFD	0.9 ng/ $\mu$ L	No cross-hybridization	2
RT-LAMP-AGE	1.0 pg/ $\mu$ L	No cross-hybridization	1.5-2
RT-LAMP-LFD	1.0 pg/ $\mu$ L	No cross-hybridization	1-1.5

## APPENDIX

**Materials**

100 bp DNA ladder marker	Biolabs
100 bp DNA ladder marker plus	Biolabs
Agarose	Vivantis
Betaine	Sigma
<i>Bst</i> DNA polymerase	Biolabs
Deoxynucleotide triphosphate (dNTP)	Biolabs
Ethylenediarrinetetraacetic acid (EDTA)	Bio Basic Canada Inc.
Glacial acetic acid	Bio Basic Canada Inc.
Hydrochloric (HCl)	Mark
LFD strip kit	Milenia biotec
Magnesium chloride (MgCl <sub>2</sub> )	Vivantis
Magnesium sulfate (MgSO <sub>4</sub> )	Biolabs
Nucleic acid extractions reagents	Precision System Science
Sodium chloride (NaCl)	Vivantis
Reverse Transcriptase kit	Invitrogen
Taq DNA polymerase	Invitrogen®
Tris-HCl	Amaesco®

## 1. Buffer preparation

### 1.1 50X Tris Acetate EDTA (TAE) buffer (pH 8.5) 1 liter

Tris	242 g
Glacial acetic acid	57.1 mL
0.5 M EDTA pH 8	100 mL

Dissolve the following reagents in approximately 700 ml of distilled water. Then the solution is adjusted to pH 8.5 with the addition of HCl, bringing final volume to 1 liter, autoclave or sterilize by filtration.

### 1.2 0.5X Tris Acetate EDTA (TAE) buffer (pH 8.5) 1 liter

50X TAE	10 mL
dH <sub>2</sub> O	990 mL

The 0.5X TAE buffer was prepared by adding 0.1 volume of 50X TAE buffer to 9.9 volume of sterilized distilled water

Table 2 Patent of primer and DNA probe for detection of CHIKV

No.	Patent	Status
1	Primers set and DNA probe for detection of Chikungunya virus using Loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick.	Patent submission number: 2003000918



หนังสือยื่นขออนุญาตเห็นการรับรอง  
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย : การพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอแบบแถบในการตรวจเชื้อไวรัสซิกาคุณภาพยา  
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทศิริ  
หน่วยงานต้นสังกัด : คณะแพทยศาสตร์  
รหัสโครงการวิจัย : SWUEC-450/2563X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยื่นขออนุญาต : 26 ตุลาคม 2563  
ยื่นขออนุญาตโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 18 มกราคม 2564

ลงชื่อ.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทนตแพทย์หญิงณปภา เข็มจิรกุล)  
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม  
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

ลงชื่อ.....  
(แพทย์หญิงสุวิพร ภัทรสุวรรณ)  
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม  
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-450/2563



Human Research Ethics Committee, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University  
 270 Rama 6 Rd. Phayatal Ratchathewi Bangkok 10400 Tel.(660)2012175, 2011544, 2010388  
 Website: <https://med.mahidol.ac.th/research/ethics>  
 E-mail: [raec.mahidol@gmail.com](mailto:raec.mahidol@gmail.com)

COA. MURA2021/105

Title of Project (English)	Development of DNA-Lateral flow Strip Test for Detection of Chikungunya Virus
Title of Project (Thai)	การพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอแบบแถบในการตรวจเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา
Type of Review	Exemption from regular review
Principal Investigator	Kosum Chansiri, Ph.D.
Official Address	Faculty of Medicine, Srinakharinwirot university
Co-Investigator (s)	1. Ngamnete Phongpratheapchai 2. Supatra Areekit, Ph.D. 3. Ekawat Pasomsub, Ph.D. 4. Treewat Watthanachokchai 5. Kingkan Rakmanee
Approval includes	1. Submission Form Protocol Version 2 Date 27/02/2021 2. Certificate in Ethics Training
<p>Institutional Review Boards in Mahidol University are in full compliance with International Guidelines for Human Research Protection such as Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)</p>	
Date of Approval	February 08, 2021
Date of Expiration	February 07, 2022

Signature of Chair.....  
 (Asst. Prof. Chusak Okascharoen, M.D., Ph.D.)

This certificate is subject to the following conditions:

- 1) Approval is granted only for the project with details described in submitted proposal
- 2) Submission of modification to the approved project is needed before implementation
- 3) A yearly progress report is required for renewing of approval
- 4) Written notification is required when the project is complete or terminated



ภาควิชา...ชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์.....  
โทร. 02-6495369 02-649500 ต่อ 4603

ที่ อว ๘๙๐๖.๘/๑๐๗

วันที่ 12 กรกฎาคม ๒๕๖๔

เรื่อง ขอส่งข้อตกลงในการใช้ตัวอย่างวัตถุเพื่อการวิจัย (Material Transfer Agreement: MTA)

เรียน รองคณบดีฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

สิ่งที่ส่งมาด้วย	1. ข้อตกลงการใช้ตัวอย่างชีวภาพ (MTA)	จำนวน 1 ฉบับ
	2. แบบฟอร์มตรวจสอบรายการเอกสารประกอบการพิจารณา	จำนวน 1 ฉบับ
	3. โครงร่างวิจัย/แบบเสนอโครงการวิจัย (Proposal/Protocol)	จำนวน 1 ฉบับ
	4. สำเนาหนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน	จำนวน 1 ฉบับ

ด้วย .....ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ..... สังกัด .....คณะแพทยศาสตร์.....มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.....มีความประสงค์ที่จะขอรับ.....ตัวอย่างสารพันธุกรรม ประเภท RNA.....จาก.....ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี.....สังกัด.....มหาวิทยาลัยมหิดล.....เพื่อ...ใช้ในงานวิจัย.....ในโครงการวิจัยเรื่อง "...การพัฒนาชุดทดสอบดีเอ็นเอแบบแถบในการตรวจเชื้อไวรัสซิกาในกุนยา....." โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก.....ทุน Basic Research Fund (Blue Sky) ประจำปีงบประมาณ 2564.....นั้น

ในการนี้ จึงขอจัดส่งเอกสารข้อตกลง Material Transfer Agreement (MTA) มายังรองคณบดีฝ่ายวิจัยเพื่อพิจารณาข้อความและให้ผู้มีอำนาจลงนามแทนในเอกสารข้อตกลง (MTA) ดังกล่าว ดังเอกสารที่ส่งมาด้วยนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาและดำเนินการต่อไป

(.....  
ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ

หัวหน้าโครงการวิจัย

(.....  
แพทย์หญิงจันทร์ตรา ตันนันทบุษราคัม

หัวหน้าภาควิชาชีวเคมี



### ข้อตกลงการใช้ตัวอย่างชีวภาพ

ข้อตกลงนี้ทำขึ้นเพื่อรักษาสีทธิในตัวอย่างชีวภาพของมหาวิทยาลัยมหิดล (ซึ่งต่อไปในบันทึกข้อตกลงนี้ เรียกว่า "ผู้จัดหา") ฝ่ายหนึ่ง ซึ่งยินยอมจะให้ตัวอย่างชีวภาพแก่.....คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.....(ซึ่งต่อไปในบันทึกข้อตกลงนี้ เรียกว่า "ผู้รับ") อีกฝ่ายหนึ่ง

ชื่อของผู้รับชีววัตถุ:

1...ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทศิริ.....

ที่อยู่ : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ 114 สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110.....

ชื่อของผู้จัดหาชีววัตถุ:

1. ...อาจารย์ ดร.เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์.....

ที่อยู่ : ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล 270 ถนนพระราม 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400  
ตัวอย่างชีวภาพที่จัดเตรียมให้ คือ...ตัวอย่างสารพันธุกรรม ประเภท RNA.....

ทั้งสองฝ่ายได้ทำบันทึกข้อตกลงกันในเรื่องดังต่อไปนี้

1. ตัวอย่างชีวภาพเป็นทรัพย์สินของผู้จัดหาชีววัตถุ แต่เพียงผู้เดียว และใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาวิจัยเท่านั้น ผู้รับชีววัตถุจะไม่มีสิทธิใดๆ ในตัวอย่างชีวภาพนอกเหนือจากที่กล่าวไว้ในข้อตกลงนี้  
กรรมสิทธิ์ในตัวอย่างชีวภาพที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงแก้ไขตัวอย่างชีวภาพและรายได้ที่เกิดขึ้นจากการนำตัวอย่างชีวภาพไปก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่าจะโดยทางตรงหรือโดยทางอ้อม ให้ทั้งสองฝ่ายมีการเจรจาตกลงกันด้วยความเป็นธรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

ก) การสนับสนุนให้เกิดความคิดสร้างสรรค์ในการเปลี่ยนแปลง แก้ไขนั้น และ

ข) กฎหมายระเบียบและข้อกำหนด ที่ใช้บังคับกับนักวิจัยนั้น

2. ผู้รับชีววัตถุจะใช้ตัวอย่างชีวภาพเพื่อประโยชน์ในทางการค้นคว้า วิจัย ตามที่ระบุในข้อตกลงนี้เท่านั้น และจะไม่นำไปใช้เพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ หรือ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์ทางทหาร หรือ อนุญาตช่วงต่อไปยังบุคคลที่สาม เว้นเสียแต่จะได้รับอนุญาตจากผู้จัดหาชีววัตถุนั้นเสียเอง

3. ผู้รับชีววัตถุจะไม่นำตัวอย่างชีวภาพ และหรือข้อมูลความลับที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างชีวภาพไปใช้ในการค้นคว้า วิจัยที่เป็นการค้าปลีก การอนุญาตให้หน่วยงานภายนอกใช้สิทธิ หรือการถ่ายโอนข้อมูล การส่งต่อข้อมูล นำออกหรือเปิดเผยข้อมูลไปยังบุคคลอื่น โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้จัดหาชีววัตถุ

4. ในการนำผลการวิจัยไปตีพิมพ์เผยแพร่ในเอกสารหรือสื่อใด ๆ ผู้รับชีววัตถุตกลงยินยอมมอบสำเนาเอกสารผลงานตีพิมพ์ให้กับผู้จัดหาชีววัตถุทุกฉบับ ซึ่งจะต้องประกอบด้วยผลการวิจัยที่ได้จากการใช้การเปลี่ยนแปลง แก๊ซ ตัวอย่างชีววัตถุไม่ว่าโดยทางตรงหรือทางอ้อม

ผู้รับชีววัตถุจะต้องลงข้อความไว้ในกิตติกรรมประกาศเพื่อให้เกียรติผู้จัดหาชีววัตถุในฐานะสถาบันเจ้าของตัวอย่างชีวภาพ ในการตีพิมพ์ผลงานวิจัยดังกล่าว

5. เนื่องด้วยตัวอย่างชีวภาพเป็นสิ่งที่ได้มาจากการทดลองอยู่แล้วโดยสภาพ จึงไม่อาจให้การยืนยันและการรับประกันใดๆ ได้ ไม่ว่าโดยชัดแจ้งหรือโดยปริยาย ไม่มีการรับประกันตัวอย่างชีวภาพดังกล่าวเพื่อการจำหน่าย หรือเพื่อการใดการหนึ่งโดยเฉพาะ หรือเพื่อการใช้ชีวภาพไปในทางการละเมิดต่อสิทธิบัตร ลิขสิทธิ์ เครื่องหมายการค้า หรือสิทธิในทรัพย์สินทางปัญญาใด ๆ ทั้งสิ้น ไม่ว่าด้วยเหตุใดๆ ก็ตาม ผู้จัดหาชีวภาพจะไม่ร่วมรับผิดชอบในความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการใช้เช่นนั้น และหากมีการโต้แย้งสิทธิเกิดขึ้น ผู้รับชีวภาพตกลงยินยอมจะรับผิดชอบต่อผู้จัดหาชีวภาพ ในการปกป้องเยียวยา ค่าเสียหายให้พ้นจากความสูญเสีย การเรียกร้อง ความเสียหาย ความรับผิดชอบใด ๆ ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการที่ผู้รับชีวภาพหรือลูกจ้างหรือตัวแทน ใช้ เก็บรักษาและขายตัวอย่างชีวภาพนั้น หรือ ต้องถูกบุคคลที่สามเรียกร้องหรือฟ้องร้อง เว้นแต่ความสูญเสีย ความเสียหาย หรือความรับผิด นั้นเป็นผลโดยตรงจากความประมาทเลินเล่อ หรือการกระทำผิดกฎหมายของผู้จัดหาชีววัตถุนั้นเอง

6. ข้อตกลงนี้จะสิ้นสุดลงเมื่อ

ก) เมื่องานวิจัยที่ใช้ตัวอย่างชีวภาพสิ้นสุดลงแล้ว หรือ

ข) เมื่อครบกำหนด 30 วันนับแต่ได้รับหนังสือทวงถามจากอีกฝ่ายหนึ่ง หรือ

ค) ณ วันที่กำหนดไว้แน่นอน ในกรณีดังต่อไปนี้

1) หากข้อตกลงนี้สิ้นสุดลง ตามข้อ 6 (ก) และ 6 (ข) ผู้รับชีวภาพจะต้องยุติการใช้ตัวอย่างชีววัตถุ และจะทำตามคำสั่งของผู้จัดหาชีววัตถุ หรือจะส่งคืน หรือทำลายสิ่งที่เปลี่ยนแปลง แก๊ซ หรือที่ยังคงเหลืออยู่ทั้งหมด และ

2) ในกรณีผู้จัดหาชีวภาพเป็นฝ่ายบอกเลิก ตาม ข้อ 6(ข) ทั้งนี้ต้องมีใช้กรณีการผิดสัญญา หรือการเสี่ยงต่อการเกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้ป่วย เมื่อผู้รับชีวภาพร้องขอผู้จัดหาชีวภาพจะขยายระยะเวลาของการสิ้นสุดสัญญาออกไปอีก 1 ปี เพื่อให้งานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไป

เมื่อบันทึกข้อตกลงนี้สิ้นสุดลงหรือเมื่อได้รับการร้องขอ ผู้รับชีววัตถุจะต้องไม่ใช้ตัวอย่างชีววัตถุนี้อีกต่อไป และจะทำตามคำสั่งของผู้จัดหาชีววัตถุ หรือจะส่งคืน หรือทำลาย ตัวอย่างชีววัตถุที่ยังคงเหลืออยู่ ความครอบครอง รวบรวมจะส่งคืน หรือทำลาย สำเนา ตัวอย่าง และรูปจำลองของชีววัตถุนั้น และให้คำรับรองแก่ผู้จัดหาตัวอย่างชีวภาพด้วยว่าได้มีการทำลายสิ่งดังกล่าวเช่นว่านั้นเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ในนามของ

3

นักวิทยาศาสตร์ ผู้จัดทำ

ลงชื่อ..... *เอกวิวัฒน์ อสมทวิทย์*

(อาจารย์ ดร.เอกวิวัฒน์ อสมทวิทย์)

ภาควิชา/หน่วยงาน...พยาธิวิทยาคลินิก.....

คณะ...แพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี.....

มหาวิทยาลัยมหิดล

นักวิทยาศาสตร์ ผู้รับ

ลงชื่อ..... *ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ*

(ศาสตราจารย์ ดร.โกสุม จันทร์ศิริ)

ภาควิชา/หน่วยงาน...ชีวเคมี.....

คณะ...แพทยศาสตร์.....

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สถาบัน ผู้จัดทำ

ลงชื่อ..... *น*

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์บุญส่ง องค์พิพัฒนกุล)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย ปฏิบัติหน้าที่แทน

คณบดีคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี

มหาวิทยาลัยมหิดล

วันที่..... 15 ก.ค. 2564

สถาบัน ผู้รับ

ลงชื่อ..... *อ.สมชาย สันติวัฒนกุล*


(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

วันที่..... 12 กรกฎาคม 2564

วันที่สร้างเอกสาร 4 สิงหาคม 2564

แบบ สป/สพ/อสป/001-ก  
หน้า 1 ของจำนวน 3 หน้า

 <b>คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร</b>	<b>สำหรับเจ้าหน้าที่</b> วันที่รับคำขอ 04/08/2564 เลขที่คำขอ วันที่ยื่นคำขอ 04/08/2564
<input type="checkbox"/> การประดิษฐ์ <input type="checkbox"/> การออกแบบผลิตภัณฑ์ <input checked="" type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร(ฉบับที่ 2) พ.ศ.2535 และพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ.2542	สัญลักษณ์งานการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์ วันประกาศโฆษณา เลขที่ประกาศโฆษณา วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่
1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ ชุดไพรเมอร์ (primer) และตัวตรวจจับ (DHA probe) สำหรับตรวจไวรัสชิคุนกุนยา (Chikungunya virus) ด้วยปฏิกิริยาซูเปอร์-เมดิเอทเดค ไอโซเอนออลแอมพลิเคชัน หรือ แอมป์ลัฟกักับการใช้แบบตรวจวัดแบบแถบสี	
2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่ _____ ในจำนวน _____ คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน	
3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> บุคคลธรรมดา <input type="checkbox"/> นิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> หน่วยงานรัฐ <input type="checkbox"/> มูลนิธิ <input type="checkbox"/> อื่นๆ ชื่อ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่อยู่ 114 หมู่ที่ 1 ต.ถนนใหญ่ทางศาลากลางบ้านปทุมธานีจ.ปทุมธานี ซอย สุรนวิทย์ 23 ถนน สุรนวิทย์ 23 ตำบล/แขวง คลองเตยเหนือ อำเภอ/เขต วัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10110 ประเทศไทย อีเมล ipswooffice@gmail.com <input type="checkbox"/> เลขประจำตัวประชาชน <input type="checkbox"/> เลขทะเบียนนิติบุคคล <input checked="" type="checkbox"/> เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 1 5 8 1 8 1 <input type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ตั้งแบบ) ไนรมณีการมา สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง <input checked="" type="checkbox"/> อีเมลผู้ขอ <input type="checkbox"/> อีเมลตัวแทน	
4. สิทธิบัตรในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร <input type="checkbox"/> ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ <input checked="" type="checkbox"/> ผู้รับโอน <input type="checkbox"/> ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น	
5. ตัวแทน (ถ้ามี) ชื่อ นางสาว นิศา รุ่งเรืองผล ที่อยู่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุรนวิทย์ 23 ถนนสุรนวิทย์ ตำบล/แขวง คลองเตยเหนือ อำเภอ/เขต วัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10110 ประเทศไทย อีเมล เลขประจำตัวประชาชน 3 2 2 0 1 0 0 2 9 0 9 1 7 <input type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ตั้งแบบ)	
6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ <input type="checkbox"/> ชื่อและที่อยู่เดียวกับผู้ขอ ชื่อ นางสาว โกลุม จันทศิริ ที่อยู่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอย สุรนวิทย์ 23 ถนน สุรนวิทย์ 23 ตำบล/แขวง คลองเตยเหนือ อำเภอ/เขต วัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10110 ประเทศไทย อีเมล เลขประจำตัวประชาชน 3 1 0 0 6 0 2 2 2 6 7 6 1 <input checked="" type="checkbox"/> เพิ่มเติม (ตั้งแบบ)	
7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร เลขที่ _____ วันยื่น _____ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ <input type="checkbox"/> คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง <input type="checkbox"/> ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ <input type="checkbox"/> ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ <b>หมายเหตุ</b> ในกรณีที่ไม่มีอาชญาจะเขียนได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับชื่อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด	
<b>สำหรับเจ้าหน้าที่</b>	
<b>จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร</b> <input type="checkbox"/> กลุ่มวิศวกรรม <input type="checkbox"/> กลุ่มเคมี <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ <input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมี/เทคนิค) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1) <input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2) <input type="checkbox"/> อนุสิทธิบัตร (เคมี) สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (พืช/สัตว์) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ) <input type="checkbox"/> สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)	



To whom it may concern

This is to certify that Ngamnete Phongpratheepechai  
from Srinakharinwirot University

attended and presented their work at the 47<sup>th</sup> Congress on Science, Technology and  
Technology-based Innovation.

Presentation Title: DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS USING REVERSE  
TRANSCRIPTION-PCR ASSAY COMBINED WITH LATERAL FLOW  
DIPSTICK

( Oral Presentation )

The 47<sup>th</sup> Congress on Science, Technology and Technology-based Innovation (STT47)  
is jointly organized by the Science Society of Thailand under the Patronage of His  
Majesty the King, under the theme “Sciences for SDGs: Challenges and Solutions” at  
Kasetsart University, Kamphangsaen Campus, Nakon Pathom, during 5-7 October,  
2021.

*Somkiat Ngamprasertsith*

Professor Somkiat Ngamprasertsith, Ph.D.

Chairperson STT47

## REFERENCES

1. Intayot P, Phumee A, Boonserm R, Sor-Suwan S, Buathong R, Wacharapluesadee S, et al. Genetic Characterization of Chikungunya Virus in Field-Caught *Aedes aegypti* Mosquitoes Collected during the Recent Outbreaks in 2019, Thailand. *Pathogens*. 2019;8(3).
2. Pathak H, Mohan MC, Ravindran V. Chikungunya arthritis. *Clin Med (Lond)*. 2019;19(5):381-5.
3. Diop D. Chikungunya Outbreaks from 2000 to 2015: A Review. *MOJ Public Health*. 2015;2(6).
4. Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009;40(5):951-62.
5. The data of reported cases of chikungunya fever in Thailand between January 1, 2020, and August 25, 2020 [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 30]. Available from: <https://ddc.moph.go.th/dvb/news.php?news=270&deptcode=dvb>.
6. Powell JR. Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*? *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(6):1563-5.
7. Horwood PF, Buchy P. Chikungunya. *Rev Sci Tech*. 2015;34(2):479-89.
8. Haese NN, Broeckel RM, Hawman DW, Heise MT, Morrison TE, Streblow DN. Animal Models of Chikungunya Virus Infection and Disease. *J Infect Dis*. 2016;214(suppl 5):S482-s7.
9. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. *J Clin Microbiol*. 2019;57(6).
10. Runowska M, Majewski D, Niklas K, Puszczewicz M. Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(3):494-501.
11. Metz SW, Pijlman GP. Function of Chikungunya Virus Structural Proteins. *Chikungunya Virus 2016*. p. 63-74.

12. Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. *Curr Opin Virol.* 2017;24:25-30.
13. Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest.* 2017;127(3):737-49.
14. Adekunle Sanyaolu, Chuku Okorie, Olanrewaju Badaru, Emily Wynveen, Shawn White, William Wallace, et al. Chikungunya Epidemiology: A Global Perspective. *SM J Public Health Epidemiol.* 2016;2(2):1028.
15. Madariaga M, Ticona E, Resurrecion C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(1):91-8.
16. Muhammad Muzammal, Safeena Sadiq, Muhammad Zeeshan Ali, Safeer Ahmad, Inayat Ullah, Saima Mashal, et al. Chikungunya virus: An emerging Arbovirus. 2019;6(6):116-9.
17. Ganesan VK, Duan B, Reid SP. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. *Viruses.* 2017;9(12).
18. Weaver SC, Chen R, Diallo M. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. *Annu Rev Entomol.* 2020;65:313-32.
19. World Health Organization. Guidelines for Prevention and Control of Chikungunya Fever. *Commun Dis Intell* 2009;9-12.
20. Cunha RVD, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(8):523-31.
21. Bautista-Reyes E, Núñez-Avellaneda D, Alonso-Palomares LA, Salazar MI. Chikungunya: Molecular Aspects, Clinical Outcomes and Pathogenesis. *Rev Invest Clin.* 2017;69(6):299-307.
22. Caglioti C, Lalle E, Castilletti C, Carletti F, Capobianchi MR, Bordi L. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol.* 2013;36(3):211-27.
23. Epidemiology and Prevention of Chikungunya Fever in Hong Kong [Internet]. 2008 [cited 2020 Nov 12]. Available from: [https://www.chp.gov.hk/files/pdf/epidemiology\\_and\\_prevention\\_of\\_chikungunya\\_fever\\_in\\_hong\\_kong\\_r.pdf](https://www.chp.gov.hk/files/pdf/epidemiology_and_prevention_of_chikungunya_fever_in_hong_kong_r.pdf).

24. Subudhi BB, Chattopadhyay S, Mishra P, Kumar A. Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. *Viruses*. 2018;10(5).
25. Simon F, Javelle E, Oliver M, Leparc-Goffart I, Marimoutou C. Chikungunya virus infection. *Curr Infect Dis Rep*. 2011;13(3):218-28.
26. Chikungunya Fever [Internet]. 2019 [cited 2020 Nov 23]. Available from: <https://www.chp.gov.hk/en/healthtopics/content/24/6122.html>
27. Rahman MM. Laboratory Diagnostic Options and Challenges for Chikungunya Viruses 2018;10(1):18-24. *Pulse*. 2018;10(1):18-24
28. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *Biomed Res Int*. 2015;2015:834371.
29. Faggioli F, Luigi M, IN. B. Viroid Amplification Methods. *Viroids and Satellites*. 2017;pp.381-91.
30. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol*. 2015;53(1):1-5.
31. อมรรัตน์ ร่มพฤษ์. เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต*. . 2554 21(3):201-6.
32. Sahni AK, Grover N, Sharma A, Khan ID, Kishore J. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Med J Armed Forces India*. 2013;69(3):246-53.
33. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4):189-94.
34. Saad NA, Zaaba SK, Zakaria ABM, Kamarudin LM, Wan K, Shariman A. Quartz crystal microbalance for bacteria application review. 2014 2nd International Conference on



Electronic Design (ICED). 2014:455-60.

35. Mehrotra P. Biosensors and their applications - A review. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(2):153-9.
36. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016;60(1):111-20.
37. Okabayashi T, Sasaki T, Masrinoul P, Chantawat N, Yoksan S, Nitatpattana N, et al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. *J Clin Microbiol.* 2015;53(2):382-8.
38. Wang R, Ongagna-Yhombi SY, Lu Z, Centeno-Tablante E, Colt S, Cao X, et al. Rapid Diagnostic Platform for Colorimetric Differential Detection of Dengue and Chikungunya Viral Infections. *Anal Chem.* 2019;91(8):5415-23.
39. McFee RB. Selected mosquito-borne illnesses-Chikungunya. *Dis Mon.* 2018;64(5):222-34.
40. Adam A, Jassoy C. Epidemiology and Laboratory Diagnostics of Dengue, Yellow Fever, Zika, and Chikungunya Virus Infections in Africa. *Pathogens.* 2021;10(10):1324.
41. Rutkowski N, Dong Y, Dimopoulos G. Field-deployable molecular diagnostic platform for arbovirus detection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):489.
42. Artika IM, Wiyatno A, Ma'roef CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect Genet Evol.* 2020;81:104215.
43. Kumar JS, Saxena D, Parida M, Rathinam S. Evaluation of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of West Nile virus in patients. *Indian J Med Res.* 2018;147(3):293-8.
44. Thirion L, Pezzi L, Corcostegui I, Dubot-Pérès A, Falchi A, de Lamballerie X, et al. Development and Evaluation of a Duo Chikungunya Virus Real-Time RT-PCR Assay Targeting Two Regions within the Genome. *Viruses.* 2019;11(8).
45. Telles JN, Le Roux K, Grivard P, Vernet G, Michault A. Evaluation of real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of Chikungunya virus in clinical samples. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 9):1168-72.
46. Lin X, Wu M, Wang W, Gao Y, Zhang W, Wu D, et al. Visual detection of Zika virus by isothermal nucleic acid amplification combined with a lateral-flow device. *Analytical*

Methods. 2019;11(13):1795-801.

47. Li J, Liang W, Xu S, Shi J, Zhou X, Liu B, et al. Rapid and sensitive detection of Senecavirus A by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick method. PLoS One. 2019;14(5):e0216245.





## VITA

NAME Ngamnete Phongpratheapchai

DATE OF BIRTH 23 Dec 1997

PLACE OF BIRTH Changmai

INSTITUTIONS ATTENDED Bachelor degree of Medical Science  
Huachiew Chalermprakiet University

HOME ADDRESS 15/13 Village No.4 , Lin Thin Sub-district, Thong Pha Phum  
district, Kanchanaburi, 71180

