

การพัฒนาเทคนิค Reverse Transcription-loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

สำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรคโควิด 19

Development of Reverse Transcription-loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for the Detection of the Causative Agent of COVID-19

เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ*

สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตำบลลาดขัวญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

วิวัฒน์ กล้ายุธ, โสภกา ศรีสังข์งาม, พายุ ภักดีนวน,

สุปราณี บุญชู และจณิศรา ฤดีอเนกสิน

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตำบลลาดขัวญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Benjawan Phetsuksiri*

Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences,

Talat Khwan, Muang, Nonthaburi 11000

Wiphat Klayut, Sopa Srisungngam, Payu Bhakdeenuan,

Supranee Bunchoo and Janisara Rudeeaneksin

National Institute of Health, Department of Medical Sciences,

Talat Khwan, Muang, Nonthaburi 11000

บทคัดย่อ

ไวรัสซาร์สโควี 2 (SARS-CoV-2) ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) ซึ่งเป็นโรคอุบัติใหม่ที่
ทำให้มีผู้ติดเชื้อและเสียชีวิตเป็นจำนวนมากทั่วโลก การตรวจหาสารพันธุกรรมโดยเทคนิค real time RT-PCR ในสิ่ง
ส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ เป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรค ซึ่งต้องใช้เครื่อง
thermocycler ที่ซับซ้อนและมีราคาสูง ทำให้เป็นข้อจำกัดในการใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไป LAMP เป็นเทคนิค

*ผู้รับผิดชอบบทความ : benjapsk@health.moph.go.th

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียว วิธีการง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น และอ่านผลได้ง่ายด้วยตาเปล่า โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค RT-LAMP สำหรับการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 โดยออกแบบไพรเมอร์และทดสอบความจำเพาะกับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส รวมทั้งปฏิกิริยาข้ามต่อจุลินทรีย์อื่นในฐานข้อมูล GISAID และ NCBI จากนั้นทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา และหาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัสที่ตรวจพบได้ ผลการศึกษาได้ไพรเมอร์ในตำแหน่ง *ORF8* ที่มีความจำเพาะกับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 ในฐานข้อมูลมากกว่าร้อยละ 98 และเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นมีความเหมือนน้อยกว่าร้อยละ 80 สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัสที่ตรวจพบได้ คือ 25 copies ต่อปฏิกิริยา ดังนั้นเทคนิค RT-LAMP ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 ซึ่งจะต้องมีการประเมินกับสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเพื่อพิจารณาการนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ต่อไป

คำสำคัญ : อาร์ทีแอลพี; ชาร์สโควี 2; โควิด 19

Abstract

SARS-CoV-2 virus is the causative agent of COVID-19, which is an emerging infectious disease. The disease has affected a number of infected cases and death worldwide. The current detection standard is real time RT-PCR, a nucleic acid amplification test (NAAT) used to detect the viral RNA in respiratory specimens. However, the method requires the thermocycler machine, which is complicated and costly and causes the limitation of its use in general laboratories. LAMP, an isothermal amplification, is a simple NAAT. It provides the results in a short time, which can be visualized the color change by naked eyes. This study aimed to develop RT-LAMP for SARS-CoV-2 detection by designing primers and evaluating the *in silico* inclusivity and cross-reactivity analyses based on microbial sequences in GISAID and NCBI databases. The reaction was optimized, and the limit of detection was determined. The results showed that the primer set targeting *ORF8* exhibited >98 % homologous to the sequence of SARS-CoV-2 and <80 % to those of other microbes. The optimum condition of the reaction was 60 °C for an hour, and the limit of detection for SARS-CoV-2 was 25 copies/reaction. Overall, the developed RT-LAMP was able to detect SARS-CoV-2. It requires further evaluation using clinical specimens for the determination of its applicability in COVID-19 diagnosis.

Keywords: RT-LAMP; SARS-CoV-2; COVID-19

1. บทนำ

ไวรัสชาร์สโควี 2 (SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) เป็นไวรัสก่อ

โรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (coronavirus disease 2019, COVID-19) ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และเป็นโรคอุบัติใหม่ในมนุษย์ พบการระบาด

ครั้งแรกที่เมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย์ สาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อช่วงปลายเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 [1] ไวรัสนี้จัดอยู่ใน family Coronaviridae genera *Betacoronavirus* และ subgenera *Sarbecovirus* เช่นเดียวกับไวรัส SARS-CoV ที่เคยเกิดการระบาดในมนุษย์ ณ มณฑลกว่างตุง สาธารณรัฐประชาชนจีน เมื่อปี พ.ศ. 2546 [2] อย่างไรก็ตาม ไวรัส SARS-CoV-2 มีลำดับสารพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับไวรัส SARS-CoV เพียงร้อยละ 79 เท่านั้น [3] สำหรับลักษณะทั่วไปของไวรัสโคโรนา 2019 นั้น มีรูปร่างเป็นทรงกลม มี envelope ห่อหุ้ม มี spike ยื่นออกมารอบ ๆ อนุภาคของไวรัส ซึ่งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะมีลักษณะคล้ายมงกุฎ และมีสารพันธุกรรมเป็น (+) ssRNA (positive-sense single strand RNA)

สำหรับประเทศไทยพบผู้ป่วยยืนยันรายแรก ซึ่งนอกจากเป็นรายแรกของประเทศไทยแล้ว ยังเป็นผู้ป่วยยืนยันรายแรกที่พบนอกสาธารณรัฐประชาชนจีน มีการแถลงข่าวเมื่อวันที่ 13 มกราคม พ.ศ. 2563 โดยเป็นชาวจีนที่เดินทางมาจากเมืองอู่ฮั่น [4] สำหรับข้อมูลเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2564 นั้น ประเทศไทยมีผู้ป่วยยืนยันสะสม 10,053 ราย มีผู้เสียชีวิต 67 ราย และมีการระบาดระลอกใหม่ ภายหลังจากสิ้นสุดการระบาดระลอกแรกเมื่อช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 ไปแล้ว [5] สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทางห้องปฏิบัติการนั้น มาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยใช้เทคนิค real time reverse transcription-polymerase chain reaction (real time RT-PCR) ในสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจของผู้สงสัยป่วย เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงและใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ แต่มีจำกัด คือ ใช้ระยะเวลาการทดสอบนาน 2-3 ชั่วโมง และต้องใช้เครื่อง

thermal cycler ที่มีวิธีการใช้งานยุ่งยากซับซ้อน รวมถึงมีราคาสูง ทำให้ไม่เหมาะสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไป หรือ ณ จุดให้บริการผู้ป่วย (point-of-care diagnosis)

เทคนิค RT-LAMP (reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง เช่นเดียวกับเทคนิค PCR [6] มีข้อดีกว่า คือ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ที่ อุณหภูมิเดียวคงที่ (isothermal) โดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ขึ้น-ลงระหว่างการทำปฏิกิริยา ทำให้ใช้เพียงเครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ เช่น อ่างน้ำร้อน (water bath) หรือกล่องให้ความร้อน (heat block) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ได้ เกิดผลผลิตของปฏิกิริยาสูง ภายในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้ยังสามารถเติมสารเคมีบางชนิดเพื่อให้อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยดูจากการเปลี่ยนสีของสารละลายปฏิกิริยา ทำให้การอ่านและแปลผลการทดสอบทำได้ง่าย ด้วยเหตุนี้ทำให้เทคนิค LAMP มีขั้นตอนการตรวจที่ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ยุ่งยากซับซ้อนและมีราคาสูง เหมาะสมกับการใช้งานทั้งในห้องปฏิบัติการระดับต่าง ๆ และภาคสนาม และเป็นเทคนิคที่สามารถรองรับกับสถานการณ์ที่เปลี่ยนแปลงไปที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากเพียงเปลี่ยนชุดไพรเมอร์ที่ใช้ให้เหมาะสมกับไวรัสที่ต้องการตรวจก็ทดสอบได้ทันที สำหรับการตรวจวินิจฉัยไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค RT-LAMP นั้น มีรายงานการศึกษาอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งมีการเลือกเป้าหมายที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 ในตำแหน่งต่าง ๆ ของจีโนม ได้แก่ *ORF1ab* ชิ้นส่วนของยีน *S*, *N* ชิ้นส่วนที่อยู่ระหว่าง *ORF3a* กับยีน *E* เป็นต้น ซึ่งรหัสพันธุกรรมมีความแตกต่างจากไวรัสอื่นสูง และปริมาณขั้นต่ำสุดของเชื้อที่สามารถตรวจพบต่างกันไป โดยมีค่าประมาณ 80-62,000 copies/ปฏิกิริยา [7-13]

เนื่องจากส่วนประกอบของน้ำยาและวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน สำหรับการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค RT-LAMP สำหรับการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 โดยการออกแบบไพรเมอร์วิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสสารพันธุกรรมในฐานข้อมูล ประเมินความไวและความจำเพาะเบื้องต้นก่อนการประเมินกับตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วย

2. วิธีการวิจัย

พัฒนาเทคนิค RT-LAMP ให้มีความไวและความจำเพาะ ตามข้อกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา โดยการวิจัยพัฒนาได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2.1 วัสดุมาตรฐานของไวรัส SARS-CoV-2

วัสดุมาตรฐานของไวรัส SARS-CoV-2 คือ AccuPlex™ SARS-CoV-2 Reference Material Kit (material no.0505-0126, SeraCare, Milford, MA) ซึ่งเป็น recombinant alphavirus ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน จึงไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ มีลำดับสารพันธุกรรมที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 เฉพาะที่ตำแหน่ง *ORF1a* (open reading frame 1a; ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 417-1,899 และ 3,094-3,360) *RdRp* (RNA-dependent RNA polymerase; ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 13,291-13,560, 14,700-15,950 และ 18,577-19,051) *E* (envelope; ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 25,801-28,200) และ *N* (nucleocapsid; ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 27,952-29,873) โดยอ้างอิงจากลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 จากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข NC_045512.2 วัสดุมาตรฐานดังกล่าวมีปริมาณไวรัส 5,203 copies/mL และบรรจุอยู่ใน VTM (viral transport media)

2.2 การสกัดสารพันธุกรรมจากวัสดุมาตรฐาน

สกัดสารพันธุกรรมจากวัสดุมาตรฐานด้วยชุดทดสอบ RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต โดยใช้วัสดุมาตรฐานปริมาณ 100 μ L ผสมกับ buffer RLT ปริมาณ 350 μ L จากนั้นเติม 70 % ethanol ลงไป 1 เท่าของปริมาณรวมทั้งหมด ผสมให้เข้ากันโดยการไปเปิดชั้น-ลง แล้วดูดสารละลายผสม (วัสดุมาตรฐาน + buffer RLT + 70 % ethanol) ปริมาณสูงสุด 700 μ L ไปใส่ยัง RNeasy spin column ที่บรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 8,000 \times g เป็นเวลา 15 วินาที เทสารส่วนเกินในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้งจนกว่าสารละลายผสมจะหมดจากนั้นเติม buffer RW1 ปริมาณ 700 μ L ลงไปยัง RNeasy spin column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 8,000 \times g เป็นเวลา 15 วินาที เทสารส่วนเกินในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ทิ้ง จากนั้นเติม buffer RPE ปริมาณ 500 μ L ลงไปยัง RNeasy spin column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 8,000 \times g เป็นเวลา 15 วินาที เทสารส่วนเกินในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ทิ้ง จากนั้นเติม buffer RPE ปริมาณ 500 μ L ลงไปยัง RNeasy spin column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 8,000 \times g เป็นเวลา 2 นาที เทสารส่วนเกินในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ทิ้ง เปลี่ยนหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ที่บรรจุ RNeasy spin column อยู่แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 15,000 \times g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้าย RNeasy spin column ไปยังหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL เติมน้ำ RNase-free ลงไป 30 μ L แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วอย่างน้อย 8,000 \times g เป็นเวลา 1 นาที เพื่อ elute สารพันธุกรรม จากนั้นทำซ้ำอีกครั้งโดยใช้ eluate เดิมจากขั้นตอนก่อนหน้า เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสาร

พันธุกรรมมากขึ้น เก็บสารพันธุกรรมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3 การออกแบบและทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แบบ *in silico*

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของจีโนมของไวรัส SARS-CoV-2 ที่มีความแตกต่างจากของไวรัส SARS-CoV สูง เลือกตำแหน่งที่จำเพาะ โดยเลือกออกแบบไพรเมอร์ในช่วงตำแหน่งระหว่าง *ORF8* กับ *N* (ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 27,993-28,299) ของไวรัส SARS-CoV-2 จากฐานข้อมูล GenBank หมายเลข NC_045512.2 ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้เครื่องมือ PrimerExplorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ 28,026-28,245 ในตำแหน่ง *ORF8* เท่านั้น ชุดไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 1 จากนั้นทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์แบบ *in silico* โดยเป็นการทดสอบความจำเพาะเฉพาะต่อไวรัส SARS-CoV-2 (inclusivity) ด้วยเครื่องมือ GESS (Global Evaluation of SARS-CoV-2 /hCoV-19 Sequences; <https://wan-bioinfo.shinyapps.io/GESS>) [14] เมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2564 กับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 344,680 จีโนม โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (cross-reactivity) กับฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) nucleotide collection (nt) [15,16] ด้วยเครื่องมือ BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์เป็น default

2.4 การทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP

ทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP ประกอบด้วย น้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, Ipswich, MA) ไพรเมอร์ F3 และ B3 ความเข้มข้น 0.2 µM FIP และ BIP ความ

เข้มข้น 1.6 µM และ LoopF และ LoopB ความเข้มข้น 0.4 µM สารพันธุกรรมที่สกัดจากวัสดุมาตรฐาน 5 µL และปรับปริมาณด้วยน้ำ RNase-free ปฏิกิริยาปริมาณ 25 µL ซึ่งในการทดสอบปฏิกิริยา LAMP การเปลี่ยนสีเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ pH ในปฏิกิริยาของตัวชี้วัด phenol red เมื่อมีการสังเคราะห์สารพันธุกรรมเกิดขึ้น สำหรับองค์ประกอบของปฏิกิริยาปริมาณ 25 µL ประกอบด้วยน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) ไพรเมอร์ F3 และ B3 ความเข้มข้น 0.2 µM FIP และ BIP ความเข้มข้น 1.6 µM และ LoopF และ LoopB ความเข้มข้น 0.4 µM สารพันธุกรรมที่สกัดจากวัสดุมาตรฐาน 5 µL และปรับปริมาณด้วยน้ำ RNase-free จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที เพื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler (Axygen® MaxyGene II Thermal Cycler, Corning, Corning, NY) อ่านผลจากการเปลี่ยนสี และยืนยันผลการทดสอบด้วย agarose gel electrophoresis

2.5 การหาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบได้

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP แล้วหาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบได้ โดยเจือจางวัสดุมาตรฐานจากปริมาณเชื้อตั้งต้น 5,000 copies/mL ด้วยน้ำที่ไม่มีเอนไซม์ที่ย่อย RNA (RNase-free water) มีปริมาณไวรัสลดลงตามลำดับดังนี้ 4,000, 3,000, 2,500 และ 1,000 copies/mL จากนั้นนำไปสกัดสารพันธุกรรมตามวิธีการข้างต้น แล้วจึงนำมาทดสอบกับปฏิกิริยา RT-LAMP โดยทดสอบที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Table 1 Research report on the development of diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-LAMP technique with WarmStart® Colorimetric LAMP Master Mix reagent kit

Publication date	Principal researcher	Journal	Specific site	Minimum concentration that can be detected (copies/mL)
April 25, 2020	Huang, W.E.	Microb. Biotechnol.	N	80
July 1, 2020	Yu, L.	Clin. Chem.	ORF1ab	10,000
July 29, 2020	Chow, F.W.	Int. J. Mol. Sci.	ORF3a-E intergenic spacer region	8,400
September 1, 2020	Rohaim, M.A.	Viruses	RdRp	40,000
November 9, 2020	Nawattanapaiboon, K.	Analyst	RdRp	5,000
December 6, 2020	Baek, Y.H.	Emerg. Microb. Infect	N	50,000
January 5, 2021	González-González, E.	Anal Methods	N	62,000

2.6 การวิเคราะห์ความจำเพาะกับไวรัส SARS-COV-2 เบื้องต้น

ทดสอบความจำเพาะของวิธีกับไวรัส SARS-Co-V2 โดยทดสอบเบื้องต้นกับไวรัสอื่นที่ก่อโรคที่สำคัญ ซึ่งพบในทางเดินหายใจและความใกล้เคียงกับไวรัส SARS-Co-V2 ทดสอบโดยใช้สารพันธุกรรม RNA จากไวรัสอื่น ได้แก่ ไวรัส influenza A subtype H1 และ H5, influenza B, ไวรัสโคโรนา MERS (MERS-CoV) และไวรัส respiratory syncytial virus (RSV) ทำปฏิกิริยา RT-LAMP และตรวจสอบสีของปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการทดสอบเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2

3. ผลการวิจัย

3.1 รายงานการศึกษาที่ผ่านมาของการตรวจวินิจฉัยไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค RT-LAMP

รายงานการศึกษาที่ผ่านมา [7-13] พบว่า การพัฒนาและประเมินการตรวจวินิจฉัยไวรัส SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix [DNA & RNA] แสดงดังตารางที่ 1

3.2 ความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยการทดสอบแบบแบบ *in silico*

ชุดไพรเมอร์สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP ในการตรวจหาไวรัส SARS-CoV-2 แสดงดังตารางที่ 2 ผลการศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยการทดสอบแบบแบบ *in silico* แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็นความจำเพาะเฉพาะต่อไวรัส SARS-CoV-2 (inclusivity) โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น (cross-reactivity) ตามลำดับสำหรับความจำเพาะเฉพาะต่อไวรัส SARS-CoV-2 นั้น วิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ GESS เมื่อวันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2563 กับลำดับสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 จำนวน 284,739 จีโนม พบว่าในไพรเมอร์แต่ละชุดมีความจำเพาะต่อไวรัสมากกว่าร้อยละ 98 ของจีโนมทั้งหมดที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 3) สำหรับความเหมือน (homology) ของชุดไพรเมอร์ทั้งหมด มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ยกเว้น *H. influenzae* และ *L. pneumophila* แต่พบเพียงในไพรเมอร์เดียว ซึ่งไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา (ตารางที่ 4) จึงสรุปเบื้องต้นว่าไม่พบปฏิกิริยาข้ามต่อจุลินทรีย์และไวรัสโคโรนาชนิดอื่น

3.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP (รูปที่ 1ก และ 1ข) ภาย

หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที สังเกตการเปลี่ยนสี โดยผลบวกมีสีเหลืองและผลลบมีสีชมพู พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาได้เร็วสุดที่ 45 นาที ในขณะที่การบ่มที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาที่ 1 ชั่วโมง และที่ 65 องศาเซลเซียสนั้น เกิดปฏิกิริยาที่ 1 ชั่วโมง 15 นาที โดยยืนยันผลการเกิดปฏิกิริยาด้วย agarose gel electrophoresis สรุปสถานะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบปฏิกิริยา RT-LAMP คือ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 ปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถตรวจพบได้

การศึกษาปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบได้จากวัสดุมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 5 พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งต้นของวัสดุมาตรฐาน คือ

มีไวรัส SARS-CoV-2 ปริมาณ 3,000 copies/mL ให้ผลการทดสอบตรงกันทั้ง 3 ซ้ำ ขณะที่การเจือจางลง 2 และ 5 เท่า (มีปริมาณไวรัส 2,500 และ 1,000 copies/mL ตามลำดับ) ไม่สามารถตรวจพบ สรุปปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่สามารถตรวจพบ คือ 3,000 copies/ml หรือเทียบเท่ากับ 25 copies/reaction

3.5 ความจำเพาะของปฏิกิริยา RT-LAMP

การศึกษาความจำเพาะของปฏิกิริยา RT-LAMP ต่อไวรัส SARS-CoV-2 เมื่อทดสอบกับสารพันธุกรรมของไวรัส SARS-CoV-2 และไวรัสที่ก่อโรคทางเดินหายใจซึ่งพบบ่อย ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าปฏิกิริยา RT-LAMP ให้ผลบวก โดยมีการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาจากสีชมพูเป็นสีเหลืองเฉพาะในหลอดทดสอบที่มีสารพันธุกรรมของเชื้อ SARS-CoV-2

Table 2 Primer Kit for RT-LAMP Reaction Test for SARS-CoV-2 Detection

Primer	Nucleotide sequence	Specific site*
F3-SARS-Cov-2-ORF8	TGGTATATTAGAGTAGGAGCTAGA	28,026-28,049
B3-SARS-Cov-2-ORF8	AAACAACACGAACGTCATG	28,227-28,245
FIP-SARS-Cov-2-ORF8 (F2+F1c)	TCGATGTAAGTGAATGGGTGATTTAG-TCAGCACCTTTAATTGAATTGTG	28,093-28,117, 28,053-28,075
BIP-SARS-Cov-2-ORF8 (B1c+B2)	AATTGCCAGGAACCTAAATTGGG-CTCTAAAAAGCTTTCATAGAACGA	28,158-28,180, 28,200-28,223
LoopF-SARS-Cov-2-ORF8	AACCAGCCTCATCCACG	28,076-28,092
LoopB-SARS-Cov-2-ORF8	AGTCTTGTAGTGCGTTGT	28,182-28,199

*GenBank accession number NC_045512.2

Table 3 The results of the primer and SARS-CoV-2 specificity (inclusivity) were analyzed with the GSAID database.

Primer	F3	B3	FIP		BIP		Loop F	Loop B
			F2	F1c	B2	B1c		
Primer length (nucleotides)	24	19	25	23	24	23	17	18
Homology (%)	> 98.0							
Mutation site	765	246	1,143	373	658	4,075	5,195	360

Table 4 Percentage of cross-reactivity against other microorganisms (cross-reactivity) when analyzed with the NCBI database

Microorganisms/Primers	Accession number of sequence	F3	B3	FIP		BIP		LoopF	LoopB
				F2	F1c	B2	B1c		
Human coronavirus 229E	NC_002645.1								< 80.0
Human coronavirus OC43	NC_006213.1								< 80.0
Human coronavirus HKU1	NC_006577.2								< 80.0
Human coronavirus NL63	NC_005831.2								< 80.0
SARS-coronavirus	NC_004718.3								< 80.0
MERS-coronavirus	NC_019843.3								< 80.0
Adenovirus type 1	MH183293.1								< 80.0
Adenovirus type 2	J01917.1								< 80.0
Adenovirus type 3	AY599836.1								< 80.0
Human Metapneumovirus	NC_039199.1								< 80.0
Parainfluenza virus 1	AF457102.1								< 80.0
Parainfluenza virus 2	AF533012.1								< 80.0
Parainfluenza virus 3	NC_001796.2								< 80.0
Parainfluenza virus 4	NC_021928.1								< 80.0
Influenza A (H1N1)	FJ966079.1								< 80.0
Influenza A (H3N2)	KT002533.1								< 80.0
Influenza B (Victoria)	MN230203.1								< 80.0
Influenza B (Yamagata)	MK715533.1								< 80.0
Enterovirus	NC_001472.1								< 80.0
Respiratory syncytial virus	NC_001803.1								< 80.0
Rhinovirus	NC_009996.1								< 80.0
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	NC_005043.1								< 80.0
<i>Haemophilus influenzae</i>	NZ_LN831035.1							82.35	< 80.0
<i>Legionella pneumophila</i>	NZ_LR134380.1							88.24	< 80.0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NC_000962.3								< 80.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NZ_LN831051.1								< 80.0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NZ_LN831034.1								< 80.0
<i>Bordetella pertussis</i>	NC_018518.1								< 80.0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NZ_CP010546.1								< 80.0
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CAKM01000281.1								< 80.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NC_002516.2								< 80.0
<i>Staphylococcus epidermis</i>	NZ_CP035288.1								< 80.0

Table 5 The minimum concentration of SARS-CoV-2 that can be detected from standard materials

SARS-CoV-2 concentration (copies/mL)	Number of times detected/Number of times tested
5,000	3/3
4,000	3/3
3,000	3/3
2,500	0/3
1,000	0/3

4. สรุปและอภิปราย

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคนิค RT-LAMP สำหรับการตรวจหาไวรัสซาร์สโควี 2 ที่ก่อโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ซึ่งเทคนิคนี้มีข้อดี คือ เป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียวตลอดการทำปฏิกิริยา สามารถใช้เพียงอ่างน้ำร้อนหรือกล่องให้ความร้อนในการตรวจวิเคราะห์ เกิดผลผลิตของปฏิกิริยาสูงภายในระยะเวลาอันสั้น และสามารถอ่านผลโดยดูจากการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า ทำให้แปลผลการทดสอบง่าย ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ชุดน้ำยา WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix [DNA & RNA] ร่วมกับชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นทดสอบปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถตรวจพบไวรัส SARS-CoV-2 ที่ปริมาณขั้นต่ำสุด คือ 3,000 copies/mL หรือเทียบเท่ากับ 25 copies/reaction โดยเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาก่อนหน้าที่ใช้ชุดน้ำยาเดียวกัน พบว่ามีปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัสที่สามารถตรวจพบได้ต่ำกว่าวิธีที่พัฒนานี้ 5 รายงาน (8,400-62,000 copies/mL) [8-10,12,13] ใกล้เคียงกับวิธีนี้ 1 รายงาน (5,000 copies/mL) [11] และสูงกว่าวิธีนี้ 1 รายงาน (80

copies/mL) [7] ขณะที่เทคนิค RT-LAMP ที่ได้รับการรับรองแบบ emergency use authorization (EUA) จากองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration, FDA) [17] มีค่า 750 copies/mL อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน real time RT-PCR ของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ประเทศสหรัฐอเมริกา [18] ที่ได้รับการรับรองแบบ EUA เช่นกัน พบว่าเทคนิค RT-LAMP ที่พัฒนาขึ้นจากรายงานการศึกษาเกือบทั้งหมด มีค่าปริมาณไวรัสขั้นต่ำสุดที่ตรวจได้สูงกว่า 1,000-3,000 copies/mL ขณะที่วิธีมาตรฐาน RT-PCR ที่ประเมินโดยห้องปฏิบัติการอ้างอิงของประเทศไทย คือ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [19] กำหนดให้ค่าปริมาณไวรัสขั้นต่ำสุดที่ตรวจได้ด้วยวิธี RT-PCR ไม่มากกว่า 1,000 copies/mL สำหรับคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย กำหนดให้ค่าปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่ตรวจด้วยวิธี RT-LAMP ไม่มากกว่า 4,000 copies/mL สำหรับการเลือกตำแหน่งที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 นั้น แต่ละรายงานการศึกษามีการเลือกต่างกัน โดยส่วนใหญ่เลือกที่ตำแหน่ง *N* ของไวรัส สำหรับการศึกษานี้เลือกตำแหน่งจำเพาะ คือ *ORF8* เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่มีความแตกต่างจากไวรัส SARS-CoV มากที่สุด คือ มีความเหมือนกันเพียงร้อยละ 30.16 [20,21] อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 28,144 ของตำแหน่งดังกล่าวมีการกลาย (mutation) มากกว่าร้อยละ 0.1 (hotspot mutation) [22] ถึงแม้ว่านิวคลีโอไทด์ดังกล่าวอยู่ในส่วนผลผลิตของปฏิกิริยา RT-LAMP ที่ตำแหน่ง 28,026-28,245 แต่เป็นลำดับที่อยู่นอกเหนือจากตำแหน่งที่จำเพาะกับชุดไพรเมอร์ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าการขาดหายไปของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 27,848-28,229 ของไวรัสที่พบในบางประเทศ [23] อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรมของไวรัสจากฐานข้อมูล 344,680 จีโนมแสดงให้เห็นว่าการกลายในตำแหน่ง *ORF8* ของไวรัส SARS-CoV-2 ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับชุดไพรเมอร์จะพบไม่เกินร้อยละ 2 เท่านั้น

เมื่อวิเคราะห์ความไวของวิธีการ กรณี false negative ที่ตัวอย่างมีไวรัสต่ำกว่า 3,000 copies/mL ซึ่งเป็น limit of detection ของวิธีการที่พัฒนาขึ้นแนวทางในการดำเนินการที่เสนอ คือ หากผู้ป่วยมีอาการควรตรวจวิธี RT-PCR เพิ่มเติม เนื่องจากวิธี RT-PCR มีความไวสูงกว่า แต่หากไม่มีอาการควรเฝ้าระวัง 14 วัน เนื่องจากไวรัสมีจำนวนน้อยมาก ส่วนใหญ่แล้วทำให้เกิดการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการและไวรัสมีความสามารถในการแพร่เชื้อต่ำ สำหรับข้อจำกัดของการศึกษาครั้งนี้ คือ ยังไม่มีการประเมินเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน real time RT-PCR โดยใช้สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 และการประเมินความจำเพาะกับตัวอย่างจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ จำนวนมาก นอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลปัญหาการเกิดผลลบลวม เนื่องจากไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอนั้นเกิดการกลายได้ง่าย และโดยเทคนิค RT-LAMP ที่พัฒนาขึ้นเป็นการตรวจสารพันธุกรรมเพียงหนึ่งตำแหน่งที่จำเพาะกับไวรัส SARS-CoV-2 หากเกิดการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่จำเพาะกับชุดไพรเมอร์ อาจส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาแม้จะมีไวรัสในตัวอย่างที่ตรวจ อีกประการหนึ่ง คือ ไม่มีการตรวจสอบในขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจยีนอื่นที่จำเพาะต่อสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย เช่น ตรวจวิเคราะห์ RNaseP [24] หากมีข้อผิดพลาดในขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอจะระบุไม่ได้ นอกจากนี้ถึงแม้เทคนิค RT-LAMP จะมีขั้นตอนในการตรวจที่ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยังยากซับซ้อน แต่

การนำไปใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไปอาจมีข้อจำกัด เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ยังต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ ได้แก่ ตู้ชีวนิรภัย เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง เป็นต้น หากมีวิธีการสกัดสารพันธุกรรมที่ง่าย หรือวิธีที่ตรวจได้โดยไม่ต้องผ่านการสกัดสารพันธุกรรมจะไม่ใช่เป็นปัญหารวมทั้งอาจเกิดปัญหาผลลบลวม ซึ่งพบได้จากการปฏิบัติงานด้วยเทคนิคทางอณูวิทยา [25] เนื่องจากเทคนิค LAMP ให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาสูง อาจเกิด carry-over contamination จากการทดสอบปฏิกิริยาก่อนหน้า หรือระหว่างทำปฏิกิริยาทดสอบ การปฏิบัติงานจึงต้องมีความระมัดระวังสูง รวมทั้งควรมีการแยกพื้นที่ ห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ เช่น ไปเปิด ในขั้นตอนการเตรียมและการทดสอบปฏิกิริยาออกจกกัน นอกจากนี้การแปลผลการทดสอบด้วยการเปลี่ยนสีโดยใช้การเปลี่ยนแปลงของ pH ในปฏิกิริยาของตัวชี้วัด phenol red นั้น [26] มีข้อควรระวังในการป้องกันผลกระทบเกี่ยวกับ pH ในตัวอย่างที่จะเกิดขึ้นในการทดสอบ และระมัดระวังในขั้นตอนการเตรียมสารพันธุกรรมซึ่งควรใช้น้ำที่ไม่มีเอนไซม์ที่ย่อย RNA (RNase-free water) โดยสรุปเทคนิค RT-LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้งาน เนื่องจากมีปริมาณขั้นต่ำสุดของไวรัส SARS-CoV-2 ที่ตรวจพบได้ต่ำกว่าข้อมูลปริมาณไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย [27,28] และเป็นไปตามเกณฑ์ของประสิทธิภาพของชุดทดสอบ RT-LAMP ซึ่งระดับต่ำสุดของ RNA ที่ตรวจได้ไม่น้อยกว่า 4,000 copies/mL และการประเมินประสิทธิภาพในตัวอย่างผู้ป่วยเปรียบเทียบกับกับวิธีมาตรฐาน รวมถึงการทดสอบกับ human DNA เพื่อทดสอบ cross-reactivity เป็นส่วนที่จะมีการศึกษาวิจัยต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลประกอบการพิจารณานำไปใช้ประโยชน์สำหรับตรวจติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอขอบคุณ นายแพทย์ บัลลังก์ อุปพงษ์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ข้อคิดเห็นเกี่ยวกับการวิจัยและพัฒนาชุดทดสอบแลมปี

6. References

- [1] Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., *et al.*, 2020, A novel corona virus from patients with pneumonia in China, 2019, *N. Engl. J. Med.* 382: 727-733.
- [2] Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., *et al.*, 2003, A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N. Engl. J. Med.* 348: 1953-1966.
- [3] Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., *et al.*, 2020, Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel corona virus: Implications for virus origins and receptor binding, *Lancet.* 395: 565-574.
- [4] Okada, P., Buathong, R., Phuygun, S., Thanadachakul, T., Parnmen, S., Wongboot, W., *et al.*, 2020, Early transmission patterns of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in travellers from Wuhan to Thailand, January 2020, *Eur. Surveill.* 25(8): 2000097.
- [5] Department of Disease Control, COVID-19 Infected Situation Reports (Thailand), Available Source: <https://covid19.ddc.moph.go.th/en>, January 9, 2021.
- [6] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., *et al.*, 2000, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* 28(12): E63.
- [7] Huang, W.E., Lim, B., Hsu, C.C., Xiong, D., Wu, W., Yu, Y., *et al.*, 2020, RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2, *Microb. Biotechnol.* 13: 950-961.
- [8] Yu, L., Wu, S., Hao, X., Dong, X., Mao, L., Pelechano, V., *et al.*, 2020, Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform, *Clin. Chem.* 66: 975-977.
- [9] Chow, F.W., Chan, T.T., Tam, A.R., Zhao, S., Yao, W., Fung, J., *et al.*, 2020, A rapid, simple, inexpensive, and mobile colorimetric assay COVID-19-LAMP for mass on-site screening of COVID-19, *Int. J. Mol. Sci.* 21: 5380.
- [10] Rohaim, M.A., Clayton, E., Sahin, I., Vilela, J., Khalifa, M.E., Al-Natour, M.Q., *et al.*, 2020, Artificial intelligence-assisted loop mediated isothermal amplification (AI-LAMP) for rapid detection of SARS-CoV-2, *Viruses* 12(9): 972.
- [11] Nawattanapaiboon, K., Pasomsub, E., Prombun, P., Wongbunmak, A., Jenjitwanich, A., Mahasupachai, P., *et al.*, 2021, Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

- (RT-LAMP) as a visual diagnostic platform for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2, *Analyst* 146: 471-477.
- [12] Baek, Y.H., Um, J., Antigua, K.J.C., Park, J.H., Kim, Y., Oh, S., *et al.*, 2020, Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2, *Emerg. Microbes. Infect.* 9: 998-1007.
- [13] González-González, E., Lara-Mayorga, I.M., Rodríguez-Sánchez, I.P., Zhang, Y.S., Martínez-Chapa, S.O., Santiago, G.T., *et al.*, 2021. Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: The change in color in LAMP-based assays quantitatively correlates with viral copy number, *Anal Methods* 13: 169-178.
- [14] Fang S., Li, K., Shen, J., Liu, S., Liu, J., Yang, L., *et al.*, 2021. GESS: A database of global evaluation of SARS-CoV-2/hCoV-19 sequences, *Nucleic Acids Res.*, 49(D1): D706-D14.
- [15] National Center for Biotechnology Information, GenBank, Available Source: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, January 9, 2021.
- [16] U.S. Food and Drug Administration, Molecular Diagnostic Template for Laboratories, Available Source: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas>, January 9, 2021.
- [17] Color Genomics, Inc., Color SARS-CoV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay for Emergency Use Only (IFU), Available Source: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas>, January 9, 2021.
- [18] Centers for Disease Control and Prevention, CDC 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time RT-PCR Diagnostic Panel for Emergency Use Only (IFU), Available Source: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas>, January 9, 2021.
- [19] Akkapailoon, P.A., Warawan, W., Thanadachakul, T, Puygun, S., Kala, S., Meechalard, W., Waichroen, S., Chittaganpitch, M. and Uppapong, B., 2020, Development of DMSc COVID-19 Real Time RT-PCR Reagent Kits, *Bull. Dept. Med. Sci.* 62(3): 143-154 (in Thai)
- [20] Ceraolo, C., Giorgi, F.M., 2020, Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus, *J. Med. Virol.* 92: 522-528.
- [21] Kakhki, R.K., Kakhki, M.K., Neshan, A., 2020, COVID-19 target: A specific target for novel coronavirus detection, *Gene Rep.* 20: 100740.

- [22] Alouane, T., Laamarti, M., Essabbar, A., Hakmi, M., Bouricha, E.M., Chemaou-Elfihri, M.W., *et al.*, 2020, Genomic diversity and hotspot mutations in 30,983 SARS-CoV-2 genomes: Moving toward a universal vaccine for the "confined virus"?, *Pathogens* 9(10): 829.
- [23] Gong, Y.N., Tsao, K.C., Hsiao, M.J., Huang, C.G., Huang, P.N., Huang, P.W., *et al.*, 2020, SARS-CoV-2 genomic surveillance in Taiwan revealed novel ORF8-deletion mutant and clade possibly associated with infections in Middle East, *Emerg. Microbes Infect.* 9: 1457-166.
- [24] Yan, Y., Chang, L. and Wang, L., 2020, Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and counter measures, *Rev. Med. Virol.* 30(3): e2106.
- [25] Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. and Notomi, T., 2008, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products, *Nat. Protoc.* 3: 877-882.
- [26] Tanne, N.A., Zhang, Y., Evans, T.C.Jr., 2015, Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes, *Biotechniques* 58: 59-68.
- [27] Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., *et al.*, 2020, Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens, *JAMA* 323: 1843-1844.
- [28] Kleiboeker, S., Cowden, S., Grantham, J., Nutt, J., Tyler, A., Berg, A., *et al.*, 2020, SARS-CoV-2 viral load assessment in respiratory samples, *J. Clin. Virol.* 129: 104439.