

หลักการพัฒนาชุดตรวจแบบแถบสีชนิดรู้ผลรวดเร็ว และ แนวทางการปรับปรุง

ปริญทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ศิวาพร ลงยันต์ ประดิษฐ์ หวังมาน และ ไพศาล สิทธิกรกุล*

บทคัดย่อ

ชุดตรวจแบบแถบสี (Lateral flow immunochromatographic strip tests: LFICS) เป็นชุดตรวจที่ทำงานโดยการแยกสารที่ต้องการตรวจออกจากสารผสมร่วมกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน หรือระหว่างกรดนิวคลีอิก บนเมมเบรนสำหรับใช้ตรวจสอบสารต่างๆ เช่น ฮอว์โมน เปปไทด์ เครื่องหมายมะเร็ง จุลินทรีย์ และสารพิษ ชุดตรวจประเภทนี้มีข้อดีหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายต่ำ ใช้งานโดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญ ทำได้นอกสถานที่และทราบผลรวดเร็ว หลักการทำงานของชุดตรวจแบบแถบสี 3 รูปแบบหลักที่ใช้อนุภาคนาโนทองคำเป็นตัวแสดงผล คือ sandwich, competitive และแบบตรวจแอนติบอดี ชุดตรวจแบบแถบสีมีข้อจำกัดในแง่ความไวซึ่งขึ้นกับแรงจับของแอนติบอดี การรวมปฏิกิริยา polymerase chain reaction รูปแบบต่างๆ กับชุดตรวจทำให้สามารถตรวจสอบสิ่งมีชีวิตต่างๆ ด้วยความไวสูงและทราบผลเร็วขึ้น การปรับปรุงชุดตรวจเพื่อเพิ่มความไวในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ double gold labeling, silver enhancing, enzyme labeling หรือแทนที่อนุภาคนาโนทองคำด้วยสารต่างๆ เช่น carbon nanotube, carbon nanoparticle, quantum dot และ magnetic nanoparticle เป็นต้น การปรับปรุงเหล่านี้อาจต้องใช้เครื่องอ่านและวิเคราะห์ผลเพิ่มขึ้น แต่ด้วยเทคโนโลยีของโทรศัพท์เคลื่อนที่ อาจปรับปรุงให้สามารถใช้ร่วมกับชุดตรวจ ซึ่งจะช่วยให้การใช้ชุดตรวจแบบแถบสีสำหรับตรวจสิ่งต่างๆ ทำได้กว้างขวาง

คำสำคัญ: แอนติบอดี อนุภาคนาโนทองคำ ชุดตรวจแถบสี

Rapid Lateral Flow Immunochromatographic Strip Tests (LFICS): Principle and Modifications

Parin Chaivisuthangkura, Siwaporn Longyant, Pradit Wangman and
Paisarn Sithigorngul*

ABSTRACT

Lateral flow immunochromatographic strip tests (LFICS) is a chromatographic system based on separation of analyte in the mixture through the reaction between antibody and antigen or between nucleic acids on the membrane. LFICS has been developed for detection of various molecules such as hormones, peptides, cancer markers, microorganism, toxins, drugs, pesticides, etc. LFICS has many advantages in terms of low cost, rapid and visual results. The operation is simple and can be performed on site by unskilled personnel with low cost and minimal labor. Principles of three formats including sandwich, competitive and antibody detection LFICSs using nanogold particles as reporter are described. The detection sensitivity of LFICS is mainly limited by antibody affinity. Different types of polymerase chain reactions have been combined successfully with LFICS for highly sensitive and rapid detection of PCR products from various organisms. Other modifications of LFICS using dual gold labeling, silver enhancing, enzyme labeling or replacement of nanogold particle with carbon nanotube, carbon nanoparticle, quantum dot and magnetic nanoparticle are promising tools to increase the sensitivity of LFICS. Even though, some modifications may need additional strip reader and analytical equipment, the improvement of mobile phone technology would assist the widely use of LFICS for detection of various molecules.

Keywords: antibody, gold nanoparticle, lateral flow immunochromatographic strip test

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

Center of Excellence in Animal, Plant and Parasite Biotechnology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

*Corresponding author, e-mail: paisarn@g.swu.ac.th, paisarn_sithi@hotmail.com

บทนำ

การตรวจสารในสารผสมที่ปะปนอยู่กับสารต่างๆ เพื่อการตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อม การวิเคราะห์อาหาร รวมถึงการวินิจฉัยโรค จำเป็นต้องอาศัยวิธีการต่างๆ ในการแยกทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์ตรวจสารด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งต้องอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธีและเครื่องมือที่มีความซับซ้อนต่างๆ เช่น gas chromatography mass spectrophometry (GC/MS), ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrophometry (LC/MS/MS), high pressure liquid chromatography (HPLC), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ biosensor ฯลฯ เพื่อใช้ในการแยกและตรวจจับโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเฉพาะ เทคนิคทั้งหมดนี้มีความเฉพาะเจาะจงและมีความละเอียดอ่อน จำเป็นต้องใช้เครื่องมือซึ่งมีราคาแพง วิธีการที่ซับซ้อน บุคลากรผู้เชี่ยวชาญ และมักใช้เวลาค่อนข้างมาก

ชุดตรวจแบบแถบสีหรือ Lateral flow immunochromatographic strip tests (LFICS) เป็นชุดตรวจที่ประกอบด้วยระบบ chromatography บน nitrocellulose membrane สำหรับแยกสารที่ต้องการตรวจ (analyte) ที่อยู่ในสารผสม ผสมกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน หรือระหว่าง nucleic acid ทำให้สามารถตรวจสารที่ต้องการได้ LFICS เป็นชุดตรวจแบบใช้ง่ายที่สามารถใช้ได้โดยบุคคลทั่วไป LFICS ชุดแรก que พัฒนาสำเร็จ ได้แก่ ชุดการทดสอบการตั้งครรภ์เพื่อตรวจหา human chorionic gonadotropin (hCG) ของมนุษย์ในปัสสาวะได้รับการพัฒนาขึ้นในปี พ.ศ. 2519 [1] และผลิตรอกจำหน่ายครั้งแรกโดย Uniliver ในประเทศสหราชอาณาจักรในปี พ.ศ. 2527 [2] ซึ่งในปัจจุบันยังมีการใช้ชุดตรวจกันแพร่หลายมีมูลค่าในปี 2559 ประมาณ 4675 M \$ US ปัจจุบันมีการพัฒนา LFICS รูปแบบต่างๆ สำหรับการตรวจจับโมเลกุลชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ฮอริโมน peptide เครื่องหมายมะเร็ง (cancer markers) จุลินทรีย์ สารพิษ ยาเสพติด สารกำจัดศัตรูพืช ฯลฯ การใช้ LFICS มีข้อได้เปรียบหลายประการในแง่ที่สามารถทราบผลอย่างรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่ำ การดำเนินการทำได้ง่าย และสามารถทำการทดสอบได้โดยบุคลากรที่ไม่มีทักษะ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจจับสารหลายชนิดได้ในเวลาอันรวดเร็วด้วยต้นทุนที่ต่ำ และใช้แรงงานน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม LFICS ไม่สามารถตอบสนองต่อการใช้งานบางอย่างได้ เนื่องจากสามารถให้ข้อมูลเพียงในเชิงคุณภาพ (มี/ไม่มี) หรือกึ่งเชิงปริมาณ สำหรับประมาณความเข้มข้นคร่าวๆ ของสารที่ตรวจเท่านั้น โดย LFICS ส่วนใหญ่ที่ใช้ในปัจจุบันจะใช้อนุภาคนาโนทองคำ (gold nanoparticle = AuNP) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 nm เป็นตัวรายงานผล ซึ่งให้ความเข้มของสีไม่เข้มมาก เป็นผลให้ความไว (sensitivity) ในความสามารถในการตรวจของ LFICS ต่ำไปด้วย สำหรับข้อดีและข้อเสียของ LFICS สรุปโดยละเอียดดัง ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อเด่นและข้อด้อยของ LFICS (ปรับปรุงจาก [1, 3])

ข้อเด่น	ข้อด้อย
- เตรียมง่ายมีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน, ราคาถูก	- ส่วนใหญ่ให้ข้อมูลเชิงคุณภาพหรือกึ่งเชิงปริมาณ
- มีความคงตัวนาน (long shelf life)	- ความสม่ำเสมอของผล อาจแปรผันในแต่ละชุดของผลิตภัณฑ์
- ใช้ง่าย ไม่ต้องอาศัยความชำนาญ	- บางกรณีมีปัญหาเกี่ยวกับแรงจับต่ำกับสารที่ต้องการตรวจ หรือเกิดปฏิกิริยาข้าม
- ใช้ตัวอย่างทดสอบปริมาณน้อย	- บางกรณีต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อน (LFICS-PCR)
- ส่วนใหญ่ใช้กับตัวอย่างได้ทันที ไม่ต้องมีกระบวนการเตรียมตัวอย่าง	- ไม่สามารถควบคุมอัตราการไหลของตัวอย่าง
- ใช้ระยะเวลาตรวจน้อย	- เวลาที่ใช้วิเคราะห์ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวอย่าง เช่น ความหนืด แรงตึงผิว
- ความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูงกว่าการตรวจโดยปฏิกิริยาเคมีทั่วไป	
- มีศักยภาพทางการค้าสูง	

บทความนี้ในช่วงแรกเป็นการอธิบายหลักการพัฒนา LFICS รูปแบบมาตรฐาน จำนวน 3 แบบที่ใช้อยู่ทั่วไป คือ sandwich LFICS, competitive LFICS สำหรับตรวจสอบสารต่างๆ และ LFICS สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจาก LFICS เป็นการตรวจปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยมี AuNP เป็นตัวแสดงผล (reporter) ไม่มีการขยายสัญญาณความไวของชุดตรวจแบบ LFICS ทั้ง 3 รูปแบบ จึงมีข้อจำกัด ขึ้นกับแรงจับ (affinity) ของแอนติบอดี ดังนั้นในตอนท้ายของบทความจะเป็นการอธิบายถึงแนวทางการพัฒนา หรือการปรับปรุงด้วยวิธีการต่างๆ มาเสริมเพื่อให้ชุดตรวจมีความไวที่สูงขึ้น รวมทั้งการใช้ LFICS ร่วมกับเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อสามารถใช้ตรวจ PCR product ที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

หลักการพัฒนา LFICS รูปแบบมาตรฐาน

1. Sandwich LFICS

Sandwich LFICS เป็นรูปแบบมาตรฐานแบบแรกที่มีการพัฒนาใช้สำหรับตรวจสอบสารต่างๆ มากที่สุด ประกอบด้วยแอนติบอดีหลัก (primary antibody) อย่างน้อย 2 ชนิดที่สามารถจับกับโมเลกุลเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงอย่างน้อย 2 ตำแหน่งที่ไม่ทับซ้อนกัน เช่นกรณีของชุดตรวจการตั้งครรภ์ ต้องใช้ anti-hCG antibody 2 ชนิด โดยแอนติบอดีชนิดหนึ่งติดฉลากด้วย AuNP (anti-hCG antibody-gold conjugate = Ab-gold) และถูกตรึงอยู่ชั่วคราวใน conjugate pad ซึ่งเป็นแผ่นใยแก้ว จึงสามารถล้างออกได้ง่ายโดยการชะของสารละลายบัฟเฟอร์ โดย conjugate pad นี้วางอยู่บน nitrocellulose membrane ซึ่งมี anti-hCG antibody ชนิดที่สองถูกตรึงอยู่ที่บริเวณ test line (T) และมีแอนติบอดีอีกชุด (secondary antibody: goat anti-mouse antibody = GAM) ที่สามารถจับกับ Ab-gold ตรึงอยู่ที่ control line (C) นอกจากนี้ยังมีแผ่นสำหรับรับตัวอย่าง (application pad) วางอยู่เหนือ conjugate pad และแผ่นดูดซับตัวอย่าง (absorbing pad) สำหรับดูดซับตัวอย่างที่เหลือซึ่งวางอยู่หลังจาก control line

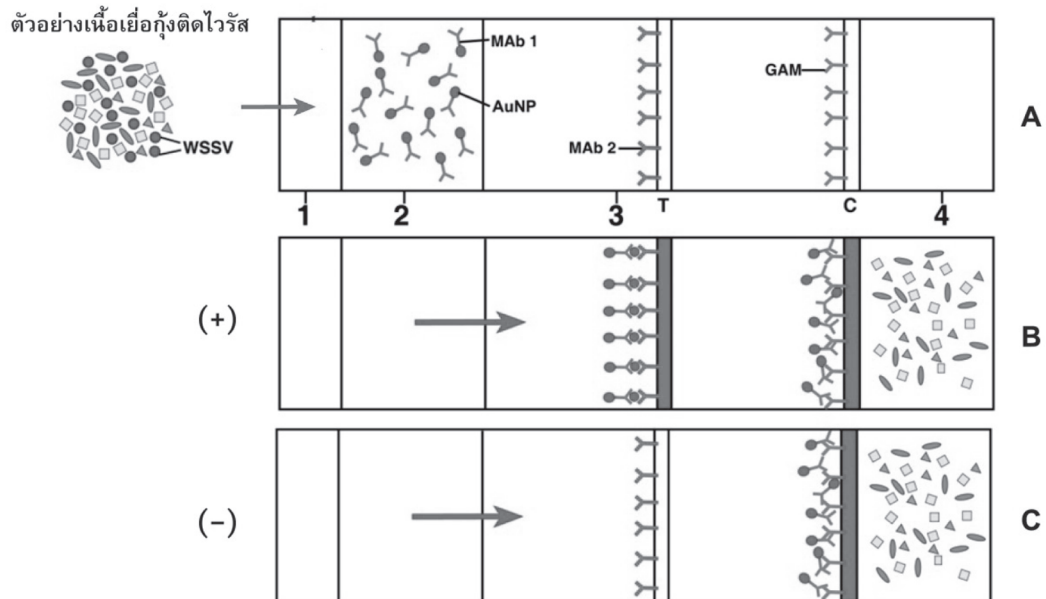
ในการใช้ LFICS ทำโดยนำตัวอย่างที่ต้องการตรวจ เช่นกรณีการตรวจการตั้งครรภ์ นำปัสสาวะใส่ในช่องรับตัวอย่างซึ่งจะไหลไปยัง conjugate pad ที่มี Ab-gold อยู่ ถ้าในตัวอย่าง (ปัสสาวะ) มีสารที่ต้องการตรวจ (hCG) สารนี้จะถูกจับโดย Ab-gold รวมเป็นสารเชิงซ้อนของ Ab-gold/hCG complex จากนั้นไหลผ่าน nitrocellulose membrane ภายใต้แรงดูด capillary attraction ระหว่างเส้นใยของ nitrocellulose membrane เมื่อถึงบริเวณ test line สารเชิงซ้อนนี้ส่วนของ hCG จะถูกจับโดยแอนติบอดีหลักชนิดที่สอง (anti-hCG antibody) สะสมเป็นสีเกิดขึ้นที่บริเวณ test line และ Ab-gold ส่วนเกินที่ไม่มี hCG จับอยู่ จะไหลผ่านไปและถูกจับโดยแอนติบอดีชนิดที่สอง (GAM) ที่บริเวณ control line ตัวอย่างและสารละลายที่เหลือจะถูกเก็บไว้ในแผ่นดูดซับ กรณีนี้จะเห็นสีที่เกิดจากการสะสมของ AuNP ทั้งที่บริเวณ test line และ control line แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มีสารที่ต้องการตรวจจะเห็นสีปรากฏที่ control line เท่านั้น ในการพัฒนาชุดตรวจสารอื่นๆ หรือเชื้อก่อโรคต่างๆ เช่น ชุดตรวจ white spot syndrome virus (WSSV) ในกุ้งนั้นใช้หลักการเดียวกันนี้ (รูปที่ 1)

ทั้งนี้ความเข้มของสีที่บริเวณ control line แปรผันโดยตรงกับปริมาณของสารที่ต้องการตรวจในตัวอย่าง และสามารถประมาณเชิงคุณภาพด้วยสายตา หรือกึ่งเชิงปริมาณด้วยเครื่องอ่านความเข้มของแถบสี สำหรับแถบสีที่บริเวณ control line ใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าชุดตรวจยังทำงานได้ สำหรับชุดตรวจแบบ sandwich LFICS เป็นชุดตรวจที่มีการพัฒนาสำหรับตรวจสารต่างๆ อย่างแพร่หลาย สำหรับใช้ตรวจสารโมเลกุลขนาดใหญ่และเชื้อก่อโรคต่างๆ โดยที่โมเลกุลนั้นต้องสามารถถูกจับโดยแอนติบอดี 2 ตำแหน่ง

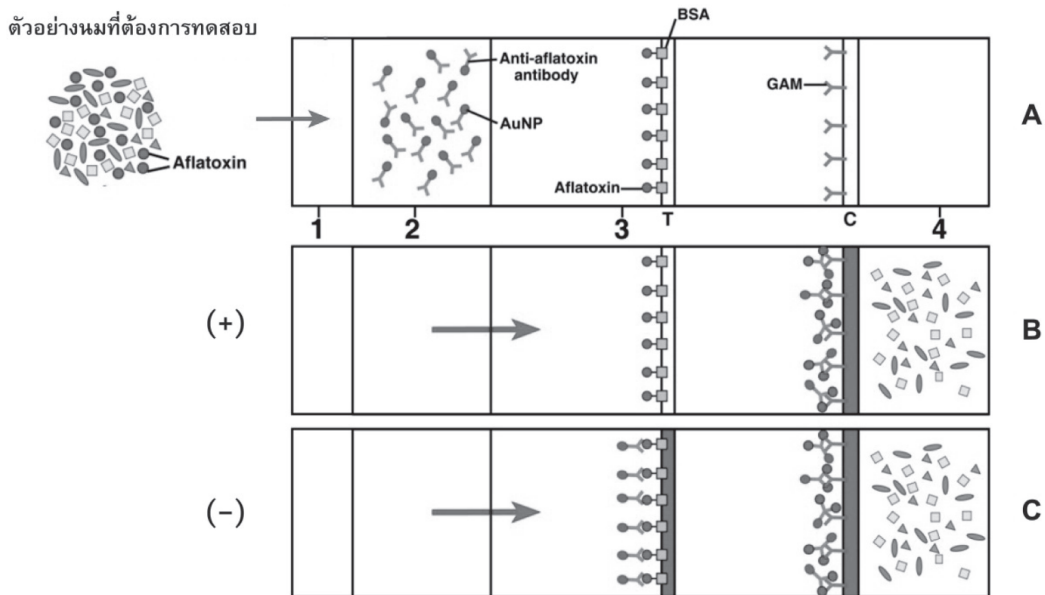
2. Competitive LFICS

ในกรณีของสารประกอบที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กกว่าที่แอนติบอดีสองชนิดจะสามารถจับได้พร้อมๆ กัน เช่น aflatoxin ดังนั้นจึงสามารถใช้แอนติบอดีหลัก (anti-aflatoxin antibody) ติดฉลากด้วย AuNP (Ab/gold) เพียงชนิดเดียว ถูกตรึงอยู่ใน conjugate pad โดยที่ test line จะมีสารชนิดเดียวกันกับสารที่ต้องการตรวจ (aflatoxin) ตรึงอยู่ และที่ control line มีแอนติบอดีชนิดที่สองสำหรับจับแอนติบอดีตัวแรก (goat anti-mouse IgG antibody) ตรึงอยู่ แต่เนื่องจาก aflatoxin มีขนาดเล็กไม่สามารถจับกับ nitrocellulose membrane ได้จึงต้องเชื่อมต่อกับ aflatoxin กับโปรตีน เช่น bovine serum albumin (BSA) ก่อนที่จะนำมาตรึงบนเมมเบรน

ในการตรวจ กรณีที่ใส่ตัวอย่างที่มีสารที่ต้องการตรวจ (aflatoxin) ในปริมาณที่สูงเกิน ปริมาณต่ำสุดที่จะตรวจได้ (limit of detection = LOD) เช่น >0.5 ng/ml ลงในแผ่นรับตัวอย่าง aflatoxin จะจับกับ Ab/gold ทั้งหมด ดังนั้นเมื่อสารละลายไหลผ่าน test line ส่วนของ Ab/gold จึงไม่สามารถจับกับ aflatoxin ที่ตรึงอยู่ที่ test line ได้อีกและไหลไปยัง control line ซึ่ง Ab/gold จะถูกจับโดยแอนติบอดีชนิดที่สอง (goat anti-mouse antibody) จึงสังเกตเห็นสี บน control line เท่านั้น แต่กรณีที่ไม่มี aflatoxin หรือมีความเข้มข้นต่ำกว่า LOD (< 0.5 ng/ml) นั้น Ab/gold จะสามารถจับกับ aflatoxin บน test line และ ส่วนที่เหลือจะถูกจับโดยแอนติบอดีชนิดที่สอง จึงเห็นสีปรากฏขึ้นทั้ง test line และ control line [4] (รูปที่ 2)



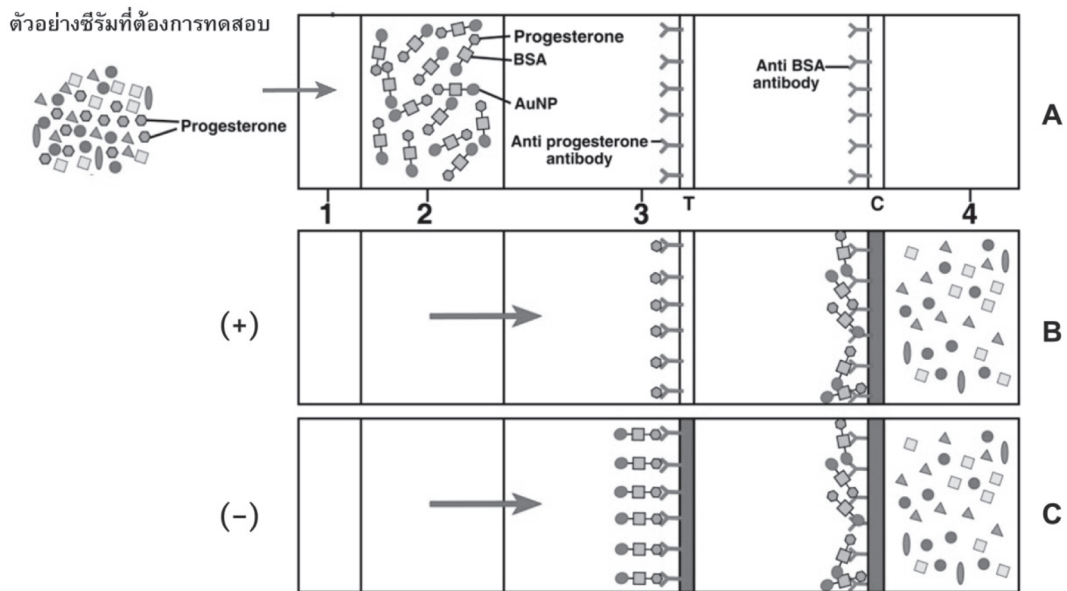
รูปที่ 1 องค์ประกอบและหลักการทำงานของ sandwich LFICS สำหรับตรวจเชื้อไวรัส WSSV ในกิ้ง (A) ส่วนประกอบของชุดตรวจ (1) application pad (2) conjugate pad ที่มี anti-WSSV antibody ชนิดที่ 1 (MAb1) ติดฉลากด้วย AuNP (3) nitrocellulose membrane ที่มี anti-WSSV antibody ชนิดที่ 2 (MAb2) ตรึงอยู่ที่ test line (T) และมี goat-anti mouse antibody (GAM) ตรึงอยู่ที่ control line (C) และ (4) absorbing pad (B) หลังจากใส่สารละลายเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อไวรัส (+) ลงใน application pad เมื่อตัวอย่างเชื้อ WSSV ไหลผ่าน conjugate pad จะถูกจับด้วย MAb1-AuNP และไหลผ่านเมมเบรน จากนั้นเชื้อ WSSV จะถูกจับอีกครั้งด้วย MAb2 เกิดการสะสมเป็นแถบสีที่ test line สำหรับ MAb1-AuNP ส่วนเกินที่ไม่จับไวรัส จะไหลผ่านและถูกจับโดย GAM เกิดเป็นแถบสีขึ้นที่ control line ส่วนตัวอย่างที่เหลือจะเข้าสู่ absorbing pad (C) ในกรณีตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อไวรัส (-) MAb1-AuNP จะไหลผ่านและไม่สะสมที่ test line แต่จะถูกจับด้วย GAM ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ C เท่านั้น



รูปที่ 2 องค์ประกอบและหลักการทำงานของ competitive LFICS ที่มีการแข่งขันที่บริเวณ test line สำหรับตรวจ aflatoxin ในนม (A) ส่วนประกอบของชุดตรวจ (1) application pad (2) conjugate pad ที่มี anti-aflatoxin antibody ซึ่งติดฉลากด้วย AuNP (3) nitrocellulose membrane ที่มี aflatoxin-BSA ตรึงอยู่ที่ test line (T) และ GAM ตรึงอยู่ที่ control line (C) และ (4) absorbing pad (B) กรณีใส่ตัวอย่างนมที่มี aflatoxin สูงกว่าค่า LOD (+) ทำให้ aflatoxin ในตัวอย่างจับกับ anti-aflatoxin antibody ได้ทั้งหมด เมื่อไหลผ่าน test line ทำให้ไม่สามารถจับกับ aflatoxin-BSA ได้ จึงไม่เกิดแถบสีที่ test line ส่วน aflatoxin-Ab complex จะถูกจับด้วย GAM ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ C เท่านั้น (C) กรณีใส่ตัวอย่างนมที่ไม่มี aflatoxin หรือมีน้อยกว่าค่า LOD (-) anti-aflatoxin antibody ที่ติดฉลากด้วย AuNP จะสามารถจับกับ aflatoxin-BSA ที่ test line และส่วนเกินจะถูก GAM จับที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ T และ C

Competitive LFICS อีกรูปแบบหนึ่งใช้สารชนิดเดียวกับสารที่ต้องการตรวจ เช่นกรณีของ 17- α -hydroxy progesterone (α HP) นำมาติดฉลากด้วยอนุภาคนาโนทองคำ แต่เนื่องจากสารเหล่านี้มีขนาดเล็กจึงไม่สามารถเชื่อมต่อกับ AuNP ได้โดยตรง จึงต้องเชื่อมสารนี้กับโปรตีนอื่น ได้แก่ BSA ก่อนนำไปเชื่อมกับ AuNP (α HP/BSA/gold) แล้วจึงนำไปตรึงใน conjugate pad ส่วนที่บริเวณ test line และ control line จะมีแอนติบอดีหลัก (anti- α HP antibody) และ แอนติบอดีชุดที่สอง (anti-BSA antibody) ตรึงอยู่ตามลำดับ

ในกรณีที่สารตัวอย่างมี α HP ความเข้มข้นสูงกว่า LOD เมื่อตัวอย่างไหลผ่าน test line โดย α HP จะจับกับ anti- α HP antibody ทั้งหมดทำให้ α HP/BSA/gold ไม่ถูกจับและไหลผ่านไปยัง control line และถูกจับโดย anti-BSA antibody จึงสังเกตเห็นสี บน control line เท่านั้น แต่ในกรณีที่ตัวอย่างไม่มี α HP หรือมีในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า LOD นั้น α HP/BSA/gold จะถูกจับ โดยแอนติบอดีที่อยู่ในทั้ง test line และ control line จึงเห็นสีปรากฏขึ้นทั้ง test line และ control line [5] (รูปที่ 3)

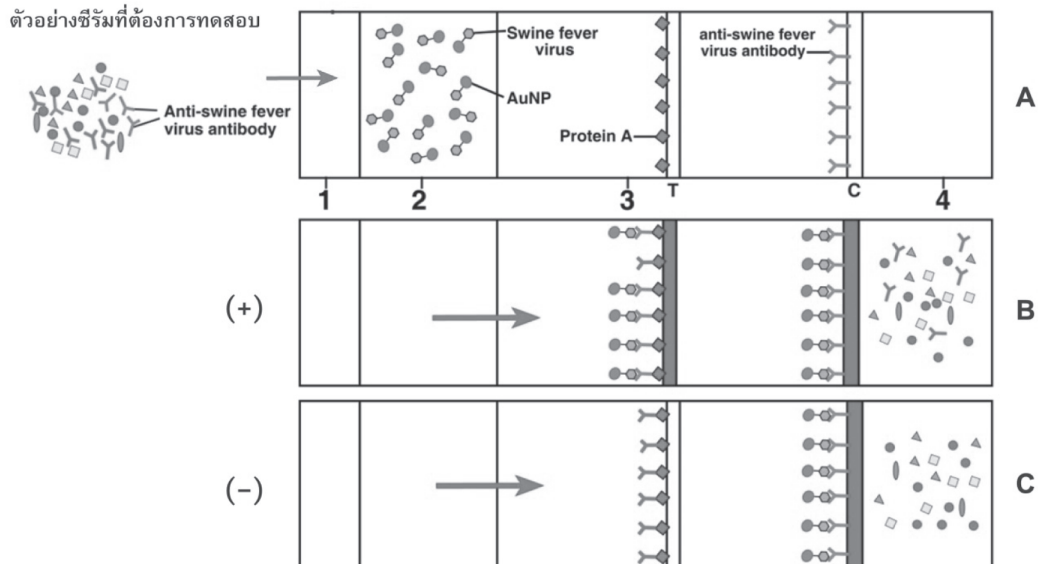


รูปที่ 3 องค์ประกอบและหลักการทำงานของ competitive LFICS ที่มีการแข่งขันที่ conjugate pad สำหรับตรวจ 17- α -hydroxy progesterone ในซีรัม (A) ส่วนประกอบของชุดตรวจ (1) application pad (2) conjugate pad ที่มี progesterone-BSA ติดฉลากด้วย AuNP (3) nitrocellulose membrane ที่มี anti-progesterone antibody ตรึงอยู่ที่ test line (T) และ anti-BSA antibody ตรึงที่ control line (C) และ (4) absorbing pad (B) หลังจากใส่ซีรัมที่มีระดับ progesterone สูงกว่าค่า LOD (+) progesterone จากซีรัมจะแย่งจับกับ anti-progesterone antibody ที่ test line ทั้งหมด ทำให้ progesterone-BSA-AuNP ไม่สามารถจับได้ จึงไม่เกิดแถบสีที่ T และเมื่อไหลมาถึง control line จะถูกจับโดย anti-BSA antibody จึงเกิดแถบสีที่ C เท่านั้น (C) กรณีที่ซีรัมมีระดับ progesterone ต่ำกว่าค่า LOD (-) progesterone-BSA-AuNP สามารถจับกับ anti-progesterone antibody ที่ test line และถูกจับโดย anti-BSA antibody ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ T และ C

3. LFICS สำหรับตรวจแอนติบอดี

LFICS สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี เป็นรูปแบบที่ใช้ตรวจสอบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคต่างๆ หลังจากการฉีดวัคซีนหรือหลังจากฟื้นตัวจากโรค และในบางกรณีสามารถใช้ป้องกันการติดเชื้อของโรคเรื้อรัง เช่น IHV gonorrhea และวัณโรค เป็นต้น LFICS รูปแบบนี้ จะประกอบด้วยแอนติเจนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อก่อโรค เช่น capsid protein (CP) ของไวรัส สามารถนำมาเชื่อมกับ AuNP (CP/gold) และตรึงใน conjugate pad ส่วนบนบนแผ่น nitrocellulose membrane จะมีการตรึง staphylococcus protein A (สำหรับจับกับแอนติบอดี) ที่บริเวณ test line และมีการตรึงแอนติบอดีต่อแอนติเจน (anti-CP antibody) ที่บริเวณ control line ซึ่งหลังจากเติมตัวอย่างซีรัมจากสัตว์ต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ เช่น หมูที่ได้รับวัคซีนโรคไข้หวัดหมู หากหมูมีการตอบสนองโดยการสร้าง anti-CP antibody แอนติบอดีเหล่านี้จะสามารถทำปฏิกิริยาจับกับ CP/gold (CP/gold/anti-CP antibody complex) และเมื่อไหลผ่านบริเวณ test line จะถูกดักจับโดยโปรตีน A สำหรับ CP/gold ส่วนเกินจะถูกจับโดย anti-CP antibody ที่ตรึงอยู่ที่

บริเวณ control line จึงสามารถสังเกตเห็นสีทั้งที่บริเวณ test line และ control line สำหรับกรณีที่ไม่ซีรัมจากสัตว์ ไม่มีการสร้าง anti-CP antibody จะไม่เกิด CP/gold/ anti-CP antibody complex ทำให้ไม่มีการสะสมของ CP/gold ที่บริเวณ test line จึงสังเกตเห็นสีเฉพาะที่บริเวณ control line เท่านั้น [6] (รูปที่ 4)



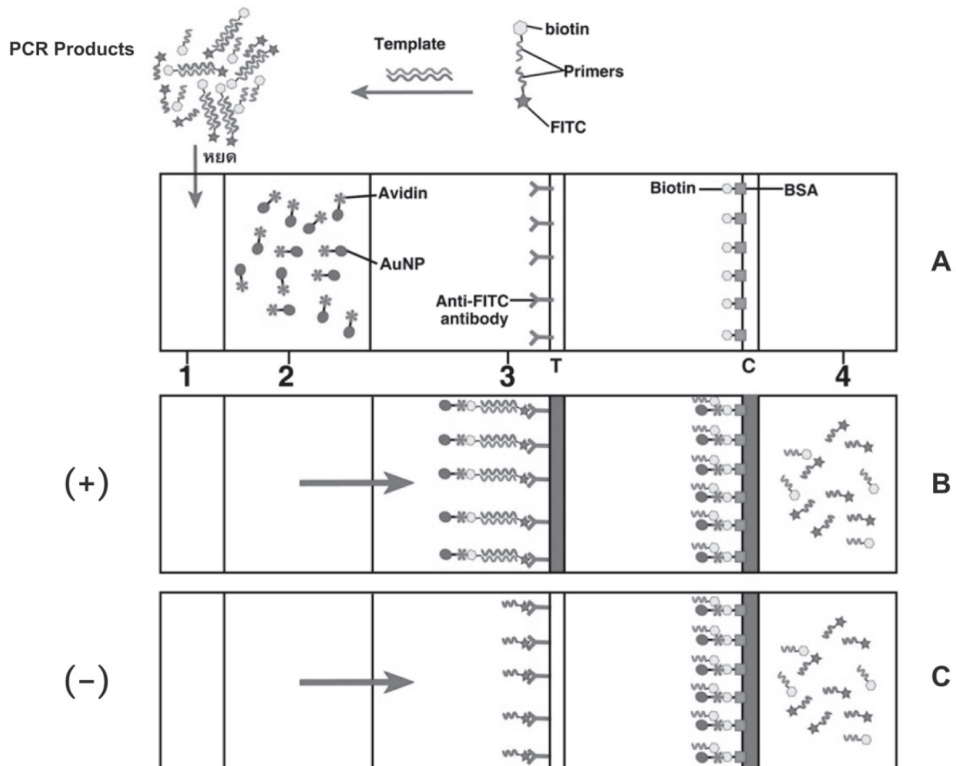
รูปที่ 4 องค์ประกอบและหลักการทำงานของ LFICS สำหรับตรวจแอนติบอดีในหมูที่ได้รับวัคซีนจากไวรัส (A) ส่วนประกอบของชุดตรวจ (1) application pad (2) conjugate pad ที่มีส่วนประกอบของไวรัส ติดฉลากด้วย AuNP (virus-AuNP) (3) nitrocellulose membrane ที่มี protein A ตรึงอยู่ที่ test line (T) และ anti-virus antibody ตรึงที่ control line (C) และ (4) absorbing pad (B) กรณีใส่ตัวอย่างซีรัมที่ปลูกภูมิคุ้มกันต่อไวรัส แอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสในซีรัมจะจับกับ virus- AuNP เมื่อไหลผ่าน test line แอนติบอดีจะถูกจับด้วย protein A และสะสมเป็นแถบสีที่ T ส่วน virus-AuNP ส่วนเกินจะไหลผ่านและถูกจับด้วย anti-virus antibody ที่ control line (C) กรณีใส่ตัวอย่างซีรัมที่ไม่มีการสร้างแอนติบอดีต่อไวรัส แอนติบอดีปกติจะไม่สามารถจับกับ virus-AuNP จึงไม่เกิดแถบสีที่ test line แต่จะไหลผ่านและถูกจับด้วย anti-virus antibody ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ C เท่านั้น

การใช้ LFICS สำหรับตรวจ nucleic acid

ในหลายกรณีของไวรัส แบคทีเรีย และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารต่ำกว่าระดับ LOD ของ LFICS แต่เนื่องจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้มี nucleic acid เป็นองค์ประกอบจึงสามารถใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณของ nucleic acid ที่จำเพาะเป็นล้านๆ เท่า ดังนั้นในกรณีนี้จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการทำ PCR ก่อนนำมาตรวจกับ LFICS ทำให้ทราบผลอย่างรวดเร็วภายหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR

ในการเตรียมตัวอย่าง nucleic acid ที่ต้องการของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เหล่านี้ สามารถนำมาขยายจำนวนด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีมาตรฐาน โดยใช้ primer ที่ติดฉลากด้วย biotin และ primer อีกด้านที่ติดฉลากด้วย fluorescein isothiocyanate (FITC) หรือ digoxigenin (dig) อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งภายหลังจากปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้น PCR product ที่ได้จะถูกติดฉลากด้วย biotin และ FITC และเมื่อนำมาตรวจด้วย LFICS ส่วนของ conjugate pad ของชุดตรวจจะมี avidin (หรือ streptavidin) gold conjugate (AV/gold) และส่วนของ nitrocellulose membrane จะมี anti-FITC antibody ที่บริเวณ test line และมี biotin ที่บริเวณ control line ใน conjugate pad ส่วนของ biotin ใน PCR product จะถูกจับโดย AV/gold และเมื่อสารละลายไหลผ่านถึงบริเวณ test line ส่วนของ FITC จะถูกจับโดย anti-FITC antibody ทำให้เกิดสีขึ้นที่บริเวณ test line สำหรับ AV/gold ส่วนเกินจะจับกับ biotin (avidin มี 4 binding site) ทำให้เกิดสีขึ้นที่บริเวณ control line ดังนั้นในตัวอย่าง nucleic acid ที่ไม่มี nucleotide sequence ที่ต้องการจะไม่เกิดผลผลิตเป้าหมายจึงไม่มีการเชื่อมต่อระหว่าง biotin และ FITC ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจโดย LFICS จะเกิดสีขึ้นที่บริเวณ control line เท่านั้น รูปที่ 5

สำหรับตัวอย่างของการใช้ LFICS-PCR ในการตรวจหา *Cryptosporidium parvum* ทำโดยการติดฉลาก forward และ reverse primer ด้วย biotin และ FITC ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จากนั้นจึงตรวจวัด PCR product โดยใช้ immobilized anti-FITC antibody และ streptavidin ที่ติดอยู่กับ coloured latex microparticle [7] ต่อมาในปีเดียวกันได้มีการใช้เทคนิค LFICS ในการตรวจหา *Staphylococcus aureus* โดยมีการใช้ immobilized streptavidin และ anti-fluorescein antibody ที่ติดฉลากด้วย AuNP [8] การเพิ่มจำนวน nucleic acid อาจเพิ่มโดยวิธี PCR, nested PCR หรือ looped mediated isothermal amplification (LAMP) ดังตัวอย่างในตารางที่ 2



รูปที่ 5 องค์ประกอบและหลักการการทำงานของ PCR-LFICS สำหรับกรณีนี้ทำการเพิ่มปริมาณ nucleic acid ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย โดย primers ปลายด้านหนึ่งติดฉลากด้วย FITC และอีกด้านติดฉลากด้วย biotin หากในตัวอย่างมียีนเป้าหมาย จะได้ PCR product ที่มี FITC และ biotin ติดอยู่ (A) ส่วนประกอบของชุดตรวจ (1) application pad (2) conjugate pad ที่มี avidin ติดฉลากด้วย AuNP (3) nitrocellulose membrane ที่มี anti-FITC antibody ตรึงอยู่ที่ test line (T) และ Biotin-BSA ตรึงที่ control line (C) และ (4) absorbing pad (B) กรณีใส่ตัวอย่าง PCR product (+) ลงใน application pad และไหลผ่าน conjugate pad ส่วนของ biotin จะถูกจับโดย avidin และเมื่อเข้าสู่ test line ส่วนของ FITC จะถูก anti-FITC antibody จับเกิดเป็นแถบสีที่ test line ส่วน avidin-AuNP ส่วนเกินจะไหลผ่านและถูกจับโดย Biotin-BSA ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ T และ C (C) กรณีตัวอย่างไม่เกิด PCR product (-) avidin-AuNP จะจับกับ Biotin-BSA ที่ control line ทำให้เกิดแถบสีที่ C เท่านั้น

ตารางที่ 2 LFICS ที่ใช้ AuNP ในการตรวจสาร

สิ่งที่ต้องการตรวจ	LOD	อ้างอิง
Sandwich LFICS		
- Carcinoembryonic antigen (CEA)	5 ng/ml	[33]
- Prostate specific antigen (PSA)	1 ng/ml	[34]
- Botulinum neurotoxin B and D	50 ng/ml, 50 pg/ml	[35, 36]
- Ricin	25 ng/ml	[37]
- Staphylococcal enterotoxin	0.2 ng/ml	[38]
- Influenza	2.9×10^6 copies/ml	[39]
- Rabies virus	0.2 IU/ml	[40]
- White spot syndrome virus (WSSV)	5×10^4 copies	[41]
- Yellow head virus (YHV)	-	[42]
- Infectious myonecrosis virus (IMNV)	5×10^6 copies	[43]
- Monodon baculovirus (MBV)	-	[44]
- <i>Vibrio cholera O1</i>	10^6 CFU/ml	[45]
- <i>Vibrio cholera O139</i>	10^4 CFU/ml	[46]
- <i>Escherichia coli O157</i>	1.14×10^3 CFU/ml	[47]
- <i>Staphylococcus aureus</i>	10 CFU/ml	[48]
- <i>Salmonella Typhimurium</i>	10^4 CFU/ml	[49]
Competitive LFICS		
- Aflatoxin B1	0.03 ng/ml	[4]
- 17- α -hydroxy progesterone	2.5 ug/l	[5]
- Chloramphenical	1 ug/l	[50]
LFICS for Antibody Detection		
- Swine fever virus	-	[6]
- Rabies	-	[51]
- Leishmania donovani	-	[52]
- HIV	-	[53]
- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	[54]
Nucleic acid LFICS		
- <i>Cryptosporidium parvum</i>	1 oocyst/l	[7]
- <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.8×10^3 CFU/g	[55]
- <i>Vibrio vulnificus</i>	1.2×10^4 CFU/g	[56]

การเพิ่มสัญญาณโดยการปรับปรุง NPAu-LFICS

ถึงแม้ NPAu จะเป็นที่นิยมแพร่หลายในการพัฒนา LFICS รูปแบบต่างๆ ข้างต้นก็ตาม แต่โดยทั่วไปการใช้ LFICS ในการตรวจสอบสารต่างๆ ที่ไม่ใช่ nucleic acid มักมีข้อจำกัดในแง่ความไวค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการตรวจสอบของ NPAu โดยตรงซึ่งมีสีชมพูอ่อนเมื่อมีสารปริมาณน้อย การใช้เครื่องอ่าน (strip reader) เพื่อเปลี่ยนเป็นค่า optical density (OD) ช่วยให้การแปลผล และการวัดเชิงปริมาณทำได้แม่นยำขึ้นกว่าการประมาณด้วยตา แต่อย่างไรก็ตามค่า OD ของ test line (ODT) และ control line (ODC) ไม่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการตรวจเท่านั้น แต่ยังขึ้นกับ เวลาที่ทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ สภาพทางกายภาพของตัวอย่าง และความแปรปรวนระหว่างชุดตรวจแต่ละชิ้นด้วย ซึ่งการใช้ค่าอัตราส่วนระหว่าง OD ของ test line และ control line (ODT/ODC) สามารถช่วยให้การวัดเชิงปริมาณทำได้แม่นยำขึ้น [9] แต่อย่างไรก็ตาม LFICS ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากแรงจับของแอนติบอดีเป็นอุปสรรคที่สำคัญที่ทำให้การพัฒนา LFICS ไม่สามารถมีความไวสูงตามที่ต้องการได้ ความพยายามที่จะปรับ LFICS ให้มีความไวสูงขึ้นสามารถทำได้โดยการเพิ่มสัญญาณโดยใช้แอนติบอดีติดฉลากด้วยอนุภาคนาโนทองคำ 2 ชนิด ชนิดแรกจำเพาะต่อแอนติเจน (*E. coli* O157:H7) และชนิดที่สองจำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดแรก ซึ่งสามารถเพิ่มความไวในการตรวจมากกว่าวิธีปกติ 10 เท่า [10] สำหรับการเพิ่มสัญญาณโดยใช้เกลือของเงิน (silver salt) ร่วมกับ reducing agent ทำให้เกิดการสะสมของเงินที่บริเวณที่มีอนุภาคนาโนทองคำสะสมอยู่ สามารถเพิ่มความไวได้สูงถึง 100 เท่า [11, 12] ส่วนการเพิ่มสัญญาณโดยใช้เอนไซม์ เช่น horseradish peroxidase เชื่อมต่อกับแอนติบอดีชุดแรกใน conjugate pad เมื่อใส่ substrate และ chromogen ชนิดต่างๆ สามารถเพิ่มความไวในการตรวจได้เท่าตัว [13]

การเพิ่มสัญญาณโดยใช้ตัวรายงานผล (reporter) ชนิดต่างๆ แทน AuNP

Carbon nanotube (CNT) และ carbon nanoparticle (CNP)

การทดลองใช้ CNT และ CNP แทนการใช้ NPAu เนื่องจากสารทั้งสองรูปแบบนี้ สามารถเชื่อมต่อดีง่ายกับสารต่างๆ ที่ใช้ตรวจ มีความคงตัวสูงและให้สีดำซึ่งเห็นชัดเจนบนพื้นขาวของ nitrocellulose membrane รายงานการพัฒนา LFICS โดยใช้ CNT และ CNP มีทั้งรูปแบบ sandwich [14, 15] และ competitive [16-19] ซึ่งโดยทั่วไปความไวของชุดตรวจที่ได้มีความไวในระดับใกล้เคียงกับ AuNP

Quantum dot (QD)

Quantum dot เป็น semiconductor nanoparticle ซึ่งสามารถเปล่งแสงสี (คลื่นความถี่) ต่างๆ เมื่อได้รับแสงหรือกระแสไฟฟ้า โดยการปรับขนาดหรือรูปร่าง เนื่องจากแสงที่ให้มีช่วงแคบและความเข้มสูง จึงทำให้ความไวในการตรวจสอบสูง และสามารถวัดเชิงปริมาณได้โดยใช้ strip reader นอกจากนี้ QD ยังประกอบด้วย amino group และ carboxylic group จำนวนมาก จึงสามารถเชื่อมต่อดีง่ายกับสารต่างๆ ที่ใช้ตรวจ โดยมีรายงานการพัฒนา LFICS ทั้งรูปแบบ sandwich LFICS [20, 21] และ competitive LFICS [22-24]

จากการที่ QD สามารถให้แสงสีต่างๆ และมีขนาดเล็ก จึงสามารถพัฒนาเป็นชุดตรวจที่สามารถใช้ตรวจสารหลายชนิดได้ในชุดตรวจเดียวกัน เช่น ชุด competitive LFICS สำหรับตรวจยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด [25] หรือชุด sandwich LFICS สำหรับตรวจเครื่องหมายมะเร็ง 2 ชนิด คือ alpha fetoprotein (AFP) และ carcinoembryonic antigen (CEA) [26] เป็นต้น

Magnetic nanoparticle (MNP)

Magnetic nanomaterial (อนุภาคแม่เหล็กนาโน) เป็นวัสดุแม่เหล็กที่เริ่มนำมาใช้ในการประกอบ LFICS แทนการใช้ optical LFICS เนื่องจากสามารถวัดสัญญาณแม่เหล็กได้ทั้งหมด ซึ่งต่างจากกรณีของ optical LFICS สีหรือแสง จากสารที่ test line และ control line สามารถตรวจได้เฉพาะบริเวณผิวสีกลลงไปประมาณ 10 ไมโครเมตร จากความหนาของเมมเบรนซึ่งหนามากกว่า 100 ไมโครเมตร [27] ดังนั้นจึงสามารถวัดในเชิงปริมาณได้โดยใช้ magnetic signal reader ที่มีความไวสูง เนื่องจากปราศจากสัญญาณรบกวนจากตัวอย่าง มีรายงานการพัฒนาโดยใช้ MNP ในการตรวจสารต่างๆ ทั้งแบบ sandwich LFICS และ competitive LFICS

อนุภาคนาโนชนิดอื่นๆ

รายงานการใช้อนุภาคนาโนชนิดอื่นๆ ในการพัฒนา LFICS เช่น colloidal selenium nanoparticle [28, 29] enzyme [30] สารเรืองแสงต่างๆ [31, 32] ซึ่งโดยทั่วไปสารเหล่านี้ไม่มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ AuNP มากนัก

สรุป

LFICS ทั้ง 3 รูปแบบที่มี AuNP เป็นตัวแสดงผล ยังเป็นรูปแบบหลักที่มีการพัฒนาสำหรับใช้ตรวจหาสารชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งในทางการแพทย์ และด้านต่างๆ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ราคาถูก ทราบผลรวดเร็ว ชุดตรวจมีขนาดเล็ก และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนหรือผู้ชำนาญ แต่อย่างไรก็ตาม LFICS ยังมีข้อด้อยที่ต้องปรับปรุงโดยเฉพาะเรื่องความไว หรือค่า LOD และการตรวจวัดเชิงปริมาณส่วนใหญ่ให้ข้อมูลเชิงคุณภาพ (มี/ไม่มี) เท่านั้น การปรับปรุงให้ LFICS มีความไวสูงขึ้นโดยใช้ strip reader หรือเสริมด้วยการวิธีการต่างๆ หรือใช้สารต่างๆ แทน AuNP นั้นส่วนใหญ่ยังไม่สะดวกและไม่เป็นที่แพร่หลายสำหรับบุคคลทั่วไป หรือพกพาไปใช้นอกห้องปฏิบัติการ (point of care) ปัจจุบันเริ่มมีแนวโน้มที่จะสามารถปรับปรุงโทรศัพท์เคลื่อนที่ให้เป็น strip reader โดยการถ่ายภาพ แสดงผล เก็บข้อมูล และมีระบบคมนาคมที่สามารถเชื่อมต่อกับศูนย์รวบรวมข้อมูลและแปลผล [59] ซึ่งจะมีผลให้บุคคลทั่วไปสามารถใช้ LFICS สำหรับตรวจสารต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงและแพร่หลายมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Bahadir, E. B., and Sezginturk, M. K. 2016. Lateral Flow Assays: Principles, Designs and Labels. *Trends in Analytical Chemistry*. 82: 286-306.
2. Mak, W. C., Beni, V., and Turner, A. P. F. 2016. Lateral-Flow Technology: from Visual to Instrumental. *Trends in Analytical Chemistry*. 79: 297-305.
3. Sajid, M., Kawde, A. N., and Daud, M. 2015. Designs, Formats and Applications of Lateral Flow Assay: A Literature Review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 19: 689-705.
4. Zhang, D., Li, P., Zhang, Q., and Zhang, W. 2011. Ultrasensitive Nanogold Probe-Based Immunochromatographic Assay for Simultaneous Detection of Total Aflatoxins in Peanuts. *Biosensors and Bioelectronics*. 26: 2877-2882.
5. Tripathi, V., Nara, S., Singh, K., Singh, H., and Shrivastav, T. G. 2012. A Competitive Immunochromatographic Strip Assay for 17- α -Hydroxy Progesterone Using Colloidal Gold Nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*. 413: 262-268.
6. Li, X., Wang, L., Shi, X., Zhao, D., Yang, J., Yang, S., and Zhang, G. 2012. Development of an Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of Antibodies Against Classical Swine Fever Virus. *Journal of Virological Methods*. 180: 32-37.
7. Kozwicz, D., Johansen, K. A., Landau, K., Roehl, C. A., Woronoff, S., and Roehl, P. A. 2000. Development of a Novel, Rapid Integrated *Cryptosporidium parvum* Detection Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2711-2717.
8. Fong, W. K., Modrusan, Z., McNevin, J. P., Marostenmaki, J., Zin, B., and Bekkaoui, F. 2000. Rapid Solid-Phase Immunoassay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Cycling Probe Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2525-2529.
9. Li, C., Luo, W., Xu, H., Zhang, Q., Xu, H., Aguilar, Z. P., Lai, W., Wei, H., and Xiong, Y. 2013. Development of an Immunochromatographic Assay for Rapid and Quantitative Detection of Clenbuterol in Swine Urine. *Food Control*. 34: 725-732.
10. Chen, M., Yu, Z., Liu, D., Peng, T., Liu, K., Wang, S., Xiong, Y., Wei, H., Xu, H., and Lai, W. 2015. Dual Gold Nanoparticle Lateral Flow immunoassay for Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytica Chimica Acta*. 876: 71-76.
11. Anfossi, L., Di Nardo, F., Giovannoli, C., Passini, C., and Baggiani, C. 2013. Increased Sensitivity of Lateral Flow Immunoassay for Ochratoxin a Through Silver Enhancement. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405: 9859-9867.

12. Wei, Y., Xiao-bing, L., Guo-wen, L., Bing-bing, Z., Yi, Z., Tao, K., Jia-jiaa, T., Dong-naa, L., and Zhe, W. 2011. A Colloidal Gold Probe-Based Silver Enhancement Immunochromatographic Assay for the Rapid Detection of Abrin-A. *Biosensors and Bioelectronics*. 26: 3710-3713.
13. Parolo, C., and Merkoç, A. 2013. Paper-Based Nanobiosensors for Diagnostics. *Chemical Society Reviews*. 42: 450-457.
14. Bogdanovic, J., Koets, M., Sander, I., Wouters, I., Meijster, T., Heederik, D., van Amerongen, A., and Doekes, G. 2006. Rapid Detection of Fungal A-Amylase in the Work Environment with a Lateral Flow Immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 118: 1157-1163.
15. Lönnberg, M., Drevin, M., and Carlsson, J. 2008. Ultra-Sensitive Immunochromatographic Assay for Quantitative Determination of Erythropoietin. *Journal of Immunological Methods*. 339: 236-244.
16. Suarez-Pantaleon, C., Wichers, J., Abad-Somovilla, A., Amerongen, A., and Abad-Fuentes, A. 2013. Development of an Immunochromatographic Assay Based on Carbon Nanoparticles for the Determination of the Phyto regulator Forchlorfenuron. *Biosensors and Bioelectronics*. 42: 170-176.
17. Blazková, M., Micková-Holubová, B., Rauch, P., and Fukal, L. 2009. Immunochromatographic Colloidal Carbon-Based Assay for Detection of Methiocarb in Surface Water. *Biosensors and Bioelectronics* 25: 753–758.
18. Blazková, M., Rauch, P., and Fukal, L. 2010. Strip-Based Immunoassay for Rapid Detection of Thiabendazole. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 2122–2128.
19. O’Keeffe, M., Crabbe, P., Salden, M., Wichers, J., Van Peteghem, C., Kohen, F., Pieraccinif, G., and Monetif, G. 2003. Preliminary Evaluation of a Lateral Flow Immunoassay Device for Screening Urine Samples for the Presence of Sulphamethazine. *Journal of Immunological Methods*. 278: 117-126.
20. Yang, Q., Gong, X., Song, T., Yang, J., Zhu, S., Li, Y., Cui, Y., Li, Y., Zhange, B., and Chang, J. 2011. Quantum Dot-Based Immunochromatography Test Strip for Rapid, Quantitative and Sensitive Detection of Alpha Fetoprotein. *Biosensors and Bioelectronics*. 30: 145-150.
21. Li, Z., Wang, Y., Wang, J., Tang, Z., Pounds, J. G., and Lin, Y., 2010. Rapid and Sensitive Detection of Protein Biomarker Using a Portable Fluorescence Biosensor Based on Quantum Dots and a Lateral Flow Test Strip. *Analytical Chemistry*. 82: 7008-7014.

22. Chen, X., Gan, M., Xu, H., Chen, F., Ming, X., Xu, H., Wei, H., Xu, F., and Liu, C. 2014. Development of a Rapid and Sensitive Quantum Dot-Based Immunochromatographic Strip by Double Labeling PCR Products for Detection of *Staphylococcus aureus* in Food. *Food Control*. 46: 225-232.
23. Duan, H., Chen, X., Xu, W., Fu, J., Xiong, Y., Wang, A. 2015. Quantum-Dot Submicrobeadbased Immunochromatographic Assay for Quantitative and Sensitive Detection of Zearalenone. *Talanta*. 132: 126-131.
24. Shen, J., Zhou, Y., Fu, F., Xu, H., Lv, J., Xiong, Y., and Wang, A. 2015. Immunochromatographic Assay for Quantitative and Sensitive Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen Using Highly Luminescent Quantum Dot-Beads. *Talanta*. 142: 145-149.
25. Taranova, N. A., Berlina, A. N., Zherdev, A. V., and Dzantiev, B. B. 2015. 'Traffic Light' Immunochromatographic Test Based on Multicolor Quantum Dots for The Simultaneous Detection of Several Antibiotics in Milk. *Biosensors and Bioelectronics*. 63: 255-261.
26. Wang, C., Hou, F., and Ma, Y. 2015. Simultaneous Quantitative Detection of Multiple Tumor Markers with a Rapid and Sensitive Multicolor Quantum Dots Based Immunochromatographic Test Strip. *Biosensors and Bioelectronics*. 68: 156-162.
27. Ryu, Y., Jin, Z., Kang, M. S., and Kim, H. S. 2011. Increase in the Detection Sensitivity of a Lateral Flow Assay for a Cardiac Marker by Orientated Immobilization of Antibody. *BioChip Journal*. 5: 193-198.
28. Lou, S. C., Patel, C., Ching, S., and Gordon, J. 1993. One-Step Competitive Immunochromatographic Assay for Semiquantitative Determination of Lipoprotein (A) in Plasma. *Clinical chemistry*. 39: 619-624.
29. Wang, Z., Zhi, D., Zhao, Y., Zhang, H., Wang, X., Ru, Y., Li, H. 2014. Lateral Flow Test Strip Based on Colloidal Selenium Immunoassay for Rapid Detection of Melamine in Milk, Milk Powder, and Animal Feed. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 1699-1707.
30. Fung, K. K., Chan, C. P., Renneberg, R. 2009. Development of Enzyme-Based Bar Code-Style Lateral-Flow Assay for Hydrogen Peroxide Determination. *Analytical Chimica Acta*. 634: 89-95.
31. Wang, Y., Xu, H., Wei, M., Gu, H., Xu, Q., and Zhu, W. 2009. Study of Superparamagnetic Nanoparticles as Labels in the Quantitative Lateral Flow Immunoassay. *Materials Science and Engineering C*. 29: 714-718.
32. Ahn, J. S., Choi, S., Jang, S. H., Chang, H. J., Kim, J. H., Nahm, K. B., Oh, S. W., and Choi, E. Y. 2003. Development of a Point-of-Care Assay System for High-Sensitivity C-Reactive Protein in Whole Blood. *Clinica Chimica Acta*. 332: 51-59.

33. Zeng, Q., Mao, X., Xu, H., Wang, S., and Liu, G. 2009. Quantitative Immunochromatographic Strip Biosensor for the Detection of Carcinoembryonic Antigen Tumor Biomarker in Human Plasma. *American Journal of Biomedical Sciences*. 1: 70-79.
34. Yuhi, T., Nagatani, N., Endo, T., Kerman, K., Takata, M., Konaka, H., Namiki, M., Takamura, Y., and Tamiya, E. 2006. Resin-Based Micropipette tip for Immunochromatographic Assays in Urine Samples, *Journal of Immunological Methods*. 312: 54-60.
35. Chiao, D. J., Shyu, R. H., Hu, C. S., Chiang, H. Y., and Tang, S. S. 2004. Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Assay for Detection of Botulinum Neurotoxin Type B. *Journal of Chromatography B* 809: 37-41.
36. Klewitz, T., Gessler, F., Beer, H., Pflanz, K., and Scheper, T. 2006. Immunochromatographic assay for Determination of Botulinum Neurotoxin Type D. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 113: 582-589.
37. Wu, J., Wang, Y., Jia, P., Wang, C., Zhao, Y., Peng, H., Wei, W., and Li, H. 2011. Immunochromatography Detection of Ricin in Environmental and Biological Samples. *Nano Biomedicine and Engineering*. 3: 167-171.
38. Jin, W., Yamada, K., Ikami, M., Kaji, N., Tokeshi, M., Atsumi, Y., Mizutani, M., Murai, A., Okamoto, A., Namikawa, T., Baba, Y., and Ohta, M. 2013. Application of IgY to Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, Lateral Flow Devices, and Immunopillar Chips for Detecting Staphylococcal Enterotoxins in Milk and Dairy Products. *Journal of Immunological Methods*. 92: 323-331.
39. Mitamura, K., Shimizu, H., Yamazaki, M., Ichikawa, M., Nagai, K., Katada, J., Wada, A., Kawakami, C., and Sugaya, N. 2013. Clinical Evaluation of Highly Sensitive Silver Amplification Immunochromatography Systems for Rapid Diagnosis of Influenza. *Journal of Virological Methods*. 194: 123-128.
40. Wang, H., Feng, N., Yang, S., Wang, C., Wang, T., Gao, Y., Su, J., Zheng, X., Hou, X., Huang, H., Yang, R., Zou, X., Huang, G., and Xia, X. 2010. A Rapid Immunochromatographic Test Strip for Detecting Rabies Virus Antibody. *Journal of Virological Methods*. 170: 80-85.
41. Wangman, P., Siritwattanasat, R., Longyant, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., and Chaivisuthangkura, P. 2017. High Sensitivity Immunochromatographic Strip Test (ICP11 Strip Test) for White Spot Syndrome Virus Detection Using Monoclonal Antibodies Specific to ICP11 Non-Structural Protein. *Aquaculture*. 470: 25-31.
42. Sithigorngul, W., Rukpratanporn, S., Sittidilokratna, N., Pecharaburanin, N., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., and Sithigorngul, P. 2007. A Convenient Immunochromatographic Test Strip for Rapid Diagnosis of Yellow Head Virus Infection in Shrimp. *Journal of Virological Methods*. 140: 193-199.

43. Wangman, P., Longyant, S., Utari, H. B., Senapin, S., Pengsuk, C., Sithigorngul, P., and Chaivisuthangkura, P., 2016. Sensitivity Improvement of Immunochromatographic Strip Test for Infectious Myonecrosis Virus Detection. *Aquaculture*. 453: 163-168.
44. Wangman, P., Longyant, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., and Sithigorngul, P., 2012. *Penaeus monodon* Nucleopolyhedrovirus Detection Using an Immunochromatographic Strip Test. *Journal of Virological Methods*. 183: 210-214.
45. Chaivisuthangkura, P., Pengsuk, C., Longyant, S., and Sithigorngul, P. 2013. Evaluation of Monoclonal Antibody Based Immunochromatographic Strip Test for Direct Detection of *Vibrio cholerae* O1 Contamination in Seafood Samples. *Journal of Microbiological Methods*. 95: 304-311.
46. Pengsuk, C., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., and Sithigorngul, P. 2013. Development and Evaluation of a Highly Sensitive Immunochromatographic Strip Test Using Gold Nanoparticle for Direct Detection of *Vibrio cholerae* O139 in Seafood Samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 42: 229-235.
47. Yonekita, T., Ohtsuki, R., Hojo, E., Morishita, N., Matsumoto, T., Aizawa, T., and Morimatsu, F. 2013. Development of a Novel Multiplex Lateral Flow Assay Using an Antimicrobial Peptide for the Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. 93: 251-256.
48. Huang, S. H. 2007. Gold Nanoparticle-Based Immunochromatographic Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B Chemical*. 127: 335-340.
49. Moongkarndi, P., Rodpai, E., and Kanarat, S. 2011. Evaluation of an Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23: 797-801.
50. Yuan, M., Sheng, W., Zhang, Y., Wang, J., Yang, Y., Zhang, S., Goryacheva, I. Y., and Wang, S. 2012. A Gel-Based Visual Immunoassay for Non-Instrumental Detection of Chloramphenicol in Food Samples, *Analytica Chimica Acta*. 751: 128-134.
51. Tao, C., and Li, G. 2014. A Rapid One-Step Immunochromatographic Test Strip for Rabies Detection Using Canine Serum Samples. *Letters in Applied Microbiology*. 59: 247-251.
52. Welch, R. J., Anderson, B. L., and Litwin, C. M. 2008. Rapid Immunochromatographic Strip Test for Detection of Anti-K39 Immunoglobulin G Antibodies for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 15: 1483-1484.
53. Iqbal, H. S, Solomon, S., Murugavel, K. G, Solomon, S. S., and Balakrishnan, P. 2005. Evaluation and Diagnostic Usefulness of Domestic and Imported Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody in India. 2005. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12: 1425-1428.

54. Ben-Selma, W., Harizi, H., and Boukadida, J. 2011. Immunochromatographic IgG/IgM Test for Rapid Diagnosis of Active Tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18: 2090-2094.
55. Prompamorn, P., Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Longyant, S., Sridulyakul, P., and Chaivisuthangkura, P. 2011. The Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick for Detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*. 52: 344-351.
56. Surasilp, T., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Sridulyakul, P., Sithigorngul, P., and Chaivisuthangkura, P. 2011. Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio vulnificus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick Targeted to *rpoS* Gene. *Molecular and Cellular Probes*. 25: 158-163.
57. Eltzov, E., Guttel, S., Kei, A. L. Y., Sinawang, P. D., Ionescu, R. E., and Marks, R. S. 2015. Lateral Flow Immunoassays-from Paper Strip to Smartphone Technology. *Electroanalysis*. 27: 2116-2130.