โครงการวิจัยนี้ เป็นการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสอบชนิดรวดเร็ววิธีอิมมูโนแอสเสย์แบบการไหลเลเทอรอล สำหรับตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. โดยจะใช้เวลาการตรวจและทราบผลในช่วงประมาณ 1-10 นาที แผ่น strips ที่ใช้ตรวจจะให้ผลบวกกับเชื้อ *Salmonella* spp. ที่จะครอบคลุม การตรวจ *Salmonella* แบบ broad range โดยที่ผลของแต่ละสายพันธุ์ให้ผลความเข้มของปฏิกิริยาแตกต่างกันบ้าง และจะให้ผลลบกับเชื้อที่ไม่ใช่ *Salmonella* spp. จากการศึกษาพบว่าหากเชื้อที่มีการปนเปื้อนตั้งแต่ 10^7 cfu/ml ขึ้นไปจึงจะให้ผลบวกชัดเจนแตกต่างจาก Enterobacteriaceae ตัวอื่น จากการทดลองพบว่าหากมีเชื้อปนเปื้อน 1 cfu/ml และเมื่อบ่มต่อนานข้ามคืน เชื้อจะมีปริมาณมากเพียงพอที่จะตรวจพบโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่าเมื่อเก็บแผ่น strips ที่ 4°C โดยมีความชื้นน้อยในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัย นาน 0, 1 และ 3 เดือน ผลที่ได้จากการตรวจสอบเชื้อยังคงได้ผลเช่นเดิม เชื่อว่าแผ่น strips สามารถเก็บไว้ใช้ได้นานกว่านี้

เมื่อนำ strips ที่เตรียมในห้องปฏิบัติการนี้มาใช้ตรวจตัวอย่างเนื้อไก่และน้ำล้างเนื้อไก่ที่ตรวจโดยกรมปศุสัตว์ จำนวน 226 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ได้จะเตรียมการตรวจตามวิธีมาตรฐานโดยจะมีการบ่มข้ามคืน 12-18 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ นำตัวอย่างที่บ่มมาปั่นแยกเชื้อและเตรียม lysate ของเชื้อ โดยการต้มเดือดนาน 10 นาที ใช้แผ่น strips มาใช้ตรวจผลการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งผลที่ได้จะมีผลที่สัมพันธ์กับผลที่ตรวจตามวิธีมาตรฐานของกรมปศุสัตว์โดยวิธี real time PCR และ/หรือ microbiological method ซึ่งใช้เวลาในการตรวจกว่าจะทราบผลระหว่าง 5-7 วัน โดยมีค่าการตรวจที่ให้ผลบวกตรงกันคิดเป็นร้อยละ 82 (50/61 ตัวอย่าง) สำหรับผลการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่บางขั้นตอนอาจแตกต่างกันพบว่าอาจมีผลเล็กน้อยในการตรวจ แต่พบว่าผลของการตรวจที่ให้ผลลบอาจแตกต่างกันบ้าง เพราะมีแนวการพิจารณาผลที่ต่างกันในการตรวจผล แต่ผลจาก strip อาจมีแนวให้เห็นและรายงานผลเป็นบวก

ชุดตรวจสอบสำหรับ *Salmonella* spp. มีต้นทุนในการผลิตที่คำนวณตามระบบที่ใช้ในห้องปฏิบัติการประมาณ 40 บาทต่อ strip ซึ่งมีราคาที่ถูกกว่า strip ในรูปแบบที่คล้ายคลึงกันโดยประมาณราคาที่จำหน่ายใน catalog ถึง 10 เท่า ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีการจำหน่ายในประเทศไทย ดังนั้นจึงเชื่อมั่นว่า การพัฒนาครั้งนี้จะสามาถนำหลักการนี้มาใช้เป็นชุดตรวจที่ใช้ในเชิงธุรกิจได้ การตรวจทำได้ง่ายไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ และสามารถทำการตรวจได้ที่นอกห้องปฏิบัติการ

สำหรับการวิจัยและพัฒนา ชุดตรวจสอบชนิดรวดเร็ววิธีอิมมูโนแอสเสย์แบบการไหลเลเทอรอล สำหรับตรวจเชื้อ *Campylobacter* spp. และ *Campylobacter jejuni* ไม่ได้ผลตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ สันนิษฐานว่าเป็นเพราะแอนติบอดีที่ใช้ตรวจยังคงไม่สามารถปรับสภาพให้ทำปฏิกิริยาในหลักการการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนแอสเสย์แบบการไหลเลเทอรอลได้ ถึงแม้ว่าสามารถนำมาใช้ตรวจโดยวิธี ELISA ได้ผลแล้วในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าในระบบที่ปรับต่างๆแล้วผลที่ได้ยังคงให้ผลข้ามกันระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อชนิดต่างๆและบางครั้งให้ผลลบ อย่างไรก็ตามการตรวจผลของระบบตัวควบคุมบนแผ่น strips บน control line เมื่อใช้แอนติบอดีจากหลากหลาย species สามารถจัดระบบให้ผลการตรวจได้ดี ในการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ประสบการณ์และความรู้ในการพัฒนาระบบอิมมูโนแอสเสย์แบบการไหลเลเทอรอล ดังนั้นในการวิจัยและพัฒนาต่อไปหากสามารถค้นหาแอนติบอดีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ตรวจสอบ จะสามารถพัฒนาชุดตรวจสอบได้ ดังนั้นในระยะการวิจัยที่สุดสิ้นลงและยังไม่มีข้อมูลใหม่ในการวิจัย คณะผู้วิจัยจึงขอสรุปผลการวิจัยเพียงนี้สำหรับรายงานสมบูรณ์

This project is the research and development on the rapid diagnosis by lateral flow test immunoassay for *Salmonella* spp. The detection will take about 1-10 min to obtain the result. The strips for the diagnosis gave positive results covering for *Salmonella* spp. in broad range, however, with some different intensity of results and gave negative results for all strains of other genus tested. The contamination of samples with *Salmonella* will give very clear cut of positive result at 10^7 cfu/ml comparing with other Enterobacteriaceae. If the contaminated samples with *Salmonella* were only 1 cfu/ml, after overnight incubation, the number of organisms would be increased more than enough to be detected by the developed strips. The developed strips during the research could be kept at $4^{o}C$ with low moisture and gave the same patterns of results after retested. It is assumed that the strips are still stable after longer storage.

The 226 samples from chicken meat and washed water between processing were identified at the Livestock Division by these lateral flow test assay. The samples were incubated overnight following standard methods and identified by PCR and/or microbiology methods that would take about 5-7 days to obtained results. Overnight incubated samples were collected, centrifuged and lysed by boiling at $100^{o}C$ for 10 minutes and tested by the developed strips. The results demonstrated the correlation for positive samples at 82% (50/61). The different media for enrichment were shown no effect on the results of developed lateral test system.

Our developed lateral flow test immunoassay for *Salmonella* spp. was created manually at the lab scale and calculated to cost approximately 40 Baht/strip which was lower than at least 10 times of the similar commercial available in the catalog. The lateral flow test kit for *Salmonella* is not available in Thailand. We believe that the developed test has strong potential to launch as commercial diagnosis kit. The kit is easy to manipulated and required no special trained - personnel. It can be used outside the laboratory at the farms.

For the development on the rapid diagnosis by lateral flow test immunoassay for *Campylobacter* spp. and *Campylobacter jejuni*, the tests were not successful as planned, since the antibodies obtained could not set to give appropriated results whereas the results obtained in ELISA in the previous grant gave satisfied results. In the lateral flow test, the strips gave false positive to various tested organisms even with buffer and some test negative results. We tried many systems, different antibodies and varied many factors, but we still could not solve the problems. However, we can set the control lines of antibodies from various species. From this study, we have many experiences and learned many systems for the lateral flow tests. In the future, if we can find the proper antibody, the system can be performed for the test. At present, since the time limit for the study and no other more information to further study, we would like to conclude and send the final report.