การพัฒนาชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus*

Development of Lateral flow test strip for detecting *Cucumber mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สกัดและทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CMV เมื่อนำไปตรวจสอบกับตัวอย่างพืชที่เป็นโรค ได้ผลของปฏิกิริยาที่ดีเกิดสีชมพูเข้มบนแผ่น NCM และทำการเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold) ติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทองได้สารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง นำมาพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว ได้แผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ CMV ติดสลากอนุภาคทอง นำไปทดสอบกับเมมเบรน 7 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีและมีประสิทธิภาพในเมมเบรน AE 100 ซึ่งให้ปฏิกิริยาของเส้น test line และ control line ได้ชัดเจน และได้ทำการเปรียบเทียบใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 7 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช พบว่าสามารถใช้ extraction buffer TBS-T บดตัวอย่างพืชและนำไปทดสอบได้ดีเพราะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเส้น test line และ control line ซึ่งขณะนี้ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการปรับปริมาณของ gold และปริมาณในการ line เส้น Test line และ Control line ใหม่ เพื่อให้ได้แถบแบนหรือปฏิกิริยาที่ชัดเจนและคมชัดสมบูรณ์มากขึ้น

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-03-54

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยได้เปิดเขตการค้าเสรีกับหลายประเทศภายใต้หลักเกณฑ์ขององค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาตรการ SPS Agreement นี้ยึดหลักการทางวิทยาศาสตร์ และการประเมินความเสี่ยงเพื่อปกป้องสินค้าเกษตรจากศัตรูพืชที่ไม่เคยมีมาก่อน ประเทศไทยมีการนำเข้าพืชจำนวนมากจากทั่วโลกในแต่ละปี และปัจจุบันประเทศไทยได้มีข้อตกลงเปิดการค้าเสรีกับหลายประเทศ มีการวางข้อกำหนดด้านคุณภาพของสินค้า ความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมมาเป็นข้อกำหนดการนำเข้าสินค้า ดังนั้นแต่ละประเทศจำเป็นต้องมีข้อมูลด้านวิชาการที่ชัดเจนเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการเจรจาตกลงในเรื่องข้อกำหนดในแต่ละเรื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลด้านศัตรูพืชและการวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืช ที่จะถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นเรื่องการกีดกันทางการนำเข้าได้เป็นอย่างดี ในระยะเวลาที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งมากกว่าปีละ 8,000-12,000 ตัน จากหลายประเทศ ทั้งจากประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา สก๊อตแลนด์ เป็นต้น เนื่องจากประเทศไทยไม่สามารถผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้ปลูก แต่จากการนำเข้าหัวพันธุ์จากต่างประเทศมีปัญหาการติดเชื้อไวรัสเข้ามา ได้แก่เชื้อ PVS PVX PVY PLRV ฯลฯ ในภาวะปัจจุบันที่ประเทศไทยต้องสั่งหัวพันธุ์จากประเทศต่างๆ เข้ามาจำนวนมากทุกปี การเร่งรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสโดยเฉพาะ PVA,PVM,PVT,PVX,PVS และ PLRV ให้เป็นปัจจุบัน ว่าเชื้อไวรัสทั้ง 6 ชนิดนี้ยังคงมีปรากฏอยู่ในแหล่งปลูกของประเทศไทยหรือไม่ หากปรากฏว่าสำรวจไม่พบว่ามีอยู่ในประเทศไทยอีกเลย นับว่าเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ที่จะนำมาแจ้งประกาศใน IPPC ว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ได้มีอยู่ในประเทศไทยโดยถิ่นกำเนิด และปัจจุบันได้หายไปจากแหล่งปลูกมันฝรั่งของไทยแล้ว จากการที่ไทยมีข้อกำหนดให้มีการติดเชื้อไวรัสมากับหัวพันธุ์ได้ไม่เกิน 0.1% และฝ่ายวิชาการกักพืชมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวดจริงจังทำให้หัวพันธุ์ที่นำเข้ามามีคุณภาพดี ปลอดโรคไวรัสมากขึ้น ดังนั้นการสำรวจให้ได้ข้อมูลของเชื้อทั้ง 6 ชนิดนี้จะเป็นประโยชน์ในการจัดทำเพื่อใช้เป็นข้อมูล ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืช (Pest list) และวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ไวรัสของมันฝรั่งและเป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดเพื่อการผลิตหัวพันธุ์ปลอดเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงมีส่วนสำคัญมากเพื่อเป็นการป้องกันการนำเข้าเชื้อไวรัสจากต่างประเทศเข้ามาภายในประเทศไทย จึงควรเร่งรวบรวมและหาข้อมูลของเชื้อไวรัสดังกล่าวว่าพบหรือไม่พบภายในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
- spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้าน GLIFT
- เครื่องมือใช้ในการ spray IgG, IgG-conjugate ควบคุมปริมาณได้
- เมมเบรน 7 ชนิด

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของ CMV

การสกัด IgG ของ CMV ดำเนินการโดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:9 (แอนติซีรัมต่อน้ำกลั่น) ผสมให้เข้ากันค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวลงไปจำนวนเท่ากับปริมาณสารละลายแอนติซีรัมที่เจือจาง กวนเบาๆขณะเติม บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ ห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge) ละลายตะกอนที่ได้ด้วยครึ่งเท่าของ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ในครึ่งเท่าของ PBS 1 ลิตร ดำเนินการ3 ครั้ง แต่ละครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280 (สุรภีและคณะ, 2532(1); สุรภีและคณะ, 2532(2))

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CMV

ทดสอบคุณภาพของ IgG โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ใช้ Nitro cellulose membrane รองรับปฏิกิริยา (NCM-ELISA) โดยเจือจาง IgG ของเชื้อแต่ละชนิดในอัตรา 1:500 ดำเนินการทดสอบโดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. บดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคจากเชื้อ CMV ให้ละเอียดในถุงพลาสติก ด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืชต่อบัฟเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบพืชปกติเช่นเดียวกัน
2. นำแผ่น NCM วางแช่ลงใน Tris buffer saline pH 7.5 เป็นเวลา 5 นาที คีบแผ่น NCM ขึ้นวางลงบนกระดาษกรองอีกชุดที่แห้ง รีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง

3. หยดบัฟเฟอร์ 1 หยด (หรือ 25 ไมโครลิตร) ในช่องแรก หยดน้ำคั้นพืชปกติ 2 ช่อง และน้ำคั้นพืชเป็นโรค 2 ช่อง หยดตัวอย่าง CMV
4. นำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้ว แช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (TBS 20 มิลลิลิตร + 0.4 กรัม non fat milk+0.8 มิลลิลิตร triton X-100) แช่เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. คีบแผ่น NCM ตัวอย่าง CMV แช่ลงในส่วนผสม IgG ของ CMV ตามลำดับ IgG เจือจาง 1:500 ใน buffer TBS+2% non fat milk 5 มิลลิลิตร แช่เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
6. ล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 20 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
7. นำแผ่น NCM แช่ลงใน Goat anti-rabbit IgG-conjugate alkaline phosphatase (SIGMA A-7778) ใน TBS+2% non fat milk 5 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที
8. เทออกแล้วล้างเช่นเดียวกับ ข้อ 7
9. เทส่วนผสมของสารละลาย substrate ลงใน NCM เขย่าเบาๆ รอดูผลประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสีชมพูแล้วเทสารละลาย substrate ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง เตรียมจากสารประกอบ $HAuCl_4$ เพื่อให้ได้อนุภาคทอง ที่บริสุทธิ์และมีขนาด 40 นาโนเมตร โดยนำสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของ gold chloride ที่ต้มเดือดแล้วมาเติม sodium citrate ทำให้เย็นลง นำไปวัดค่า OD ที่ 530 ปรับให้ได้เท่ากับ 0.5 (Hampton *et al.*, 1990) นำสารละลายทองแขวนลอยไปใช้ในการติดสลาก (conjugate หรือ labeling) IgG ของ CMV ต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทอง

นำ IgG ของ CMV จำนวน 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอยที่เตรียมไว้จำนวน 200 มิลลิลิตร กวนเบาๆด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 200 ไมโครลิตร กวนเบาๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน IgG ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled IgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 นำไปพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) แยกกันในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line

ในการวิจัยการผลิตชุด GLIFT kit ของ CMV ได้ทดลองใช้เมมเบรน 7 ชนิดคือ

1. เมมเบรน S&S AE 100
2. เมมเบรน S&S AE 99
3. เมมเบรน S&S AE 98 Fast
4. เมมเบรน Unisart CN 95
5. เมมเบรน Unisart CN 140
6. เมมเบรน Millipore HF 13504
7. เมมเบรน Prisma 60

ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ CMV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และ 1.5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 3 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร เส้นทั้ง 3 เส้นถูกพ่นพร้อม กันและจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบว่าการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบมีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง)

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้ buffer 7 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างพืชในการตรวจสอบโรคไวรัสของพืช

1. PBS
2. PBS-T
3. TBS
4. TBS-T
5. Ext-Agdia
6. Ext-ELISA
7. Ext-Buffer

ขั้นตอนที่ 7 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CMV

การทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ GLIFT kit ในการตรวจสอบเชื้อ CMV ในอัตราความเข้มข้นต่างๆ ด้วยการเจือจางน้ำคั้นพืชเป็นโรค ในอัตรา 1:10 1:100 1:200 1:500 1:1,000 และ 1:2,000 แล้วหยดทดสอบเท่าๆ กัน อ่านผลหลังหยดตัวอย่างแล้วประมาณ 5 นาที

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2556

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของ CMV และ
ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CMV

ผลในขั้นตอนที่ 1 และ 2 การสกัดและทดสอบคุณภาพของ IgG ของ CMV ได้ IgG ของ CMV วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ OD^{280} เท่ากับ 11.2 ปรับค่า IgG ของ CMV ให้ได้เท่ากับ 1.4 ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำ IgG ของ CMV ที่ปรับ OD^{280} เท่ากับ 1.4 ไปตรวจสอบกับตัวอย่างพืชที่เป็นโรคได้ผลของปฏิกิริยาที่ดีเกิดสีชมพูเข้มบนแผ่น NCM สามารถนำไปใช้ผลิตชุดตรวจสอบได้

ขั้นตอนที่ 3 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold) และ
ขั้นตอนที่ 4 การติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทอง

ผลในขั้นตอนที่ 3 และ 4 การเตรียมสารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง (colloidal gold) และการติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทองได้สารละลายแขวนลอยอนุภาคทอง จากนั้นปรับให้ได้ค่า OD 540 เท่ากับ 0.5 เมื่อกวนสารละลายทองแขวนลอยที่มีอนุภาคขนาด 40 นาโนเมตร ผสมกับ IgG ของ CMV ซึ่งเป็นการติดสลากอนุภาคทองกับ IgG นำมาพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว แล้วอบแห้งที่ 37 $^{\circ}$C นาน 2 ชั่วโมง จึงได้แผ่นใยแก้วเคลือบ IgG ของ CMV ติดสลากอนุภาคทองที่แห้งพร้อมนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ

ขั้นตอนที่ 5 การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line

ผลในขั้นตอนที่ 5 ทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ CMV บนเส้น test line จากการทดสอบเมมเบรนทั้ง 7 ชนิด ในการตรวจสอบ CMV พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีและมีประสิทธิภาพในเมมเบรน AE 100 และ CN 140 แต่เมมเบรน AE 100 ให้ปฏิกิริยาของ test line ได้ดีและชัดเจนกว่า แต่ต้องทำการปรับปริมาณของ gold ที่เหมาะสมและปริมาณในการ line ใหม่ ทั้งเส้น Test line และ Control line เพื่อให้ได้แถบแบนหรือปฏิกิริยาที่ชัดเจนและคมชัดมากขึ้น เพื่อที่จะให้ชุดตรวจไวรัสสามารถตรวจเชื้อ CMV ได้ดีอย่างสมบูรณ์

ขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ผลในขั้นตอนที่ 6 การเปรียบเทียบใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 7 ชนิด ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช พบว่าการใช้ extraction buffer ของ TBS-T ในการเตรียมตัวอย่างพืชได้ดีเพราะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับเส้น test line และแถบเส้น control line มีความคมชัดและอ่านผลได้ชัดเจน

ขั้นตอนที่ 7 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CMV

ผลในขั้นตอนที่ 7 ทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อ CMV ของชุดตรวจนั้น ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินงาน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการทดลองผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Cucumber mosaic virus* โดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา (Serology) ร่วมกับการต่อเชื่อมแอนติซีรัมหรือ IgG ของไวรัส กับอนุภาคของ Colloidal Gold ซึ่งสามารถแสดงผลของปฏิกิริยาให้เห็นได้ชัดเจนเป็นสีแดงส้มนั้น โดยนำ Colloidal Gold มา conjugate กับ IgG เมื่อถูกละลายออกไปจะไปทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาจับอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นตัวอย่างพืชเป็นโรคแล้วไหลผ่านไปบนแผ่นเมมเบรนชนิด AE 100 และไหลไปพบกับแถบ IgG ของไวรัส ที่ line ไว้ด้านบนของแผ่นเมมเบรน โดยห่างจากปลายด้านล่างของแผ่นเมมเบรนประมาณ 3.5 cm นั้น IgG จึงทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสที่ถูกพาขึ้นมากับ Gold labeling IgG (Gold labeling IgG)+(Virus)+(IgG) ที่จับติดบนแผ่นเมมเบรน ตรงแนวของแถบ IgG ที่ line ไว้ เมื่อเกิดปฏิกิริยามาจับกันมากๆขึ้น จึงมองเห็นเป็นแถบเส้นตรงของปฏิกิริยาสีแดงส้มของอนุภาคทอง การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส CMV นั้นในขั้นตอนการติดสลาก IgG ของ CMV ด้วยอนุภาคทอง ต้องทำการปรับปริมาณของ gold ที่เหมาะสมและปริมาณในการ line ใหม่ ทั้งเส้น Test line และ Control line เพื่อให้ได้แถบแบนหรือปฏิกิริยาที่ชัดเจนและคมชัดมากขึ้น เพื่อที่จะให้ชุดตรวจไวรัสสามารถตรวจเชื้อ CMV ได้ดีอย่างสมบูรณ์ ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ “ กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.

Anonymous. 2004. Cucumber Mosaic Virus. 2 p. Available at : www.avrdc.org/pdf/pepper/CMV.pdf

Berke, T.G., L.L. Black, R.A. Morris, N.S. Talekar and J.F. Wang. 2003. Suggested Cultural Practices for Sweet Pepper. 5 p. Available at: http://www.avrdc.org.tw/LC/pepper/swtpepper.pdf

Kim, S. and Je-Kyun Park. 2004. Development of a Test Strip Reader for Lateral Flow Membrane-based Immunochromatographic Assay. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9: 127-131.

Ninlawan Pichayayothin. 2001. Pacific Biotech Co. Ltd. (Thailand). Website www. Pacific-biotech.com