

บทที่ 4

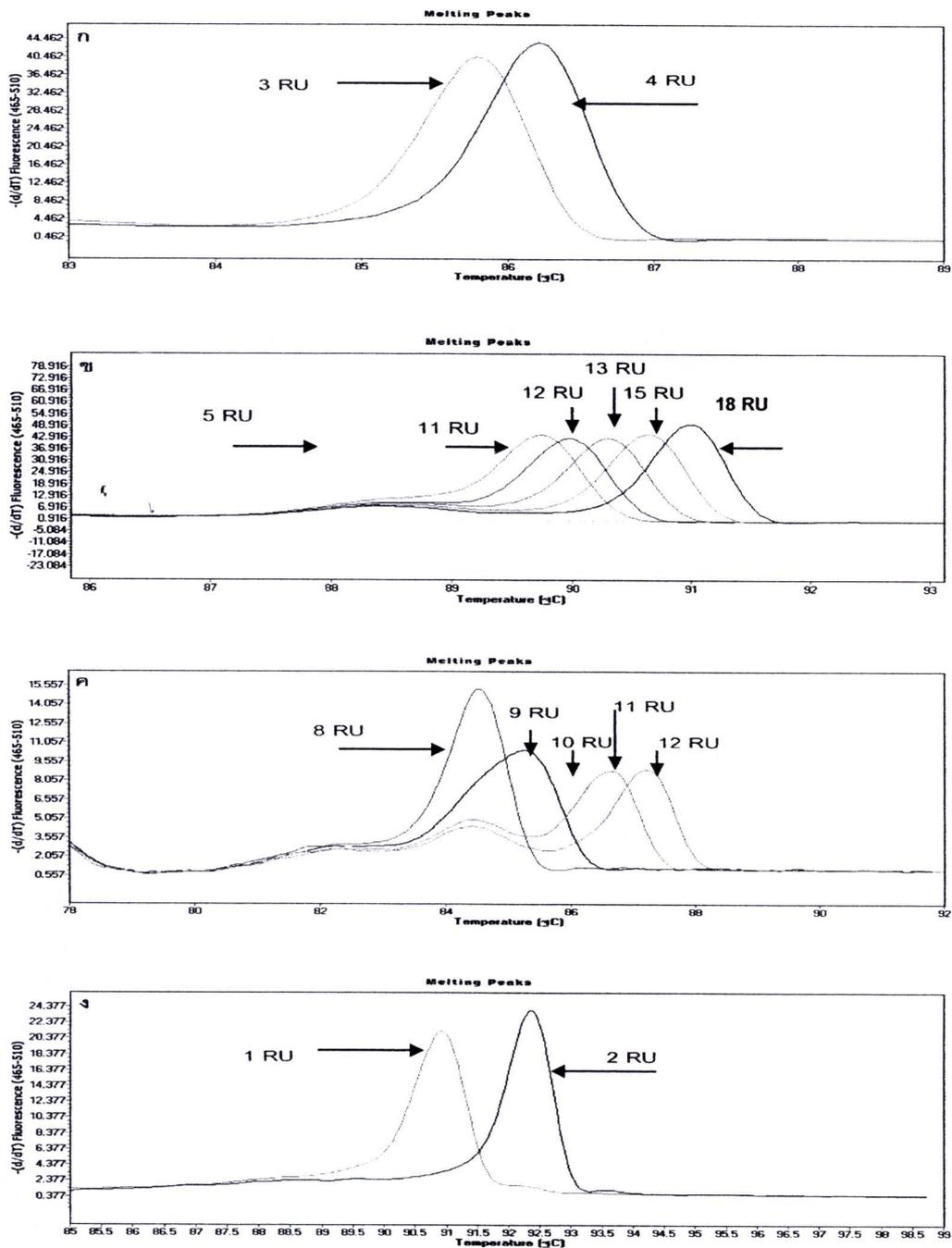
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย

จากการทดสอบ S. Typhimurium และ S. Enteritidis ซึ่งมีข้อมูล repeat units ที่ต่างกันดังตาราง 4-1 โดยวิเคราะห์ความแตกต่างในบริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าในการทดสอบเชื้อ S. Typhimurium ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR 6 และ STTR3 มีความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นสอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ในทุกๆ อัลลีลดังแสดงในรูป 4-1

ตาราง 4-1 จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Typhimurium ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE

Isolates	Repeat units			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
ST1				1
ST10		12	9	2
ST14		15	11	
ST17			8	
ST23	4	13	10	
ST27			12	
ST42	3	5		
SAP3057		11		
SAP5447		18		



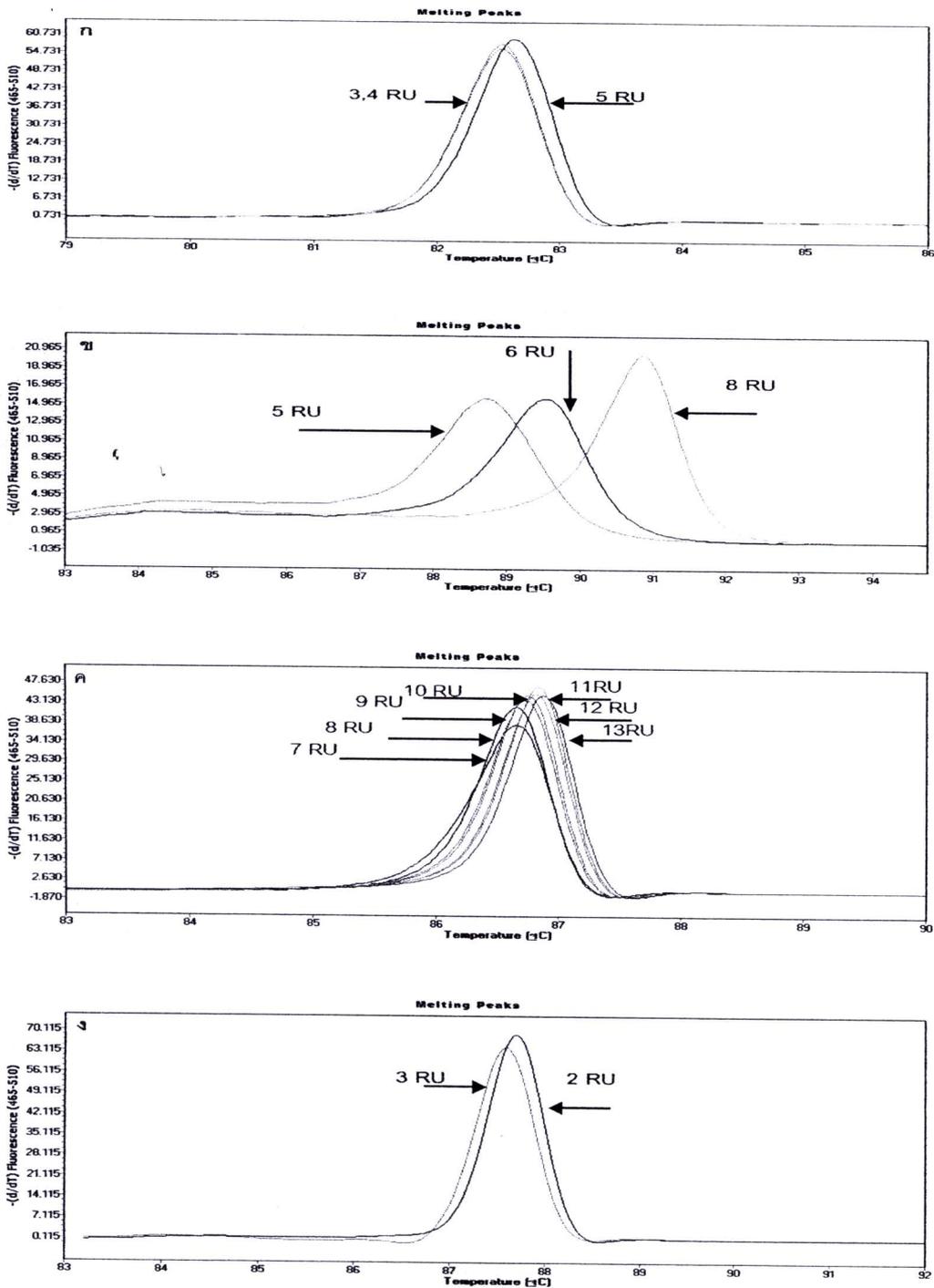
รูป 4-1 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Typhimurium* 9 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6 และ ง = locus STTR3

โดยตำแหน่ง STTR9 มีความแตกต่างกัน 2 อัลลีล (3, 4 repeat units) เกิด 2 melting profile ตำแหน่ง STTR5 มีความแตกต่างกัน 6 อัลลีล (5, 11,12,13,15, 18 repeat units) เกิด 6 melting profile ตำแหน่ง STTR6 มีความแตกต่างกัน 5 อัลลีล (8, 9, 10, 11, 12 repeat units) เกิด 5 melting profile และตำแหน่ง STTR3 มีความแตกต่าง 2 อัลลีล (1, 2 repeat units) เกิด 2 melting profile

การทดสอบเชื้อ *S. Enteritidis* ซึ่งมีข้อมูล repeat units ที่ต่างกันดังตาราง 4-2 โดยวิเคราะห์ความแตกต่างในบริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ SE1, SE2, SE5 และ SE9 พบว่ามีเพียงบริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE2 เท่านั้นที่มีความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นดังแสดงในรูป 4-2

ตาราง 4-2 จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ *S. Enteritidis* ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE

Isolates	Repeat units			
	SE1	SE2	SE5	SE9
SAP5262	3		10	
080900035 - 2	4		11	3
080900798 - 3		5	8	
081200075 - 2	5			2
SAP2137			7	
080900796 - 1			9	
080900025 - 1			12	
SAP6090			13	
MLSE64		8		
MLSE118		6		



รูป 4-2 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Enteritidis* 10 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน กำหนดให้ ก = locus SE1, ข = locus SE2, ค = locus SE3 และ ง = locus SE9

ความแตกต่างของ melting profile ในตำแหน่ง SE2 ที่เกิดขึ้นนั้นสอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ในทุกๆ อัลลีล โดยตำแหน่ง SE2 มีความแตกต่างกัน 3 อัลลีล (5, 6, 8 repeat units) เกิด 3 melting profile ในขณะที่ melting profile ที่ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 มีความแตกต่างของ melting profile น้อยมากไม่สอดคล้องกับความแตกต่างของ repeat units ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) และ Ciannaruconi et al. (2009) ที่ศึกษาการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของอัลลีลอย่างรวดเร็วใน *B. anthracis* และ *Y. pestis* ตามลำดับและพบว่าไม่มีเพียงบางตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้นที่ melting profile มีความแตกต่างกันในทุกอัลลีล

ดังนั้นการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile จึงมีความเป็นไปได้สูงในเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ให้ความแตกต่างของ melting profile ในทุกอัลลีลของทุกตำแหน่งเป้าหมาย ในขณะที่การจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในเชื้อ *S. Enteritidis* มีความเป็นไปได้เพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้นซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป ดังนั้นไอโซเลทของ *S. Typhimurium* ที่ถูกเลือกเป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความเป็นไปได้ทุก ไอโซเลท (ตาราง 4-1) จะถูกคัดเลือกเป็น internal control เพื่อการแปรผลค่า melting profile ไปเป็น repeat units ในการทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* 50 ไอโซเลทในการทดลองต่อไป สำหรับเชื้อ *S. Enteritidis* ในตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 จะถูกนำไปพัฒนาหาไพรเมอร์ใหม่เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ต่อไป

4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของ *S. Enteritidis*

จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.1 ซึ่งพบว่าไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ในตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ *S. Enteritidis* ด้วย melting profile ได้นั้น อาจเกิดจากปริมาณ GC ที่อยู่ในองค์ประกอบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เนื่องจากปริมาณ GC เป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tm utility (Bommarito et al., 2000) โดยปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการคำนวณดังแสดงในตาราง 4-3

ตาราง 4-3 การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์จากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ซึ่งคำนวณจากโปรแกรม Tm utility

Locus	Repeat units	Properties		
		%GC content	Length	Tm calculated
SE1	3	42.7	260	83.87
	4	42.7	267	83.91
	5	42.7	274	83.95
SE2	5	50.5	208	84.64
	6	51.2	215	87.26
	8	52.4	229	88.01
SE5	7	51.5	194	87.58
	8	51.5	200	87.64
	9	51.5	206	87.70
	10	51.4	212	87.76
	11	51.4	218	87.82
	12	51.3	224	87.87
SE9	13	51.3	230	87.92
	2	54.4	329	90.17
	3	54.1	338	90.10

จากการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นพบว่าตำแหน่ง SE2 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวที่สามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile ในอัลลีล 5, 6 และ 8 repeat units ด้วยเทคนิคHRM ได้นั้นมีปริมาณ GC เท่ากับ 50.5, 51.2 และ 52.4 ตามลำดับ ในขณะที่ตำแหน่ง SE1 ซึ่งมีอัลลีล 3, 4 และ 5 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 42.7 % เท่ากันทั้ง 3 อัลลีล ในตำแหน่ง SE5 ซึ่งมีอัลลีล 7 - 13 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 51.5 %, 51.4, 51.3 % ส่วนตำแหน่ง SE9 ซึ่งมีอัลลีล 2 และ 3 มีปริมาณ GC เท่ากับ

54.4 และ 54.1 % ตามลำดับ ถึงแม้ว่าค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการคำนวณจะมีความแตกต่างจากค่าการหลอมเหลวที่ได้จากการทดลองจริงแต่สามารถทำให้ทราบถึงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ GC ซึ่งเมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณพบว่า ถ้ามีปริมาณ GC ต่างกันมากขึ้น แนวโน้มความแตกต่างของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจะมีมากขึ้น ในขณะที่ถ้าปริมาณ GC เท่ากันหรือใกล้เคียงกันมากๆ ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีสจะแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับความแตกต่างของ melting peak ดังแสดงในภาพ 4-2 ซึ่งอุณหภูมิที่ต่างกันนั้นอาจเป็นผลมาจากจำนวนของ repeat units ที่เพิ่มเข้ามาทำให้นิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีจำนวนเพิ่มขึ้นจึงทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นนั้นมีค่าการหลอมเหลวสูงขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตามพบว่าที่ตำแหน่ง SE 9 เมื่อจำนวนของ repeat units เพิ่มขึ้นค่าการหลอมเหลวลดลงซึ่งเมื่อพิจารณาปริมาณ GC พบว่าเมื่อ repeat units เพิ่มขึ้น ปริมาณ GC จะลดลงส่งผลให้ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอลดลงด้วย

ดังนั้นจึงได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยออกแบบให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณเพื่อการวิเคราะห์บริเวณ VNTR มีขนาดชิ้นส่วนเล็กลง เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการจำแนกของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยการออกแบบไพรเมอร์ใช้ตำแหน่ง VNTR เดิมแต่เปลี่ยนตำแหน่งของไพรเมอร์ใหม่ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่แสดงในตาราง 4-4

ตาราง 4-4 คู่ไพรเมอร์ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ *S. Enteritidis* ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ที่ออกแบบใหม่

Locus	Primer	Primer sequence (5'-3')	Product size
SE1	Forward	ccaggcaactattcgctatca	96
	Reverse	caatggcaacgagaccatc	
SE5	Forward	cgggaaaccacccatcac	121
	Reverse	tgatagcgttttgacgttgc	
SE9	Forward	tactgtccaccagcgtttt	96
	Reverse	tgcataccaacgatcaccac	



หลังจากได้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้ไปหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากฐานข้อมูลของ Genbank แล้วนำมาทำนายปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Tm utility จากการตรวจสอบปริมาณ GC เบื้องต้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่พบว่าตำแหน่ง SE1 ซึ่งมีอัลลีล 3, 4 และ 5 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 44.4 และ 44.3 % ตามลำดับ ในตำแหน่ง SE5 ซึ่งมีอัลลีล 7 – 13 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 50.5 และ 50.4 % ส่วนตำแหน่ง SE9 ซึ่งมีอัลลีล 2 และ 3 repeat units มีปริมาณ GC เท่ากับ 52.9 และ 52.1 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอที่ได้จากการคำนวณพบว่า ถึงแม้ปริมาณ GC มีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน แต่ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของแต่ละอัลลีลมีแนวโน้มที่จะมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อนำไปทดสอบด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM melting profile ของแต่ละอัลลีลน่าจะมีการมีความแตกต่างกันด้วย

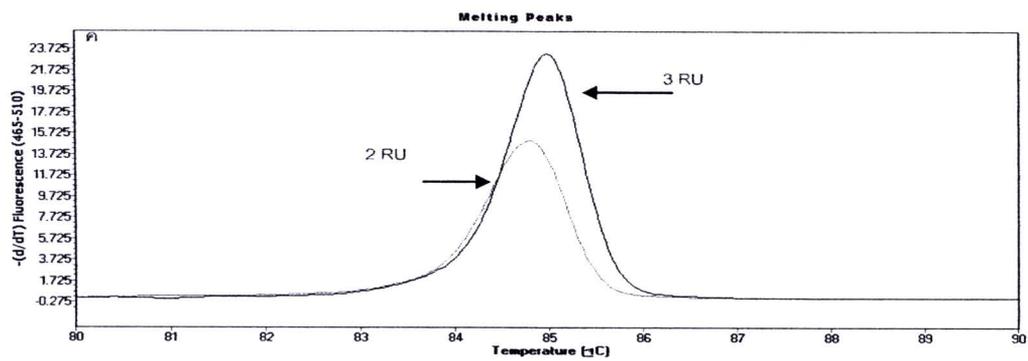
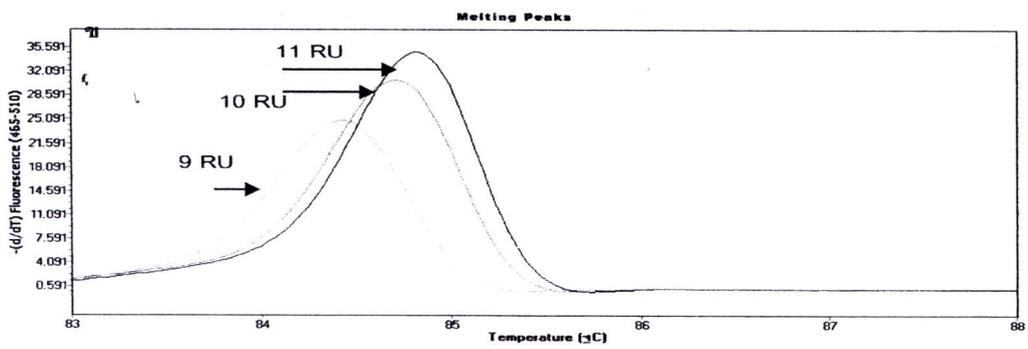
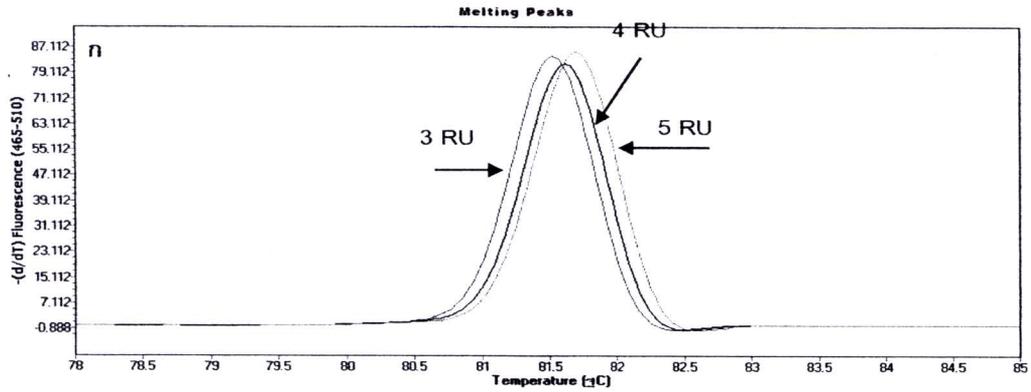
ตาราง 4-5 การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ โดยคำนวณจากโปรแกรม Tm utility

Locus	Repeat units	Properties		
		%GC content	Length	Tm calculated
SE1	3	44.4	135	82.42
	4	44.4	142	82.56
	5	44.3	149	82.70
SE5	7	50.5	103	84.54
	8	50.5	109	84.83
	9	50.4	115	85.09
	10	50.4	121	85.32
	11	50.4	127	85.53
	12	50.4	133	85.72
	13	50.4	119	85.89
SE9	2	52.9	87	85.40
	3	52.1	96	85.58

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ไปทดสอบวิเคราะห์ความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อเฉพาะบางอัลลีลที่แตกต่างกันมาเป็นตัวแทนดังแสดงในตาราง 4-6 พบว่าไพรเมอร์คู่ใหม่ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นลงยังคงไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ *S. Enteritidis* ได้ดังแสดงในรูป 4-3

ตาราง 4-6 ไอโซเลทของ *S. Enteritidis* และ อัลลีลที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่

Isolates	Repeat units		
	SE1	SE5	SE9
SAP5262	3	10	
080900035 - 2	4	11	3
081200075 - 2	5		2
080900796 - 1		9	



รูป 4-3 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Enteritidis* 4 ไอโซเลท ที่มี repeat units ต่างกันด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ กำหนดให้ ก = locus SE1, ข = locus SE5, ค = locus SE9

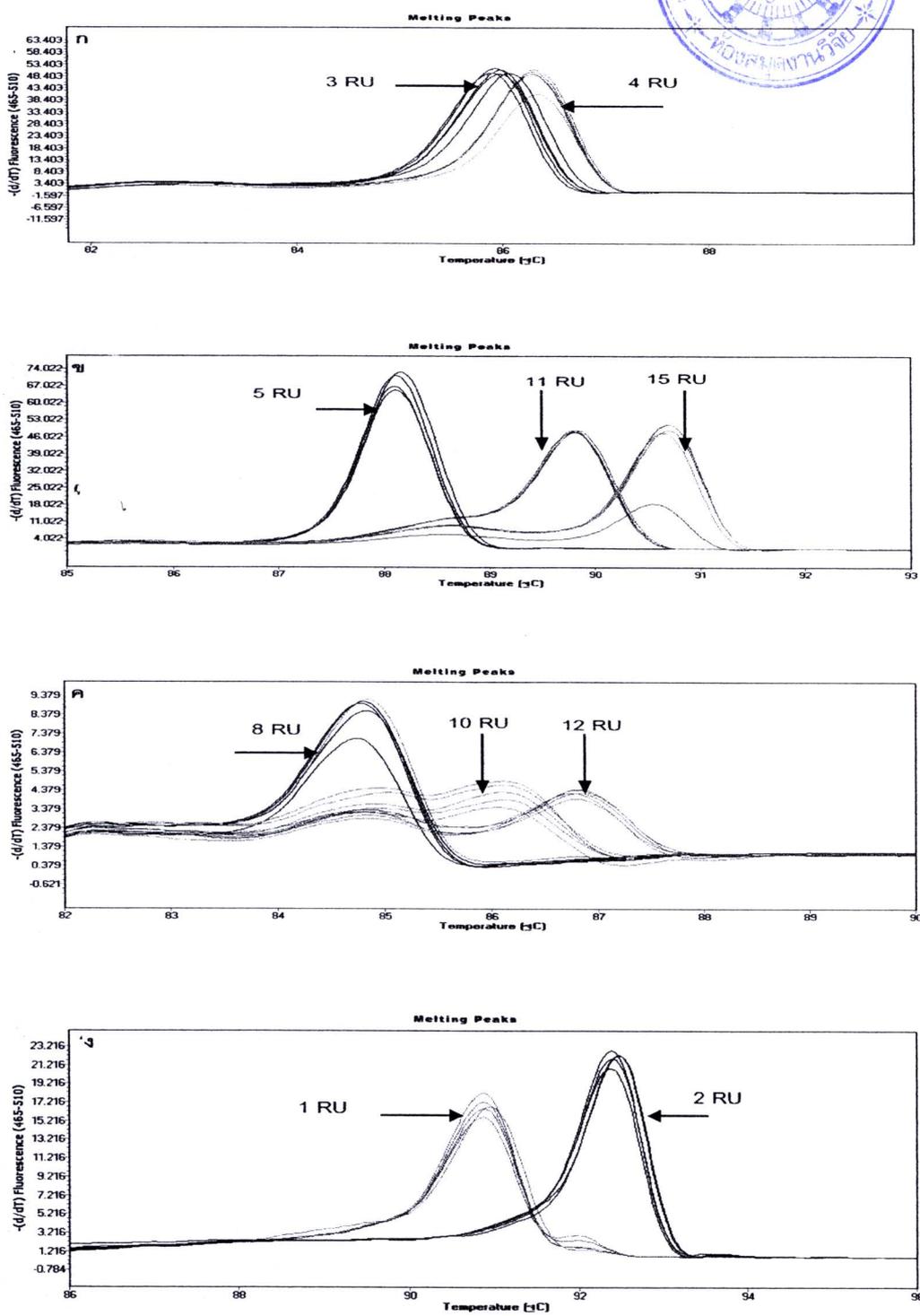
การที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ในเชื้อ *S. Enteritidis* ได้นั้นไม่สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Wittwer et al. (2003), Leiw et al. (2004) และ Seipp et al. (2009) ที่รายงานว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นได้ดีกว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่และให้ melting peak ที่แยกความแตกต่างได้ชัดเจนขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ยังให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสมพอหรือชิ้นส่วนบริเวณ VNTR ที่ถูกเพิ่มปริมาณนั้นมีปริมาณ GC ในองค์ประกอบใกล้เคียงกันมากทำให้อุณหภูมิที่ต้องใช้ในการแยกสายดีเอ็นเอมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณ GC ไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่ส่งผลกระทบต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอเนื่องจากเมื่อดูแนวโน้มของค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากการคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปพบว่าถึงแม้ปริมาณ GC จะมีค่าเท่ากันแต่ค่าการหลอมเหลวจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อจำนวนของ VNTR เพิ่มมากขึ้นซึ่งสนับสนุนข้อเท็จจริงที่ว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอนอกจากจะมีปริมาณ GC แล้วยังขึ้นอยู่กับความยาวของสายดีเอ็นเอหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนดีเอ็นเออีกด้วย นอกจากนี้อาจเกิดจากประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอต่างกันน้อยกว่า 0.4 องศาเซลเซียสได้ (Reed, Kent and Wittwer, 2007; Seipp et al., 2009)

4.3 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

S. Typhimurium ถูกทดสอบบริเวณ VNTR ในทุกตำแหน่งเป้าหมาย (STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3) คัดเลือกไอโซเลทจากอัลลีลต่างๆในตำแหน่งเป้าหมายทั้ง 4 ตำแหน่งตำแหน่งละ 2 อัลลีล ดังแสดงในตาราง 4-7 เพื่อเป็นตัวแทนอัลลีลอื่นๆ ประเมินความแม่นยำของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) ตัวอย่างละ 5 ซ้ำ พบว่ามีความแตกต่างของ melting profile ของแต่ละ repeat units ที่ใช้ในการทดสอบเกิดขึ้นดังแสดงในรูป 4-4

ตาราง 4-7 ไอโซเลทของ *S. Typhimurium* และ repeat units ซึ่งถูกนำมาทดสอบการประเมินความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกัน (repeatability)

Isolates	Repeat units			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
ST1				1
ST10				2
ST14		15		
ST17			8	
ST23	4		10	
ST27			12	
ST42	3	5		
SAP3057		11		

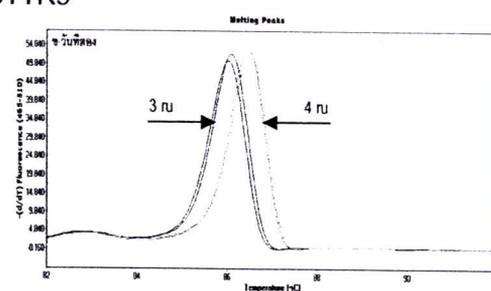
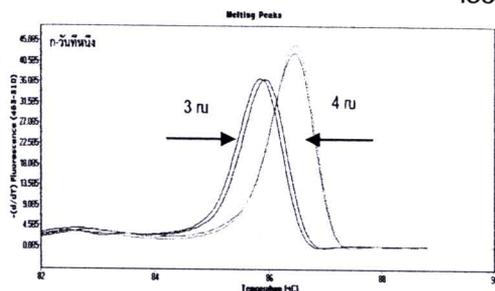


รูป 4-4 Derivative melting plot ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของ *S. Typhimurium* ในการทดสอบ repeatability
กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6 และ ง = locus STTR3

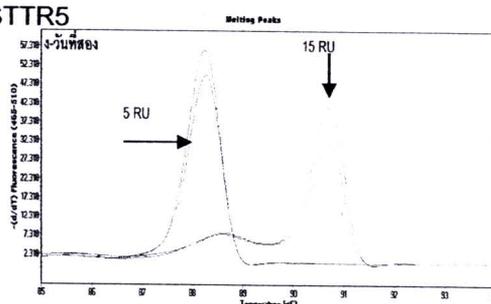
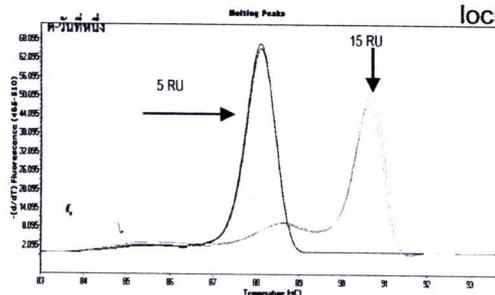
โดยในตำแหน่ง STTR9 ทดสอบ 2 อัลลีล (3, 4 repeat units) เกิด 2 melting profile ตำแหน่ง STTR5 ทดสอบ 3 อัลลีล (5, 11, 15 repeat units) เกิด 3 melting profile ตำแหน่ง STTR6 ทดสอบ 3 อัลลีล (8, 10, 12 repeat units) เกิด 3 melting profile และตำแหน่ง STTR3 ทดสอบ 2 อัลลีล (1, 2 repeat units) เกิด 2 melting profile โดยตัวอย่างทั้ง 5 ซ้ำของแต่ละอัลลีล ในตำแหน่งทั้ง 4 ตำแหน่ง มีรูปร่างของ melting peak ใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้อย่างถูกต้อง

ผลการทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) เมื่อพิจารณา melting profile ของวันที่ทำการทดลองวันที่หนึ่งเปรียบเทียบกับวันที่ทำการทดลองวันที่สอง พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของ melting profile ได้ถูกต้องสอดคล้องกับจำนวน repeat units ในทุกอัลลีลที่ถูกคัดเลือกมา โดยที่ตำแหน่ง STTR9 melting peak มีความแตกต่างกัน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี repeat units เท่ากับ 3 และ 4 ตามลำดับทั้งในวันที่หนึ่งและวันที่สอง และเมื่อพิจารณา melting peak ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างทั้งสามซ้ำในวันที่ทำการทดลองทั้งสองวัน พบว่ามีลักษณะรูปร่างของ melting peak ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูป 4-6 และผลการทดสอบในตำแหน่ง STTR5, STTR6 และ STTR3 เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลการทดสอบที่ตำแหน่ง STTR9

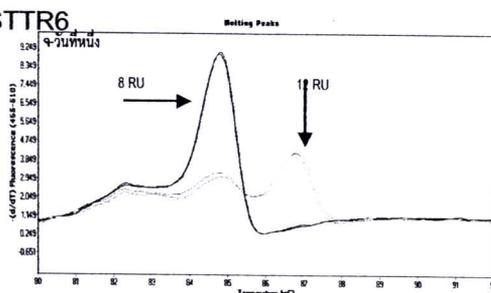
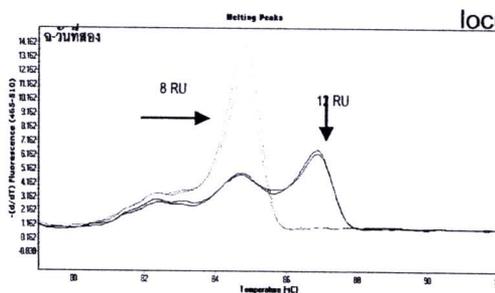
locus STTR9



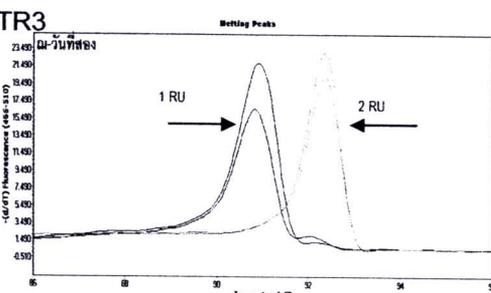
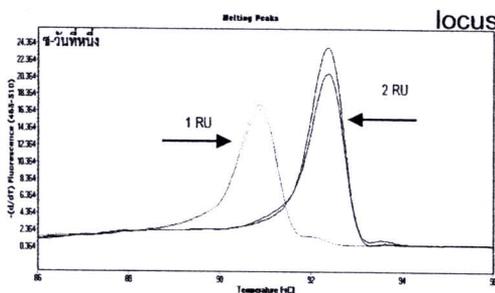
locus STTR5



locus STTR6



locus STTR3

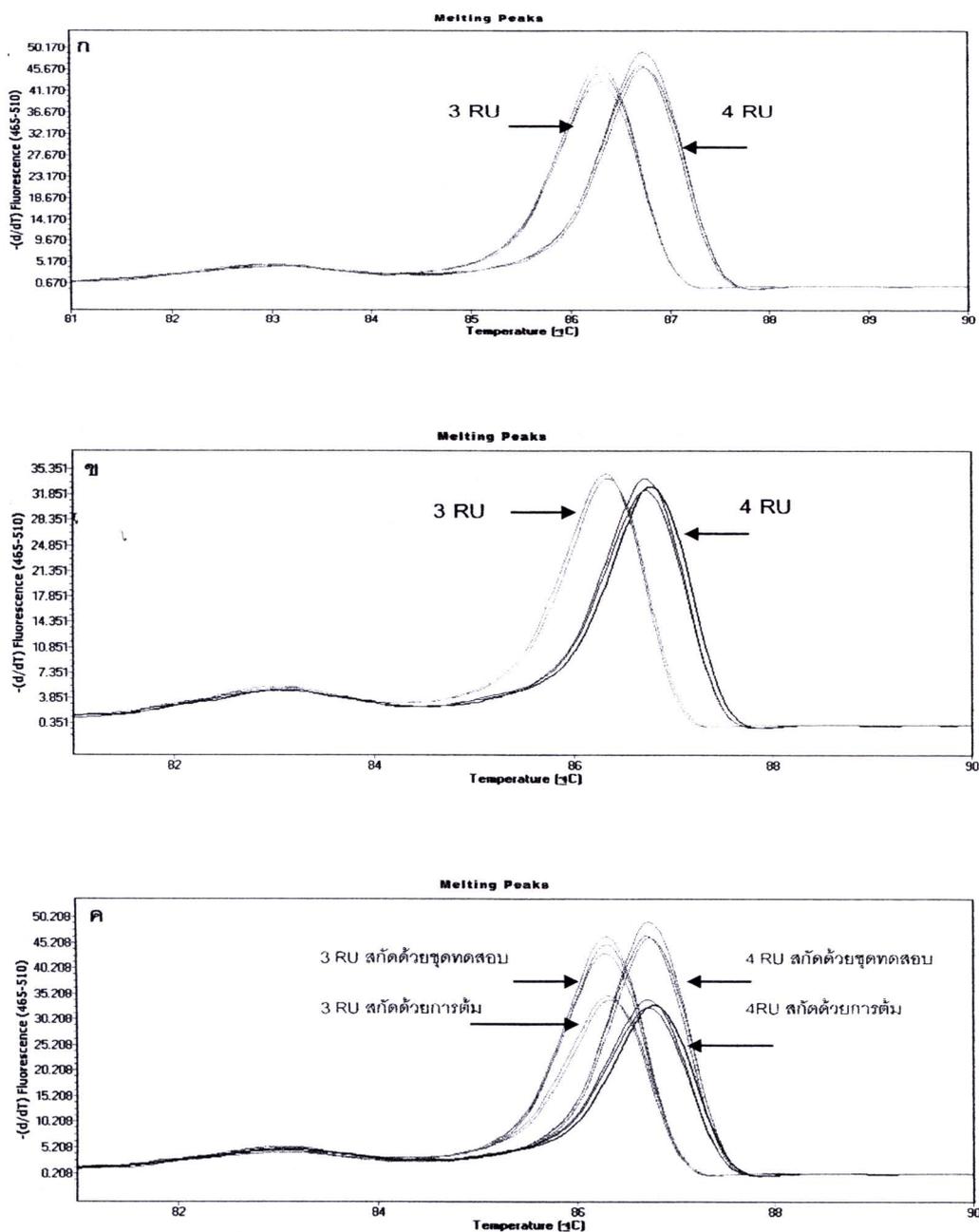


รูป 4-5 Derivative melting plot ของการทดสอบ reproducibility ของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ในเชื้อ *S. Typhimurium* กำหนดให้ ก, ข = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR9 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ ค, ง = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR5 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ จ, ฉ = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR6 และซ, ฉ = การทดสอบที่ตำแหน่ง STTR3 วันทดสอบวันที่หนึ่งและวันที่สองตามลำดับ

ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จึงมีความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำทั้งในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และการทดลองในวันที่ต่างกัน (reproducibility) สอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) และ Ciammaruconi et al. (2009) ที่พบว่าเทคนิค HRM วิเคราะห์ความแตกต่างของอัลลีลในตำแหน่งเป้าหมายของ *B. anthracis* และ *Y. pestis* ซ้ำได้ทั้งในสถานะการทดลองครั้งเดียวกันและการทดลองในวันที่ต่างกัน

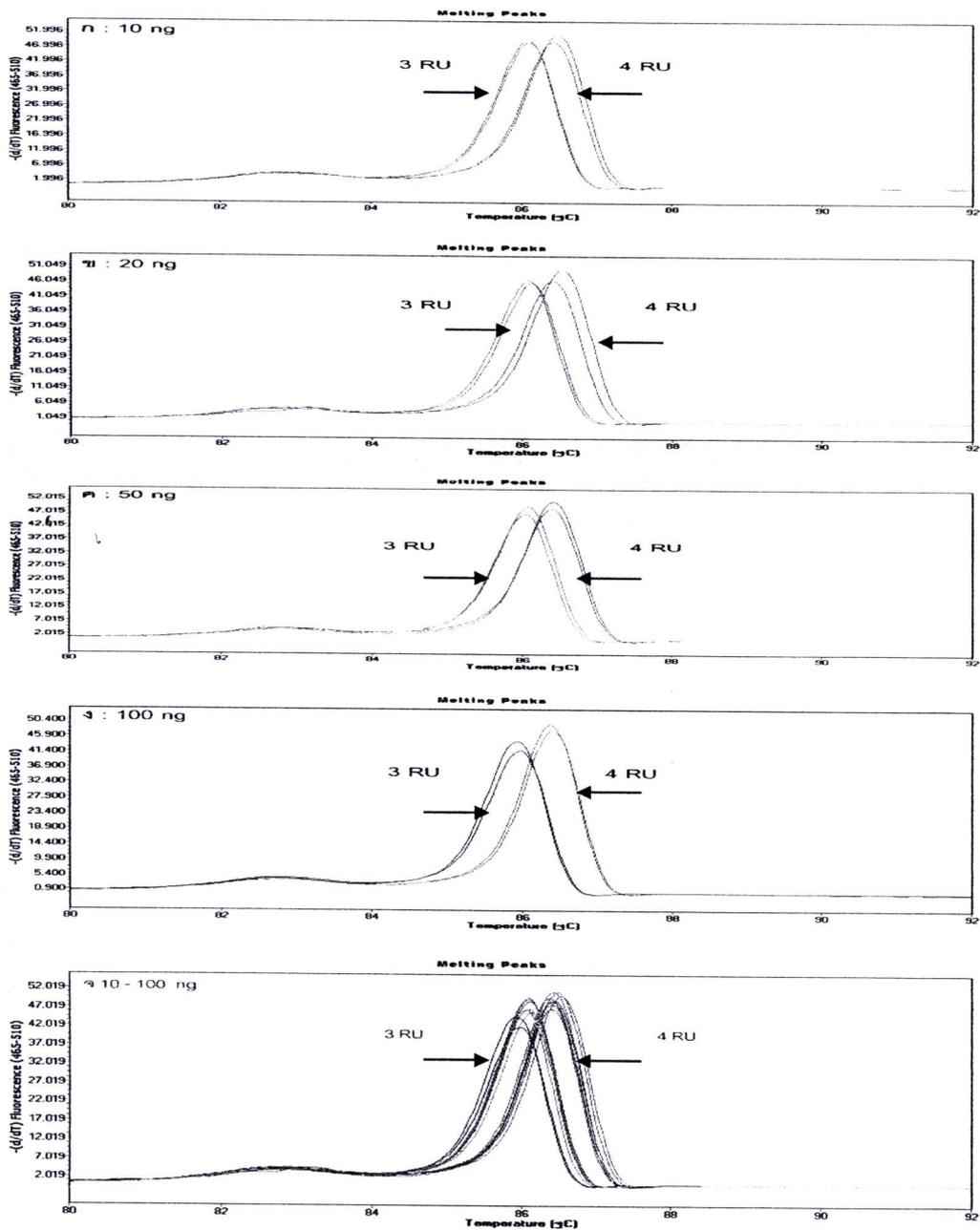
ผลการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (Robustness) โดยเลือกทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9 ซึ่งมี 2 อัลลีล ได้แก่ 3 และ 4 repeat units ตามลำดับ พบว่าการใช้ดีเอ็นเอซึ่งถูกสกัดด้วยชุดทดสอบและสกัดด้วยการต้มเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จะให้ผลของ melting peak ที่มีรูปร่างคล้ายคลึงกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันดังแสดงในรูป 4-6

เมื่อพิจารณาการแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 50 และ 100 นาโนกรัมพบว่าในการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในแต่ละระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ นั้นพบว่าเกิด melting profile ที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มสอดคล้องกับจำนวน repeat units 3 และ 4 repeat units อย่างถูกต้องในทุกระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอทุกระดับพร้อมกันพบว่า melting peak จะถูกจัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่มของอัลลีล 3 และ 4 repeat units แต่พบว่า melting peak ที่ระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมที่ 3 repeat units จะมีการเลื่อนออกจากกลุ่มไปเล็กน้อยแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อผลการแปรผลแต่อย่างใดดังแสดงในรูป 4-7



รูป 4-6 Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอซึ่งมาจากวิธีการสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้ม

กำหนดให้ ก : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยชุดทดสอบ, ข : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยการต้ม และ ค : melting peak ซึ่งเกิดจากการวิเคราะห์ VNTR ด้วยดีเอ็นเอสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้มร่วมกัน



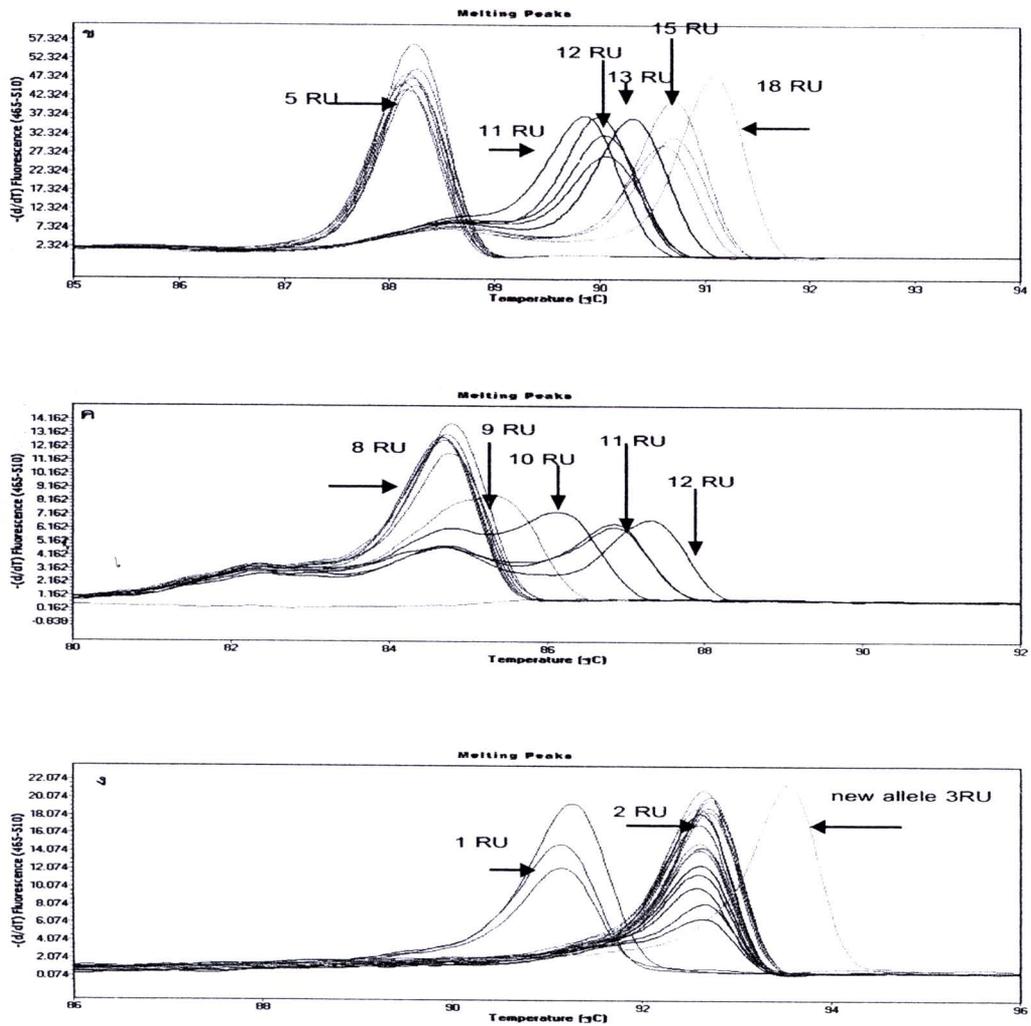
รูป 4-7 Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 -100 นาโนกรัม

กำหนดให้ ก : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 10 นาโนกรัม, ข : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 20 นาโนกรัม, ค : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 50 นาโนกรัม, ง : ความเข้มข้นดีเอ็นเอระดับ 100 นาโนกรัม และ จ : ความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ระดับ 10 - 100 นาโนกรัม

การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบและการต้มส่งผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอในด้านของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ทำให้สัญญาณสีฟลูออเรสเซนซ์ในขณะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งได้จากการต้มมีสัญญาณสีที่ต่ำกว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่งได้จากการสกัดด้วยชุดทดสอบ อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดทั้งสองวิธีไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ซ้ำด้วยเทคนิค HRM สอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al. (2007) ซึ่งพบว่า melting peak ที่เกิดจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM โดยใช้ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากชุดทดสอบและการสกัดด้วยวิธีการต้มสามารถวิเคราะห์ซ้ำได้ ในขณะที่ผลการทดสอบการแปรระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอพบว่าระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอในระดับ 10 – 50 นาโนกรัมเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการสำหรับการทดสอบการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fortini et al (2007) และ Ciannaruconi et al.(2009) ที่รายงานว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอในระดับที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ในเชื้อ *B. anthracis* และ *Y. pestis* ด้วยเทคนิค HRM อยู่ในช่วง 20 – 40 และ 3- 50 นาโนกรัมตามลำดับ

4.4 ผลการเปรียบเทียบผลของการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM

จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของอัลลีลใน VNTR ด้วย melting profile โดยแปรผล repeat units จาก melting peak ของตัวอย่างที่ตรงกับ melting peak ของ internal control ดังแสดงในรูป 4-8 จากนั้นนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE พบว่าไม่มีความแตกต่างของการจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ดังแสดงในตาราง 4-8



รูป 4-8 Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 50 ไอโซเลท

กำหนดให้ ก = locus STTR9, ข = locus STTR5, ค = locus STTR6, ง = locus STTR3

ตาราง 4-8 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ของ

S. Typhimurium

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE					Allelic variants analyzed by MLVA with HRM					
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 01	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 02	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 03	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 04	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 05	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 06	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 07	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 08	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 09	3	5	0	1	3	5	0	1	5	0	1
STTR 10	3	12	9	2	3	12	9	2	12	9	2
STTR 11	3	13	8	2	3	13	8	2	13	8	2
STTR 14	4	15	11	2	4	15	11	2	15	11	2

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 15	4	13	10	2	4	13	10	2
STTR 16	4	15	11	2	4	15	11	2
STTR 17	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 18	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 23	4	13	10	2	4	13	10	2
STTR 24	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 25	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 26	4	15	12	2	4	15	12	2
STTR 27	4	15	12	2	4	15	12	2
STTR 29	3	13	8	2	3	13	8	2
STTR 31	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 32	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 33	3	12	8	2	3	12	8	2
STTR 35	3	12	8	2	3	12	8	2

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants-analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
STTR 37	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 38	3	5	0	1	3	5	0	1
STTR 42	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 21194/08	3	12	9	2	3	12	9	2
SAP 00433/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00444/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00445/09	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP 00564/09	4	15	12	2	4	15	12	2
SAP 01571/09	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP 03057/09	3	11	8	2	3	11	8	2
SAP4202	3	5	0	1	3	5	0	1
SAP4282	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP4570	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP4572	3	12	8	2	3	12	8	2
SAP5447	3	18	8	1	3	18	8	1

Isolates	Allelic variants analyzed by MLVA with CE				Allelic variants analyzed by MLVA with HRM			
	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3	STTR9	STTR5	STTR6	STTR3
SAP6077	3	11	8	2	3	11	8	2
SAP9184/09	3	12	8	2	3	12	8	2
MLST12	4	13	10	2	4	13	10	2
MLST13	4	13	10	2	4	13	10	2
MLST23	3	13	8	2	3	13	8	2
MLST24	3	13	8	2	3	13	8	2
MLST33	4	13	10	2	4	13	10	2
ATCC13311	3	18	8	1	3	18	8	1
DMST17242	3	15	10	3	3	15	10	3