สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การจำแนกความแตกต่างของ *S.* Typhimurium และ Enteritidis ในระดับซับซีโรวาร์ ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลภายหลังจากการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ *Salmonella* ในระดับซีโรวาร์ยังคงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายเพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาและนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหาร (Foley et al, 2009; Wiedmann and Nightingale, 2009) ดังนั้นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเออย่างเทคนิค HRM จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค MLVA เพื่อจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Enteritidis ด้วย melting profile

เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ใน *S.* Typhimurium โดยสามารถจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ได้ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย ได้แก่ STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 โดยให้ melting profile ต่างกันในทุกอัลลีล แต่สำหรับเชื้อ *S.* Enteritidis พบความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นเพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมายเท่านั้น ได้แก่ตำแหน่ง SE2 ส่วนอีก 3 ตำแหน่งเป้าหมายที่เหลือ ได้แก่ SE1, SE5 และSE9 ไม่พบความแตกต่างของ melting profile หรือความแตกต่างของ melting profile ไม่เกิดขึ้นในทุกๆอัลลีล เมื่อพัฒนาเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ในการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน 3 ตำแหน่งเป้าหมาย ได้แก่ SE1, SE5 และ SE9 ใน *S.* Enteritidis โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นลงพบว่าเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ได้

การประเมินความแม่นยำ (precision) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยพิจารณาจากการวิเคราะห์ซ้ำในการทดลองครั้งเดียวกัน (repeatability) และการวิเคราะห์ซ้ำในวันที่ต่างกัน (reproducibility) ดำเนินการทดสอบกับเชื้อ S. Typhimurium เท่านั้นเนื่องจากการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในเชื้อ *S.* Enteritidis ทำได้เพียง 1 ตำแหน่งซึ่งไม่เพียงพอต่อการนำไปทดลองต่อ โดยพบว่าเทคนิค HRM สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน *S.* Typhimurium ซ้ำได้ทุกอัลลีลทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมายและการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA

ร่วมกับเทคนิค HRM พบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบและการต้ม และความเข้มข้นของดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ซ้ำของเทคนิค HRM

การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM โดยวิเคราะห์บริเวณ VNTR ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของเชื้อ *S.* Typhimurium จำนวน 50 ไอโซเลท พบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างของ VNTR ด้วย melting profile ได้ทั้ง 50 ไอโซเลทที่ใช้ทดสอบ การแปรผล repeat units จาก melting peak ของตัวอย่างที่ตรงกับ melting peak ของ internal control ให้ผลของ repeat units ตรงกับผลของ repeat units ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE ทั้ง 50 ตัวอย่าง

ดังนั้นการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM มาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในตำแหน่งเป้าหมายจึงมีความเป็นไปได้สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อ *S.* Typhimurium ที่การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างได้ในทุกอัลลีลและทุกตำแหน่งเป้าหมาย แต่สำหรับ *S.* Enteritidis จำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิค HRM ในแนวทางอื่นนอกเหนือจากการปรับปรุงให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย SE1, SE5 และ SE9 ต่อไป โดยอาจปรับปรุงเทคนิคด้วยการใช้วิธี GC clamp ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณนิวคลีโอไทด์ GC จำนวนมากเข้าไปที่บริเวณไพรเมอร์เพื่อให้ค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันมากขึ้นหรือทำให้รูปแบบของ melting domain เปลี่ยนแปลงไป หรือหาบริเวณ VNTR ตำแหน่งเป้าหมายใหม่ที่สามารถใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR จาก melting profile ได้ เนื่องจากการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ได้เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาหรือการจัดการด้านความปลอดภัยของอาหาร

ถึงแม้ว่าการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เช่น เทคนิค MLVA ไปจำแนกความแตกต่างของ *Salmonella* ในระดับซับซีโรวาร์ในทางปฏิบัติเพื่อแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของ *Salmonella* หรือการศึกษาทางระบาดวิทยาในโรงงานอุตสาหกรรมจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้น เนื่องจากเครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาสูงและต้องวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามการจำแนก *Salmonella* ลงไปในระดับซับซีโรวาร์นั้นจะทำให้สามารถจัดการแหล่งกำเนิดของการปนเปื้อน *Salmonella* ได้ถูกจุดและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การมีฐานข้อมูลใน

ระดับซับซีโรวาร์ของ *Salmonella* อาจเป็นแหล่งข้อมูลสำคัญในการตอบข้อโต้แย้งกับคู่ค้าเมื่อเกิดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในสินค้าได้