

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247902

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
โดยใช้ Enteritide โดย High Resolution Melting Analysis

นางสาวพนัสนันท์ สิมมัญญ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

600252489

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



247902

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
และ Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis



นางสาวพนัสนันท์ ศิลมัฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 0 7 2 6 5 2 4 2 3

DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS

Miss Panusanun Silamat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์

Salmonella enterica serovar Typhimurium และ
Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis

โดย

นางสาวพนัสนันท์ ศิลมัฐ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

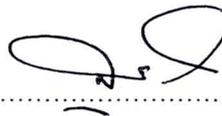
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร.มงคล เวสารัชเวศย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท



คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ นารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



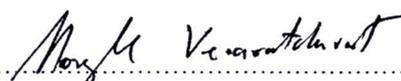
ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)



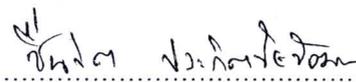
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กীরติพิบูล)



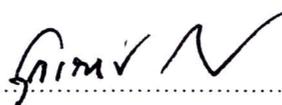
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.มงคล เวสารัชเวศย์)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)



กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

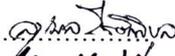
(นายสัตวแพทย์ รุจเวทย์ ทหารแก้ว)

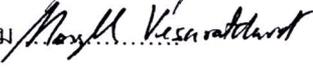
พนัสนันท์ ศิลมัฐ : การพัฒนาเทคนิคระดับโมเลกุลเพื่อการระบุสายพันธุ์ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium และ Enteritidis โดย High Resolution Melting Analysis. (DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. สุวิมล กิริติพิบูล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.มงคล เวสรัสซเวศย์, 96 หน้า.

247902

High resolution melting analysis (HRM) เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยอาศัยความแตกต่างของ melting profile บริเวณ variable number of tandem repeats (VNTR) ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค HRM มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Multiple locus variable number tandem repeat (MLVA) แทนเทคนิค capillary electrophoresis (CE) เพื่อจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR จากความแตกต่างของ melting profile โดยจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ใน *S. Typhimurium* ได้ทั้ง 4 ตำแหน่งเป้าหมาย (STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3) โดยให้ melting profile ต่างกันในทุกอัลลีล แต่ในเชื้อ *S. Enteritidis* พบความแตกต่างของ melting profile เกิดขึ้นเพียง 1 ตำแหน่งเป้าหมาย (SE2) จาก 4 ตำแหน่งเป้าหมาย (SE1, SE2, SE5 และ SE9) ในการพัฒนาเทคนิค HRM ในตำแหน่งเป้าหมาย SE1, SE5 และ SE9 ใน *S. Enteritidis* โดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลงพบว่าเทคนิค HRM ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ melting profile บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมายได้ สำหรับการประเมินความแม่นยำพบว่าการวิเคราะห์ *S. Typhimurium* ด้วยเทคนิค HRM สามารถวิเคราะห์ซ้ำได้ในทุกอัลลีลของ ตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 และการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอและระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค HRM เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และ เทคนิค HRM จำนวนเชื้อละ 50 ไอโซเลท พบว่าเทคนิค HRM สามารถจำแนกความแตกต่างบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ใน *S. Typhimurium* ให้ผลของ repeat units ตรงกับการจำแนกความแตกต่างด้วยเทคนิค CE ทั้ง 50 ไอโซเลท ดังนั้นการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM มาวิเคราะห์ความแตกต่างของบริเวณ VNTR ด้วย melting profile ในตำแหน่งเป้าหมายจึงมีความเป็นไปได้สูงโดยเฉพาะในเชื้อ *S. Typhimurium* แต่สำหรับ *S. Enteritidis* จำเป็นต้องมีการพัฒนาปรับปรุงเทคนิค HRM ต่อไป

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อนิสิต..... 

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... 

ปีการศึกษา 2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... 

5072652423 : MAJOR Food Technology

KEYWORDS: High resolution melting analysis / VNTR / *Salmonella* Typhimurium / *Salmonella* Enteritidis

PANUSANUN SILAMAT: DEVELOPMENT OF MOLECULAR TECHNIQUE FOR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AND Enteritidis STRAINS IDENTIFICATION BY HIGH RESOLUTION MELTING ANALYSIS. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, THESIS COADVISOR: MONGKOL VESARATCHAVEST, Ph.D., 96 pp.

247902

High resolution melting analysis (HRM) is a molecular technique that has been applied to bacterial strain identification. This technique is based on differentiation of melting profile of number of nucleotide in variable number of tandem repeats (VNTR) which are specific for each strain. In the present, the analysis of the size of VNTR was based on capillary electrophoresis (CE) technique. However, this CE technique is relatively expensive and laborious. Therefore, the aim of this study was to develop HRM technique for differentiation of the size of VNTR by using a melting profile property of different VNTR size. The feasibility of HRM method was demonstrated in testing of different allele variants for 4 of 4 selected loci in *S. Typhimurium* and only single locus of 4 selected loci in *S. Enteritidis*. For *S. Typhimurium*, this method produced repeatable, reproducible and robust results for 4 loci and the distinguishable melting profile results were consistent with CE results obtained for the same alleles. Therefore, HRM, a rapid accurate and inexpensive technique can be used to discriminate VNTR variants in *S. Typhimurium* but required some development for *S. Enteritidis*.

Department : Food Technology..... Student's signature.....
Field of study : Food Technology..... Advisor's signature.....
Academic year : 2010..... Co-advisor's signature.....

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สกุล (genus) <i>Salmonella</i>	3
2.1.1 จุลชีววิทยาของ <i>Salmonella</i>	3
2.1.2 อนุกรมวิธานและระบบการเรียกชื่อของ <i>Salmonella</i>	4
2.1.3 แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ <i>Salmonella</i>	7
2.1.4 การจำแนก <i>Salmonella</i> ในทางระบาดวิทยา.....	7
2.1.4.1 <i>Salmonella</i> ที่อาศัยคนเป็นเจ้าบ้าน.....	7
2.1.4.2 <i>Salmonella</i> ที่ปรับตัวตามเจ้าบ้าน.....	7
2.1.4.3 เชื้อ <i>Salmonella</i> ที่ไม่จำเพาะต่อเจ้าบ้าน.....	7
2.1.5 อาการของผู้ป่วยที่ได้รับ <i>Salmonella</i>	8
2.1.5.1 อาการของระบบทางเดินอาหาร.....	10
2.1.5.2 อาการไข้ไทฟอยด์.....	10
2.1.5.3 อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต.....	10
2.1.6 บทบาทของ <i>Salmonella</i> ในอุตสาหกรรมอาหาร.....	10
2.2 การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์.....	12
2.2.1 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก.....	12
2.2.2 การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะพันธุกรรม.....	12
2.3 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i>	13
2.3.1 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> โดยใช้ลักษณะที่แสดงออก.....	13

	หน้า
2.3.1.1 Serotyping.....	13
2.3.1.1.1 แอนติเจนบนผนังเซลล์.....	13
2.3.1.1.2 แอนติเจนบริเวณไส้.....	17
2.3.1.1.3 แอนติเจนบริเวณแคปซูล.....	18
2.3.1.1.4 วิธีการทั่วไปในการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i>	18
2.3.1.2 Phage typing.....	22
2.3.2 การจำแนกสายพันธุ์ <i>Salmonella</i> โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม.....	25
2.3.2.1 Restriction-based methods.....	25
2.3.2.1.1 Plasmid analysis.....	26
2.3.2.1.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.....	27
2.3.2.1.3 Ribotyping.....	29
2.3.2.1.4 Insertional sequences –RFLP.....	29
2.3.2.1.5 Pulsed-field gel electrophoresis.....	30
2.3.2.2 Amplification-based methods.....	31
2.3.2.2.1 Amplified fragment length polymorphism (AFLP).....	31
2.3.2.2.2 Random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR).....	33
2.3.2.2.3 Repetitive element PCR (REP-PCR)	34
2.3.2.2.4 Variable number of tandem repeat (VNTR) analysis and multiple locus VNTR analysis (MLVA).....	35
2.3.2.3 Sequencing – based methods.....	37
2.3.2.3.1 Multilocus sequence typing (MLST).....	37
2.4 capillary gel electrophoresis (CE).....	38
2.5 High resolution melting (HRM) analysis.....	40
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	43
3.1 เชื้อแบคทีเรีย.....	43
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	43

3.2.1 สารเคมีและสารละลาย.....	43
3.2.2 ชุดทดสอบ.....	43
3.2.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	44
3.3 การเตรียมดีเอ็นเอจาก <i>S. Typhimurium</i> และ <i>S. Enteritidis</i>	44
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดทดสอบ.....	44
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม.....	45
3.4 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ.....	46
3.5 การคัดเลือกตำแหน่งเป้าหมายและไพรเมอร์.....	46
3.6 ข้อมูล repeat units ของ <i>S. Typhimurium</i> และ <i>S. Enteritidis</i> จากการ การวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของตำแหน่งเป้าหมายด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ CE.....	47
3.7 สภาวะและส่วนผสมของสารเคมีในการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ <i>S. Typhimurium</i> และ <i>S. Enteritidis</i> ด้วยเทคนิค MLVA และ High resolution melting (HRM).....	47
3.7.1 <i>S. Typhimurium</i>	47
3.7.2 <i>S. Enteritidis</i>	49
3.8 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง เป้าหมาย.....	50
3.9 การพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ใน ตำแหน่งเป้าหมายของเชื้อ <i>S. Enteritidis</i>	51
3.10 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง สภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	51
3.10.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ.....	51
3.10.2 การประเมินความแม่นยำ	51
3.10.2.1 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำใน การทดลองครั้งเดียวกัน.....	52
3.10.2.2 การทดสอบความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำใน วันที่ต่างกัน.....	52
3.10.3 ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ.....	52

3.10.3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ.....	53
3.10.3.2 ความเข้มข้นดีเอ็นเอ.....	53
3.11 การเปรียบเทียบผลการจำแนกความแตกต่างของ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	54
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	55
4.1 การวิเคราะห์ความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM จำแนกความแตกต่างของ melting profile จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่งเป้าหมาย.....	56
4.2 ผลการพัฒนาเทคนิค HRM เพื่อวิเคราะห์ melting profile บริเวณ VNTR ใน ตำแหน่งเป้าหมายของ S. Enteritidis.....	59
4.3 การประเมินความแม่นยำ (precision) และความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง สภาวะของการทดสอบ (Robustness) ของเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	65
4.4 ผลการเปรียบเทียบผลของการจำแนกความแตกต่างของบริเวณ VNTR ระหว่างเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM.....	73
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	79
รายการอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ <i>Salmonella</i> ในแต่ละชนิดและชนิดย่อย.....	5
2-2	จำนวนซีโรวารที่พบในแต่ละชนิดและชนิดย่อยในปีต่างๆ	6
2-3	กลุ่มเจ้าบ้านของ <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ซีโรวารต่างๆ.....	8
2-4	ชื่อกลุ่มแอนติเจน O แบบเก่าและแบบใหม่และแอนติเจน O factors ที่แสดง ในกลุ่ม.....	15
2-5	ตัวอย่างแอนติเจนของ <i>Salmonella</i> ซีโรวาร.....	22
2-6	ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะและบริเวณจดจำที่ใช้ในเทคนิค RFLP.....	28
3-1	ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคูโพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยเทคนิค MLVA ของ <i>S. Typhimurium</i>	46
3-2	ตำแหน่งเป้าหมายและลำดับนิวคลีโอไทด์ของคูโพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ ด้วยเทคนิค MLVA ของ <i>S. Enteritidis</i>	47
4-1	จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>S. Typhimurium</i> ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE.....	55
4-2	จำนวน repeat units ในแต่ละอัลลีลซึ่งได้จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ <i>S. Enteritidis</i> ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค CE.....	57
4-3	การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอซึ่งถูกเพิ่มปริมาณโดยโพรเมอร์จากงานวิจัยของ Cho และคณะ (2007) ซึ่งคำนวณจากโปรแกรม Tm utility.....	58
4-4	คูโพรเมอร์ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ของ <i>S. Enteritidis</i> ตำแหน่ง SE1, SE5 และ SE9 ที่ออกแบบใหม่.....	61
4-5	การประมาณปริมาณ GC และค่าการหลอมเหลวของดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอ ไทด์ซึ่งได้จากโพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ โดยคำนวณจากโปรแกรม Tm utility..	62
4-6	ไอโซเลทของ <i>S. Enteritidis</i> และ อัลลีลที่ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ทดสอบโพรเมอร์ที่ ออกแบบใหม่.....	63
4-7	ไอโซเลทของเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> และ repeat units ซึ่งถูกนำมาทดสอบการ ประเมินความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกัน.....	66

- 4-8 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ด้วยเทคนิค MLVA ร่วมกับ
เทคนิค CE และเทคนิค MLVA ร่วมกับเทคนิค HRM ของ *S. Typhimurium*..... 75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ลักษณะเซลล์ของ <i>Salmonella</i>	4
2-2 แสดงเส้นทางของ <i>Salmonella</i> เมื่อเข้าไปในร่างกาย.....	9
2-3 แผนภาพแสดงโครงสร้างและตำแหน่งของแอนติเจน O, H, Vi ของ <i>Salmonella</i> ...	14
2-4 โครงสร้างทั่วไปของลิวโพลีแซคคาไรด์ใน <i>Salmonella</i>	14
2-5 ลักษณะเส้นของ <i>Salmonella</i>	17
2-6 ลักษณะโคโลนีของ <i>Salmonella</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดประเภท ต่างๆ.....	19
2-7 การทดสอบด้วยเทคนิค slide agglutination.....	20
2-8 แผนภาพการตรวจวิเคราะห์ <i>Salmonella</i> ในตัวอย่างตามมาตรฐานข้อกำหนด ISO 6579.....	21
2-9 การติดตามการติดเชื้อไวรัสแบคทีเรียโดยดูจากการย่อยสลายเซลล์แบคทีเรีย.....	23
2-10 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค bacteriophage typing.....	24
2-11 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค plasmid analysis.....	26
2-12 แผนภาพแสดงขั้นตอนการจำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียด้วยเทคนิค RFLP..	28
2-13 แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วย เทคนิค PFGE.....	30
2-14 แผนภาพแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วย เทคนิค AFLP.....	32
2-15 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค RAPD-PCR.	33
2-16 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค Rep-PCR...	34
2-17 แผนภาพแสดงแนวคิดและขั้นตอนการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรคด้วยเทคนิค MLVA.....	36
2-18 หลักการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยเทคนิค MLST.....	38
2-19 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องมือ capillary electrophoresis.....	39

2-20	หลักการเบื้องต้นในการพลอตค่าสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์และอุณหภูมิในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HRM.....	41
4-1	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Typhimurium 9 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน.....	56
4-2	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของ S. Enteritidis 10 isolate ที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนของไอโซเลทที่มี repeat units ต่างกัน.....	58
4-3	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 3 ตำแหน่งของ S. Enteritidis 4 ไอโซเลท ที่มี repeat units ต่างกันด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่...	64
4-4	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ในตำแหน่ง STTR9, STTR5, STTR6 และ STTR3 ของ S. Typhimurium ในการทดสอบ repeatability	67
4-5	Derivative melting plot ของการทดสอบ reproducibility ของเทคนิค MLVA ร่วมกับ HRM ใน S. Typhimurium.....	69
4-6	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอซึ่งมาจากวิธีการสกัดด้วยชุดทดสอบและการต้ม.....	71
4-7	Derivative melting plot ของการวิเคราะห์ VNTR บริเวณ STTR9 โดยแปรระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 10 -100 นาโนกรัม.....	72
4-8	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR ทั้ง 4 ตำแหน่งของเชื้อ S. Typhimurium และ 1 ตำแหน่งของ S. Enteritidis จำนวน 50 ไอโซเลท.....	74
ภ.1	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR9 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	92
ภ.2	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR5 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	93
ภ.3	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR6 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	94
ภ.4	Derivative melting plot จากการวิเคราะห์บริเวณ VNTR บริเวณตำแหน่งเป้าหมาย STTR3 ของเชื้อ S. Typhimurium จำนวน 50 isolate.....	95