

คำนำ

งานนิติเวชศาสตร์และนิติวิทยาศาสตร์เป็นงานซึ่งเกิดขึ้นโดยการใช้ความรู้ทางสาขาวิชาแพทยศาสตร์และวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้เพื่อตอบคำถามต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการยุติธรรม ซึ่งผลจากการทำงานของผู้เชี่ยวชาญนั้นจะมีรายงานของผู้เชี่ยวชาญซึ่งประกอบด้วยเนื้อหาสาระสำคัญ 2 ส่วน ได้แก่ ข้อเท็จจริงที่ตรวจพบจากการตรวจวิเคราะห์ และการให้ความเห็นประกอบผลการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติม ในส่วนของผลการตรวจวิเคราะห์นั้นมักจะไม่มีข้อคัดค้านหรือข้อขัดแย้งเนื่องด้วยขีดความสามารถของเครื่องมือการตรวจวิเคราะห์ที่สูงขึ้นตลอดเวลา อย่างไรก็ตามในส่วนของความเห็นนั้นอาจมีความแตกต่างกันไปในมุมมองที่แตกต่างกันของผู้เชี่ยวชาญแต่ละท่านในการแปลความหมายของผลการตรวจวิเคราะห์

ดังนั้นการให้ความเห็นในงานนิติเวชศาสตร์และนิติวิทยาศาสตร์นั้นจึงต้องมีตรรกะและเหตุผลอธิบายที่เพียงพอเป็นที่ยอมรับได้ มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัยยืนยันได้ ไม่ควรอ้างแต่ความเชื่อประสบการณ์ หรือสิ่งที่ตนคุ้นเคยประเพณีปฏิบัติเป็นประจำเป็นที่ตั้ง ไม่เช่นนั้นความเห็นที่ผู้เชี่ยวชาญให้ออกไปนั้นย่อมก่อให้เกิดความไม่เป็นธรรมและสูญเสียแก่ทุกฝ่ายไม่ว่าจะเป็นคู่ความในกระบวนการยุติธรรม รวมไปถึงผู้ปฏิบัติงานในวิชาชีพด้วย

วัตถุประสงค์

วารสารนิติเวชศาสตร์ เป็นวารสารของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีวัตถุประสงค์ในการจัดทำวารสาร ได้แก่

1. เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางนิติเวชศาสตร์ นิติวิทยาศาสตร์ กฎหมายที่เกี่ยวข้อง จริยธรรมและปรัชญา
2. เป็นสื่อกลางในการเผยแพร่แนวความคิดสร้างสรรค์ ที่มีประโยชน์ต่อสังคมอย่างมีเหตุผล
3. เพื่อพัฒนามาตรฐานทางวิชาชีพนิติเวชศาสตร์ และนิติวิทยาศาสตร์
4. เพื่อพัฒนารูปแบบของกระบวนการยุติธรรมของประเทศไทย ให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
5. เป็นสื่อกลางในการเผยแพร่ผลงานวิจัยของแพทย์ประจำบ้าน นิสิต นักศึกษา และนักวิจัย

คณะผู้จัดทำ/กองบรรณาธิการ

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 1. ผศ.นพ.ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์ | บรรณาธิการ |
| 2. ผศ.นพ.อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตร | |
| 3. ผศ.นพ.เกรียงศักดิ์ วงศ์ไพศาลสิน | |
| 4. อ.นพ.ธีรโชติ จองสกุล | |
| 5. อ.นพ.ภาณุวัฒน์ ชุตินวงศ์ | |
| 6. อ.พญ.เกษณี จงประสาธน์สุข | |
| 7. ญ.กัญญณลิน หิรัญเศรษฐธาดา | ผู้ช่วยบรรณาธิการและเลขานุการ |

วารสารออนไลน์

<http://www.forensicchula.net>

สารบัญ

Original article

- การเสียชีวิตในผู้ใหญ่ช่วงต้น	197
- การศึกษาความไว ความจำเพาะของ Determine HIV 1/2 [®]	202
- ความสูงของ pyramidal lobe ของคอมพิวเตอร์	208
- ชนิดของแมลงที่เกี่ยวข้องกับการเน่าสลายของซากไก่	215
- ประสิทธิภาพและความไวของวิธี LAMP ในการตรวจระบุเพศจากตัวอย่างเลือด	234
- การตรวจสอบเชื้อ <i>Streptococcus salivarius</i> ในเลือดของศพที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ	244

Review

- การจำแนกชนิดหมัดและนิติวิทยาศาสตร์	253
- อาวุธชีวภาพและการก่อการร้ายทางชีวภาพ	259
- การประเมินช่วงอายุโดยใช้ cranial sutures และ epiphyseal plate	291

Miscellaneous

- การระบุดีเอ็นเอสุกรด้วยไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย	304
- จดหมายถึงบรรณาธิการ	312
- แก้ไขข้อผิดพลาด	318

ภาพปก

ชื่อภาพ	Salisbury Cathedral from the Bishop's Garden
ศิลปิน	John Constable
สถานที่	Metropolitan Museum of Art, New York
ที่มา	http://en.wikipedia.org/wiki/File:Salisbury_Cathedral_from_the_Bishop%27s_Garden_John_Constable.jpeg

การส่งบทความ

วารสารนิติเวชศาสตร์เป็นวารสารรายสี่เดือน รับเผยแพร่ผลงานที่เกี่ยวข้องทางนิติเวชศาสตร์ นิติวิทยาศาสตร์ กฎหมาย จริยธรรมและปรัชญา โดยให้ส่งผลงานตีพิมพ์ในกระดาษขนาด A4 หรือไฟล์ข้อมูลในสื่อบันทึก หรือจดหมายอิเล็กทรอนิกส์

ผลงานที่ส่งเพื่อตีพิมพ์สามารถใช้ได้ทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ โดยไม่จำกัดรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นบทความแสดงความคิดเห็น งานวิจัยนิพนธ์ต้นฉบับ รายงานผู้ป่วย และงานในรูปแบบอื่น ๆ ให้ระบุชื่อเรื่อง ชื่อผู้วิจัยหรือผู้เขียนผลงาน และส่งผลงานได้ที่

ผศ.นพ.ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ.พระราม4 เขตปทุมวัน กทม.10330

หรือที่ e-mail: tssnat@hotmail.com

การเสียชีวิตในผู้ใหญ่ช่วงต้น

Dying in the young adult

นพ.ณัฐ ดันศรีสวัสดิ์ *

นพ.อุดมศักดิ์ หุ่นวิจิตร *

นพ.ธีรโชติ จongsกุล **

บทคัดย่อ

การเสียชีวิตในผู้ใหญ่ช่วงต้นมักทำให้เกิดความสูญเสียต่อทั้งครอบครัวและสังคม จากการศึกษาการชันสูตรศพของศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แสดงให้เห็นว่าผู้เสียชีวิตส่วนใหญ่เป็นเพศชาย สาเหตุและพฤติการณ์การเสียชีวิต 3 ลำดับแรกได้แก่ ยังไม่ทราบสาเหตุ อุบัติเหตุจราจร และการฆ่าตัวตาย ซึ่งในกลุ่มที่ยังไม่ทราบสาเหตุในเบื้องต้นนั้น เมื่อทำการสืบค้นและตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมปรากฏว่าสาเหตุที่พบเป็นผลมาจากโรคหลอดเลือดและหัวใจ

คำสำคัญ การเสียชีวิต ผู้ใหญ่ช่วงต้น

Abstract

Dying in the young adults cause sentimental loss to their family and other losses to society. The study at Forensic Investigation Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn university showed that most cases were men. The three major causes and manner of death were undetermined, traffic accident and suicide, respectively. In the undetermined group, further investigation and laboratory results revealed that the underlying causes were cardiovascular disease.

Keywords dying, young adult

* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** อาจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เมื่อมีการเสียชีวิตย่อมทำให้นญาติพี่น้องและผู้ใกล้ชิดของผู้เสียชีวิตรู้สึกเสียใจ นอกจากนั้นถ้าผู้เสียชีวิตเป็นเสาหลักของครอบครัวหรือหน่วยงานก็ย่อมก่อให้เกิดความสูญเสียต่อทั้งครอบครัวและหน่วยงานไม่ว่าในด้านสังคม อารมณ์ เศรษฐกิจ และในทุกมิติ ในกรณีที่ผู้เสียชีวิตมีอายุมากอยู่ในวัยชรา ญาติและผู้ใกล้ชิดอาจจะไม่ตระหนักและรู้สึกสูญเสียมากเท่าผู้ที่เสียชีวิตยังอยู่ในช่วงเยาว์วัยหรือผู้ใหญ่ตอนต้นเนื่องจากทราบดีว่าเป็นวัฏจักรชีวิตเมื่อเข้าสู่วัยชรา แต่ในกรณีที่ผู้เสียชีวิตอายุน้อยอยู่นั้นโดยเฉพาะในรายที่ไม่มีโรคประจำตัวย่อมไม่มีใครคาดคิดว่าจะเสียชีวิตในช่วงอายุเช่นนี้ย่อมสร้างความรู้สึกตระหนักและสูญเสียได้รุนแรง

การเสียชีวิตในผู้ใหญ่ตอนต้นนั้นมีการแบ่งช่วงอายุที่แตกต่างกันในแต่ละการศึกษาและแต่ละสังคม อย่างไรก็ตามเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเกณฑ์การแยกระหว่างผู้ใหญ่ตอนต้นนั้นแยกจากผู้ใหญ่ตอนปลายเมื่อการซ่อมแซมของร่างกายเริ่มชะลอช้าลงทำให้สุขภาพร่างกายทรุดโทรมลงโดยเริ่มในช่วงระยะเวลา 35 – 40 ปี ดังนั้นการศึกษาจึงศึกษาในช่วงระยะเวลาเหล่านี้ โดยตัวเลขอายุที่นิยมนำมาศึกษาได้แก่อายุ 35 ปี

ศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีหน้าชันสูตรพลิกศพกรณีเสียชีวิตผิดปกติ (ฆ่าตัวตาย ฆาตกรรม อุบัติเหตุ สัตว์ทำร้าย ไม่ปรากฏเหตุ) หรือเสียชีวิตระหว่างการควบคุมของเจ้าพนักงาน ในท้องที่รับผิดชอบของกองบังคับการตำรวจนครบาล 5 สถานีตำรวจนครบาลทางด่วน และบางสถานีตำรวจนครบาลในท้องที่กองบังคับการตำรวจนครบาล 8 รวม 14 สถานี จากข้อมูลที่รวบรวมในปี พ.ศ.2554 พบว่ามีผู้เสียชีวิตที่มีการตรวจชันสูตรศพทั้งหมด 947 ราย เป็นผู้เสียชีวิตในช่วงผู้ใหญ่ตอนต้น 228 ราย

วิธีการศึกษา

ศึกษาจากบันทึกข้อมูลการผ่าชันสูตรพลิกศพในระบบฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ของศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพฯ ปี พ.ศ.2554 โดยศึกษาศพที่มีอายุระหว่าง 20 – 35 ปี

ผลการศึกษา

1. ปี พ.ศ. 2554 มีผู้เสียชีวิตอายุ 20 – 35 ปี จำนวน 228 ราย (ร้อยละ 24.08 ของการผ่าตรวจศพทั้งหมด)

เพศชาย 187 ราย (82 %)

เพศหญิง 41 ราย (18 %)

2. พฤติการณ์การเสียชีวิต

2.1 เพศชาย 187 ราย

ไม่ทราบเหตุ 60 ราย (32 %)

อุบัติเหตุจราจร 50 ราย (27 %)

ฆ่าตัวตาย 20 ราย (11 %)

ถูกทำร้าย 25 ราย (13 %)

อื่น ๆ 32 ราย (17 %)

2.2 เพศหญิง 41 ราย

ไม่ทราบเหตุ 10 ราย (24 %)

อุบัติเหตุจราจร 13 ราย (32 %)

ฆ่าตัวตาย 6 ราย (15 %)

ถูกทำร้าย 4 ราย (10 %)

อื่น ๆ 8 ราย (19 %)

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาปรากฏว่าสาเหตุการเสียชีวิตที่พบบ่อยมาก 2 อันดับแรกทั้งเพศชายและเพศหญิง ได้แก่ อุบัติเหตุจราจร และยังไม่สามารถระบุสาเหตุ-พฤติการณ์การเสียชีวิต ซึ่งการเสียชีวิตจากจราจรนั้นมีส่วนหนึ่ง ซึ่งตรวจพบเอทานอลในเลือด ดังนั้นการป้องกันการกวดขันเข้มงวดวินัยจราจรในการขับขี่ยานพาหนะจึงเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่ง

การเสียชีวิตโดยที่ยังไม่สามารถระบุสาเหตุ-พฤติการณ์การเสียชีวิตได้นั้น พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวนมากที่มีรายงานของการเกิดภาวะไหลตายในชายวัยทำงาน อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ผ่าศพแล้วยังไม่สามารถระบุสาเหตุการตายได้นั้นจะสรุปว่าเป็นภาวะไหลตายก็ต่อเมื่อได้ทำการตรวจเพิ่มเติมทุกด้านโดยละเอียดแล้วไม่พบสาเหตุการตาย ซึ่งพบว่ากรณีที่เป็นเบื้องต้นการตรวจพยาธิสภาพด้วยตาเปล่า ไม่พบสาเหตุการตายนั้น เมื่อได้มีการตรวจชิ้นเนื้อทางกล้องจุลทรรศน์ ร่วมกับการตรวจทางนิติพยาธิวิทยา จุลชีววิทยา และจากการสอบสวน-การซักประวัติต่าง ๆ พบว่ามีบางกรณีที่สามารถวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตได้ โดยส่วนหนึ่งเกิดจากโรคหลอดเลือดหัวใจหรือโรคหัวใจที่มีอยู่เดิม ดังนั้นในกรณีที่ยังไม่สามารถระบุสาเหตุการเสียชีวิตได้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่าง ๆ เช่น การศึกษาความผิดปกติของการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ที่มีผลต่อโรคกลุ่ม channelopathy หรือความผิดปกติของไขมันในเลือด ก่อนที่จะสรุปว่าเป็นการตายโดยไม่ทราบสาเหตุ

ในส่วนของพฤติการณ์การเสียชีวิตที่เป็นการฆ่าตัวตายนั้นพบได้ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ซึ่งวิธีการที่ใช้ฆ่าตัวตายส่วนใหญ่เป็นการแขวนคอ รองลงมาได้แก่การใช้อาวุธปืนและการกินสารพิษ/ยาเพื่อฆ่าตัวตาย

พฤติการณ์การตายจากการถูกทำร้ายพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยส่วนใหญ่เกิดจากการถูกแทงด้วยวัตถุมีคม และรองลงมาถูกทำร้ายด้วยอาวุธปืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณจันทร์เพ็ญ มั่นเสมอ คุณมณีนรัตน์ บุญอ้อย และคุณประทีป มณฑาทิพย์ เจ้าหน้าที่ธุรการศูนย์ฯ ที่เก็บรวบรวมข้อมูลในการศึกษานี้

References

1. บันทึกข้อมูลการผ่าชันสูตรพลิกศพ ศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2554
2. Sheppard MN. The fittest person in the morgue? *Histopathology*. 2012; 60(3): 381 -96.
3. Henriques de Gouveia R, van der Wal AC, van der Loos CM, Becker AE. Sudden unexpected death in young adults. Discrepancies between initiation of acute plaque complications and the onset of acute coronary death. *Eur Heart J*. 2002; 23(18): 1433 – 40.
4. Winke BG, Holst AG, Theilade J, et al. Nationwide study of sudden cardiac death in persons aged 1-35 years. *Eur Heart J*. 2011; 32(8): 983 – 90.
5. Lippi G, Montagnana M, Meschi T, Comelli I, Cervellin G. Genetics and clinical aspects of Brugada syndrome: an update. *Adv Clin Chem*. 2012; 56: 197 – 208.
6. Kirschner RH, Eckner FAO, Baron RC. The cardiac pathology of sudden, unexplained nocturnal death in Southeast Asian refugees. *JAMA*. 1986; 256(19): 2700-5.
7. Wever EFD, de Medina EOR. Sudden death in patients without structural heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 1137 – 44.
8. Gjerde H, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J. Prevalence of driving with blood drug concentrations above proposed new legal limits in Norway: estimations based on drug concentrations in oral fluid. *Forensic Sci Int* 2011;210(1-3):221-7.

การศึกษาความไวและความจำเพาะในการตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีในโลหิตหลังเสียชีวิตของชุดตรวจ Determine HIV1/2®

Study sensitivity and specificity of Determine HIV1/2® in detection of HIV infection in postmortem.

นพ.วสุรัฐ สุเมธพันธ์ *

ดอกเตอร์ สุณี ศิริวิชกุล **

นพ.ณัฐ ตันศิริสวัสดิ์ ***

นพ.กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน ***

บทคัดย่อ

การติดเชื้อเอชไอวี เป็นปัญหาสำคัญของโลก โดยมีความชุกของการตรวจพบไวรัสเอชไอวี 0.8% โดยที่ 33 ล้านคนของประชากรทั่วโลกได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเอดส์ และมีการเสียชีวิต 2 ล้านคนในปี 2007 สำหรับภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลพบว่าผู้เสียชีวิตที่ถูกส่งเข้ามาชันสูตรตั้งแต่ปี 2549-2552 มีความชุกของการติดเชื้อเอชไอวี 4.3%

ปัจจุบัน ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีในโลหิตหลังเสียชีวิตโดยชุดตรวจ Architect HIV Ag/Ab Combo® ซึ่งใช้หลักการทาง Immunoassay แต่ปัญหาที่พบวิธีการตรวจของชุดการตรวจนี้คือ ต้องใช้ plasma หรือ serum ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในโลหิตหลังเสียชีวิตมักมีการแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลให้ไม่สามารถทำการแยก serum หรือ plasma ออกมาได้

ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองนำชุดตรวจ Determine HIV1/2® ซึ่งสามารถตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีได้ทั้งจาก plasma serum และ whole blood มาทำการศึกษาหาความไวและความจำเพาะ โดยยืนยันผลการตรวจที่ได้ด้วยวิธี Western Blot ซึ่งถือเป็น gold standard ในการตรวจยืนยันการติดเชื้อเอชไอวี

ผลการศึกษาพบว่า ชุดตรวจ Determine HIV1/2® ให้ค่าความไวที่ 100% และความจำเพาะที่ 100% แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองนำร่องจึงควรมีการศึกษาเต็มรูปแบบต่อไป

คำสำคัญ ชุดตรวจ Determine HIV1/2® การติดเชื้อเอชไอวีในศพ

* แพทย์ประจำบ้านชั้นปีที่ 3 ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** อาจารย์สาขาวิชาโรคมุมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การติดเชื้อเอชไอวี เป็นปัญหาสำคัญของโลก โดยมีความชุกของการตรวจพบไวรัสเอชไอวี 0.8% โดยมีประชากร 33 ล้านคนของประชากรทั่วโลกได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเอดส์ และมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อเอชไอวี 2 ล้านคนในปี 2007⁽¹⁾ สำหรับภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลพบว่าผู้เสียชีวิตที่ถูกส่งเข้ามาชันสูตรตั้งแต่ปีพ.ศ. 2549-2552 มีความชุกของการติดเชื้อเอชไอวีที่ 4.3%

การปฏิบัติงานผ่านชันสูตรศพนิติเวช ของภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีการตรวจหาไวรัสเอชไอวีทุกราย เพื่อประโยชน์ในการหาสาเหตุการเสียชีวิต พฤติการณ์การเสียชีวิต และเพื่อความปลอดภัยในการปฏิบัติงานของบุคลากรทางนิติเวชและบุคลากรที่เกี่ยวข้อง ซึ่งปัจจุบันภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีในโลหิตหลังเสียชีวิตโดยชุดตรวจ Architect HIV Ag/Ab Combo[®] ซึ่งใช้หลักการทาง Immunoassay แต่ปัญหาที่พบจากวิธีการตรวจของชุดการตรวจนี้คือต้องใช้ plasma หรือ serum ในการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งในโลหิตหลังเสียชีวิตมักมีการแตกของเม็ดเลือดแดงส่งผลให้ไม่สามารถทำการคัดแยก serum หรือ plasma ออกมาได้ และการไม่สามารถทำการแยก plasma หรือ serum ได้นั้น แล้วนำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์บางครั้งเป็นเหตุทำให้เกิดความเสียหายแก่เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจ

ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองนำชุดตรวจ Determine HIV1/2[®] ซึ่งเป็น Rapid Test ที่ใช้หลักการทาง Immunoassay ชนิดหนึ่งที่มีความนิยมใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV ในประเทศไทย โดยมีข้อดีคือราคาถูก(ราคา120 บาท ต่อชุดตรวจ) วิธีการตรวจทำได้ง่ายไม่จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทางห้องปฏิบัติการ โดยชุดตรวจ Determine HIV1/2[®] สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสเอชไอวีได้ทั้งจาก plasma serum และ whole blood มาทำการศึกษาค้นคว้าหา ความไวและความจำเพาะ ในโลหิตหลังเสียชีวิต ซึ่งยังไม่มีผู้ใดเคยทำการทดลองโดยยืนยันผลการตรวจที่ได้ด้วยวิธี Western Blot ซึ่งถือเป็น gold standard ใน การตรวจยืนยันการติดเชื้อเอชไอวี

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้ทำในรูปแบบ Diagnostic Test โดยใช้เลือดที่นำมาจากสภากาชาดไทย 30 ราย ซึ่งได้คำนวณจำนวนประชากรที่ต้องศึกษาซึ่งได้รับการตรวจสอบวิธีทางสถิติโดยนักสถิติของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเลือดที่ผ่านการตรวจคัดกรองพบการติดเชื้อเอชไอวีและ

ไม่พบการติดเชื้อเอชไอวีอย่างละ 15 ราย ซึ่งผู้ทำการวิจัยไม่ทราบข้อมูลส่วนตัวของผู้บริจาคโลหิต โดยการทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองนำร่อง โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. นำตัวอย่างเลือดจากสภากาชาดไทยที่ผ่านการตรวจคัดกรองพบการติดเชื้อเอชไอวีและไม่พบการติดเชื้อเอชไอวีอย่างละ 15 ราย รายละ 2 มล.

2. นำตัวอย่างเลือดตั้งทิ้งไว้ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อจำลองภาวะของเลือดหลังการเสียชีวิต

3. ใส่ตัวอย่างเลือดครบส่วน (whole blood) 1 หยด หยดลงตรงส่วนสำหรับหยอดตัวอย่างของชุดตรวจ Determine HIV1/2[®] รอ 15 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ 1 หยด ลงไปตรงส่วนที่ใส่ตัวอย่าง ทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วอ่านผล

4. นำตัวอย่างเลือด 1 มล. ใส่หลอดทดลองที่ไม่ใส่สารกันเสียหรือสารกันการตกตะกอนของเลือด นำส่งห้องปฏิบัติการเชื้อไวรัส สาขาวิชาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์เพื่อทำการตรวจยืนยันเชื้อเอชไอวีโดยวิธี Western Blot ซึ่งถือเป็น gold standard

5. นำผลที่ได้มาคำนวณทางสถิติเพื่อหาค่าความไวและความจำเพาะ

6. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเลือดจากสภากาชาดไทยที่ผ่านการตรวจคัดกรองพบการติดเชื้อเอชไอวีและไม่พบการติดเชื้อเอชไอวีอย่างละ 15 ราย เมื่อนำมาตรวจโดยชุดตรวจ Determine HIV1/2[®] และ Western Blot ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย Determine HIV1/2[®] เทียบกับ Western Blot ในกลุ่มที่ตรวจคัดกรองได้ผลบวก

	Determine HIV1/2 [®]	Western Blot
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	+
7	+	+

8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย **Determine HIV1/2[®]** เทียบกับ **Western Blot** ในกลุ่มที่ตรวจคัดกรองได้ผลลบ

	Determine HIV1/2[®]	Western Blot
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-

ตารางที่ 3 ค่าความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ Determine HIV1/2®

	เป็นโรค	ไม่เป็นโรค	ทั้งหมด
ผลตรวจ Positive	15	0	15
ผลตรวจ Negative	0	15	15
ทั้งหมด	15	15	30

ความไว = 100% ความจำเพาะ = 100%

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยชิ้นนี้เกิดขึ้นจากข้อจำกัดที่พบในภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งพบว่าเมื่อส่งเลือดหลังเสียชีวิตไปตรวจทางห้องปฏิบัติการส่วนกลางซึ่งใช้วิธีตรวจโดยชุดตรวจ Architect HIV Ag/Ab Combo® มักมีปัญหาไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากเม็ดเลือดแดงแตกจนไม่สามารถปั่นแยก plasma หรือ serum ออกมาตรวจได้ ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาชุดตรวจที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจทางนิติเวช ผู้วิจัยได้เลือกชุดตรวจ Determine HIV1/2® ซึ่งสามารถตรวจการติดเชื้อเอชไอวี ได้ทั้งจาก plasma serum และ whole blood ประกอบกับชุดตรวจนี้สามารถตรวจได้ง่ายไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญทางห้องปฏิบัติการมีราคาถูกและรู้ผลการตรวจเร็ว

เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านเงินทุน ซึ่งผู้วิจัยเป็นผู้ออกค่าวิจัยเองทำให้ผู้วิจัยออกแบบการทดลองเป็นการทำลองนำร่องใช้ตัวอย่างเพียง 30 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผ่านการคำนวณทางสถิติแบบ Diagnostic Test จากผลการทดลองพบว่า ชุดตรวจ Determine HIV1/2® มีค่าความไวและความจำเพาะสูงถึง 100% เมื่อเทียบกับ Western Blot ซึ่งเป็น gold standard แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่น้อยและเป็นเพียงการทดลองนำร่อง การทดลองแบบเต็มรูปแบบโดยใช้จำนวนตัวอย่างที่มากกว่านี้จึงมีความสำคัญในการศึกษาต่อไป

การตรวจหาการติดเชื้อในศพที่ถูกส่งมาชันสูตรนั้น มีความจำเป็นเพื่อประโยชน์ในการหาสาเหตุการเสียชีวิต พุทธกรรมกรรมการเสียชีวิตและเพื่อความปลอดภัยในการปฏิบัติงานของบุคลากรทางนิติเวชซึ่งจากผลการวิจัยเบื้องต้นพบว่าชุดตรวจ Determine HIV1/2® มีประโยชน์ในการตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีในโลหิตหลังเสียชีวิต

References

1. Kilmarx P H. Global epidemiology of HIV. Current Opinion in HIV and AIDS 2009;4:240-6.
2. Sanaei-Zadeh H, Amoei M, Taaghaddosinejad F. Seroprevalence of HIV, HBV and HCV in forensic autopsies, of presumed low risk, in Tehran, the capital of Iran. J Clin Forensic Med. 2002;9:179-81.
3. Eriksen M B, Jakobsen M A, Kringsholm B, Banner J, Thomsen J L, Georgsen J, et al. Postmortem detection of Hepatitis B, C, and Human Immunodeficiency Virus genomes in blood samples from drug-related Deaths in Denmark. J Forensic Sci 2009;54 :1085-8
4. Constantine N T, Zink H. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res 2005:519-38.
5. Lyamuya E F, Aboud S, Urassa W K, Sufi J, Mbwana J, Ndugulile F, et al. Evaluation of simple rapid HIV assays and development of national rapid HIV test algorithms in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis 2009;9:19.
6. Kshatriya R, Cachaferio A A, Kerr J S, Nelson A E, Fiscus S A. Comparison of two rapid Human Immunodeficiency Virus (HIV) assays, Determine HIV-1/2 and OraQuick Advance Rapid HIV-1/2, for detection of recent HIV seroconversion. J Clin Microbiol Oct 2008;46(10):3482-3.
7. Pandori M W, Hackett J, Louie B, Vallari A, Dowling T, Liska S, et al. Assessment of the ability of a fourth-generation immunoassay for Human Immunodeficiency Virus (HIV) Antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. J Clin Microbiol Aug 2009;47(8):2639-42.
8. Eshleman S H, Khaki L, Laeyendecker O, Manning E P, Lewis L J, Husnik M et al. Detection of individuals with acute HIV-1 infection using the ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo Assay. J Acquir Immune Defic Syndr 2009;52:121-4.
9. Klarkowski D B, Wazome J M, Lokuge K M, Shanks L, Millis C F, O'Brien D P. The evaluation of a rapid *in situ* HIV confirmation test in a programme with a high failure rate of the WHO HIV two-test diagnostic algorithm. Plos One. 2009; 4(2): e4351.
10. Mayhood M K, Afwamba I A, Odhiambo C O, Ndanu E, Thielman N M, Morrissey A B, et al. Validation, performance under field conditions, and cost-effectiveness of Capillus HIV-1/HIV-2 and Determine HIV-1/2 rapid Human Immunodeficiency Virus Antibody assays using Sequential and parallel testing algorithms in Tanzania. J Clin Microbiol Dec 2008;46(12):3946-51.

ความชุกของการพบ Pyramidal lobe ของต่อมไทรอยด์ในร่างอาจารย์ใหญ่

The prevalence of thyroid pyramidal lobe in academic cadavers

พงษ์พิทักษ์ ภูติวัตร *

เกศรินทร์ ศรีเขตต์ **

สุทัศน์ ดวงจิตร ***

บทคัดย่อ

ต่อมไทรอยด์จัดเป็นต่อมไร้ท่อที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย มีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย ต่อมนี้นี้ประกอบด้วย 2 กลีบย่อย เชื่อมต่อกันด้วยบริเวณแคบ ๆ ที่เรียกว่า isthmus ต่อมไทรอยด์เจริญพัฒนามาจากส่วนปลายของท่อไทรอกลอสซัล ซึ่งเคลื่อนที่ลงมาจาก foramen cecum ที่อยู่บริเวณโคนลิ้นจนถึงบริเวณที่อยู่ด้านล่างต่อกล่องเสียง เมื่อกระบวนการเจริญพัฒนาของต่อมไทรอยด์เสร็จสิ้น ท่อไทรอกลอสซัลจะสลายไป ในกรณีที่ทำอย่างกล่าวไม่สลายไปอาจทำให้มีการเจริญและพัฒนาของต่อมไทรอยด์ ในบริเวณที่ทำอย่างกล่าวเคลื่อนที่ผ่านลงมา เช่นการเกิดกลีบพิแรมมิคัล, ectopic thyroid gland และ thyroglossal duct cyst เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของการพบกลีบพิแรมมิคัล ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ยังเหลืออยู่ของท่อไทรอกลอสซัล จากร่างอาจารย์ใหญ่จำนวน 66 ร่าง (ชาย 49 ร่าง หญิง 17 ร่าง) ที่ผ่านการศึกษาก่อนที่บริเวณคอโดยนิติศาสตราจารย์สุภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวรและมหาวิทยาลัยพะเยา จากการศึกษาพบส่วนที่ยังคงเหลืออยู่จากการเจริญพัฒนาของต่อมไทรอยด์ที่เรียกว่ากลีบพิแรมมิคัลโดยพบในร่างอาจารย์ใหญ่เพศชายจำนวน 19 ร่าง คิดเป็น 38.78% และพบในร่างอาจารย์ใหญ่เพศหญิงจำนวน 8 ร่าง คิดเป็น 47.06% และจากการศึกษาในครั้งนี้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่พบทั้งในเพศชายและเพศหญิงเท่ากับ 40.91% สำหรับขนาดของกลีบพิแรมมิคัลที่พบก็มีขนาดแตกต่างกันออกไป มีค่าเฉลี่ยของความกว้างที่ส่วนฐานตรงส่วน isthmus และความยาวเท่ากับ 1.28 ± 0.54 เซนติเมตร และ 1.87 ± 1.2 เซนติเมตร ตามลำดับ คณะผู้วิจัยหวังว่าผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับศัลแพทย์ในการผ่าตัดต่อมไทรอยด์ได้ต่อไป

คำสำคัญ กลีบพิแรมมิคัล, ท่อไทรอกลอสซัล, ต่อมไทรอยด์

* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ สถานีวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

** สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พะเยา

*** ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

Abstract

Thyroid gland is the largest endocrine gland in the body. Its function is to regulate thyroid hormones involved in controlling the growth of a body and basal metabolic rate. It consists of two lobes which are connected by a narrow portion called thyroid isthmus. Thyroid gland is developed from thyroglossal duct, which is moving down from foramen cecum at the base of the tongue to the area below larynx. Finally, the thyroglossal duct is degenerated after thyroid development complete. If this duct is not degenerated, it may cause an abnormal thyroid development along its distance such as pyramidal lobe, ectopic thyroid gland as well as thyroglossal duct cyst. Thus, this study aims to investigate the prevalence of pyramidal lobe, which is a remaining thyroglossal duct structure in 66 cadavers (49 male and 17 female). All cadavers were dissected by health science students at Naresuan and Phayao Universities. The study shows that the remnant of thyroid gland, called pyramidal lobe, was found 40.91% in both genders, 19 in male (38.78%) and 8 in female (47.06%). The pyramidal lobe size was 1.28 ± 0.54 cm average width and 1.87 ± 1.2 cm in length, respectively. We suppose that these data may be used as a basic knowledge for surgeon in total thyroidectomy.

Key words : Pyramidal lobe, Thyroglossal duct, Thyroid gland

บทนำ

ต่อมไทรอยด์จัดเป็นต่อมไร้ท่อที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายและจัดเป็นต่อมไร้ท่อที่มีความสำคัญต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก มีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกาย โดยเฉพาะระบบประสาท ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญของสมองและการรับรู้สั่งการของระบบประสาท นอกจากนี้ยังควบคุมอัตราเมตาบอลิซึมและการเผาผลาญสารอาหารต่าง ๆ ในร่างกายอีกด้วย ต่อมไทรอยด์เจริญพัฒนามาจากเนื้อเยื่อชั้น endoderm ที่บริเวณคอหอยหรือโคนลิ้นในระยะที่เป็นตัวอ่อน โดยในช่วงท้ายของสัปดาห์ที่ 4 เนื้อเยื่อที่อยู่ในบริเวณ foramen cecum จะเคลื่อนที่ลงมาด้านหน้าและอยู่ด้านล่างต่อกล่องเสียง (larynx) โดยในช่วงสัปดาห์ที่ 5 ต่อมไทรอยด์ยังคงเชื่อมอยู่กับ foramen cecum ด้วยท่อที่เรียกว่า thyroglossal duct หลังจากนั้นในช่วงท้าย ๆ ของสัปดาห์ที่ 5 thyroglossal duct ก็จะเริ่มสลายไป ทำให้ต่อมไทรอยด์แยกออกจาก foramen cecum และเคลื่อนที่ลงมาจนถึงด้านล่างต่อกระดูกอ่อน cricoid ในช่วงสัปดาห์ที่ 7 ประมาณช่วงสัปดาห์ที่ 7 - 10 ต่อมไทรอยด์ก็เริ่มมีการหลั่งฮอร์โมนและทำหน้าที่ได้ บางครั้ง thyroglossal duct ก็ไม่สลายไป ทำให้เกิดเป็น thyroglossal cyst หรือ thyroglossal sinus ได้ นอกจากนี้อาจมีการเจริญของเนื้อเยื่อต่อมไทรอยด์ตามเส้นทางที่เคลื่อนที่ผ่านลงมาก็ได้ เช่น การเกิด pyramidal lobe, accessory thyroid gland และ ectopic thyroid gland เป็นต้น^{(1), (2)} ต่อมไทรอยด์มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณคอทางด้านหน้า สัมพันธ์กับกระดูกสันหลังระดับคอชั้นที่ 5 ถึงกระดูกสันหลังระดับคอชั้นที่ 1 (C5-T1) โดยอยู่ด้านล่างต่อกล่องเสียง ประกอบด้วย 2 กลีบย่อยได้แก่ กลีบทางด้านซ้าย

และกลีบทางด้านขวา เชื่อมต่อกันตรงกลางด้วยบริเวณแคบ ๆ ที่เรียกว่า isthmus ซึ่งอยู่ด้านหน้าต่อกระดูกอ่อนของหลอดลมชั้นที่ 2 และ 3 และในบางครั้งอาจพบว่าไม่มีการเจริญของส่วน isthmus ได้เช่นกัน ต่อมไทรอยด์อยู่ทางด้านหลังต่อกล้ามเนื้อ sternothyroid และ sternohyoid ถูกห่อหุ้มด้วย fibrous capsule บางๆ ซึ่งอยู่ติดกับกลุ่มของพังผืดที่เรียกว่า pretracheal fascia ได้รับเลือดมาเลี้ยงจากหลอดเลือดแดง superior และ inferior thyroid และบางครั้งอาจพบหลอดเลือดแดง thyroid ima เป็นแขนงที่ออกมาจาก arch of aorta พบได้ประมาณ 10% ในคนซึ่งจะให้แขนงมาเลี้ยงที่บริเวณ isthmus ทางด้านหลังของต่อมไทรอยด์สัมพันธ์กับเส้นประสาท recurrent laryngeal ซึ่งเป็นเส้นประสาทที่ไปเลี้ยงโครงสร้างที่อยู่ในกล่องเสียง ที่บริเวณ isthmus สามารถพบส่วนที่ยังคงหลงเหลืออยู่จากการเจริญพัฒนาของส่วนปลายของ thyroglossal duct ที่เรียกว่า pyramidal lobe ได้^{(3), (4)} ส่วนใหญ่มักพบ pyramidal lobe ยื่นขึ้นมาจากบริเวณขอบบนของ isthmus โดยอยู่เอียงไปทางด้านซ้าย ยื่นขึ้นไปเกาะที่กระดูกอ่อน thyroid หรืออาจขึ้นไปเกาะที่กระดูกไคคาง (hyoid bone) ด้วยส่วนที่เรียกว่า levator glandulae thyroideae ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวประกอบด้วยเส้นใยพังผืดและอาจมีไขมันของกล้ามเนื้อแทรกอยู่เล็กน้อย ขนาดความยาวของ pyramidal lobe ในตำราทางวิชาการส่วนใหญ่ส่วนระบุไว้ว่ามีความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร⁽⁵⁾

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับรายงานการพบ pyramidal lobe ที่แตกต่างกันในกลุ่มประชากรต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นในการศึกษารั้งนี้เพื่อศึกษาถึงความชุกของการพบ pyramidal lobe ของต่อมไทรอยด์ รวมทั้งขนาดความยาวของโครงสร้างดังกล่าวในร่างอาจารย์ใหญ่

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา เพื่อศึกษาการพบ pyramidal lobe ของต่อม thyroid จากร่างอาจารย์ใหญ่อำนาจ 66 ร่าง (จากมหาวิทยาลัยนเรศวร 50 ร่าง และมหาวิทยาลัยพะเยา 16 ร่าง) โดยแยกเป็นเพศชาย 49 ร่างและเพศหญิง 17 ร่าง ผ่านการศึกษาโดยนิติลักษณะแพทยศาสตร์ ทันตแพทยศาสตร์และสหเวชศาสตร์ ที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และมหาวิทยาลัยพะเยา แล้วทำการเก็บบันทึกข้อมูลรายงานผลการทดลองอยู่ในรูปร้อยละ พร้อมทั้งวัดขนาดความยาวและความกว้างที่ส่วนฐานของ pyramidal lobe โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ จากนั้นทำการเก็บบันทึกข้อมูลและถ่ายภาพ

ผลการศึกษา

จากการศึกษาในร่างอาจารย์ใหญ่อำนาจ 66 ร่าง แบ่งเป็นเพศชาย 49 ร่างและเพศหญิง 17 ร่าง พบส่วนที่ยังคงหลงเหลือจากการเจริญพัฒนาของต่อมไทรอยด์ ที่เรียกว่า pyramidal lobe โดยพบในร่างเพศชายจำนวน 19 ร่าง คิดเป็น 38.78% และพบในร่างเพศหญิงจำนวน 8 ร่าง คิดเป็น 47.06% และจากการศึกษาในครั้งนี้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่พบทั้งในเพศชายและเพศหญิงเท่ากับ 40.91% ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับความกว้างที่ส่วนฐานของ pyramidal lobe และความยาวของ pyramidal lobe มีค่าเฉลี่ยทั้งในเพศชายและเพศหญิงเท่ากับ 1.28 ± 0.54 ซม. และ 1.87 ± 1.2 ซม. ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การพบ pyramidal lobe จากการศึกษาที่ผ่านมา ⁽⁶⁾

ผู้วิจัย	ความถี่ที่พบ (%)	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	ปีที่ศึกษา	กลุ่มประชากร
Marshall	43	ในศพดอง (on cadaver)	1895	อังกฤษ
Sobotta	45	ในศพดอง (on cadaver)	1915	เยอรมัน
Blumberg	60-65	การผ่าตัด (surgical)	1981	สหรัฐอเมริกา
Kitagawa	48.6	ในศพดอง (on cadavers)	1993	ญี่ปุ่น
Filho	50.7	การผ่าตัด (surgical)	2004	บราซิล
Harjeet	28.9	ในศพดอง (on cadavers)	2004	อินเดีย
Braun	55	ในศพดอง (on cadavers)	2007	ออสเตรเลีย
Sturniolo	25.5	การผ่าตัด (surgical)	2008	อิตาลี
Geraci	12	การผ่าตัด (surgical)	2008	อิตาลี

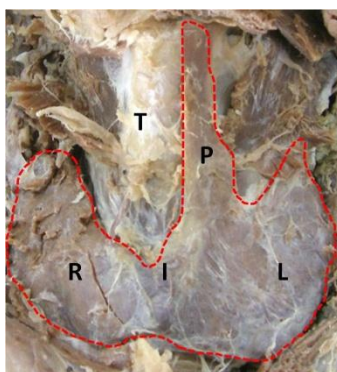
[ที่มา : คัดแปลงจาก Zivic และคณะ, 2011]

ตารางที่ 2 แสดงการพบ pyramidal lobe (remnant structure) ทั้งในเพศชายและเพศหญิง

เพศ	Pyramidal lobe ของต่อม thyroid	
	จำนวนร่างที่พบ (%)	จำนวนร่างที่ไม่พบ (%)
ชาย	19 (38.78%)	30 (61.22%)
หญิง	8 (47.06%)	9 (52.94%)
รวม	27 (40.91%)	39 (59.09%)

ตารางที่ 3 แสดงความกว้างที่ส่วนฐาน และความยาวของ pyramidal lobe

เพศ	Pyramidal lobe ของต่อม thyroid	
	ความกว้างที่ส่วนฐานบริเวณ isthmus (ชม.±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	ความยาวจาก isthmus ขึ้นไปหา thyroid cartilage (ชม.±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ชาย	1.42±0.56	2.13±1.4
หญิง	1.13±0.55	1.6±0.78
ค่าเฉลี่ย	1.28±0.54	1.87±1.2



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของ pyramidal lobe (P) ของต่อม thyroid โดยเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายแท่งยื่นจาก isthmus (I) ขึ้น

ไปหากระดูกอ่อน thyroid (T), R=right lobe, L=left lobe

วิจารณ์ผลและสรุป

ต่อมไทรอยด์เจริญพัฒนามาจากเนื้อเยื่อชั้นเอ็นโดเดิร์ม (endoderm) ที่อยู่บริเวณที่จะพัฒนาไปเป็นลิ้น ในระยะที่เป็นเอมบริโอ โดยเนื้อเยื่อดังกล่าวเคลื่อนที่ลงมาทางด้านหน้าและลงมาอยู่ทางด้านล่างต่อกระดูกอ่อนไทรอยด์ผ่านท่อไทรอกลิอัสซัล ต่อมาท่อดังกล่าวก็จะสลายไปเช่นกัน⁽¹⁾ ในกรณีที่ท่อดังกล่าวสลายไปไม่หมด อาจทำให้มีการเจริญของต่อมไทรอยด์เพิ่มขึ้นมาตามเส้นทางที่ท่อดังกล่าวเคลื่อนที่ผ่านลงมา เช่น การเกิด ectopic thyroid gland, accessory thyroid gland และ pyramidal lobe เป็นต้น โดย pyramidal lobe เจริญพัฒนามาจากส่วนปลายของท่อไทรอกลิอัสซัล โดยยื่นขึ้นมาจากขอบทางด้านบนของส่วน isthmus และอยู่เยื้องไปทาง

กลีบทางด้านซ้ายของต่อม⁽⁷⁾ ซึ่งบางครั้งสามารถพบส่วนของเส้นใยที่มีกล้ามเนื้อแทรกอยู่เล็กน้อยที่เรียกว่า levator glandulae thyroideae ขึ้นจากส่วนยอดของ pyramidal lobe ไปยังกระดูกไคคาง⁽⁸⁾ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบ pyramidal lobe ทั้งในเพศชายและเพศหญิงคิดเป็น 40.91% ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้ Sultana และคณะได้ศึกษาความชุกของการพบ pyramidal lobe โดยพบในเพศชายมากกว่าในเพศหญิงคิดเป็น 52.1% และ 41.7% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบในเพศหญิงมากกว่าในเพศชาย คิดเป็น 47.06% และ 38.78% ตามลำดับ ทั้งนี้ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนร่างเพศหญิงที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อย ซึ่งเป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ยาก ความยาวและความกว้างของ pyramidal lobe จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 1.87 ± 0.54 และ 1.28 ± 0.54 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาของ Sultana พบว่า pyramidal lobe มีช่วงความยาวและความกว้างเท่ากับ 0.18- 0.30 และ 0.13- 0.19 เซนติเมตร ตามลำดับ⁽⁹⁾ การทราบถึงความชุกของการพบ pyramidal lobe อาจมีประโยชน์ต่อศัลยแพทย์ในการผ่าตัดโรคที่เกี่ยวข้องกับต่อมไทรอยด์ ซึ่งถ้าทำการผ่าตัดเอาต่อมไทรอยด์ออกไปแล้ว แต่ยังคงมีเนื้อเยื่อบางส่วนหลงเหลืออยู่ ก็สามารถทำให้ย้อนกลับมาเป็นโรคดังกล่าวได้อีกครั้ง เช่น โรคคอพอกและมะเร็งต่อมไทรอยด์ เป็นต้น^{(6), (10)} ดังนั้นการทราบถึงความชุกของการพบ pyramidal lobe ในประชากรไทย อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางการแพทย์ในกลุ่มประชากรไทยได้

จากการศึกษาครั้งนี้ พบส่วนที่ยังคงเหลืออยู่จากการเจริญพัฒนาของต่อมไทรอยด์ที่เรียกว่า pyramidal lobe โดยพบในร่างอาจารย์ใหญ่ทั้งในเพศชายและเพศหญิงเท่ากับ 40.91% สำหรับขนาดของ pyramidal lobe ที่พบก็มีขนาดแตกต่างกันออกไป และมักพบตรงรอยต่อระหว่างส่วน isthmus และ left lobe ของต่อม ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับศัลยแพทย์ในการผ่าตัดต่อมไทรอยด์ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และสาขากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ร่างอาจารย์ใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

References

1. Larsen WJ. Human embryology. 2nd ed. New York: Cherrchill Livingstone; 1997.
2. Samuel A. Thyroid ectopia in hyperthyroidism. Indian J Nucl Med. 2006;21(3):50-5.

3. Snell RS. Clinical anatomy. 7th ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
4. Moore KL, F.Dalley A. Clinically oriented anatomy. 5th ed. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
5. Sultana SZ, Khalil M, Khan MK, Shamim R, Parveen S, Ara ZG. Morphological study of levator glandulae thyroidea in Bangladeshi cadaver. Mymensingh Med J. 2009 Jul;18(2):179-83.
6. Zivic R, Radovanovic D, Vekic B, Markovic I, Dzodic R, Zivaljevic V. Surgical anatomy of the pyramidal lobe and its significance in thyroid surgery. S Afr J Surg. 2011 Aug;49(3):110, 2, 4.
7. Joshi SD, Joshi SS, Daimi SR, Athavale SA. The thyroid gland and its variations: a cadaveric study. Folia Morphol (Warsz). 2010 Feb;69(1):47-50.
8. Marshall CF. Variations in the Form of the Thyroid Gland in Man. J Anat Physiol. 1895 Jan;29(Pt 2):234-9.
9. Sultana S, Mannan S, Ahmed M, Rahman M, Khan M, Khalil M. An anatomical study on pyramidal lobe of thyroid gland in Bangladeshi people. Mymensingh Med J. 2008 Jan;17(1):8-13.
10. Ozgur Z, Celik S, Govsa F, Ozgur T. Anatomical and surgical aspects of the lobes of the thyroid glands. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 Sep;268(9):1357-63.

ชนิดของแมลงที่เกี่ยวข้องกับการเน่าสลายของซากไก่ในแต่ละระยะ ในบริเวณบ้านคลองหนอง เหล็ก ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

Species of insects associated with each stage of chicken carcass decomposition at Ban Klong Nong Lek, Amphur Meung, Phitsanulok Province

แสงชัย นทีวรรณารถ, ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์, ครรชิต คงรส *

อิทธิพล พลสวัสดิ์, ธนกร เสี่ยงล้ำ, พิทักษ์ สุริยะบุตร **

อรัญญา จิระวิริยะกุล, วชิรินทร์ เทียนสันต์ **

กาญจนา อุสุวรรณทิพย์ ***

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการจำแนกชนิดของแมลงที่เกี่ยวข้องกับการเน่าสลายของซากไก่ในแต่ละระยะ โดยทำการเก็บแมลงจากซากไก่ บริเวณบ้านคลองหนองเหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก จากนั้นนำมาทำการแยกชนิดทั้งระยะตัวเต็มวัยและตัวอ่อน ตัวเต็มวัยจะแยกโดยใช้ลักษณะที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ส่วนตัวอ่อนจะมีการนำมาคงสภาพด้วยเอทานอลจากนั้นนำมาย่อยด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ กำจัดน้ำออกด้วยด้วยเอทานอล จากนั้นทำให้ใสด้วย xylene และ mount ด้วย permount นำสไลด์ถาวรที่ได้ทำการศึกษาลักษณะ โครงสร้างภายในของตัวอ่อนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope) การศึกษานี้พบแมลงที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ คือ *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya megacephala*, *Parasarcophaga ruficornis*, *Musca domestica*, *Fannia* sp., *Dermestes maculatus*, *Necrobia* sp. และ *Trox* sp. ซึ่งจากข้อมูลของแมลงชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประมาณระยะเวลาหลังการตายในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

* สาขาโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์ศาสตร์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

** นิสิตชั้นปีที่ 4 สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

*** สาขาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

Abstract

The objective of this study was to identify the species of insects which associated with each stage of decomposition. The study was performed by collecting the insect from chicken carcass in the ambient area of Ban Klong Nong Lek, Amphur Meung, Phitsanulok Province . The adult insects were pinned and identified their morphology by using stereomicroscope. While their larvae were fixed in ethanol, digested by KOH. Next the larvae were dehydrated in various concentrations of ethanol. Then the larvae specimen were clear in xylene and mount with permount. The specimens were identified their species by using light microscope. The results showed that necrophagic insect species we found were *Chrysomya rufifacies*, *Chrysomya megacephala*, *Parasarcophaga ruficornis*, *Musca domestica*, *Fannia* sp., *Dermestes maculatus*, *Necrobia* sp. and *Trox* sp. The data in this study is a useful data for estimating postmortem interval (PMI) in studied area.

บทนำ

นิติกีฏวิทยา (Forensic Entomology) คือการนำความรู้เกี่ยวกับแมลงที่พบบนศพและบริเวณรอบข้างของศพมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการพิสูจน์หลักฐานในคดีทางด้านการสืบสวนสอบสวนเพื่อบังคับใช้กฎหมายในกระบวนการยุติธรรม ⁽¹⁾

เมื่อมีการเสียชีวิตร่างกายจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาพตามระยะเวลาของการเน่าสลาย(decomposition) ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ ระยะสด (Fresh), ระยะอืด (Bloat), ระยะเน่าสลาย (Active decay), ระยะเน่าสลายเต็มที่ (Advance decay) และระยะแห้ง (Skeletonization) ซึ่งในแต่ละระยะของการย่อยสลายจะมีการดึงดูดแมลงที่ต่างชนิดกัน ⁽²⁾

ในช่วงระยะเวลาหลังการเสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง ผู้ประเมินสามารถประเมินระยะเวลาหลังการเสียชีวิต (Post-Mortem Interval ; PMI) ได้จากการเปลี่ยนแปลงสภาพของศพ เช่น การแข็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) การตกของเม็ดเลือดแดง (lividity) และอุณหภูมิของร่างกายที่ลดลง เป็นต้น แต่ถ้าหากระยะเวลาของการเสียชีวิตมากกว่า 24 ชั่วโมง จะทำให้การประมาณ PMI มีความแม่นยำน้อยลง จึงต้องอาศัยความรู้ทางด้านนิติกีฏวิทยาช่วยในการประมาณระยะเวลาหลังการตายประกอบกับวัตถุพยานและหลักฐานในสถานที่เกิดเหตุ ⁽¹⁾

จากการรายงานของ Sukontason ในปี 2010 พบว่าแมลงวันหลังลายในระยะตัวเต็มวัยเพศผู้สามารถใช้ในการประมาณ PMI ได้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันยังได้ใช้ลักษณะของ cephalopharyngeal skeleton (CK), posterior spiracle (PS) และ spine บนตัวหนอน ในการแยกชนิดของแมลงวันหัวเขียวที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์⁽³⁾ ส่วนการใช้วงจรชีวิตในการประเมิน PMI ได้มีรายงานของนภาพร ศรีตะวานิชและคณะได้ใช้แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* ในการประมาณ PMI และผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันยังได้ทำการศึกษา *Dermestes maculatus* เพื่อใช้ประมาณ PMI⁽⁴⁾⁽⁵⁾ และ Kumara (2007) ได้ทำการศึกษาในประเทศมาเลเซียพบว่า *Dermestes ater* มาที่ศพในระยะ Advance decay ของการย่อยสลาย เพื่อประกอบกับหลักฐานในการประมาณ PMI ในการสอบสวนหาสาเหตุการตายของเจ้าหน้าที่ตำรวจ⁽⁶⁾

การศึกษานิชของแมลงวันในระยะต่าง ๆ ที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์โดย อภิชาติ วิตย์ตะ และคณะได้ทำการศึกษาที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก พบแมลงที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์คือ *C. rufifacies*, *C. megacephala*, *Parasarcophaga ruficornis*, *Musca domestica*, *Fannia canicularis*, *Piophilidae casei*, *D. maculatus*, *Hister* sp., *Necrobia rufipes* และ *Trox* sp. การศึกษาของ Bunchu และคณะพบแมลงวันที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ 12 ชนิด คือ *C. megacephala*, *C. chain*, *Achoetandrus (Chrysomya) rufifacies*, *Ceylomoniac (Chrysomya) nigripes*, *Hemipyrelia ligurriens*, *H. pulchra*, *Lucilia cuprina*, *L. perphyrina*, *Stomorphyna discolor*, *Isonomyia pseudoridana*, *Hypopygiopsis infumata*, *Rhycomyia* spp. สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nateeworanart และคณะที่ศึกษานิชของแมลงในมหาวิทยาลัยนเรศวร ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน⁽⁸⁾ พบแมลงวันที่มีความสำคัญทางการแพทย์ 5 ชนิดคือ *C. megacephala*, *C. rufifacies*, *M. domestica*, *Fannia* sp., *Piophilidae* sp. โดยการศึกษาดังกล่าวได้ใช้ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนระยะ third instar larva⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษานิชของแมลงที่มีความเกี่ยวข้องกับนิติวิทยาศาสตร์ที่ยังสับสนไว้ในระยะต่าง ๆ ของการเน่าสลายเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ในพื้นที่ที่ทำการศึกษา

วิธีการศึกษาวิจัย

สถานที่ในการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างแมลงที่เกี่ยวข้องกับการเน่าสลายของซากไก่ ในเขตชุมชนบริเวณหมู่บ้านคลองหนองเหล็ก ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งตั้งอยู่ที่พิกัด 16°53'N 100°19'E⁽²⁾

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแมลงจากซากไก่

1.1 นำซากไก่น้ำหนัก 1.5 กิโลกรัม ไปวางทิ้งไว้กลางแจ้งในเขตชุมชนคลองหนองเหล็ก โดยใช้กรงขนาด 60 x 80 x 100 ซม. ครอบไว้เพื่อป้องกันจากการรบกวนของสุนัขและสัตว์กินซากอื่นๆ

1.2 สุ่มเก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยของแมลงโดยใช้สวิงโฉบ จากนั้นใส่ลงในกล่องใส่แมลง และสุ่มเก็บตัวอย่างตัวอ่อนของแมลงโดยใช้ forceps จากนั้นใส่ตัวอ่อนของแมลงที่เก็บได้ลงในขวดเก็บตัวอ่อน

1.3 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยของแมลงใน 2 ช่วงเวลา คือ ตอนเช้าเวลาประมาณ 08.00-10.00 น. และตอนเย็นเวลาประมาณ 16.00 – 18.00 น. ของทุกวัน ในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม

2. การแยกชนิดตัวเต็มวัยของแมลง

2.1 นำตัวเต็มวัยของแมลงในขวดที่บรรจุ Chloroform (Duncan's, Flockhart & Go.)

2.2 ใช้ pin แมลงปักตัวเต็มวัยของแมลงที่ตายแล้ว

2.3 นำแมลงที่ปักด้วย pin แมลงแล้วไปอบใน hot air oven อุณหภูมิประมาณ 55 - 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 48 ชั่วโมง⁽²⁾

2.4 นำตัวอย่างแมลงไปศึกษารูปร่างลักษณะของตัวเต็มวัยภายใต้กล้อง stereomicroscope จากนั้นทำการแยกชนิดตัวเต็มวัยโดยอ้างอิงจาก Greenberg & Kunich (2002)⁽¹⁰⁾

2.5 ถ่ายรูปตัวอย่างของแมลงโดยใช้กล้อง CCD moticam 2000

3. การแยกชนิดตัวอ่อนของแมลง

3.1 เตรียมตัวอ่อนโดยนำไปต้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อป้องกันการหดตัวและโค้งงอของตัวอ่อน

3.2 คงสภาพตัวอ่อนด้วย ethyl alcohol (Merck, Merck chemicals Ltd. Darmstadt, Germany) เพื่อป้องกันตัวอ่อนมีสีคล้ำ

3.3 นำตัวอ่อนที่ได้ไปตัดในส่วนของ abdominal segment ที่ 7 (AS7) และ Thoracic segment ที่ 2 (TS2)

3.4 นำส่วนที่ตัดแล้วไปย่อยอวัยวะภายในด้วยสารละลาย 20% KOH ⁽¹¹⁾ ทำให้ตัวอ่อนใส จากนั้นนำไปทำสไลด์ถาวร

3.5 การทำสไลด์ถาวรประกอบด้วย การดึ่งน้ำออกจากตัวอย่างตัวอ่อนของแมลงด้วย ethyl alcohol ความเข้มข้น ร้อยละ 60, 70, 80, 95 และ 100

3.6 ทำให้ตัวอย่างตัวอ่อนของแมลงใสด้วย xylene (EMPLURA[®], Merck chemicals Ltd. Darmstadt, Germany)

3.7 mount ด้วยน้ำยา permount (Fisher Scientific* Permount* Adhesive, Fisher Scientific International Inc.)

3.8 ทำสไลด์ให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.9 นำไปศึกษารูปร่างและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope) ที่กำลังขยาย 10X และ 40X จากนั้นทำการแยกชนิดตัวอ่อนของแมลงโดยอ้างอิงจาก Greenberg & Kunich (2002) ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

ผลการวิจัย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแมลงชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าสลายของซากไก่ภายในชุมชนคลองหนองเหล็ก จ.พิษณุโลก โดยทำการศึกษาในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อน อุณหภูมิอยู่ในช่วง 24.5 – 34.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 60-80% จากการศึกษากระบวนการการเน่าสลายของซากไก่ สามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะสด (fresh stage) เป็นระยะแรกหลังการตายของไก่ ลำตัวของไก่มีสีขาวซีด รูปร่างลักษณะภายนอกปกติ ไม่มีกลิ่น แต่ภายในซากไก่จะมีการย่อยสลายเซลล์ที่ตายแล้วโดยการทำงานของแบคทีเรียและโปรโตซัว และพบตัวเต็มวัยของแมลงวันหัวเขียวเข้ามายังซากไก่ (รูปที่ 1)

ระยะที่ 2 ระยะอืด (bloat stage) เป็นช่วงหลังการตายผ่านไปแล้ว 2-3 วันพบว่าซากไก่เริ่มอืด บริเวณใบหน้าและต้นขาเริ่มมีสีเขียว และพบว่าแมลงชนิดต่างๆมายังซากไก่มากขึ้น (รูปที่ 2)

ระยะที่ 3 ระยะเน่าสลาย (active decay stage) เป็นช่วงเวลาหลังการตายมาแล้ว 4-5 วัน มีการสลายของเนื้อเยื่อในซากไก่ ระยะนี้เป็นระยะที่ซากไก่ส่งกลิ่นเหม็นมากที่สุด และพบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงหลายชนิด (รูปที่ 3)

ระยะที่ 4 ระยะเน่าสลายเต็มที่ (advanced stage) เป็นช่วงระยะเวลาหลังการตายแล้ว 6-9 วัน พบซากไก่เริ่มแห้ง ยังคงมีกลิ่นเหม็นในระยะนี้จะพบตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงน้อยลง เริ่มพบแมลงปีกแข็ง (รูปที่ 4)

ระยะที่ 5 ระยะแห้ง (dry stage) เป็นระยะหลังการตายมาแล้ว 10 วัน ซากไก่แห้งเกือบทั้งหมด มีกลิ่นเหม็นน้อยลง ยังคงพบแมลงปีกแข็ง (รูปที่ 5)



รูปที่ 1 ระยะสด



รูปที่ 2 ระยะอืด



รูปที่ 3 ระยะเน่าสลาย



รูปที่ 4 ระยะเน่าสลายเต็มที่



รูปที่ 5 ระยะแห้ง

ในแต่ละระยะของการเน่าสลายของซากไก่จะมีความสัมพันธ์กับแมลงที่พบ (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าระยะต่าง ๆ ของวงจรชีวิตแมลง ใน genus และ species ต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กับระยะของการเน่าสลายของซากศพ โดยการศึกษาได้ทำการลุ่มเก็บตัวอย่างของแมลงที่พบบนซากไก่ ซึ่งพบทั้งในระยะตัวเต็มวัยระยะตัวอ่อน และระยะดักแด้ แล้วนำมาทำการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อบันทึกจำนวนและจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะการเน่าของซากไก่ที่มีความสัมพันธ์กับแมลงที่พบในแต่ละระยะของการเน่าสลาย

ระยะของการเน่า	ช่วงเวลา (วัน)	ลักษณะของซากไก่	กลุ่มของแมลง
ระยะสด (Fresh Stage)	0-1	ศพยังใหม่และสด	แมลงวันหัวเขียว <i>Chrysomya rufifacies</i> (รูป 6, 7) แมลงวันหัวเขียว <i>Chrysomya megacephala</i> (รูป 8, 9) แมลงวันหลังลาย <i>Parasarcophaga ruficornis</i> (รูป 10) แมลงวันบ้าน <i>Musca domestica</i> (รูป 11) มด
ระยะเริ่มอืด (Bloated Stage)	2-3	ศพบวม บริเวณใบหน้าและต้นขามีสีเขียว เริ่มมีกลิ่นเน่าเหม็น	แมลงวันหัวเขียว <i>Chrysomya rufifacies</i> แมลงวันหัวเขียว <i>Chrysomya megacephala</i> แมลงวันหลังลาย <i>Parasarcophaga ruficornis</i> แมลงวันบ้าน <i>Musca domestica</i> มด
ระยะเน่าสลาย (Active Decay Stage)	4-5	ศพมีการสลายของเนื้อเยื่อภายใน มีกลิ่นเหม็นมาก	แมลงวันหลังลาย <i>Parasarcophaga ruficornis</i> มด
ระยะเน่าสลาย เต็มที่ (Advance Decay Stage)	6-9	ภายนอกศพเริ่มแห้ง บางส่วนภายในศพยังไม่แห้ง ยังคงมีกลิ่นเหม็น	ด้วงหนังสัตว์ <i>Dermestes maculatus</i> (รูป 13-16) แมลงวันหลังลาย <i>P. ruficornis</i> <i>Necrobia rufipes</i>

			<i>Trox</i> sp. แมงมุม มด
ระยะแห้ง (Dry Remains)	ตั้งแต่วันที่ 10	ศพเกือบแห้งทั้งหมด มีกลิ่นเหม็นน้อยลง	ด้วงหนังสัตว์ <i>Dermestes maculates</i> <i>Fannia</i> sp (รูป 12) <i>Necrobia rufipes</i> <i>Trox</i> sp. แมงมุม มด

จากการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างแมลงทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะตัวอ่อน ระยะดักแด้ และ ตัวเต็มวัย ได้แมลงรวมทั้งหมด 181 ตัว โดยจัดอยู่ใน 2 Order ได้แก่ แมลงใน Order Diptera คือ *Chysomya rufifacies* (77.90 %), *C. megacepala* (8.29 %), *Parasarcophaga ruficornis* (4.97%), *Musca domestica* (2.76 %) และ *Fannia* sp. (1.11%) และแมลงใน Order Coleoptera คือ *Dermestes maculates* (4.97 %) (ตาราง 2 และ 3)

นอกจากนี้ยังพบแมลงอื่น ๆ คือ Order Gamasida เช่น *Poecilochiras* sp., Order Aranae เช่น แมงมุม, Order Hymenoptera เช่น มด และ Class Diplopoda เช่น กิ้งกือ

จากการศึกษาพบว่าตัวเต็มวัยของแมลงที่สุ่มเก็บจากซากไก่ได้จำนวนมากที่สุด คือ แมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* (ตารางที่ 3) ส่วนตัวอ่อนและดักแด้ที่เก็บได้จากซากไก่ ได้นำมาจำแนกชนิด พบว่า เป็นแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ทั้งหมด

การแยกเพศของแมลงวันหัวเขียวทั้งสองชนิดจะแยกโดยใช้ลักษณะของตา คือระยะห่างของตาทั้งสองข้าง ซึ่งตัวผู้ตาทั้งสองข้างจะชิดติดกันและตัวเมียตาทั้งสองข้างจะห่างกัน ซึ่งจากการศึกษาพบแมลงวันเพศเมียมีตาที่สฟไก่มากกว่าเพศผู้ (รูปที่ 17 และ 18)

ตารางที่ 2 ลักษณะการเน่าของซากไก่ที่มีความสัมพันธ์กับแมลงที่พบในแต่ละระยะของการเน่าสลาย

Genus/species	Stages of Decaying pig				
	Fresh (0-1day)	Bloated (2 day)	Active (3 day)	Advanced (4-6 day)	Dry (7-30 day)
<i>Chrysomya rufifacies</i>	A	E,I,A	E,I,A	I	I
<i>Chrysomya megacephala</i>	A	A	A	-	-
<i>Parasarcophaga ruficornis</i>	A	A	A	A	-
<i>Musca domestica</i>	A	A	-	-	-
<i>Fannia</i> sp.	-	A	-	-	-
<i>Piophilidae casei</i>	-	-	A	-	-
<i>Dermestes maculatus</i>	-	-	-	A	A
<i>Hister</i> sp.	-	-	-	A	-
<i>Necrobia</i> sp.	-	-	-	A	-
<i>Trox</i> sp.	-	-	-	A	A
Spider (not identified)	-	A	A	A	A
Ants	A	A	A	A	A

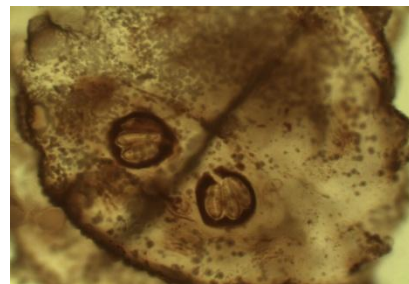
หมายเหตุ : A = ตัวเต็มวัย, E = ไข่, L = ระยะตัวอ่อน, P = ระยะดักแด้

ตารางที่ 3 จำนวนและชนิดของแมลงตัวเต็มวัยและตัวอ่อนที่สุ่มเก็บจากซากไก่

Order	Genus/species	จำนวนแมลงที่สุ่มเก็บ (%)
Diptera	<i>Chrysomya rufifacies</i>	141 (77.90%)
	<i>Chrysomya megacephala</i>	15 (8.29%)
	<i>Parasacophaga ruficornis</i>	9 (4.97%)
	<i>Musca domestica</i>	5 (2.76%)
	<i>Finnia canicularis</i>	2 (1.11%)
Coleoptera	<i>Dermestes maculatus</i>	9 (4.97%)
รวม		181 (100%)



รูปที่ 6 แมลงวันหัวเขียว *Chrysomya rufifacies*



รูปที่ 7 Poterior spiracle ของแมลงวัน *C. rufifacies*



รูปที่ 8 แมลงวันหัวเขียว *C. Megacephala*



รูปที่ 9 ตาของแมลงวัน *C. megacephala* (เพศผู้)



รูปที่ 10 แมลงวันหลังลาย (*Parasarcophaga ruficornis*)



รูปที่ 11 แมลงวันบ้าน (*Musca domestica*)



รูปที่ 12 แมลงวัน *Fannia* sp.



รูปที่ 13 ตัวหนังสือตัว *Demestes maculatus* (ด้าน dorsal)



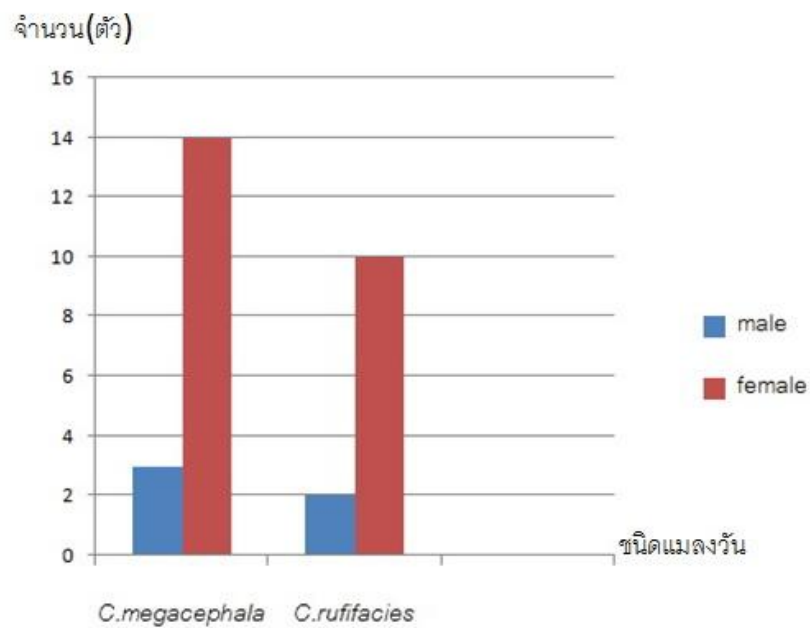
รูปที่ 14 ตัวหนังสือตัว (ด้าน ventral)



รูปที่ 15 ระยะตัวอ่อนของตัวหนังสือตัว



รูปที่ 16 ระยะคักคักของตัวหนังสือตัว



รูปที่ 17 กราฟแสดงชนิดและจำนวนของแมลงวันหัวเขียวแยกตามเพศ



รูปที่ 18 – 19 แมลงวันหัวเขียวเพศผู้ (ตาขีด) ตัวเมีย (ตาห่าง)

อภิปรายผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะการเน่าสลาย (Decomposition) ของซากไก่ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแมลงชนิดต่าง ๆ บนซากไก่ในแต่ละช่วงเวลาของการเน่าสลาย สามารถแบ่งระยะการเน่าสลายออกเป็น 5 ระยะ คือ fresh, bloat, active decay, advance decay และ skeletonization ซึ่งระยะเวลาในการเน่าสลายตั้งแต่ระยะ fresh จนถึงเริ่มระยะ skeletonization ใช้เวลาทั้งสิ้น 7 วัน ซึ่งกระบวนการการเน่าสลายของซากไก่สอดคล้องกับ

งานวิจัยของ อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะ ที่ได้ศึกษาการเน่าสลายของซากหมู ซึ่งได้แบ่งกระบวนการการเน่าสลายออกเป็น 5 ระยะ ใช้เวลาทั้งสิ้น 30 วัน โดย ระยะ fresh ใช้เวลา 0-1 วัน, ระยะ bloat ใช้เวลา 2 วัน, ระยะ active decay ใช้เวลา 3 วัน, ระยะ advance decay ใช้เวลา 4-6 วัน และ ระยะ skeketonization ใช้เวลา 7-30 วัน ส่วนผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกันคือระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการเน่าสลาย ซึ่งระยะเวลาในการเน่าสลายที่ต่างกันนี้อาจขึ้นอยู่กับขนาดของซากตัวอย่าง ซึ่งขนาดของซากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ที่มีขนาดเล็กกว่า การศึกษาของ อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะจึงใช้เวลาในการย่อยสลายน้อยกว่าซากที่มีขนาดใหญ่ โดยการศึกษานี้ได้ใช้ซากไก่อ่านหนัก 1.5 กิโลกรัม ส่วน อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะใช้ซากหมูมีน้ำหนัก 3-4 กิโลกรัม⁽²⁾ และจากการศึกษาของ Catts & Goff ในปี 1992 พบว่าซากสัตว์ที่ใช้ทำการทดลองมีน้ำหนักประมาณ 23 กิโลกรัมจะมีลักษณะของการเน่าสลายใกล้เคียงกับศพมนุษย์มากที่สุด⁽¹²⁾ และเนื่องจากสัตว์ที่มีลักษณะของชั้นผิวหนังคล้ายมนุษย์มากที่สุดคือหมู การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่จึงนิยมใช้หมูเป็นเหยื่อในการศึกษาแมลงที่มีความเกี่ยวข้องกับการเน่าสลาย แต่ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีข้อจำกัดในงบประมาณจึงได้ใช้ซากไก่ที่มีน้ำหนักเพียง 1.5 กิโลกรัม ซึ่งเป็นอีกปัจจัยที่ทำให้ระยะเวลาในการเน่าสลายของซากไก่แตกต่างจากการเน่าสลายของซากหมูที่มีลักษณะใกล้เคียงกับศพของมนุษย์มากกว่า ดังนั้นหากมีการศึกษาในทางนิติภุติวิทยาในพื้นที่ควรใช้ศพหมูเป็นเหยื่อต่อแมลง

นอกจากนี้อุณหภูมิของพื้นที่รอบ ๆ ยังมีผลต่ออัตราการเน่าสลายของซากไก่ โดยหากสิ่งแวดล้อมอุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้อัตราการเน่าสลายเกิดขึ้นได้เร็วกว่าอุณหภูมิต่ำ นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่ออัตราการเน่าสลาย เช่น ความชื้น พิกัดทางภูมิศาสตร์⁽¹³⁾ อุณหภูมิของพื้นที่ที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 24.5-31.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60-80 ซึ่งอุณหภูมิในการศึกษาตรงกับการศึกษาของ อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะเนื่องจากมีอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกันรวมทั้งยังมีพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย โดย อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะ ได้ศึกษาในมหาวิทยาลัยนเรศวร ส่วนในการศึกษานี้ทำในเขตทุ่งนาของบ้านคลองหนองเหล็กซึ่งห่างจากมหาวิทยาลัยประมาณ 1 กิโลเมตร ส่วนฤดูกาลซึ่งการวิจัยนี้ทำในระหว่างเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม ซึ่งอยู่ในช่วงปลายฤดูร้อนและต้นฤดูฝนทำให้สภาพภูมิอากาศฝนพรมมีอุณหภูมิต่ำสุดที่ 24.9 องศาเซลเซียสและสูงสุดที่ 29.7 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 65.9 – 90.4 ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพและระยะเวลาการเน่าสลายของซากศพเพราะเป็นช่วงคาบเกี่ยวระหว่างฤดูจะมีฝนตกทำให้ซากที่แห้งแล้วกลับมาเปียกและเน่าสลายกลืนล่อแมลงมาที่ซากอีกครั้ง เป็นผลให้ระยะเวลาในการเน่าสลายและชนิดของแมลงแตกต่างจากการศึกษาของ อภิชาติ วิทย์ตะ และคณะ ในปี 2005 ที่ทำการศึกษาในฤดูร้อนคือช่วงกลางเดือนกุมภาพันธ์ถึงกลางเดือนมีนาคม อุณหภูมิ 22.4 - 35.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยร้อยละ 68.7 โดยในการศึกษาดังกล่าวไม่ระบุว่ามีฝนตกอาจทำให้ระยะเวลาของการเน่าสลายของซากแตกต่างกันจากการศึกษานี้

ส่วนการศึกษาชนิดของแมลงกลุ่ม Diptera ในมหาวิทยาลัยนเรศวรโดยใช้ดับวัวเป็นเหยื่อล่อแมลงในฤดูฝนคือ ปลายเดือนสิงหาคม ถึงต้นเดือนกันยายน ปี 2007 พบว่าการย่อยสลายใช้เวลาไม่ถึง 30 วัน ซึ่งผลการศึกษา คล้ายคลึงกับการศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้จะใช้เหยื่อที่แตกต่างกันก็ตาม⁽⁸⁾

โดยธรรมชาติของการเน่าสลาย เมื่อมีการตายจะมีปฏิกิริยาหลังการตายเกิดขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลง ในทางเคมีและระบบกล้ามเนื้อ ในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีนั้นจะมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นเรียกว่า lividity ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงและเฮโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในเส้นเลือด การเกิด lividity นี้จะเริ่มเกิด ตั้งแต่หลังตายและจะเกิดไปเรื่อย ๆ และเห็นชัดเจนสุดหลังจากเสียชีวิตแล้ว 12 ชั่วโมง ส่วนการเปลี่ยนแปลง ของระบบกล้ามเนื้อนั้น เมื่อมีการตายเกิดขึ้น ร่างกายจะมีการสูญเสีย Adenosine triphosphate (ATP) ทำให้ กล้ามเนื้อเกิดการหดเกร็งเรียกว่า rigor mortis เนื่องจากปกติแล้ว ATP จะทำงานร่วมกับ actin และ myosin ซึ่งเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อ ในการที่จะทำให้กล้ามเนื้อเกิดการยืดหยุ่น ดังนั้นเมื่อ ATP ลดลงจนหมดจะทำให้เส้นใย actin และ myosin อยู่ในสภาพของ actomyosin ซึ่งเป็นลักษณะของกล้ามเนื้อที่ไม่สามารถยืดหดได้ สฟก็จะเกิดการแข็งเกร็ง อย่างไรก็ตามการประมาณระยะเวลาหลังการตายหลังจากเวลา 24 ชั่วโมงไปแล้ว ชนิดและวงจร ชีวิตของแมลงจะให้ผลถูกต้องและแม่นยำกว่า lividity และ rigor mortis (14) และจากการศึกษานี้พบว่าซากไก่ เมื่อมีการเน่าจะทำให้เกิดแก๊สขึ้น ซึ่งแก๊สนี้เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในทางเดินอาหาร (anaerobic gas forming bacteria) เกิดการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในลำไส้จะมีแบคทีเรียชนิดนี้ ก่อนข้างมาก ส่งผลให้เกิดกลิ่นซึ่งจะมีผลต่อการดึงดูดสิ่งมีชีวิตประเภทต่างๆมายังซากไก่ โดยแมลงจะเป็น สิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่มายังซากศพและเข้าทำลายศพ⁽⁴⁾ แมลงที่พบในการศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นแมลงใน order Diptera และ order Coleoptera แมลงใน order Diptera ที่พบได้แก่ *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, *Parasarcophaga*, *Musca domestica*, *Fannia* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vitta และคณะที่พบ *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies*, *Parasarcophaga*, *Musca domestica*, *Parasarcophaga ruficornis*, *Piophilidae casei*, *Hister* sp., *Necrobia rufipes* และ *Trox* sp. ได้ทำการศึกษาชนิดของแมลงบนซากหมู ที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำในมหาวิทยาลัยนเรศวรอีกรายงานหนึ่ง ที่พบ *C. megacephala*, *C. rufifacies*, *M. domestica*, *Fannia* sp., *Piophilidae* sp. โดยศึกษาชนิดของแมลงในมหาวิทยาลัย นเรศวร ในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายนโดยใช้ดับวัวเป็นเหยื่อล่อ⁽⁸⁾ ส่วนงานวิจัยของนพวรรณ บุญชูมี ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการศึกษานี้ โดยการศึกษาของนพวรรณ บุญชู ในหลายพื้นที่ของจังหวัด พิษณุโลกพบแมลงที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ 12 ชนิดคือ *C. megacephala*, *C. chain*, *Achoetandrus(Chrysomya) rufifacies*, *Ceylomonyiac(Chrysomya) nigripes*, *Hemipyrelia ligurriens*, *H. pulchra*, *Lucilia cuprina*, *L.perphyrina*, *Stomorhyna discolor*, *Isomyia pseudoridana*, *Hypopygiopsis*

infumata, *Rhycomya* spp.⁽⁹⁾ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบแมลงปีกแข็งใน order Coleoptera คือ *Dermestes maculatus* ซึ่งจะมาในระยะ advance decay ในการศึกษาที่ผ่านมาพบแมลงในระยะ advance decay และ skeletonization เช่นเดียวกัน⁽²⁾

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บเอาระยะตัวอ่อนของแมลงวันจากซากไก่ มาแยกชนิดโดยศึกษาจาก cephalopharyngeal skeleton (CK), posterior spiracle (PS), anterior spiracle (AS) และ spine (SP) บนตัวอ่อนของแมลงวัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอ่อนระยะที่ 3 (L₃) สามารถใช้ในการแยกกลุ่มของแมลงที่มีความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ โดย Sukontason ได้ใช้ลักษณะของ CK, PS, AS และ SP ของแมลงวันหัวเขียว *C. megacephala* และ *C. rufifacies* ในการแยกชนิดของแมลงวันดังกล่าว(15)(16) โดยพบว่า สามารถใช้ลักษณะดังกล่าว CK, AS และ SP ในการแยกความแตกต่างได้ โดยลักษณะของ CK ที่แตกต่างกันคือความยาวของ dorsal lobes (DC) และ ventral cornua (VC) ของ *C. megacephala* จะมีความยาวที่ค่อนข้างต่างกัน แต่ความยาวของ DC และ VC ของ *C. rufifacies* จะมีความยาวที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ลักษณะที่แตกต่างกันอีกลักษณะหนึ่งคือ AS โดย *C. megacephala* จะมีจำนวน papillae 12 papillae ส่วน *C. rufifacies* พบเพียง 10 papillae นอกจากนี้ลักษณะของ SP ระหว่าง prothorax และ mesothorax ก็มีความแตกต่างกันคือ SP ของ *C. megacephala* จะมีขนาดเล็กและสั้น ส่วน spine ของ *C. rufifacies* จะมีขนาดใหญ่ซึ่งเรียงตัวอยู่ตรงกลางของ thoracic segment ที่เห็นได้ชัดเจน

สำหรับตัวเต็มวัยที่เก็บได้จากสถานที่ที่ทำการศึกษามีทั้ง *C. megacephala* และ *C. rufifacies* แต่ผู้วิจัยพบตัวอ่อนแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ซึ่งมีลักษณะมีหนามยาวตรงปลายมีหนามขนาดเล็กสีดำประมาณ 10-15 หนามซึ่งมีลักษณะเรียกว่า Hairy maggot ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของตัวอ่อน L3 ของ *C. rufifacies*⁽¹⁶⁾ แต่ไม่พบตัวอ่อนของ *C. megacephala* สอดคล้องกับการศึกษาของแสงชัย นทิวรรณ และ นพวรรณ บุญชู ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะเกิดจาก ตัวอ่อนของ *C. rufifacies* จะกินตัวอ่อนของ *C. megacephala* เป็นอาหาร หลังจาก *C. megacephala* เข้าสู่ Instar larva ระยะที่ 1 รวมทั้งพื้นที่ๆ ทำการศึกษาเป็นเขตชนบทที่มีภูมิประเทศเป็นทุ่งนาและป่า จึงพบ *C. rufifacies* มากกว่า *C. megacephala* (13)(17) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาในบริเวณเดียวกัน⁽²⁾⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบแมลงวันหัวเขียว *C. nigripes* จากการเก็บตัวอย่าง⁽⁹⁾ นอกจากนี้ตัวเต็มวัยของ *C. megaceph*, *C. rufifacies*, *Parasarcophaga*, *Fannia* sp. แล้วการศึกษาที่ผ่านมายังพบแมลงปีกแข็ง *D. maculatus* เป็นแมลงอีกชนิดหนึ่งที่พบในระยะ advance decay และ skeletonization จากการรายงานของ อภิชาติ วิทย์ตะ ในปี 2007 นอกจากนี้ Kumara และคณะได้รายงานการพบด้วง *D. ater* (De geer) บนศพของผู้ตายรายหนึ่ง ในประเทศมาเลเซีย โดยประมาณค่า PMI จากระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วง *D. ater* คาดว่าผู้ตายน่าจะตายมาแล้ว 14 วัน⁽⁶⁾

การประยุกต์ใช้วงจรชีวิตแมลงในการประมาณเวลาหลังการตายได้มีรายงานทั่วโลก เช่น ในประเทศนอร์เวย์ ได้มีการศึกษาตัวอ่อนในระยะที่ 3 ของ *Cynomya mortuorum* ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ข้อมูลเกี่ยวกับระยะเวลาหลังการเสียชีวิตได้ ซึ่งตัวอ่อนเก็บได้จากปากของศพและข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายของแมลงชนิดนี้ทำให้ทราบว่า ศพได้เสียชีวิตมาแล้ว 7 เดือน ก่อนจะถูกพบ(17) ในประเทศอิตาลีได้มีรายงานการศึกษาแมลงวัน *Calliphora loewi* เพื่อใช้ประเมินระยะเวลาหลังการตาย นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงวันชนิดนี้เป็นแมลงวันชนิดแรกที่มายังซากศพ และผู้วิจัยได้แนะนำให้ใช้ผลวิเคราะห์ DNA ประกอบด้วย เพื่อการประมาณระยะเวลาหลังการตายถูกต้องแม่นยำมากขึ้น⁽¹⁸⁾ สำหรับประเทศไทย นภาพร ศรีตะวันิช ใช้ *C. megaceph* และ *D. maculates* ในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย โดยในการศึกษาแรก เป็นศพเพศหญิงที่ศพพบนอนด้วยหงส์ตัว *D. maculatus* แล้วได้ศึกษาวงจรชีวิตของตัวหงส์ตัวดังกล่าว PMI ได้ประมาณ 19-24 วัน ซึ่งตรงกับคำรับสารภาพของฆาตกรที่ทำให้ทราบระยะเวลาการตายที่แท้จริงคือ 22 วัน ในกรณีศึกษาที่ 2 เป็นเพศหญิงสภาพศพเปลือยลอยน้ำ บนศพพบนอนแมลงวันหัวเขียว *C. megacephala* และจากการศึกษาวงจรชีวิตตัวดังกล่าว PMI ได้ประมาณ 4 วัน นอกจากนี้ Sukontason ในปี 2007 ได้ระบุว่าแมลงปีกแข็ง *D. maculates* เป็นแมลงที่มีความสำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์⁽²¹⁾

การศึกษานี้ใช้ลักษณะของ CK, SP บน thoracic segment ที่ 1 และ thoracic segment ที่ 2, AS และ PS ในการแยกชนิดของตัวอ่อนแมลงวันหัวเขียว ระยะที่ 3 เนื่องจาก Sukontason และ คณะ ได้ระบุว่าอวัยวะดังกล่าวใช้แยกชนิดของแมลงวัน *C. megacephala* และ *C. rufifacies* ได้ดี เนื่องจากตัวอ่อนในระยะที่ 3 จะมีการเจริญและเปลี่ยนแปลงของอวัยวะข้างต้น ดังนั้นนักนิติวิทยาศาสตร์จึงสามารถระบุชนิดของแมลงวันได้ถูกต้องกว่าตัวอ่อนระยะอื่น⁽¹⁶⁾⁽²²⁾

การศึกษากการเจริญเติบโตของแมลงวันทั้งสองชนิดในสภาวะต่างๆพบว่า *C. megacephala* มีอัตราการเจริญเติบโตสูงในช่วงฤดูร้อนและจะเจริญเติบโตช้าในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตประมาณ 31.4 องศาเซลเซียส ส่วน *C. rufifacies* ก็มีแนวโน้มเช่นเดียวกัน ส่วนการศึกษาวงจรชีวิตนั้นพบว่า *C. rufifacies* จะเข้าสู่ระยะดักแด้หลังจากวางไข่แล้ว 144 ชั่วโมง และ *C. megacephala* จะเข้าสู่ระยะดักแด้หลังจากวางไข่แล้ว 156 ชั่วโมง ซึ่งข้อมูลนี้สามารถนำมาประกอบในการประมาณ PMI เพื่อเป็นประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนคดีอาชญากรรมได้⁽¹⁶⁾

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงเข้าฤดูฝน การศึกษานี้ในอนาคตควรจึงทำการศึกษาในฤดูกาลอื่นๆเพิ่มเติมเพื่อเป็นข้อมูลเฉพาะของพื้นที่นี้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับฤดูกาลรวมทั้งเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์มากยิ่งขึ้น

นอกจาก *D. Maculatus* แล้ววิจัยยังพบแมลงปีกแข็ง *Trox* sp. และ *Necrophorus* sp. ซึ่งมักจะมุดลงไป ในซากไก่ ผู้วิจัยจึงไม่ได้เก็บตัวอย่างแมลงปีกแข็งทั้งสองชนิดนี้ เนื่องจากการเก็บดังกล่าวอาจทำลายลักษณะ ของซากไก่อันมีผลต่อการสังเกตการเน่าสลายของซากในระยะท้ายของการเน่าสลาย อย่างไรก็ตามการศึกษา ทางด้านนิติกีฏวิทยาในอนาคตนอกจากจะศึกษาเกี่ยวกับการวัดขนาดของแมลงแล้ว ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับ พิษวิทยาและอนุชีวะ โมเลกุลของแมลงด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลประกอบที่มีประโยชน์มากยิ่งขึ้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยพบว่า การเน่าสลายของซากไก่สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ระยะ คือ fresh, bloat, active decay, advanced decay และ skeletonization โดยในแต่ละระยะของการเน่าสลายจะมีความสัมพันธ์กับ ชนิดของแมลงที่มาขังซากไก่ โดยในแต่ละระยะของการเน่าสลายจะพบชนิดของแมลงที่แตกต่างกันออกไป ซึ่ง การศึกษานี้ได้ทำการสุ่มตัวอย่างของแมลงที่พบบนซากไก่ ซึ่งพบทั้งระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อน และดักแด้ จากนั้น นำมาศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อบันทึกจำนวนและแยกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าตัว เต็มวัยของแมลงที่สุ่มเก็บจากซากไก่ได้จำนวนมากที่สุดคือ *C. rufifacies* ส่วนตัวอ่อนและดักแด้ที่เก็บได้จาก ซากไก่ได้นำมาจำแนกชนิดพบว่าเป็นแมลงวันหัวเขียว *C. rufifacies* ทั้งหมด ซึ่งการแยกของแมลงวันจะนิยมใช้ ลักษณะของ CS AS และ spine บนตัวอ่อน PS ของตัวอ่อนระยะ L₃ และ AS ของตัวเต็มวัยส่วนระยะดักแด้ไม่ นิยมใช้แยกชนิดของแมลงวัน สำหรับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษา ทางด้านนิติกีฏวิทยาในพื้นที่ที่ทำการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณ อนุกุล พิษณุวิวัฒน์ งานธุรการ สำนักงานเลขานุการ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรใน การให้คำแนะนำในการถ่ายภาพแมลงผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพิสิฐ แสงอนันตการ คุณสุรพร นาคอ้งและอาจารย์ยุทธพงษ์ ทองพบ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการให้ความช่วยเหลือระหว่างทำการทดลอง และ ขอขอบคุณอาจารย์ Helmer Barimbao Montejo สาขาวิชาภาษาอังกฤษภาควิชาภาษาตะวันตก คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัย นเรศวร ในการให้คำแนะนำและช่วยตรวจสอบความถูกต้องของบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

References

- (1) วิสุทธิ์ ชะริโต. นิติกฎหมาย. วารสารนิติเวชศาสตร์ 2552 ; 2(3) : 39-50.
- (2) Vitta A, Pumidonming W, Tangchaisuriya U, Poodeeandean C, Nateeworanart S. A preliminary study on insects associated with pig (*Sus scrofa*) carcasses in Phitsanulok, northern Thailand. Trop Biomed 2007; 24(2) : 2-4.
- (3) Sukontason K, Bunchu N, Chaiwong T, Moophayak K, Sukontason K L. Forensic important flesh fly species in Thailand : morphology and development rate. Parasitol Res 2010 ; 106 : 1055-64.
- (4) Sritavanich N, Jamjanya T, Hamboon Y, Jamsuwan A. An application of forensic entomology to evaluate post-mortem interval. KKU Res 2007 ; 7(2) : 1-5.
- (5) Jamjanya T, Sritavanich N, Jamsuwan A, Hanboonsong Y. The use of Dermestid to evaluate Post –Mortem Interval. Abstract the 2nd International conference on Forensic Science and Medical Science 2007 ; 116.
- (6) Kumara TK, Abu Hassan A, Che Salma M R , Bhupinder S. The infestation of *Dermestes ater*(De Geer) on a human corpse in Malaysia. Tropical Biomed 2009 ; 26(1) : 73-9.
- (7) อภิชาติ วิฑ์ตะ, วิลาวรรณ ภูมิดอนมิ่ง, อุดมศักดิ์ ตั้งชัยสุริยา, ชนสรณ์ ภูเด่นแดน. รายงานการวิจัยการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับนิติกฎหมายบนซากมนุษย์. พิษณุโลก: คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2548
- (8) Nateewornart S, Vitta A, Poodeeandean C, Mirasena S. Diptera species associate with the cow-liver bait in Naresuan university, Phitsanulok Thailand.(Abstract)The 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science 2008 ; 30.
- (9) Bunchu N, Sanit S, Sontigun N, Boonleat A, Rungkrajang T, Sukontason K, et al. Blow fly species (Diptera:Calliphoridae) in different landscape of Phitsanulok province, Thailand. Naresuan Reserch Conference; 2010. July 29-31; Naresuan University, Phitsanulok; 2010.
- (10) Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law. Flies as forensic indicators. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2002. 54-153.
- (11) แสงชัย นทีวรณารณ, นพวรรณ บุญชู, อภิชาติ วิฑ์ตะ, สังกัป สุดสวาท, ยุทธพงษ์ ทองพบ. ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์กับเทคนิคการทำให้อ่อนหนอนแมลงวันหัวเขียวใสเพื่อศึกษาส่วน Cephalopharyngeal skeleton. วารสารนิติเวชศาสตร์ 2553; 3(2): 85-91.
- (12) Catt EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. Annual Review of Entomology 1992 ; 37: 253-72.

- (13) Campobasso CP, Vella GD, Introna F. Factors affecting decomposition and diptera colonization. *Forensic Sci Int* 2001; 120: 18-27.
- (14) อรรถพล แซ่มสุวรรณวงศ์. นิติวิทยาศาสตร์ 3 เพื่อการสืบสวนสอบสวน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ทีซีจี พรินติ้ง จำกัด; 2544.
- (15) แสงชัย นทีวรรณกร นพวรรณ บุญชู อภิชาติ วิทย์ตะ. การวัด Cephalopharyngeal skeleton ของ *Chrysomya megacephala* ระยะ third instar larvae ที่เก็บจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. *วารสารเทคนิคการแพทย์* 2553; 38(1): 3100-6
- (16) Sukontason K, Piangjai S, Siri Wattanarungsee S, Sukontason KL. Morphology and development rate of blowflies *Crysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. *Parasitol Res* 2008; 102:1207-16.
- (17) Stærkeby, M., Dead larvae of *Cynomya mortuorum* (L.) (Diptera, Calliphoridae) as indicators of the post-mortem interval a case history from Norway. *Forensic Sci Int*; 2001. 120(1-2): 77-8.
- (18) Vanin, S., et al., Insects found on a human cadaver in central Italy including the blowfly *Calliphora loewi* (Diptera, Calliphoridae), a new species of forensic interest. *Forensic Science International*, 2011. 207(1-3): 30-3.
- (19) Kulshrestha, P. and D.K. Satpathy, Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Sci Int*, 2001. 120(1-2): 15-7.
- (20) Sukontason K, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Sribanditmongkol P, Bhoopat T, et al. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. *Parasitol Res* 2007 ; 101: 1417–23.
- (21) นภาพร ศรีตะวานิช, ทศนีย์ แจ่มจรรยา, ยุพา หาญบุญทรง, อัมพร แจ่มสุวรรณ. การประยุกต์ใช้นิติภูมิวิทยาในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับบัณฑิตศึกษา* 2550; 7(2): 1-5.
- (22) Sukontason KL, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Piangjai S, Boonsriwong W, et al. Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blow flies. *Forensic Sci Int*. 2006; 164(2-3): 230-4.

ประสิทธิภาพ และความไวของวิธี Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) สำหรับการตรวจระบุเพศจากตัวอย่างเลือดมนุษย์

Efficiency and Sensitivity of Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Sex Determination from Human Blood Samples

จิราฤทธิ์ วังตา*

นพ.ธนาธิกร ภูพัฒน์**

พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์***

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิค loop mediated isothermal amplification สำหรับการตรวจระบุเพศจากตัวอย่างเลือดมนุษย์ การทดสอบได้ใช้ตัวอย่างเลือดจากเพศชาย 15 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดจากเพศหญิง 15 ตัวอย่าง การทดลองในครั้งนี้ใช้กระบวนการของเทคนิค LAMP ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายใต้เงื่อนไขอุณหภูมิเดียวตลอดทั้งปฏิกิริยาสำหรับการตรวจวัดหาชิ้น Amelogenin Y อุณหภูมิของปฏิกิริยา และเวลาที่เหมาะสมซึ่งใช้ในกระบวนการของเทคนิค LAMP สำหรับการตรวจวัดหาชิ้น Amelogenin Y ในครั้งนี้ คือ 63 °C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80 °C นาน 10 นาที ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ตัวอย่างจากเพศชาย 15 ตัวอย่างให้ผลเป็น positive และตัวอย่างจากเพศหญิง 14 ตัวอย่างให้ผลเป็น negative แต่มีตัวอย่างเพศหญิง 1 ตัวอย่างให้ผลเป็น false positive นอกจากนี้ผลของการตรวจวัดความไวชี้ให้เห็นว่า ปริมาณของดีเอ็นเอแบบน้อยสุดที่ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ 70.5625 นาโนกรัม ดังนั้นจึงสรุปว่าเทคนิค LAMP สามารถที่จะใช้สำหรับการระบุเพศจากตัวอย่างเลือดมนุษย์ได้

คำสำคัญ: Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP, Amelogenin Y

* สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ศาสตราจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

This study aimed to detect the efficiency and sensitivity of loop mediated isothermal amplification for sex determination from human blood samples. Analysis was performed using fifteen blood samples for each sex. In this experiment, the LAMP method that amplifies DNA at isothermal condition was evaluated for detection of Amelogenin Y gene. Reaction temperature and time of LAMP assay for the Amelogenin Y gene were also optimized at 63 °C for 60 minutes and inactivate at 80 °C for 10 minute, respectively. Result indicated that all male samples and one female sample gave a positive reaction. Furthermore, the sensitivity showed that the minimum amount of template required for successful amplification was 70.5625 ng. Thus, we concluded that the LAMP assay can potentially be used for sex determination from human blood samples.

Key words: Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP, Amelogenin Y

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ได้เข้ามามีบทบาทในการทำประโยชน์กับงานหลาย ๆ ด้าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์เพื่อการวินิจฉัยโรค อุศนากรรม และสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิต เกษตรกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการตรวจ DNA ทางนิติวิทยาศาสตร์ เรามักจะคุ้นเคยกับคำว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้บ่งบอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล พัฒนาขึ้นใช้ครั้งแรกโดย ศาสตราจารย์ Alec Jeffreys ในปี ค.ศ. 1985 และพบว่าลายพิมพ์ ดีเอ็นเอจะเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละบุคคล โอกาสที่คนสองคนจะมี ดีเอ็นเอเหมือนกันมีค่าเท่ากับ 1 ใน 9,340 ล้าน ซึ่งสูงกว่าจำนวนประชากรในโลกนี้ (สุรินทร์, 2548) งานนิติวิทยาศาสตร์นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหาความสัมพันธ์ของบุคคลว่าเป็นพ่อ แม่ ลูกกันจริงหรือไม่ อีกทั้งยังช่วยในการหาตัวผู้กระทำความผิดจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งเอาไว้ที่เกิดเหตุ และเรามักจะพบว่าวัตถุพยานชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งไว้ในที่เกิดเหตุนั้นมีปริมาณที่น้อยมากซึ่งอาจทำให้ยากต่อการตรวจพิสูจน์ ด้วยเหตุนี้ จึงมีการนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำเพาะส่วนก่อนโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1986 โดย Kary Mullis สามารถ

เพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ เป็นจำนวนมาก ภายในระยะเวลาอันสั้นในหลอดแก้ว (in vitro) (หัทธยา, 2549) ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมากเพื่อง่ายต่อการตรวจสอบ ในปี ค.ศ. 2000 Notomi *et al.* ได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบใหม่ ชื่อว่า Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ได้ถูกทำการวิจัยแล้วว่าเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ดีกว่าเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทั้งในด้านของควมมีประสิทธิภาพสูง (efficiency) ความไว (sensitivity) ความแม่นยำ (precision) ความจำเพาะ (specificity) และความประหยัด (cheapness) (Eiken GENOME SITE, 2005) ด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาของเทคนิคนี้ทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจที่จะนำเทคนิคนี้มาพัฒนาต่อยอดในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

ในปัจจุบันเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในงานทางด้านการแพทย์ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่สงสัยเพื่อตรวจวินิจฉัย และหาแนวทางรักษาได้ทันทั่วทั้งที่ แต่การนำมาใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) นั้นยังมีน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นการสมควรอย่างยิ่งที่จะต้องทำการวิจัยเพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งจะส่งผลดีให้กับหน่วยงานด้านความยุติธรรม ในเรื่องของความรวดเร็ว และลดความยุ่งยากในการตรวจพิสูจน์ รวมไปถึงการประหยัดงบประมาณของรัฐได้อย่างมหาศาล

ความแตกต่างของ LAMP กับ PCR มีอยู่หลายอย่างด้วยกัน LAMP ใช้อุณหภูมิเดียวตลอดทั้งปฏิกิริยา (isothermal) ส่วน PCR นั้นต้องใช้อุณหภูมิหลากหลายในหนึ่งรอบของปฏิกิริยา (thermal cycler) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิค LAMP มีความยุ่งยากน้อยกว่าเพราะเพียงแค่ใช้ incubator ก็สามารถทำได้แล้ว ในขณะที่เทคนิค PCR ต้องใช้เครื่องมือสำหรับ PCR ที่มีราคาแพงกว่า และมีขั้นตอนการตั้งค่าเครื่องมือที่ยุ่งยากมากกว่า นอกจากนี้การที่ LAMP ใช้ Primer ถึงสี่ตัวที่จำเพาะกับตำแหน่งจดจำบนยีนที่สนใจ ทำให้ LAMP มีความจำเพาะมากกว่า PCR ที่ใช้ primer เพียงแค่สองตัว (Moradi *et al.*, 2008) ในส่วนของ enzyme polymerase เทคนิค LAMP ใช้ *Bst.* polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) ซึ่ง *Tag* polymerase ที่ใช้ใน PCR นั้นไม่มีคุณสมบัตินี้ ในด้านของกลไกการสังเคราะห์ LAMP จะใช้ DNA ต้นแบบที่มีลักษณะคล้ายดัมเบล เป็น DNA ตั้งต้นในการสังเคราะห์ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการทำงานร่วมกันระหว่าง enzyme *Bst.* polymerase และ primer ที่มีลักษณะเฉพาะตัว นอกจากนี้ LAMP product ที่นำไปทำ agarose gel electrophoresis จะพบเป็นแถบ ladder เนื่องจากว่าผลิตภัณฑ์ของ LAMP มีหลากหลายขนาดแตกต่างกัน (จิตรลัดดา และคณะ, 2554) สำหรับระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในหนึ่งรอบของปฏิกิริยา เทคนิค LAMP สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ 10^9 copies โดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ซึ่งเทคนิค PCR ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มากกว่านั้น (Notomi *et al.*, 2000) ข้อดีของ LAMP อีกประการ

หนึ่งคือ สามารถดูผลของการตรวจวัดได้ด้วยตาเปล่า (visual detection) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของ Magnesium pyrophosphate ที่เกิดจากการรวมกันของ pyrophosphate ion จาก dNTPs กับ magnesium ion จาก LAMP reaction buffer (Buates, 2009)

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพ และความไวในการระบุเพศของมนุษย์จากเลือดซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่พบได้บ่อย โดยมุ่งประเด็นความสนใจไปที่ ยีน Amelogenin Y ซึ่งผลของงานวิจัยจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ดีในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มประชากร

ตัวอย่างเลือดสกัดเพศชายที่ไม่เกี่ยวข้องกันจำนวน 15 คน และตัวอย่างเลือดสกัดเพศหญิงที่ไม่เกี่ยวข้องกันจำนวน 15 คน

2. ลำดับเบส Primer ของ Y-chromosome Specific Primer

FIP: 5'-aatccgaatggcaggcagg-ccagtttaagctctgatggtt-3' (41 mer)

F1c (nt433-452)-F2 (nt382-402)

BIP: 5'-gactctttcctcctaaataggttg-ttttgcctttcatggaac-3' (44 mer)

B1c (nt453-477)-B2 (nt513-531)

B3: 5'-ctggtcagtcagagttgac-3' (nt533-551)

F3: 5'-gggtcccaattttacagtcc-3' (nt349-368)

3. วิธีการทดสอบ

สกัดตัวอย่างทั้ง 30 ตัวอย่างด้วยวิธี Chelex reagent

ความเข้มข้นของสารในปริมาตรสุดท้ายเป็นดังนี้ Primer Mix (FIP 40 pmol, BIP 40 pmol, F3 5 pmol, B3 5 pmol), *Bst* Polymerase 8 U, 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, pH 8.8 @ 25 °C, Betaine 0.8 M, dNTPs 0.4 mM each และ Template ลงในหลอด micro centrifuge ขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรรวมของสารละลายให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

การตรวจหา sensitivity จะกระทำโดยการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจวัด DNA template ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี Phenol-Chloroform แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop ทำการเจือจางตัวอย่าง

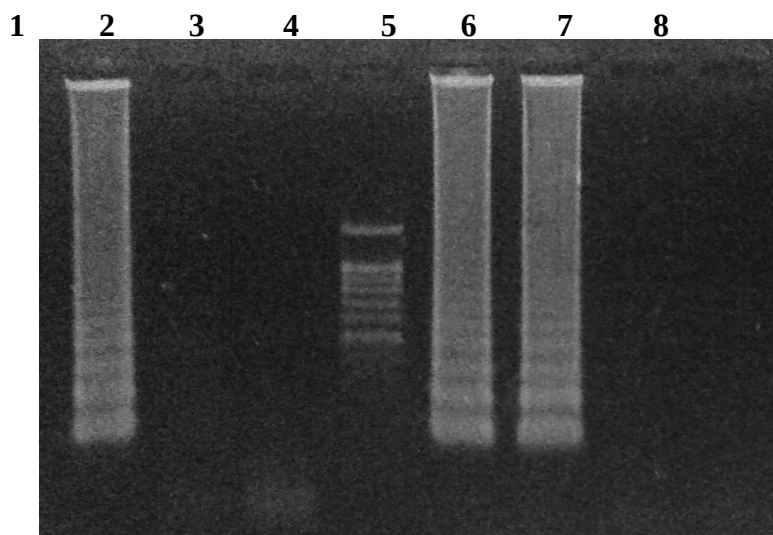
DNA เป็น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 เท่า แล้วใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

4. การตรวจสอบผลการทดลอง

นำ LAMP product 5 µl ผสมกับ loading dye 1 µl แล้วนำไปโหลดบน agarose gel จากนั้นแช่เจลใน ethidium bromide นาน 30 นาที ดูผลเปรียบเทียบกับ ladder 100 bp

ผลการศึกษา

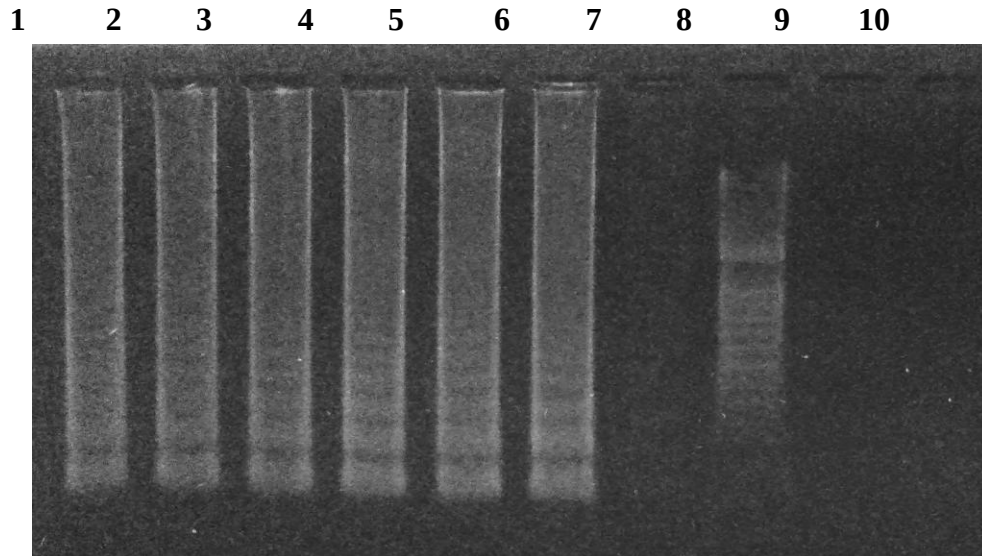
ผลการทดสอบการระบุเพศในตัวอย่างเลือดมนุษย์จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค LAMP แสดงให้เห็นว่าผลการตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในตัวอย่างเลือดสกัดที่เป็นเพศชายทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น Positive ทั้ง 15 ตัวอย่าง และให้ผลเป็น Negative ศูนย์ตัวอย่าง สำหรับผลการตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในตัวอย่างเลือดสกัดเพศหญิงจำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลเป็น Positive 1 ตัวอย่าง โดยที่มีแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ Smear ซึ่งถือว่าเป็น False Positive และผลเป็น Negative 14 ตัวอย่าง ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค LAMP ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วยการ run agarose gel electrophoresis ได้แสดงไว้ดังภาพ 1



ภาพ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

Lane 1 Positive Control, Lane 2 Negative Control, Lane 3 Negative H₂O,
Lane 4 100 bp, Lane 5 and 6 Positive tests, Lane 7 and 8 Negative tests

ผลการทดสอบความไวของเทคนิคพบว่าปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 70.5625 ng จนถึง 2,261 ng ยังสามารถตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP ใน Agarose gel ได้อยู่ แต่ปริมาณดีเอ็นเอ 35.328125 ng ลงไปไม่สามารถตรวจพบแถบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP ใน Agarose gel ได้ ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ดังภาพ 2



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification

Lane 1: Positive undiluted (male DNA), Lane 2: Positive diluted $\frac{1}{2}$, Lane 3: Positive diluted $\frac{1}{4}$

Lane 4: Positive diluted $\frac{1}{6}$, Lane 5: Positive diluted $\frac{1}{8}$, Lane 6: Positive diluted $\frac{1}{10}$

Lane 7: Positive diluted $\frac{1}{12}$, Lane 8: 100 bp ladder, Lane 9: Negative H_2O

Lane 10: Negative Undiluted (female DNA)

อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค LAMP พบว่าตัวอย่างเลือดสกัดเพศชาย 15 ตัวอย่าง ถูกทดสอบว่าเป็น positive 15 ตัวอย่าง และตัวอย่างเพศหญิง 15 ตัวอย่างถูกทดสอบว่าเป็น negative 14 ตัวอย่าง และให้ผล smear เป็น false positive 1 ตัวอย่าง ซึ่งหนึ่งตัวอย่างที่เกิดผล false positive นี้ผู้ศึกษาได้ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำทั้งหมดสามครั้งซึ่งผลของการทดสอบทั้งสามครั้งให้ผลเป็น smear false positive เช่นเดิม ผู้ศึกษาคาดว่าความผิดพลาดที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากสองปัจจัยด้วยกันคือ

1. เกิดจากการที่ตัวอย่างสกัดเพศหญิงตัวอย่างไม่เกิดการปนเปื้อน
2. เกิดจากความไม่คงที่ของอุณหภูมิในขณะทำการทดสอบ

เนื่องจากเทคนิค LAMP มีความไวสูง การที่มีละอองของตัวอย่างที่เป็น positive เพียงน้อยนิดปนเปื้อนลงไปในตัวอย่าง negative ก็อาจทำให้เกิดผลที่มีการปนเปื้อนได้ และจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างที่เป็น positive ก็ให้ผลที่เป็น smear ได้เช่นกัน และการที่ตัวอย่าง positive ให้ผลเป็น smear นั้น ผู้ศึกษาตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจากการที่มีปริมาณของดีเอ็นเอน้อยเกินไป ซึ่งผู้ศึกษาก็ได้ทำการทดสอบสมมติฐานนี้ด้วยการนำตัวอย่างเลือดสกัดเพศชายที่สกัดด้วยวิธี Chelex reagent มาทำการเจือจาง แล้วทำการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP จากการทดสอบพบว่าตัวอย่างเลือดที่สกัดด้วยวิธี Chelex ซึ่งถูกเจือจางในปริมาณมากนั้นมีอัตราการเกิดผล smear สูง แต่ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Phenol Chloroform แม้ว่าจะถูกเจือจางในปริมาณมาก ก็ไม่ปรากฏผล smear ดังนั้นจากการทดสอบเบื้องต้นนี้ผู้ศึกษาคาดว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Chelex นั้นได้ดีเอ็นเอที่ไม่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ และวิธีสกัดแบบ Chelex ก็เป็นวิธีอย่างหยาบที่ไม่สามารถให้ปริมาณดีเอ็นเอที่คงที่ได้ในแต่ละครั้งของการดูดจ่ายดีเอ็นเอจึงทำให้เกิดปัญหาการ smear ขึ้น ซึ่งปัญหาการ smear นี้ ไม่พบในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Phenol Chloroform ซึ่งข้อสมมติฐานดังกล่าวตรงกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* ที่บอกว่าการผลิตผลของเทคนิค LAMP ไม่เพียงพออาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะขึ้นมาได้ (Zhang *et al.*, 2009) ซึ่งวิธีแก้ไข Nagamine *et al.* บอกว่า loop primer จะช่วยลดอัตราการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะได้ (Nagamine *et al.*, 2002)

สำหรับการปนเปื้อนในตัวอย่างเพศหญิงนี้ก็แบ่งออกได้เป็นสามกรณีด้วยกันคือ มีการปนเปื้อนในขณะเตรียม master mix, มีการปนเปื้อนในขณะดูดจ่ายดีเอ็นเอ template และมีการปนเปื้อนลงไปในหลอดของ template โดยตรง ซึ่งกรณีที่ผู้ศึกษาคาดว่าเป็นไปได้มากที่สุดก็คือกรณีที่สาม มีการปนเปื้อนลงไปในหลอดของ template โดยตรง เนื่องจากว่าในกรณีแรก หากปนเปื้อนลงไปใน master mix จะต้องมิแถบ Smear ปรากฏอยู่ใน negative control ของการทดลองด้วย แต่สำหรับการทดลองชุดนี้ไม่เกิดการปนเปื้อนในตัวอย่าง negative control หากเป็นการปนเปื้อนในรูปแบบที่สอง คือ มีการปนเปื้อนในขณะดูดจ่ายดีเอ็นเอ template ก็เป็นกรณีที่เป็นไปได้ น้อยมากเนื่องจากการทดสอบซ้ำ ในครั้งที่สองและครั้งที่สาม ผู้ศึกษาได้ทำการป้องกันด้วยการใช้ tip ที่ใส่ตัวกรองด้วยสำลีมาเช็ดแล้ว ซึ่งมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดการปนเปื้อนจากการดูดจ่าย template ในตัวอย่างเดียวกันถึงสามครั้ง

สำหรับปัจจัยที่สองเกิดจากความไม่คงที่ของอุณหภูมิในการทดสอบ จากการที่ผู้ศึกษาพบว่าความคงที่ของอุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP นั้นมีผลต่อคุณภาพของผลการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP กล่าวคือ ผู้ศึกษาได้ทำการทดสอบการใช้เครื่อง Incubator ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาสำหรับเทคนิค LAMP เป็นสามลักษณะด้วยกัน คือ

1. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองผ่านเครื่อง Incubator โดยตรง และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จากเครื่อง Incubator เป็นเกณฑ์วัด

2. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองผ่านเครื่อง Incubator โดยตรง และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จาก Thermometer เป็นเกณฑ์วัด
3. ให้ความร้อนกับหลอดทดลองโดยผ่านทางน้ำที่ให้ความร้อนด้วยเครื่อง Incubator และใช้ค่าอุณหภูมิที่ได้จาก Thermometer เป็นเกณฑ์วัด

จากผลการทดสอบด้วยวิธีทั้งสามพบว่า วิธีที่สามมีอัตราความผิดพลาดของผลการทดลองน้อยที่สุด รองลงมาก็เป็นวิธีที่สอง และวิธีที่หนึ่งให้ผลการทดลองที่มีอัตราความผิดพลาด มากที่สุด

สำหรับการทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดมนุษย์ สกัดด้วยวิธี Phenol-Chloroform และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ 2261, 1130.5, 556.25, 141.3125 และ 70.5625 นาโนกรัม สามารถตรวจพบแถบชั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมใน agarose gel electrophoresis และปริมาณดีเอ็นเอที่ 35.328125 นาโนกรัม ไม่สามารถตรวจพบแถบชั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมใน agarose gel electrophoresis ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Chu *et al.* ที่บอกว่า ปริมาณดีเอ็นเอน้อยสุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis คือ 10 นาโนกรัม (Chu *et al.*, 2010) ที่เป็นอย่างนี้ผู้ศึกษาคาดว่าเป็นเพราะข้อจำกัด และความแตกต่างของการทดลองทั้งในเรื่องของตัวอย่าง และวิธีการสกัด Chu *et al.* ใช้ตัวอย่างจาก buccal cell แต่สำหรับการทดลองของผู้ศึกษาใช้ตัวอย่างสกัดจากเลือด ซึ่งผู้ศึกษามีความเห็นว่ ในเลือดอาจจะมีตัวยับยั้ง (inhibitor) ที่ไปรบกวนปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP ทำให้ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมนั้นลดลงซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Deguo *et al.* ที่บอกว่า วิธีการสกัดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเทคนิค LAMP เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค LAMP จะมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีความบริสุทธิ์สูง และ Deguo ได้อธิบายว่า ตัวรบกวนซึ่งอาจจะ เป็น organic หรือ inorganic substance เช่น detergents, antibiotics, phenolic compounds, enzymes, polysaccharides, fats, proteins และ salts ซึ่งอาจจะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเทคนิคได้ รวมถึงไปมีผลโดยอ้อมต่อการทำงานของ primers (Deguo *et al.*, 2008) สำหรับการที่เลือกดูผลใน agarose gel electrophoresis เนื่องจาก ประการที่หนึ่ง agarose gel electrophoresis เหมาะสมสำหรับที่จะใช้ดูผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ (สุรินทร์, 2552) ซึ่งตรงกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการจะตรวจวัดนั่นคือ Amelogenin Y gene ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับยีน ประการที่สอง เนื่องจากเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง ความไวสูง และความจำเพาะสูง ดังนั้น การตรวจวัดจึงไม่ควรจะยุ่งยาก กล่าวคือ ควรจะตรวจวัดได้ด้วย agarose gel electrophoresis และจากการทดสอบพบว่าสามารถมองเห็นได้ใน agarose gel จึงไม่จำเป็นที่จะต้องใช้อcrylamide gel อีก

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพ และความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ด้วยการตรวจระบุเพศในตัวอย่างเลือดมนุษย์ที่สกัดด้วยวิธี Chelex reagent พบว่า ตัวอย่างเลือดสกัดเพศชาย 15 ตัวอย่าง ถูกทดสอบว่าเป็น Positive 15 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดสกัดเพศหญิง 15 ตัวอย่างถูกทดสอบว่าเป็น Negative 14 ตัวอย่าง และให้ผล Smear เป็น False Positive 1 ตัวอย่าง จากการคำนวณค่า Performance Characteristics ของการทดสอบเทคนิคพบว่า Sensitivity ของการทดสอบเท่ากับ 100 %, Specificity ของการทดสอบเท่ากับ 93%, False Negative Rate ของการทดสอบเท่ากับ 0%, False Positive Rate ของการทดสอบเท่ากับ 7%, Predictive Value Positive ของการทดสอบเท่ากับ 94% และ Predictive Value Negative ของการทดสอบเท่ากับ 100% นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบสมมติฐานด้วย Chi-Square พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจวัดยีน Amelogenin Y ในเพศชาย และเพศหญิงได้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับการทดสอบความไวของเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดมนุษย์ สกัดด้วยวิธี Phenol-Chloroform และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่ 2261, 1130.5, 556.25, 141.3125 และ 70.5625 นาโนกรัม สามารถตรวจพบแถบชั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมใน Agarose Gel Electrophoresis และปริมาณดีเอ็นเอที่ 35.328125 นาโนกรัม ไม่สามารถตรวจพบแถบชั้นบันไดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมใน Agarose Gel Electrophoresis

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี ที่กรุณาให้ความรู้เกี่ยวกับการปฏิบัติงานจริงในห้องปฏิบัติการสำหรับเทคนิค LAMP

References

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2548). พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หัตถา กาวิวงศ์. (2549). อนุพันธุศาสตร์ MOLECULAR GENNETIC: ห้างหุ้นส่วนจำกัด บุญไชยการพิมพ์.

Buates, S. (2009). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method: an Easy and Fast Gene Amplification Method for Detection of Malaria Parasites. วิทยาศาสตร์เพื่อการพัฒนา: รวบรวมบทความวิชาการ ตลอดครบรอบ 50 ปี แห่งการสถาปนาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 131-138.

- Chu, E., Nathinee, P., Wansika, K. (2010). Identification of Human DNA by Lood-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method. *วารสารการประชุมวิชาการ "นิติพันธุศาสตร์ไทย ก้าวไกลสู่สากล", 1.*
- Deguo, W., Guicheng, H., Fugui, W., Yonggang, L., Daxi, R. (2008). Drawback of loop-mediated isothermal amplification. *African Journal of Food Science, 2*, 083-086.
- Moradi, A., Hagh, K. A., Nazari, A., Ahmadi, Z., Soroori, Z. R., Javadi, SM. (2008). Comparison of the PCR and LAMP Techniques in the Diagnosis of Salmonella Infection. *Molecular Biology Research Center.*
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes, 16*, 223-229.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. (2000). Loop-Mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research, 28*, e63.
- SITE, E. G. (2005). About LAMP Method, from <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>
- Zhang, Z-P., Zhang, Y., Liu, J-P., Zhang, J-T., An, Z-X., Quan, F-S., Zhang, L., Cai, X., Pu, SWJ. (2009). Codeposition of dNTPs Detection for Rapid LAMP-based Sexing of Bovine Embryos. *Repord Dom Anim, 44*, 116-121.

การตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในเลือดของศพที่ตายจากการจมน้ำโดยใช้เทคนิคลูปมีดิเอเตคไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน

Detection of *Streptococcus salivarius* in Postmortem Blood of Drowning Victims using Loop-Mediated Isothermal Amplification

อนิลดา เนตกุล *

นพ.ธานินทร์ ภูพัฒน์ **

พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ ***

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยการเสียชีวิตจากการจมน้ำยังเป็นปัญหาอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากลักษณะที่ตรวจพบบางอย่างไม่สามารถจะชี้ชัดได้ว่าผู้ตายนั้นเสียชีวิตจากการจมน้ำ *Streptococcus salivarius* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่บริเวณช่องปาก ลำคอ และคอหอยจะเข้าไปสู่กระแสเลือดในขณะที่มีการสำลักน้ำและอาจนำมาเป็นตัวบ่งชี้สาเหตุการตายจากการจมน้ำได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในตัวอย่างเลือดจากหัวใจ 2 กลุ่ม ได้แก่ศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำจำนวน 16 ศพ และกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นจำนวน 16 ศพ โดยใช้เทคนิค Loop - Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ที่จำเพาะต่อส่วนของยีน glucosyltransferase K (*gtfK*) ผลที่ได้ตรวจพบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในเลือดจากหัวใจศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำจำนวน 10 ศพ จาก 16 ศพและตรวจไม่พบเชื้อในเลือดจากกลุ่มเสียชีวิตจากสาเหตุอื่น การเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิค LAMP และเทคนิค PCR ในกลุ่มเลือดคนจมน้ำ 16 ตัวอย่างพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน จากผลพบว่าผลการตรวจพบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในเลือดโดยเทคนิค LAMP สามารถใช้บ่งชี้การตายจากการจมน้ำได้

คำสำคัญ: จมน้ำ, *Streptococcus salivarius*, LAMP

* สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ศาสตราจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

Diagnosis of drowning is still difficult in autopsy. There are no pathognomonic findings to indicate drowning as a cause of death. *Streptococcus salivarius* is a flora bacterium in human oral, throat and trachea. In case of drowning, *Streptococcus salivarius* may entrance to the blood circulation via the respiratory tract and might therefore be used as an indicator of drowning. The amplification of *Streptococcus salivarius*-specific sequence in glucosyltransferase K gene (*gtfK*) was performed by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Heart blood from sixteen diagnosed drowning bodies and other sixteen non-drowning cases were analyzed for the presence of *Streptococcus salivarius* DNA sequence by LAMP. *Streptococcus salivarius* DNA was identified in ten drowning cases but not detected in the other group. However, PCR technique was also performed to target the material DNA sequence in sixteen drowning cases. The result showed that PCR can detect *Streptococcus salivarius* DNA in ten of sixteen cases and as effective as LAMP. This study showed that the detection of *Streptococcus salivarius* by LAMP can be used as indicator for drowning.

Key words: Drowning, *Streptococcus salivarius*, LAMP

บทนำ

การเสียชีวิตจากการจมน้ำยังเป็นปัญหาที่ยากต่อการวินิจฉัยในทางการแพทย์เนื่องจากลักษณะที่ตรวจพบบางอย่าง เช่น การเกิดฟองฟอด (fine forth) อยู่บริเวณจมูก ปาก หลอดลมและปอด cyanosis ปอดบวม น้ำ การมีจุดเลือดออกที่บริเวณผนังอวัยวะภายในนั้นไม่สามารถจะชี้ชัดได้ว่าผู้ตายนั้นเสียชีวิตจากการจมน้ำ เช่น อาการปอดบวมน้ำอาจพบผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจ และการเกิดฟองฟอด (fine forth) อาจพบได้ในผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น การที่จะวินิจฉัยว่าเป็นการเสียชีวิตจากการจมน้ำ ต้องระบุให้ได้ว่าผู้ตายได้มีการหายใจเอาน้ำหรือสิ่งปนเปื้อนเข้าไปมากจนไปขัดขวางการทำงานของระบบทางเดินหายใจ

โดยปกติแล้วในคนที่เสียชีวิตจากการจมน้ำนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณช่องปาก ลำคอ และคอหอย จะเข้าไปสู่กระแสเลือดได้ผ่านทางระบบทางเดินหายใจ *Streptococcus salivarius* เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่

บริเวณช่องปากของมนุษย์ จากการศึกษาและการทดลองจำนวนมากพบว่าส่วนใหญ่ในเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำพบแบคทีเรียจำพวก *Streptococcus salivarius* ในขณะที่ผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นไม่พบการปรากฏของแบคทีเรียชนิดนี้ *Streptococcus salivarius* จึงเป็นแบคทีเรียที่ช่วยในการวินิจฉัยผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำได้

เทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำนั้นเริ่มแรกทำโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏขึ้นมาเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารต้องใช้เวลาพอสมควร จึงมีการพัฒนาเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงขึ้น คือวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของแบคทีเรียโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการจะตรวจสอบในตัวอย่างที่สนใจ เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แต่ข้อเสียเปรียบของเทคนิค PCR นั้นนอกจากการทำงานต้องใช้ระยะเวลานานหลายชั่วโมงแล้ว ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต้องอาศัยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่แตกต่างกันหลายอุณหภูมิ ทำให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลาในการทำงานเป็นอย่างมาก จึงได้มีผู้คิดค้นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เรียกว่า เทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เทคนิคนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR แล้วพบว่าเป็นวิธีที่ใช้เวลาในกระบวนการทำน้อยกว่า และขั้นตอนการทำนั้นไม่ยุ่งยากเนื่องจากใช้อุณหภูมิในการทำเพียงอุณหภูมิเดียว การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* แต่เดิมจากการใช้เทคนิค PCR นั้นจึงเริ่มมีการปรับเปลี่ยนมาใช้เทคนิค LAMP แทน ในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์มีการเริ่มทำในตัวอย่างที่เป็นน้ำลาย น้ำอสุจิ และปัสสาวะของมนุษย์เท่านั้น

ความรู้ดังกล่าวจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคนิคใหม่ คือ Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการตรวจเชื้อ *Streptococcus salivarius* จากเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ และผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น เพื่อหาเทคนิคที่ รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการเสียชีวิตจากการจมน้ำต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1.กลุ่มประชากร

ใช้กลุ่มตัวอย่างทดลอง 2 กลุ่มคือ กลุ่มศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำจำนวน 16 ศพ และกลุ่มศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นจำนวน 16 ศพ

2. วิธีเก็บตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บจากหัวใจและการเก็บเลือดนั้นเก็บโดยเทคนิคปราศจากเชื้อ ไม่ทิ้งตัวอย่างไว้หลายวันจนเกินไป

3. ตัวควบคุมผลบวก (Positive control) และตัวควบคุมผลลบ (Negative control)

ตัวควบคุมผลบวก ได้จากการนำน้ำลายมาสกัดเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยใช้ น้ำลายปริมาตร 1 ml สกัดตามวิธีการสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียในเลือด ส่วนตัวควบคุมผลลบ คือตัวอย่างที่เป็นเลือดใช้น้ำเลือดของผู้ที่ไม่ได้เสียชีวิตจากการจมน้ำ และตัวอย่างที่เป็นน้ำ

4. วิธีการทดสอบ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดทั้งหมดด้วยวิธี Chelex^[1] จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

โดยประยุกต์ใช้วิธีของ Nakanishi *et al.*, 2011^[6] โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อในส่วน of glucosyltransferase K (*gtfK*) มีขั้นตอนและการใช้ไพรเมอร์ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของ Primer mix ที่ใช้ในปฏิกิริยา 25 μ l

Primer		ความเข้มข้นสุดท้าย ในปฏิกิริยา 25 μ l
F3	5'-GTTACTGCTGACAAACCAG- 3'	0.2 μ M
B3	5'-CCTTAATTTTCGGCTTCAGAA- 3'	0.2 μ M
FIP	5'-CAGGTTTGGCTTCAACCTCTACGTTCAACCAATTCAGGAAC- 3'	1.6 μ M
BIP	5'-GTTGCTACTAAACCAGAAACAGCACTTCTCAGTCGTTGGAG- 3'	1.6 μ M
LF	5'-TGCTGCAGCTCTATCACTAG- 3'	0.8 μ M
LB	5'-AGAAGTCGCTGCAAATGCTG- 3'	0.8 μ M

ปฏิกิริยาเกิดในส่วนผสมที่มีปริมาตร 25 μ l ซึ่งประกอบไปด้วย น้ำ 9 μ l, 10X reaction buffer 2.5 μ l, 4M betaine 4.0 μ l, 5 mM each dNTPs 4.0 μ l, Primer mix 2.5 μ l, 8u/ μ l *Bst* polymerase 1 μ l และ Template 2 μ l และมี LAMP condition ดังนี้

- แห่อบที่อุณหภูมิ 63 $^{\circ}$ C นาน 60 นาที
- หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}$ C นาน 2 นาที

5. การตรวจสอบผลการทดลอง

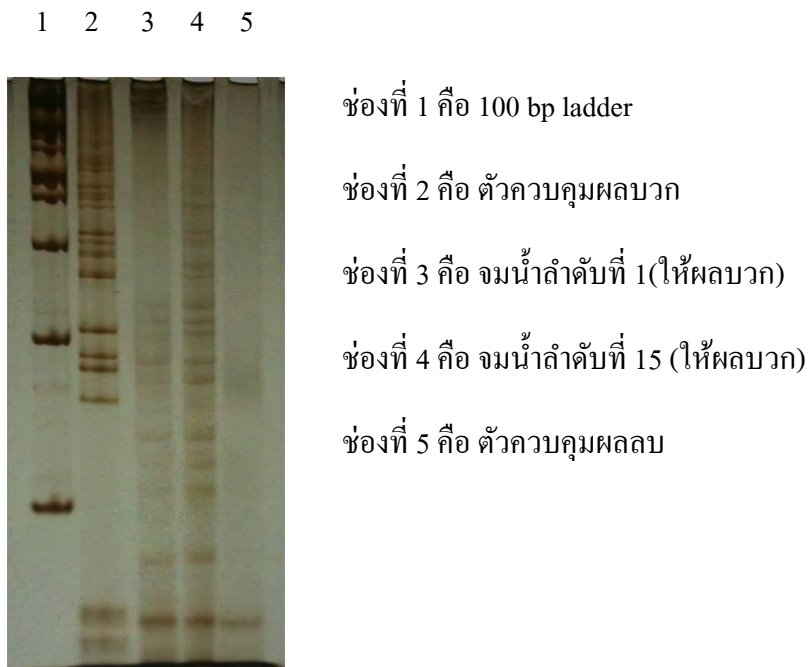
ตรวจสอบว่ามี Lamp products โดยการทำ polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อผลเป็นบวกจะปรากฏแถบดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นขั้นบันได ส่วนผลลบจะไม่ปรากฏแถบที่มีลักษณะเป็นขั้นบันได

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยพบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในตัวอย่างเลือดจากหัวใจของศพที่วินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำ จำนวน 10 ตัวอย่างจาก ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อในเลือดจากศพเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นทั้ง 16 ตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ผลการตรวจพบพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius*

	พบ	ไม่พบ	ผลรวม
จมน้ำ	10	6	16
ไม่จมน้ำ	0	16	16
	10	22	32



ภาพ 1 แสดงตัวอย่างการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยเทคนิค LAMP ในตัวอย่างเลือดจากหัวใจของศพ ที่วินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำ

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปทดสอบสมมุติฐานด้วย Chi-square test ที่ α เท่ากับ 0.05 df เท่ากับ 1 ค่า χ^2 จากผลการทดลองได้เท่ากับ 14.54 ซึ่งมากกว่าค่า χ^2 จากในตาราง จึงปฏิเสธ H_0 แสดงให้เห็นว่า อัตราการตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยวิธี LAMP ในกลุ่มศพที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ แตกต่างจากในกลุ่มศพที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นอย่างมีนัยสำคัญ

อภิปรายผลการวิจัย

ในการตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในกลุ่มผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำทั้งหมด 16 ตัวอย่าง ตรวจพบผลบวก 10 ตัวอย่าง ตรวจพบผลลบ 6 ตัวอย่างซึ่งสามารถอธิบายแยกเป็นกรณีดังนี้ กลุ่มที่ให้ผลบวก คือตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16 ซึ่งสอดคล้องกับผลการชันสูตรศพ กลุ่มที่ให้ผลลบ คือ ตัวอย่างที่ 4, 5, 7, 9, 12, 13

ตัวอย่างที่ 4, 5, 13 ผลไม่สอดคล้องกับการชันสูตรเนื่องจากตัวอย่างเลือดได้มาจากศพที่มีสภาพเน่าแล้ว ทั้ง 3 ตัวอย่าง สาเหตุที่ตรวจไม่พบเชื้อ *Streptococcus salivarius* อาจเนื่องมาจากเมื่อศพเน่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ได้เจริญเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วแข่งขันกับเชื้อ *Streptococcus salivarius* ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อชนิด

นี้จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีความต้านทานน้อยกว่าแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จึงไม่สามารถเจริญเติบโตแข่งกับแบคทีเรียในลำไส้ได้

ตัวอย่างที่ 9 แม้จะมีการชันสูตรว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำในอ่างน้ำแต่ตรวจพบปริมาณแอลกอฮอล์และยาอื่นๆในปริมาณสูงและมีโรคประจำตัวหลายโรค ทำให้เสียชีวิตง่ายกว่าคนทั่วไป การชันสูตรพบปอดบวมน้ำเพียงเล็กน้อย การจมน้ำอาจเป็นการจมน้ำแบบไม่สมบูรณ์ ทำให้แบคทีเรียเข้าไปสู่กระแสเลือดได้แต่ไม่มากพอที่จะตรวจพบเชื้อ

ตัวอย่างที่ 7 ให้ผลไม่สอดคล้องกับการวินิจฉัย พบว่าผู้ตายมีโรคหัวใจเป็นโรคประจำตัวและมีอาการหมดสติก่อนล้มหน้าคว่ำลงไปในห้องน้ำตื้นๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 12 ที่พบศพบริเวณทุ่งนา ซึ่งเป็นแหล่งที่มีน้ำขังอยู่น้อยและยังตรวจพบปริมาณของยาบางชนิด ทั้งสองกรณีอาจจะมีการจมน้ำเพียงเล็กน้อย (Early drowning) ทำให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดน้อยผลจึงเป็นลบ

สารเคมีมีความสำคัญมากในกระบวนการ LAMP ดังเช่น betaine การวิจัยในช่วงแรกไม่ได้ใส่สารชนิดนี้ลงไปทำให้ผลไม่ขึ้น เมื่อลดปริมาณความเข้มข้นของ betaine เหลือ 0.4 M ผลไม่ขึ้นเช่นกัน หน้าที่ของ betaine ยังไม่มีผู้ค้นพบแน่ชัด แต่มีงานวิจัยพบว่า betaine มีหน้าที่ในการเตรียมสายดีเอ็นเอแม่แบบให้มีความเหมาะสมกับเอ็นไซม์ polymerase นอกจากนั้นยังมีความสามารถในการลดความเสถียรของสายดีเอ็นเอที่มีปริมาณของ C และ G มากได้อีกด้วย (Yeh *et al.*, 2005)

ปริมาณของ Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) มีความจำเป็นเช่นกัน การตรวจสอบในช่วงแรกใช้ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 mM each ปรากฏผลออกมาเป็นลบ ในบางตัวอย่างปรากฏแบนที่จางมาก หลังจากเพิ่มความเข้มข้นของ dNTPs เป็น 0.8 mM each แบนตัวอย่างให้ผลบวกชัดเจนขึ้น dNTPs เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอ ในการทำงานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด อาจต้องอาศัย dNTPs ที่มากพอที่จะสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้น้อยกว่างานวิจัยของ Nakanishi และคณะ (Nakanishi *et al.*, 2011)

งานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้วิธีการตรวจหาเชื้อ *Streptococcus salivarius* จากงานวิจัยของ Nakanishi และคณะ แต่ในการปฏิบัติงานจริงสารเคมีบางชนิดได้ใช้ความเข้มข้นแตกต่างจากงานวิจัยข้างต้น ในงานวิจัยของ Nakanishi ได้ใช้ชุดน้ำยาดูแลสำเร็จ (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) งานวิจัยนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนปริมาณอัตราส่วนสารเคมีขึ้นใช้เองโดยไม่ต้องซื้อชุดน้ำยาดูแลสำเร็จ ซึ่งไม่มีขายในประเทศหากนำเข้าจะมีราคาที่แพงมาก อัตราส่วนความเข้มข้นของสารบางตัวถูกปรับลดลง เช่น dNTPs จากชุดน้ำยาต้องการความเข้มข้นสุดท้าย

เท่ากับ 1.4 mM each ในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นเพียง 0.8 mM each เท่านั้น $MgSO_4$ ในชุดน้ำยาใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 8 mM ในงานวิจัยลดลงเหลือ 2 mM (Nakanishi *et al.*, 2011)

การตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในกลุ่มเลือดจากศพจมน้ำโดยเทคนิค PCR และเทคนิค LAMP พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งสองเทคนิคสามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งหมด 10 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 ตัวอย่างเนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับพยาธิสภาพของศพ การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเทคนิค LAMP ใช้เวลาในกระบวนการทำเพียง 1 ชั่วโมง 2 นาที ซึ่งรวดเร็วกว่าการวินิจฉัยโดยเทคนิค PCR ที่ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง (รวิศรา, 2010) และเทคนิคการนำเลือดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Lucci *et al.*, 2008) ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างต่ำ 3 วัน การเชอบสามารถทำในเครื่องมือพื้นฐานอย่างเช่น เครื่อง incubator ได้ทำให้การปฏิบัติงานแต่ละครั้งมีความสะดวกไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจเลือดจากผู้ที่เกี่ยวข้องกับการจมน้ำ และที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น ต้องพิจารณาพยาธิสภาพแวดล้อมต่างๆ ร่วมด้วย ไม่ว่าจะเป็นการจมน้ำแบบไม่สมบูรณ์ หรือสภาพศพที่เน่าอาจทำให้ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อได้

สรุป

ผลการวิจัยพบว่าตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในตัวอย่างเลือดจากหัวใจของศพที่วินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำ จำนวน 10 ตัวอย่างจากทั้งหมด 16 อย่าง และตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อในเลือดจากศพเสียชีวิตจากสาเหตุอื่น

การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยวิธี Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในกลุ่มศพที่เสียชีวิตจากการจมน้ำและกลุ่มศพที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค LAMP ใช้ในการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* เพื่อช่วยในการวินิจฉัยการจมน้ำได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธีนี้ยังต้องคำนึงถึงพยาธิสภาพอื่นๆร่วมด้วย เช่น การเน่าของศพ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

บุคลากรภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้เอื้อเฟื้อสถานที่และให้ปรึกษาเกี่ยวกับงานวิจัย การเก็บตัวอย่างเลือดและคำแนะนำที่มีประโยชน์ในงานวิจัยนี้

References

- [1] ชานินทร์ ภูพัฒน์, วิฑูรย์ ทะสุขะ. Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวช (SOP for DNA Analysis for Forensic Medicine). เชียงใหม่: ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2005.
- [2] รวิศรา ไชยมหาวัน. การใช้เทคนิค PCR เพื่อการตรวจสอบเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในเลือดศพที่ตายจากการจมน้ำ เทียบกับศพที่ตายจากสาเหตุอื่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (นิติวิทยาศาสตร์), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่, 2553
- [3] Kudo Y H, Yoshino M, Kojima T, Ikedo M. Loop – mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*. 253, (2005): 155-161
- [4] Lucci A, Cirnelli A. A microbiological test for the diagnosis of death by drowning. *Forensic Scie Int*. 168, (2006): 34-36
- [5] Lucci A, Campobasso C P, Cirnelli A, Lorenzini G. A promising microbiological test for the diagnosis of drowning. *Forensic Sci Int*. 128, (2008): 20-26
- [6] Nakanishi H, Ohmori T, Hara M, Takada A, Shojo H, Adachi N, Saito K. A simple Identification method of saliva by detecting *Streptococcus salivarius* using loop – mediated isothermal amplification. *J Foren Sci*. 56, (2011): 158- 161
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop - mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28, (2000): 63e
- [8] Suto M, Kato N, Abe S, Nakamura M, Tsuchiya R, Hiraiwa K. PCR detection of bacterial genes provides evidence of death by drowning. *Leg Med (Tokyo)*. 11, (2009): 354-356
- [9] Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop – mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocol*. 3, (2008): 877-882
- [10] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Evaluation of Loop - Mediated Isothermal Amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *J Microbiol Methods*. 63, (2005): 36-44

การจำแนกชนิดหมัดและนิติวิทยาศาสตร์

Flea identification and forensic science

แสงชัย นทีวรณารณ *

บทคัดย่อ

หมัดเป็นแมลงที่ไม่มีปีก และมีส่วนของปากที่ใช้ในการแทงและดูดกินเลือด หมัดเป็นปรสิตภายนอกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การฟื้นตัวของแมลงนี้มีความสำคัญเนื่องจากนักวิทยาศาสตร์สามารถใช้ในการประมาณเวลาหลังการตายในร่างที่จมน้ำ บทความนี้กล่าวถึงการระบุชนิดหมัดและความสำคัญทางนิติวิทยาศาสตร์ของแมลงชนิดนี้

คำสำคัญ: หมัด การแยกชนิดหมัด นิติวิทยาศาสตร์

Abstract

Fleas are wingless insects with mouthparts adapted for piercing skin and sucking blood. These insects are external parasites of mammals. The insects' recovery rate is important because scientists can estimate the time of death, in the case of the body having been immersed in water. This review is about flea identification and its important in forensic science.

Keywords: flea, flea identification, forensic science.

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

บทนำ

ในทางนิติวิทยาศาสตร์ ได้ใช้แมลงวันและสัตว์ขาข้ออื่นในการประเมินเวลาหลังการตาย (post mortal interval) ซึ่งเวลาดังกล่าวสามารถประมาณได้จากวงจรชีวิตและชนิดของสัตว์ขาข้อชนิดที่แตกต่างกันในการเข้ามายังศพในระยะของการเน่าสลายที่แตกต่างกัน¹⁻⁸ นอกจากนี้ใช้ประเมินเวลาหลังการตาย สัตว์ขาข้อบางชนิด เช่น แมลงวันและแมลงปีกแข็งที่มากินศพยังสามารถใช้เป็นหลักฐานในการสืบสวนคดีได้โดย Gagliano-Candela และ Avenaggiato ได้ระบุในงานทบทวนเอกสารไว้ว่า แมลงที่มาที่ศพสามารถใช้ในการตรวจหาสารพิษที่ผู้เสียชีวิตได้รับก่อนตายได้^{7, 8} ยิ่งไปกว่านั้นมีรายงานการศึกษาที่ระบุว่าแมลงดูดเลือดบางชนิด เช่น เหาและโลนยังสามารถถูกใช้เป็นตัวช่วยในการตรวจหา DNA เพื่อพิสูจน์บุคคลได้⁹

หมัดและนิติวิทยาศาสตร์

หมัดเป็นสัตว์ขาข้ออีกชนิดหนึ่งที่ใช้ประเมินเวลาหลังการตายได้ โดย Gennard ระบุว่าหมัดคนสามารถเป็นตัวชี้วัดการตายในลักษณะ recent death ได้ ถ้าพบหมัดยังคงมีชีวิตบนศพ³ นอกจากนี้ Simpson ได้ระบุว่าหมัดสามารถใช้เป็นหลักฐานเพื่อประกอบการประเมินเวลาในการจมน้ำของศพมนุษย์หรือสัตว์ได้ โดยประเมินจากเวลาในการฟิ้นกลับมีชีวิตของหมัด (revive) ซึ่งหมัดจะ revive หลังจาก 60 นาทีเมื่อร่างที่เป็นโฮสต์จมน้ำมากกว่า 12 ชั่วโมง หากร่างจมน้ำ 18-20 ชั่วโมง หมัดจะฟิ้น (revive) ในช่วงเวลา 4-5 ชั่วโมงอย่างไรก็ตาม Simpson ไม่ได้ระบุชนิดหมัดที่ใช้ในการศึกษา ส่วน Gennard ได้ระบุชนิดหมัดคนแต่ไม่ได้ระบุ genus species ของหมัดที่มีการศึกษาไว้^{3,4} Brouqui และ Raoult ระบุว่าหมัดแมว หมัดหนูและหมัดคนเป็นแมลงที่สามารถพบได้บนร่างกายของคนเรื้อรังได้ โดยหมัดที่พบได้แก่ *Ctenocephalides felis*, *Xenopsylla cheopis*, and *Pulex irritans*¹⁰ ดังนั้นการศึกษาหมัดในแง่ของชนิดและสัตว์ที่มันอาศัยโดยเทคนิคทางวิทยาศาสตร์ไม่ว่าจะเป็นทางนิติเวชโรโลยีและอนุชีววิทยา จึงน่าจะมีประโยชน์ในการพิสูจน์บุคคลและใช้เป็นหลักฐานในคดีการทอดทิ้งต่อไป

การแยกชนิดหมัด

หมัดที่มีความสำคัญทางการแพทย์สามารถแยกชนิดในเบื้องต้นได้จากลักษณะโครงสร้างภายนอกโดยหมัดที่มีความสำคัญทางการแพทย์ ได้แก่ หมัดคน (*P. irritans*), หมัดคน (*T. penetrans*), หมัดหนูเมืองร้อน (*X. cheopis*), หมัดแมว (*Ct. felis*) และหมัดสุนัข (*Ct. canis*)^{11,12} (Fig 1)¹³

หมัดคน *Pulex irretans*

หมัดชนิดนี้เป็นปรสิตของคนและหนู มีรายงานพบหมัดนี้ในคนในประเทศอินเดีย ปากีสถาน แต่ไม่มีรายงานพบหมัดนี้ในคนในประเทศไทย การกัดของหมัดนี้จะทำให้เกิดอาการแพ้บริเวณที่ถูกกัด หมัดชนิดนี้จะมีขนที่ตา (ocular bristle) อยู่ได้ดรรวม ไม่มีแผงหนามที่แก้ม (genal comb) ไม่มีแผงหนามตรงท้ายของอกปล้องกลาง (pronatal comb) ไม่มีร่อง mesopleural rod ที่โคนขาคู่ 2^{11,12} (Fig. 2)¹⁴

หมัดคน *Tunga penetrans*

หมัดชนิดนี้มีชื่อเรียกหลายชื่อเช่น chigoe, jigger, sand-flea, Nigua เป็นหมัดที่มีขนาดเล็กมาก โดยมีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร เป็นปรสิตภายนอกของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบในอเมริกาใต้ แอฟริกาและอินเดีย แต่ไม่มีรายงานในประเทศไทย หมัดชนิดนี้จะฝังตัวใต้ผิวหนังสัตว์ที่มันอาศัย ส่วนมากพบที่ซอกนิ้วเท้าและฝ่าเท้า (Fig. 7)²⁰ ลักษณะของหมัดนี้คือส่วนหัวเรียบแคบ ส่วนอก (thorax) แคบมาก โดยจะแคบกว่าปล้องท้อง (abdomen) ปล้องแรกมาก ไม่มีแผงหนาม genal comb และไม่มี pronatal comb ไม่มี mesopleural rod^{11,12} (Fig. 3)¹⁵

หมัดหนู *Xenopsylla cheopis*

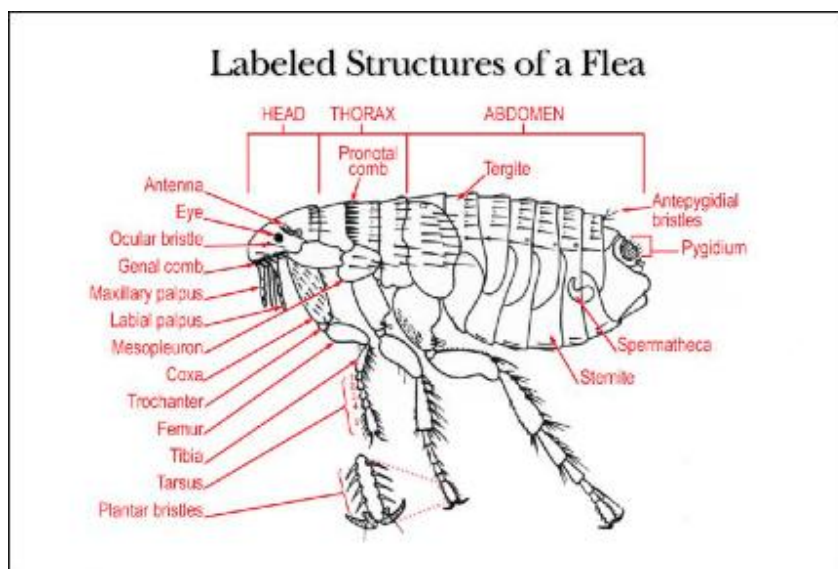
หมัดหนูเมืองร้อน (oriental rat flea) เป็นชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งของหมัดชนิดนี้ เป็นหมัดที่พบเป็นปรสิตของหนู พบหมัดนี้ได้ทั่วโลก เป็นพาหะที่สำคัญของกาฬโรค ไม่มีแผงหนาม genal comb และไม่มี pronatal comb แต่มี mesopleural rod และ ocular bristle หน้าดรรวม นอกจาก *X. cheopis* แล้วยังมี *Xenopsylla* ชนิดอื่นที่สามารถนำเชื้อ *Y. pestis* ที่เป็นสาเหตุของกาฬโรคได้ ได้แก่ *X. astia* และ *X. braziliensis*^{11,12} (Fig. 4)¹⁶

หมัดแมว *Ctenocephalides felis*

ปกติหมัดแมวจะอาศัยในแมวและสุนัข แต่หมัดนี้กัดคนได้ คนที่ถูกกัดบางรายจะมีอาการแพ้ น้ำลายหมัดได้ หมัดแมวเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิติดหนูและติดสุนัขได้ หมัดแมวมีความยาวของส่วนหัวประมาณ 2 เท่าของส่วนสูงของส่วนหัว หัวยาว หมัดชนิดนี้มีแผงหนาม genal comb ที่ genal comb หนามซี่แรกสั้นกว่าหนามซี่ถัดไป นอกจากนี้หมัดนี้ยังมี pronatal comb, mesopleural rod และ ocular bristle หน้าดรรวม^{11,12} (Fig. 5)¹⁷

หมัดสุนัข *Ctenocephalides canis*

ปกติหมัดสุนัขกัดคนได้เช่นเดียวกับหมัดแมว หมัดสุนัขทำให้เกิดอาการแพ้ น้ำลายหมัดได้เช่นกัน หมัดสุนัขเป็นโฮสต์กึ่งกลางของพยาธิติดยาและติดยา หมัดสุนัขหัวกลมมน ความยาวของส่วนหัวประมาณ $\frac{1}{2}$ ถึง 1 เท่าของส่วนสูงของส่วนหัว หมัดชนิดนี้มีแผงหนาม genal comb ที่ genal comb หนามซี่แรกมีความยาวเท่ากับหนามซี่ถัดไป นอกจากนี้หมัดนี้ยังมี pronotal comb, mesopleural rod และ ocular bristle หน้าตาารวม ^{11,12} (Fig. 6) ¹⁸



รูปที่ 1 Morphology of a flea ⁽¹⁵⁾



รูปที่ 2 Human flea (*Pulex irritans*) ⁽¹⁴⁾



รูปที่ 3 *Tunga penetrans* ⁽¹⁵⁾



รูปที่ 4 Rat flea (*Xenopsylla cheopis*)⁽¹⁶⁾



รูปที่ 5 Cat Flea, *Ctenocephalides felis*⁽¹⁷⁾



รูปที่ 6 Dog flea (*Ctenocephalides canis*)⁽¹⁸⁾

References

1. Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law; file as forensic indicators. 1st ed UK, Cambridge University press, 2002.
2. แสงชัย นทีวรนาถ นพวรรณ บุญชู อภิชาติ วิทย์ตะ. การวัด cephalopharyngeal skeleton ของ *Chrysomya megacephala* ระยะ third in star larvae ที่เก็บจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2553; 38(1): 3100-6.
3. Gennard DE. Forensic entomology: an introduction. 1st ed England, John Wiley&sons Ltd, 2007
4. Simpson K. Forensic Medicine. Edward Arnold: London, 1985.
5. Byrd JH, Casther JL. Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigation. New York: CRC press. 2000.

6. แสงชัย นทีวรรณารถ สังกัป สุคตวาสดี สุริพร นาคอ้ง วรรณจิต คงรส ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์ อรัญญา จิระวิริยะกุล. ชนิดของ หมดที่เก็บจากสุนัขเลี้ยง ที่เก็บบริเวณบ้านคลองหนองเหล็ก ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิจิตรโลก. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2554; 39(1): 3608-16.
7. แสงชัย นทีวรรณารถ , อภิชาติ วิทย์ตะ. ตัวหนังสือตัว (Dermestes maculates) วารสารเทคนิคการแพทย์ 2553; 38(2): 3190-202.
8. Gagliano-Candela R. Aventaggiato L. The detection of toxic substances in entomological specimens. Int J Legal Med 2001; 114(4-5): 197-203.
9. อภิชาติ วิทย์ตะ แสงชัย นทีวรรณารถ. เหาคน โคนคนและนิติวิทยาศาสตร์. วารสารนิติเวชศาสตร์ 2555; 4(2): 151-64.
10. Brouqui P, Raoult D. Arthropod-borne diseases in homeless. Ann N Y Acad Sci. 2006 ;1078:223-35.
11. อุษาวดี ถาวระ จักรวาล ชมพูศรี สุวัฒนา ศิริอ่อน สุกัญญา ปุโรทกานนท์. ชีวิตวิทยาและการควบคุมแมลงที่เป็นปัญหา สาธารณสุข. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2544.
12. Service M. Medical Entomology for Students. 5th ed. UK: Cambridge University Press, 2012
13. Bustos F. Parasite. Access at www.stanford.edu/.../image027.png on February 20, 2012.
14. CaliVita. Parasites. Access at <http://www.e-cleansing.com/parasites/human-flea-pulex-irritans.html> on February 20, 2012.
15. *Tunga penetrans*. Access at www.icb.usp.br/~marcelcp/Tungapenetrans.htm on February 20, 2012.
16. Anteater Pest Control Inc. PestMall.com. Access at www.pestmall.com/blog/pest-info/fleas/rat-fleas on February 20, 2012.
17. Oklahoma State University. Entomology and Plant Pathology. Access at [entopl.okstate.edu/ddd/insects /fleas.htm](http://entopl.okstate.edu/ddd/insects/fleas.htm) on February 20, 2012.
18. Dog flea. Access at <http://www.flea-and-tick-control.info/dog-flea.htm> on February 20, 2012.

อาวุธชีวภาพและการก่อการร้ายทางชีวภาพ

Biowarfare and Bioterrorism

บุญเรือง คำศรี *

บทคัดย่อ

การใช้จุลินทรีย์ก่อโรคเป็นอาวุธในความขัดแย้งของมนุษย์มีประวัติอันยาวนาน ไม่ว่าโดยเจตนาหรือไม่เจตนาก็ตาม ตั้งแต่ประเทศสหรัฐอเมริกาถูกโจมตีด้วยการก่อการร้ายเมื่อ 11 กันยายน พ.ศ. 2544 และมีการจ้องจ้องกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ มีการดำเนินการเกี่ยวกับภัยคุกคามจากการโจมตีในอนาคตด้วยสารชีวภาพอย่างจริงจัง ด้วยคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีแนวโน้มนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ อาทิ 1) ทำให้เกิดโรคที่มีอัตราการตายสูงและกระทบต่อสุขภาพ 2) สามารถแพร่กระจายเชื้อจากคนสู่คน 3) เตรียมได้ง่ายและต้นทุนการผลิตต่ำ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, smallpox เป็นต้น ท็อกซินบริสุทธิ์ที่อาจใช้เป็นอาวุธชีวภาพ เช่น สารพิษโบทูลินัมซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียไร้อากาศ *Clostridium botulinum* การตรวจหาร่องรอยของการได้รับอาวุธชีวภาพต้องอาศัยวิธีทดสอบที่มีความไวสูง การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์อาศัยเทคนิคทางอนุชีววิทยาซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง ได้แก่ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การวิเคราะห์พลาสมิด และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ การพิจารณาการตรวจทางห้องปฏิบัติการและวิธีทดสอบเพื่อวินิจฉัยเชื้อสาเหตุต้องอาศัยข้อบ่งชี้ทางคลินิกและทางระบาดวิทยา นักจุลชีววิทยามีบทบาทสำคัญในการป้องกันและควบคุมแต่ไม่ใช่การผลิตอาวุธชีวภาพ อนุสัญญาว่าด้วยการห้ามพัฒนาผลิต และสะสมอาวุธแบคทีเรีย (ชีวะ) และอาวุธท็อกซิน และว่าด้วยการทำลายอาวุธเหล่านี้เป็นข้อตกลงระหว่างประเทศเพื่อกำจัดอาวุธชีวภาพ

คำสำคัญ: อาวุธชีวภาพ การก่อการร้ายทางชีวภาพ อนุชีววิทยา อนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพ

* ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

Abstract

There is a long history of the use of microorganisms as weapons in human conflicts, whether intentionally or unintentionally. Since the September 11, 2001 terrorist attacks in the USA, the anthrax letters, the threat of future attacks with biological agents has been taken seriously. The characteristics of some potential biological warfare agents is followed as: 1) that can result in high mortality rates with the potential for major public health impact 2) that can be easily disseminated or transmitted from person to person 3) that can be easily produced with low capital investment, e.g. *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, smallpox. Purified highly potent toxins are possible biowarfare agents, such as botulinum toxin which is made by the anaerobic bacterium, *Clostridium botulinum*. High sensitivity of method is necessary for the detection of bioterrorism clues. In this context, several molecular techniques and practices including DNA amplification, DNA restriction, plasmid analysis, and nucleotide sequence-based analysis can be extremely useful and effective analytical tools for microbial identification. Clinical and epidemiological indicators are required for laboratory and technology considerations. Microbiologist plays an important role in prevention and control, but not production the biowarfare. Convention on the prohibition of the development, production and stockpiling of bacteriological (biological) and toxin weapons and on their destruction is international protocol for elimination of biowarfare.

Keywords: Biowarfare, Bioterrorism, Molecular Biology, Biological Weapons Convention

บทนำ

การเกิดความขัดแย้งกันของมนุษย์นำมาซึ่งการทำลายกัน อาวุธเป็นสิ่งที่แต่ละฝ่ายต่างพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการสู้รบกัน อาวุธชีวภาพก็เป็นเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่ถูกใช้ ด้วยลักษณะของอาวุธชีวภาพมักจะไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่อาจมองเห็นได้ง่ายนัก เนื่องจากมีขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา หากเป็นท็อกซินมักเป็นโปรตีน ซึ่งเป็นอาวุธที่ผลิตได้ง่าย มนุษย์รู้จักผลิตโดยเลียนแบบการเกิดโรคระบาดซึ่งสามารถคร่าชีวิตผู้คนได้ครั้งละจำนวนมาก เป็นการสังหารหมู่โดยธรรมชาติ ความหายนะที่เกิดจากอาวุธชีวภาพนั้นไม่ได้ด้อยกว่าระเบิดปรมาณู วิธีการแพร่กระจายอาวุธชีวภาพเหล่านี้กระทำได้หลายวิธี เช่น ฉีดพ่นเป็นละอองลอยแพร่กระจายไปในอากาศ อาจนำไปโปรยลงมาจากเครื่องบิน หรือนำไปทำเป็นหัวรบของขีปนาวุธยิงสู่พื้นที่

เป้าหมาย ปล่อยกระจายไปกับสัตว์พาหะ หรือปล่อยกระจายในสถานที่ปิด เช่น การปล่อยเฉพาะภายในอาคารใด อาคารหนึ่งหรือสถานที่ใดสถานที่หนึ่ง อาจถูกสร้างขึ้นมาอย่างลับๆ ได้ง่าย แม้อาวุธชีวภาพจะไม่แสดงผลในทันทีเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการการฟักตัวในร่างกาย แต่เมื่อถึงเวลาแสดงผล ก็อาจจะตรวจสอบหาที่มาได้ อย่างยากลำบาก ผู้นำเชื่อมาปล่อยอาจหายไปอย่างไร้ร่องรอยได้โดยง่าย กว่าที่จะรู้ตัวกันอีกที ก็เกิดความโกลาหล ในชุมชนหรือสังคม ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ เศรษฐกิจ และสังคมอย่างชัดเจน การตอบสนองอย่างเป็นระบบ และมีประสิทธิภาพนับว่าเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการรับมือกับสถานการณ์การระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ ในบทความนี้จะอธิบายถึงสาระสำคัญเกี่ยวกับอาวุธชีวภาพและการก่อการร้ายในแง่ของประวัติของการใช้อาวุธชีวภาพ คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นอาวุธชีวภาพ จุลินทรีย์และที่ออกซินที่อาจนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อและองค์ประกอบสำคัญที่ใช้เพื่อการพิจารณาว่า อาจเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ จรรยาบรรณและข้อตกลงระหว่างประเทศเกี่ยวกับการห้ามใช้อาวุธชีวภาพ

คำนิยาม

Biowarfare หรือ biological warfare (อาวุธชีวภาพ) หมายถึง อาวุธที่มีอนุภาพในการทำลายล้างสูง ทำให้คนจำนวนมากในพื้นที่กว้างได้รับบาดเจ็บ ป่วย และตายในที่สุด และยังมีคำนิยามจากองค์การสหประชาชาติซึ่งให้ความหมาย อาวุธชีวภาพ ว่าหมายถึง สิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นธรรมชาติเป็นเช่นใด รวมถึงส่วนที่ทำให้เกิดการติดเชื้อซึ่งมาจากสิ่งมีชีวิตนั้น ที่ถูกนำไปใช้โดยเจตนาเพื่อให้เข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในร่างกายมนุษย์ สัตว์ พืช เป็นผลให้ป่วยเป็นโรคหรือเสียชีวิต ปัจจุบันมีความเห็นไม่ตรงกันว่า ควรจัด “ที่ออกซิน” หรือ สารพิษจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ให้เป็นอาวุธชีวภาพด้วยหรือไม่ เนื่องจากที่ออกซินเป็นสารเคมีไม่ใช่สิ่งมีชีวิต การเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นจากที่ออกซินก็เป็นผลมาจากคุณสมบัติทางเคมี อีกทั้งยังไม่สามารถถ่ายทอดถึงกันได้ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อโรคที่มีชีวิต ที่ต้องเข้าสู่ร่างกาย เจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ จึงทำให้เกิดการเจ็บป่วย บางประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เห็นว่าที่ออกซินอาจจัดเป็นอาวุธชีวภาพได้เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิต

Bioterrorism (การก่อการร้ายทางชีวภาพ) หมายถึง การกระทำที่ผิดกฎหมายอาญาระหว่างประเทศ เป็นการปฏิบัติการคุกคามและใช้ความรุนแรงหรือมีการข่มขู่อย่างรุนแรง เพื่อมุ่งหวังผลตามเงื่อนไขข้อเรียกร้องในการเปลี่ยนแปลงทางการเมือง เศรษฐกิจ และสังคม โดยมักเป็นข้อเรียกร้องระหว่างผู้ก่อการร้ายที่มีเครือข่าย

กระจายอยู่ทั่วโลก กับรัฐบาลของประเทศ กล่าวคือ เป็นการต่อสู้ระหว่างรัฐกับกลุ่มที่ไม่ใช่รัฐ โดยใช้อาวุธชีวภาพในการกระทำดังกล่าว ซึ่งก็คืออาวุธที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ซึ่งครอบคลุมถึงสารพิษจากสิ่งมีชีวิต หรือแม้กระทั่งฮอร์โมนหรือสารอื่นใดที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมา หากจะพูดให้เข้าใจได้ง่ายก็คืออาวุธเชื้อโรคหรืออาวุธสารพิษที่สกัดจากสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์นั่นเอง

ประวัติของการใช้อาวุธชีวภาพ

การใช้จุลินทรีย์ก่อโรคเป็นอาวุธในความขัดแย้งของมนุษย์มีประวัติศาสตร์ที่ยาวนาน และมีหลักฐานเป็นลายลักษณ์อักษรมากกว่าหลายศตวรรษ ไม่ว่าจะเป็นโดยเจตนาหรือไม่ตั้งใจก็ตาม ในยุคแรกของการใช้อาวุธชีวภาพ เริ่มต้นตั้งแต่สมัยโบราณทั้งที่ขณะนั้นมนุษย์ยังไม่มีวิทยาการทางด้านวิทยาศาสตร์ที่เจริญก้าวหน้า มีบันทึกในคัมภีร์ไบเบิลว่าเมื่อ 1,500 ปีก่อนคริสต์ศักราช ชาวอียิปต์ต้องเผชิญกับภัยพิบัติโรคระบาดหลังจากที่กษัตริย์ฟาโรห์ปฏิเสธที่จะให้อิสราเอลแก่เด็กชาวอิสราเอล สิ่งที่เกิดขึ้นในตอนแรกคือ แม่น้ำเปลี่ยนเป็นสีเลือดและปลาตาย ส่งกลิ่นเหม็นเน่า และตามมาด้วยภัยพิบัติจากกบ ริน เหลือบ ผงสัตว์ ฝุ่น เป็นต้น จนในที่สุดจำเป็นต้องให้อิสราเอลแก่ชาวอิสราเอล (Handysides. 2009: 3; citing the Bible (King James version): Exodus chapters 8–12) และอีกบันทึกหนึ่งที่ถูกเขียนในมหากาพย์อิลเลียดโดยโฮเมอร์ นักประพันธ์ชาวกรีก ราว 700-1,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช ได้บรรยายถึงโรคระบาดในกองทัพกรีกที่พบในสัตว์พาหนะ เช่น ล่อ สุนัข รวมทั้งทหารล้มตายเป็นอันมากซึ่งเกิดจากแรงบันดาลของเทพอพอลโลที่มีเรื่องบาดหมางกับนักรบชาวกรีก (Handysides. 2009: 3; citing Homer; Rieu. 1950) สมัยโบราณเชื่อกันว่าโรคภัยไข้เจ็บเกิดขึ้นเมื่อเทพเจ้าพิโรธและลงโทษมนุษย์ เมื่อ 500 ปีก่อนคริสต์ศักราช ฐาไซเดสบันทึกไว้ว่า ชาวโรมันในเมืองเอเธนส์เผชิญกับโรคระบาดที่มากับน้ำซึ่งถูกปล่อยเชื้อโดยชาวสปาร์ต้า (Handysides. 2009: 4; citing Thomas. 1981: 137–147, 562–573) หลายปีต่อมาโรค Black Death ระบาดจากเมืองคอนสแตนติโนเปิล (เมืองอิสตันบูล ประเทศตุรกี ในปัจจุบัน) ไปยังยุโรปตะวันตกทั้งหมด (Handysides. 2009: 4; citing Leven. 1999) ราว 400 ปีก่อนคริสต์ศักราช นักยิหรูของชาวไซเรียน (มนุษย์โบราณ) จุ่มปลายลูกธนูลงในเลือดที่ปนเปื้อนเชื้อโรคก่อนยิงใส่ฝ่ายตรงข้าม (CBWInfo. 2003: Website) รวมทั้งชนชาติเปอร์เซีย กรีก และโรมัน ต่างเคยบันทึกเหตุการณ์ไว้ในอดีตว่า ได้ใช้ซากศพผู้เสียชีวิตด้วยโรคและสิ่งปฏิกูลใส่ในแหล่งน้ำ หรือคิดเข้าไปในเมืองที่ปิดล้อม เพื่อให้ทหารและพลเมืองฝ่ายตรงข้ามป่วยและตายด้วยโรคระบาด หรือในปี ค.ศ. 1346 ชาวตาตาร์ (Tartars) ชนชาติเชื้อสายมองโกลได้นำ

ร่างของทหารตนเองที่ตายด้วยโรคกาฬโรค และใช้เครื่องคิดหินนำร่างเหล่านั้นข้ามเข้าไปในกำแพงเมืองคัฟฟา (Caffa; เมืองเฟโอโดเซีย ประเทศยูเครน ในปัจจุบัน) ทำให้ประชาชนและทหารของคัฟฟาต่างหนีตายมาที่ประเทศอิตาลี และนำกาฬโรคไปแพร่ในอิตาลีจนกระทั่งระบาดไปทั่วยุโรป คาดการณ์กันว่าเหตุการณ์ครั้งนั้นเป็นสาเหตุให้เกิดกาฬโรคระบาดครั้งใหญ่ที่สุดในยุโรป คาดว่าการระบาดครั้งนั้นทำให้ประชากรของทวีปยุโรปเสียชีวิตไปกว่า 1 ใน 3 ของประชากรทั้งทวีป (Handysides. 2009: 4; citing Derbes. 1966: 179–182)

ยุคต่อมาของการใช้อาวุธชีวภาพเป็นยุคที่มนุษย์เริ่มมีความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์มากขึ้น จากการค้นพบทฤษฎีเชื้อสาเหตุโรคของโรคติดเชื้อของหลุยส์ ปาสเตอร์ และสมมติฐานของค็อค (Koch's postulates) มนุษย์เริ่มรู้จักโรคติดต่อที่มีจุลินทรีย์เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค เริ่มตั้งแต่ในศตวรรษที่ 18 เมื่อทหารอังกฤษสู้รบกับชนพื้นเมืองกลุ่มชาติพันธุ์อินเดียนแดงที่อเมริกาเหนือ ณ ค่ายฟอร์ตพิตต์ (Fort Pitt) เมืองพิตต์สเบิร์ก มลรัฐเพนซิลเวเนีย มีการบันทึกว่า ฝ่ายกองทัพอังกฤษได้มอบผ้าห่มและผ้าเช็ดหน้าที่มาจากโรงพยาบาลสำหรับผู้ป่วยไข้ทรพิษให้กับชนเผ่าอินเดียนแดง โดยการบัญชาการของผู้นำกองทัพของอังกฤษ บันทึกดังกล่าวไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนว่าได้กระทำจริงหรือไม่ แต่ได้เกิดการระบาดของไข้ทรพิษในหมู่ชาวอินเดียนแดงในช่วงเวลานั้นอยู่นานหลายเดือน ทำให้มีผู้เสียชีวิตหลายร้อยคน (d'Errico. 2001: Website) หรือในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 (ปี ค.ศ. 1915-1918) มีการกล่าวหาผู้ที่ฝึกฝึเยอรมันในประเทศสหรัฐอเมริกาทำให้ปลุสสัตว์ที่จะส่งไปให้ฝ่ายสัมพันธมิตรในทวีปยุโรป เป็นโรคระบาดตายเป็นจำนวนมาก หรือในครั้งที่เยอรมันโดนกล่าวหาว่าลอบทำให้ม้าของฝรั่งเศสเป็นโรคระบาดตาย โดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus anthracis* และ *Pseudomonas mallei* ซึ่งก่อโรคแอนแทรกซ์และโรคมงค่อ (glanders disease) ตามลำดับ เป้าหมายของอาวุธชีวภาพไม่ใช่มนุษย์ แต่เป็นปลุสสัตว์ และพยายามทำให้มีการระบาดของกาฬโรคในรัสเซีย (Christopher, et al. 1997: 412-417)

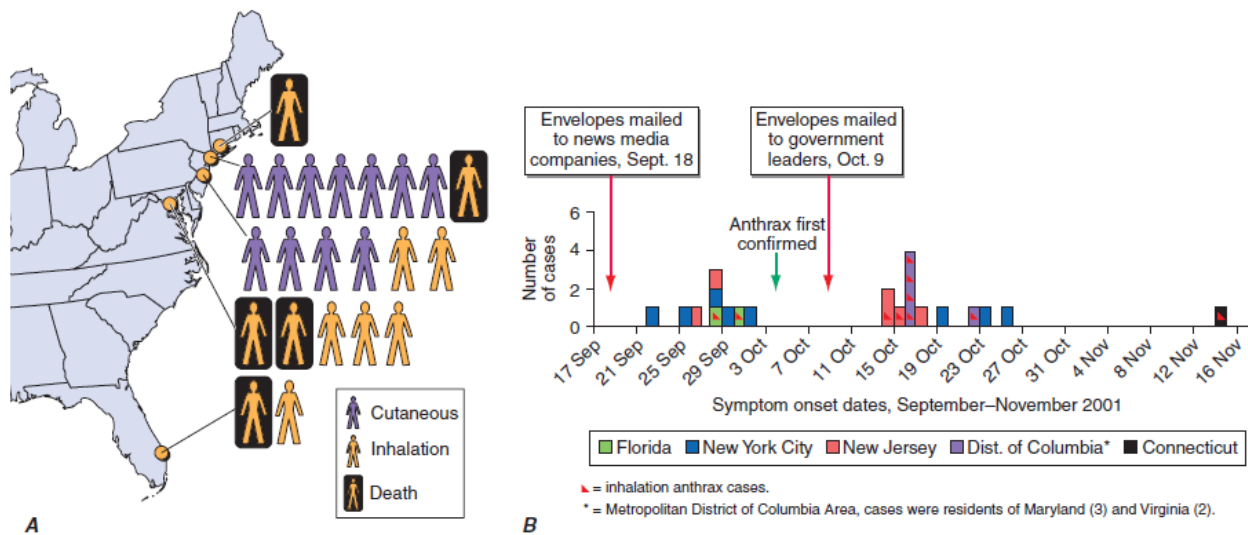
ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 (ปี ค.ศ. 1932-1945) ญี่ปุ่นได้ตั้งสถานีวิจัยอาวุธชีวภาพ ทั้งในประเทศจีนและสิงคโปร์ กองทัพญี่ปุ่นใช้อาวุธชีวภาพในการทำสงครามกับจีนและโซเวียต (ในขณะนั้น) ช่วงนั้นเชื่อกันว่าญี่ปุ่นได้ศึกษาวิจัยเชื้อโรคชนิดต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นอาวุธ เช่น *B. anthracis*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella* sp., *Vibrio cholerae* และ *Yersinia pestis* เป็นต้น จากการทดลองดังกล่าวส่งผลให้มีผู้เสียชีวิตมากกว่า 10,000 ราย และเมื่อปี ค.ศ. 1939 จึงได้นำอาวุธชีวภาพไปใช้เชื่อว่าชาวจีน เกาหลี และชาวรัสเซีย จำนวนมากกว่าหนึ่งล้านรายใน 11 เมือง ทหารญี่ปุ่นเองก็เสียชีวิตราว 1,700 นาย เนื่องจากไม่มีภูมิคุ้มกัน ส่วนใหญ่เสียชีวิตเพราะติดเชื้อโรคในระบบทางเดินอาหารจากจำนวน 10,000 นาย ที่เจ็บป่วยเพราะอาวุธชีวภาพ (Wheelis. 2004: 15-31)

นอกจากนี้ ยังพบว่าการทดลองเชื้อก่อโรคไทฟอยด์ พาราไทฟอยด์ และมกคล่อ ด้วย (Hill, 2003: Website) ในปี ค.ศ. 1941-1942 ประเทศอังกฤษได้ทดลองปล่อยกระจายสารชีวภาพเพื่อเตรียมใช้โต้ตอบเยอรมัน หากเยอรมันมีการใช้อาวุธชีวภาพกับทหารอังกฤษ ในครั้งนั้นอังกฤษได้พัฒนาเชื้อแอนแทรกซ์ใส่เกาะกรินาร์ด ซึ่งเป็นเกาะเล็กๆ ของสกอตแลนด์ ส่งผลให้เชื้อแอนแทรกซ์นี้มีชีวิตอยู่ 40 ปี ภายหลังในปี ค.ศ. 1992 รัฐบาลอังกฤษต้องใช้จ่ายเงินหลายล้านปอนด์เพื่อฆ่าเชื้อที่จมอยู่ในดิน ด้วยการตักหน้าดินทั้งเกาะและราดน้ำยาฆ่าเชื้อโรค (Clark and Pazdernick, 2012: 623)

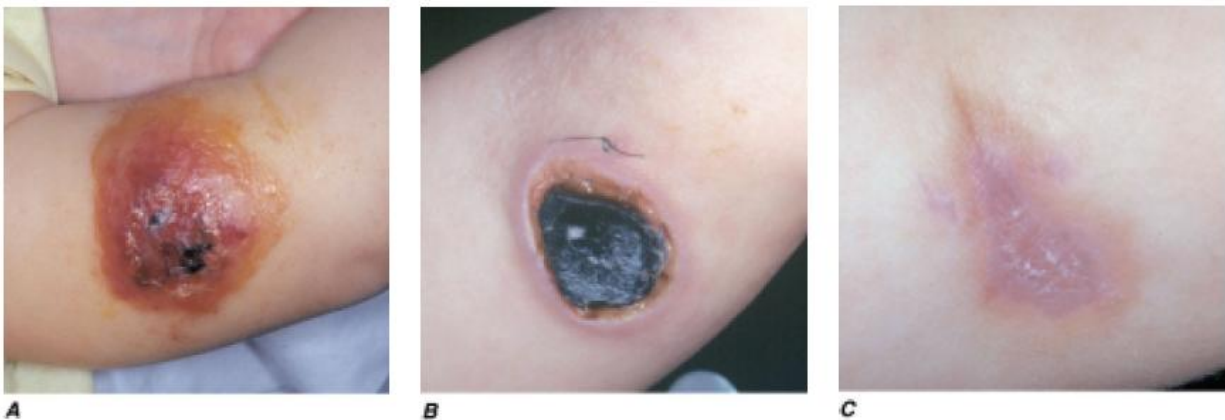
หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 สงบได้ไม่นาน สหรัฐอเมริกา อังกฤษ แคนาดา และโซเวียต ต่างดำเนินการทดลองและผลิตอาวุธชีวภาพกันอย่างเปิดเผย จนกระทั่งเกิดความพยายามของประชาคมโลกในการยับยั้งและกำจัดอาวุธชีวภาพ และมีอนุสัญญาห้ามผลิตอาวุธชีวภาพ ให้ประเทศต่าง ๆ ปฏิบัติตาม แต่ยังมีหลายประเทศที่น่าเคลือบแคลงสงสัย เช่น จีน รัสเซีย เกาหลีเหนือ อิรัก เป็นต้น

กรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อ ตุลาคม ปี พ.ศ. 2544 (เหตุการณ์ 911)

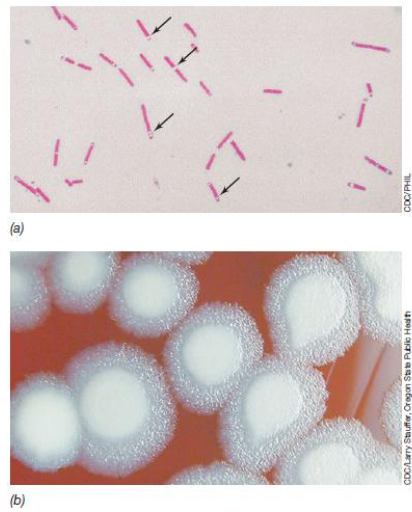
ความเสี่ยงของการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ ไม่สามารถประมาณเป็นจำนวนหรือคาดเดาได้ แต่การตอบสนองด้านสาธารณสุขมีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังเช่นที่สหรัฐอเมริกา ในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2544 เมื่อมีการจ้องใจกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ เป็นสาเหตุให้มีผู้ติดเชื้อ 22 ราย และเสียชีวิต 5 ราย (ดังรูปที่ 1) การตอบสนองทางสาธารณสุข ได้แก่ การระบุผู้ที่มีความเสี่ยงทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อผ่านทางระบบไปรษณีย์ และมีการใช้ยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยกว่า 100,000 ราย ที่มีความเป็นไปได้ว่าสัมผัสกับของจดหมายที่บรรจุสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ (The United States Department of Justice, 2010: Website) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกรณีฉุกเฉินและการบังคับใช้กฎหมาย ในสหรัฐอเมริกาและทั่วโลก ซึ่งมีการแจ้งเตือนที่ผิดพลาดเกิดขึ้นพร้อมกันจำนวนมาก โดยเหตุการณ์และสิ่งไม่จริงที่เกี่ยวข้อง ทำให้เกิดความต้องการบริการทางห้องปฏิบัติการสาธารณสุขจำนวนมาก หลายประเทศจึงได้มีการให้บริการห้องปฏิบัติการของภาคเอกชนในการจัดการกับงานที่มากมายเหล่านั้น



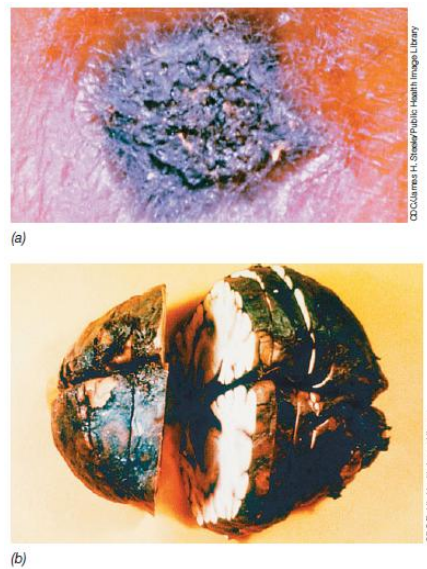
รูปที่ 1 กรณีเหตุการณ์การจู่โจมการกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อตุลาคม พ.ศ. 2544 (A) ไดอะแกรมแสดงพื้นที่และจำนวนผู้ติดเชื้อ 22 ราย และเสียชีวิต 5 ราย (B) ผลการสอบสวนโรค (จาก Lane and Fauci. 2010: 68)



รูปที่ 2 โรคแอนแทรกซ์ผิวหนังบริเวณแขนของผู้ป่วยเด็กที่ได้รับเชื้อในกรณีเหตุการณ์การจู่โจมการกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อตุลาคม ปี พ.ศ. 2544 (A) รอยแผลในวันที่ 5 ของการสัมผัสเชื้อ (B) จะเริ่มขุดตรงกลางเป็นเนื้อตายสีดำคล้ายแผ่นหนัง (eschar) ในวันที่ 12 และ (C) เมื่อ 2 เดือนผ่านไปแผลจะหายและมีรอยแผลเป็น (จาก Lane and Fauci. 2010: 69)



รูปที่ 3 *Bacillus anthracis* (a) แบคทีเรียชนิดแกรมบวก รูปร่างแท่ง มีเอ็นโดสปอร์ (b) ลักษณะโคโลนีบน blood agar มีลักษณะแบบกระจุกฝุ่น (จาก Madigan, Martinko, Stahl, and Clark. 2012: 939)



รูปที่ 4 โรคแอนแทรกซ์ (a) ชนิดแผลที่ผิวหนัง (cutaneous anthrax) และ (b) ชนิดทางเดินหายใจ (inhalation anthrax) (จาก Madigan, Martinko, Stahl, and Clark. 2012: 940)

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นอาวุธชีวภาพ

ลักษณะที่พึงประสงค์ของอาวุธชีวภาพ มีดังนี้ (Borio, *et al.* 2002: 2392)

- 1) ทำให้เกิดโรคที่มีอัตราการป่วยและอัตราการตายสูง
- 2) สามารถแพร่กระจายเชื้อจากคนสู่คน
- 3) ใช้จำนวนเชื้อเพียงเล็กน้อยและสามารถติดต่อโดยทางอากาศได้สูง
- 4) ยังไม่มีวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบบรวดเร็ว
- 5) ยังไม่มีวัคซีน
- 6) สร้างความตื่นตระหนกให้กับสังคม
- 7) เป็นเชื้อก่อโรคและง่ายต่อการผลิต
- 8) ทนทานต่อสภาวะแวดล้อม
- 9) มีข้อมูลจากการวิจัย
- 10) มีแนวโน้มเป็นอาวุธได้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณลักษณะที่อาจใช้เป็นอาวุธชีวภาพ

Agent	Infective dose (by aerosol)	Incubation period	Diagnostic samples (BSL)	Diagnostic assay
CDC Category A agents				
Anthrax (<i>Bacillus anthracis</i>)	8000–50 000 spores	1–5 days	Blood (BSL-2), tissue	Culture, Gram stain, Ag and Ab detection, PCR
Botulinum toxin	0.001 mg/kg (type A)	1–5 days	Nasal swab (possibly BSL-2)	Ag detection, mouse bioassay, PCR
Plague (<i>Yersinia pestis</i>)	100–500 organisms	2–3 days	Blood, sputum, tissue, lymph node aspirate (BSL-2/3)	Culture, Gram or Wright-Giemsa stain, Ag and Ab detection, PCR
Tularemia (<i>Francisella tularensis</i>)	10–50 organisms	2–10 days	Blood/serum, sputum, tissue (BSL-2/3)	Culture, Ab detection, PCR, EM of tissue
Smallpox (<i>Variola major</i>)	Assumed to be low (10–100 organisms)	7–17 days	Pharyngeal swab, scab material (BSL-4)	Culture, Ab detection, PCR, EM of scab material
Viral hemorrhagic fevers	1–10 organisms	4–21 days (species- dependent)	Blood/serum (BSL-3/4, species dependent)	Culture, Ag and Ab detection, PCR, EM of tissue or serum in some cases

CDC Category B agents				
Brucellosis (<i>Brucella</i> spp.)	10–100 organisms	5–60 days (months sometimes)	Blood (paired acute/convalescent sera), bone marrow (BSL-3)	Culture, Ab detection, PCR
Q fever (<i>Coxiella burnetii</i>)	1–10 organisms	10–40 days	Serum (BSL-2/3)	Ab detection, PCR
Staphylococcal enterotoxin B	30 ng/person (to incapacitate); 1.7 mg/person (lethal)	1–6 hours	Nasal swab, serum, urine (BSL-2)	Ag and Ab detection, PCR
Viral encephalitides	10–100 organisms	2–14 days (species- dependent)	Serum (BSL-2/3, species dependent)	Culture, Ab detection, PCR

Incubation periods quoted here may vary slightly from those described in the text, due to the different reference sources used. Antigen (Ag) and antibody (Ab) detection can be performed using enzyme immunoassay (EIA), immunofluorescence (IF), or agglutination test formats. Nowadays, molecular tests (PCR) can be designed to detect most organisms by targeting specific conserved gene regions in their genomes. Other abbreviations: CDC, Centers for Disease Prevention and Control; PCR, polymerase chain reaction; EM, electron microscopy; BSL, biosafety level.

รายชื่อเชื้อก่อโรคที่อาจจะนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ

รายชื่อเชื้อก่อโรคในที่นี้ไม่ได้มีความหมายใด ๆ มากนัก เนื่องจากมีรายชื่อของเชื้อก่อโรคจำนวนมากที่อาจเหมาะสมมากกว่าหรือน้อยกว่าต่อการประเมินตามบริบทและภัยคุกคามที่แตกต่างกัน และมีความสำคัญต่อการเตรียมความพร้อมสำหรับการใช้อาวุธชีวภาพโดยเจตนา ซึ่งต้องนำมาใช้ตามความเหมาะสมของประเทศ/พื้นที่/เวลา รายชื่อต่างๆ ไปจากศูนย์ป้องกันและควบคุมโรคแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป หรืออาเซียน อาจนำมาใช้ในการจัดสรรงบประมาณและการวางแผนได้ และควรพิจารณาเชื้อก่อโรคตามความเกี่ยวข้องที่กระทบ เช่น การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มเป้าหมาย เชื้อก่อโรค (ปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรม หรือโดยธรรมชาติ) วิธี/ช่องทางการแพร่กระจาย และปัจจัยอื่นๆ นอกจากนี้ รายชื่อดังกล่าวสามารถเปลี่ยนได้อย่างรวดเร็วตลอดเวลา สิ่งที่สำคัญมากกว่าคือ ความเข้าใจเกี่ยวกับเชื้อก่อโรค และความเป็นไปได้ในการใช้เป็นอาวุธชีวภาพโดยเจตนา ตารางที่ 2 แสดงรายชื่อของเชื้อก่อโรคที่มีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นอาวุธชีวภาพ หรืออาจจะถูกพัฒนาไปเป็นอาวุธชีวภาพ หรืออาจจะเคยใช้เป็นอาวุธชีวภาพในอดีต สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความรุนแรง ดังนี้

กลุ่มเอ ได้แก่ เชื้อก่อโรคที่มีความสำคัญมาก และสารพิษสามารถก่อภัยคุกคามทางสาธารณสุขได้มาก โดยในกลุ่มนี้ หมายถึง เชื้อก่อโรคที่ทำให้มีอัตราป่วยและอัตราตายสูงสุด มีความสามารถในการแพร่กระจายได้ง่าย หรือแพร่กระจายได้ในพื้นที่กว้างขวาง มีความเป็นไปได้สูงที่จะก่อให้เกิดความตื่นตระหนกของสาธารณชน และจำเป็นที่จะต้องมีการเตรียมความพร้อมในการรับมือกับเชื้อก่อโรคกลุ่มนี้

กลุ่มบี ได้แก่ เชื้อก่อโรคที่แพร่กระจายได้ง่ายพอสมควร แต่ทำให้มีอัตราป่วยและอัตราตายต่ำกว่าในกลุ่มเอ โดยสามารถจัดการควบคุมได้โดยเพิ่มความสามารถทางห้องปฏิบัติการและการติดตามทางระบาดวิทยา

กลุ่มซี ได้แก่ เชื้อก่อโรคอุบัติใหม่และสามารถกลายเป็นอาวุธชีวภาพได้ในอนาคต

ตารางที่ 2 กลุ่มของเชื้อก่อโรคที่อาจจะนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ (จาก Clark and Pazdernick, 2012: 626- 627)

CATEGORY A AGENTS INCLUDE ORGANISMS THAT POSE A RISK BECAUSE:	
• they can be easily disseminated or transmitted person-to-person • they cause high mortality • they might cause public panic and social disruption • they require special action to protect public health	
Bacteria	
Anthrax	<i>Bacillus anthracis</i>
Plague	<i>Yersinia pestis</i>
Tularemia	<i>Francisella tularensis</i>
Viruses	
Smallpox	<i>Variola major</i>
Filoviruses	Ebola hemorrhagic fever Marburg hemorrhagic fever
Arenaviruses	Lassa fever Junin virus (Argentine hemorrhagic fever)
Toxins	
Botulinum toxin from <i>Clostridium botulinum</i>	

CATEGORY B AGENTS INCLUDE THOSE THAT:

- are moderately easy to disseminate
- cause moderate morbidity and low mortality
- require improved diagnostic capacity and enhanced surveillance

Bacteria

Brucellosis	<i>Brucella</i> (several species)
-------------	-----------------------------------

Glanders	<i>Burkholderia mallei</i>
----------	----------------------------

Melioidosis	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
-------------	----------------------------------

Q fever	<i>Coxiella burnetti</i>
---------	--------------------------

Several food- or waterborne enteric diseases including:	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Vibrio cholerae</i>
---	---

Viruses

Alphaviruses	Venezuelan encephalomyelitis Eastern and western equine encephalomyelitis
--------------	--

Toxins

Ricin toxin from <i>Ricinus communis</i> (castor bean)

Epsilon toxin from <i>Clostridium perfringens</i>

Enterotoxin B from <i>Staphylococcus</i>
--

CATEGORY C AGENTS:

Emerging pathogens that could possibly be engineered for mass dissemination in the future, such as Nipah virus, hantaviruses, flaviviruses (yellow fever, dengue fever), multidrug-resistant tuberculosis

ท็อกซินบริสุทธิ์ที่อาจนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ

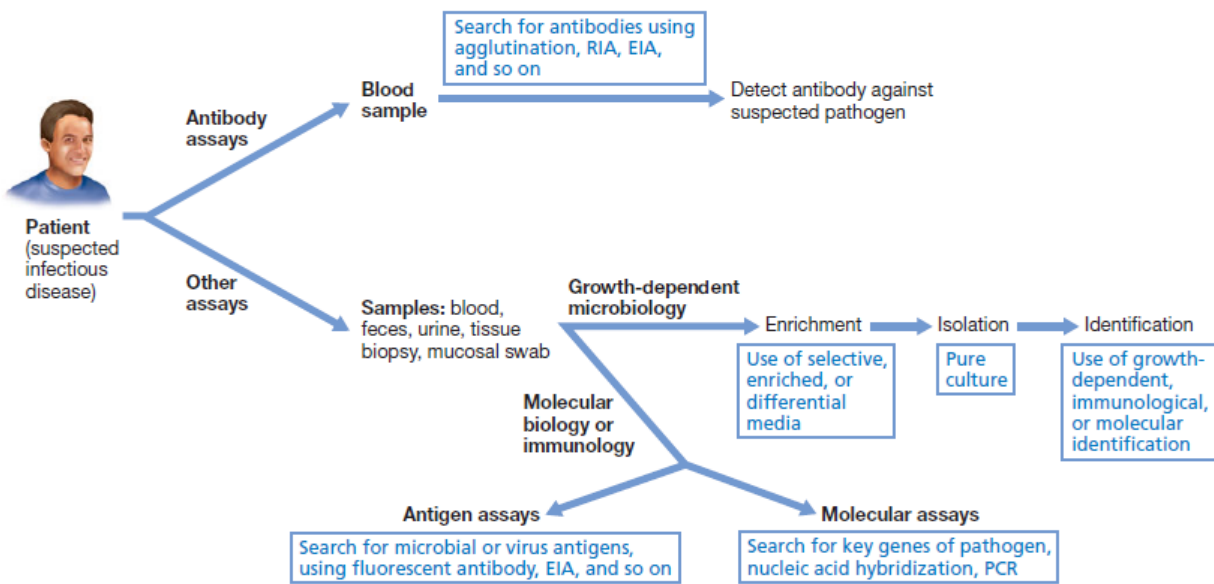
อาวุธทางชีวภาพอีกประเภทหนึ่งคือ ท็อกซินบริสุทธิ์ แม้จะไม่สามารถแพร่กระจายจากคนหนึ่งสู่อีกคนก็ตาม ซึ่งแหล่งที่มา ได้แก่ แบคทีเรีย สาหร่าย รา ฟีช หรือสัตว์ นอกจากนี้ อาจมาจากการสังเคราะห์ก็ได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ท็อกซินที่อาจจะนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ (จาก Clark and Pazdernick, 2012: 631)

Toxin	LD50 (µg/kg)	Producer Organism
Botulinum toxin A	0.001	Bacterium (<i>Clostridium</i>)
Enterotoxin B	0.02	Bacterium (<i>Staphylococcus</i>)
Ciguatoxin P-CTX-1	0.2	Marine dinoflagellate
Batrachotoxin	2	Poison arrow frog
Ricin (RIP)	3	Castor bean (<i>Ricinus communis</i>)
Tetrodotoxin	8	Pufferfish
VX	15	Synthetic nerve agent
Anthrax lethal toxin	50	Bacterium (<i>B. anthracis</i>)
Aconitine	100	Plant (monkshood = wolfsbane)
Mycotoxin T-2	1200	Fungus (<i>Fusarium</i>)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่อาจเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ

หลักการของการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่อาจเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพเป็นหลักการเดียวกันกับการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ นอกจากแพทย์จะอาศัยการตรวจลักษณะอาการทางคลินิกแล้ว ในหลายๆ กรณียังจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเข้าร่วมด้วย (รูปที่ 5) แต่เดิมที่ผ่านมามีเทคนิคหลายอย่างที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เช่น การตรวจดูเชื้อโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อหรือแอนติบอดีต่อเชื้อโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา เป็นต้น เข้ามาใช้ในการตรวจวินิจฉัย เทคนิคต่างๆ ที่กล่าวข้างต้นยังมีปัญหาและอุปสรรคอยู่ค่อนข้างมาก เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อ ต้องใช้เวลานาน ประกอบกับเชื้อบางชนิด เช่น ไวรัส การเพาะเลี้ยงค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องมีห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งในทางปฏิบัติไม่ใช่เรื่องง่ายสำหรับโรงพยาบาลโดยทั่วไปจะทำได้ นอกจากนี้ เชื้อบางชนิดไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ เช่น human papilloma virus เป็นต้น ส่วนการตรวจหาเชื้อโดยใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา มักประสบปัญหาเรื่องความไวไม่สูงพอ ในกรณีที่มิมีเชื้ออยู่ในสิ่งส่งตรวจในปริมาณไม่มากพอ



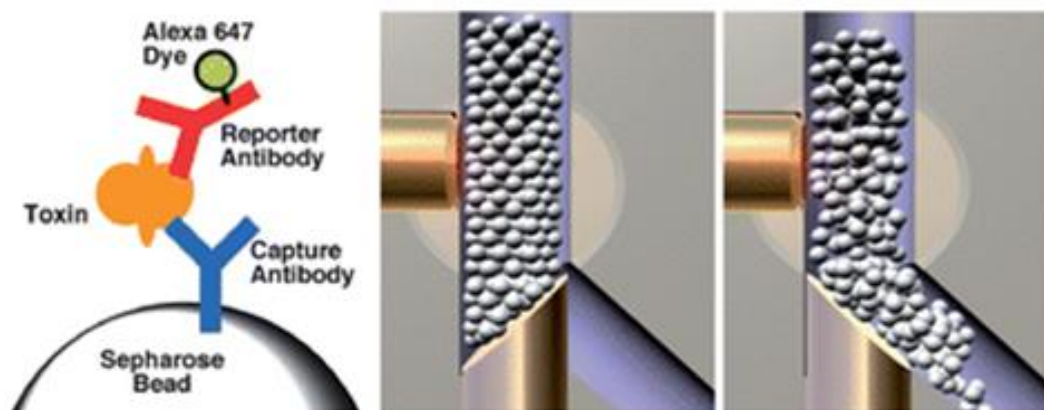
รูปที่ 5 หลักการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค (จาก Madigan, Martinko, Stahl, and Clark. 2012: 879)

การระบุเชื้อแบคทีเรีย (unknown) ในตัวอย่างส่งตรวจหรือจากการเพาะเลี้ยง เป็นงานที่ทำทนาย วิธีทดสอบที่ใช้เพื่อระบุในระดับของสกุล (genus) และชนิด (species) ของแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 3 ประเภทหลัก ได้แก่ 1) ฟิโนไทป์ (phenotype) ซึ่งจะเป็นการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งแบบ microscopic และ macroscopic รวมทั้งสรีรวิทยาของแบคทีเรีย หรือชีวเคมี 2) ปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกัน (immunologic) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เลือด หรือน้ำเหลืองวิทยา (serology) และ 3) จีโนไทป์ (genotypic) เป็นการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

การระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ เป็นภัยคุกคามในหลายบริบท และเป็นความเสี่ยงด้านสาธารณสุขที่สำคัญในระดับชาติและระดับสากล ต้องใช้หน่วยงานสุขภาพในระดับชาติ เพื่อประสานความร่วมมือกับหน่วยงานอื่นๆ ในการตอบสนองเพื่อจัดการความเสี่ยงด้านสุขภาพของการระบาดที่เป็นไปได้ว่าจะเกี่ยวข้องกับการใช้เชื้อก่อโรคหรือสารพิษโดยเจตนา ด้วยกลไกการตรวจสอบและการตอบสนองที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ในเหตุการณ์ที่อาวุธชีวภาพได้แพร่กระจายออกไปแล้ว ต้องเพิ่มขีดความสามารถในการติดตามผู้สัมผัส และการเฝ้าระวังเชิงรุก โดยสิ่งที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อที่ใช้เป็นอาวุธชีวภาพ ได้แก่ ระยะฟักตัวของเชื้อ ระยะติดต่อ และความไวต่อเชื้อชนิดนั้นๆ เป็นต้น ซึ่งต้องใช้ความรู้ด้านจุลชีววิทยาและระบาดวิทยาเป็นแนวทางในการปฏิบัติงานดังกล่าว เนื่องจากการตรวจเพื่อระบุและจำแนกเชื้อโรคที่เป็นสาเหตุของการระบาดที่ไม่ใช่การติดเชื้อที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีความจำเป็นที่ต้องทราบผลตรวจภายในระยะเวลาอันสั้น ถูกต้องและมีความแม่นยำสูง เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อจึงเป็น

ตัวเลือกที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตาม ในบางกรณียังต้องใช้วิธีอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การตรวจดูเชื้อโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อหรือแอนติบอดีต่อเชื้อโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา เป็นต้น (ตารางที่ 4)

การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดของท็อกซิน นิยมใช้วิธีการตรวจจับทางชีวภาพ (biosensing) จากเหตุการณ์ก่อการร้ายทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแอนแทรกซ์ในปี พ.ศ. 2544 ตลอดจนเหตุการณ์ที่เกี่ยวข้องต่อมา เป็นแรงผลักดันให้นักวิทยาศาสตร์ต้องคิดค้นวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น สำหรับใช้ในการตรวจสอบอาวุธชีวภาพ การพัฒนาการตรวจจับทางชีวภาพเป็นหนึ่งในนวัตกรรมที่ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อรองรับสถานการณ์ดังกล่าว หลักการของไบโอเซนเซอร์ (biosensor) หรืออุปกรณ์ที่สามารถตรวจจับและส่งสัญญาณทางชีวภาพออกมา โดยอุปกรณ์ดังกล่าวประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ตัวแปลงสัญญาณ และสารชีวภาพ ใช้กลไกการจดจำทางชีวภาพ ซึ่งเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีและมีการถ่ายทอดสัญญาณเฉพาะ อาจเป็นอิเล็กตรอน แสง และอื่นๆ เข้าสู่ตัวแปลงสัญญาณ ซึ่งแปลงสัญญาณทางกายภาพเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเครื่องอ่านสัญญาณให้ผู้ทดสอบอ่านค่าได้ (มาลินี อัสวศิษฐเลิศ. 2552: เว็บไซต์) สารพิษโบทูลินัมเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ทำให้เกิดอาการอัมพาตกล้ามเนื้ออ่อนแรง (flaccid paralysis) และรวมอยู่ในรายการที่อาจนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ วิธีการตรวจหาสารพิษโบทูลินัม ซีโรไทป์ เอ (botulinum neurotoxin serotype A) ถูกพัฒนาขึ้นมาโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (fluidic automation) วิธีการทดสอบเป็นแบบ fluorescence sandwich immunoassay ให้ผลรวดเร็ว ใช้หลักการของไบโอเซนเซอร์คือ อาศัยการจับกันของสารพิษโบทูลินัมกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสารพิษโบทูลินัมจำนวน 2 ตัว แอนติบอดีตัวแรกเชื่อมติดกับเม็ดพลาสติก (Sepharose bead) ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจจับ (capture antibody) ส่วนแอนติบอดีตัวที่สองถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจติดตาม (reporter antibody) ขั้นตอนการทดสอบเริ่มต้นจากการเติมเม็ดพลาสติกที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย สิ่งส่งตรวจ และตัวตรวจติดตาม ลงในคอลัมน์ ตามลำดับ หากในสิ่งส่งตรวจมีสารพิษโบทูลินัมก็จะเกิดการจับกัน เมื่อผ่านแสงเลเซอร์จะทำให้เกิดการเรืองแสง และถูกตรวจจับด้วยเครื่องบันทึกสัญญาณและแสดงผล ทำให้ผู้ทดสอบสามารถอ่านผลได้ภายในเวลา 20 นาที จากการทดลองระบบพบว่า สามารถตรวจสารพิษโบทูลินัมได้ในปริมาณตั้งแต่ 10×10^{-12} โมลาร์ (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โคอะเกรม fluorescence sandwich immunoassay ในการตรวจหาสารพิษโบทูลินัม (จาก Gate, *et al.* 2009: 987-996)

กรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระจายสปอร์ของเชื้อแอนแทรกซ์ผ่านทางระบบไปรษณีย์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อ ตุลาคม ปีพ.ศ. 2544 (เหตุการณ์ 911) นั้น ผลการตรวจหาและบ่งชี้ชนิด พบว่า เชื้อแอนแทรกซ์ดังกล่าวมีแหล่งที่มาของเชื้อคือ ภายในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยใช้สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้เสียชีวิตทั้ง 5 ราย พบว่า เป็นเชื้อแอนแทรกซ์สายพันธุ์เดียวกัน คือ Ames strain ของ *B. anthracis* ซึ่งถูกแยกเชื้อมาจากซากโคที่มลรัฐเท็กซัส เมื่อปีค.ศ. 1981 แล้วถูกส่งไปเก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิจัยโรคติดเชื้อทางการแพทย์กองทัพอเมริกา (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases: USAMRIID) และยังเป็นสายพันธุ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการของประเทศสหรัฐอเมริกา นอกจากนี้ ยังไม่มีรายงานการระบาดของสายพันธุ์นี้อีก คาดกันว่าผู้กระทำผิดอาจเป็นบุคลากรในสถาบันวิจัยดังกล่าว (Clark and Pazdernick, 2012: 628; The United States Department of Justice, 2010: Website) สำหรับวิธีการตรวจหาและบ่งชี้ชนิดของเชื้อแอนแทรกซ์จากกรณีนี้ ดำเนินการโดย Keim และคณะ ซึ่งเป็นนักจุลชีววิทยาสังกัดมหาวิทยาลัยนอร์ทเทิร์น แอริโซนา มลรัฐแอริโซนา ร่วมกับ Fraser-Liggett และคณะ ซึ่งขณะนั้นดำรงตำแหน่งประธานสถาบัน The Institute for Genomic Research (TIGR) เมืองรีโอควิลล์ มลรัฐแมริแลนด์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ (whole genome sequencing) (Frontline, 2011: Website)

ตารางที่ 4 อาการแสดงทางคลินิก วิธีป้องกันและการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อกลุ่มเอ (จาก Lane and Fauci. 2010: 71-72)

AGENT	CLINICAL SYNDROME	INCUBATION PERIOD	DIAGNOSIS	TREATMENT	PROPHYLAXIS
<i>Bacillus anthracis</i> (anthrax)	Cutaneous lesion: Papule to eschar Inhalational disease: Fever, malaise, chest and abdominal discomfort Pleural effusion, widened mediastinum on chest x-ray	1–12 days 1–60 days	Culture, Gram's stain, PCR, Wright's stain of peripheral smear	Postexposure: Ciprofloxacin, 500 mg, PO bid × 60 d or Doxycycline, 100 mg PO bid × 60 d also (Amoxicillin, 500 mg PO q8h, likely to be effective if strain penicillin sensitive) Active disease: Ciprofloxacin, 400 mg IV q12h or Doxycycline, 100 mg IV q12 plus Clindamycin, 900 mg IV q8h and/or rifampin, 300 mg IV q12h; switch to PO when stable × 60 d total Antitoxin strategies: Neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies are under study	Anthrax vaccine adsorbed Recombinant protective antigen vaccines are under study
<i>Yersinia pestis</i> (pneumonic plague)	Fever, cough, dyspnea, hemoptysis Infiltrates and consolidation on chest x-ray	1–6 days	Culture, Gram's stain, direct fluorescent antibody, PCR	Gentamicin, 2.0 mg/kg IV loading then 1.7 mg/kg q8h IV or Streptomycin, 1.0 g q12h IM or IV Alternatives include doxycycline, 100 mg bid PO or IV; chloramphenicol 500 mg qid PO or IV	Doxycycline, 100 mg PO bid (ciprofloxacin may also be active) Formalin-fixed vaccine (FDA licensed; not available)
<i>Variola major</i> (smallpox)	Fever, malaise, headache, backache, emesis Maculopapular to vesicular to pustular skin lesions	7–17 days	Culture, PCR, electron microscopy	Supportive measures; consideration for cidofovir, antivaccinia immunoglobulin	Vaccinia immunization
<i>Francisella tularensis</i> (tularemia)	Fever, chills, malaise, myalgia, chest discomfort, dyspnea, headache, skin rash, pharyngitis, conjunctivitis Hilar adenopathy on chest x-ray	1–14 days	Gram's stain, culture, immunohistochemistry, PCR	Streptomycin, 1 g IM bid or Gentamicin, 5 mg/kg per day div q8h IV for 14 days or Doxycycline, 100 mg IV bid or Chloramphenicol, 15 mg/kg IV qid or Ciprofloxacin, 400 mg IV bid	Doxycycline, 100 mg PO bid × 14 days or Ciprofloxacin, 500 mg PO bid × 14 days
Viral hemorrhagic fevers	Fever, myalgia, rash, encephalitis, prostration	2–21 days	RT-PCR, serologic testing for antigen or antibody Viral isolation by CDC or U.S. Army Medical Institute of Infectious Diseases	Supportive measures Ribavirin 30 mg/kg up to 2 g × 1, followed by 16 mg/kg IV up to 1 g q8h for 4 days, followed by 8 mg/kg IV up to 0.5 g q8h × 6 days	No known chemoprophylaxis Consideration for ribavirin in high-risk situations Vaccine exists for yellow fever
Botulinum toxin (<i>Clostridium botulinum</i>)	Dry mouth, blurred vision, ptosis, weakness, dysarthria, dysphagia, dizziness, respiratory failure, progressive paralysis, dilated pupils	12–72 h	Mouse bioassay, toxin immunoassay	Supportive measures including ventilation 5000–9000 IU equine antitoxin	Administration of antitoxin

Note: CDC, U.S. Centers for Disease Control and Prevention; FDA, U.S. Food and Drug Administration; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase PCR.

การจำแนกโดยวิธีทางพันธุกรรม (Genotypic methods)

การตรวจหาสารพันธุกรรมเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อการบ่งชี้และการจำแนกประเภทของแบคทีเรีย วิธีทดสอบทางพันธุกรรมมีข้อดีมากกว่าวิธีทดสอบทางฟิโนไทป์หลายประการ ข้อแรก คือ การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไม่จำเป็นเสมอไป ในระยะสิบปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ตระหนักดีว่า มีจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการมากกว่าจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ อีกข้อหนึ่ง คือ วิธีทดสอบทางพันธุกรรมถูก

พัฒนาเป็นวิธีการทดสอบโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (automated system) เพิ่มขึ้น และได้ผลการทดสอบในเวลาที่รวดเร็วตลอดจนมีความแม่นยำมากกว่าวิธีทดสอบทางฟิโนไทป์

วิธีการจำแนกโดยวิธีอณู (Molecular typing)

ในที่นี้จะกล่าวถึง 3 วิธีด้วยกัน ดังนี้

1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA amplification; PCR-based methods)

เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ไม่ว่าจะเป็น nested PCR, multiplex PCR, RT-PCR, real-time PCR นั้น นอกจากนิยมนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อแล้ว ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาระบาดวิทยา ระดับอณูของโรคติดเชื้อได้ด้วย และนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากมีความไวสูง สะดวกและรวดเร็วในการตรวจผล รวมทั้งสามารถใช้ได้กับเชื้อก่อโรคทุกประเภท ไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย ไวรัส รา หรือปรสิต ตัวอย่างของการใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการจำแนกเชื้อก่อโรค ได้แก่ การทดสอบเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแอนแทรกซ์ โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในยีน *vrnA* ของ *B. anthracis* โดยใช้เทคนิค variable number tandem repeats (VNTRs) ทำให้สามารถแยก *B. anthracis* สายพันธุ์ต่างๆ ออกจากกันได้ชัดเจน เนื่องจากบริเวณยีนดังกล่าวมีจำนวนซ้ำของลำดับ CAATATCAACAA ภายในบริเวณยีนที่ถอดรหัสแล้วได้โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ตั้งแต่ 2-6 ซ้ำ ซึ่งความแตกต่างของจำนวนซ้ำที่พบในแต่ละสายพันธุ์อาจเนื่องมาจากการเลื่อนหลุดของ เอนไซม์ DNA polymerase ในระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอของเชื้อก็เป็นได้ (Clark and Pazdernick, 2012: 628)

2) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (DNA digestion)

Pulse field gel electrophoresis (PFGE) และ Restriction-based methods

PFGE เป็นเทคนิคที่ใช้กระแสไฟฟ้าจาก 2 ทิศทาง เพื่อผลักดันให้ดีเอ็นเอวิ่งไปบนแผ่นเจล กระแสไฟฟ้าจะถูกปล่อยออกมาสลับกันเป็นจังหวะอย่างสม่ำเสมอ ด้วยปริมาณกระแสไฟฟ้าและเวลาที่เท่ากัน ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอต้องปรับทิศทางเพื่อวิ่งให้เข้าทางกับกระแสไฟฟ้า หลักการของ PFGE อยู่ที่การควบคุมการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าที่ต่อเนื่อง ดีเอ็นเอขนาด 30-50 กิโลเบส จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันโดยไม่ขึ้นกับขนาดของโมเลกุล แผลดีเอ็นเอจะถูกแยกออกเป็นแถบเดี่ยวๆ ขนาดใหญ่ก่อน จน

เมื่อมีแรงมากระทำ การแยกส่วนและทิศทางการเคลื่อนจะเปลี่ยนไป ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ในทิศทางใหม่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลใหญ่กว่า เพราะดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ใช้เวลาในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงสนามไฟฟ้า ทำให้ดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่อยู่ล้าหลังกว่าและถูกแยกออกจากโมเลกุลที่เล็กกว่า PFGE นิยมใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาระดับอนุของเชื้อก่อโรคที่พบในอาหาร รวมทั้งสามารถใช้เพื่อตรวจหาและบ่งชี้ชนิดของเชื้อได้ด้วย ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาและบ่งชี้ชนิด เช่น *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157, *Campyrobacter* และ *Listeria* เป็นต้น

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

การศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในโครโมโซมของกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดเป็นแบบแผนที่ยาวและมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่ม หรือสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ในบางกรณีการดูแบบแผนของชิ้นดีเอ็นเอจากเจลไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของแบบแผนเหล่านั้นได้อย่างชัดเจน สามารถนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีน หรือลำดับเบสที่จำเพาะมาเป็นตัวตรวจสอบ (probe) โดยวิธี Southern blot hybridization เช่น การทำ ribotyping หรือ DNA fingerprinting ทั้งสองวิธีสามารถนำมาบ่งบอกความแตกต่างของชนิด หรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นได้ขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม

Restriction endonuclease analysis (REA) of chromosomal DNA

เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นสามารถตัดสายคู่ของดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสจำเพาะ ทำให้โครโมโซมดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะออกมาเป็นสายดีเอ็นเอที่มีขนาดและการเรียงตัวที่ต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ในทางปฏิบัติ ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็นสายสั้นๆ มีขนาดตั้งแต่ 0.5-50 กิโลเบส ซึ่งจะถูกแยกตามขนาดในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์หรือสีย้อมดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ และดูแถบของดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลต แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์จะมีความแตกต่างใน REA pattern เนื่องจากความแตกต่างของการเรียงตัวของลำดับเบสบนโครโมโซม วิธีนี้ใช้ศึกษาได้กับแบคทีเรียทุกชนิด แต่มีข้อจำกัดในความซับซ้อนของ pattern ที่ได้

Southern blot analysis of RFLPs

ถ้า RFLPs นั้น ใช้ดีเอ็นเอส่วนที่สร้าง rRNA (16S rRNA, 25S rRNA) เป็น probe จะเรียกสายพันธุ์ที่แยกเป็น ribotyping ในแบคทีเรียที่มียีนสร้าง rRNA หลายยีน (5-7 ยีน) เช่น *E. coli*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Staphylococcus* จะได้ ribotype patterns 10-15 DNA bands ส่วนแบคทีเรียที่มี 1 ยีนของ rRNA เช่น *Mycobacteria* จะได้ ribotype pattern เพียง 1-2 DNA band(s) เท่านั้น นอกจากนี้ rRNA probe อาจใช้ insertion sequences (IS) และ transposons เป็น probes ซึ่งก็ได้ผลดีในการแยก strains ของแบคทีเรียหลายชนิด เช่น การแยก outbreak strain ของ multidrug-resistant *M. tuberculosis* ออกจาก sporadic multidrug-resistant *M. tuberculosis* ด้วยการใช้ IS6110 เป็น probe เป็นต้น

3) Plasmid analysis

วิธีนี้มีหลักที่ชนิดของพลาสมิดที่ปรากฏอยู่ในแบคทีเรีย ทำการศึกษาด้วยการแยกดีเอ็นเอของพลาสมิด ซึ่งเป็นส่วน extrachromosomal DNA ออกจากแบคทีเรีย และนำไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูขนาดและปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละ strain และอาจใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดก่อนไปทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูขนาดของ restriction fragments (REA of plasmid DNA) วิธีนี้มีข้อเสียที่พลาสมิดเป็น mobile extrachromosomal elements แบคทีเรียบางชนิดอาจไม่มีพลาสมิด หรือเคยมีและหายไป ทำให้จัดแบ่ง strain ไม่ได้ หรือได้แต่ไม่ถาวร

วิทยาการทันสมัยในระบาดวิทยาระดับอนุ (Recent advances in molecular epidemiology)

วิธีจำแนกจุลินทรีย์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหลักสามารถประเมินความผันแปรได้โดยตรง ไม่ว่าจะเป็นลำดับเบสของยีนที่มาจากตำแหน่งเดียวหรือหลายตำแหน่ง เครื่องมือนี้ให้มุมมองระดับพื้นฐานของความผันแปรทางพันธุกรรม ในปัจจุบัน วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Sanger (dideoxy-chain termination method) ถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสิ่งที่จำเป็นสำหรับการจัดจำแนกด้วยเทคนิคนี้คือเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (bioinformatics tools) เช่น ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจำเป็นสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงเปรียบเทียบ รวมทั้งชุดซอฟต์แวร์สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีววิทยา เป็นต้น

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence-based analysis)

การเปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับเบสบนจีโนมของจุลินทรีย์ เป็นวิธีมาตรฐานที่สุดที่ใช้แยกสายพันธุ์ทั้งเก่าและใหม่ โดยอาจใช้วิธี direct sequencing หรือโคลนนิ่งแล้วตามด้วย sequencing ก็ได้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อาจวิเคราะห์ทั้งจีโนมหรือเลือกวิเคราะห์เฉพาะยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจก็ได้ เช่น ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสมักจะเลือก nucleotide sequence ของยีนบางชนิดมาศึกษา ในแบคทีเรียมักจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal DNA (rDNA) หรือยีนอื่นที่สนใจ เป็นต้น และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถประยุกต์ใช้ได้กับจุลินทรีย์ทุกชนิด

Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
Genome sequencing				
16S rDNA sequencing				
Mol% G+C				
DNA-DNA hybridization				
Multilocus sequence typing				
Whole cell protein profiling				
Genomic fingerprinting				

รูปที่ 7 ศักยภาพของเทคนิคในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (จาก Willey, Sherwood, and Woolverton. 2009: 398)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเลือกเฉพาะยีนที่สนใจมาศึกษา ซึ่งการวิเคราะห์แบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

- **SLST (Single-locus sequence typing)**

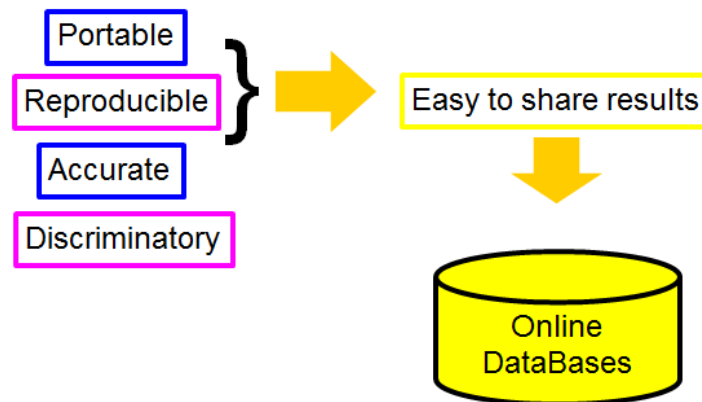
เป็นการเลือกบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงภายในตำแหน่งของยีนเดียวกัน (ภายใน locus เดียวกัน)

- **MLST (Multi-locus sequence typing)**

วิธีนี้เลือกบริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายจากหลาย ๆ ตำแหน่งของยีนซึ่งเป็นยีนจำเป็น (housekeeping gene)

Sequence-Based Typing Methods

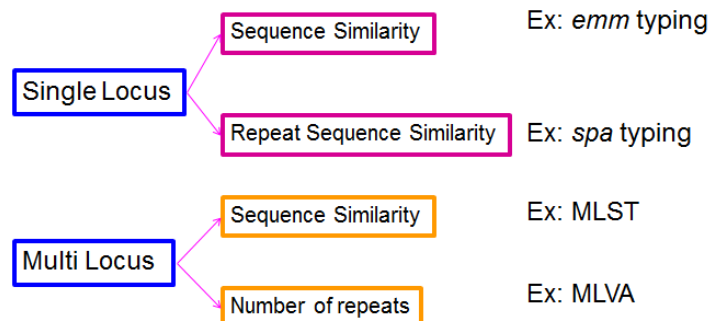
Sequence Based Typing Methods:



รูปที่ 8 ไดอะแกรมแสดงศักยภาพของ Sequence-based typing methods

Sequence-Based Typing Methods

Sequence Based Typing Methods:



รูปที่ 9 วิวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่อาจเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธ ชีวภาพ

การพิจารณาผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีหลักการ ดังต่อไปนี้ (สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่. 2554:

61)

- 1) สายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการติดต่อปรับปรุงพันธุกรรม หรือไม่ใช่สายพันธุ์ปกติ หรือเป็นสายพันธุ์โบราณ
- 2) ผู้ป่วย/กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่ทราบปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อตามธรรมชาติ
- 3) ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะเชื้อก่อโรคทั้งทางโมเลกุล หรือทางพันธุกรรม ที่ตรวจสอบได้จากพื้นที่ที่แตกต่างกัน

องค์ประกอบสำคัญที่ใช้เพื่อพิจารณาว่าเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วย อาวุธชีวภาพ

การพิจารณาว่าการระบาด/อุบัติการณ์ใด เป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพนั้น จำเป็นต้องมีข้อบ่งชี้เพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจก่อนที่จะเริ่มแผนปฏิบัติการตอบสนองต่อสถานการณ์นั้นๆ สำหรับประเทศไทย ทางสำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้จัดทำคู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดต่ออุบัติใหม่ สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข ปี 2554 ซึ่งครอบคลุมถึงการตอบสนองต่อการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยสารชีวะ รวมทั้งมีการกำหนดข้อบ่งชี้ สัญญาณสำหรับการแจ้งเตือนและการเฝ้าระวังโรค และตัวบ่งชี้ทางคลินิกและทางระบาดวิทยา (สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่. 2554: 57-60)

ข้อบ่งชี้ว่าการระบาดเป็นการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ

เกณฑ์ต่อไปนี้ ให้เป็นข้อบ่งชี้สำหรับการระบาดในกรณีเหตุการณ์การจ้องใจกระทำของมนุษย์ด้วยอาวุธชีวภาพ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อก่อโรค/สารพิษที่มีหรือกำลังถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการรุกรานทางชีวภาพ หรือ เคยมีการใช้เป็นสาเหตุของการระบาดโดยเจตนาในอดีต ประกอบด้วย

- 1) การระบาดของโรคติดต่อที่ขยายวงกว้างหรือเกิดขึ้นพร้อมกันหลายการระบาด
- 2) เป็นโรคติดต่อที่ไม่ใช่โรคประจำถิ่นในพื้นที่
- 3) พบผู้ป่วยด้วยโรคติดต่อจำนวนมาก ซึ่งอาจจะเป็นโรคประจำถิ่นในพื้นที่ แต่เป็นโรคที่ติดต่อในคนได้ยาก
- 4) พบกลุ่มผู้ป่วย 2 รายหรือมากกว่า ที่มีความเกี่ยวข้องกันในช่วงเวลาและพื้นที่ที่เกิดโรค ด้วยกลุ่มอาการต่อไปนี้ (ผู้ป่วยอาการรุนแรงเพียงคนเดียวในผู้ที่มีสุขภาพดีมาก่อน อาจจะถูกนำมาพิจารณาด้วย)
 - กลุ่มอาการด้านระบบประสาท เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) สมองอักเสบ (encephalitis) มีพยาธิสภาพในสมอง (encephalopathy) หรือ โรคทางระบบประสาท
 - กลุ่มอาการด้านระบบทางเดินหายใจ โรคปอดอักเสบ หรือภาวะการหายใจล้มเหลวเฉียบพลัน
 - การติดเชื้อในกระแสเลือดเฉียบพลันอย่างรุนแรง หรืออาการช็อก
 - อาการดับอย่างรุนแรงหรือ การทำงานของดับ

สัญญาณสำหรับการแจ้งเตือนและการเฝ้าระวังโรค

- 1) ภัยคุกคามของการใช้อาวุธชีวภาพโดยเจตนาที่เห็นได้ชัดเจน
- 2) ข่าวลือและรายงานทั้งหมดของการป่วยด้วยโรคคล้ายไข้ทรพิษ
- 3) ข่าวลือหรือรายงานทั้งหมดของโรคที่มีผลการตรวจยืนยันว่า เกิดจากเชื้อก่อโรคที่มีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากการใช้อาวุธชีวภาพโดยเจตนาในพื้นที่ที่ไม่ใช่โรคประจำถิ่น (เช่น โรคแอนแทรกซ์ทางเดินหายใจ ไข้กระต่าย หรือกาฬโรค)
- 4) บุคคลที่ก่อนหน้านี้มีสุขภาพดี และป่วยด้วยโรคหรือกลุ่มอาการที่ไม่ทราบสาเหตุอย่างรุนแรง หรือเสียชีวิต

- 5) โรคที่ทราบสาเหตุ แต่เกิดขึ้นผิดปกติในประชากร หรือผิดปกติ หรือมีอาการแสดงทางคลินิกที่ผิดปกติ/อัตราการป่วย และอัตราตายสูงกว่าปกติ
- 6) การระบาดของโรคที่เกิดขึ้นหลายพื้นที่ ด้วยกลุ่มอาการเดียวกัน หรือโรคเดียวกัน ในพื้นที่ที่ไม่ใกล้ชิดกัน
- 7) การป่วยหรือการตายในสัตว์ ซึ่งป่วยก่อนหรือตามมาด้วย การป่วยหรือการเสียชีวิตในคน
- 8) การปล่อยอาวุธชีวภาพโดยไม่เจตนาหรือโดยเจตนาทั้งที่สงสัยหรือทราบแน่ชัดในประเทศอื่นๆ
- 9) การเจ็บป่วยที่ส่งผลกระทบต่อภาคส่วนที่สำคัญในชุมชน (เช่น การเมือง การเงิน) หรือเหตุการณ์ที่มีคนมารวมตัวกันเป็นจำนวนมาก

ตัวบ่งชี้ทางคลินิกและทางระบาดวิทยา

- 1) ความล้มเหลวของการตอบสนองต่อโรคด้วยการรักษา/การให้ยาป้องกันตามปกติ
- 2) ค่ากลางเลขคณิต หรือค่าเฉลี่ยของระยะฟักตัวของโรคสั้นผิดปกติ
- 3) ไม่รู้วิธีการแพร่กระจายของโรคมามาก่อน
- 4) ความสามารถในการติดเชื้อ (จำนวนผู้ที่ติดเชื้อจากผู้ป่วย 1 ราย; infectivity) สูงกว่าที่คาดการณ์ไว้ (เพิ่มความสามารถในการแพร่กระจายของโรค; increase transmissibility)
- 5) อัตราป่วยตายสูงกว่าที่คาดการณ์ไว้ (ความรุนแรงของเชื้อที่เพิ่มขึ้น; increase virulence)
- 6) การตอบสนองต่อขนาดของยา เช่น อัตราป่วยต่ำในประชากร ที่อยู่ในที่ร่ม โดยเฉพาะในพื้นที่ที่ไม่มีการระบายอากาศ หรือ พื้นที่ที่มีที่กรองอากาศ เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรที่อยู่กลางแจ้ง
- 7) การเพิ่มจำนวนผู้มาใช้บริการสาธารณสุขมากผิดปกติ โดยเฉพาะถ้ามาด้วยอาการไข้ อาการในระบบทางเดินหายใจ ระบบประสาท หรือระบบทางเดินอาหาร

จรรยาบรรณของนักจุลชีววิทยา

ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 จรรยาบรรณ หมายถึง ประมวลความประพฤติที่ผู้ประกอบอาชีพการงานแต่ละอย่างกำหนดขึ้น เพื่อรักษาและส่งเสริมเกียรติคุณ ชื่อเสียง และฐานะของสมาชิก อาจเขียนเป็นลายลักษณ์อักษรหรือไม่ก็ได้ หรืออาจหมายถึง หลักความประพฤติอันเหมาะสมแสดงถึงคุณธรรม และจริยธรรมในการประกอบอาชีพที่กลุ่มบุคคลแต่ละสาขาอาชีพประมวลขึ้นไว้เป็นหลัก และการใช้ดุลพินิจ

ทางศีลธรรมที่ว่าด้วยการกระทำของบุคคลว่าถูกหรือผิด สมควรหรือไม่สมควร เพื่อให้สมาชิกในสาขาอาชีพนั้นๆ ยึดถือปฏิบัติ เพื่อรักษาชื่อเสียงและส่งเสริมเกียรติคุณของสาขาวิชาชีพ จึงเป็นหลักปฏิบัติของบุคคลในแต่ละกลุ่มอาชีพ เป็นเครื่องยึดเหนี่ยวจิตใจให้สมาชิกในวิชาชีพนั้นๆ มีคุณธรรมและจริยธรรม แม้สาขาวิชาจุลชีววิทยาหรือกลุ่มบุคคลที่ประกอบอาชีพนักจุลชีววิทยา จะยังไม่มีการรวบรวมหรือกำหนดเป็นมาตรฐานความประพฤติเฉพาะอาชีพอย่างเป็นทางการเป็นลายลักษณ์อักษรก็ตาม แต่นักจุลชีววิทยาเป็นสาขาอาชีพที่อยู่ภายใต้กรอบของอาชีวแพทยศาสตร์ การผลิตอาวุธชีวภาพเป็นการกระทำที่อาศัยองค์ความรู้ด้านจุลชีววิทยา ฉะนั้นนักจุลชีววิทยาต้องตระหนักและยึดถือในคุณธรรม จริยธรรม และจรรยาบรรณ ที่นักจุลชีววิทยาพึงมีอย่างเหนียวแน่น เช่น จรรยาบรรณนักวิทยาศาสตร์ และจรรยาบรรณนักวิจัย เป็นต้น พร้อมทั้งปฏิบัติตามอนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพอย่างเคร่งครัด ใช้องค์ความรู้ในทางที่เป็นประโยชน์ต่อตนเองและสังคม เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงในการพัฒนา ผลิต และใช้อาวุธชีวภาพ ในทางตรงกันข้าม ควรพัฒนาองค์ความรู้ด้านการตรวจสอบและจำแนกจุลินทรีย์ที่อาจมาจากการใช้อาวุธชีวภาพให้มีศักยภาพและประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ได้ภายในเวลาที่รวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ

จรรยาบรรณนักวิทยาศาสตร์

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ทำหน้าที่เป็นห้องปฏิบัติการหลักของประเทศในการควบคุมคุณภาพของชีววัตถุที่ใช้ในประเทศ ได้แก่ ชีววัตถุมาตรฐาน วัคซีน ชีววัตถุเพื่อการรักษา และน้ำยาวินิจฉัยโรคติดต่อทางเลือด ซึ่งบุคลากรที่ปฏิบัติงานในหน่วยงานนี้ ส่วนใหญ่เป็นนักวิทยาศาสตร์และได้มีการกำหนดจรรยาบรรณนักวิทยาศาสตร์ขึ้นเพื่อเป็นแนวทางที่ดีในการปฏิบัติหน้าที่ ดังนี้ (สถาบันชีววัตถุ. 2554: เว็บไซต์)

1. เป็นผู้ที่มีศีลธรรมและคุณธรรมในการดำรงชีวิตและในการประกอบอาชีพ
2. ประกอบอาชีพด้วยความซื่อสัตย์สุจริต ไม่รับทรัพย์สินหรือผลประโยชน์อย่างใดสำหรับตนเองหรือผู้อื่นโดยมิชอบ
3. ต้องมีวินัยในตนเอง พัฒนาตนเองด้านวิชาชีพ บุคลิกภาพและวิสัยทัศน์ให้ทันต่อการพัฒนาทางวิชาการ เศรษฐกิจและสังคม

4. ต้องไม่ทำงานทางวิทยาศาสตร์ที่ขัดต่อความสงบเรียบร้อย ศีลธรรมอันดีของประชาชนและความมั่นคงของชาติ
5. ประพฤติตนเป็นผู้ตรงต่อเวลาและปฏิบัติหน้าที่อย่างเต็มกำลังความสามารถดำรงตนเป็นที่เชื่อถือของบุคคลอื่น รอบคอบ ขยันหมั่นเพียร ถูกต้อง สมเหตุสมผล โดยคำนึงถึงประโยชน์องค์กรเป็นสำคัญ
6. พึงช่วยเหลือเกื้อกูลซึ่งกันและกันอย่างสร้างสรรค์ โดยยึดมั่นในระบบคุณธรรม สร้างความสามัคคีในหมู่คณะ
7. ประพฤติปฏิบัติตนเป็นผู้นำในการอนุรักษ์วัฒนธรรม ภูมิปัญญา สิ่งแวดล้อม รักษาผลประโยชน์ของส่วนรวมและยึดมั่นในการปกครองระบอบประชาธิปไตย
8. มีจรรยาบรรณของนักวิจัยตามที่สภาวิจัยกำหนดไว้

จรรยาบรรณนักวิจัย

คณะกรรมการบริหารสภาวิจัยแห่งชาติ ในการประชุมเมื่อวันที่ 8 เมษายน 2541 ได้กำหนดจรรยาบรรณนักวิจัยขึ้น เพื่อใช้เป็นแนวหลักเกณฑ์ควรประพฤติ ของนักวิจัยทั่วไป ไม่ว่าสาขาวิชาการใดๆ โดยให้มีลักษณะเป็นข้อพึงสัจจคุณธรรม และจริยธรรม ในการทำงานวิจัย ของนักวิจัยไทย ดังนี้ (สภาวิจัยแห่งชาติ, 2541: เว็บไซต์)

ข้อ 1 นักวิจัยต้องซื่อสัตย์และมีคุณธรรมในทางวิชาการและการจัดการ

ข้อ 2 นักวิจัยต้องตระหนักถึงพันธกรณีในการทำวิจัย ตามข้อตกลงที่ทำไว้กับหน่วยงานที่สนับสนุนการวิจัยและต่อหน่วยงานที่ตนสังกัด

ข้อ 3 นักวิจัยต้องมีพื้นฐานความรู้ในสาขาวิชาการที่ทำวิจัย

ข้อ 4 นักวิจัยต้องมีความรับผิดชอบต่อสิ่งที่ศึกษาวิจัย ไม่ว่าจะเป็นสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต

ข้อ 5 นักวิจัยต้องเคารพศักดิ์ศรี และสิทธิของมนุษย์ที่ใช้เป็นตัวอย่างในการวิจัย

ข้อ 6 นักวิจัยต้องมีอิสระทางความคิด โดยปราศจากอคติในทุกขั้นตอนของการทำวิจัย

ข้อ 7 นักวิจัยพึงนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ในทางที่ชอบ

ข้อ 8 นักวิจัยพึงเคารพความคิดเห็นทางวิชาการของผู้อื่น

ข้อ 9 นักวิจัยพึงมีความรับผิดชอบต่อสังคมทุกระดับ

ข้อตกลงระหว่างประเทศเกี่ยวกับการห้ามใช้อาวุธชีวภาพ

ในระดับนานาชาติข้อตกลงเกี่ยวกับการห้ามใช้อาวุธชีวภาพ คือ “อนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพ” (Biological Weapons Convention-BWC) หรือมีชื่อเต็มว่า “อนุสัญญาว่าด้วยการห้ามพัฒนา ผลิต และสะสมอาวุธแบคทีเรีย (ชีวะ) และอาวุธที่токซิน และว่าด้วยการทำลายอาวุธเหล่านี้” ชื่อภาษาอังกฤษว่า Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction เป็นหนึ่งในความตกลงพหุภาคีด้านลดอาวุธที่สะท้อนถึงความพยายามของประชาคมโลก ในการป้องกันไม่ให้มีการแพร่ขยายอาวุธที่มีอำนาจทำลายล้างสูง คือ อาวุธนิวเคลียร์ อาวุธเคมี และอาวุธชีวภาพ

หลักการสำคัญคือ เพื่อลดอาวุธชีวภาพ โดยห้ามไม่ให้ประเทศสมาชิกมีการพัฒนา ผลิต และสะสมอาวุธเชื้อโรคต่างๆ รวมทั้งต้องทำลายอาวุธชีวภาพที่มีอยู่ในครอบครองถือเป็นข้อตกลงฉบับแรกของโลกด้านการลดอาวุธที่มีอานุภาพทำลายล้างสูง มีผลบังคับใช้ตั้งแต่เดือนมีนาคม ค.ศ.1973 ภายหลังที่มีอนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพแล้ว หลายประเทศได้ยุติการทดลองและผลิตอาวุธชีวภาพลง แต่เชื่อกันว่าอาจจะมียังคงไม่ปฏิบัติตามพันธกรณีของอนุสัญญา ยังคงมีการทดลองพัฒนาอาวุธชีวภาพอยู่บ้าง

อนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพได้รับการเจรจาสร้างในกรอบของที่ประชุมว่าด้วยการลดอาวุธ ณ นครเจนีวา แล้วเสร็จเมื่อ ค.ศ. 1971 (พ.ศ. 2514) และเปิดให้มีการลงนามเมื่อ ค.ศ. 1972 (พ.ศ. 2515) โดยมีผลบังคับใช้เมื่อ ค.ศ. 1975 (พ.ศ. 2518) มีสาระสำคัญคือ ห้ามรัฐภาคีพัฒนา ผลิต และสะสมอาวุธชีวภาพ และให้ทำลายอาวุธที่มีอยู่ในครอบครอง อนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพถือเป็นความตกลงพหุภาคีด้านการลดอาวุธฉบับแรกของโลก ซึ่งปัจจุบันมีประเทศต่างๆ เข้าเป็นภาคีอนุสัญญาฯ จำนวน 162 ประเทศ (ข้อมูล ณ เมษายน พ.ศ. 2553 โดยกระทรวงการต่างประเทศ) สำหรับประเทศไทยนั้นได้เข้าเป็นภาคีอนุสัญญาฯ เป็นลำดับที่ 38 โดยให้สัตยาบันเมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม ค.ศ. 1975 (พ.ศ. 2518)

สรุปประเด็นหลักในอนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพ

ข้อ 1 รัฐภาคีแต่ละรัฐแห่งอนุสัญญานี้ รับจะไม่พัฒนา ผลิต สะสม หรือหามาไว้ซึ่ง

- สารจุลินทรีย์หรือสารแบคทีเรียอื่นๆ หรือท็อกซินไม่ว่าจะมาจากแหล่งกำเนิดหรือวิธีการผลิตใด
- อาวุธ ปรักณฑ์ หรือเครื่องส่งที่ทำไว้เพื่อใช้สารพิษ เพื่อมุ่งประสงค์ในการเป็นศัตรูหรือการสู้รบ

ข้อ 2 รัฐภาคีรับจะทำลายหรือเปลี่ยนแปลงไปใช้ในทางสันติ ซึ่งสารท็อกซิน อาวุธ ปรักณฑ์ และเครื่องส่งที่ระบุไว้ในข้อ 1

ข้อ 3 รัฐภาคีรับจะไม่โอนให้ผู้ใดและจะไม่ช่วยเหลือ ส่งเสริม หรือชักจูงให้รัฐหรือองค์การระหว่างประเทศผลิตหรือได้มาซึ่งสารท็อกซิน อาวุธ ปรักณฑ์ หรือเครื่องส่งที่ระบุไว้ในข้อ 1

ข้อ 4 รัฐภาคีรับจะใช้มาตรการที่จำเป็นเพื่อห้ามและป้องกันการพัฒนา ผลิต สะสม ได้มา หรือมีไว้ ซึ่งสารท็อกซิน อาวุธ ปรักณฑ์ หรือเครื่องส่งที่ระบุไว้ในข้อ 1

ข้อ 5 รัฐภาคีรับจะหารือซึ่งกันและกัน และร่วมมือกันแก้ปัญหาซึ่งอาจเกิดจากวัตถุประสงค์หรือการปฏิบัติตามบทบัญญัติของอนุสัญญาฯ ภายใต้กรอบการทำงานของสหประชาชาติ

ข้อ 6

- รัฐภาคีที่พบว่ารัฐภาคีอื่นใดกระทำการละเมิดพันธกรณี ซึ่งเกิดจากบทบัญญัติของอนุสัญญาอาจร้องเรียนไปยังคณะมนตรีความมั่นคงแห่งสหประชาชาติ
- รัฐภาคีรับจะใช้ความร่วมมือในการดำเนินการสืบสวน ซึ่งคณะมนตรีความมั่นคงแห่งสหประชาชาติอาจริเริ่ม ตามที่ได้รับการร้องเรียน

ข้อ 7 รัฐภาคีรับจะให้หรือสนับสนุนการช่วยเหลือตามกฎบัตรแห่งสหประชาชาติ แก่รัฐภาคีใดที่ร้องขอ ถ้าคณะมนตรีความมั่นคงแห่งสหประชาชาติมีมติว่ารัฐภาคีนั้นอยู่ในอันตรายอันเป็นผลเนื่องจากการละเมิดอนุสัญญา

ข้อ 8

- รัฐภาคีรับจะอำนวยความสะดวกมากที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ และมีสิทธิร่วมในการแลกเปลี่ยนปรักณฑ์ วัสดุ และข้อสนเทศทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพื่อการใช้สารชีวภาพและท็อกซินเพื่อความมุ่ง

ประสงค์ในทางสันติ และให้ความร่วมมือสนับสนุนให้มีความก้าวหน้าในการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากการค้นพบทางวิทยาศาสตร์สาขาจุลชีววิทยา เพื่อการป้องกันโรคติดต่อ หรือเพื่อความมุ่งประสงค์อื่นในทางสันติ

- การใช้อนุสัญญานี้จะหลีกเลี่ยงการขัดขวางการพัฒนาเศรษฐกิจหรือเทคโนโลยีของรัฐภาคี หรือความร่วมมือระหว่างประเทศในกิจกรรมทางจุลชีววิทยาเพื่อสันติ รวมทั้งการแลกเปลี่ยนระหว่างประเทศ ซึ่งสารชีวภาพและที่ออกซิน และเครื่องมือสำหรับการผ่านกรรมวิธีการใช้ หรือการผลิตสารชีวภาพ และที่ออกซิน เพื่อความมุ่งประสงค์ในทางสันติตามบทบัญญัติของอนุสัญญา (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544: เว็บไซต์)

บทสรุป

อาวุธชีวภาพถือเป็นอาวุธที่มีอานุภาพในการทำลายล้างสูง ใช้จำนวนเพียงเล็กน้อยก็อาจเป็นอันตรายต่อคนหมู่มากได้ง่าย แม้จะไม่ทำให้ถึงแก่ชีวิตก็อาจก่อความวุ่นวาย ตื่นตระหนกและหวาดระแวง อาวุธชีวภาพและการก่อการร้ายมีผลกระทบทั้งต่อความมั่นคงของชาติ (national security) และการสาธารณสุข (public health) ผลกระทบที่ติดตามมาในแง่จิตวิทยาและสังคม สามารถนำความหายนะมาสู่ตัวบุคคลและสังคม โดยสร้างโศกนาฏกรรมมากกว่าอาวุธชนิดอื่นได้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยว่ามีการระบาดที่ไม่ใช่การติดเชื้อที่เกิดขึ้นตามธรรมชาตินับเป็นงานเร่งด่วนที่ต้องรีบดำเนินการ เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ และภายในระยะเวลาที่รวดเร็ว ศาสตร์ทางจุลชีววิทยาและระบาดวิทยาเป็นองค์ความรู้ที่จำเป็น และนักจุลชีววิทยาเป็นบุคลากรที่มีบทบาทสำคัญ ทั้งในแง่ของการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อโรคที่มาจากอาวุธชีวภาพ และอีกด้านหนึ่งในฐานะที่เป็นผู้มีความรู้ทางจุลชีววิทยาต้องปฏิบัติตามจรรยาบรรณอย่างเคร่งครัดและตระหนักในอนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพอยู่เสมอ เพื่อธำรงไว้ซึ่งสันติภาพของโลก

References

1. มาลินี อัสวดิษฐ์เลิศ. (2552). ไบโอสเซนเซอร์คืออะไร (What's Biosensor?). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.vcharkarn.com/varticle/38381. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
2. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2554). จรรยาบรรณนักวิทยาศาสตร์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.dmsc.moph.go.th/webroot/Biology/biop/.../MoralScientist.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล: 10 กุมภาพันธ์ 2555).

3. สภาวิจัยแห่งชาติ. (2541). **จรรยาบรรณนักวิจัยและแนวทางปฏิบัติ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.riclib.nrct.go.th/ebook/Researcher%20Ethics%20Thai.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล: 10 กุมภาพันธ์ 2555).
4. สำนักโรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2554). **คู่มือการป้องกันควบคุมโรคติดต่ออุบัติใหม่สำหรับบุคลากรทางการแพทย์และสาธารณสุข ปี 2554**. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: beid.ddc.moph.go.th/th_2011/upload/protec.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล: 5 พฤศจิกายน 2554).
5. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. (2544). **อาวุธชีวภาพและอนุสัญญาห้ามอาวุธชีวภาพ**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.biotech.or.th/biosafety/web/db/attach/radF39A0.doc. (วันที่ค้นข้อมูล: 5 พฤศจิกายน 2554).
6. Borio, L., Inglesby, T., Peters, C.J., Schmaljohn, A.L., Hughes, J.M., Jahrling, P.B., *et al.* (2002). Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. **JAMA**. 287: 2391-2405.
7. CBWInfo. (2003). **A Brief History of Chemical and Biological Weapons: Ancient Times to the 19th Century**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.cbwinfo.com/History/History.html. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
8. Christopher, G.W., Cieslak, J., Pavlin, J.A., and Eitzen, E.M. Jr. (1997). Biological warfare: a historical perspective. **JAMA**. 278: 412-417.
9. Clark, D.P. and Pazdernick, N.J. (2012). **Biotechnology: Academic Cell Update**. London: Academic Press.
10. d'Errico, P. (2001). **Jeffrey Amherst and Smallpox Blankets: Lord Jeffrey Amherst's letters discussing germ warfare against American Indians**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.umass.edu/legal/derrico/amherst/lord_jeff.html. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
11. Frontline. (2011). **Paul Keim: "We Were Surprised It Was the Ames Strain"**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.pbs.org/wgbh/pages/frontline/criminal-justice/anthrax-files/paul-keim-we-were-surprised-it-was-the-ames-strain/. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
12. Gate, J.W., Warner, M.G., Ozanich, R.M. Jr., Miller, K.D., Colburn, H.A., Dockendorff, B., *et al.* (2009). Renewable surface fluorescence sandwich immunoassay biosensor for rapid sensitive botulinum toxin detection in an automated fluidic format. **Analyst**. 134: 987-996.
13. Handysides, S. (2009). The History of Bioterrorism: Old Idea, New Word, Continuing Taboo. In: Lutwick, L.I. and Lutwick, S.M. (eds.). **Beyond Anthrax: The Weaponization of Infectious Diseases**. (p. 1-15). New York: Humana Press.
14. Hill, A. (2003). Article History: The day the earth died. **The Observer Magazine** (Monday, March 17, 2003). [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.guardian.co.uk/theobserver/2003/mar/02/features.magazine37. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
15. Lane, H.C. and Fauci, A.S. (2010). Microbial Bioterrorism. In: Kasper, D.L. and Fauci, A.S. (eds.). **Harrison's Infectious Diseases**. (p. 66-80). Columbus: The McGraw-Hill Companies, Inc.

16. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., and Clark, D.P. (2012). **Brock Biology of Microorganisms (13th edition)**. San Francisco: Pearson Education, Inc.
17. Shetty, N., Tang, J.W., and Andrews, J. (2009). **Infectious Disease: Pathogenesis, Prevention, and Case Studies (1st edition)**. Chichester: Wiley-Blackwell.
18. The United States Department of Justice. (2010). **Amerithrax Investigative Summary: Released Pursuant to the Freedom of Information Act**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: www.justice.gov/amerithrax/docs/amx-investigative-summary.pdf. (วันที่ค้นข้อมูล: 3 เมษายน 2555).
19. Wheelis, M. (2004). A short history of biological warfare and weapons. In: Chevrier, M.I., Chomiczewski, K., Dando, M.R., Garrigue, H., Granasztai, G., and Pearson, G.S. (eds.). **The Implementation of Legally Binding Measures to Strengthen the Biological and Toxin Weapons Convention**. (p. 15-31). Dordrecht: Springer.

การประเมินช่วงอายุโดยใช้ Cranial sutures และ Epiphyseal plate

Age estimation by using cranial sutures and epiphyseal plate

พงษ์พิทักษ์ ภูติวัตร *

บทคัดย่อ

การประเมินอายุของผู้เสียชีวิตโดยใช้กระดูกส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย สามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ในกรณีที่ศพนั้นอยู่ในสภาพที่อาจจะถูกทำลายไปเพื่ออำพรางคดี เช่น ถูกเผา ถูกฆ่าหั่นศพ ถูกกัดแทะจากสัตว์ หรืออาจถูกย่อยสลายไปโดยกระบวนการทางธรรมชาติ และสิ่งที่ยังคงหลงเหลืออยู่ก็คือกระดูก เนื่องจากกระดูกเป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรงและทนทานต่อการถูกทำลาย ดังนั้นจึงสามารถที่จะนำมาใช้เป็นหลักฐานในการระบุตัวบุคคลได้ เช่น การระบุเพศ ช่วงอายุ และเชื้อชาติ การระบุช่วงอายุของบุคคลสามารถใช้กระดูกส่วนต่างๆ ในร่างกายได้ เช่น ข้อต่อที่กระดูกศีรษะ (cranial sutures) และแผ่นปิดกระดูก (epiphyseal plate) ที่อยู่ที่ส่วนปลายของกระดูกชนิดยาว เป็นต้น โดยการปิดของข้อต่อที่กระดูกศีรษะก็จะมีระยะเวลาในการเชื่อมปิดที่แตกต่างกัน ทั้งในวัยเด็ก วัยผู้ใหญ่ และวัยชรา การศึกษาเพื่อระบุช่วงอายุจาก sutures สามารถศึกษาได้จากรอยเชื่อมประสานกันของกระดูกแต่ละชิ้นซึ่งสามารถดูจากลักษณะทางกายภาพทั้งจากภายนอกกะโหลกศีรษะ (ectocranial sutures) และจากภายในกะโหลกศีรษะ (endocranial sutures) โดยถ้าเป็นในวัยเด็กรอยเชื่อมของกระดูกก็ยังสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน แต่เมื่อเวลาผ่านไปรอยเชื่อมระหว่างกระดูกดังกล่าวก็จะเริ่มหายไปเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ และจะไม่ทิ้งร่องรอยใดๆ ให้เห็นเมื่อเข้าสู่วัยชรา ส่วนการระบุช่วงอายุของบุคคลโดยใช้แผ่นปิดกระดูกที่เรียกว่า epiphyseal plate ก็สามารถที่จะบ่งบอกถึงช่วงอายุได้ โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนที่อยู่บริเวณ epiphyseal plate ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก ทำให้กระดูกชิ้นนั้นๆ ไม่สามารถที่จะเพิ่มความยาวให้กับร่างกายอีกต่อไป โดยส่วนใหญ่ epiphyseal plate จะปิดเมื่ออายุประมาณ 20 ปี โดยอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน การปิดของ epiphyseal plate จะเกิดขึ้นในเพศหญิงเร็วกว่าเพศชายประมาณ 1 ปี และการปิดของ epiphyseal plate ในกระดูกแต่ละชิ้นก็จะมีระยะเวลาในการปิดที่แตกต่างกัน โดย epiphyseal plate ที่กระดูกไหปลาร้า (clavicle) ทางด้าน medial end จะปิดช้าที่สุดในร่างกายเมื่ออายุระหว่าง 25-28 ปี

คำสำคัญ : Age estimation, Cranial suture, Epiphyseal plate

บทนำ

ในปัจจุบันคดีทางอาชญากรรมต่างๆ มากมายที่ไม่สามารถทราบได้ว่าผู้ตายเป็นใคร โดยเฉพาะเมื่อพบศพที่มีลักษณะการเน่าสลายและแปรสภาพไปตามระยะเวลา ซึ่งทำให้การระบุตัวบุคคลเป็นไปด้วยความลำบากยิ่งขึ้น ข้อมูลที่ได้จากศพนั้นเป็นสิ่งสำคัญที่จะนำไปสู่การสืบสวนสอบสวน ในบางคดีผู้ตายได้เสียชีวิตเป็นระยะเวลานาน และเหลือเพียงโครงกระดูก จึงจำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางนิติมานุษยวิทยาเพื่อระบุว่าโครงกระดูกที่พบนั้น มีเพศ อายุ ความสูง และเชื้อชาติอะไรบ้าง การประเมินอายุของผู้เสียชีวิตโดยใช้กระดูกส่วนต่างๆ ของร่างกายมาเป็นหลักฐานสนับสนุนงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการระบุตัวบุคคล และเพื่อเป็นแนวทางการสืบสวนสอบสวนนั้นสามารถใช้ได้เป็นอย่างดี ส่วนของกระดูกที่สามารถนำมาใช้ในการประเมินช่วงอายุ ได้แก่ ข้อต่อที่กระดูกศีรษะ (cranial sutures) แผ่นปิดกระดูก (epiphyseal plate) รอยต่อระหว่างกระดูกหัวหน่าว (pubic symphysis) ส่วนของกระดูกอ่อนที่เชื่อมระหว่างกระดูกหน้าอกและกระดูกซี่โครง (ribs) กระดูกสันหลัง (vertebrae) และฟัน (teeth)

การศึกษาเกี่ยวกับการปิดของ suture ซึ่งเป็นข้อต่อของกระดูกกะโหลกศีรษะ และ epiphyseal plate ในกระดูกชนิดยาว มีประโยชน์ในการที่จะระบุช่วงอายุของบุคคลในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ หรืองานทางด้านโบราณคดี เพราะกระดูกชิ้นต่างๆ ในร่างกายของคนเรามีระยะเวลาในการปิดของ epiphyseal plate ที่แตกต่างกัน รวมทั้งในข้อต่อ sutures ก็มีระยะเวลาในการเชื่อมปิดแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุ ดังนั้นในการเขียนบทความในครั้งนี้งจึงสนใจที่จะรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการประเมินช่วงอายุของบุคคลโดยใช้รอยประสานระหว่างกระดูกชนิดแบนที่เรียกว่า suture ที่กะโหลกศีรษะ และแผ่นปิดกระดูกที่เรียกว่า epiphyseal plate ที่อยู่ส่วนปลายของกระดูกชนิดยาว เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

การเจริญพัฒนาของกระดูกในร่างกาย

กระดูกเจริญพัฒนามาจากเซลล์ mesenchyme ทั้งหมด เพียงแต่ว่ามีลักษณะการเจริญพัฒนาที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะได้แก่

1. Membranous bone เป็นกลุ่มของกระดูกที่เจริญแบบ intramembranous ossification ในการเจริญของกระดูกแบบนี้เกิดจากกลุ่มเซลล์ mesenchyme มาอยู่รวมกลุ่มกันในบริเวณที่จะเจริญพัฒนาเป็นกระดูก เช่น กระดูกแบนบริเวณศีรษะ (flat bone of the skull) จากนั้น mesenchyme จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น osteoblast ซึ่งเป็นเซลล์อ่อนของกระดูก ต่อมาเซลล์อ่อนนี้จะสร้างสาร osteoid ออกมาล้อมรอบเซลล์ และมีการดึงแคลเซียมเข้ามาสะสมจนเกิดเป็นแท่งของกระดูก (trabecula) ส่วนเซลล์ osteoblast ก็เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ osteocyte (Eerden และคณะ, 2003)

2. Cartilaginous bone เป็นกลุ่มของกระดูกที่มีการเจริญโดยมีกระดูกอ่อนเป็นต้นแบบมาก่อน (cartilaginous model) หลังจากนั้นจึงมีการเจริญของกระดูกเข้าไปแทนที่เนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เรียกการเจริญของกระดูกแบบนี้ว่า intracartilagenous ossification หรือ endochondral bone formation กระดูกในร่างกายที่มีการเจริญมาแบบนี้ส่วนใหญ่เป็นกระดูกชนิดยาว (long bones) เช่น กระดูกต้นแขน (humerus) และกระดูกต้นขา (Femur) เป็นต้น (Eerden และคณะ, 2003)

การประเมินช่วงอายุของกระดูก

การประเมินช่วงอายุของมนุษย์โดยใช้กระดูก สามารถแบ่งช่วงอายุออกได้เป็น 3 ระยะกว้างๆ คือ การประเมินช่วงอายุในวัยเด็ก (subadults) การประเมินช่วงอายุที่มีการเปลี่ยนแปลงจากวัยเด็กเข้าสู่ผู้ใหญ่ (transition phase) และการประเมินช่วง

อายุในวัยผู้ใหญ่ (adults) ตลอดจนวัยชรา การประเมินช่วงอายุในวัยเด็กประกอบด้วยระยะ fetuses, newborns, infants, children และ adolescents การประเมินช่วงอายุที่มีการเปลี่ยนแปลงจากวัยเด็กเข้าสู่ผู้ใหญ่ ได้แก่ช่วงอายุระหว่าง 20-25 ปี และการประเมินช่วงอายุในวัยผู้ใหญ่ หลังจากผ่าน 25 ปีไปแล้ว ซึ่งการประเมินช่วงอายุในวัยผู้ใหญ่มีความยุ่งยากมากกว่าในวัยเด็ก เนื่องจากในผู้ใหญ่มีการเจริญพัฒนาของกระดูกและฟันเสร็จเรียบร้อยแล้ว ดังนั้นการประเมินช่วงอายุในวัยผู้ใหญ่จึงมีความคลาดเคลื่อนสูง ส่วนใหญ่การประเมินช่วงอายุของกระดูกในวัยผู้ใหญ่จนถึงวัยชรา นั้น มักจะสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของกระดูก และลักษณะการเสื่อม รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของฟันด้วย (Cunha และคณะ, 2009) ซึ่งการประเมินช่วงอายุของกระดูกนั้นสามารถดูได้จากส่วนต่างๆ ของกระดูกเช่น แนวกระดูกประสานของกระดูกกะโหลกศีรษะ (cranial sutures), แผ่นปิดกระดูก (epiphyseal plate), รอยต่อระหว่างกระดูกหัวหน้า (pubic symphysis) , กระดูกซี่โครง (ribs) และกระดูกสันหลัง (vertebrae) เป็นต้น

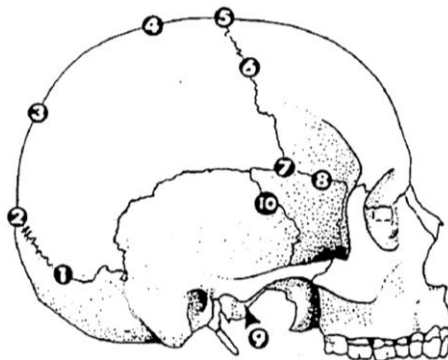
การประเมินช่วงอายุโดยใช้แนวกระดูกประสาน (sutures) ของกระดูกกะโหลกศีรษะ

Sutures จัดเป็นข้อต่อชนิด fibrous joint ซึ่งเป็นข้อต่อที่ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกระดูกกะโหลกศีรษะซึ่งประกอบด้วย กระดูกหน้าผาก (frontal bone) กระดูกด้านข้างศีรษะ (parietal bone) กระดูกข้างหู (temporal bones) กระดูกท้ายทอย (occipital bone) กระดูกรูปผีเสื้อ (sphenoid bone) และกระดูกขี้จุก (ethmoid bone) โดยกระดูกเหล่านี้เชื่อมต่อกันด้วยข้อต่อที่เรียกว่า suture ซึ่ง suture นั้นมีลักษณะเป็นเส้นหยักมีการเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ สามารถใช้ในการประเมินช่วงอายุของบุคคลได้ ในช่วงวัยเด็กยังเชื่อมติดกันไม่สนิท พอเริ่มเข้าสู่ผู้ใหญ่รอยต่อก็เริ่มเชื่อมติดกันแน่นยิ่งขึ้น และร่องรอยของการเชื่อมต่อนี้จะเริ่มหายไปเมื่อเข้าสู่วัยชรา (Daisy และคณะ, 2005) โดย cranial suture ประกอบด้วย Coronal suture เป็นรอยต่อของกระดูกที่อยู่ระหว่างกระดูก parietal และกระดูก frontal Sagittal suture เป็นรอยต่อของกระดูกที่อยู่ระหว่างกระดูก parietal Lambdoid suture เป็นรอยต่อของกระดูกที่อยู่ระหว่างกระดูก occipital และกระดูก parietal Squamous suture เป็นรอยต่อของกระดูกที่อยู่ระหว่างกระดูก parietal และกระดูก temporal นอกจากนี้ยังมี sutures ที่อยู่บริเวณเพดานปาก (palate) ได้แก่ Incisive suture ซึ่งเป็นรอยต่อที่แยกบางส่วนของกระดูก maxilla ที่มีฟันตัด (incisors) อยู่เรียกกระดูกส่วนนี้ว่า premaxilla ส่วน Transverse palatine suture เป็นข้อต่อที่เชื่อมระหว่างกระดูก maxilla และกระดูก palatine นอกจากนี้ยังมี Median palatine suture ซึ่งเป็นข้อต่อที่เชื่อมระหว่างกระดูก maxilla และ palatine ข้างซ้ายและขวาซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือส่วนหน้า (Anterior median palatine suture) และส่วนหลัง (Posterior median palatine suture) ของรอยประสานซึ่งส่วนหน้าและส่วนหลังถูกแบ่งโดย Transverse palatine suture

แนวกระดูกประสาน (sutures) ของกระดูกกะโหลกศีรษะในเด็กที่คลอดออกมาใหม่จะยังเชื่อมติดกันไม่สนิท ทำให้สามารถเห็นส่วนของรอยบุ๋มที่กระดูกกะโหลกศีรษะได้ชัดเจน รอยบุ๋มเหล่านี้เรียกว่า fontanelle ประกอบด้วยหลายส่วนด้วยกัน เช่น anterior fontanelle จะปิดในสองปีหลังจากคลอด และ posterior fontanelle จะปิดในสองเดือนหลังจากคลอด (Steven, 2005) การศึกษาการปิดของ cranial sutures มักจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ระบุช่วงอายุของผู้เสียชีวิตได้ เพราะการปิดของ cranial sutures เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกายที่มีความสัมพันธ์กับอายุ การศึกษาการปิดของ cranial sutures ดูได้จากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยดูได้จากการเชื่อมติดกันของกระดูกที่ได้มา Sutures ที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ รอยประสานทางด้านนอกของกะโหลกศีรษะ (ectocranium) รอยประสานทางด้านในของกะโหลกศีรษะ (endocranium) และรอยประสานที่กระดูกเพดานปาก (palate)

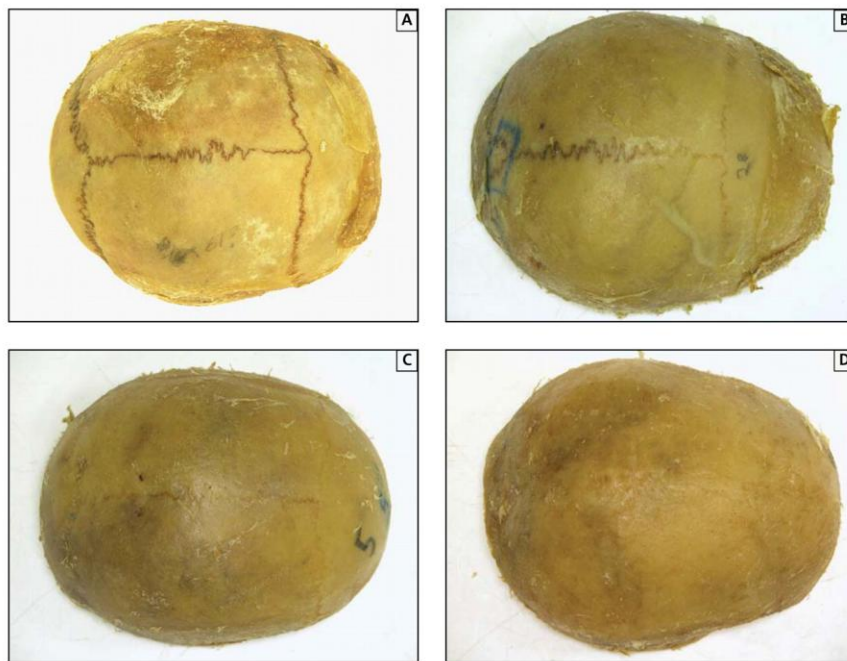
Ectocranium คือบริเวณที่อยู่ภายนอกกะโหลกศีรษะประกอบด้วย sutures หลายส่วน ซึ่งแต่ละส่วนก็จะมีการปิดและเริ่มที่จะเชื่อมติดกันสนิทจนไม่ทิ้งร่องรอยเหลือไว้ให้เห็นตามเวลาที่เปลี่ยนไป การเชื่อมติดกันของ sutures แต่ละส่วนก็ใช้ระยะเวลาไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงสามารถที่จะใช้ sutures ประเมินช่วงอายุของบุคคลที่เสียชีวิตได้ในทางนิติวิทยาศาสตร์ Endocranium คือบริเวณที่อยู่ภายในกะโหลกศีรษะประกอบด้วย sutures 3 ส่วนอยู่ที่บริเวณส่วนบนของกะโหลกศีรษะ และมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา โดย Todd และ Lyon (1924) ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า การประเมินช่วงอายุของ sutures จากทางด้านใน จะให้ความแม่นยำและความถูกต้องมากกว่าทางด้านนอก Buikstra และ Ubelaker (1994) ยังได้ศึกษาถึงการประเมินช่วงอายุจากกะโหลกศีรษะทางด้านใน พบว่าสามารถที่จะระบุช่วงอายุของการเสียชีวิตได้พอสังเขปเท่านั้น ส่วน suture ที่บริเวณ palate ก็พบว่าการเชื่อมติดกันจนร่องรอยหายไปเช่นกัน ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นตลอดช่วงอายุขัย

การศึกษา cranial suture จากทางด้านนอก Meindl และ Lovejoy (1985) ได้รายงานตำแหน่งต่างๆ บนกะโหลกศีรษะที่สามารถใช้ในการประเมินช่วงอายุได้ โดยตำแหน่งที่สามารถใช้ประเมินได้มี 10 ตำแหน่ง ได้แก่ midlambdoid, lambda, obelion, anterior sagittal, bregma, midcoronal, pterion, sphenofrontal, inferior sphenotemporal และ superior sphenotemporal เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในเทคนิค ได้มีการแบ่งตำแหน่งเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ ตำแหน่งที่อยู่ในส่วนโค้ง (vault location) ได้แก่ midlambdoid, lambda, obelion, anterior sagittal, bregma และ midcoronal ส่วนตำแหน่งที่อยู่ทางด้าน lateral-anterior cranium ได้แก่ midcoronal, pterion, sphenofrontal, inferior sphenotemporal และ superior sphenotemporal (รูปที่ 1) โดยการประเมินช่วงอายุจากตำแหน่งเหล่านี้มีความแม่นยำนำมาใช้ร่วมกันหลายๆจุด และงานวิจัยนี้ยังได้สรุปไว้ว่าการประมาณอายุโดยใช้ตำแหน่งต่างๆ บน suture นั้น ต้องทราบเพศ และเชื้อชาติของโครงกระดูกด้วยจึงจะทำให้เกิดความแม่นยำ เพราะพารามิเตอร์ดังกล่าวจะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการประเมิน นอกจากนี้การประเมินด้วยเทคนิคนี้ยังต้องประเมินร่วมกับส่วนอื่นๆ ของกระดูกจึงจะทำให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น



รูปที่ 1 แสดงตำแหน่งต่างๆ บนกะโหลกศีรษะที่สามารถใช้ในการประเมินช่วงอายุได้ โดยแบ่งออกเป็น 10 ตำแหน่งโดยที่ 1 = Midlamboid, 2 = Lambda, 3 = Obelion, 4 = Anterior sagittal, 5 = Bregma, 6 = Midcoronal, 7 = Pterion, 8 = Sphenofrontal, 9 = Inferior sphenotemporal และ 10 = Superior sphenotemporal (ที่มา : Meindl และ Lovejoy, 1985)

Buikstra และ Ubelaker (1994) ได้มีการแบ่งระยะการปิดของ sutures ออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะ open, minimal, significant และ obliteration ในระยะ open หมายถึง แนวกระดูกประสาน (suture) ยังไม่มีการเชื่อมติดกัน ช่องว่างที่อยู่ระหว่างกระดูกที่ติดกันเป็นร่องที่ลึก ระยะ minimal หมายถึง ลักษณะที่มีการเชื่อมติดกันของแนวกระดูกภายใน suture โดยตลอดความยาวของ suture มีการเชื่อมติดกันน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะ significant หมายถึง ระยะที่มีการเชื่อมติดกันของ suture โดยตลอดความยาวของ suture มีการเชื่อมติดกันมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่ก็ยังคงมีบางส่วนที่ยังคงเปิดอยู่ ระยะสุดท้ายคือ obliteration หมายถึงระยะที่มีการเชื่อมติดกันของกระดูกโดยสมบูรณ์ ไม่สามารถมองเห็นช่องระหว่างกระดูกได้ ถึงแม้ว่าวิธีการศึกษาการปิดของ sutures คู่ก่อนข้างจะคลุมเครือเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า แต่เมื่อทำการศึกษาก็ควรเลือกใช้วิธีการอื่นๆ ร่วมด้วย เพื่อความแม่นยำมากขึ้น ต่อมา Rosanna และคณะ (2006) ได้แบ่งระยะการปิดของ cranial suture ออกเป็น 5 ระยะ (รูปที่ 2) และทำการประเมินอายุตามวัยต่างๆ ได้แก่ Grade 0 ยังคงแสดงรอยเชื่อมติดกันของ sutures ให้เห็นแบบชัดเจน แสดงว่ากะโหลกศีรษะดังกล่าวน่าจะอยู่ในวัยเด็กและวัยรุ่น Grade 1 เริ่มมีการเชื่อมแนบชิดติดกันของ sutures และรอยเชื่อมติดกันนั้นเริ่มหายไป แสดงว่ากะโหลกศีรษะดังกล่าวน่าจะอยู่ในวัยผู้ใหญ่ตอนต้น Grade 2 มีการหายไปของร่องรอย sutures ที่เชื่อมติดกัน แต่น้อยกว่า 50% แสดงว่ากะโหลกศีรษะดังกล่าวน่าจะอยู่ในวัยผู้ใหญ่ตอนกลาง Grade 3 มีการหายไปของร่องรอย sutures ที่เชื่อมติดกัน มากกว่า 50% แสดงว่ากะโหลกศีรษะดังกล่าวน่าจะอยู่ในวัยผู้ใหญ่ตอนปลาย Grade 4 มีการหายไปของร่องรอย sutures ที่เชื่อมติดกัน 100% แสดงว่ากะโหลกศีรษะดังกล่าวน่าจะอยู่ในวัยชรา



รูปที่ 2 แสดงการแบ่งการปิดของ cranial suture ออกเป็นระยะต่างๆ grade: 1 : fused but not obliterated (A), 2 : less than 50% obliterated (B), 3 : more than 50% obliterated (C), 4 : 100% obliterated (D) (ที่มา: Rosanna และคณะ, 2006)

การศึกษา cranial suture จากทางด้านใน (endocranial sutures) ก็สามารถใช้ในการประเมินช่วงอายุการเสียชีวิตได้เช่นกัน โดยบริเวณที่ศึกษาจะอยู่ทางด้านบนภายใน endocranial suture การศึกษาสามารถสังเกตได้ผ่านทาง foramen magnum

หรือศึกษาได้โดยตรงจากกระดูกกะโหลกศีรษะที่ผ่าออกมา การเชื่อมติดกันของ sutures เหล่านี้เป็นเพียงแค่การชี้แสดงลักษณะโดยทั่วไปของกลุ่มประชากรและสามารถที่จะระบุได้ในวัยผู้ใหญ่เท่านั้น โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่

1. ช่วงอายุระหว่าง 20-34 ปี จัดอยู่ในระยะ early
2. ช่วงอายุระหว่าง 35-49 ปี จัดอยู่ในระยะ middle
3. ช่วงอายุ 50 ปีหรือมากกว่า จัดอยู่ในระยะ late

การเชื่อมติดกันของ sutures จากทางด้านในมีความสัมพันธ์กับอายุ โดยแบ่งบริเวณที่ศึกษาออกเป็น 3 ตำแหน่งได้แก่ ตำแหน่งที่อยู่บน coronal suture เริ่มต้นจาก bregma ไปถึง pterion ทางด้านซ้าย ตำแหน่งที่อยู่บน sagittal suture ศึกษาตลอดความยาวของ suture และตำแหน่งที่อยู่บน lambdoid suture ทางด้านซ้าย โดยลักษณะการเชื่อมติดกันของ sutures ให้ยึดตามที่ศึกษาจากทางด้าน ectocranial คือถ้าระดับการเชื่อมติดกันอยู่ในระยะ minimal หรือน้อยกว่าแสดงว่าอยู่ในช่วงวัยผู้ใหญ่ตอนต้น (young adulthood) ถ้าระดับการเชื่อมติดกันอยู่ในระยะ significant แสดงว่าอยู่ในช่วงวัยผู้ใหญ่ช่วงกลาง (middle adulthood) และถ้าระดับการเชื่อมติดกันอยู่ในระยะ obliteration แสดงว่าอยู่ในช่วงอายุมากกว่า 50 ปี (Buikstra และ Ubelaker, 1994)

การประเมินช่วงอายุจากรอยเชื่อมต่อของกระดูกที่อยู่บริเวณเพดานปากที่เรียกว่า palatal suture ก็เป็นรอยเชื่อมต่ออีกบริเวณหนึ่งที่สามารถใช้ในการประเมินช่วงอายุได้ โดยรอยเชื่อมต่อดังกล่าวประกอบด้วย incisive suture เป็นรอยเชื่อมต่อที่อยู่ทางด้านหน้าของกระดูกขากรรไกรบนซึ่งมีฟันติดอยู่ ซึ่งบางครั้งอาจเรียกบริเวณดังกล่าวว่า premaxilla พบใน infants และ children ต่อมาเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่รอยเชื่อมดังกล่าวก็จะหายไป median palatal suture เป็นรอยเชื่อมต่อที่แยกระหว่างกระดูก maxilla และ palatine ข้างซ้ายและขวาออกจากกัน transverse palatine suture แยกกระดูก maxilla ออกจากกระดูก palatine การศึกษาเชื่อมติดกันของ sutures เหล่านี้แบ่งออกเป็น 4 บริเวณได้แก่ incisive suture, anterior part ของ median palatine suture, posterior part of median palatine suture และ transverse palatine suture Buikstra และ Ubelaker (1994) ได้รายงานว่าการเชื่อมติดกันแบบสมบูรณ์ของ incisive suture และการเชื่อมติดกันเพียงบางส่วนของ posterior median palatine suture และ transverse palatine suture แสดงว่ากระดูกนั้นอยู่ในวัยผู้ใหญ่ตอนต้น (young adulthood) ถ้ามีการเชื่อมติดกันโดยสมบูรณ์ของ incisive suture, posterior part of median palatal suture และ transverse palatine suture แต่บางส่วนของ anterior part of median palatal suture ยังคงเปิดอยู่แสดงว่ากระดูกนั้นอยู่ในวัยผู้ใหญ่ช่วงกลาง (middle adulthood) แต่ถ้ามีการเชื่อมติดกันของ palatal sutures ทุกอันแบบสมบูรณ์แสดงว่ากระดูกนั้นอยู่ในวัยผู้ใหญ่ตอนปลาย (late adulthood) นอกจากนี้นงานวิจัยของ Mann และคณะ (1987) ที่ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์ระดับการปิดของ suture อย่างสมบูรณ์ (obliteration) ให้ข้อสรุปอย่างกว้างๆ ไว้ว่า Incisive suture จะมีการปิดเร็วกว่า suture อื่นๆ ของกระดูกเพดานปาก และมีระยะเวลาการปิดเริ่มในวัยเด็กและปิดจนสมบูรณ์พบเร็วที่สุดเมื่ออายุประมาณ 25 ปี และในส่วนของ Posterior median palatine suture พบว่าจะเริ่มปิดเร็วที่สุดเมื่ออายุ 25 ปี และพบการปิดแบบสมบูรณ์อย่างรวดเร็วที่สุดเมื่ออายุ 36 ปี นอกจากนั้นในงานวิจัยยังได้กล่าวอีกว่าในส่วน of Anterior median palatine suture และ Transverse palatine suture จะยังไม่มีมีการปิดในคนที่อายุน้อยกว่า 43 ปี และในคนที่มีความอายุ 60 ปีขึ้นไป จะมีส่วนของ suture ของเพดานปากปิดอย่างสมบูรณ์อย่างน้อย 2 แห่ง จากรายงานดังกล่าวจึงสามารถอนุมานได้ว่าการใช้ sutures ที่เพดานปากในการที่จะประเมินช่วงอายุของบุคคลหลังที่เสียชีวิตได้เช่นกันแต่เป็นไปในลักษณะที่ค่อนข้างกว้าง

จากงานวิจัยต่างๆ อาจพอสรุปได้ว่า Cranial sutures จะเริ่มเชื่อมติดกันสนิทสมบูรณ์ในช่วงวัยผู้ใหญ่จนกระทั่งอายุถึง 40 ปี และเมื่อมีอายุมากขึ้น sutures ก็จะเชื่อมติดกันสนิทจนกระทั่งรอยเชื่อมหายไป Mckern และ Stewart (1957) ได้ศึกษากระดูกกะโหลกศีรษะจำนวน 369 ชิ้น จากชิ้นส่วนของกระดูกที่ยังคงหลงเหลืออยู่ของทหารอเมริกัน ที่มีอายุระหว่าง 17-50 ปี ที่ถูกฆ่า

ตายในสงครามเกาหลีเหนือ พบว่ากะโหลกศีรษะจำนวน 55 ชิ้น ที่มีอายุ 17-18 ปี มีการเชื่อมติดกันของ sutures เพียงบางส่วน โดยพบที่ sagittal suture 25% coronal suture 1% และ lambdoid suture 8% นอกจากนี้การศึกษาในประชากรอินเดีย (Daisy และคณะ, 2005) พบว่า บุคคลที่มีอายุ 18-20 ปี มีการเชื่อมติดกันของ sutures เพียงบางส่วน โดยพบที่ sagittal suture 14% coronal suture 16.3% และ lambdoid suture 4.7%

Todd และ Lyon (1924) ได้ศึกษาช่วงระยะเวลาการปิดของ skull sutures ในเพศชายชาวอเมริกันผิวขาวจำนวน 307 ชิ้น และในคนผิวดำ (Negroes) จำนวน 120 ชิ้น พบว่าทั้งในคนผิวขาวและผิวดำ มีรูปแบบการปิดของ sutures จากทางด้านนอกดังนี้ ที่ sagittal suture เริ่มมีการเชื่อมติดกันที่อายุ 22 ปี และจะเชื่อมติดกันแบบสมบูรณ์เมื่ออายุ 35 ปี ที่ coronal และ lambdoid suture เริ่มมีการเชื่อมติดกันที่อายุ 26 ปี และจะเชื่อมติดกันแบบสมบูรณ์เมื่ออายุ 42 ปี นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Perizonius (1984) ได้ศึกษาการเชื่อมติดกันของ sutures ในเพศหญิงจำนวน 82 ชิ้น และในเพศชาย จำนวน 184 ชิ้น จากประชากรในเมือง Amsterdam ที่มีอายุระหว่าง 20 ถึง 99 ปี โดยศึกษาการปิดของ cranial sutures จากทางด้านใน (endocranial sutures) โดยใช้ไฟส่องผ่านทาง foramen magnum จากผลการศึกษาของเขาไม่พบความแตกต่างในการปิดของ cranial sutures ระหว่างในเพศชายและเพศหญิง และส่วนใหญ่การเชื่อมติดกันของ sutures จะเชื่อมติดกันจากทางด้านใน (endocranial) ก่อนทางด้านนอก (ectocranial) โดยข้อมูลดังกล่าวได้มาจากการศึกษาในประชากรกลุ่มยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Sahni และคณะ, 2005) และยังพบข้อมูลที่ขัดแย้งกันกับผลงานของ Perizonius ซึ่งพบว่าการปิดของ cranial sutures มักจะเกิดขึ้นเร็วในเพศชายมากกว่าในเพศหญิง แต่มีความสอดคล้องกันของข้อมูลที่ศึกษาและพบว่าการระบุช่วงอายุโดยดูจากการปิดของ cranial sutures จากทางด้านในมีความน่าเชื่อถือมากกว่าการปิดของ suture ทางด้านนอก

จากการศึกษาการเชื่อมติดกันของ sutures จากทางด้านใน ด้านนอก และ suture ของกระดูกเพดานปาก จะเห็นได้ว่าการศึกษาโดยการสังเกตจากการเชื่อมติดกันของ sutures สามารถที่จะระบุอายุของบุคคลได้เป็นช่วงอายุเท่านั้น ดังนั้นการประเมินช่วงอายุของบุคคลโดยใช้ sutures อย่างเดียวอาจได้ข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์และมีความคลาดเคลื่อนสูง ทั้งนี้เพราะมีตัวแปรที่ต้องคำนึงเช่น เพศ เชื้อชาติ จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากกระดูกส่วนอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น ศึกษาจากการปิดของ epiphyseal plate ที่ส่วนปลายของกระดูก เป็นต้น

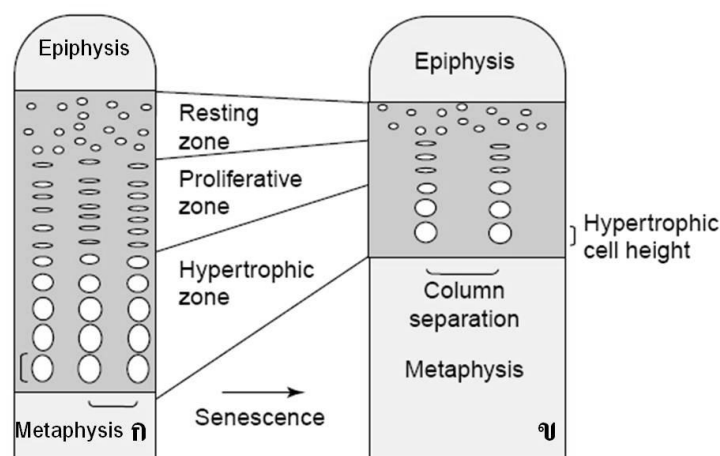
การประเมินช่วงอายุโดยใช้แผ่นปิดกระดูก (Epiphyseal plate) ระหว่าง epiphysis กับ diaphysis

การพัฒนาของกระดูกที่บริเวณ epiphyseal plate

Epiphyseal plate หรือบางครั้งเรียกว่า Growth plate เป็นส่วนของ hyaline cartilage ที่อยู่ระหว่าง diaphysis และ epiphysis ของกระดูกชนิดยาว (long bone) ซึ่ง epiphysal plate มักจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของกระดูกแบบที่มีกระดูกอ่อนเป็นโครงร่างมาก่อน (hyaline cartilage model) โดยการเจริญของกระดูกแบบนี้เรียกว่า intracartilagenous ossification หรือ endochondral bone formation ซึ่งการเจริญของกระดูกในร่างกายของคนเราส่วนใหญ่มีการเจริญของกระดูกมาโดยวิธีนี้ ไม่ว่าจะเป็นกระดูกแขนและขา เป็นต้น epiphysal plate เป็นส่วนที่ยังสามารถเจริญเพิ่มความยาวให้กับกระดูกได้จนกระทั่งอายุประมาณ 20-25 ปี กระดูกอ่อนส่วนนี้ก็จะเริ่มปิดเรียกว่า epiphyseal line ทำให้กระดูกไม่สามารถที่จะเจริญเพิ่มความยาวได้อีกต่อไป นอกจากกระดูกยาวทั่วไปแล้วยังสามารถพบ epiphyseal plate ที่ขอบบนและขอบล่างของกระดูกสันหลังอีกด้วย (Eerden และคณะ, 2003) ซึ่งคาดว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับความสูงในการเจริญเติบโตของคนเช่นเดียวกัน

การเจริญของกลุ่มเซลล์กระดูกอ่อนที่ epiphyseal plate แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ Zone of resting cartilage เป็นกระดูกอ่อนชั้นที่อยู่ติดกับ epiphysis ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ที่ยังไม่มีการแบ่งตัว Zone of proliferating cartilage เป็นชั้นที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์กระดูกอ่อนที่มีการแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก ทำให้ชั้นนี้ขยายขนาดยาวขึ้น Zone of hypertrophic cartilage ในชั้นนี้เซลล์กระดูกอ่อนโตขึ้นทำให้กระดูกยาวขึ้น Zone of calcified cartilage เป็นชั้นบางๆ ที่กระดูกอ่อนตายแล้วมีแคลเซียมไปเกาะอยู่ Osteoclast จะเข้าไปย่อยสลายกระดูกอ่อนส่วนนี้ แล้ว Osteoblast ตามเข้าไปสร้างกระดูกใหม่ ได้ตามกระดูกอ่อนชั้นไปเรื่อยๆ ทำให้กระดูกยาวออกโดยที่ความยาวของ epiphyseal plate ยังคงเดิม จนกระทั่งเซลล์กระดูกอ่อนใน epiphyseal plate หยุดการแบ่งตัว เซลล์กระดูกก็จะแทรกเข้าไปแทนที่ทั้งหมดเห็นเป็นเส้นเรียกว่า epiphyseal line และร่างกายก็จะไม่สูงเพิ่มขึ้นอีก

ระยะพักจะอยู่ใกล้กับส่วน epiphysis ของกระดูกซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ chondrocyte จำนวนมาก ส่วนในระยะการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนประกอบด้วยเซลล์ chondrocyte ที่กำลังแบ่งเซลล์จัดเรียงตัวกันเป็นแถวตามแนวความยาวของกระดูกชนิดยาว สำหรับระยะการขยายตัวหรือการเพิ่มขนาดของเซลล์ เซลล์ก็จะหยุดการแบ่งเซลล์และมีการขยายขนาดของเซลล์ให้ใหญ่ขึ้น มีการสร้างสารต่างๆ ออกมาสะสมในเนื้อกระดูกอ่อน (Eerden และคณะ, 2003) และต่อมาจะมีการแทรกตัวของหลอดเลือด (blood vessels) และเซลล์กระดูก (bone cells) เข้ามา ซึ่งจะมีการเจริญเปลี่ยนแปลงจากกระดูกอ่อนไปเป็นกระดูกในที่สุด ทำให้สามารถเพิ่มความยาวให้กับกระดูกในร่างกายของคนเราได้โดยเฉพาะในเด็กและในวัยรุ่น เมื่ออายุของคนเราเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณ epiphyseal plate ก็จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ไป โดยอัตราการเจริญเพื่อเพิ่มความยาวของกระดูกจะค่อยๆ ลดลง เนื่องจากการลดจำนวนลงของเซลล์ chondrocyte (Hunziker และ Schenk, 1989, Farquharson และ Loveridge, 1990) การเปลี่ยนแปลงของ epiphyseal plate จากวัยรุ่นเข้าสู่ผู้ใหญ่ จะทำให้ความยาวของ epiphyseal plate ลดลง เนื่องจากขนาดและความหนาแน่นของกลุ่มเซลล์กระดูกอ่อนในส่วนต่างๆ มีจำนวนลดลง นอกจากนี้จำนวนการจัดเรียงตัวของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นแถวก็มีความหนาแน่นของเซลล์ในแต่ละแถวลดจำนวนลงอีกด้วย (Kember, 1973, Masoud และคณะ, 1986, Weise และคณะ, 2001) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ก. และ ข. แสดงการเปลี่ยนของ epiphyseal plate จากวัยรุ่นเข้าสู่ผู้ใหญ่ มีการลดขนาดลงของระยะต่างๆ รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ chondrocyte ก็ลดลง (ที่มา : ดัดแปลงจาก Ola และ Jeffrey, 2004)

ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการปิดของ epiphyseal plate คืออิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งพบว่าเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Grumbach และ Auchus, 1999, Grumbach, 2000) ในผู้ป่วยที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนก็จะทำให้เกิดความล้มเหลวในการเปลี่ยนแปลงของกระดูกที่บริเวณ epiphyseal plate ทำให้มีการเพิ่มความยาวให้กับกระดูกที่บริเวณ epiphyseal plate ตลอดช่วงอายุวัยผู้ใหญ่ (Morishima และคณะ, 1995) ในทางตรงกันข้ามในผู้ป่วยที่มีปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจนมากเกินไป เช่นในคนที่เข้าสู่วัยหนุ่มสาวเร็วกว่าปกติ (precocious puberty) ก็จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนไปเป็นกระดูกที่บริเวณ epiphyseal plate เร็วกว่าปกติด้วย (Sigurjonsdottir และ Hayles, 1968) ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะเข้าไปเร่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนไปเป็นกระดูก โดยจะไปส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดและเซลล์กระดูกเข้าไปที่บริเวณ epiphyseal plate ส่งผลให้มีการสร้างกระดูกได้เร็วยิ่งขึ้น (Silberberg และ Silberberg, 1941) การเปลี่ยนแปลงของ epiphyseal plate ไปเป็นกระดูกนั้น จะเกิดขึ้นในเพศหญิงเร็วกว่าในเพศชายประมาณ 1 ปี ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตเห็นได้ว่าเด็กผู้หญิงจะมีความสูงมากกว่าเด็กผู้ชายเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น

การปิดของ epiphyseal plate ในกระดูกชิ้นต่างๆ ในร่างกาย

การทราบถึงระยะเวลาในการปิดของ epiphysial plate ในกระดูกชิ้นต่างๆ นั้นสามารถใช้เพื่อประเมินช่วงอายุของบุคคลได้ โดยสามารถศึกษาได้จากลักษณะภายนอกของกระดูกโดยตรง (Webb และ Suchey, 1985, Kreitner และคณะ, 1998) ภาพถ่ายเอ็กซเรย์ (radiograph) (Schulz และคณะ, 2008) computed tomography, magnetic resonance imaging และ ultrasound (Schulz และคณะ, 2008) การศึกษาเกี่ยวกับการปิดของ epiphyseal plate ในกระดูกชนิดยาว มีประโยชน์ในการที่จะระบุช่วงอายุของบุคคลในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์หรืองานทางด้านโบราณคดี เพราะกระดูกชิ้นต่างๆ ในร่างกายของคนเรามีระยะเวลาในการปิดของ epiphyseal plate ที่แตกต่างกัน

การปิดของกระดูกแต่ละชิ้นนั้น มีการปิดที่ระยะเวลาต่างกัน กระดูกที่มักจะนำมาเพื่อประเมินหาอายุโดยการตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นกระดูกยาว ซึ่งได้แก่ กระดูกต้นแขน กระดูกปลายแขน กระดูกต้นขา และกระดูกปลายขา นอกจากนี้จากการศึกษายังพบอีกว่านอกจากกระดูกยาวชิ้นใหญ่แล้ว ยังมีผู้ศึกษานำกระดูกยาวชิ้นอื่นๆ ที่มีขนาดเล็กมาวิเคราะห์เพื่อประเมินอายุ อันได้แก่ กระดูกนิ้วมือ กระดูกนิ้วเท้า กระดูกไหปลาร้าหรือแม้แต่กระดูกที่ไม่จัดว่าเป็นกระดูกยาว เช่นกระดูกสันหลัง หรือกระดูกสะโพกก็ถูกนำมาวิเคราะห์การปิดเชื่อมของแผ่นกระดูกเพื่อประเมินอายุด้วยเช่นกัน ซึ่งความแม่นยำของกระดูกแต่ละชิ้นนั้นก็มีความแตกต่างกันไปตามแต่ละงานวิจัย เวลาของการเริ่มปิดของกระดูกในแต่ละชิ้น และในแต่ละเชื้อชาตินั้น มีระยะเวลาที่ต่างกัน แม้กระทั่งระยะเวลาที่ปิดสมบูรณ์นั้นก็ยังแตกต่างกันในแต่ละเพศที่มีเชื้อชาติเดียวกันอีกด้วย (Cardoso, 2008) และในการศึกษาของ Crowder และ Austin (2005) ซึ่งเป็นการศึกษาการปิดของกระดูก tibia และ fibula ในแต่ละเพศและประชากรต่างเชื้อชาติกัน ซึ่งประกอบไปด้วยชาวแอฟริกัน และอเมริกันพบว่า การปิดของกระดูกส่วนปลาย (distal end) ของกระดูกทั้งสองชิ้นในเพศหญิงเริ่มต้นเมื่ออายุ 12 ปี และจะปิดสมบูรณ์เมื่ออายุเฉลี่ย 16 ปี ไม่มีความแตกต่างทั้งสองเชื้อชาติ แต่ในเพศชายในเชื้อชาติแอฟริกันอเมริกัน จะเริ่มมีการปิดของกระดูกทั้งสองส่วนปลายและส่วนต้นตั้งแต่อายุ 14 ปี ส่วนเชื้อชาติอเมริกันจะเริ่มมีการปิดตั้งแต่อายุ 16 ปี แต่ในเพศชายทั้งสองเชื้อชาติจะมีช่วงอายุที่มีการปิดของกระดูกอย่างสมบูรณ์ไม่เกิน 19 ปี จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่า อิทธิพลที่มีผลต่อการปิดของกระดูกที่สมบูรณ์นั้นขึ้นอยู่กับเพศ และเชื้อชาติด้วย ดังนั้นในการนำเอาข้อมูลต่างๆ ไปใช้ ควรทราบก่อนว่าโครงกระดูกเหล่านั้นมีเพศอะไร และเชื้อชาติอะไรบ้าง เพื่อความแม่นยำในการประเมินอายุจากโครงกระดูก

กระดูกไหปลาร้า (clavicle) เป็นกระดูกชนิดยาวที่มีการปิดของ epiphyseal plate ที่ช้าที่สุดในร่างกาย (Jagmahender และคณะ, 2011) การศึกษาการปิดของ medial clavicular epiphysis สามารถที่จะระบุช่วงอายุของบุคคลในช่วง 30 ปีแรก หรือหลังจากผ่านพ้นวัยรุ่นไปแล้วได้ (post-pubertal period) Epiphyseal plate ของกระดูกไหปลาร้า เริ่มมีการเชื่อมติดกันตั้งแต่อายุ 18 ปี ทั้งในเพศชายและเพศหญิง และจะเริ่มเชื่อมติดกันจนสนิทเมื่ออายุ 22 ปีขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่าการปิดของ epiphyseal plate ในเพศหญิงจะปิดเร็วกว่าในเพศชายประมาณ 1 ปี แต่ในบางรายทั้งในเพศชายและเพศหญิง อาจพบว่าการปิดของ epiphyseal plate ล่าช้าออกไปบ้าง ซึ่งกว่าจะมีการปิดจนสมบูรณ์อาจมีอายุอยู่ระหว่าง 30-31 ปีได้ (Black และ Scheuer, 1996, Webb และ Suchey, 1985, Szilvassy, 1980) ดังนั้นการปิดของ clavicle epiphyseal plate จึงอยู่ในช่วงอายุประมาณ 18-31 ปี โดยประมาณ การศึกษาเกี่ยวกับกระดูกไหปลาร้าได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และงานทางด้านโบราณคดี เพราะเป็นกระดูกชิ้นหนึ่ง ที่ทนทานต่อการถูกทำลายไปโดยธรรมชาติ เนื่องจากว่ามีสัดส่วนปริมาณของกระดูกแข็ง (compact bone) มากกว่ากระดูกพรุน (spongy bone) (Thieme และ Schull, 1957) กระดูกไหปลาร้ามีระยะเวลาการเจริญพัฒนายาวนาน ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินช่วงอายุของการเสียชีวิตได้ดี (Pasalasacqua, 2009) การปิดของ epiphyseal plate ของกระดูกไหปลาร้าในประชากรต่างเชื้อชาติและยุคสมัยที่ต่างกัน ก็จะส่งผลต่อระยะเวลาการเชื่อมปิดที่แตกต่างกัน เช่นการปิดของ epiphyseal plate ของผู้ชายที่อยู่ในวัยหนุ่มชาวอเมริกันเริ่มปิดเมื่ออายุ 23 ปี และปิดแบบสมบูรณ์เมื่อกระทั่งอายุ 30 ปี (McKern และ Stewart, 1957) และจากการศึกษาในชาวอเมริกายุคต่อมาพบว่า การปิดของ epiphyseal plate ของกระดูกไหปลาร้าทางด้านใน (sternal end) จะเกิดขึ้นในเพศหญิงเร็วกว่าในเพศชาย และนอกจากนั้นยังพบว่า ช่วงเวลาในการปิดแต่ละระดับ มีระยะเวลาเฉลี่ยที่ยาวมากขึ้นกว่าชาวอเมริกายุคก่อนหน้าที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว (Webb และ Suchey, 1985) นอกจากนี้การปิดของ epiphyseal plate ของกระดูกไหปลาร้าในเชื้อชาติที่ต่างกันก็จะมีระยะเวลาการปิดที่ต่างกัน จากการศึกษาในประชากรเพศชายชาวญี่ปุ่นและทำการเปรียบเทียบกับชาวอเมริกัน พบว่าชาวญี่ปุ่นมีการปิดของ epiphyseal plate ของกระดูกไหปลาร้าส่วนด้านใน (sternal end) เร็วกว่าเพศชายชาวอเมริกัน (Ji และคณะ, 1994) เนื่องจากการประเมินอายุจากการปิดของ epiphyseal plate มีปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องหลายอย่าง Bass (1971) จึงได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยในขณะนั้นและสรุปเป็นช่วงอายุของกระดูกแต่ละชิ้นไว้ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่ข้อมูลดังกล่าวก็เป็นการประมาณช่วงอายุกว้างๆ และไม่ได้รับุเทศและเชื้อชาติอันเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้การประเมินอายุแปรผัน หรือมีความคลาดเคลื่อนไว้ด้วย

ตารางที่ 1 แสดงอายุโดยเฉลี่ยของการปิด epiphyseal plate ของกระดูกชิ้นต่างๆ ในร่างกาย (ที่มา : Bass,1971)

กระดูก (bones)	ส่วนต้น : proximal (ปี)	ส่วนปลาย : distal (ปี)
Clavicle	sternal end 25-28	acromial end 19-20
Humerus	19.5-20.5	14-15
Radius	14-15	18-19
Ulna	14.5-15.5	18.19
Metacarpals		15-16
Hip bones		23
Femur	17-18.5	17-18.5
Tibia	17.5-18.5	15.5-16.5
Fibula	17.5-18.5	15.5-16.6

นอกจากนี้การปิดของ epiphyseal plate ที่กระดูกสันหลังก็ยังสามารถนำมาใช้ในการประเมินช่วงอายุได้เช่นกันโดย Albert และคณะ (2010) ได้ศึกษาการประเมินช่วงอายุของบุคคลจากการปิดของ epiphyseal plate ที่กระดูกสันหลังระดับอก (thoracic) และระดับเอว (lumbar) ในกลุ่มประชากรเสียชีวิตที่อยู่ในวัยหนุ่มสาว (adolescence) และวัยผู้ใหญ่ตอนต้น (early adulthood) โดยศึกษาจากคนที่เสียชีวิตจำนวน 57 คน ที่มีอายุระหว่าง 14-27 ปี โดยได้แบ่งระยะการปิดของ epiphyseal plate ของกระดูกสันหลังออกเป็น 4 ระยะได้แก่ stage 0 ยังไม่มีการปิดของ epiphyseal plate, stage 1 เริ่มมีกระบวนการปิดของ epiphyseal plate, stage 2 มีการปิดของ epiphyseal plate มากกว่า 50% ยังคงพบร่องรอยการปิดของ epiphyseal plate และ stage 3 มีการปิดของ epiphyseal plate แบบสมบูรณ์ ในเพศหญิงจะมีรูปแบบการปิดของ epiphyseal plate ที่เป็นรูปแบบมากกว่าเพศชายและไม่เหลื่อมล้ำกันมาก เมื่อแบ่งออกเป็นช่วงอายุที่ใช้ศึกษา ทั้งในเพศหญิงและเพศชายจะมีการปิดของ epiphyseal plate แบบสมบูรณ์ (stage 4) เมื่อมีอายุตั้งแต่ 23 ปีและ 24 ปีขึ้นไป ตามลำดับ แต่การศึกษานี้ก็ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุเท่าไร จึงจะมีระดับการปิดของ epiphyseal plate ในกระดูกสันหลังแต่ละส่วนในระดับใด

การประมาณอายุจากการใช้ epiphyseal plate ของกระดูกแต่ละชิ้นนั้นมีข้อดีคือ มีกระดูกหลายชิ้นที่สามารถนำมาประเมินอายุได้ ซึ่งจากการนำกระดูกหลายๆ ชิ้นมาคำนวณร่วมกันย่อมทำให้มีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น แต่ข้อควรระวังก็ต้องมีข้อมูลเบื้องต้นด้วยว่าโครงกระดูกนั้นๆ เป็นเพศอะไร มีเชื้อชาติอะไร เพราะปัจจัยทั้งสองอย่างเป็นตัวแปรสำคัญเบื้องต้นในการประเมินอายุของกระดูก และเมื่อทราบปัจจัยทั้งสองแล้วก็จะทำให้การประเมินโครงกระดูกนั้นมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์สุทัศน์ ดวงจิตร์ ที่ให้คำแนะนำในการเขียนบทความครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณผู้อุทิศร่างกายเพื่อการศึกษาทุกท่านที่ทำให้ผู้เขียนได้เรียนรู้ถึงโครงสร้างต่างๆ ของร่างกายมนุษย์และสามารถที่จะนำเอาความรู้ไปประยุกต์ใช้ได้

เอกสารอ้างอิง

- Albert, M., Muthern, D., Torpey, M. A., & Boone. E. (2010). Age estimation using thoracic and first two lumbar vertebral ring epiphyseal union. *J Forensic Sci*, 55(2), 287-294.
- Bass, W. M. (1971). *Human osteology: A laboratory and field manual of the human skeleton*. Columbia: Missouri Archaeological Society.
- Black, S. & Scheuer, B. (1996). Age changes in the clavicle: from the early neonatal period of the skeletal maturity. *Int J Osteoarchaeol*, 6, 425-34.
- Buikstra, J.E. & Ubelaker, D.H.(1994). *Standards for data collection from human skeletal remains*. Fayetteville, AR: Arkansas Archeological Survey Research Series 44.
- Cardoso, H.F.(2008). Age estimation of adolescent and young adult male and female skeletons II, epiphyseal union at the upper limb and scapular girdle in a modern Portuguese skeletal sample. *Am J Phys Anthropol*. 137(1),97-105.

- Crowder, C., & Austin, D. (2005). Age Ranges of Epiphyseal Fusion in the Distal Tibia and Fibula of Contemporary Males and Females. *J Forensic Sci*, 50(5), 1001-1007
- Cunha, E., Baccin, E., Martrille, L. et al., (2009). The problem of aging human remains and living individuals: A review. *For Sci Int*, 193, 1-13.
- Daisy, S., Indar, J., & Neelam, S., (2005). Time of closure of cranial sutures in northwest Indian adults. *For Sci Int*, 148, 199-205
- Eerden, B.C.J., Karperien, M., & Wit, J. M., (2003). Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev*, 24, 782-801.
- Grumbach, M.M. & Auchus, R.J. (1999) Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 4677-4694.
- Farquharson, C. & Loveridge, N. (1990). Cell proliferation within the growth plate of long bones assessed by bromodeoxyuridine uptake and its relationship to glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Bone and Mineral* 10, 121-130.
- Grumbach, M.M. (2000). Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13(Suppl 6), 1439-1455.
- Hunziker, E.B. & Schenk, R.K. (1989). Physiological mechanisms adopted by chondrocyte regulating longitudinal bone growth in rat. *J Physiol (London)* 414, 55-71.
- Jagmahender, S. & Chavali, K.H. (2011). Age estimation from clavicular epiphyseal union sequencing in a Northwest Indian population of the Chandigarh region. *J Forensic and Leg Med*, 18, 82-87.
- Ji, L., Terazawa, K., Tsukamoto T., & Haq H. (1994). Estimation of age from epiphyseal union degree of the sternal end of the clavicle. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 69(1), 104-11.
- Kember, N.F. (1973). Aspects of the maturation process in growth cartilage in the rat tibia. *Clin. Orthop*. 95, 288-294
- Kreitner, K.F., Schweden F.J., Riepert T., Nafe B. & Thelen M. (1998). Bone age determination based on the study of the medial extremity of the clavicle. *Eur Radiol*, 8, 1116-22.
- Mann, R.W., Symes, S.A. & Bass, W.M. (1987). Maxillary Suture Obliteration: Aging the Human Skeleton Based on Intact or Fragmentary Maxilla. *J Forensic Sci*. 32(1), 148-157
- McKern, T.W. & Stewart T.D. (1957). Skeletal age change in young American males, Environmental Protection Research Division, Technical Report EP-45, Headquarters Quartermaster Research and Development command, Natick, MA, pp 26-28
- Masoud, I., Shapiro, F. & Moses, A. (1986). Tibial epiphyseal development: a cross sectional histologic and histomorphometric study in the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res* 4, 212-220.
- Meindl, R.S. & Lovejoy, C.O. (1985). Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *Am J Phys Anthropol*, 68, 57-66.

- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C. & Qin, K. (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* 80, 3689–3698.
- Ola, N. & Jeffrey, B. (2004). Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal plate fusion. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 15(8), 370-374.
- Pasalasacqua, N.V. (2009). Forensic age-at-death estimation from the human sacrum. *J Forensic Sci*, 54(2), 255-62.
- Perizonius, W.R.K. (1984). Closing and non-closing sutures in 256 crania of known age and sex from Amsterdam (AD 1883-1909). *Hum Evol*, 13, 201-206.
- Rosanna, C., Sabini, D.O., David, E., Elkowitz, D.O. (2006). Significance of Differences in Patency Among Cranial Sutures. *JAOA*, 106 (10), 600-604.
- Schulz, R., Zwiesigk, P., Schiborr, M., Schmidt, S. & Schmelling, A. (2008). Ultrasound studies on the time course of clavicular ossification. *Int J Leg Med.* 122(2), 163-7.
- Sigurjonsdottir, T.J. & Hayles, A.B. (1968). Precocious puberty. A report of 96 cases. *Am J Dis Child.* 115, 309–321.
- Silberberg, M. & Silberberg, R. (1941). Further investigations concerning the influence of estrogen on skeletal tissues. *Am J Anat*, 69, 295–325.
- Steven, N. (2005). Introduction to Forensic Anthropology. 2nd edition. Tom Conville Publishing Services, LLC. Palatal suture, pp 245.
- Szilvassy, J. (1980). Age determination on the sternal auricular faces of the clavicle. *J Hum Evol*, 158, 184-9.
- Thieme, F.P. & Schull, W.J. (1957). Sex determination from the skeleton. *Hum Biol*, 29(3), 242-73.
- Todd, T.W. & Lyon, D.W. (1924). Endocranial suture closure. Its process and age relationship. Part I. Adult male of White stock, *Am J Phys Anthropol*, 7, 325-384.
- Webb, P.O. & Suchey, J.M. (1985). Epiphyseal union of anterior iliac crest and medial clavicle in a modern multiracial sample of American males and females. *Am J Phys Anthropol*, 68, 457-66.
- Weise, M., De-Levi, S., Barnes, K., Baron, J. (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 98, 6871–6876.

การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย

Identification of *Sus domestica*'s DNA by analysis of the mitochondrial cytochrome

b gene

ศิวพร อินตะหล่อ *

พญ.เลิศลักษณ์ ภูพัฒน์ **

นพ.ธนาธิบดิ์ ภูพัฒน์ ***

บทคัดย่อ

การตรวจพิสูจน์หลักฐานทางชีวภาพด้วยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุว่าเป็นสัตว์ชนิดใดนั้นมีบทบาทสำคัญไม่น้อยในงานนิติวิทยาศาสตร์ ดังเช่นในคดีที่มีสัตว์เข้าไปเกี่ยวข้อง หรือคดีเกี่ยวกับกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภคที่มีการปลอมปนและแสดงฉลากไม่ถูกต้อง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วนิยมตรวจวิเคราะห์จากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ทั้งนี้อกจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วยังสามารถพบดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย ซึ่งรหัสของดีเอ็นเอบริเวณนี้มีความจำเพาะสำหรับสัตว์ในแต่ละชนิดและสามารถใช้ได้ดีในกรณีของตัวอย่างที่มีอายุยาวนานซึ่งมักจะไม่มีดีเอ็นเอในนิวเคลียสเหลือเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรด้วยการวิเคราะห์จากยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพต่อลำดับดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียของสุกรโดยเฉพาะและทำการเก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจากตลาดในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยจำนวน 70 ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex Method จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR แล้วตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis แล้วจึงทำการทดสอบกับมนุษย์ ปลา กุ้ง และวัว อย่างละ 18 ตัวอย่างในวิธีการเดียวกัน ผลคือสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรทั้งหมดจำนวน 70 ตัวอย่าง บนตำแหน่งซึ่งตรงกับที่กำหนดไว้คือ 135 bp ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์และวิธีการที่ใช้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงกับสุกรได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ, ยีนไซโตโครมบี, พีซีอาร์

* สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract

The identification of biological evidences using DNA analysis to determine of animal species has become an important role in forensic science. The condition against the consumer protection laws such as the meat products may be adulterated by other animals which were not shown in the label need to be proved by identifying species of meat contents. In general, most of forensic DNA analysis was emphasized on nuclear DNA. However, mitochondrial DNA can also be another source for forensic analysis especially cytochrome b gene of which the DNA sequence shows a specific order for animal species. Since the target DNA sequence is on mitochondria so it can be used for analysis even in the old aged or degraded samples. This research aims to develop the test which specifically identify of *Sus Domestica* DNA in mitochondrial cytochrome b gene. The newly designed primers were used to effectively anneal to the DNA sequence in cytochrome b gene of pig particularly. 70 pork meat samples collected from markets in the upper north of Thailand were extracted for DNA using Chelex Method. Then, the DNA samples were amplified by PCR technique and the amplicons were analysed by agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, we expected a DNA band of 135 base pairs in size for the positive result. 18 DNA samples from each species including human, fish, chicken and cow were tested for specificity of the technique. The result showed that only pig DNA could give a positive reaction, therefore, we concluded that the PCR technique using our newly designed primers can be applied for identification of *Sus domestica* DNA effectively and specifically.

Key words: Mitochondrial DNA, Cytochrome b gene, PCR

บทนำ

การตรวจพิสูจน์พยานหลักฐานทางชีวภาพในงานนิติวิทยาศาสตร์นั้น นอกจากประเด็นสำคัญในการตรวจเพื่อทราบว่าหลักฐานทางชีวภาพที่ส่งสัยนั้นคืออะไร เช่น เป็นเลือดหรือไม่ หรือเป็นเส้นขนหรือไม่ และพยานหลักฐานนั้นเป็นของมนุษย์หรือสัตว์ ถ้าเป็นของมนุษย์จึงทำการตรวจพิสูจน์เพื่อยืนยันเอกลักษณ์บุคคลว่าเป็นของผู้ใดต่อไป แต่ในกรณีที่ตรวจพบว่าเป็นชีววัตถุของสัตว์นั้น ในบางกรณีอาจถูกลดความสำคัญของวัตถุพยานชิ้นนั้นลงหรืออาจตัดความสำคัญของวัตถุพยานนั้นออกไปเลยก็ได้ แต่อย่างไรก็ตามในบางคดีที่มีสัตว์เข้าไปเกี่ยวข้อง เช่น ถูกสัตว์ทำร้าย หรือกรณีที่มีกรกล่าวอ้างของผู้ต้องสงสัยว่าเลือดที่ติดตามเสื้อผ้าตนนั้นเป็นเลือดของสัตว์ เป็นต้น ดังนั้นการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของสัตว์จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการสืบสวนสอบสวนของเจ้าหน้าที่ตำรวจ ทั้งการตรวจเพื่อระบุชนิดของสัตว์นี้ยังสามารถปรับใช้กับการตรวจอาหารว่ามี

การปลอมปนหรือไม่ โดยในปัจจุบันการตรวจดีเอ็นเอนี้เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งในการตรวจเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ ทั้งนี้หากต้องการระบุชนิดของสัตว์ให้ได้ผลที่แน่นอน ควรวิเคราะห์จากส่วนของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสัตว์ชนิดนั้นๆ โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสัตว์แต่ละชนิดนั้น เป็นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่บนยีนไซโตโครมบี (Cytochrome b) ซึ่งพบได้ในไมโทคอนเดรียอันเป็นส่วนประกอบภายในเซลล์ที่ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ส่วนของดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครมบีนี้เป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กและสามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ทุกชนิดแต่มีความพิเศษตรงที่รหัสของดีเอ็นเอบริเวณนี้จะสร้างโปรตีนที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์ในแต่ละชนิด จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้วิเคราะห์เพื่อระบุชนิดของสัตว์

ไซโตโครม บี (Cytochrome b) เป็นหนึ่งในไซโตโครม (Cytochromes) ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนในโซ่การหายใจของไมโทคอนเดรีย โดยไซโตโครมมีหลายชนิดใช้ตัวอักษรเป็นชื่อชนิดของไซโตโครม เช่น ไซโตโครม เอ ไซโตโครม บี หรือไซโตโครม ซี เป็นต้น ยีนไซโตโครม บี ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอประมาณ 1140 เบส พบว่าดีเอ็นเอบางช่วงมีลักษณะที่มีความจำเพาะสำหรับสัตว์แต่ละชนิด จึงมีการนำเอาดีเอ็นเอในส่วนนี้ มาใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของสัตว์ (Species Identification) และเนื่องจากลำดับดีเอ็นเอของยีนไซโตโครม บี ในสัตว์แต่ละชนิดค่อนข้างจะอนุรักษ์ จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์ (Primer) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ที่จำเพาะกับชนิดของสัตว์ได้ (Species Specific)^[3] ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำประโยชน์จากดีเอ็นเอบนยีนไซโตโครม บี มาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสัตว์รวมไปถึงเป็นมนุษย์ นอกจากนั้นดีเอ็นเอบนไมโทคอนเดรียยังสามารถใช้ได้กับตัวอย่างที่มีสภาพไม่ดี เก่า เสื่อมสภาพ หรือมีปริมาณเล็กน้อย เช่น ผม หรือ ขน โบราณวัตถุ ซึ่งการตรวจสอบดีเอ็นเอบนนิเวศวิทยามีปัญหา การตรวจพิสูจน์ species อาจนำไปประยุกต์ใช้ในกรณีต่างๆ เช่น การนำไปตรวจสอบอาหารเพื่อสิทธิประโยชน์ของผู้บริโภคตามกฎหมายคุ้มครองผู้บริโภค ดังเช่น การตรวจพิสูจน์ว่าอาหารหรือผลิตภัณฑ์ใดที่มีการผลิตและจำหน่ายโดยมีการแสดงฉลากไม่ถูกต้อง หรือการตรวจวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นอาหารที่มีฉลากเพื่อลวงหรือพยายามลวงผู้อื่นให้เข้าใจผิดในเรื่องคุณภาพหรือลักษณะพิเศษอย่างอื่น ตามที่บัญญัติไว้ในพระราชบัญญัติคุ้มครองผู้บริโภคและพระราชบัญญัติอาหาร ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารนั้นอาจมีฉลากที่ระบุไว้ทำให้ผู้บริโภคเข้าใจผิดหรือหลอกลวงในส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ เช่น อ้างว่าเป็นอาหารเจหรืออาหารฮาลาลแต่แท้จริงไม่ใช่ จนถึงกรณีที่ผู้บริโภคเกิดอาการแพ้จากการรับประทานอาหารที่มีการรับรองฉลากไม่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการสืบสวนสอบสวนในทางคดี เช่นการพิสูจน์วัตถุพยานในกรณีที่มีชีวิตวัตถุเปื้อนหรือติดมากับวัตถุพยานใดๆ แล้วต้องการทราบว่าเป็นชีวิตวัตถุของสุกรหรือไม่ เพื่อมัดตัวผู้ต้องสงสัยหรือเพื่อประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนหากมีการกล่าวอ้างของตัวผู้ต้องสงสัย ทั้งนี้ยังเป็นประโยชน์ในการเชื่อมโยงรูปคดีเพื่อช่วยในการคลี่คลายคดีให้ง่ายขึ้น และการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ของสัตว์ป่าที่ถูก

ลักลอบทำลายในกรณีที่มีการดำเนินคดีทางกฎหมายเกี่ยวกับปัญหาการลักลอบทำลายสัตว์ป่า หรือการลักลอบส่งออก หรือนำเข้าสัตว์ป่าคุ้มครอง เป็นต้น

วัสดุและวิธีการ

1.กลุ่มประชากร

- ตัวอย่างชิ้นเนื้อของสุกรที่เลี้ยงและจำหน่ายเพื่อการบริโภคโดยทั่วไปในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย จำนวน 70 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างเลือดของมนุษย์ และ ปลา ชนิดละ 18 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างเส้นขนของวัว 18 ตัวอย่าง
- ตัวอย่างชิ้นเนื้อของไก่ 18 ตัวอย่าง

2.วิธีเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรจากร้านค้าเนื้อสุกรในตลาดสด โดยเก็บตัวอย่างเนื้อสุกร 1 ตัวอย่างต่อ 1 ร้านค้า จำนวน 70 ร้าน โดยชิ้นเนื้อแต่ละตัวอย่างแยกบรรจุในถุงพลาสติกใส แล้วแช่แข็งระหว่างการเดินทาง เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอภายหลัง

3.วิธีการทดสอบ

ทำการสกัดตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธี Chelex^[2] จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในสารละลายปฏิกิริยาปริมาตร 10 µl ซึ่งประกอบด้วย Sterile water 5 µl, 10X Taq Buffer 1 µl, dNTPs (1 mM each) 1 µl, 0.25 U/µl Taq DNA Polymerase 1 µl, *Sus scrofa* cyt b Primer Mix (5 µM each) 1 µl, ดีเอ็นเอแม่แบบ(DNA template) 1 µl ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ดังนี้ 94°C นาน 4 นาที 1 รอบ จากนั้นปรับไปที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 69°C นาน 30 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที รวมทั้งสิ้น 32 รอบ

โดยลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ มีรายละเอียดดังนี้

Cytochrome b *Sus scrofa*

Primer Forward: 5' -AATCTTGCAAATCCTAACAGGCC- 3'

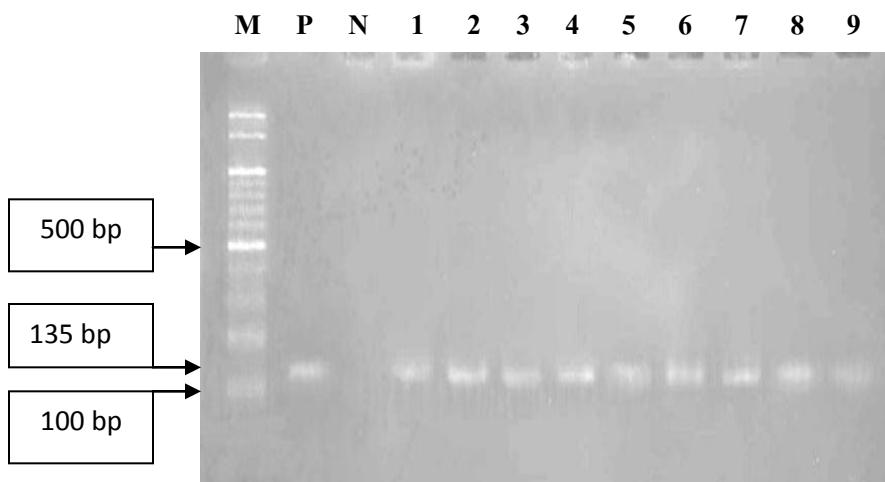
Primer Reverse: 5' -CCGTTTGCATGTAGATAGCGAAT- 3'

4. การตรวจสอบผลการทดลอง

ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการทำ agarose gel electrophoresis^[2]

ผลการศึกษา

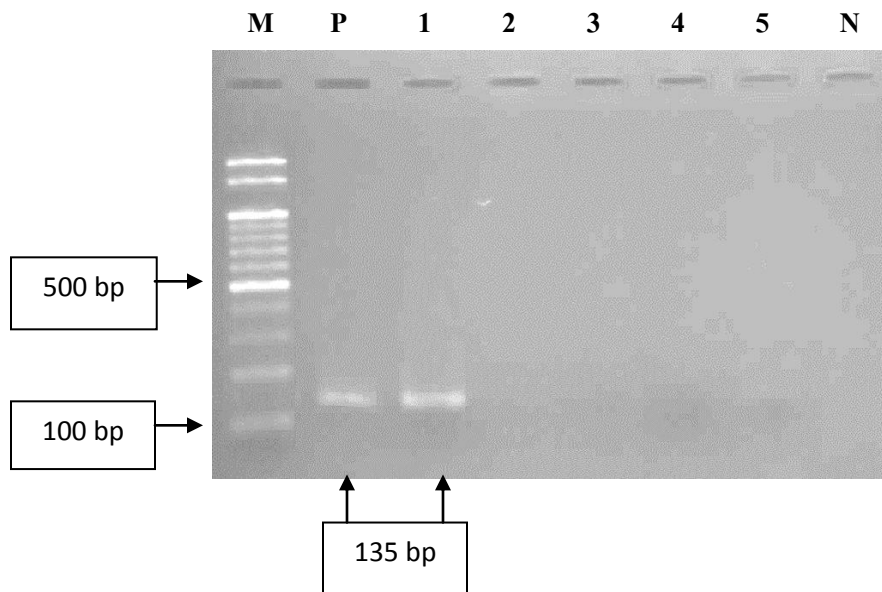
ผลการระบุสารพันธุกรรมของสุกรด้วยการวิเคราะห์ฮัยโดโครม บีในไมโตคอนเดรีย โดยเทคนิค PCR แล้วนำมาวิเคราะห์ใน agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder) พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 135 คู่เบส ทั้ง 70 ตัวอย่าง คิดเป็นความถูกต้อง 100 % และเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำอีก 2 ครั้งต่อตัวอย่าง ยังได้ผลเหมือนเดิม (ภาพ 1)



ภาพ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอบนตำแหน่ง 135 bp จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อสุกรด้วยการวิเคราะห์ฮัยโดโครม บี ในไมโตคอนเดรีย เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder); ช่อง M- ดีเอ็นเอมาตรฐาน, ช่อง P- Positive Control (เลือดสุกร), ช่อง N- Negative Control (น้ำ), ช่องที่ 1-9 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสุกร

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของวิธีการที่ใช้ตรวจ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมนุษย์ และสัตว์ชนิดอื่นได้ทั้งหมด 72 ตัวอย่าง คิดเป็น 100% โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ผ่านกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องในเบื้องต้นแล้วว่ามิติดีเอ็นเออยู่จริง และจากการทดสอบซ้ำอีก 1 ครั้งก็ยังปรากฏผลเหมือนเดิมทุกประการ (ภาพ 2)

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้ พบว่ามีความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจง 100 %



ภาพ 2 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอใน agarose gel ภายหลังจากทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวอย่าง เนื้อสุกรเทียบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ชนิดต่างๆ; ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder), ช่อง P Positive Control (เลือดสุกร), ช่องที่ 1 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสุกร, ช่องที่ 2 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากขนวัว, ช่องที่ 3 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดมนุษย์, ช่องที่ 4 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อไก่, ช่องที่ 5 น้ำสกัดดีเอ็นเอจากเลือดปลา, ช่อง N Negative Control (น้ำ)

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุสารพันธุกรรมของสุกร ที่มีความน่าเชื่อถือและจำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาและทดสอบเพิ่มเติมในด้านประสิทธิภาพความไว (Sensitive) ของวิธีการตรวจ เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ด้านการตรวจสอบอาหารหรือตัวอย่างที่อาจมีการปนเปื้อนมาเพียงเล็กน้อย หรือทดลองใช้กับการตรวจสอบกับผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งผ่านกระบวนการต่างๆ^[7] เช่น การต้ม ทอด นึ่ง อบ หรือตากแห้งเป็นต้น เนื่องจากกระบวนการทำความร้อนนั้นๆอาจทำให้ดีเอ็นเอในตัวอย่างเสียสภาพตามธรรมชาติ ส่งผลให้การตรวจสอบผิดไปจากความเป็นจริงได้

ในการทดสอบเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอจากมนุษย์ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง สามารถทราบผลการตรวจสอบเบื้องต้นว่าไพรเมอร์ของสุกรไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมนุษย์ได้ ดังนั้นในทางกลับกันจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการใช้ไพรเมอร์ของมนุษย์บนยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียมาทำการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสุกรและสัตว์ชนิดอื่นร่วมด้วยเพื่อประโยชน์ในการคัดแยกดีเอ็นเอของมนุษย์และสัตว์ออกจากกัน เนื่องจากในการประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่จะมีมนุษย์เกี่ยวข้องด้วยเสมอและในสถานที่เกิด

เหตุเองก็มักจะมีดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียจำนวนมากมาย ทั้งของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการตรวจสอบเบื้องต้นว่ามีดีเอ็นเอของมนุษย์ในสถานที่เกิดเหตุหรือไม่ก็อาจใช้การระบุดีเอ็นเอของมนุษย์ด้วยยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียได้เช่นกัน

กรณีจะนำไปประยุกต์ใช้ในคดีเกี่ยวกับการลักลอบล่าสัตว์ป่านั้น บางครั้งวัตถุพยานทางชีวภาพที่พบอาจไม่ได้อยู่ในลักษณะที่จะสามารถบ่งบอกว่าเป็นของสัตว์ชนิดใดได้ด้วยลักษณะทางกายภาพ อาจเนื่องมาจากการแปรรูปหรือการแบ่งขายเป็นชิ้นส่วน สิ่งที่เหลือเป็นสิ่งที่ส่งตรวจอาจจะเป็นเพียงเศษชิ้นเนื้อ อวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่ง เส้นขน หรือคราบเลือดเท่านั้น การตรวจสอบสารพันธุกรรมเพื่อระบุชนิดของสัตว์จึงมีบทบาทสำคัญหากวัตถุพยานทางชีวภาพที่ได้นั้นมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบนยีนบนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียอาจทดลองประยุกต์ใช้กับเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นเทคนิคการทำ PCR ถึง 2 ขั้นตอน เป็นการเพิ่มความแม่นยำและความไว (Sensitivity) มากยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถคงความถูกต้องได้ถึง 99.7%^[6]

เพื่อประโยชน์ในการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอาจมีการทดลองประยุกต์ใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากยีนไซโตโครมบี โดยเทคนิคนี้จะใช้ไพรเมอร์หลายคู่ที่มีความจำเพาะกับมนุษย์และสัตว์แต่ละชนิดในขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน สามารถใช้คัดแยกมนุษย์และสัตว์แต่ละชนิดออกจากกันได้ด้วยการทำ PCR เพียงครั้งเดียว ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตจากตัวอย่างตรวจได้ตั้งแต่ครั้งแรก ทั้งนี้ยังพบว่าในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) กับการระบุสารพันธุกรรมจากตัวอย่างเลือดของมนุษย์ด้วยการวิเคราะห์จากยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย^[5] โดยเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคใหม่ที่ไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีนสามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65°C และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการเล็กๆ หรือสำหรับปฏิบัติการในภาคสนามได้ดี^[4] ดังนั้นจึงอาจทดลองประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียของสุกรด้วย เพื่อประโยชน์การนำไปปรับใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

สรุป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและทดสอบวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรด้วยการวิเคราะห์จากยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรียจากตัวอย่างชิ้นเนื้อสุกร จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Chelex จากนั้นจึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ทั้งนี้ในวิธีการตรวจได้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสุกรคือ Primer Forward: 5'-AATCTTGCAAATCCTAACAGGCC-3' และ Primer Reverse: 5'-CCGTTTGCATGTAGATAGCGAAT-3' แล้วจึงทำการตรวจสอบซ้ำอีกจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์และ

วิธีการโดยทดสอบกับเลือดมนุษย์และปลา เนื้อไก่ และเส้นขนวัว อย่างละ 18 ตัวอย่างในวิธีการเดียวกัน ผลการศึกษา ทราบได้ว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของสุกรทั้งหมดจำนวน 70 ตัวอย่างคิดเป็น 100 % บนตำแหน่ง ซึ่งตรงกับที่กำหนดไว้คือ 135 bp ในทางกลับกันก็ไม่ปรากฏว่าตรวจพบดีเอ็นเอใดๆในการทดสอบกับตัวอย่างจากมนุษย์ ปลา ไก่ และวัว ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าไพรเมอร์และวิธีการที่ใช้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการระบุสารพันธุกรรมของสุกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะเจาะจงกับสุกรเป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์สวนดอกกัญพันธุ์ศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา และห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาให้ใช้สถานที่และเครื่องมือสำหรับทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

References

1. ชานินทร์ ภูพัฒน์. วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: ภาควิชานิติเวชศาสตร์คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2538.
2. วิฑูรย์ ทะสุยะ, ชานินทร์ ภูพัฒน์. Standard Operation Procedure งานตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสำหรับงานนิติเวช (SOP for DNA Analysis for Forensic Medicine). เชียงใหม่: ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2005.
3. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552.
4. อมรรัตน์ ร่มพุกภัย : เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). วารสารโลหิตวิทยา และ เวชศาสตร์ บริการโลหิต ปี ที่ 21 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน 2554.
5. Eric C., Nathinee P., Wansika K. Identification of Human DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method. Bangkok: Faculty of Science Mahidol University, 2553.
6. Le-Chin T., Mei-Tzu H., Chung-Ting H., Chun-Yen L., Szu-Jung C. Chun-I L. Hsing-Mei H. Species Identification of Animal Specimens by Cytochrome b gene. Forensic Science Journal. 2007, 6: 63-5.
7. Tanabe S., Miyauchi E., Muneshige A., Mio K., Sato C., Sato M. Pcr Method of Detecting Pork in Foods for Verifying Allergen Labeling and for Identifying Hidden Pork Ingredients in Processed Foods. Biosci. 2007, 71(7): 1663-1667.

จดหมายถึงบรรณาธิการ

Letter to Editor

ความรู้สึกลึกซึ้งของนิติสาขาเทคนิคการแพทย์ที่ศึกษาการนำน้ำยา Kastle-Meyer มาใช้ในการวินิจฉัย occult blood ในสิ่งส่งตรวจ

วัชรินทร์ เทียนสันต์* อรัญญา จิระวิริยะกุล*

ครรชิต คงรส** ไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์** แสงชัย นทีวรรณารัก**

เรียนบรรณาธิการวารสารนิติเวชศาสตร์

Kastle-Meyer หรือ reduced phenolphthalein เป็นน้ำยาที่ใช้ในการตรวจคราบเลือดในงานนิติวิทยาศาสตร์ ในการเรียนการสอนในรายวิชาการตรวจปัสสาวะและสารน้ำในร่างกาย และเทคนิคพื้นฐานทางเวชศาสตร์ชันสูตร ของสาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ได้ใช้น้ำยานี้เป็นน้ำยาสาธิตแทนการใช้ Toluene และ benzidine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง นิสิตของสาขาวิชานี้จะทำการทดสอบน้ำยานี้ควบคู่กับชุดทดสอบสำเร็จรูป Guaiac เนื่องจากสารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยานี้มีการใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ในหัวข้อการไตเตรทสารละลาย จดหมายฉบับนี้เขียนขึ้นเพื่อนำเสนอความคิดเห็นบางส่วนของนิติสาขาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 ที่มีประสบการณ์ในการนำน้ำยานิดนี้มาใช้ในการวินิจฉัย เลือดปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถเห็นด้วยตาเปล่า (occult blood) ในสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ



นางสาวศิรินทรา ฝุ่งาม (ปุ๋ย)

“ปุ๋ยได้ทำสัมภาษณ์ในหัวข้อเรื่องการเปรียบเทียบสารตรวจคราบเลือดในสถานที่เกิดเหตุและทำโครงการวิชาชีพเกี่ยวกับการตรวจหาเลือดและฮีโมโกลบินในปัสสาวะ ปุ๋ยว่างานทางด้านนิติเวชศาสตร์สามารถนำมาใช้ในห้องแลปได้ค่ะ”



นายวรุฒิ วิจิตพันธ์ (บอม)

“ผมไม่ค่อยมีความรู้ด้านนิเวศศาสตร์เท่าไร แต่เมื่อมีโอกาสมาช่วยเพื่อนทำแลป ผมรู้สึกว่ามันเป็นวิชาที่น่าสนใจ งานของเพื่อนเป็นการนำความรู้ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์มาประยุกต์และพัฒนาให้เป็นน้ำยาทางห้องแลปเทคนิคการแพทย์เพื่อให้ได้น้ำยาที่มีประสิทธิภาพในการตรวจเลือดหรือเม็ดเลือดแดงที่แตกจนตรวจไม่พบด้วยตาเปล่าหรือแม้กระทั่งจากกล้องจุลทรรศน์ ผมว่าถ้าประยุกต์ให้ดี เราก็จะได้น้ำยาที่ดีและมีประสิทธิภาพใช้ในแลปเทคนิคการแพทย์ครับ”



นางสาวสุติมา ละออ(ยุ้ย)

“น้ำยา Kastle-Meyer มีความไวในการตรวจ occult blood มากค่ะ หนูเห็นอาจารย์ใช้น้ำยานี้ในการสอนในชั่วโมงแลป พอรู้ว่าใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ยิ่งรู้สึกว่ามันมีความใกล้เคียงกับงานด้านเทคนิคการแพทย์มาก หนูได้ทดสอบความไวและความจำเพาะของน้ำยา ทำให้หนูรู้สึกว่ามันได้มีประโยชน์ในการสืบสวนคดีเท่านั้น แต่ยังใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์อื่นได้อีกด้วย”



นางสาวธนภรณ์ หว่างแยม (วิ)

“หนูทำการศึกษาโครงงานวิชาชีวเทคนิคการแพทย์เรื่องนี้ค่ะ เห็นได้ชัดว่านิติวิทยาศาสตร์มีความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับงานด้านเทคนิคการแพทย์มาก หนูมีโอกาสได้รู้เกี่ยวกับนิติชีวเคมี ซึ่งใช้ในการหาหลักฐานในทางนิติวิทยาศาสตร์ที่เกิดเหตุและ

หลักฐานที่เป็นประโยชน์ต่อคดีและหาตัวผู้กระทำความผิดมารับโทษ วิชาโครงงานวิชาชีพที่หนูทำอยู่เป็นการตรวจหา occult blood โดยใช้ Kastle-Meyer ตรวจ การทดลองนี้ทำให้หนูรู้สึกว่าไม่ว่าจะเป็นสาขาวิชาชีพไหนก็นำมาประยุกต์ใช้ด้วยกันได้ และทุกวิชาชีพล้วนมีประโยชน์ต่อเพื่อนมนุษย์ด้วยกันทั้งนั้นค่ะ”

จากความเห็นของนิสิตคงพอจะสรุปได้ว่า นิสิตมีความพึงพอใจในการประยุกต์การศึกษางานด้านนิติวิทยาศาสตร์เพื่อใช้ในงานเวชศาสตร์ชันสูตร นอกจากการนำ Kastle-Meyer มาใช้ในงานด้านการเรียนการสอนแล้ว คณะผู้วิจัยยังได้นำน้ำยาชนิดนี้มาประยุกต์ให้เป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปที่สะดวก ง่าย และราคาไม่แพง สำหรับใช้ในงานเวชศาสตร์ชันสูตร เพื่อลดการนำเข้าชุดทดสอบจากต่างประเทศ ส่งเสริมการพึ่งพาตัวเองจากการใช้น้ำยาที่ผลิตเองในประเทศอีกด้วย

ขอแสดงความนับถือ

วัชรินทร์ เทียนสันต์และคณะ

*สาขาวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

“สาขาวิชาโลหิตวิทยาและจุลทรรศนศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
พิษณุโลก

ประสบการณ์ของนิสิตเทคนิคการแพทย์ปีที่ 4 ในการศึกษาวิจัยด้านนิติวิทยาศาสตร์

กรรชิต กงรศ., แสงชัย นทีวรณารณ*

วัชรินทร์ เทียนสันต์, อรัญญา จิระวิริยะกุล**

เรียน บรรณาธิการวารสารนิติเวชศาสตร์

ปัจจุบันการศึกษานิติวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาไปมาก มีการประยุกต์ใช้ความรู้หลายด้านในการช่วยสืบสวนคดี นิติวิทยาศาสตร์เป็นวิทยาศาสตร์สาขาหนึ่งที่มีความสนใจเพิ่มมากขึ้น จดหมายนี้เขียนขึ้นเพื่อแสดงความรู้สึกลูกของนิสิตชั้นปีที่ 4 สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ที่ได้ทำการศึกษาชนิดของแมลงบนซากไก่ ที่ทำขึ้นเพื่อจำลองการตาย ในเขตบ้านคลองหนองเหล็ก ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก สำหรับการศึกษาชนิดสัตว์ขาข้อเพื่อประโยชน์ในการประมาณเวลาหลังการตายและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานนิติวิทยาศาสตร์ในพื้นที่นี้ ความคิดเห็นของนิสิตกลุ่มนี้ได้แสดงหลังจากทำการศึกษาดังกล่าวเสร็จสิ้นลง ดังนี้



ธนกร เสี่ยงล้ำ (ก๊อต)

“ก่อนที่จะได้ทำการศึกษาวิจัยทางด้านนิติวิทยาศาสตร์นี้ กระผมคิดว่าแมลงไม่มีความสำคัญทางด้านนิติเวช แต่เมื่อกระผมได้ทำการศึกษาวิจัยทางด้านนิติวิทยาศาสตร์แล้ว กระผมได้ประสบการณ์ใหม่ๆมากมายที่มีประโยชน์ต่อวิชาชีพเทคนิคการแพทย์มาก อย่างเช่น การใช้วงจรชีวิตของแมลงในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย การศึกษาแมลงประจำท้องถิ่นต่างๆ เพื่อบอกถึงการเคลื่อนย้ายศพ ซึ่งการศึกษาวิจัยเหล่านี้ ส่วนใหญ่แล้วไม่มีในหลักสูตรการสอนในวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ และเป็นเรื่องใหม่สำหรับประเทศไทย อีกทั้งยังมีประโยชน์ทางด้านนิติเวช เพราะ สามารถใช้เป็นหลักฐานเพื่อช่วยในการสืบสวนหาตัวผู้กระทำความผิดได้ กระผมคิดว่าเมื่อกระผมได้ทำการศึกษาในเรื่องนี้อย่างจริงจังแล้ว อาจทำให้กระผมสามารถทำงานทางด้านอื่นๆได้ และยังสามารถประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ได้อีกด้วย”



อิทธิพล พลสวัสดิ์ (ท็อป)

“จากการที่ได้ทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำให้กระผมได้ประสบการณ์หลายอย่างครับ ไม่ว่าจะเป็นความรู้ใหม่ๆที่ได้จากการศึกษาวิจัย ซึ่งการศึกษาทางด้านนี้นั้นสืบทอดเทคนิคการแพทย์อาจจะไม่ค่อยมีประสบการณ์มากนัก ความรู้ทางด้านนิติกฎหมายนี้ถือว่าประโยชน์อย่างมากครับ โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากแมลง ซึ่งคนทั่วไปอาจมองข้ามว่าแมลงเป็นเพียงสิ่งมีชีวิตเล็กๆ ไม่มีประโยชน์อะไร แต่ที่จริงแล้วในทางนิติกฎหมาย แมลงถือมีความสำคัญอย่างมาก อย่างเช่นแมลงวันบางชนิดสามารถนำมาประกอบการประมาณระยะเวลาหลังการตายได้ ว่าผู้ตายเสียชีวิตมาแล้วประมาณกี่วัน การศึกษาโครงสร้างและลักษณะต่างๆที่ไม่เคยรู้มาก่อนของแมลงสามารถนำไปจำแนกชนิดของแมลงที่เราพบได้ นอกจากนี้ประสบการณ์นอกห้องเรียน เช่น การได้พบปะ พูดคุยกับชาวบ้านในพื้นที่ที่ทำการศึกษายังช่วยส่งเสริมให้เรามีมนุษยสัมพันธ์ที่ดีกับชาวบ้านด้วย ”



พิทักษ์ สุริยะบุตร (แฟลต)

“สำหรับผม การศึกษาวิจัยในเรื่องของนิติวิทยาศาสตร์ นับว่าเป็นเรื่องใหม่ที่แปลกใหม่และเป็นการวิจัยที่ท้าทายมากสำหรับผม เพราะในทางวิชาชีพเทคนิคการแพทย์ไม่ได้ทำงานที่เกี่ยวข้องกับด้านนิติกฎหมาย แต่อาจมีบ้างที่จะทำงานเกี่ยวกับนิติวิทยาศาสตร์ ก่อนนี้ ผมไม่เคยรู้เลยว่าเราสามารถที่จะใช้วงจรชีวิตแมลงวัน หรือดั่งหนังสือช่วยในการประมาณระยะเวลาหลังการตายได้ หรือแม้กระทั่งการใช้ไฝที่บ้านที่ตัวเล็กมากๆ ซึ่งมองไม่เห็นได้ด้วยตาเปล่าจะสามารถนำมาใช้ระบุพื้นที่ที่

เสียชีวิต หรือการเคลื่อนย้ายศพได้ ผมรู้เพียงแต่ใช้อุณหภูมิของร่างกายที่ลดลงภายหลังการเสียชีวิตจนกว่าจะเท่ากับอุณหภูมิแวดล้อม และการใช้การแข็งตัวของกล้ามเนื้อผู้เสียชีวิตในการบอกว่าศพนั้นได้เสียชีวิตมาที่วันแล้วเท่านั้น

ซึ่งในส่วนการศึกษาวิจัยที่ได้ทำนี้จะเกี่ยวกับเรื่องของการใช้วงจรชีวิตของแมลงวัน และดั่งหนังสือในการประมาณระยะเวลาหลังการตาย ได้ทำงานวิจัยนอกห้องปฏิบัติการคือที่โรงเรียนเลี้ยงแมลงวัน และดั่งหนังสือ และได้ออกพื้นที่เก็บแมลงบ้าง เป็นงานศึกษาวิจัยที่สนุกมากครับ และเป็นประสบการณ์ที่ดีที่สามารถนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในการทำงานหรือการศึกษาต่อได้เป็นอย่างดีเลยครับ”

ประสบการณ์ใหม่สำหรับนิสิตเป็นสิ่งที่สำคัญในการเรียนรู้ของคนรุ่นใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเรียนรู้ในสิ่งที่อยู่รอบตัวนิสิตเอง เพื่อประยุกต์ใช้ในการปฏิบัติงานจริง หากนิสิตมีความรู้ความเข้าใจในหลักการพื้นฐานของงานด้านนี้ นิสิตย่อมสามารถจะประยุกต์ใช้ความรู้ดังกล่าวเข้ากับวิชาชีพที่ตนได้ศึกษาเล่าเรียนมา ดังนั้น อาจารย์ผู้สอนควรยอมรับการเรียนรู้ในสิ่งที่อยู่รอบตัวและใช้งานได้จริง เพราะทุกศาสตร์ ทุกวิชาชีพมีความสัมพันธ์กัน หากรู้จักประยุกต์เพื่อพัฒนาใช้เพื่อประโยชน์ของสังคมส่วนรวม

ขอแสดงความนับถือ

ครรชิต คงรส และคณะ

* สาขาโลหิตวิทยาและจุลทรรศน์ศาสตร์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

** สาขาวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

Erratum

แก้ไขข้อผิดพลาด

บทความเรื่อง “การพิสูจน์ยืนยันดีเอ็นเอของไก่ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนไซโตโครม บี” ซึ่งตีพิมพ์ในวารสารนิติเวชศาสตร์ ปีที่ 4 ฉบับที่ 2 มกราคม – เมษายน 2555 ได้เกิดข้อผิดพลาดในการตีพิมพ์รายชื่อผู้พิมพ์ โดยมีชื่อผู้พิมพ์ คุณ มีณญา บุญเจริญ เพียงรายชื่อเดียว โดยไม่มีรายชื่อผู้ร่วมพิมพ์และผู้ร่วมวิจัยอีก 2 ท่าน คือ ศาสตราจารย์นายแพทย์ธานินทร์ ภูพัฒน์ และศาสตราจารย์แพทย์หญิงเลิศลักษณ์ ภูพัฒน์

ทางกองบรรณาธิการจึงขอภัยต่อข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้น และได้ดำเนินการแก้ไขในฉบับออนไลน์ให้ถูกต้องเป็นที่เรียบร้อยแล้ว