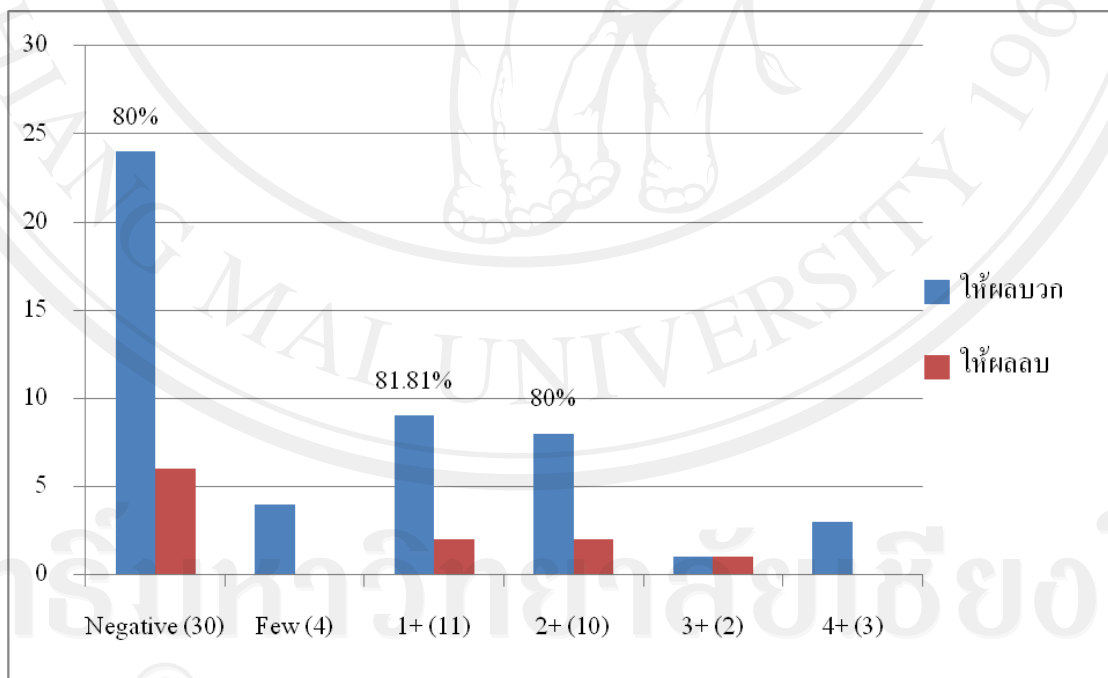


บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

เมื่อนำข้อมูลผลการตรวจพบ Amelogenin Y locus โดยเทคนิค LAMP จากน้ำซับช่องคลอดมาแบ่งกลุ่มตามปริมาณที่ตรวจพบตัวสุจิ พบว่าในกลุ่ม Few และ 4+ สามารถตรวจพบ Amelogenin Y locus ได้ทั้งหมด ในกลุ่ม 1+ ตรวจพบ 9 ตัวอย่าง (81.81%) จากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ในกลุ่ม 2+ ตรวจพบ 8 ตัวอย่าง (80%) จากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ในกลุ่ม 3+ ตรวจพบ 1 ตัวอย่างจาก 2 ตัวอย่าง และในกลุ่มที่ไม่พบตัวสุจิ ตรวจพบ 24 ตัวอย่าง (80%) จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบตัวสุจิแบ่งตามปริมาณที่พบ
กับผลการตรวจที่ได้

ในการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการตรวจหา Acid phosphatase activity ที่ให้ผลบวกในทุกตัวอย่าง และมีประวัติเข้ารับการตรวจภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากถูกระงับการกระทำชำเรา เนื่องมาจากการศึกษาของ Khalidi และคณะ ในปี 2004 ที่ทดสอบว่าความเข้มข้นของตัวสูกิจและระยะเวลาระหว่างการหลังและการทดสอบมีอิทธิพลต่อการตรวจโดยใช้ชุดตรวจอย่างไร พบว่าความเข้มข้นของตัวสูกิจไม่มีอิทธิพลต่อการตรวจหา Acid phosphatase activity และ Prostate specific antigen ซึ่งการตรวจหา Acid phosphatase activity สามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง

แต่ระดับ Acid phosphatase activity ที่อยู่ในช่องคลอดจะพบมากที่สุดภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากมีเพศสัมพันธ์ และอาจลดลงสู่ระดับปกติภายในระยะเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง หรือภายใน 3 วัน และเอนไซม์ Acid phosphatase หากทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องจะสลายตัวไปประมาณร้อยละ 20 – 50 ภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง อีกทั้งผู้เสียหายส่วนใหญ่ไม่ได้เข้ารับการตรวจร่างกายและเก็บตัวอย่างน้ำซ้บช่องคลอดทันทีหลังจากถูกระงับการกระทำชำเรา อาจจะทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ (ศิริพร และ สมศักดิ์, 2544) ในการตรวจหา Acid phosphatase ซึ่งเป็นวิธีจะต้องสังเกตการเปลี่ยนสี (Color test) โดยถ้าหากมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนสีภายในระยะเวลา 60 วินาที และการตรวจโดยวิธี Sperm cytology เป็นการตรวจหาตัวสูกิจโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ เป็นวิธีการที่จะต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญของผู้ตรวจแต่ละคน ทั้งการสังเกตการเปลี่ยนสีและการตรวจหาตัวสูกิจอาจเกิดความผิดพลาดจากผู้ตรวจได้ (Human error) ดังนั้นการตรวจหาสารพันธุกรรมจากเพศชาย ในส่วนของอเมโลจีนินในโครโมโซมเพศอาจใช้เป็นหลักฐานแสดงถึงการปนเปื้อนของเซลล์จากเพศชายลงไปในช่วงคลอด

จากการศึกษาของ Lydia และคณะ (2011) พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุของผู้กระทำความผิดเพศชายได้ การศึกษาในครั้งนี้จึงใช้วิธีการสกัดแบบไม่แยกชนิดเซลล์ เนื่องจากการสกัดที่ไม่เป็นการทำลายเซลล์เยื่อบุผิว ซึ่งมีข้อดีคือเซลล์เยื่อบุผิวที่เป็นของผู้กระทำความผิดเพศชายที่หลุดออกมาจากการเสียดสีของอวัยวะเพศ หรือท่อทางเดินต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์เพศชาย ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้การตรวจหา Amelogenin Y locus โดยเทคนิค LAMP มีผลบวก จากตัวอย่างที่ไม่พบตัวสูกิจเลย (Sperm Negative) อีกทั้งวิธีการสกัดแบบไม่แยกชนิดเซลล์ ยังเป็นวิธีที่ง่าย และมีขั้นตอนการสกัดน้อย เหมาะสำหรับการสกัดตัวอย่างในปริมาณมาก แต่

มีข้อเสียในเรื่องของการที่มีเซลล์เยื่อหุ้มช่องคลอดมากเกินไปอาจทำให้มีดีเอ็นเอของผู้หญิงมารบกวนในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

และในระหว่างขั้นตอนการสกัดที่มีการปั่นล้างและดูดซับน้ำชั้นบนทิ้งไป อาจมีการสูญเสียตัวอสุจิและเซลล์เยื่อหุ้มของผู้กระทำความผิดเพศชายไปได้ ดังเช่นในกรณีของตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอ Amelogenin Y locus โดยเทคนิค LAMP ได้ ได้แก่ ตัวอย่างที่มีอสุจิปริมาณ 1+ และ 2+ ตรวจไม่พบ 2 ตัวอย่าง จาก 11 ตัวอย่าง และ 3+ ตรวจไม่พบ 1 ตัวอย่าง จาก 2 ตัวอย่าง และการสกัดแบบ Differential จะสามารถแยกตัวอสุจิออกจากเซลล์เยื่อหุ้มของเพศหญิงได้ (Prinz et al, 2001) ดังนั้นในการระบุเพศหากต้องการดีเอ็นเอที่มีเซลล์เยื่อหุ้มของผู้หญิงลดลง เพื่อให้ปฏิกิริยาสามารถทำงานได้ดีขึ้นสามารถใช้วิธีการสกัดแบบ Differential ได้ แต่การสกัดดีเอ็นเอแบบ Differential นั้น ใช้เวลามากและมีหลายขั้นตอน แต่เราสามารถใช่วิธีการแยกตัวอสุจิออกจากเซลล์เยื่อหุ้มได้โดยการใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Microfluidic ซึ่งจะสามารถแยกเซลล์เยื่อหุ้มและตัวอสุจิออกจากกัน แล้วจึงนำตัวอสุจิมาสกัดโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการทั่วไป (Juroske, 2006)

ในกระบวนการ LAMP มีการใช้ Primer ทั้งหมด 4 ตัว 6 ชุดเบส ทำให้มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งจะมี Inner primer และ Outer primer ในขั้นตอนการสร้าง Dumbbell like DNA structure หลังจากนั้น Inner primer จะเข้าไปจับกับส่วนที่เป็นลูปของโครงสร้างที่สร้างขึ้นมาแล้ว ในขั้นตอนแรก จะทำให้ประหยัคเวลามากขึ้น และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิเดียวซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูง เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกสายออกจากกันก่อนเพื่อให้ Primer เข้าไปจับกับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมานี้ทำให้เทคนิค LAMP ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมน้อยกว่าเทคนิค PCR อย่างชัดเจน

สำหรับอุปกรณ์ที่ใช้ในการเข้มนั้น จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่ใช้เข้มนั้นต้องมีความคงที่ใกล้เคียงกับ 63 °C หากมีความผันผวนของอุณหภูมิมาก จะทำให้ปฏิกิริยาไม่สามารถทำงานได้ จึงจำเป็นต้องเลือกใช้เครื่องเข้มนที่เหมาะสม

การควบคุมผลการทดลองภายนอก (External control) โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอสุจิสำหรับเป็นตัวควบคุมผลบวก และใช้น้ำบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อ (Sterile water) เป็นตัวควบคุมผลลบ สำหรับการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาผลพบว่าเมื่อใช้วิธี Agarose gel electrophoresis นั้นไม่สามารถเห็นได้ชัดเจนทุกตัวอย่าง จึงเปลี่ยนไปใช้ Polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมีความไวกว่า เนื่องจาก LAMP product ที่ได้จะมีความยาวหลายขนาดแตกต่างกันไป จึงได้ผลออกมาเป็น

แถบดีเอ็นเอหลายแถบแบบจั้นบันได นอกจากนี้ยังมีวิธีในการตรวจผลแบบง่ายและรวดเร็ว โดยอาศัยความขุ่นของตะกอน Magnesium pyrophosphate (Yasuyoshi et al, 2001) หรือดูการเรืองแสง โดยใช้สารฟลูออ-เรสเซนซ์ เช่น SYBR GREEN I (Norihito et al, 2008) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั้งในและนอกสถานที่เกิดเหตุได้