บทที่ 1

บทนำ

การวินิจฉัยการตายจากการจมน้ำบางครั้งยังเป็นปัญหา เนื่องจากการที่จะระบุให้แน่ชัดว่าตายจากการจมน้ำ ต้องสามารถพิสูจน์ได้ว่ามีการหายใจเอาน้ำและสิ่งที่ปนเปื้อนเข้าสู่ปอดจำนวนมากพอที่จะขัดขวางกระบวนการหายใจ การพบว่ามีปอดบวมน้ำอาจมีสาเหตุมากมายนอกเหนือจากการจมน้ำ เช่น หัวใจวาย วิธีการหนึ่งที่จะช่วยบอกได้ว่าผู้ที่จมน้ำมีการหายใจเอาน้ำเข้าสู่ร่างกายจริงคือการตรวจหาสิ่งที่ปนเปื้อนในน้ำที่พบอยู่ในร่างกายของผู้ที่จม

ในขณะที่ผู้จมน้ำยังไม่เสียชีวิต จะมีการหายใจเอาน้ำและสิ่งที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำเข้าสู่ร่างกาย สิ่งที่ปนเปื้อนในน้ำ มีทั้งเชื้อจุลชีพต่างๆ พืชน้ำ โคลน และอื่นๆที่สามารถเข้าสู่ร่างกายพร้อมกับน้ำผ่านระบบทางเดินหายใจ วิธีการหนึ่งที่จะช่วยบอกได้ว่าผู้ที่จมน้ำมีการหายใจเอาน้ำเข้าสู่ร่างกายจริงคือ การตรวจหาสิ่งที่ปนเปื้อนในน้ำ ที่มีอยู่ภายในร่างกายของผู้ที่จม ได้มีการทดลองมากมายเกี่ยวกับการหาสิ่งปนเปื้อนในน้ำจากตัวผู้ที่จม อันได้แก่ ไดอะตอม แพลงตอน และแบคทีเรีย ผลที่ได้จากการศึกษาบ่งชี้ว่าสิ่งเหล่านี้ช่วยในการวินิจฉัยการจมน้ำอยู่บ้าง แต่ก็มีข้อด้อยบางประการ เช่น การหาไดอะตอมในเนื้อเยื่อปอดผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ แม้จะตรวจพบก็ยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่ามาจากการจมน้ำเพราะไดอะตอมอาจมาจากการรับประทานสัตว์น้ำ และในกรณีที่ไม่พบก็ไม่ได้บ่งชี้ว่าไม่จมน้ำ นอกจากนั้นวิธีการตรวจก็ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากเป็นการค้นหาส่วนใหญ่ต้องทำในเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในหลายๆอย่าง ต้องอาศัยขั้นตอนในการย่อยเนื้อเยื่อซึ่งใช้เวลานานและยุ่งยากพอสมควร ส่วนการตรวจหาแพลงตอนเพื่อเป็นตัวบ่งชี้การจมน้ำ พบว่าในแหล่งน้ำบางแห่งไม่มีแพลงตอน ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้แม้ผู้นั้นจะจมน้ำจริง

สิ่งปนเปื้อนอีกอย่างหนึ่งที่พบได้ในแหล่งน้ำคือ แบคทีเรีย ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่พบได้ในแหล่งน้ำ ทั่วไป สามารถ ปนเปื้อนและเข้าสู่ร่างกาย ได้ง่าย การทดลอง เกี่ยวกับการหาเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำจากเลือดผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ พบว่าได้ผลค่อนข้างดี แม้แต่น้ำที่ค่อนข้างสะอาดเช่น น้ำบ่อก็ยังสามารถพบแบคทีเรียได้แม้จะเป็นปริมาณที่น้อย เชื้อแบคทีเรียที่เคยมีผู้ศึกษาไว้และสอดคล้องกับงานวิจัยนี้มีหลายชนิด เช่น *Aeromonas hydrophila* เป็น เชื้อแบคทีเรียที่พบในแหล่งน้ำทั่วไป และ *Escherichia coli* เป็นเชื้อปนเปื้อนมากับอุจจาระที่พบในแหล่งน้ำ เนื่องจากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยการปรากฏมีของเชื้อดังกล่าวในแหล่งน้ำเป็นปัจจัยเบื้องต้น หากแหล่งน้ำไม่มีเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวก็ไม่สามารถใช้เชื้อเหล่านั้นเป็นตัวบ่งชี้ จึงเริ่มมีผู้สนใจจะตรวจหาแบคทีเรียที่อาศัยเป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายของคนที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายในภาวะปกติ เช่น เชื้อ *Streptococcus salivarius* ซึ่งพบในช่องปากและทางเดินหายใจส่วนต้น เมื่อผู้ที่จมน้ำมีการกลืนหรือหายใจเอาน้ำเข้าไปในช่วงกำลังจมน้ำ เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดผ่านทางถุงลมของปอด

วิธีมาตรฐานสำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย คือ การเพาะเชื้อ ซึ่งใช้เวลาหลายวันกว่าจะทราบผลว่าเป็นเชื้อตัวใด จึงมีความพยายามประยุกต์ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจพิสูจน์ ได้แก่เทคนิค PCR เป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมที่มีจุดเด่น คือ มีความไว (sensitivity) สูง สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมได้แม้มีปริมาณน้อย ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตที่บางครั้งไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีเพาะเชื้อ เทคนิค PCR ยังมีความจำเพาะ (specificity) สูง เนื่องจากสามารถออกแบบลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวเริ่ม (primer) ที่จำเพาะกับเชื้อแต่ละตัว นอกจากนั้นระยะเวลาที่ใช้ตรวจก็สั้นกว่าการเพาะเชื้อมาก

จากการศึกษาของ Hoshono t. et al., 2004 ได้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ *Streptococcus* สายพันธุ์ต่างๆที่เป็นปัญหาเกี่ยวข้องกับโรคในช่องปาก โดยใช้เทคนิค PCR ที่จำเพาะกับบริเวณ *gtf* genes พบว่าสามารถแยกแต่ละสายพันธุ์ได้ รวมถึง *Streptococcus salivarius* ด้วย

และ Nakanishi H. et al., 2008 ทำการตรวจหาเชื้อ *Streptococcus salivarius* ในน้ำลาย โดยใช้เทคนิค PCR จากตัวอย่างที่เป็นน้ำลาย เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน คือ การตรวจหาเอ็นไซม์ amylase พบว่าได้ผล 100% นอกจากนั้นพบว่าเชื้อดังกล่าวพบได้เฉพาะในน้ำลาย จึงได้นำไปประยุกต์ใช้กับงานทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อช่วยพิสูจน์ว่า มีคราบน้ำลายหรือไม่ในสิ่งส่งตรวจ เช่น ก้นบุหรี่ และ swab จากผิวหนัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดลองต่างๆที่กล่าวมา ทำให้เชื่อ ได้ว่า เทคนิค PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* ได้ สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในเลือดศพเพื่อช่วยวินิจฉัยการจมน้ำที่มีปรากฏอยู่บ้าง ได้แก่

Lucci A. et al., 2008 แสดงให้เห็นว่าสามารถเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำจากตัวอย่างเลือดของศพที่เสียชีวิตจากการจมน้ำได้ แต่ไม่พบในศพที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น อย่างไรก็ตาม แม้ผลการทดลองดูเหมือนจะได้ผลดี แต่ยังใช้เวลาทดสอบค่อนข้างมาก

Suto M. et al., 2009 ได้ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis* และ *Aeromonas hydrophila* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละตัว จากตัวอย่างเลือดศพที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำ พบว่าได้ผลดี

จากงานวิจัยที่กล่าวมาแล้ว พบว่ามีความเป็นไปได้เป็นอย่างมากที่จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการจมน้ำ ที่มีความไวและความจำเพาะ จึงน่าสนใจที่จะนำวิธีการดังกล่าวมาทดสอบความถูกต้องในบริบทของประเทศไทย และอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

<u>แบคทีเรีย</u>

แบคทีเรีย เป็นสัตว์ชั้นต่ำ (prokaryotic cell) ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดีเอ็นเอในเซลล์จึงอยู่ร่วมกับออร์กาเนลส์ (organels) อื่นๆในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดยดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นวงกลม ประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) 2 สายพันเป็นเกลียวต่อเนื่องกันไม่มีปลายเปิด อยู่ในลักษณะเส้นเดี่ยว เรียกว่า haploid (มี chromosome 1 ชุด) (ตรีทิพย์, 2552)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การแยกชนิดแบคทีเรียตามการติดสีแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ แกรมบวก และแกรมลบ

1. <u>แกรมลบ</u> ผนังเซลล์ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคน 5-20 % ลิโพโปรตีน ลอโพพอลิแซ็กคาไรด์ และมีกรดไดอะมิโนพิมิลิกแทนที่กรดอะมิโนไลซีน
2. <u>แกรมบวก</u> ผนังเซลล์ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคน 90 % มีกรดอะมิโนน้อยชนิดกว่าแกรมลบ แต่มีผนังเซลล์หนากว่าแกรมลบ

องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ปริมาณไขมันที่มีมากกว่าในแกรมลบ มีคุณสมบัติเป็น O antigen และ endotoxin เป็นเครื่องป้องกันไม่ให้ถูกย่อยโดยเอนไซม์บางชนิด องค์ประกอบของลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ ยังช่วยป้องกันการถูกฟาโกไซโทซิสด้วย

ความแตกต่างที่สำคัญของแบคทีเรียแกรมลบคือ มีเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ล้อมรอบเพปติโดไกลแคนไว้ เมมเบรนนี้มีไขมันมากถึง 11-22 % ของน้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ เมมเบรนชั้นนอกทำหน้าที่เป็นเครื่องกั้นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของผนังเซลล์ ไม่ให้ออกจากช่องว่าง เพอริพลาสมิก (periplasmic space) และยังกั้นสารเคมีและเอนไซม์ภายนอกไม่ให้เข้าไปทำลายเซลล์ ดังนั้นผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ได้ง่ายกว่าของแบคทีเรียแกรมลบ (นงลักษณ์ และคณะ, 2552)

<u>คุณสมบัติทั่วไปของดีเอ็นเอ</u>

คุณสมบัติทางกายภาพ

1. ถูกย่อยสลายเป็นหน่วยย่อยเล็กๆอย่างสมบูรณ์ได้ด้วยกรดแก่
2. ทนต่อการย่อยด้วยด่าง
3. เสียสภาพธรรมชาติเมื่อถูกความร้อน (denaturation) และกลับมาจับกันใหม่ได้ (renaturation) ถ้าอุณหภูมิเย็นลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติทางชีวภาพ

1. เก็บรักษาข้อมูลทางพันธุกรรม ถ่ายทอดไปได้ในแต่ละรุ่น
2. จำลอง (DNA replication) และซ่อมแซม (DNA repair) ตัวเองได้ การจำลองตัวเองของ ดีเอ็นเอ ในสัตว์ชั้นต่ำ (ศึกษาใน *Escherichia coli*) เป็นแบบ semiconservative replication คือ เมื่อมีการจำลองตัวเองจะมีการแยกโพลีนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 2 สายออกจากกัน จากนั้นสร้างสายใหม่เข้าคู่กับสายเก่าเสมอ
3. ถ่ายทอดหรือแสดงออกข้อมูลอย่างเป็นลำดับขั้น โดยผ่านอาร์เอ็นเอ

จากคุณสมบัติต่างๆดังกล่าวจึงได้มีการใช้ประโยชน์ของดีเอ็นเอ ในหลายๆด้าน เช่น ทางการแพทย์ ทางด้านกฎหมายเช่นการพิสูจน์บุคคล และใช้พิสูจน์การมีอยู่ของสิ่งที่ต้องการตรวจหา ได้หากสิ่งที่ต้องการตรวจหานั้นมีสารพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบ โดยประยุกต์ใช้ในเทคนิคที่เรียกว่า PCR

Polymerase chain reaction (PCR)

เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ให้มีมากขึ้นในเวลาอันสั้น ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ซึ่งจะวนซ้ำๆกันใน 3 ขั้นตอนนี้เป็นวัฏจักร ขั้นตอนหลักนั้นคือ

1. denaturation เป็นการเพิ่มความร้อนให้สูงเพียงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอ ตั้งต้นนั้น เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยทำให้มีการแยกสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายที่พันกันเป็นเกลียวออกจากกัน
2. annealing เป็นการเข้าคู่ของสายดีเอ็นเอ ต้นแบบกับไพรเมอร์
3. extension เป็นการต่อสายยาวของดีเอ็นเอ ด้วย DNA polymerase enzyme

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากความรู้ดังกล่าวจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ ที่ต้องการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อในช่องปากที่ปนเปื้อนไปกับน้ำที่สำลักเข้าไปขณะจมในเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ คือเชื้อ *Streptococcus salivarius* และนำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้ในเลือดของผู้ที่ตายจากสาเหตุอื่น ที่อาจเป็นประโยชน์ช่วยบ่งชี้สาเหตุการเสียชีวิตจากการจมน้ำได้

<u>วัตถุประสงค์</u>

เพื่อเปรียบเทียบโอกาสตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus salivarius* ในเลือดศพที่ตายจากจมน้ำกับการตายจากสาเหตุอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved