บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

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

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 ผลไม่สอดคล้องกับการชันสูตรเนื่องจากตัวอย่างเลือดได้มาจากศพที่มีสภาพเน่าแล้วทั้ง 3 ตัวอย่าง สาเหตุที่ตรวจไม่พบเชื้อ *Streptococcus salivarius* อาจเนื่องมาจากเมื่อศพเน่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ได้เจริญเติบโตขึ้นมาอย่างรวดเร็วแข่งขันกับเชื้อ *Streptococcus salivarius* ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อชนิดนี้จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีความต้านทานน้อยกว่าแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จึงไม่สามารถเจริญเติบโตแข่งกับแบคทีเรียในลำไส้ได้

ตัวอย่างที่ 9 แม้จะมีการชันสูตรว่าเสียชีวิตจากการจมน้ำในอ่างน้ำแต่ตรวจพบปริมาณแอลกอฮอล์และยาอื่นๆในปริมาณสูงและมีโรคประจำตัวหลายโรค ทำให้เสียชีวิตง่ายกว่าคนทั่วไป การชันสูตรพบปอดบวมน้ำเพียงเล็กน้อย การจมน้ำอาจเป็นการจมน้ำแบบไม่สมบูรณ์ ทำให้แบคทีเรียเข้าไปสู่กระแสเลือดได้แต่ไม่มากพอที่จะตรวจพบเชื้อ

ตัวอย่างที่ 7 ให้ผลไม่สอดคล้องกับการวินิจฉัย พบว่าผู้ตายมีโรคหัวใจเป็นโรคประจำตัวและมีอาการหมดสติก่อนล้มหน้าคว่ำลงไปในร่องน้ำตื้นๆ เช่นเดียวกับตัวอย่างที่ 12 ที่พบศพบริเวณทุ่งนาซึ่งเป็นแหล่งที่มีน้ำขังอยู่น้อยและยังตรวจพบปริมาณของยาบางชนิดในตัวอย่างเลือดทั้งสองกรณี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาจจะมีการสำลักน้ำเพียงเล็กน้อยทำให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่กระแสเลือดน้อยผลจึงเป็นลบ

ในกลุ่มตัวอย่างเลือดของผู้ที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Streptococcus salivarius* โดยปกติแล้วจะพบแบคทีเรียชนิดนี้บริเวณช่องปากเท่านั้นจะไม่พบในเลือด ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏออกมาในบางตัวอย่างเป็นลักษณะไม่จำเพาะ (non-specific band) ซึ่งอาจเกิดมาจากตัวอย่างเลือดเก็บมาเป็นเวลานาน 2 ปี อีกทั้งการสกัดดีเอ็นเอแบบ chelex อาจมีการปนเปื้อนดีเอ็นเอชนิดอื่นเข้าไปในตัวอย่างที่สกัด ทำให้ไพร์เมอร์บางตัวเข้าเกาะแล้วทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอกลายเป็น non-specific band ขึ้น การตรวจผลดีเอ็นเอ เริ่มแรกได้ทำการตรวจดูในเจล agarose ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็นขั้นบันไดของตัวอย่างเลือดคนจมน้ำไม่ชัดเจน บางตัวอย่างไม่สามารถมองเห็นได้ในเจล agarose ได้ ดังนั้นจึงทำการตรวจผลโดยใช้ เจล acrylamide ที่เป็นวิธีที่มีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยได้และมีความไวมากกว่าเจล agarose ใช้เวลาในการแยกแถบดีเอ็นเอ 5 ชั่วโมงก็สามารถตรวจผลได้แล้ว

กระบวนการ LAMP ครั้งนี้ ได้ใช้ไพร์เมอร์ในส่วนของยีน glucosyltransferase K (*gtf*K) โดยปกติแล้วมีหน้าที่ในการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเพื่อสร้าง polysaccharide ซึ่งเป็นส่วนช่วยให้เซลล์ของแบคทีเรียมีการรวมกลุ่มและเกาะอยู่บนพื้นผิวของฟัน เป็นลักษณะที่เรียกกันว่าคราบ พลาค (Plaque) แบคทีเรียจำพวก *Streptococcus* sp. จะมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ แต่ในแต่ละ สปีชีส์ จะมีส่วนของดีเอ็นเอตำแหน่งจะไม่เหมือนกัน เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ออกจากกันเช่น *Streptococcus mutants* คือยีน *gft*D *Streptococcus sobrinus* คือยีน *gft*T ในส่วนของ *Streptococcus salivarius* ยีนในส่วนนี้คือ *gtf*K

สารเคมีมีความสำคัญมากในกระบวนการ LAMP ดังเช่น betaine การวิจัยในช่วงแรกไม่ได้ใส่สารชนิดนี้ลงไปพบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เมื่อลดปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของ betaine เหลือ 0.4 M ก็ไม่ได้ผลเช่นกัน หน้าที่ของ betaine ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีงานวิจัยพบว่า betaine มีหน้าที่ในการเตรียมสายดีเอ็นเอแม่แบบให้มีความเหมาะสมกับเอ็นไซม์ polymerase นอกจากนั้นยังมีความสามารถในการลดความเสถียรของสายดีเอ็นเอที่มีปริมาณของ C และ G มากได้อีกด้วย (Yeh *et al*., 2005)

ปริมาณของ Deoxynucleotidetriphosphates (dNTPs) มีความจำเป็นเช่นกัน การตรวจสอบในช่วงแรกใช้ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 mM each ปรากฏผลออกมาเป็นลบ ในบางตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จางมาก หลังจากเพิ่มความเข้มข้นของ dNTPs เป็น 0.8 mM each จึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ผลบวกชัดเจนขึ้น dNTPs เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการสร้างสายดีเอ็นเอ ในการทำงานวิจัยนี้ใช้ไพร์เมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด อาจต้องอาศัย dNTPs ที่มากพอที่จะสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น

งานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้วิธีการตรวจหาเชื้อ *Streptococcus salivarius* จากงานวิจัยของ Nakanishi และคณะ แต่ในการปฏิบัติงานจริงสารเคมีบางชนิดได้ใช้ความเข้มข้นแตกต่างจากงานวิจัยข้างต้น ในงานวิจัยของ Nakanishi และคณะ ได้ใช้ชุดน้ำยาตรวจสำเร็จ (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) งานวิจัยนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนปริมาณ อัตราส่วนสารเคมีขึ้นใช้เองโดยไม่ต้องซื้อชุดน้ำยาตรวจสำเร็จ ซึ่งไม่มีขายในประเทศหากนำเข้าจะมีราคาที่แพงมาก อัตราส่วนความเข้มข้นของสารบางตัวถูกปรับลดลง เช่น dNTPs จากชุดน้ำยาต้องการความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 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 (รวิสรา, 2010) และเทคนิคการนำเลือดมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Lucci *et al*., 2008) ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างต่ำ 3 วัน การแช่อบสามารถทำในเครื่องมือพื้นฐานอย่างเช่น เครื่อง incubator ได้ทำให้การปฏิบัติงานแต่ละครั้งมีความสะดวกไม่ต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจเลือดจากผู้ที่เสียชีวิตจากการจมน้ำ และที่เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น ต้องพิจารณาพยาธิสภาพแวดล้อมต่างๆ ร่วมด้วย ไม่ว่าจะเป็นการจมน้ำแบบไม่สมบูรณ์ หรือสภาพศพที่เน่าอาจทำให้ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved