ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas spp* บนเลือดกับอายุของคราบเลือด

โดย
นางสาวสุธีรา ก้ออิสละ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas spp* บนเลือดกับอายุของคราบเลือด

โดย
นางสาวสุธีรา ก้ออิสละ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE COLONY NUMBER OF *PSEUDOMONAS SPP.* IN BLOOD AND THE AGE OF BLOODSTAINS.

By

MISS Suteera KOISSALA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas spp* บนเลือดกับอายุของคราบเลือด
โดย	สุธีรา ก้ออิสละ
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(อาจารย์ ดร. ยุภาพร สมีน้อย)

56312331 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : คราบเลือด/ Pseudomonas spp /นิติวิทยาศาสตร์

นางสาว สุธีรา ก้ออิสละ: ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas spp* บนเลือดกับอายุของคราบเลือด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

เลือดเป็นพยานวัตถุทางชีวภาพที่มักพบมากชนิดหนึ่งในสถานที่เกิดเหตุ การประมาณอายุของคราบเลือดที่สัมพันธ์กับเวลาในการเกิดเหตุนั้นและ มีความสำคัญทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์ได้แก่เชื้อ *Pseudomonas spp* บน เลือด fresh normal และ inactivated complement serum กับอายุของคราบเลือดในระยะเวลาต่างๆ ในการทดลองนี้ ตัวอย่างเลือด fresh normal และ inactivated complement serum ถูกหยดลงบนผิวสัมผัสกระเบื้องแห้ง โดยตัวอย่างเลือดถูกวางไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลานาน 4, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงก่อนที่จะนำมานับหาจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่เจริญเติบโตแต่ละช่วงเวลา ผลการทดลองพบว่าผลกระทบของเชื้อ *Pseudomonas spp* ในสภาวะ fresh normal blood มีจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp* ลดลงในขณะที่สภาวะเลือดที่ผ่านการ inactivated complement จำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp* เพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยศิลปากร

56312331 : Major (FORENSIC SCIENCE)

Keyword : Bloodstains / Pseudomonas spp /Forensic Science

MISS SUTEERA KOISSALA : THE RELATIONSHIP BETWEEN THE COLONY NUMBER OF *PSEUDOMONAS SPP.* IN BLOOD AND THE AGE OF BLOODSTAINS. THESIS ADVISOR : DR. SIRIRAT CHOOSAKOONKRIANG

Bloodstains at a crime scence is one of the most important biological traces. Estimation of the age of human bloodstains is of great importance in forensic practices. The objective of this research is aimed to study the relationship between the colony number of *Pseudomonas spp* on fresh normal serum and complement inactivated serum and the age of human bloodstains. In this experiment, fresh normal serum and complement inactivated serum samples were deposited immediately onto the tile surfaces to form bloodstains and kept at 37°C for 4, 6, 12, 24 and 48 hours before examination. The results showed that a decreasing in *Pseudomonas spp* number from 4 to 48 hours in fresh normal serum. On the other hand, the *Pseudomonas spp* numbers were increase in complement inactivated serum samples.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขานิติวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และประสบการณ์อันมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ หลักสูตรนิติวิทยาศาสตร์ รุ่นที่ 9 มหาวิทยาลัยศิลปากร และน้องๆ ปี 4 คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำและกำลังใจตลอดมา รวมทั้งผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามทุกท่าน ซึ่งมีส่วนช่วยเหลือจนการวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน

สุธีรา ก้ออิสละ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

สารบัญภาพประกอบ 1

บทที่ 1 2

บทนำ 2

บทที่ 2 8

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

บทที่ 3 26

วิธีดำเนินการวิจัย 26

บทที่ 4 34

ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล 34

บทที่ 5 41

อภิปรายผลของการวิจัย 41

รายการอ้างอิง 43

ประวัติผู้เขียน 45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้การทดลอง.....27

ตารางที่ 2ข้อมูลจำนวนเซลล์ Pseudomonas spp. ที่เจริญเติบโตใน Nutrient broth ในแต่ละชั่วโมง35

ตารางที่ 3 ข้อมูลแสดง stock culture Pseudomonas spp.....37

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อ Pseudomonas spp. ที่ได้สัมผัสกับเลือด.....37

ตารางที่ 5แสดงจำนวนเชื้อ Pseudomonas spp. ได้สัมผัสกับเลือดที่ผ่านการ inactivated complement 39

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1องค์ประกอบของเลือด.....14

ภาพที่ 2รูปร่างของ Red blood cell (biconcave) 15

ภาพที่ 3รูปร่างของเม็ดเลือดแดงเมื่อย้อมสีไรท์ 16

ภาพที่ 4เม็ดเลือดขาว (Neutrophil) 17

ภาพที่ 5เม็ดเลือดขาว (lymphocyte).....17

ภาพที่ 6เม็ดเลือดขาว (Monocyte)ที่ปกติภาพ 18

ภาพที่ 7 เม็ดเลือดขาว (Monocyte) ที่ผิดปกติ 18

ภาพที่ 8เม็ดเลือดขาว(basophil) 19

ภาพที่ 9เม็ดเลือดขาว (Eosinophil) 19

ภาพที่ 10เกร็ดเลือด (platelets).....21

ภาพที่ 11อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป3M™ Petri film™ 24

ภาพที่ 12อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป3M™ Petri film™ ที่แยก S. aureus ได้โคโลนีสีแดง-ม่วง.....25

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

กราฟที่ 1จำนวนเชื้อ Pseudomonas spp. ใน Nutrient broth ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละช่วงเวลา.....36

กราฟที่ ค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ2Pseudomonas spp. ในสภาวะ Fresh normal blood ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละช่วงเวลา.....38

กราฟที่ 3ค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ Pseudomonas spp. ได้สัมผัสกับเลือดที่ผ่านการinactivated complement.....40

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ในปัจจุบันนี้ ได้เกิดปัญหาทางด้านอาชญากรรมขึ้นมาก การที่จะนำตัวผู้กระทำผิดที่แท้จริงมาลงโทษตามกระบวนการยุติธรรมนั้นเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะจะต้องมีการรวบรวมพยานหลักฐานมายืนยันให้สามารถพิสูจน์ความผิดได้อย่างชัดเจน ดังนั้นในประเทศที่พัฒนาแล้ว อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น ยุโรปและสหรัฐอเมริกา จึงมีการนำเอาความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีต่างๆ มาพัฒนาใช้ในการตรวจพิสูจน์หลักฐานต่างๆให้ได้ผลที่ถูกต้องแท้จริงตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งได้ผลอย่างดียิ่งในการสืบสวนติดตามหาคนร้ายโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่น เมื่อเกิดคดีฆาตกรรมเกิดขึ้น สามารถจับกุมคนร้ายได้ถึง 90% โดยการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีที่ค้นคว้าวิจัยและผลิตขึ้นอย่างทันสมัย ผสานกับหลักนิติวิทยาศาสตร์ให้บรรลุผลได้เป็นอย่างมาก การสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์เริ่มจากการตรวจสถานที่เกิดเหตุ(Crime scene investigation) หลังจากคนร้ายก่อเหตุและหลบหนีไปแล้วและคนร้ายมักจะลงมือก่อเหตุในช่วงเวลาที่ปลอดคนไม่มีคนเห็นเหตุการณ์ จึงไม่มีพยานบุคคลระบุยืนยันตัวคนร้ายได้ จึงต้องอาศัยวิธีการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์มาช่วยในการหาตัวคนร้าย เนื่องจากสถานที่เกิดเหตุเป็นแหล่งที่รวบรวมพยานวัตถุได้เกือบทั้งหมดเช่น รอยนิ้วมือแฝง ปลอกกระสุน ร่องรอยการต่อสู้ รอยเบรคของล้อรถ เศษอาหาร คราบเลือด คราบอสุจิ และศพ เป็นต้น ซึ่งพยานทั้งหลายยังสามารถนำมาลำดับย้อนเหตุการณ์ความเป็นไปของเรื่องราวได้ จึงถือเป็นเรื่องสำคัญมาก นิติวิทยาศาสตร์ (Forensic Science) คือ “การนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์ทุกสาขามาประยุกต์ใช้ เพื่อพิสูจน์ข้อเท็จจริงในคดีความเพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมายและการลงโทษ”จากประโยชน์ดังกล่าวข้างต้น จึงมีการนำนิติวิทยาศาสตร์มาใช้ในขอบเขตโดยทั่วไป ดังนี้

1. การตรวจสถานที่เกิดเหตุ และการถ่ายรูป (Crime Scene Investigation and Forensic)
2. การตรวจลายนิ้วมือ ฝ่ามือ ฝ่าเท้า (Fingerprint, Palm print, Footprint)
3. การตรวจเอกสาร (Document) เช่น ตรวจลายเซ็น ลายมือเขียน
4. การตรวจอาวุธปืน และกระสุนปืนของกลาง (Forensic Ballistics)
5. การตรวจทางเคมี (Forensic Chemistry) เช่น ตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารต่าง ๆ
6. การตรวจทางฟิสิกส์ (Forensic Physics)เช่น ตรวจร่องรอยการเฉี่ยวชนของรถ
7. การตรวจทางชีววิทยา (Biological Trace Evidence) เช่น ตรวจเส้นผม เลือด อสุจิ

8. การตรวจทางนิติเวช (Forensic Medicine) ได้แก่ งานนิติพยาธิ งานนิติวิทยา งานชีวเคมี งานพิสูจน์บุคคล งานภาพการแพทย์

การเก็บรวบรวมและจัดส่งพยานวัตถุจากสถานที่เกิดเหตุ จากร่างกายของผู้เสียหายหรือผู้ตายอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ เป็นสิ่งสำคัญที่สุดในชั้นสืบสวนสอบสวน และในชั้นศาลก็ตาม การเก็บพยานวัตถุต้องกระทำถูกต้องตามกฎหมาย จึงถือเป็นพยานที่ยอมรับได้ ดังนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงก่อนที่จะทำการเก็บพยานวัตถุคือ ผู้ที่จะทำการเก็บนั้นกฎหมายจะต้องให้อำนาจในการเก็บพยานวัตถุไว้ เช่น เป็นพนักงานสอบสวน เป็นเจ้าหน้าที่กองพิสูจน์หลักฐาน และวิธีการเก็บพยานวัตถุจะต้องเป็นวิธีที่เหมาะสม เช่น เมื่อพบอาวุธปืนพกรีวอลเวอร์ ขนาด .38 ตกอยู่ในสถานที่เกิดเหตุ ผู้เก็บพิจารณาแล้วว่า อาวุธปืนดังกล่าว สามารถตรวจหาลายนิ้วมือ ตำแหน่งของปลอกกระสุนปืนในลูกโม่ ตำหนิ พิเศษของล่องเกลียวสันเกลียวในลำกล้องปืน(ชัย & บรรณาธิการ, 2008) ดังนั้นผู้เก็บจะต้องเลือกวิธีการเก็บที่ไม่ทำให้สิ่งเหล่านี้เสียไป การเก็บที่ผิดวิธีหรือไม่เหมาะสมสามารถทำให้ก่อข้อโต้แย้งในชั้นศาลได้เพื่อจะให้พยานวัตถุใช้เป็นพยานหลักฐานในชั้นศาลได้ พยานวัตถุนั้นจะต้อง

• ระบุรายละเอียดของพยานวัตถุอย่างชัดเจน
• แสดงช่วงของการครอบครองพยานวัตถุโดยตลอด
• เป็นพยานวัตถุที่มีความเป็นสาระสำคัญ
• ปฏิบัติถูกต้องตามกฎหมายทุกขั้นตอน

เจ้าหน้าที่กองพิสูจน์หลักฐานหรือพนักงานสอบสวน ผู้อยู่ในสถานที่เกิดเหตุจะต้องมีหน้าที่ในการเก็บรวบรวม และแสดงตำแหน่งพยานวัตถุที่ตรวจพบการเก็บพยานวัตถุควรหลีกเลี่ยงการจับต้องพยานวัตถุโดยตรง และควรใส่ถุงมือขณะทำการเก็บพยานวัตถุ(วิภาส & บรรณาธิการ) ทั้งนี้โดยทั่วไปการพิจารณาประเภทของพยานวัตถุและจุดประสงค์ในการตรวจพิสูจน์ สามารถแยกวิธีการออกได้ดังนี้

1. การตรวจโดยวิธีทางเคมี และชีววิทยา (Chemical and Biological Analysis)
2. การตรวจโดยการใช้วิธีทางกายภาพ (Physical Experiments)
3. การตรวจโดยใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ (Instrumental Analysis)

พยานวัตถุทางชีววิทยาที่มีความสำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือเลือดซึ่งมักพับได้บ่อยในสถานที่เกิดเหตุมักพบอยู่ในอาชญากรรมที่มีความรุนแรง เช่น คดีฆาตกรรมด้วยอาวุธต่าง ๆ เลือดที่ไหลออกมาจะมีปริมาณมากน้อยอย่างไรย่อมขึ้นอยู่กับความฉกรรจ์ของบาดแผล ส่วนใดของร่างกายที่เกิดเป็นแผลฉกรรจ์ และบาดแผลอยู่ใกล้ทางเดินของเส้นเลือดใหญ่ ก็ย่อมจะมีเลือดไหลออกมามากเลือดที่ไหลออกมาอาจจะเปรอะเปื้อนอยู่ในที่ต่าง ๆ เช่น ตามเสื้อผ้า พื้น ฝา ผนัง ตามร่างกายผู้เสียหายหรือ

คนร้าย และอาวุธที่ใช้ทำร้าย เป็นต้น เลือดจะมีลักษณะเกาะแน่นเป็นหยดหรือคราบอยู่ ณ ที่นั้น เรียกว่าหยดเลือด หรือคราบเลือด ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์แก่การสืบสวนเป็นอันมากดังจะกล่าวดังต่อไปนี้

1. ช่วยให้ทราบถึงวิธีการกระทำผิดของคนร้าย เช่น กรณีฆาตกรรมพบอาวุธมีดมีคราบเลือดติดอยู่ พบรอยคราบเลือดเปรอะเปื้อนอยู่จำนวนมากในสถานที่เกิดเหตุ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าคนร้ายลงมือฆ่าผู้ตายในสถานที่เกิดเหตุนั้นโดยใช้อาวุธมีด

2. ช่วยให้ทราบถึงเส้นทางหลบหนีของคนร้าย เช่น กรณีมีการยิงต่อสู้ระหว่างเจ้าหน้าที่และคนร้าย เมื่อคนร้ายถูกยิงแล้วบาดเจ็บแล้วหลบหนีไป หยดเลือดจากบาดแผลที่ถูกยิงอาจจะหยดเป็นทางไปตลอด เป็นตัวบ่งบอกถึงเส้นทางหลบหนีของคนร้าย

3. ช่วยในการตรวจพิสูจน์ยืนยันตัวบุคคลผู้กระทำผิด เช่น การตรวจหาหมู่เลือด

4. ช่วยให้ทราบระยะเวลาของการตายที่ผ่านมาแล้ว เช่น ในกรณีที่มีผู้พบศพถูกฆ่าตายทิ้งไว้ในที่แห่งหนึ่ง โดยไม่ทราบว่าผู้นั้นได้ถูกฆ่าตายมาตั้งแต่เมื่อใด การพิจารณาลักษณะของหยดเลือดหรือคราบเลือดประกอบกับสิ่งอื่น ๆ อาจจะทราบได้ว่าผู้นั้นได้ถูกฆ่าตายตั้งแต่เมื่อใด

• เลือดที่ไหลออกมาใหม่ ๆ จะมีลักษณะเหลวและมีสีแดงเข้ม

• ต่อมาจะเป็นลักษณะเหลวตรงกลาง ส่วนตามขอบของเลือดจะค่อย ๆ แห้ง และสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแก่ ต่อจากนั้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนสภาพแห้งหรือเป็นสะเก็ด สีน้ำตาลแก่หรือสีดำ

เลือดมีความสำคัญที่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคลและช่วยประมาณระยะเวลาการของคราบเลือดหรือประมาณระยะเวลาการเกิดเหตุได้ ในปัจจุบันการประมาณอายุของคราบเลือดนั้นมีการศึกษาอยู่น้อยรวมทั้งมีปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ลม แสงแดด ฝุ่น ฝน ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา พยาธิ และสัตว์อื่น ๆ ที่ทำให้การคาดคะเนหรือการเชื่อมโยงเหตุการณ์มีความคลาดเคลื่อนได้แต่ยังคงเป็นการศึกษาที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ตัวอย่างคดีที่พิสูจน์ได้จากคราบเลือด

จากที่เมื่อวันที่ 15 มี.ค.2560 ที่ผ่านมา กองปราบเข้าค้นห้องพักผู้ก่อเหตุใช้ไขควงแทงศีรษะนักศึกษามหาวิทยาลัยศิลปากรเสียชีวิต เพื่อติดตามหาหลักฐานในคดีโดยเฉพาะคราบเลือดกางเกงของนายไบร์ท ผู้ก่อเหตุใช้ไขควงแทงศีรษะ นายธีระพงษ์ นักศึกษามหาวิทยาลัยศิลปากร เสียชีวิต ผลชันสูตรศพ “น้องแก้ม” ไม่พบอสุจิของ ผู้ต้องหาในร่างกายแต่พบสารคัดหลั่งของคนร้ายในอวัยวะเพศกับผลตรวจเลือดที่เปื้อนติดกางเกงในบ็อกเซอร์ของไอ้เกมพบเป็นดีเอ็นเอของเหยื่อ รวมทั้งผลตรวจเนื้อเยื่อที่ติดในซอกเล็บของผู้ตายพบเป็นของไอ้เกมแต่ไม่พบของบุคคลอื่น

การวิจัยโดยส่วนใหญ่เป็นการประมาณระยะเวลาการเสียชีวิตที่ตรวจพบจากศพ การ ประมาณ ระยะเวลา การ เสีย ชีวิต ของ ศพ จาก การ เปลี่ยนแปลง สัณฐาน วิทยา ของ เซลล์ เม็ดเลือดขาว(เพชร)

การวิจัยที่อาศัยการตรวจวิเคราะห์ด้วยเลือดยังมีอยู่น้อย การตรวจหาอายุคราบเลือดซึ่งขึ้นกับความเข้มของสัญญาณเมทฮีโมโกลบิน(คณะ) การประมาณคราบเลือดด้วยหนอนแมลง (Nuorteva, 1974) การศึกษางานวิจัยนี้มีแนวคิดมาจากการตรวจวินิจฉัยด้านจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญต่อการวินิจฉัย ตามปกติแล้วตามธรรมชาติจะมีเชื้อจุลชีพอาศัยอยู่วัตถุทุกสิ่งไม่เว้นแม้แต่บนผิวหนังของมนุษย์ แต่ในสภาวะปกติของมนุษย์นั้นเมื่อได้สัมผัสเชื้อจุลชีพจะไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ แต่หากร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำหรือภูมิคุ้มกันบกพร่องจึงก่อให้เกิดภาวการณ์ติดเชื้อได้ร่างกายของคนเรามีกลไกหรือกรรมวิธีที่จะป้องกัน กำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการนั้น ๆ แต่ในการศึกษานี้กำหนดตัวแทนจุลชีพเป็นแบคทีเรียบนผิวหนังมนุษย์ดังนั้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีอยู่ในเลือดจะกระตุ้นเม็ดเลือดขาวออกมาทำลายเชื้อจุลชีพดังกล่าว เมื่อเชื้อจุลชีพได้สัมผัสกับคราบเลือดที่มีเม็ดเลือดขาวและคอมพลีเมนท์อยู่ จึงมีปฏิกิริยาการทำลายเชื้อจุลชีพนี้ได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าวัตถุสถานที่ต่างๆหลังจากสัมผัสคราบเลือดจำนวนจุลชีพน่าจะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เปลี่ยนไปของคราบเลือดด้วย หากรู้ปริมาณเชื้อจุลชีพที่นับได้ในระยะเวลาที่ต่างกันจึงอาจทำให้สามารถทราบถึงอายุของคราบเลือดจากการนับจำนวนเชื้อที่เกิดขึ้นได้และสามารถพิสูจน์ได้ว่าคราบเลือดนั้นอยู่ในที่เกิดเหตุเป็นระยะเวลาเท่าใด อาจทำให้สามารถประมาณระยะเวลาของการเกิดเหตุในสถานที่เกิดเหตุได้ ดังนั้นอาจเป็นวิธีการที่นำมาคาดคะเนอายุของคราบเลือดได้อีกทางหนึ่งและสามารถนำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้ทางนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคตต่อไป

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์กับอายุของคราบเลือด และผลกระทบของเชื้อแบคทีเรียธรรมชาติที่อยู่บนผิวหนังของมนุษย์เมื่อได้สัมผัสคราบเลือดในระยะเวลาที่แตกต่าง

สมมติฐานของการศึกษา

อายุคราบเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์

ขอบเขตของการศึกษา

1)เก็บตัวอย่างจุลชีพจากผิวหนังบริเวณหลังมือของอาสาสมัคร 1 คน
2) เก็บตัวอย่างเลือดมนุษย์จากอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่เป็นโรคเกี่ยวกับเลือดและโรคติดต่อ 1 คน
3) การเก็บตัวอย่างเลือดต้องให้เลือดไหลออกมาปกติ ห้ามบีบหรือเค้นกล้ามเนื้อเพื่อให้เลือดออก

4) อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาคราบเลือดในระยะเวลาต่างๆเป็นอุณหภูมิห้องประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส

5) เลือดที่ใช้ในการศึกษาเป็นเลือดที่ไม่ได้รับสารต้านปฏิชีวนะใดก่อนการทดลอง

6) เลือดที่ใช้ในการศึกษาเป็นเลือดที่มีปริมาตรที่แน่นอนคือ 30 มิลลิลิตร

7) เก็บตัวอย่างคราบเลือดในระยะเวลาที่1, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

8) ตัวอย่างพื้นผิวสัมผัสคือพื้นห้อง (ปูกระเบื้อง)

9) การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบทดลอง

ข้อจำกัดของการวิจัย

1) การวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละครั้งใช้ระยะเวลานานดังนั้นในแต่ละวันจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในปริมาณที่มาก

2) เนื่องจากต้องเก็บตัวอย่างหลายครั้งอย่างต่อเนื่อง จึงต้องควบคุมปัจจัยแวดล้อมให้คงที่ใกล้เคียงกัน

3) การอ่านผลทดสอบจำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความรู้ประสบการณ์ผ่านการรับรองหรือทดสอบความชำนาญจากหน่วยงานรับรองที่น่าเชื่อถือเพื่อผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ

4) ปริมาณตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นจำสามารถเพิ่มความเชื่อมั่นทางสถิติในผลการทดสอบได้ แต่จะส่งผลให้งบประมาณในการวิจัยเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

คำจำกัดความที่ใช้ในการศึกษา

3MTM Petri film TM	แผ่นเพาะเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปชนิดผงแห้งที่เคลือบบนแผ่นฟิล์ม
Cotton swab	ไม้พันสำลี
Blood stain	คราบเลือด
TBC	วิธีตรวจนับจุลินทรีย์มาตรฐาน
Pseudomonas	เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อได้หลายประเภท
Butterfield’s Phosphate	บัฟเฟอร์สำหรับการทำเจือจางตัวอย่าง

กรอบแนวคิดของการวิจัย

เมื่อเชื้อจุลชีพได้สัมผัสกับคราบเลือดที่มีเม็ดเลือดขาวและคอมพลีเมนท์อยู่ จะทำปฏิกิริยาการทำลายเชื้อจุลชีพนี้ได้ ดังนั้นวัตถุหลังจากสัมผัสคราบเลือดน่าจะมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เปลี่ยนไปของคราบเลือดด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงข้อการประมาณอายุของคราบเลือดเพื่อเป็นประโยชน์ในการสืบสวนคดีอาชญากรรม
2) ได้ข้อมูลพื้นฐานในการประมาณอายุของคราบเลือดโดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนของจุลชีพ
3) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประมาณอายุของคราบเลือดโดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนของจุลชีพ
4) เพื่อใช้พัฒนางานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ในด้านการตรวจสอบคราบเลือดและทางชีววิทยา
5) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยประมาณอายุของคราบเลือดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพชนิดอื่นหรือใช้เทคนิคอื่น

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุคราบเลือดกับปริมาณเชื้อจุลชีพที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยในปีต่างๆดังนี้

Martina Tesarova and others (2011: 136) ได้ทำการศึกษาเรื่อง Optimization of growth condition Escherichia coli culture by method Design of experiments to produce optimal amount of studied genetically insert protein หรือการศึกสภาวะการเจริญเติบโตของเชื้อ Escherichia coli culture โดยวิธีการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆเช่นอุณหภูมิ, เวลาและความเร็วรอบการปั่น ให้ได้ปริมาณโปรตีนทางพันธุกรรมที่ดีที่สุดซึ่งอุณหภูมิที่ดีคือ36 องศาเซลเซียสเวลา7.5 ชั่วโมงและความเร็วรอบการปั่นคือ 150 RPM ได้จำนวนเชื้อ 215.36 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นโมเดลข้อมูลที่มีความเหมาะสม

Anderson and others (2005:37-45) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง A method for determining the age of a blood stain หรือการทำ reverse transcriptase real time PCR แสดงการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง mRNA และ rRNA เพื่อประมาณอายุของคราบเลือดแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่าง RNA ชนิดต่างๆ (mRNA กับ RRNA) เปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลาในแบบเส้นตรงเมื่อถูกตรวจสอบในช่วง 150 วันและยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้

Qinfang Qian and other (2001: 3578–3582) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง Direct Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures by Amplification and Sequencing of the 16S rRNA Gene: Evaluation of BACTEC 9240 Instrument True- Positive and False-Positive Resultsหรือการแยกแบคทีเรียแกรมบวกโดยวิธีการทำ DNA Sequencing เพื่อหาลำดับของยีน16S rRNA เพื่อการประเมินผลของแบคทีเรียลำดับ BACTEC 9240 ว่าได้ผลแกรมบวกที่เป็นจริงหรือเท็จ

Behera B and other (2010: 138-42) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง Blood culture gram stain, acridine orange stain and direct sensitivity-based antimicrobial therapy of bloodstream infection in patients with trauma หรือการศึกษาการความไวของเชื้อจากเลือดที่ได้จากแผลของผู้ป่วยที่มีการย้อมสี acridine กับยาที่ใช้รักษาผลไม่มีความแตกต่างมากในการศึกษานี้ พบอัตราการผิดพลาดเล็กน้อย 5.2 และ 1.8% ในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ ความแตกต่างส่วนใหญ่ในแบคทีเรียแกรมลบพบในยา beta lactam - beta lactamase inhibitor การทดสอบความไวไม่สามารถต่อต้านเชื้อ Staphylococci ในยา methicillin และ vancomycin ได้

Inoue and others (1992:17-27) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography หรือการประมาณอายุคราบเลือดด้วยวิธี HPLC โดยใช้การตรวจวัดปริมาณ Heme ในเม็ดเลือดแดง โดยพบว่าเมื่ออายุเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นทำให้มี Heme ที่ได้จากการตรวจวัดมีปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น

Strasser and others (2007: 8-14) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง Age determination of blood spots in forensic by force spectroscopy หรือการประมาณอายุของหยดเลือดโดยใช้เทคนิค force spectroscopy ซึ่งเป็น Atomic force microscopy (AFM) ที่มีความสามารถในการส่องภาพเข้าไปในผิวของเม็ดเลือดแดงเพื่อทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นของผิวเม็ดเลือดแดงเมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป ผลที่ได้มีหน่วยวัดเป็น nanometer scale แล้วนำผลที่ได้มา plot เป็น calibration curve เพื่อประมาณอายุของคราบเลือด

Bremmer and others (2011:166-171) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy หรือการประมาณอายุของคราบเลือดโดยศึกษาโครงสร้างของ hemoglobin ด้วยการใช้เทคนิคการสะท้อนแสงของเครื่อง Spectroscopy ซึ่งฉายแสงเข้าไปในคราบเลือด เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลโดยมีความแปรผันกับระยะเวลาของคราบเลือด

และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ complement ที่มีผลกระทบในทางลบกับแบคทีเรียได้มีการศึกษาวิจัยดังนี้

Loos and others (1987:203-208) ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่อง Antibody-independent killing of gram-negative bacteria via the classical pathway of complement โดยพบว่าระบบภูมิคุ้มกัน complement ชนิด C1q และ C1 สามารถจับกับแบคทีเรียชนิดแกรมลบ (gram negative bacilli) ในส่วนของผิวชั้นนอกซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่เรียกว่า lipopolysaccharides และ porins ได้อย่างอิสระเมื่อมีการจับกันของ antibody ชนิด C1q และ C1 ต่อผิวชั้นนอกของแบคทีเรียจะเข้าสู่กระบวนการทำลายเชื้อผ่านทาง classical pathway และเชื้อแบคทีเรียจึงตายในที่สุด

กระบวนการยุติธรรมของประเทศไทยมีการปรับเปลี่ยนจากการเน้นความสำคัญของประจักษ์พยานมาสู่ระบบพิสูจน์การกระทำความผิดโดยการรับฟังพยานหลักฐานทางด้านวิทยาศาสตร์ มีการนำหลักนิติวิทยาศาสตร์มาใช้ควบคู่กับกระบวนการยุติธรรมซึ่งเป็นมาตรการในการป้องกันและปราบปรามการก่ออาชญากรรมทางหนึ่ง (พัชรา สินลอยมา, 2558) ซึ่งใช้หลักนิติวิทยาศาสตร์ 2 ประเภท (1) นิติวิทยาศาสตร์ที่เป็นวิทยาศาสตร์ธรรมชาติเช่น วิชาพิสูจน์หลักฐานรวมถึงการตรวจสถานที่เกิดเหตุและเก็บรวบรวมวัตถุพยานในสถานที่เกิดเหตุ และ (2) นิติวิทยาศาสตร์ที่เป็นวิทยาศาสตร์ประยุกต์โดยการนำความรู้ทางวิทยาศาสตร์ในสาขาต่าง ๆ มา

ประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการยุติธรรม โดยขณะเดียวกันนิติวิทยาศาสตร์ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานสืบสวนสอบสวนเช่น การตรวจสถานที่เกิดเหตุและการถ่ายรูป การตรวจลายนิ้วมือฝ่ามือฝ่าเท้า การตรวจเอกสาร การตรวจทางฟิสิกส์เช่น ตรวจร่องรอยการเฉี่ยวชนรถ การตรวจทางนิติเวชเช่น งานนิติพยาธิ งานนิติวิทยา งานชีวเคมีและการตรวจทางชีววิทยา เช่น ตรวจเส้นผม เลือด อสุจิ และตรวจรหัสพันธุกรรม (DNA)

การพิจารณาคดีอาญาในกระบวนการยุติธรรมของประเทศไทยมีข้อที่ต้องวินิจฉัยชี้ขาดอยู่สองประการได้แก่ ข้อกฎหมายและข้อเท็จจริง หลักในการวินิจฉัยจะต้องพิจารณาค้นคว้าหาข้อเท็จจริงหรือความสัตย์จริงในคดีว่าเป็นอย่างไรแล้วจึงยกข้อกฎหมายขึ้นปรับวินิจฉัยว่าจำเลยควรจะได้รับโทษหรือควรจะได้รับการปล่อยตัวไป ตามกฎหมายลักษณะพยานข้อเท็จจริงที่ศาลจะรับรู้ได้เองจำกัดอยู่เพียงข้อเท็จจริงที่เป็นไปตามธรรมดาธรรมชาติซึ่งบุคคลธรรมดาจะพึงรู้ได้เอง ส่วนข้อเท็จจริงอย่างอื่นที่อยู่นอก เหนือไปจากความรู้ของบุคคลธรรมดาศาลรับรู้เองไม่ได้ ฉะนั้นฝ่ายผู้กล่าวหาจะต้องพิสูจน์ให้ประจักษ์แก่ศาลว่าผู้ต้องหาได้กระทำการที่อ้างว่าเป็นความผิดนั้นจริง (สราวุธ เบญจกุล, 2550) โดยพยานหลักฐานที่เกี่ยวกับข้อเท็จจริงในคดี (relevant evidence) หมายความถึง พยานที่มีแนวโน้มที่จะทำให้ความมีอยู่ของข้อเท็จจริงใดโดยผลจากการวินิจฉัยมีความเป็นไปได้มากกว่าหรือน้อยกว่าการไม่มีพยานหลักฐานกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ พยานหลักฐานที่เกี่ยวกับข้อเท็จจริงในคดีเกี่ยวข้องกับพยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในสาขาต่าง ๆ ที่มีคุณค่าในการพิสูจน์ความจริงที่เกิดขึ้น สามารถยืนยันข้อเท็จจริงได้ ซึ่งสิ่งต่าง ๆ ที่จะนำ ไปใช้เป็นพยานหลักฐานในคดีจำต้องมีคุณค่าในตัวเอง (Rosenberg & Donald, 1995)

พยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ เป็นพยานหลักฐานที่เกิดขึ้นด้วยการวิเคราะห์ หรือวิจัย ซึ่งในทางกฎหมาย ถือว่า พยานหลักฐานเหล่านี้เป็นพยานหลักฐานอย่างหนึ่งที่จะนำเข้าสู่กระบวนการพิจารณาหรือจะนำเข้าสู่ความรู้ของศาลเพื่อให้ศาลวินิจฉัยว่าจำเลยมีความผิดหรือไม่ โดยกำหนดวิธีการนำสืบไว้ คือ หากคู่ความประสงค์จะอ้างหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์เข้าสู่สำนวนเพื่อนำสืบข้อเท็จจริง ให้นำสืบโดยผู้เชี่ยวชาญซึ่งได้ทำการตรวจ ได้วิเคราะห์หรือได้วิจัยสังเกตเหตุการณ์หรือสิ่งของต่างๆที่เกี่ยวข้องกับในคดีนั้นมาแล้ว ฉะนั้น จึงกล่าวได้ว่าพยานหลักฐานทางวิทยาศาสตร์นี้ก็คือพยานความเห็นของผู้เชี่ยวชาญตามกฎหมายนั่นเอง ที่ผ่านมามีการนำหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์มาช่วยคลี่คลายคดีต่างๆ ที่มีความสำคัญ และมีความยุ่งยากสลับซับซ้อนทั้งที่เกิดขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศมาแล้วหลายคดี ในประเทศสหรัฐอเมริกาคดีที่มีการนำหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์มาช่วยในการคลี่คลายคดี ได้แก่ คดีลอบสังหารประธานาธิบดีเคนนาดี้ พฤศจิกายน ค.ศ.1963, คดีโอ เจ ซิมป์สัน ฆาตกรรมภรรยาและเพื่อนมิถุนายน ค.ศ.1994 และคดีฆาตกรรมไร้ศพ เหตุเกิดที่รัฐฟลอริดา เป็นต้น สำหรับในประเทศ

อังกฤษคดีสำคัญที่มีการนำหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์มาช่วยในการคลี่คลายคดี คือ คดีฆาตกรรมอำพรางที่ฟาร์มวิดเดนฮิลล์ หมู่บ้านฮอตัน ในปี ค.ศ.1984

ในประเทศไทยคดีที่สำคัญ และมีความสลับซับซ้อนซึ่งคลี่คลายลงได้โดยอาศัยหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ ได้แก่ คดีฆาตกรรม น.ส.ดอริส ฟอน ฮาเฟน นางแบบสาวชาวเดนมาร์ก เมื่อ 24 มกราคม พ.ศ. 2511, คดีฆาตกรรมนางศยามล พ.ศ. 2536, คดีฆาตกรรมนายแสงชัย สุนทรวัฒน์ พ.ศ. 2539, คดีฆาตกรรม น.ส.เจนจิรา พลอยองุ่นศรี นักศึกษาแพทย์ปี 5 พ.ศ. 2541 และคดีล่าสุดที่ได้รับความสนใจจากประชาชน คือ คดีฆาตกรรมแพทย์หญิงผัสพร บุญเกษมสันติ โดยศาลฎีกาพิพากษาประหารชีวิตนายแพทย์วิสุทธิ์ บุญเกษมสันติ (สามี) คดีนี้ถึงแม้ว่าจะไม่พบศพของผู้เสียชีวิต แต่ผลการพิสูจน์ DNA ประกอบกับพยานแวดล้อมต่างๆ จึง เชื่อได้ว่า แพทย์หญิงผัสพรฯ เสียชีวิตแล้ว

โดยสรุปแล้ว ถือได้ว่านิติวิทยาศาสตร์นี้เป็นการประยุกต์ใช้ความรู้ทางวิชาการทางด้านต่างๆ ผนวกเข้ากับการบังคับใช้ทางกฎหมาย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อกระบวนการยุติธรรม ให้สามารถอำนวยความยุติธรรมให้กับผู้เสียหาย และผู้ต้องหาได้เป็นอย่างดี ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ประเทศไทยจะต้องส่งเสริมให้มีการพัฒนา ทางด้านการตรวจวิเคราะห์ต่างๆดังกล่าวข้างต้น รวมถึงการนำเอานิติวิทยาศาสตร์นี้มาส่งเสริมกระบวนการยุติธรรมของประเทศไทยให้ทัดเทียมกับอารยประเทศ ซึ่งจะส่งผลอย่างดียิ่งต่อประชาชนคนไทยในท้ายที่สุด

หากจะนึกถึงคดีความที่เป็นปัญหาอาชญากรรมที่เจ้าหน้าที่ตำรวจต้องรับเรื่องร้องเรียนบ่อยๆ ได้แก่ คดีลักทรัพย์ ทำร้ายร่างกาย ฆาตกรรม บุคคลผู้มีหน้าที่สำคัญในการให้ความเป็นธรรมกับผู้เสียหาย คือ เจ้าหน้าที่ฝ่ายพิสูจน์หลักฐาน (crime scene investigator) ซึ่งมีหน้าที่ตรวจสถานที่เกิดเหตุเพื่อค้นหาวัตถุพยานอันเป็นเบาะแสที่สามารถทำให้กระบวนการสืบสวนสอบสวน สามารถชี้ถึงตัวผู้ลงมือกระทำความผิดได้ วัตถุพยานที่อาจตรวจพบได้แก่ ลายนิ้วมือ ลายฝ่าเท้า ลายพื้นรองเท้า รอยฟัน ดีเอ็นเอ สารคัดหลั่ง ร่องรอยการงัดแงะ สี หรืออาวุธที่ใช้ก่อเหตุ เป็นต้น วัตถุพยานที่สามารถระบุถึงตัวผู้กระทำผิดได้ถูกต้องและยอมรับกันเป็นสากล คือ วัตถุพยานทางชีววิทยา เช่น ลายนิ้วมือ (fingerprint) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งจัดเป็นวัตถุพยานทางชีววิทยาที่มนุษย์ทุกคนมีตั้งแต่กำเนิดและมีเอกลักษณ์เฉพาะบุคคลไม่ซ้ำกันวัตถุพยาน คือ หลักฐานในการติดตามตัวผู้กระทำความผิดที่น่าเชื่อถือได้นอกเหนือไปจากประจักษ์พยาน(พยานบุคคล) ที่รู้เห็นการกระทำความผิด พบได้ในสถานที่เกิดเหตุ ตัวผู้เสียหายหรือตัวผู้กระทำความผิด อาจเป็นอะไรก็ได้ เช่น คราบเลือด รอยฟกช้ำ ปลอกกระสุนปืน เป็นต้น

ประเภทของวัตถุพยาน

วัตถุพยานแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1 วัตถุพยานทางกายภาพ (physical evidence) เป็นวัตถุพยานที่ได้จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น อาวุธ เขม่าดินปืน สี ร่องรอยการงัดแงะ เป็นต้น

2 วัตถุพยานทางชีววิทยา (biological evidence) เป็นวัตถุพยานที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตหรือเป็นส่วนของสิ่งมีชีวิตมาก่อน เช่น คราบเลือด คราบอสุจิ เส้นผม ฟัน น้ำลาย ปัสสาวะ อุจจาระ เนื้อเยื่อ ลายนิ้วมือ เป็นต้น

จากวัตถุพยานทั้ง 2 ประเภทข้างต้นในทางการสืบสวนคดีอาญาถือว่าวัตถุพยานทางชีววิทยาเป็นวัตถุพยานเพียงประเภทเดียวที่สามารถแสดงความสัมพันธ์โดยตรงขณะที่เกิดเหตุการณ์ขึ้นระหว่างผู้กระทำความผิดกับผู้เสียหายได้ ดังนั้นการเก็บและนำส่งวัตถุพยานประเภทนี้เพื่อนำไปตรวจสอบนั้นต้องมีความระมัดระวังและปฏิบัติอย่างถูกต้อง ตามแนวทางที่เรียกว่า “ลูกโซ่แห่งการเก็บรักษาตัวอย่าง” (chain of custody procedures) หมายถึง การจัดการ การเก็บ การขนส่ง และการส่งมอบวัตถุพยานที่ทุกขั้นตอนสามารถตรวจสอบได้ตลอดเวลา เช่น วิธีการเก็บ รายละเอียดวัตถุพยาน วันเดือนปีที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ ชื่อผู้ส่งมอบ ชื่อผู้รับมอบ เป็นต้น หากเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบปฏิบัติตามแนวทางดังกล่าว วัตถุพยานทางชีววิทยาที่พบจะเป็นประโยชน์ต่อแนวทางสืบสวนหาผู้กระทำผิดหรือการพิสูจน์ความผิดของผู้ต้องหาได้เป็นอย่างมากเมื่อได้วัตถุพยานทางชีววิทยามาแล้ว ขั้นต่อไปคือการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

1. เลือดและคราบเลือด สิ่งที่ต้องตรวจเป็นอันดับแรกคือ เป็นเลือดใช่หรือไม่ถ้าใช่เป็นของมนุษย์หรือสัตว์โดยใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี้ของเลือดมนุษย์ เมื่อทราบว่าเป็นเลือดของมนุษย์แล้ว เลือดและคราบเลือดที่พบนั้นเป็นเลือดหมู่ใด และเป็นของใคร ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบได้แก่ เพศ อายุ ดีเอ็นเอของเจ้าของเลือดนั้น

2. คราบอสุจิ เป็นวัตถุพยานทางชีววิทยาที่ต้องตรวจในคดีข่มขืนกระทำชำเรา ทั้งนี้สามารถเก็บได้โดยตรงจากร่างกายของผู้เสียหายหรือผู้ตาย อาจได้จากบนเสื้อผ้า ตามร่างกาย ช่องคลอด เป็นต้น สิ่งที่ต้องตรวจเป็นอันดับแรกคือ เป็นคราบอสุจิหรือไม่ โดยการตรวจหาตัวอสุจิหรือเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase), PSA (prostatic specific antigen) ซึ่งจะพบในเพศชายเท่านั้น ถ้าเป็นคราบอสุจิแล้ว คราบที่พบนั้นเป็นของมนุษย์หรือไม่ โดยลักษณะของตัวอสุจิของมนุษย์และสัตว์จะแตกต่างกัน ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาโดยใช้ anti-human seminal fluid antibody ที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำอสุจิของมนุษย์ (human seminal fluid)

ก่อให้เกิดการตกตะกอนขึ้น หลังจากทราบว่าเป็นคราบอสุจิของมนุษย์ ต้องพิสูจน์ให้ได้ว่าเป็นของบุคคลใด โดยการตรวจหาหมู่เลือด หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากส่วนนิวเคลียสของตัวอสุจิ

3. เซลล์เยื่อบุช่องคลอด ตรวจสอบที่อวัยวะเพศชาย บริเวณ coronal sulsus ซึ่งจะมีเซลล์เยื่อบุช่องคลอดติดอยู่ หากตรวจสอบพบแสดงว่าได้ผ่านการร่วมเพศมา ต่อมาต้องนำเซลล์ที่ต้องสงสัยว่าเป็นเซลล์เยื่อบุช่องคลอดนั้นไปตรวจในห้องปฏิบัติการอีกครั้งโดยการตรวจหาไกลโคเจนในส่วนที่เป็นไซโทพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ซึ่งเนื้อเยื่อบริเวณอื่นนั้นจะไม่พบไกลโคเจนเลย โดยใช้น้ำยาตรวจสอบคือ Lugol' s solution ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับไกลโคเจนของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเป็นสีน้ำตาล วิธีนี้มีความจำเพาะสูงกับเซลล์เยื่อบุช่องคลอดมาก

4. เส้นผมและเส้นขน จัดเป็นวัตถุพยานที่มีความคงทนพอสมควร ไม่เสียหายง่ายเหมือนวัตถุพยานทางชีววิทยาอื่นๆ และยังสามารถตรวจสอบถึงการสะสมสารเคมี สารพิษ และการใช้ยาเสพติดได้ การตรวจสอบที่ต้องปฏิบัติคือ วัตถุพยานที่พบนั้นเป็นเส้นผมและเส้นขนหรือไม่ ถ้าใช่เส้นผมหรือเส้นขนนั้นเป็นของมนุษย์หรือสัตว์ ถ้าเป็นของมนุษย์เส้นผมหรือเส้นขนนั้นเป็นของใคร ข้อมูลที่เส้นผมและเส้นขนบอกได้คือ เพศของเจ้าของโดยการตรวจโครโมโซมจากส่วนรากผม อายุของเจ้าของโดยการตรวจดูสี ลักษณะเส้น และหมู่เลือด

5. น้ำลาย อาจพบเป็นลักษณะคราบบนแก้วน้ำ บุหรี่ หรือบนตัวผู้เสียหาย ซึ่งคราบที่ได้มานั้นต้องมาตรวจสอบว่าเป็นน้ำลายใช่หรือไม่ โดยการตรวจหาเอนไซม์อะไมเลส หรือเซลล์เยื่อบุช่องปาก ถ้าเป็นคราบน้ำลายแล้ว คราบนั้นเป็นน้ำลายของมนุษย์ใช่หรือไม่ โดยใช้วิธีตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาแบบเดียวกันกับการตรวจเลือดและคราบเลือด จากนั้นตรวจสอบว่าคราบน้ำลายนั้นเหมือนกับตัวอย่างที่เก็บมาจากผู้ต้องสงสัยหรือไม่ โดยการตรวจหาหมู่เลือด ซึ่งเป็นการตรวจแอนติเจนในน้ำลาย (ABO Antigen)

6. อุจจาระและปัสสาวะ เป็นวัตถุพยานทางชีววิทยาที่พบได้น้อยมาก ส่วนมากคนร้ายที่ทิ้งหลักฐานนี้มักถือโชคลาง โดยถ่ายทิ้งไว้ ซึ่งหากเป็นอุจจาระก็สามารถตรวจหาเซลล์เยื่อบุลำไส้ใหญ่ที่ปะปนมากับอุจจาระได้หรือบางทีพบไข่พยาธิที่เชื่อมโยงกับคนร้ายและสามารถใช้เป็นหลักฐานสำคัญได้

จากวัตถุพยานทางชีววิทยาทั้ง 6 ชนิดข้างต้นพบว่าเป็นสิ่งที่มนุษย์มีมาตั้งแต่กำเนิด และเป็นสิ่งที่ถูกสร้างในร่างกายของมนุษย์ซึ่งเราสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการยุติธรรมได้เป็นอย่างดี (Biology (2556). วัตถุพยานทางชีววิทยา. (Online: http://biology.ipst.ac.th/?p=102)

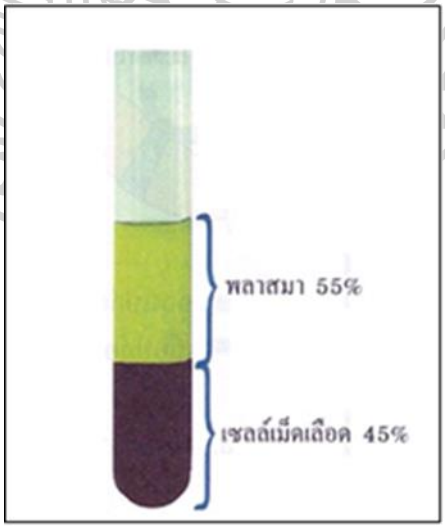
ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ การตรวจสอบรอยเลือดจะเป็นตัวแทนที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสิ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างการสืบสวนสอบสวนในสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งจากข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับเลือดที่เราพบในที่เกิดเหตุ เราสามามารถนำมาเปรียบเทียบกับพยานหลักฐานต่างๆใน

ที่เกิดเหตุรวมทั้งคำให้การของพยาน ผู้เสียหาย หรือผู้ต้องสงสัย โดยทั่วไปวัตถุพยานที่เป็นเลือดสามารถที่จะเชื่อมโยงผู้เสียหายกับสถานที่เกิดเหตุ เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับสถานที่เกิดเหตุ

เชื่อมโยงผู้ต้องสงสัยกับผู้เสียหาย นอกจากนั้นยังสามารถช่วยในการคัดกรองผู้ต้องสงสัยหรือแยกผู้บริสุทธิ์ออกจากข้อกล่าวหา ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งโดยเฉพาะกรณีที่มีผู้ต้องสงสัยเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการตรวจคราบเลือดจึงจำเป็นต้องได้ข้อมูลต่างๆที่เกี่ยวกับคราบเลือดเพื่อประกอบในการแปรผล ไม่ว่าจะเป็นลักษณะการกระจายของคราบเลือด ตำแหน่งที่พบคราบเลือดและปริมาณคราบเลือด ที่ต้องนำมาเปรียบเทียบกับพยานหลักฐานต่างๆในที่เกิดเหตุ เพื่อจะใช้บ่งบอกพฤติกรรมที่คาดคะเนไว้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

เลือดและส่วนประกอบของเลือด (Blood components)

เลือดที่ไหลเวียนในกระแสโลหิตของร่างกายอาจเปรียบเสมือนขบวนรถไฟสินค้า ขนส่งสินค้าที่จำเป็นในการดำรงชีวิตไปสู่สถานีต่างๆ ภายในกระแสโลหิตมีทั้งเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด มีก๊าซ เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ เกลือแร่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้แล้ว ยังมีสารจำพวกฮอร์โมน วิตามิน เอนไซม์ และแอนติบอดี ซึ่งทั้งหมดนี้ รวมตัวกันอยู่ในน้ำ ผู้โดยสารรถไฟขบวนพิเศษนี้ ได้อาศัยการไหลเวียนของเลือดภายในร่างกาย เดินทางไปสู่จุดหมายที่ต้องการ เช่น มีการลำเลียงน้ำตาลกลูโคสจากที่เก็บไว้ในตับไปยังกล้ามเนื้อ เพื่อนำไปเป็นเชื้อเพลิง ทำให้เกิดการเผาผลาญเปลี่ยนเป็นพลังงาน ส่วนอื่นๆ เช่น เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด ต่างก็มีหน้าที่พิเศษเฉพาะตัว



ภาพที่ 1องค์ประกอบของเลือด

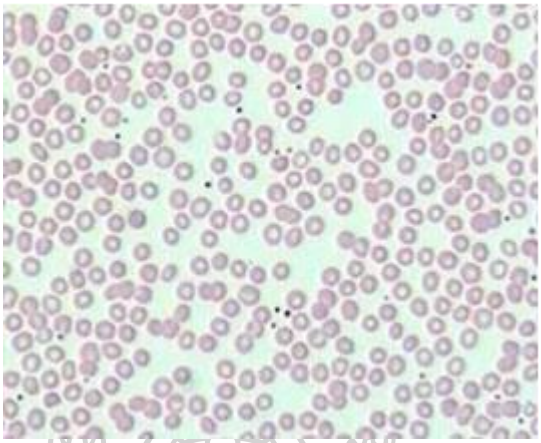
ที่มา: https://sites.google.com/site/bodybalanceu/xngkh-prakxb-khxng-leuxd

เม็ดเลือดแดง (Red blood cells) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ ๗-๘ ไมโครเมตร รูปร่างเหมือนจานแต่บุ๋มตรงกลางทั้งสองข้าง มีอยู่ทั้งหมดประมาณร้อยละ ๔๐-๕๐ ของปริมาตรเลือดทั้งหมดของร่างกาย หรือปริมาณ ๔ - ๕ ล้านเซลล์ ต่อเลือดหนึ่งมิลลิลิตร มีอายุในกระแสโลหิตได้นาน ประมาณ ๑๒๐ วัน โดยทั่วไปในวันหนึ่งๆ มีการสร้างเม็ดเลือดออกมาใหม่ประมาณร้อยละ ๙ ของจำนวนทั้งหมดที่มีอยู่ในร่างกายโครงสร้างของเม็ดเลือดแดงประกอบด้วยสารไลโปโปรตีน (โปรตีนและไขมัน) และมีสารโปรตีนที่จับกับเหล็กที่เรียกว่า เฮโมโกลบิน ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการจับนำเอาออกซิเจนจากปอดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ ของร่างกายทางเส้นเลือดแดง และนำคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นของเสียจากเนื้อเยื่อ และอวัยวะต่างๆ กลับไปยังปอด เพื่อถ่ายทอดออกทิ้งไปทางเส้นเลือดดำ ในคนปกติ ผู้ชายจะมีเฮโมโกลบินประมาณ ๑๔-๑๘ กรัม ในเลือด ๑๐๐ มิลลิลิตร ผู้หญิงจะมีเฮโมโกลบินประมาณ ๑๒-๑๖ กรัมในเลือด ๑๐๐ มิลลิลิตร หน้าที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเฮโมโกลบิน คือ รักษาดุลความเป็นกรดด่างของเลือดให้อยู่ในเกณฑ์พอดี

ภาพที่ 2รูปร่างของ Red blood cell (biconcave)

ที่มา :

http://www.mt.mahidol.ac.th/elearning/BasicTechniquesInHematology/lessons/lesson%201/rbc/rbc.htm

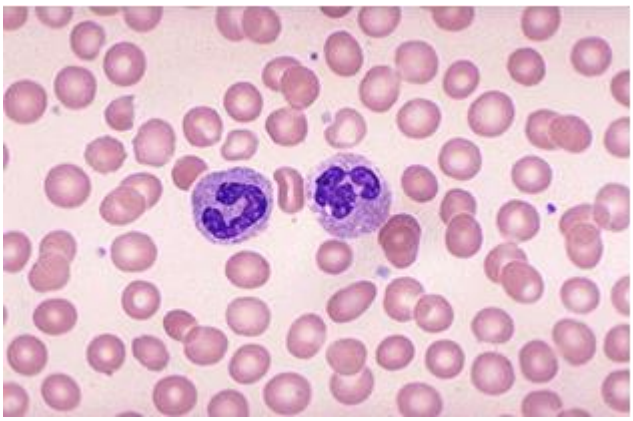


ภาพที่ 3รูปร่างของเม็ดเลือดแดงเมื่อย้อมสีไรท์

ที่มา :
http://www.mt.mahidol.ac.th/elearning/BasicTechniquesInHematology/lessons/lesson%201/rbc/rbc.htm

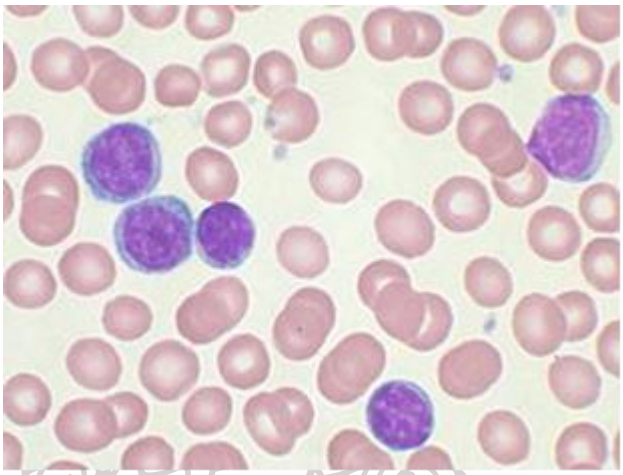
เม็ดเลือดขาว (White bolld cells) มีอยู่ประมาณ 5,000-10,000 เซลล์ในเลือด 1มิลลิลิตร ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาว 5 ชนิดต่างๆ กัน โดยอาศัยคุณลักษณะในการติดสีที่ใช้ย้อม และลักษณะของ นิวเคลียสเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ นิวโตรฟิล (neutrophil) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) โมโนไซต์ (monocyte) เบโซฟิล (basophil) และอีโอซิโนฟิล (eosinophil)

1.นิวโตรฟิล มีหน้าที่กำจัดบัคเตรี หรือสิ่งแปลกปลอมที่เป็นเม็ดเล็ก ๆ เมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์เข้าสู่ร่างกายจะถูกนิวโตรฟิลจับ (phagocytosis) เข้าไปในไซโตพลาสม์ (cytoplasm) ซึ่งมีแกรนนูลของนิวโตรฟิล คือ ไลโซโซมส์ (lysosomes) อยู่ ไลโซโซมส์เป็นถุง ซึ่งภายใน บรรจุน้ำย่อยจำพวกเหล่านี้ออกมาย่อยเชื้อจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมที่มีขนาดเล็กๆ เหล่านี้



ภาพที่ 4เม็ดเลือดขาว (Neutrophil)

2.ลิมโฟไซท์ แต่เดิมนั้นมีผู้คิดว่าลิมโฟไซท์ไม่มีหน้าที่ใดๆ เลย แต่ในปัจจุบันทราบดีว่า ลิมโฟไซท์มีหน้าที่สำคัญๆ หลายอย่างทั้งที่ทราบดีแล้วและที่ยังไม่ทราบแน่นอนก็มีอยู่มากเชื่อว่าลิมโฟไซท์อยู่ 2 จำพวก

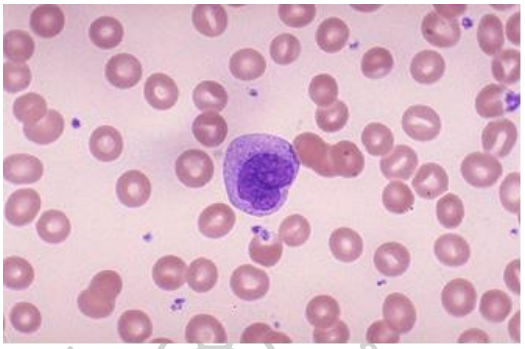


ภาพที่ 5เม็ดเลือดขาว (lymphocyte)

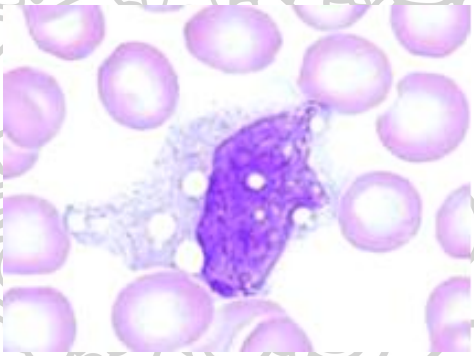
2.1พวกที่กำเนิดมาจากต่อมไธมัส ซึ่งเป็นแหล่งกลางของปฏิกิริยาทางดิมมูน เป็นตัวส่งลิมโฟไซท์ออกไปให้กำเนิดแก่ลิมโฟไซท์ในอวัยวะน้ำเหลืองอื่นๆ ลิมโฟไซท์ชนิดนี้มีความจำและจะทำลายสิ่งที่ไม่เหมือนตัวเอง

2.2พวกที่กำเนิดมาจากต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes และ lymphoid tissue) ของระบบทางเดินอาหาร ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีและควบคุมภาวะไวเกินจากภูมิคุ้มกันส่วนเซลล์ (cell mediated hypersensitivity responses.)

3.โมโนไซท์ มีหน้าที่ป้องกันร่างกายเช่นเดียวกับนิวโตรฟิล สามารถกินเชื้อจุลินทรีย์ เช่น บัคเตรี เชื้อรา ยีสต์ หรือแม้แต่เม็ดเลือดแดง โดยที่โมโนไซท์สามารถกินของใหญ่ๆ ได้ บางทีจึงเรียกกันว่า มัค โครเฟจ (macrophage) เทียบกับนิวโตรฟิล ซึ่งเรียกว่า ไมโครเฟจ (microphage) โมโนไซท์มีชีวิตในกระแสโลหิตที่หมุนเวียนเพียงระยะสั้นเท่านั้น ก่อนที่จะเคลื่อนย้ายเข้าสู่เนื้อเยื่อแล้วเปลี่ยนรูปร่างกลายเป็น ฮิสติโอไซท์ (Histliocyte)

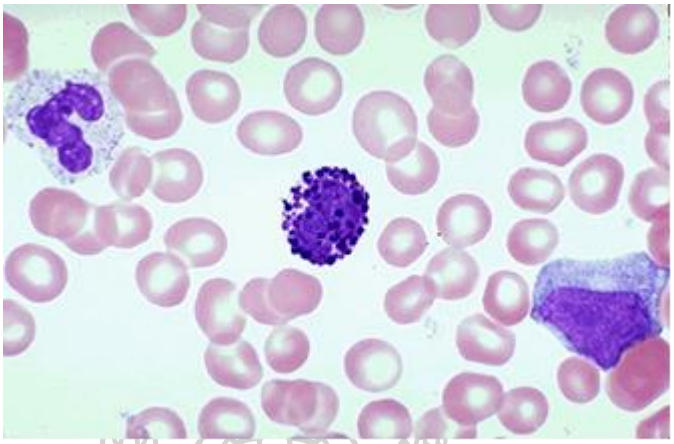


ภาพที่ 6เม็ดเลือดขาว (Monocyte)ที่ปกติภาพ



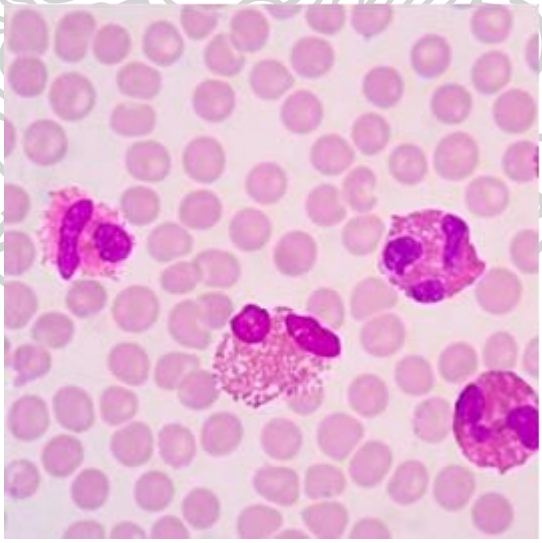
ภาพที่ 7 เม็ดเลือดขาว (Monocyte) ที่ผิดปกติ

4.เบโซฟิลหรือมาสท์เซลล์ (mast cell) ปัจจุบันเชื่อว่า มีบทบาทสำคัญยิ่งในปฏิกิริยาภูมิแพ้ (hypersensitivity) จากปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยไปทำให้เม็ดแกรนนูลของเบโซฟิลสลายตัวปล่อยสารฮิสตามีน ซึ่งเป็นสารที่ทำให้มีอาการแพ้ออกมาอาการที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกัน ไปตามลักษณะอวัยวะที่เกิด เช่น ถ้าเป็นที่ผิวหนัง ทำให้มีอาการคัน ถ้าเป็นที่หลอดลม ทำให้หลอดลมตีบ ทำให้มีอาการเป็นหืด หรือถ้าหากมีสารฮิสามีนจำนวนมากเข้าไปในกระแสโลหิต อาจทำให้เกิดอาการช็อค (anaphylactic shock) ได้ เช่น ในกรณีของการแพ้เพนิซิลลิน เป็นต้น



ภาพที่ 8เม็ดเลือดขาว(basophil)

5.อีโอซิโนฟิล เชื่อว่ามีหน้าที่เกี่ยวกับการขจัดฤทธิ์ของฮิสตามีน ในปัจจุบันยังไม่ทราบถึงธรรมชาติทางเคมี และกลไกในการออกฤทธิ์ที่แน่นอน



ภาพที่ 9เม็ดเลือดขาว (Eosinophil)

เกร็ดเลือด (Platelet)

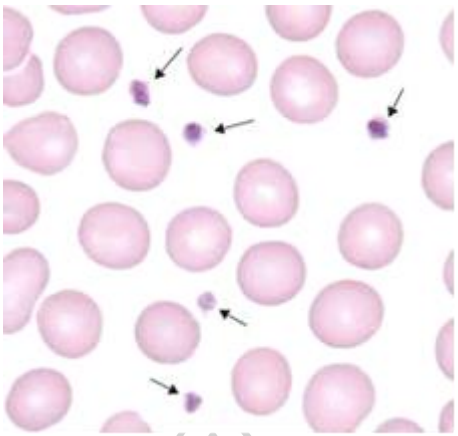
เชื่อว่ามีกำเนิดมาจากไซโตพลาสม์ของเมกาคาริโอไซต์ (megakaryocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ในไขกระดูก คือมีขนาดประมาณ 35-160 ไมโครเมตร ภายในไซโต- พลาสม์มีเม็ดแกรนนูล นอกจากนั้นแล้ว ไซโตพลาสม์ยังมี ขาเทียม (pseudopods) เล็กๆ ยื่นออกมาเป็น

จำนวนมาก และต่อมา จะหลุดออกมาเป็นเกล็ดเลือด มีจำนวนประมาณ 150,000 – 450,000 เซลล์ในจำนวนเลือดหนึ่งมิลลิลิตร มีชีวิตอยู่ใน กระแสโลหิตได้นานประมาณ 8-11 วัน มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ การห้ามเลือดโดยตรง โดยจะรวมตัวเป็นกระจุก (Platelet plug) อุดตรงบริเวณที่มีหลอดเลือดฉีกขาด นอกจากนี้แล้วยังมีบทบาท สำคัญในกลไกการแข็งตัวของเลือด โดยให้ปัจจัยในการแข็งตัว ของเลือด (platelet factors I, II, III และ IV) อีกด้วย หน้าที่อื่นที่นอกเหนือจากนี้คือ การนำสารต่างๆ ไปกับตัวเกล็ดเลือดด้วย คือ สารซีโรโทนิน (serotonin) สารแอดรีนาลิน (adrenalin) และนอร์แอดรีนาลิน (noradrenalin) และยังพบอีกว่า เกล็ดเลือด สามารถจับมวลสารขนาดเล็ก เช่น ไวรัส ได้ด้วย ดังนั้น เกล็ด เลือดจึงมีความสำคัญในการต่อต้านเชื้อโรคด้วย

พลาสมา (Plasma)

เป็นส่วนน้ำของเลือดที่ไม่แข็งตัว หมายถึงเลือดที่ ไม่มีสารที่เป็นมวลสาร (formed elements) มวลสารหมายถึง เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ในพลาสมาจำนวน 100 มิลลิลิตรมีโปรตีนอยู่ประมาณ 6.4- 8.2 กรัมคุณสมบัติเฉพาะของพลาสมาโปรตีน ประกอบด้วยส่วนที่ เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกว่า ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ส่วน ที่เป็นไขมันเรียกว่า ไลโปโปรตีน (lipoprotein) หรืออาจเรียก ตามลักษณะการเคลื่อนตัวในสนามไฟฟ้า (electrophoretic mobility) ว่า แอลบูมินแอลฟา -1 แอลฟา -2 บีตา และ แกมมาโกลบูลิน เป็นต้น นอกจากนั้นแล้ว พลาสมายังมีความ สำคัญเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดโดยตรง โดยมีปัจจัยสำหรับ การแข็งตัวของเลือดอยู่ถึง 12 ชนิด ได้แก่ แฟกเตอร์ - I หรือ ไฟบริโนเจน (fibrinogen) แฟกเตอร์ -II หรือ โพร-ทรอมบิน (prothrombin) แฟกเตอร์ - III หรือ ทรอมโบพลาสติน (thromboplastin) แฟกเตอร์ -IV หรือ แคลเซียม (calcium) แฟกเตอร์ -V หรือ เลไบล์แฟกเตอร์ (labile factor) แฟกเตอร์ - VII หรือ โพรคอนเวอร์ติน (proconvertin) แฟกเตอร์ -VIII หรือแอนติฮีโมฟิลิกโกลบูลิน (antihemophilic globulin) แฟกเตอร์ - IX หรือคริสต์มัสแฟกเตอร์ (christmas factor) แฟกเตอร์ - X หรือสจวร์ตโพรเวอร์แฟกเตอร์ (stuart - prower factor) แฟกเตอร์ - XI หรือ พลาสมาทรอมโบพลาสตินแอนติซิเดนท์ (plasma thromboplastin anticedent) แฟกเตอร์ - XII หรือ เฮจแมนแฟกเตอร์ (hageman factor) และแฟกเตอร์ - XIII หรือ ไฟบรินสเตบิไลชิง แฟกเตอร์ (fibrin stabilising factor)

http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=8&chap=6&page=t8-6-infodetail02.html



ภาพที่ 10เกร็ดเลือด (platelets)

ระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์มีอยู่ทั่วร่างกายเปรียบเหมือนกองทัพทหารที่ป้องกันประเทศ ประกอบด้วย ต่อมน้ำเหลือง (เป็นที่อยู่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว) คือ หน่วยทหาร และท่อน้ำเหลือง ที่ภายในจะเป็น น้ำเหลือง และเซลล์เม็ดเลือดขาว เชื่อมต่อระหว่างต่อมน้ำเหลืองด้วยกันเอง และเชื่อมต่อเข้ากับเส้นเลือด คือ เส้นทางเดินทัพของทหาร ม้าม ไขกระดูก ต่อมทอนซิล Payer's patch ที่อยู่ตามเยื่อบุทางเดินอาหาร เป็นที่ตั้งฐานทัพของทหาร สิ่งแปลกปลอมต่างๆรวมทั้งจุลชีพก่อโรค จะผ่านเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองจากตำแหน่งที่เข้าสู่ร่างกาย เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองเฉพาะที่ และผ่านทางเส้นเลือดและท่อน้ำเหลืองกระจายไปทั่วร่างกายเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน สร้างมาจาก stem cells ที่อยู่ในไขกระดูก แบ่งเป็น

1) เซลล์ที่ทำหน้าที่กินสิ่งแปลกปลอม เช่น macrophage, monocyte, neutrophil

2) เซลล์ที่มี granule จำนวนมาก ได้แก่ eosinophil, basophil และ

3) เซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดเล็กที่เรียกว่า เซลล์ลิมโฟไซท์ (lymphocyte) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือB cells และ T cells

B cells ทำหน้าที่ผลิตภูมิคุ้มกันชนิดสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี โดยที่ B cell จะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน แล้วจึงเปลี่ยนเป็น plasma cells เพื่อสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนนั้น

T cells ทำหน้าที่ด้านการตอบสนองทางด้านเซลล์ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ แบ่งเป็น

1) เซลล์ CD4 หรือ helper T (Th) cells เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแอนติเจนชนิด CD4 บนผนังเซลล์ ทำหน้าที่ส่งเสริมเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่น เช่น B cell ในการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ

และ T cells เพื่อการเปลี่ยนเป็น cytotoxic T cells (CTL) ดังนั้น CD4+ T cells จึงมีความสำคัญมาก เพราะมีส่วนร่วมในการทำให้มีภูมิคุ้มกันทั้งแบบเซลล์และสารน้ำ

2) เซลล์ CD8 หรือ killer cells หรือ suppressor cells เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแอนติเจนชนิด CD8 บนผนังเซลล์ ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือที่ติดเชื้อจุลชีพ เซลล์เม็ดเลือดขาวพวกนี้จะรู้ได้ว่าเซลล์ชนิดใดเป็นสิ่งแปลกปลอม จากที่เซลล์ชนิดนั้นไม่มีโมเลกุลที่ผิวเซลล์ HLA class I ชนิดเดียวกับเซลล์เม็ดเลือดขาวนั้น ส่วนสิ่งแปลกปลอมที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เรียกว่า แอนติเจน (antigen)และตำแหน่งบนแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นเรียกว่า epitopeแบ่งเป็น B-cell epitope กระตุ้น B-cell เพื่อสร้างแอนติบอดีจำเพาะ และ T-cell epitope กระตุ้น T-cell

แอนติบอดี

แอนติบอดี หรือ อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) เป็นโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายตัว Y เปรียบเหมือนรถยนต์ ที่จะเปลี่ยนสีและรูปร่าง ตามลักษณะของเชื้อโรคที่จำเพาะนั้นๆ โดยที่ส่วนยอดของตัว Y จะมีความหลากหลายมากไม่เหมือนกันในแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจนแต่ละชนิด เรียกว่า variable regionเป็นตำแหน่งที่จับกับแอนติเจน ส่วนที่โคนตัว Y ของโมเลกุลแอนติบอดีจะบ่งบอกถึงชนิดของแอนติบอดีว่าเป็น class ไหน เช่น IgG, IgA, IgM, IgD, IgE เรียกว่า constant regionแอนติบอดีกระจายอยู่ตามท่อน้ำเหลือง และเส้นเลือด แอนติบอดีจะจับกับสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพที่เข้ามาในร่างกาย เพื่อการทำลายจุลชีพนั้นๆ แอนติบอดีชนิด secretory IgA จะอยู่ตามช่องเยื่อบุต่างๆ ในน้ำตา น้ำลาย สารหลั่งในช่องทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ท่อปัสสาวะ ช่องคลอด เป็นต้น เพียบยั้งไม่ให้จุลชีพ หรือสิ่งแปลกปลอมผ่านเข้าร่างกายทางเยื่อบุ

Cytokines

เป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อสื่อสารกันระหว่างเซลล์ cytokines ที่สร้างจาก T- และ B- cells ที่เรียกว่า lymphokines ได้แก่ interleukin (IL)และ interferon ส่วนที่สร้างจาก monocytes และ macrophage เรียกว่า monokines โดย cytokines ที่หลั่งออกมาอาจทำหน้าที่เรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มารวมกันที่ตำแหน่งที่มีสิ่งแปลกปลอม กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีการเปลี่ยนแปลง และ ทำลายเซลล์

ระบบ Complement

เป็นระบบที่ประกอบด้วยการทำงานอย่างต่อเนื่องของโปรตีนหลายชนิด เพื่อช่วยแอนติบอดีในการทำลายแบคทีเรีย โดยที่โปรตีนเหล่านี้อยู่ในกระแสเลือดในรูปของ inactive form ปฏิกิริยา complement เริ่มจาก โปรตีน C1 ถูกกระตุ้นด้วยแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนเป็น antigen-antibody complex แล้วจึงมีการกระตุ้นโปรตีนในระบบอย่างต่อเนื่อง จนทำให้เซลล์เสียสมดุลของภายในเซลล์ ด้วยการเกิดรูที่ผิวเซลล์ เซลล์จึงถูกทำลาย

ระบบน้ำเหลืองประกอบด้วย น้ำเหลือง ท่อน้ำเหลือง และอวัยวะน้ำเหลือง

1.น้ำเหลืองเป็นของเหลวที่ซึมผ่านผนังหลอดเลือดฝอยมาอยู่ระหว่างเซลล์บางส่วนจะถูกดูดซึมเข้าสู่หลอดเลือดฝอยบางส่วนจะถูกดูดซึมเข้าสู่หลอดน้ำเหลืองเรียกของเหลวที่อยู่ในหลอดน้ำเหลือง ว่าน้ำเหลือง

2.ท่อน้ำเหลืองท่อน้ำเหลืองฝอยซึ่งมีปลายตัน มีขนาดต่างๆกัน ท่อน้ำเหลืองฝอยแทรกอยู่ใกล้กับหลอดเลือดฝอยในบริเวณต่างๆ จะมารวมกันเป็นท่อน้ำเหลืองใหญ่และเปิดเข้าสู่หลอดเลือดเวนใหญ่ (หลอดเลือดดำที่บริเวณใกล้หัวใจ (นำน้ำเหลืองเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดนอกจากนี้ท่อน้ำเหลืองที่ผนังลำไส้เล็กยังเป็นทางลำเลียงสารอาหารประเภทไขมันไปยังกระแสเลือดด้วย

3.อวัยวะน้ำเหลืองประกอบด้วย ต่อมน้ำเหลือง ม้าม และต่อมไทมัส อวัยวะน้ำเหลืองเป็นที่อยู่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม

3.1ต่อมน้ำเหลืองพบอยู่ระหว่างทางเดินของท่อน้ำเหลืองทั่วไปในร่างกาย เช่น ที่คอ รักแร้ โคนขา มีลักษณะรูปไข่ขนาดแตกต่างกัน ภายในมีเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่รวมเป็นกระจุก มีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ทำให้น้ำเหลืองซึมผ่านได้ ต่อมน้ำเหลืองที่รู้จักกันดี คือ ต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอเรียกว่า ทอมซิล

3.2ม้ามเป็นอวัยวะน้ำเหลืองที่มีขนาดใหญ่ที่สุด อยู่ใต้กะบังลมด้านซ้ายติดกับด้านหลังของกระเพาะอาหาร ม้ามเป็นแหล่งผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะเอ็มบริโอ หลังคลอดม้ามจะเป็นที่อยู่เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ และเป็นแห่งทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดที่หมดอายุแล้ว

3.3ต่อมไทมัสมีตำแหน่งอยู่บริเวณทรวงอก รอบหลอดเลือดใหญ่ของหัวใจ เนื้อเยื่อบางส่วนของต่อมไทมัส ทำหน้าที่สร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวกลุ่มลิมโฟไซต์ เมื่อเซลล์เจริญระยะหนึ่งแล้ว จะออกจากต่อมไทมัสเข้าสู่กระแสเลือด และน้ำเหลืองไหลเวียนไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย http://cms576.bps.in.th/group1/immune-system

Pseudomonas

Pseudomonas เป็นชื่อ genus ของแบคทีเรีย (bacteria) ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) เป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมเสียของอาหารหลายชนิดได้แก่อาหารทะเล เนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู เนื้อวัว สัตว์ปีก ไข่ และ ผักผลไม้ลักษณะทั่วไปที่สำคัญของ *Pseudomonas* คือ

1.เป็นแบคทีเรียที่ย้อยติดสีแกรมลบ (Gram-negative bacteria)

2.รูปร่างเป็นท่อน (rod shape)

3.ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming bacteria)

4.เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (aerobic bacteria) การเสื่อมเสียที่มี Pseudomonas เป็นสาเหตุมักเกิดที่ผิวซึ่งสัมผัสกับอากาศ

5.เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) ทำให้อาหารที่เก็บรักษาด้วยการแช่เย็น (cold storage) เสื่อมเสียได้

6.เป็นแบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) จึงเป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารที่มีโปรตีน (protein) เป็นส่วนประกอบ เช่น เนื้อสัตว์ (meat) น้ำนม (milk) ไข่ (egg) อาหารทะเล (seafood)

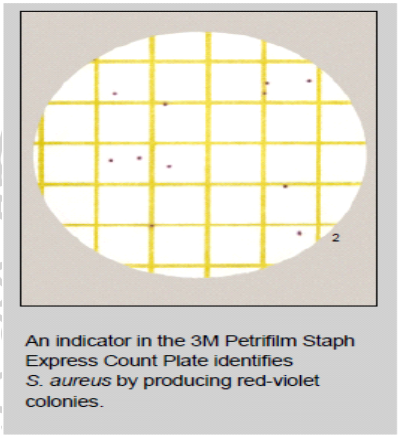
7. สร้างรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีต่างๆ ทำให้อาหารเปลี่ยนสี หรือเรืองแสง เช่นไ พโอไซยานิน (pyocyanin) มีสีฟ้า ไพโอเวอร์ดิน (pyoverdins) มีสีเหลือง เรืองแสงได้ภายใต้ด้วยแสง UV ไพโอรูบิน (pyorubin) มีสีแดง ไพโอเมลานิน (pyomelanin) มีสีน้ำาตาล http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1541/pseudomonas

3M™ Petri film ™

3M™ Petri filmเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปโดยมีลักษณะเป็นผงแห้งที่เคลือบอยู่บนแผ่นฟิล์มพลาสติก สำหรับใช้วิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ราในส่วนของส่วนประกอบหลักๆ ของ 3M™ Petri film ™ จะประกอบด้วยแผ่นพลาสติกสองแผ่นที่ประกบกันอยู่โดยแผ่นบนเป็นแผ่นฟิล์มพลาสติกใสที่แบ่งย่อยออกเป็นอีกสามชั้นที่เคลือบอยู่ ดังนี้ ชั้นบนสุดเป็นแผ่นฟิล์มพลาสติก รองลงมา จะเป็นชั้นของ กาว+สารบ่งชี้ และชั้นล่างจะเป็นเจลละลายในน้ำเย็น ในส่วนของแผ่นล่างนั้นจะประกอบด้วยชั้นย่อยๆ อีกสามชั้นเช่นกัน ชั้นบนสุดเป็นชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar) รองลงมาเป็นชั้นของกาว และชั้นล่างสุดของแผ่นล่างจะเป็นแผ่นพลาสติกพิมพ์ลายดังแสดงในรูปที่ 14 โดยส่วนประกอบของแผ่นตรวจนั้นตัวสารบ่งชี้ที่ใช้ในแผ่นตรวจชนิดนี้จะเป็นสีไตรเฟนนิลเตทตระโซเลียมคลอไรด์ (Triphenyl Tetrazolium Chloride-TTC) และในส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะเป็น Plate Count Agar ที่แบคทีเรียทั่วไปสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยมีสารที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวคือ เจลที่ละลายในน้ำเย็น

ภาพที่ 11อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป3M™ Petri film ™

วิธีการใช้แผ่น PAC ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นี้เป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจากหน่วยงานมาตรฐาน AOAC เริ่มจากทำการหยดตัวอย่างปริมาตร 1 ml ลงบนแผ่นตรวจเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการวางแผ่นตรวจในเครื่องบ่มเชื้อนั้นสามารถวางซ้อนกันได้ไม่เกิน 20 แผ่น และนำมาอ่านผลเมื่อครบเวลาในการอ่านผล aerobic bacteria จะทำการนับโคโลนีที่มีสีแดงทั้งหมดที่อยู่ในพื้นที่วงกลม 20 ตารางเซนติเมตร ซึ่งช่วงที่เหมาะสมในการนับโคโลนีจะอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อแผ่น



ภาพที่ 12อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป3M™ Petri film ™ ที่แยก *S. aureus* ได้โคโลนีสีแดง-ม่วง

มาตรฐานของการตรวจสอบวิธีมาตรฐาน (Standard Method) ได้มีการบอกถึงมาตรฐานต่างที่เราสามารถใช้อ้างอิงได้ในการตรวจสอบ ได้แก่ International Standards: ISO National Standards: TIS, BS, DIN, EPA, BAM Internationally recognized organizations: AOAC, ICUMSA, IOB, IP, ICMSF Nationally recognized organizations: EPA, USFDA, BAM, APHA เป็นหน่วยงานของ AOAC ซึ่ง AOAC = Association of Official Agricultural Chemist เป็นหน่วยงานพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบ โดยก่อตั้งขึ้นที่ประเทศสหรัฐอเมริกา แต่ได้เป็นที่ยอมรับทั่วโลก ทั้งอเมริกา แถบยุโรป และเอเชีย การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Validation) โดยมีกระบวนการตรวจสอบเพื่อพิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ ได้แก่ให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศหรือระหว่างประเทศ (regulation) การควบคุณคุณภาพสินค้านำเข้าและส่งออก (import/export control) เป็นต้น http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3612

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่องการศึกษาผลกระทบของเชื้อจุลชีพธรรมชาติบนผิวหนังของมนุษย์ในระยะเวลาที่ต่างกันเป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีรายละเอียดและวิธีการทดลอง ดังนี้

1 อาสาสมัครที่ให้เชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง

2 อาสาสมัครที่ให้เลือดโดยไม่เป็นโรคเกี่ยวกับเลือดและโรคติดต่อ

3 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

4 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5 วิธีการทดลอง

อาสาสมัครที่ให้เชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวหนัง

ผู้วิจัยมีส่วนสูง 156 เซนติเมตรและน้ำหนักประมาณ 55 กิโลกรัม) โดยใช้สำลีก้านปราศจากเชื้อหมุนบริเวณหลังมือซ้ายช้าๆเป็นลักษณะวงกลมคล้ายก้นหอย ให้อาสาสมัครนั่งอยู่ในห้องที่มีอากาศถ่ายเท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1นาที หลังจากนั้นนำก้านสำลีใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Agar เพื่อนำไปStreak Plate ทำการเพาะเชื้อและแยกเชื้อจากโคโลนีที่ได้ทำการทดลองในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือน กันยายน อุณหภูมิประมาณ 32-25 องศาเซลเซียส

อาสาสมัครที่ให้เลือดโดยไม่เป็นโรคเกี่ยวกับเลือดและโรคติดต่อ

ผู้วิจัยมีส่วนสูง 156 เซนติเมตรและน้ำหนักประมาณ 55 กิโลกรัม) โดยทำการเจาะเลือดออกมาใส่หลอดเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อ1พื้นผิวสัมผัส เจาะเลือดโดยนักเทคนิคการแพทย์ อาสาสมัครนั่งอยู่ในห้องที่มีอากาศถ่ายเท ที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นทำการทดลองในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนมีนาคม อุณหภูมิประมาณ 32-25 องศาเซลเซียส

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

3.1 ตัวอย่างผิวสัมผัสที่ใช้ในการทดลองเป็นพื้นผิวกระเบื้อง

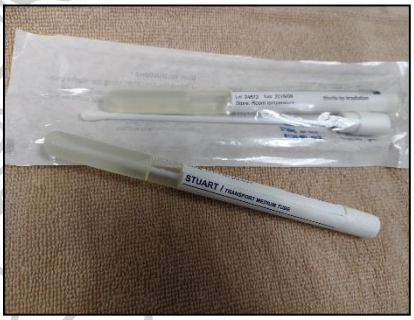
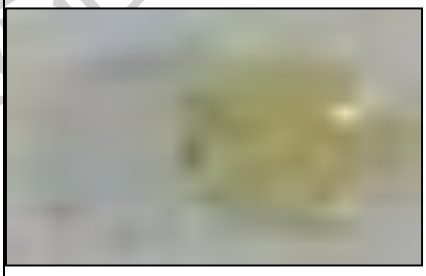
3.2 ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการทดลองเป็นเลือดกรุ๊ปเอปริมาตร 3 มิลลิลิตร

3.3 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองคือเชื้อ *Pseudomonas spp*. ที่ทำการแยกออกมาได้

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้การทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้การทดลอง

สารเคมี/อุปกรณ์	ที่มา	ภาพประกอบ
Transport media	อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Stuart Media บริษัท Higher Enterprises Co., Ltd	
Nutrient agar plate	อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป cetrimide agar บริษัท Higher Enterprises Co., Ltd	
3M™ Petri film ™	บริษัท 3M ประเทศสหรัฐอเมริกา	

ขวดรูปชมพู่	เป็นอุปกรณ์ที่ยืมห้องLAB รพ. สัตว์ทองหล่อ	
Butterfield's Phosphate	ยี่ห้อ Hardy Diagnostics	

วิธีการศึกษาทดลอง

การหาเชื้อแบคทีเรียจากผิวหนังมนุษย์ใน Nutrient agar

1.ใช้สำลีก้านปราศจากเชื้อหมุนบริเวณหลังมือซ้ายช้าๆเป็นลักษณะวงกลมคล้ายก้นหอย แล้วนำไปใส่ในStuart Media สำหรับการเพาะเชื้อ

2. ใช้loop เขี่ยเชื้อลงบน Nutrient agar โดยทำการStreak plate

3. นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. เพื่อทำการแยกเชื้อออกมา

การเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas spp.* ใน Nutrient broth เพื่อหาช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase)

1. เตรียม Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน tube แก้ว sterile ขนาด 16×19 มิลลิเมตร

2. ใช้ Loop เขี่ยตัวอย่างเชื้อ *Pseudomonas spp.* ลงใน Nutrient broth

3. นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. เมื่อบ่มครบ 1 ชั่วโมงใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด broth ที่มีเชื้อ *Pseudomonas spp.* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรนำไปหยดลงบน Nutrient agar

5. ทำการ spread plate โดยใช้ Spreader จุ่มแอลกอฮอล์ 95 % แล้วเอียง Spreader ที่ขอบของบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แล้วนำSpreader ที่มีแอลกอฮอล์ไปเผาไฟให้หมด ปล่อยให้เย็น นำไปเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อ

6. เมื่อครบชั่วโมงที่ 2 ใช้Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด broth ที่มีเชื้อ *Pseudomonas spp.* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรนำไปหยดลงบน Nutrient agar

7. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 4-5 เมื่อครบทุก 1 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 12

8. นำ Plate ที่ทำการ Spreader plate เสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

9. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังผ่านไป 24-48 ชั่วโมง

การเลี้ยง *Pseudomonas spp.* ในNutrient broth เพื่อใช้เป็น Stock culture

1. เตรียม nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใน tube แก้ว sterile ขนาด 16*150 มิลลิเมตร

2. ใช้ Loop เขี่ยตัวอย่างเชื้อ *Pseudomonas spp.* ลงใน Nutrient broth

3. นำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 8ชั่วโมง (พิจารณาจากระยะ log phase จากการศึกษาที่ 2)

4. เตรียม nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใน tube แก้ว sterile ขนาด 150×16 มิลลิเมตรจำนวน 6 หลอด

5. เขียนระดับความเข้มข้นที่ 1:10 (10^{-1}), 1:100 (10^{-2}),1 :1000 (10^{-3}),1 :10000 (10^{-4}),1 :100000 (10^{-5}),1 :1000000 (10^{-6}) ในแต่ละหลอด

6.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด stock culture ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดับความเข้มข้น 1:10 (10^{-1})

7.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:10(10^{-1}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:100 (10^{-2})

8.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:100(10^{-2}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:1000 (10^{-3})

9.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:1000(10^{-3}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:10000 (10^{-4})

10.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:10000(10^{-4}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:100000 (10^{-5})

11.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:100000(10^{-5}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:1000000 (10^{-6})

12.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูดsuspension จากระดับความเข้มข้น 1:1000000(10^{-6}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ระดังความเข้มข้น 1:10000000 (10^{-7})

13. เลือกคำนวณปริมาณชื้อ *Pseudomonas spp*. โดยเลือกคำนวณในระดับความเข้มข้นที่ 1:10000, 1:100000 และ 1:1000000 โดยใช้ auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด

suspension จากแต่ละระดับความเข้มข้นที่เลือกไว้ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วนำไปหยดบน nutrient agar

14. ทำการ spread plate โดยใช้ Spreader จุ่มแอลกอฮอล์ % 95แล้วเอียง Spreader ที่ขอบของบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก แล้วนำSpreader ที่มีแอลกอฮอล์ไปเผาไฟให้หมด ปล่อยให้เย็น นำไปเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานเพาะเชื้อ

15. นำ Plate ที่ทำการ Spreader plate เสร็จเรียบร้อยแล้วนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

16. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังผ่านไป 24-48 ชั่วโมง

17. คำนวณปริมาณเชื้อ *Pseudomonas sp.* ที่นับได้ใน stock culture

การศึกษาผลกระทบของเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในเลือดพื้นผิวแห้งบนแผ่นกระเบื้อง

1.เตรียมเลือดในสภาวะ fresh normal Blood 3 มิลลิลิตร

2.ใส่ Stock culture *Pseudomonas spp.* ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปในเลือด

3.ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด Suspension จากตัวอย่างเลือดที่มีเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/จุด บนแผ่นกระเบื้อง

4.ใช้ Cotton swab นำเลือดไปตรวจหาปริมาณ total bacterial count (TBC) โดยเก็บเชื้อช่วงเวลาต่างกันดังนี้

จุดที่ 2 เมื่อผ่านไป 1 ชั่วโมง

จุดที่ 3 เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง

จุดที่ 4 เมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมง

จุดที่ 5 เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง

จุดที่ 6 เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง

5. นำ Cotton swab ที่เก็บเลือดใส่หลอดที่มีสารละลาย Butterfiled phosphate B 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นให้เข้ากัน

5.1นำไปเพาะหาปริมาณเชื้อโดยการเปิดแผ่น 3M™ Petri film ™ ดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงบนแผ่น

5.2ปิดแผ่นฟิลม์ลงและกดด้วยSpreaderใช้นิ้วกดลงกึ่งกลางของ Spreader แรงพอประมาณจนตัวอย่างกระจายเต็มวงกลม อย่าเลื่อนหรือบิด spreader

5.3ยก Spreader ขึ้นปล่อยแผ่น 3M™ Petri film ™ อยู่กับที่อย่างน้อย 1 นาทีจากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1-6 จำนวน 10 ซ้ำเพื่อหาข้อมูลค่าเฉลี่ยปริมาณ TBC ในแต่ละช่วงเวลา

การศึกษา *Pseudomonas spp.* ในserum ที่ผ่านการ inactivated complement พื้นผิวแห้งบนแผ่นกระเบื้อง

1. เตรียม serum ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใน tube แก้ว sterile ขนาด 16*150 มิลลิเมตร

2. นำไปinactivated complement ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

3. ใส่ stock culture *Pseudomonas spp.* ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปใน serum ที่ผ่านการ inactivated complement

4. ใช้ Auto pipette สวม yellow tip sterile ดูด Suspension จากตัวอย่าง serum ที่มีเชื้อ*Pseudomonas spp*. ในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร/จุด บนแผ่นกระเบื้อง

5. ใช้ Cotton swab นำเลือดไปตรวจหาปริมาณ total bacterial count (TBC) โดยเก็บเชื้อช่วงเวลาต่างกันดังนี้

จุดที่ 2 เมื่อผ่านไป 1 ชั่วโมง

จุดที่ 3 เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง

จุดที่ 4 เมื่อผ่านไป 12 ชั่วโมง

จุดที่ 5 เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง

จุดที่ 6 เมื่อผ่านไป 48 ชั่วโมง

6. นำ Cotton swab ที่เก็บเลือดใส่หลอดที่มีสารละลาย Butterfiled phosphate B 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นให้เข้ากัน

6.1นำไปเพาะหาปริมาณเชื้อโดยการเปิดแผ่น 3M™ Petri film ™ ดูดสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงบนแผ่น

6.2ปิดแผ่นฟิลม์ลงและกดด้วยSpreaderใช้นิ้วกดลงกึ่งกลางของ Spreader แรงพอประมาณจนตัวอย่างกระจายเต็มวงกลม อย่าเลื่อนหรือบิด spreader

6.3ยก Spreader ขึ้นปล่อยแผ่น 3M™ Petri film ™ อยู่กับที่อย่างน้อย 1 นาทีจากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7. ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1-6 จำนวน 10 ซ้ำเพื่อหาข้อมูลค่าเฉลี่ยปริมาณ TBC ในแต่ละช่วงเวลา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4

ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล

จากการดำเนินการวิจัยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์กับอายุของคราบเลือด และผลกระทบของเชื้อแบคทีเรียธรรมชาติที่อยู่บนผิวหนังของมนุษย์เมื่อได้สัมผัสคราบเลือดในระยะเวลาที่แตกต่าง

การหาเชื้อแบคทีเรียจากผิวหนังมนุษย์ใน Nutrient agar

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากผิวหนังของมนุษย์เพื่อนำมาเป็นเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาเก็บตัวอย่างโดยใช้ Cotton swab หมุนวนเป็นรูปก้นหอยบริเวณหลังมืออาสาสมัครแล้วทำการเลี้ยงเชื้อใน nutrient agar โดยเทคนิค Streak plate incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อที่ได้คือโคโลนีของ *Pseudomonas spp.* ซึ่งสามารถนำมาเป็นเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในการศึกษาวิจัย

การเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas spp.* ใน Nutrient broth เพื่อหาช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase)

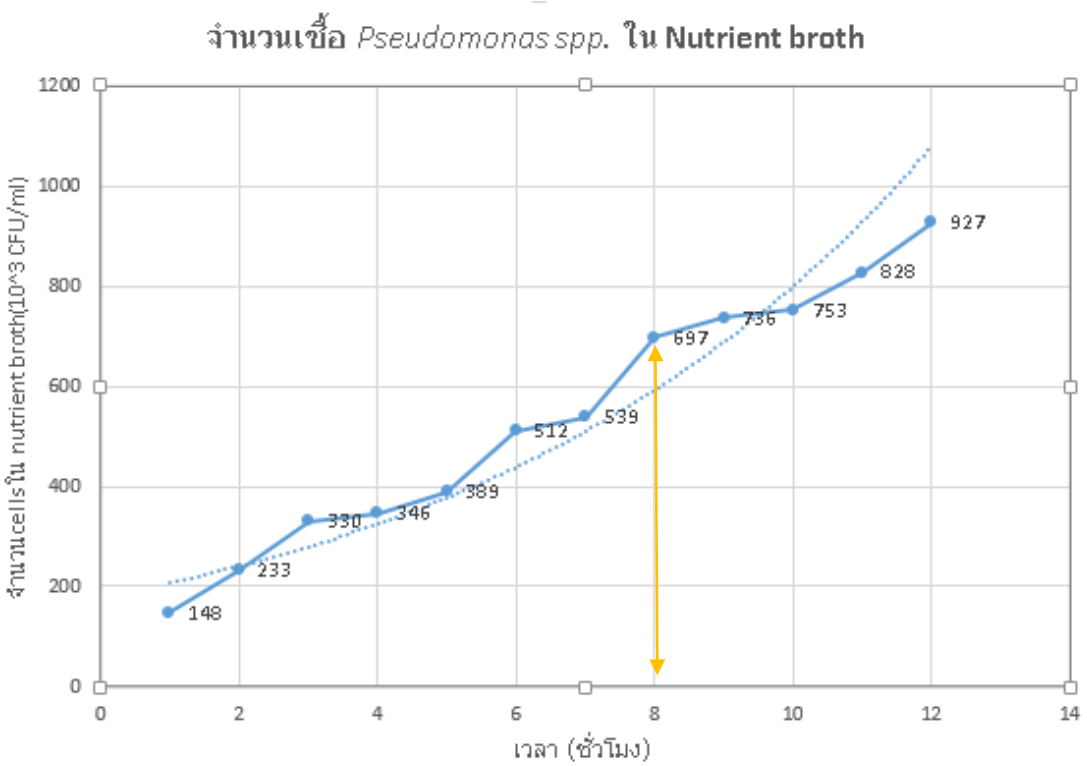
จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อหาช่วงระยะเวลาการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas spp.* ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ดีที่สุดและมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

จากการศึกษาเลี้ยงตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas spp.* ใน nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้ว spread plate เพื่อนับจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่เจริญเติบโตทุกๆ 1 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Pseudomonas spp.* สามารถเจริญเติบโตได้เพิ่มขึ้นในระยะเวลาที่เปลี่ยนแปลงไป เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารสำหรับการดำรงชีพของเชื้อ *Pseudomonas spp.* ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการแบ่งจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* คือ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีข้อมูลจำนวนเชื้อในแต่ละชั่วโมงดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2ข้อมูลจำนวนเซลล์ Pseudomonas spp. ที่เจริญเติบโตใน Nutrient broth ในแต่ละชั่วโมง

จำนวนชั่วโมง	จำนวนเซลล์ใน Nutrient broth (10^3CFU/ml)
1	148
2	233
3	330
4	346
5	389
6	512
7	539
8	697
9	736
10	753
11	828
12	927
Average	537
SD	251.2

จากข้อมูลในตารางที่ 2 สามารถนำมาสร้างกราฟเพื่อหาช่วงระยะเพิ่มจำนวน (Log phase) ของเชื้อ *Pseudomonas spp.* โดยการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกระยะ Log phase จากกราฟเส้นโดยสังเกตช่วงเวลาที่ *Pseudomonas spp.* สามารถเจริญเติบโตได้สูงที่สุด คือช่วงเวลาในชั่วโมงที่ 8 ดังแสดงในกราฟที่ 1



กราฟที่ 1จำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ใน Nutrient broth ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละช่วงเวลา

การเลี้ยง *Pseudomonas spp.* ในNutrient broth เพื่อใช้เป็น Stock culture

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเลือกระยะการเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas spp.* ในอัตราการเติบโตสูงสุดจากการศึกษาที่ 2 คือระยะเวลาชั่วโมงที่ 8 หรือระยะ Log phase และนำเชื้อที่อยู่ในระยะนี้มาทำการศึกษาทดลองต่อไป และ Stock culture *Pseudomonas spp.* ที่คำนวณได้นำมาใช้ในการทดลองนี้มีจำนวน 2.05×10^{7} CFU/ml ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลแสดง stock culture *Pseudomonas spp.*

วันที่ทำการทดลอง	ระดับความเข้มข้นที่นำมาคำนวณ	จำนวนโคโลนี (N)	จำนวนเชื้อเริ่มต้น
21 ธันวาคม 2560	10^{-4}	205	$(205/0.1)\times10^{4}$

จากข้อมูลในตารางที่ 3 Stock culture *Pseudomonas spp.* ในการศึกษานี้มีจำนวนเท่ากับ $10^{7}\times2.05$ CFU/ml

การศึกษาผลกระทบของเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในเลือด

จุดประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาว่าจำนวนแบคทีเรีย *Pseudomonas spp.* มีจำนวนเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากการได้สัมผัสกับส่วนประกอบในเลือด จำพวกเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils, monocytes และ lymphocytes ในเลือดโดยศึกษาผลกระทบ *Pseudomonas spp.* ที่ได้สัมผัสเลือดโดยตรง ดังแสดงในตารางที่ 4

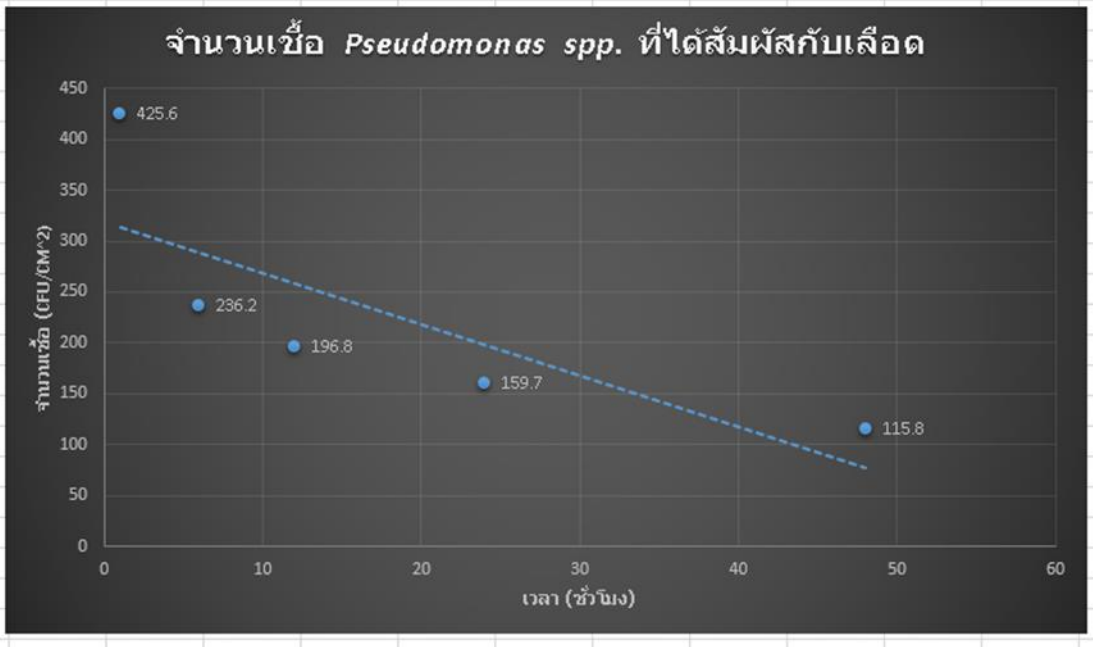
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่ได้สัมผัสกับเลือด

ครั้งที่/ตำแหน่งที่	1 (1 ชั่วโมง)	2 (6 ชั่วโมง)	3 (12 ชั่วโมง)	4 (24 ชั่วโมง)	5 (48 ชั่วโมง)
1 (CFU/cm^2)	500	197	193	163	85
2(CFU/cm^2)	559	302	262	238	228
3(CFU/cm^2)	501	295	250	171	117
4(CFU/cm^2)	228	213	154	152	137
5(CFU/cm^2)	268	241	234	155	109
6(CFU/cm^2)	271	224	187	163	127
7(CFU/cm^2)	588	204	181	169	70
8(CFU/cm^2)	223	220	103	89	57

แสดงจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่ได้สัมผัสกับเลือด (ต่อ)

ครั้งที่/ ตำแหน่งที่	1 (1 ชั่วโมง)	2 (6 ชั่วโมง)	3 (12 ชั่วโมง)	4 (24 ชั่วโมง)	5 (48 ชั่วโมง)
9(CFU/cm^2)	601	242	213	180	142
10(CFU/cm^2)	517	224	191	117	86
Average	426	236	197	160	116
SD	158	36	47	39	49

จากตารางที่ 4 สามารถนำค่าเฉลี่ยแต่ละช่วงเวลามาสร้างกราฟจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่สัมผัสเลือดในช่วงเวลาที่ต่างกันดังนี้



กราฟที่ 2ค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในสภาวะ Fresh normal blood ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละช่วงเวลา

จากกราฟที่ 2 ค่าเฉลี่ยผลกระทบ *Pseudomonas spp.* ในสภาวะfresh normal blood พบว่ามีจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ลดลงทั้งนี้เป็นเพราะในเลือดสภาวะนี้มี complement และเม็ดเลือดขาวที่ยังทำหน้าที่ได้ครบสมบูรณ์ และเมื่อเวลาผ่านไปคราบเลือดเริ่มแห้งการแบ่งตัวของเชื้อ

จะมีจำนวนลดลง ในขณะที่เม็ดเลือดขาวยังทำลายเชื้อไปเรื่อยๆจึงมีจำนวนเชื้อที่ลดลงไปตามระยะเวลา

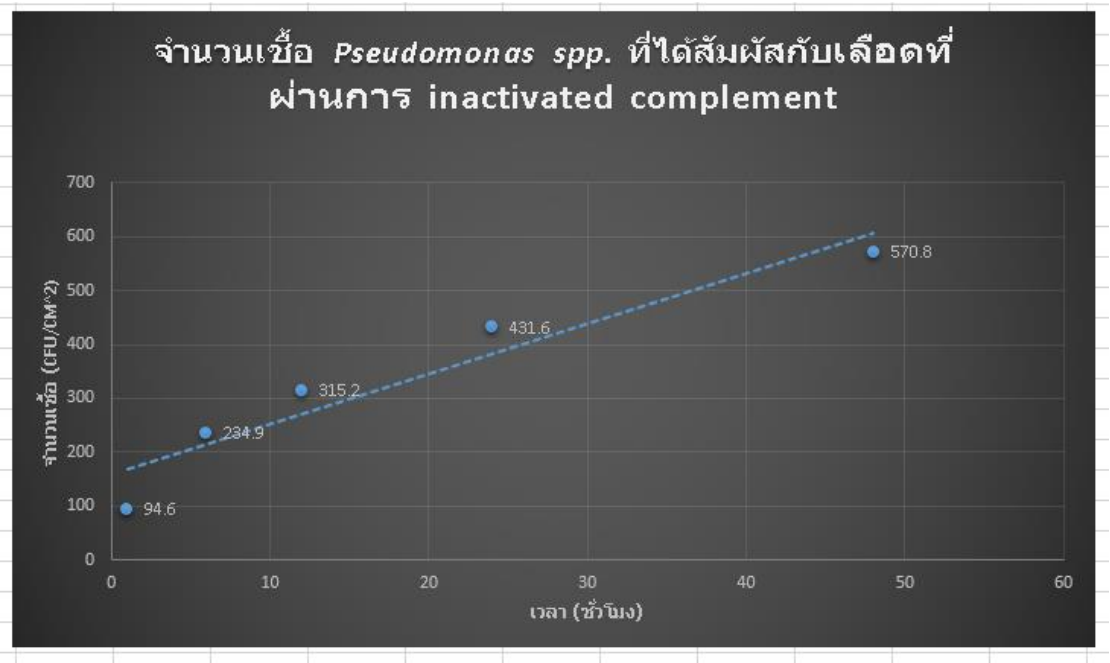
การศึกษา *Pseudomonas spp.* ใน serum ที่ผ่านการ inactivated complement พื้นผิวแห้งบนแผ่นกระเบื้อง

จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาแนวโน้มของแบคทีเรียที่อยู่serum ของเลือดที่ผ่านการ inactivated complement ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเชื้อ *Pseudomonas spp.* สามารถเจริญเติบโตได้เพิ่มขึ้นในระยะเวลาที่เปลี่ยนแปลงไปเพราะ complement ที่อยู่ในเลือดได้ถูกยับยั้งจึงไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* จึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5แสดงจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ได้สัมผัสกับเลือดที่ผ่านการ inactivated complement

ครั้งที่/ ตำแหน่งที่	1 (1 ชั่วโมง)	2 (6 ชั่วโมง)	3 (12 ชั่วโมง)	4 (24 ชั่วโมง)	5 (48 ชั่วโมง)
1 (CFU/cm^2)	85	252	398	420	595
2(CFU/cm^2)	102	205	384	438	498
3(CFU/cm^2)	117	255	450	400	587
4(CFU/cm^2)	110	213	254	389	537
5(CFU/cm^2)	109	241	234	469	609
6(CFU/cm^2)	98	244	277	463	527
7(CFU/cm^2)	70	205	305	469	670
8(CFU/cm^2)	68	220	338	489	557
9(CFU/cm^2)	101	290	213	402	542
10(CFU/cm^2)	86	224	299	377	586
Average	95	235	315	432	571
SD	17	27	77	39	49

จากข้อมูลในตารางที่ 5 สามารถนำค่าเฉลี่ยแต่ละช่วงเวลามาสร้างกราฟจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่สัมผัสเลือดที่ผ่านการ inactivated complement ในช่วงเวลาที่ต่างกันดังนี้



กราฟที่ 3ค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ Pseudomonas spp. ได้สัมผัสกับเลือดที่ผ่านการinactivated complement

เมื่อนำกราฟที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในสภาวะ Fresh normal blood ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแต่ละช่วงเวลามาเปรียบเทียบกับกราฟที่ 3 ค่าเฉลี่ยผลกระทบเชื้อ *Pseudomonas spp.* ได้สัมผัสกับเลือดที่ผ่านการ inactivated complement พบว่ากราฟที่ 2 ข้อมูลจำนวนเชื้อในสภาวะ Fresh normal blood พบว่าจำนวนเชื้อ *Pseudomonas spp.* ลดลง ทั้งนี้เพราะในเลือดสภาวะนี้มี complement และเม็ดเลือดขาวที่ยังทำหน้าที่ได้ดีครบถ้วน ซึ่งเม็ดเลือดขาวมีหน้าที่ทำลายเชื้อได้และเมื่อคราบเลือดเริ่มแห้งการแบ่งตัวของเชื้อจะมีจำนวนลดลงในขณะที่เม็ดเลือดขาวยังทำหน้าที่ทำลายเชื้อไปเรื่อยๆ จึงมีจำนวนเชื้อลดลงไปตามระยะเวลา ในขณะที่กราฟที่ 3 มีแนวโน้มจำนวนเชื้อเพื่อมากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละชั่วโมง ทั้งนี้เพราะ *Pseudomonas spp.* สามารถเจริญเติบโตได้ดีใน serum ที่ผ่านการ inactivated complement

บทที่ 5

อภิปรายผลของการวิจัย

การศึกษาวิจัยเป็นการศึกษาแบบทดลอง โดยศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์กับอายุของคราบเลือด และผลกระทบของเชื้อแบคทีเรียธรรมชาติที่อยู่บนผิวหนังของมนุษย์เมื่อได้สัมผัสคราบเลือดในระยะเวลาที่แตกต่าง โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานจากการศึกษาที่ 4และ5 โดยผู้วิจัยจักได้อภิปรายตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยดังต่อไปนี้

จุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพบนผิวหนังมนุษย์กับอายุของคราบเลือดในระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยจากการศึกษาที่ 4 ศึกษาทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas spp.* ในเลือดพื้นผิวแห้งบนแผ่นกระเบื้องเพื่อหาผลกระทบของเชื้อ *Pseudomonas spp.* ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลชีพที่ได้สัมผัสกับคราบเลือดกับระยะเวลาของคราบเลือด โดยพบว่ากราฟความสัมพันธ์มีแนวโน้มแบบลดลงหรือหมายความว่าเมื่อมีระยะเวลาคราบเลือดเปลี่ยนไปมากขึ้นจะมีผลกระทบทำให้มีจำนวนจุลชีพที่ได้สัมผัสคราบเลือดนั้นลดลงตามไปด้วย และตัวแปรที่สำคัญในการทำลายเชื้อจุลชีพนี้คือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งได้แก่ระบบ complement และเม็ดเลือดขาวเนื่องจาก normal fresh blood มี complement ในสภาพที่สมบูรณ์ไม่ถูกทำลายจึงสามารถทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อจุลชีพได้ดีจำนวนเชื้อจุลชีพที่ได้จึงมีน้อย และพบว่าข้อมูลกราฟสภาวะเลือด normal fresh blood กับระยะเวลาในเลือดมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นผลมาจาก complement ที่ทำหน้าที่ได้อย่างดี จากการศึกษาที่ 4 นั้นผู้วิจัยแนะนำว่าควรทำการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas spp.* ในเลือดในสภาวะที่หลากหลายเช่น old blood , old non-incubated blood และ heat inactivated blood ควบคู่กับการเลี้ยงเชื้อใน normal fresh blood เพื่อทำการเปรียบเทียบผลกันด้วย

การศึกษาเลี้ยง *Pseudomonas spp.* ในเลือดที่ผ่านการ inactivated complement พื้นผิวแห้งบนแผ่นกระเบื้องหรือการทำให้ complement ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้นจากการทดลองพบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียจากการศึกษาที่ 5 นี้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงใน serum นานมากขึ้นเพราะไม่มี complement ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงตัวแปรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas spp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียตัวแทนแบคทีเรียจุลชีพจากผิวหนังมนุษย์ นั่นคือระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในระบบ complement ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในคราบเลือด และผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Michael Loos, 1987 ที่ได้ศึกษาพบว่าระบบภูมิคุ้มกัน complement ชนิด C1q และ C1 สามารถจับกับแบคทีเรียแกรมลบ (bacilli) ในส่วนของผิวชั้นนอกซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนได้อย่างอิสระ

เมื่อมีการจับกันของ antibody ชนิด C1q และ C1 ต่อผิวชั้นนอกของแบคทีเรีย จะเข้าสู่กระบวนการทำลายเชื้อผ่านทาง Classical pathway ซึ่งทำให้เชื้อแบคทีเรียตายในที่สุด จากการศึกษาที่ 5 นั้น ผู้วิจัยแนะนำว่าควรทำการเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas spp*. ใน serumที่ไม่ได้ทำการ inactivated complement ควบคู่กับการเลี้ยงเชื้อใน serum ที่ผ่านการ activated complement เพื่อทำการเปรียบเทียบผลกันด้วย

สรุปได้ว่าปัจจัยการทำลายเชื้อจุลชีพจากผิวหนังมนุษย์ในเลือดสภาวะ Normal fresh blood จะมีมากที่สุดเพราะมีการทำลายเชื้อได้ทั้งระบบ complement และเม็ดเลือดขาว ปัจจัยการทำลายเชื้อจุลชีพรองลงมาคือเลือดในสภาวะ Heat inactivated serum เพราะมีเพียงเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อจุลชีพ การทำลายเชื้อจุลชีพจากระบบ Complement จะสามารถทำลายเชื้อจุลชีพได้อย่างรวดเร็วมากกว่าการทำลายเชื้อจุลชีพจากเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไปและใช้ระยะเวลาในการทำลายและจากศึกษาทั้ง 2 การศึกษาทำให้ทราบว่าปัจจัยทำลายเชื้อจุลชีพของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่อยู่ในคราบเลือดนั้นจะส่งผลกระทบต่อเชื้อจุลชีพในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นจนกว่าคราบเลือดนั้นแห้งจะทำให้ปัจจัยการทำลายเชื้อจุลชีพถูกแห้งไปกับคราบเลือดและทำให้ปัจจัยการทำลายเชื้อถูก activated โดยอัตโนมัติหรือการถูกทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เองตามธรรมชาติ

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ควรทำการศึกษาผลกระทบของเชื้อแบคทีเรียเป็นตัวแทนเชื้อจุลชีพธรรมชาติ โดยใช้กลุ่มเชื้อแบคทีแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นเช่น *Klebsiella spp.*หรือศึกษากลุ่มเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

2. ควรทำการศึกษาผลกระทบของเชื้อจุลชีพธรรมชาติในพื้นผิวที่แตกต่างกัน เนื่องจากพื้นผิวต่างกันทำให้จำนวนเชื้อจุลชีพมีผลกระทบต่อเลือดต่างกัน

3. ควรเปลี่ยนวิธีการทดลองจากวิธี spread plate เป็นเทคนิคอื่นเช่น drop plate, pour plate เป็นต้น

รายการอ้างอิง

Nuorteva, P. (1974). Age determination of a blood stain in a decaying shirt by entomological means. *Forensic Science, 3*, 89-94.

Rosenberg, W., & Donald, A. (1995). Evidence based medicine: an approach to clinical problem-solving. *BMJ: British Medical Journal, 310*(6987), 1122.

เพชร, ป. ฉ. พ. การ ประมาณ ระยะ เวลา การ เสีย ชีวิต ของ ศพ จาก การ เปลี่ยนแปลง สัณฐาน วิทยา ของ เซลล์ เม็ดเลือด ขาว. *Veridian e-Journal* ฉบับ ภาษา ไทย สาขา มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ และ ศิลปะ และ ฉบับ *International Humanities, Social Sciences and arts, 4*(1), 807-818.

คณะ, ส. ร. ว. ธ. แ. ศ. แ. การ ตรวจ หา อายุ คราบ โลหิต ด้วย Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Veridian e-Journal* ฉบับ ภาษา ไทย สาขา มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ และ ศิลปะ และ ฉบับ *International Humanities, Social Sciences and arts, 5*(2), 721-729.

ชัย, พ. เ. ว. ช., & บรรณาธิการ. (2008). คำ อธิบาย กฎหมาย ลักษณะ พยาน หลักฐาน: สำนัก อบรม ศึกษา กฎหมาย แห่ง เนติบัณฑิต ย สภา.

วิภาส, แ. บ. เ., & บรรณาธิการ. นิติเวชศาสตร์ และ กฎหมาย การ แพทย์.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุธีรา ก้ออิสละ
วัน เดือน ปี เกิด	20 พฤษภาคม 2531
สถานที่เกิด	19/1 หมู่ที่2 ต.แม่จริม อ.แม่จริม จ.น่าน
วุฒิการศึกษา	ปี 2554 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ปี 2556 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	738 บ้านสุขศรีการ B832 ถนนพัฒนาการ แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กทม.

มหาวิทยาลัยศิลปากร