Original Article

การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับประเมินผลการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2556

สุคนธ์ ประดุจกาญจนา[1] จันทร์เพ็ญ ธนกิจโกเศรษฐ์[2]
สุวิทย์ เรืองกิตติสกุล[1] ชัยรัตน์ มานะเสถียรกิจ[5]
บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค[2] กวิน รัศมีไพศาล[6]
ปัทมา เหลืองวุฒิวงษ์[3] จินตนา ประดุจกาญจนา[1]*
ประภาพร ไขประภาย[4]

The 2013 Interlaboratory Comparison of Forensic Mitochondrial DNA Typing in Thailand.

Sukone Pradutkanchana[1], Suwit Rueangkittisakul[1], Budsaba Rerkamnuaychoke[2], Pattama Luangwuthiwong[3], Prapaporn Khaiprapai[4], Janpen Thanakitgosate[2], Chairat Manasatienkij[5], Kawin Rasmeepaisarn[6], Jintana Pradutkanchana[1]

[1]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90110, Thailand. [2]Human Genetics Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Ratchathewi, Bangkok, 10400, Thailand. [3]Sub Division of Forensic Biochemistry, Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, Royal Thai Police, Pathum Wan, Bangkok, 10330, Thailand. [4]Bureau of Forensic Biology, Central Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, Lak Si, Bangkok, 10210, Thailand. [5]Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bankok Noi, Bangkok, 10700, Thailand. [6]Serology Unit, Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Pathum Wan, Bangkok, 10330, Thailand.

***E-mail: jintana.pr@gmail.com**

Songkla Med J 2015;33(4):187-195

[1]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
[2]ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400 [3]กลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเขม่าดินปืน สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
[4]สำนักตรวจพิสูจน์ทางชีววิทยา สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210
[5]ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700
[6]หน่วยนิติเซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
รับต้นฉบับวันที่ 5 กันยายน 2557 รับลงตีพิมพ์วันที่ 14 มิถุนายน 2558

บทคัดย่อ:

วัตถุประสงค์: เพื่อประเมินผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2556

วัสดุและวิธีการ: แบ่งการประเมินเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่ง เป็นการประเมินผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ตัวอย่างเซลล์ควบคุม K562 และตัวอย่างคราบเลือดจากผู้ที่มีความสัมพันธ์บิดา-บุตร-มารดา บนแผ่นเมมเบรน FTA แต่ละห้องปฏิบัติการทำการสกัดดีเอ็นเอ และทำการทดสอบตามวิธีปกติตามที่ปฏิบัติงาน แล้วรายงานผลการทดสอบลงในแบบฟอร์มที่กำหนด และส่วนที่สอง เป็นโจทย์กรณีศึกษาด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ยาย-หลาน จำนวน 2 กรณี โดยห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งสามารถเลือกตอบหรือไม่ตอบส่วนที่สองได้

ผลการศึกษา: มีห้องปฏิบัติการ 5 แห่ง (ร้อยละ 83) ตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียบริเวณ hypervariable region I (HV I) และ hypervariable region II (HV II) ขณะที่ห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียครบทั้งช่วง control region การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการครั้งนี้พบว่ามีการรายงานผลการทดสอบคลาดเคลื่อนเฉลี่ยร้อยละ 19 (ค่าพิสัยอยู่ระหว่างร้อยละ 0-37) โดยมีห้องปฏิบัติการเพียง 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ที่มีการคำนวณค่าทางสถิติและระบุค่าทางสถิติไว้ในการรายงานผลการทดสอบ สำหรับโจทย์กรณีศึกษาพบว่าห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งตอบคำถามได้แตกต่างกันค่อนข้างมาก

สรุป: ควรจัดให้มีการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการด้านการตรวจไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ และควรกำหนดให้มีแนวปฏิบัติมาตรฐานสำหรับการทดสอบนี้ เพื่อให้แต่ละห้องปฏิบัติการใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการทดสอบนี้ให้มีมาตรฐานและลดความไม่สอดคล้องระหว่างห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทยลง

คำสำคัญ: การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ, นิติเวชศาสตร์, ประเทศไทย, ไมโตคอนเดรีย

Abstract:

Objective: To evaluate the results of the 2013 interlaboratory comparison of forensic mitochondrial deoxyribonucleic acid (DNA) typing.

Material and Method: The evaluation was divided into 2 parts. (1) Laboratory analysis was assessed using control cell K562 and blood stains from 3 suspects of father-child-mother on membrane. Each laboratory extracted DNA from these samples and performed the test following the standard routine protocol. The results were appended in the given forms and send back to the provider. (2) Hypothetical forensic case studies of grandmother and nieces were asked optionally. Each laboratory could select whether to answer the second part or not.

Results: Five laboratories (83%) analysed only hypervariable region I (HV I) and hypervariable region II (HV II) of mitochondrial DNA while only one laboratory (17%) analysed all regions of control region. The report of this interlaboratory comparison showed the average error rate from consensus polymorphism positions of 19% (range 0-37%). Only one laboratory calculated necessary forensic statistical values and showed these values within a report. For the hypothetical forensic case studies, the answers from each laboratory showed several variations.

Conclusion: A training workshop on forensic mitochondrial DNA typing should be organized. A standard guideline of the test should be released in order to provide high quality service and reduce inconsistent results among forensic laboratories in Thailand.

Keywords: forensic, interlaboratory comparison, mitochondria DNA typing, Thailand

บทนำ

เครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย เป็นองค์กรหนึ่งภายใต้สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ดำเนินการจัดทำการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับประเมินผลการทดสอบการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ ได้แก่ การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอบนออโตโซม การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมวาย การตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอบนโครโมโซมเอ็กซ์ และการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ มาตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2553[1] ในจำนวนการทดสอบเหล่านี้ การตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์เป็นการทดสอบที่มีการรายงานผลการทดสอบที่แตกต่างกันระหว่างห้องปฏิบัติการมากที่สุด จึงเป็นสาเหตุให้คณะผู้วิจัยให้ความสนใจที่จะวิเคราะห์หาสาเหตุที่ก่อให้เกิดความไม่สอดคล้องในการรายงานผลการทดสอบเฉพาะการทดสอบตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์เท่านั้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดแนวปฏิบัติที่ดีให้แต่ละห้องปฏิบัติการในการลดความไม่สอดคล้องของการรายงานผลการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ระหว่างห้องปฏิบัติการ และเพิ่มมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ให้เป็นเอกภาพมากยิ่งขึ้น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างตรวจ

ประกอบด้วยตัวอย่างควบคุม (เซลล์ K562): PT1-2013 และตัวอย่างคราบเลือดของผู้ที่มีความสัมพันธ์บิดา (PT2-2013)-บุตร (PT3-2013)-มารดา (PT4-2013) บนแผ่นเมมเบรน FTA (Whatman, ประเทศสหราชอาณาจักร) โดยบุคคลทั้งสามยินยอมให้เก็บตัวอย่างตรวจเพื่อใช้ในการประเมินการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการในครั้งนี้ ตัวอย่างตรวจบนแผ่นเมมเบรนดังกล่าวถูกส่งให้กับห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการทางไปรษณีย์ไม่ลงทะเบียน

ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วม

ปี พ.ศ. 2556 มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ จำนวน 6 แห่ง ในจำนวนนี้เป็นห้องปฏิบัติการในโรงเรียนแพทย์ (มหาวิทยาลัย) จำนวน 4 แห่ง (ร้อยละ 67) และเป็นห้องปฏิบัติการในสถาบันทางนิติเวชศาสตร์ ซึ่งเป็นหน่วยงานราชการ จำนวน 2 แห่ง (ร้อยละ 33) แต่ละห้องปฏิบัติการทำการทดสอบเริ่มตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง การวิเคราะห์ลำดับเบส การเปรียบเทียบและบันทึกตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิง และการวิเคราะห์ค่าทางสถิติตามวิธีการปกติที่ทดสอบเป็นงานประจำของห้องปฏิบัติการนั้นๆ แล้วรายงานผลการทดสอบลงในแบบฟอร์มที่กำหนด

เกณฑ์การตัดสินใจ

ตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงที่มีห้องปฏิบัติการรายงานผลเหมือนกันตั้งแต่ 3 แห่งขึ้นไป ถือเป็นเกณฑ์การตัดสินว่าเป็นตำแหน่งที่สอดคล้องกัน การรายงานผลการตรวจที่แตกต่างจากตำแหน่งที่สอดคล้องกันนี้ ถือเป็นการรายงานผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้อง

วิเคราะห์กรณีศึกษาเพิ่มเติม

โจทย์กรณีศึกษาเพิ่มเติม จำนวน 2 ข้อ หนึ่งในสองข้อเป็นกรณีศึกษาเรื่อง การเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียเปรียบเทียบความสัมพันธ์ยาย (PTF-2013) กับหลานสองคน (PTD-2013 และ PTE-2013) โดยยายกับหลาน (PTD-2013) มีรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียเหมือนกันทุกตำแหน่ง แต่ยายกับหลาน (PTE-2013) มีรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียต่างกัน 1 ตำแหน่ง โจทย์กรณีศึกษานี้เป็นทางเลือกที่ห้องปฏิบัติการสามารถเลือกตอบหรือไม่ตอบได้ โดยไม่มีผลต่อการพิจารณามอบหนังสือรับรองการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์

ผลการศึกษา

การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการจำนวน 5 แห่ง (ร้อยละ 83) ตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียบริเวณ hypervariable region I (HV I) และ hypervariable region II (HV II) ขณะที่ห้องปฏิบัติการอีก 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ตรวจวิเคราะห์ไมโตคอนเดรียครบทั้งช่วง control region ดังนั้นตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงที่สอดคล้องกันของแต่ละตัวอย่างจึงเป็นบริเวณ HV I และ HV II เท่านั้น (ตารางที่ 1)

การทดสอบไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ประจำปี พ.ศ. 2556 มีการรายงานผลการทดสอบไม่สอดคล้อง เมื่อวิเคราะห์จากข้อมูลดิบพบว่ามีอัตราความไม่สอดคล้องเฉลี่ยร้อยละ 19 (ค่าพิสัยอยู่ระหว่างร้อยละ 0-37) (ตารางที่ 2)

ในจำนวนห้องปฏิบัติการทั้ง 6 แห่งที่เข้าร่วมโครงการนี้ มีห้องปฏิบัติการเพียง 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ที่มีการคำนวณค่าทางสถิติ likelihood ratio (LR) และ Posterior Probability (W) โดยมีการระบุค่าทางสถิติเหล่านี้ไว้ในการรายงานผลการทดสอบด้วย ส่วนอีก 5 ห้องปฏิบัติการที่เหลือ เป็นการรายงานผลการทดสอบโดยการเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรีย (haplotype) ของตัวอย่างตรวจทั้งสาม แล้วแปลผลการทดสอบว่ามีความสัมพันธ์เป็นญาติร่วมบรรพบุรุษสายมารดาเดียวกันหรือไม่

กรณีศึกษาเพิ่มเติม

จากโจทย์กรณีศึกษาที่กำหนดรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียของผู้เกี่ยวข้องทั้งยายและหลานสองคนชัดเจน แต่การตอบคำถามจากห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งยังมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียของตัวอย่างตรวจที่ใช้ในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ ปี พ.ศ. 2556 จำนวน 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างตรวจ	บริเวณที่ทดสอบ		ตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงที่สอดคล้องกัน
	HV I	HV II	
PT1-2013	16024-16365	73-340	16126C, 16294T, 16296T, 16324C, 73G, 263G, 310D, 311D, 312D, 313D
PT2-2013	16024-16365	73-340	16193T, 16223T, 16291T, 73G, 150T, 152C, 263G, 309.1C, 315.1C, 337D
PT3-2013 และ PT4-2013	16024-16365	73-340	16140C, 16183C, 16189C, 16266A, 73G, 210G, 263G, 309.1C, 315.1C

ตารางที่ 2 จำนวนตำแหน่งที่รายงานผลการทดสอบไม่สอดคล้องกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ

ลำดับที่	รหัสห้องปฏิบัติการ*	HV I					HV II					รวมตำแหน่งที่รายงานผลการทดสอบคลาดเคลื่อน	อัตราการรายงานผลการทดสอบคลาดเคลื่อน (ร้อยละ)
		PT1-2013	PT2-2013	PT3-2013	PT4-2013	รวม	PT1-2013	PT2-2013	PT3-2013	PT4-2013	รวม		
1	L01	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	3	3/38 (8)
2	L06	0	0	1	1	2	4	3	2	2	11	13	13/38 (34)
3	L09	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	2	2/38 (5)
4	L10	0	0	2	2	4	3	4	0	0	7	11	11/38 (29)
5	L11	0	0	0	0	0	5	3	3	3	14	14	14/38 (37)
6	L13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/38 (0)
รวม		**0**	**0**	**4**	**4**	**8**	**15**	**10**	**5**	**5**	**35**	**43**	**43/228 (19)**

*รหัสห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการสำหรับตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2556

ตารางที่ 3 การตอบคำถามกรณีศึกษาเรื่องการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียเพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ยาย-หลาน ของแต่ละห้องปฏิบัติการ

รายละเอียด	จำนวนห้องปฏิบัติการ/รวมห้องปฏิบัติการทั้งสิ้น (ร้อยละ)
กรณี ยาย (PTF-2013) กับ หลาน (PTD-2013)	
1. มีการวิเคราะห์ทางสถิติ	1/6 (17)
2. การรายงานผลการทดสอบ	
-สามารถสรุปความสัมพันธ์ยาย-หลานได้	4/6 (67)
-ข้อมูลไม่เพียงพอ	1/6 (17)
-ไม่รายงานผล	1/6 (17)
กรณี ยาย (PTF-2013) กับ หลาน (PTE-2013)	
1. ไม่มีการวิเคราะห์ทางสถิติ	6/6 (100)
2. ระบุว่าข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับการตัดสินใจ	4/6 (67)
3. ต้องการข้อมูลเพิ่มเติม	
-Autosomal STR	1/6 (17)
-Autosomal STR หรือไมโตคอนเดรียบริเวณ coding region	1/6 (17)
-X-STR	1/6 (17)
-ฐานข้อมูลไมโตคอนเดรียในประชากรไทย	1/6 (17)
4. การรายงานผลการทดสอบ	
-ไม่สามารถสรุปผลได้	3/6 (50)
-ไม่ปฏิเสธความสัมพันธ์ยาย-หลาน	2/6 (33)
-ไม่รายงานผล	1/6 (17)

วิจารณ์

แม้ว่ามีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ประจำปี พ.ศ. 2556 จำนวน 13 แห่งก็ตาม แต่มีห้องปฏิบัติการเพียง 6 แห่งเท่านั้น (ร้อยละ 46) ที่ร่วมเปรียบเทียบการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบนี้จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะที่สูงมาก มีความชำนาญหรือเชี่ยวชาญเฉพาะด้านการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส จึงทำให้ขาดแคลนบุคลากรที่จะปฏิบัติงานทางด้านนี้ อีกทั้งการทดสอบนี้เป็นการทดสอบที่มีค่าใช้จ่ายสูง มีขั้นตอนการทดสอบยุ่งยาก ใช้เวลาทำการทดสอบนาน อาจไม่คุ้มค่าต่อการลงทุนจัดตั้งการทดสอบนี้ขึ้นในห้องปฏิบัติการ จึงทำให้การทดสอบนี้ส่วนใหญ่จำกัดอยู่เพียงห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยที่มีโรงเรียนแพทย์และสถาบันทางนิติเวชศาสตร์ที่มีขนาดใหญ่เท่านั้น

จะเห็นว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ร้อยละ 83 ทำการทดสอบไมโตคอนเดรียเฉพาะบริเวณ HV I และ HV II เท่านั้น ขณะที่มีห้องปฏิบัติการเพียงหนึ่งแห่งที่ทดสอบครอบคลุมทั้ง control region (HV I, Variable region I (VR I), HV II, VR II และ HV III: ตำแหน่งที่ 16024-16569 และ 1-574) ทำให้ตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงที่สอดคล้องกันจำกัดอยู่ในช่วงบริเวณ HV I และ HV II เท่านั้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า ประมาณหนึ่งในห้าของบุคคลที่มีรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียบริเวณ HV I และ HV II เหมือนกันทุกตำแหน่ง สามารถแยกออกจากกันได้โดยการตรวจลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียบริเวณ HV III เพิ่มเติม[2,3] และการใช้ลำดับเบสบริเวณ HV III ร่วมกับ HV I และ HV II สามารถช่วยเพิ่ม haplotype diversity จาก 0.992 เป็น 0.995 ได้[4] ดังนั้นการทดสอบบริเวณ HV III เพิ่มขึ้นหรือการทดสอบไมโตคอนเดรียให้คลอบคลุมทั้งบริเวณ control region จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้ในงานด้านนิติเวชศาสตร์ในอนาคต เพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกแยะบุคคลที่ไม่ใช่ญาติร่วมบรรพบุรุษสายมารดาเดียวกันออกจากกันได้

การรายงานผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้อง เกิดได้จากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ (1) การบันทึกตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงผิดพลาด (2) คุณภาพของผลการทดสอบลำดับเบส (sequence quality) ไม่สูง จึงทำให้อ่านผลการทดสอบบางตำแหน่งได้ไม่ชัดเจน (3) การอ่านผลการทดสอบบริเวณ C-Stretch ซึ่งเป็น length heteroplasmy ไม่สามารถระบุจำนวนเบส C ได้ชัดเจน และ (4) เกิด point heteroplasmy ขึ้นบางตำแหน่ง ทำให้อ่านผลการทดสอบผิดพลาดได้

ความผิดพลาดจากการบันทึกตำแหน่งที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิง เป็นความผิดพลาดที่สามารถหลีกเลี่ยงได้ เนื่องจากผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสจาก electropherogram ยังมีความถูกต้อง แต่เป็นปัญหาจากทักษะและความชำนาญด้านการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการจัดเรียงตำแหน่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid alignment; DNA alignment) ของบุคลากรในห้องปฏิบัติการยังไม่มากเพียงพอที่จะตัดสินใจแก้ไขลำดับเบสที่แตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิงที่ถูกรายงานโดยโปรแกรม ปัญหานี้จะลดลงอย่างมากหากการเปรียบเทียบลำดับเบสกับสายดีเอ็นเออ้างอิงเป็นไปตามข้อกำหนดการบันทึกความแตกต่างของลำดับเบสไมโตคอนเดรียบริเวณ control region เมื่อเปรียบเทียบกับสายดีเอ็นเออ้างอิงตามที่แนะนำโดย Wilson และคณะ[5,6] อย่างไรก็ตามหากพิจารณาว่าความผิดพลาดจากการบันทึกความแตกต่างจากสายดีเอ็นเออ้างอิง เป็นข้อผิดพลาดเพียงเล็กน้อยที่สามารถมองข้ามไปได้ อัตราการรายงานผลการทดสอบคลาดเคลื่อนเฉลี่ยภายหลังปรับปรุงแล้ว จะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 11 โดยมีค่าพิสัยอยู่ระหว่างร้อยละ 0-34 และจะมีห้องปฏิบัติการจำนวน 2 แห่งที่ไม่พบความคลาดเคลื่อนของการรายงานผลการทดสอบเลย (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

คณะทำงานวิทยาศาสตร์ด้านวิธีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods; SWGDAM) ได้เสนอแนวปฏิบัติสำหรับการแปลผลการตรวจลำดับเบสบนไมโตคอนเดรียว่ากรณีที่ผลการตรวจเปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียของผู้รับการตรวจเหมือนกันทุกตำแหน่ง หรือ

ไม่สามารถคัดออกจากการเป็นตัวอย่างตรวจของบุคคลเดียวกันหรือมีความสัมพันธ์ร่วมบรรพบุรุษสายมารดาเดียวกัน จะต้องมีการคำนวณค่าน้ำหนักวัตถุพยาน หรือคำนวณค่าทางสถิติเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจ[7] แต่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีห้องปฏิบัติการเพียง 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ที่มีการคำนวณค่าทางสถิติ LR และ W เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ Proficiency testing สำหรับการทดสอบไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ในต่างประเทศ พบว่าห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 31 แห่ง ทุกแห่งมีการคำนวณค่าทางสถิติ (ร้อยละ 100) แต่สูตรคำนวณค่าความถี่ของการพบรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียมีความแตกต่างกันถึง 4 สูตร สูตรคำนวณค่า LR แตกต่างกัน 2 สูตร มีการใช้รูปแบบการค้นหา (match type) แหล่งข้อมูล (data source) และฐานข้อมูลประชากรแตกต่างกัน จึงทำให้ค่าทางสถิติ LR ที่คำนวณได้แตกต่างกัน ตั้งแต่ 32-333 เท่า[8] ดังนั้นนอกเหนือจากการกระตุ้นเตือนให้แต่ละห้องปฏิบัติการเห็นความสำคัญของการคำนวณค่าทางสถิติประกอบการรายงานผลการทดสอบให้สมบูรณ์ และมีมาตรฐานเป็นไปตามข้อกำหนดของ SWGDAM แล้ว การทำความตกลงระหว่างห้องปฏิบัติการที่จะเลือก (1) สูตรคำนวณค่าความถี่รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรีย (2) สูตรคำนวณค่าสถิติ LR (3) รูปแบบการค้นหา (4) แหล่งข้อมูล และ (5) ฐานข้อมูลประชากรก็เป็นเรื่องสำคัญที่จะทำให้การคำนวณค่าทางสถิติในงานตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ของประเทศไทยมีมาตรฐานสอดคล้องกัน และเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

การตอบคำถามกรณีศึกษาเรื่องการตรวจพิสูจน์ความสัมพันธ์ยาย-หลาน (ตารางที่ 3) นั้น ได้แบ่งคำถามเป็น 2 กรณี กรณีแรก ยาย (PTF-2013) กับ หลาน (PTD-2013) ที่มีรูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียเหมือนกันทุกตำแหน่ง กรณีนี้สามารถสรุปความสัมพันธ์ยาย-หลานได้ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ (ร้อยละ 67) สามารถสรุปความสัมพันธ์ของผู้รับการตรวจสองคนนี้ได้ แต่มีห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง ตอบแตกต่างไป นั่นคือห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ตอบว่าข้อมูลที่ให้มาไม่เพียงพอ และห้องปฏิบัติการอีก 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ไม่รายงานผลการทดสอบ จากเหตุการณ์นี้สะท้อนให้เห็นว่าผู้ปฏิบัติงานบางส่วนยังขาดความมั่นใจในการรายงานผลการตรวจ

กรณีที่สอง การตรวจความสัมพันธ์ยาย (PTF-2013) กับหลาน (PTE-2013) เป็นกรณีที่รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียมีความแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นกรณีที่ "ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ได้" ต้องการข้อมูลเพิ่มเพื่อมาช่วยในการตัดสินใจ กรณีนี้พบไม่บ่อยนักในการปฏิบัติงานจริง ซึ่งห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ตอบไปในทิศทางเดียวกัน โดยครึ่งหนึ่งของห้องปฏิบัติการตอบว่าไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ของผู้รับการตรวจคู่นี้ได้ ห้องปฏิบัติการร้อยละ 67 ระบุว่าข้อมูลที่ให้มาไม่เพียงพอต่อการตัดสินใจ โดยจำเป็นต้องมีข้อมูลผลการตรวจดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น autosomal STR (ร้อยละ 17) autosomal STR หรือ ไมโตคอนเดรียบริเวณ coding region (ร้อยละ 17) X-STR (ร้อยละ 17) และฐานข้อมูลไมโตคอนเดรียในประชาการไทย (ร้อยละ 17) แต่เป็นที่น่าแปลกใจที่มีห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง (ร้อยละ 33) ระบุว่าไม่สามารถปฏิเสธความสัมพันธ์ยาย-หลานคู่นี้ได้ ซึ่งเป็นการยอมรับว่าผู้รับการตรวจทั้งสองมีความสัมพันธ์ยาย-หลานกัน โดยไม่ดูข้อมูลอื่นประกอบ ขณะที่มีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง (ร้อยละ 17) ไม่รายงานผลการทดสอบ ผลที่ได้จากการตอบคำถามนี้แสดงให้เห็นว่าผู้ปฏิบัติงานด้านนี้อีกประมาณครึ่งหนึ่งยังขาดความรู้ความเข้าใจในการจัดการกรณีปัญหาเหล่านี้ ดังนั้นผู้วิจัยคิดว่าการจัดให้มีการอบรมการตรวจพิสูจน์รูปแบบดีเอ็นเอบนไมโตคอนเดรียให้มีมาตรฐานเป็นไปตามแนวปฏิบัติที่กำหนดโดย SWGDAM[7] เป็นสิ่งที่ควรกระทำ

สรุป

การตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์เป็นการทดสอบที่มีการรายงานผลการทดสอบแตกต่างกันมากที่สุดในการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ประจำปี พ.ศ. 2556 ทั้งนี้เนื่องจากบุคลากรส่วนหนึ่ง

ยังขาดทักษะ ความรู้ ความชำนาญ ในการทำการทดสอบ การวิเคราะห์ผลการทดสอบ คำนวณค่าทางสถิติ และการรายงานการทดสอบ ดังนั้นการจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการให้เข้าใจถึงกระบวนการทดสอบในแต่ละขั้นตอนจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนั้นยังควรจัดให้มีแนวปฏิบัติมาตรฐานสำหรับการทดสอบไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ เพื่อให้แต่ละห้องปฏิบัติการใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการทดสอบนี้ให้มีมาตรฐานและลดความไม่สอดคล้องระหว่างห้องปฏิบัติการลง

ความขัดแย้งทางผลประโยชน์

การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ เป็นหนึ่งในกิจกรรมประจำปีของเครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย โดยแต่ละสถาบันที่เป็นสมาชิกเครือข่ายฯ หมุนเวียนกันเป็นเจ้าภาพ ในปี พ.ศ. 2556 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รับผิดชอบเป็นเจ้าภาพ ดำเนินการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการโดยไม่ขอรับการสนับสนุนทางการเงินจากหน่วยงานใดๆ ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งที่เข้าร่วมโครงการนี้มีอิสระอย่างเต็มที่ในการทำการทดสอบ วิเคราะห์ผลการทดสอบ รายงานผลการทดสอบ และ/หรือ ตอบกรณีศึกษาเพิ่มเติม โดยปราศจากการแทรกแซงจากหน่วยงานหรือบุคคลภายนอก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเครือข่ายนิติ-พันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนให้จัดกิจกรรมเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์ในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประสานงานทุกท่านจากทุกสถาบันที่เป็นสมาชิกเครือข่ายนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยที่เข้าร่วมการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ไมโตคอนเดรียทางนิติเวชศาสตร์ประจำปี พ.ศ. 2556 ได้แก่ (1) กลุ่มงานตรวจเลือดชีวเคมีและเขม่าดินปืน สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ (2) สำนักตรวจพิสูจน์ทางชีววิทยา สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม (3) ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (4) หน่วยนิติซีโรโลยี่ วัตถุพยาน ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (5) หน่วยนิติ-เซโรวิทยา ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ (6) หน่วยนิติเวชศาสตร์และพิษวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

1. Sinkhan N, Duangshatome W, Jaitrong W, et al. The 2012 interlaboratory comparison of forensic DNA typing in Thailand. Songkla Med J 2014; 32: 207 - 17.
2. Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, et al. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in sample that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? Forensic Sci Int 2000; 113: 97 - 101.
3. Fridman C, Gonzalez RS. HV III discrimination power to distinguish HV I and HV II common sequences. Forensic Sci Int Genet 2009; (Suppl 2): S320 - 1.
4. Bini C, Ceccardi S, Luiselli D et al. Different informativeness of the three hypervariable mitochondrial DNA regions in the population of Bologna (Italy). Forensic Sci Int 2003; 135: 48 - 52.
5. Wilson MR, Allard MW, Monson K, et al. Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. Forensic Sci Int 2002; 129: 35 - 42.
6. Wilson MR, Allard MW, Monson KL, et al. Further discussion of the consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. Forensic Sci Com [serial on the Internet] 2002 Oct

[cited 2014 April 25]; 4(4). Available from: http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/oct2002/wilson.htm

7. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Guidelines for mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide sequence interpretation. Forensic Sci Com [serial on the Internet] 2003 Apr [cited 2014 April 25]; 5(2). Available from: http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm
8. Prieto L, Alves C, Zimmermann B et al. GHEP-ISFG proficiency test 2011: paper challenge on evaluation of mitochondrial DNA results. Forensic Sci Int Genet 2013; 7: 10 - 5.