

คู่มือปฏิบัติงาน
เรื่อง การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยเครื่องอัตโนมัติ
Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer

ทนพ.ปกพล คีรีลักษณ์

ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ ระดับ ปฏิบัติการ

หน่วย อณูกายวิภาควิทยาและนิติเวช

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2569

คำนำ

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (fragment and sequencings analysis) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วขึ้นโดยการนำตัวอย่างที่มีความพร้อมในการตรวจมาทำการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติ Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer โดยอาศัยหลักการ capillary electrophoresis ซึ่งกระบวนการดังกล่าวสามารถเข้ามาช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้ ส่งผลให้กลุ่มผู้รับบริการได้รับผลการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็วเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

สิ่งที่จะกล่าวในคู่มือเล่มนี้จะบ่งบอกถึง องค์ความรู้ต่างๆในส่วนของการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมรูปแบบของ fragment analysis และยังนำองค์ความรู้ของคู่มือฉบับนี้ ไปประยุกต์ในการใช้เครื่อง Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer ซึ่งจะอธิบายเริ่มตั้งแต่กระบวนการเตรียมตัวอย่าง กระบวนการตรวจวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์ กระบวนการแปลผล การดูแลรักษาเครื่องมือ ตลอดจนการแก้ปัญหาของเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมเบื้องต้นอีกด้วย ผู้เขียนยังได้นำองค์ความรู้และประสบการณ์การทำงานกับเครื่องมือ ในการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมถ่ายทอดลงไปในคู่มือเล่มนี้ด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำงานกับเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมดังกล่าว

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าองค์ความรู้และประสบการณ์ในการทำงานที่ถ่ายทอดลงไปในคู่มือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ในการปฏิบัติงานแก่ นักเทคนิคการแพทย์ แพทย์ นักศึกษา ตลอดจนบุคลากรทางการแพทย์ที่มีความเกี่ยวข้องในการทำงานเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน และรวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง และการวิจัยปรับปรุงพัฒนาด้านการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมต่อไปในอนาคต

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ทนพญ. จิตนา ประดุญกาณจนา นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ ผู้ซึ่งให้การสนับสนุนในการจัดทำคู่มือและ ยังเป็นทั้งผู้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำคู่มือเป็นอย่างมาก และ ทั้งนี้ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานใน หน่วยอณูพยาธิวิทยา กายวิภาคและนิติเวช งานพยาธิวิทยาโมเลกุล ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนสามารถทำคู่มือเล่มนี้จนสำเร็จด้วยดี

ทนพ.ปกพล คีรีลักษณ์
ผู้เขียน
เดือน มิถุนายน 2568

สารบัญ

คำนำ ก

สารบัญ ข

สารบัญภาพ ง

สารบัญตาราง ฉ

สารบัญแผนภูมิ ช

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ 3

ขอบเขต 3

นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ 4

บทที่ 2 บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ 7

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่ง 7

ลักษณะงานที่ปฏิบัติ 8

โครงสร้างบริหารจัดการ 10

บทที่ 3 หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข 14

หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน 14

วิธีการปฏิบัติงาน 15

เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน 19

แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

บทที่ 4 เทคนิคในการปฏิบัติงาน 38

แผนปฏิบัติงาน 38

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน 40

วิธีการติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน 75

จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน 76

บทที่ 5 ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน 77

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน 77

ข้อเสนอแนะ 79

สารบัญ (ต่อ)

บรรณานุกรม 80

ประวัติผู้เขียน 82

สารบัญภาพ

ภาพ 1 องค์ประกอบสำคัญขั้นต่ำของ CoC 24
ภาพ 2 ลักษณะการเรียงตัวของ VNTR 27
ภาพ 3 ช่วงความยาวคลื่นของสีย้อม fluorescence dye 28
ภาพ 4 โครงสร้างไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของมนุษย์ 31
ภาพ 5 ลักษณะของ peak ที่เป็น ST และ AT 33
ภาพ 6 การคำนวณ Heterozygote peak height ratio (PHR) 34
ภาพ 7 ลักษณะ peak ที่เป็น shutter 34
ภาพ 8 ลักษณะ peak ที่เป็น Pull-up และ spike artifact 35
ภาพ 9 ลักษณะ peak ที่เป็น microvariant allele 36
ภาพ 10 หนังสือสัญญายินยอมให้ตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรม (1) 41
ภาพ 11 หนังสือสัญญายินยอมให้ตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรม (2) 42
ภาพ 12 ซองบรรจุและป้ายกำกับสิ่งส่งตรวจ 43
ภาพ 13 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (1) 44
ภาพ 14 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (2) 45
ภาพ 15 ขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นผิวเลนส์วัด 46
ภาพ 16 ขั้นตอนการตั้งค่า blank ก่อนวัดตัวอย่างจริง 46
ภาพ 17 วิธีวัดตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 47
ภาพ 18 น้ำยา VeriFiler™ Plus PCR Amplification 50
ภาพ 19 ขั้นตอนการประกอบ plate 55
ภาพ 20 ตำแหน่งปุ่มเปิด/ปิดและสถานะสัญญาณไฟของเครื่อง 56
ภาพ 21 ไอคอนสถานะ server ของเครื่อง 58
ภาพ 22 ไอคอนโปรแกรมของเครื่องอัตโนมัติ 58
ภาพ 23 Dashboard โปรแกรมของเครื่อง ABI 3500 59
ภาพ 24 ปุ่มคำสั่งสร้าง plate สำหรับตรวจวิเคราะห์ 59
ภาพ 25 หน้าต่างกำหนดลักษณะ plate ในการวิเคราะห์ (1) 60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ 26 หน้าต่างกำหนดลักษณะ plate ในการวิเคราะห์ (2) 60
ภาพ 27 สถานะการเชื่อมต่อ plate กับเครื่องตรวจวิเคราะห์ 61
ภาพ 28 ไอคอนโปรแกรม GeneMapper™ 62
ภาพ 29 หน้าต่าง login โปรแกรม GeneMapper™ 62
ภาพ 30 หน้าต่างหลักของโปรแกรม GeneMapper™ 63
ภาพ 31 ขั้นตอนการใช้ raw data files เพื่อวิเคราะห์ (1) 63
ภาพ 32 ขั้นตอนการใช้ raw data files เพื่อวิเคราะห์ (2) 64
ภาพ 33 การตั้งค่าการวิเคราะห์ตัวอย่าง 64
ภาพ 34 ขั้นตอนเข้าดูผลตัวอย่างที่ผ่าน allele calling 65
ภาพ 35 Electropherogram ของตัวอย่างวิเคราะห์ 65
ภาพ 36 Parameter ของตัวอย่างในโปรแกรม GeneMapper™ 66
ภาพ 37 ผล Allelic ladder electropherogram ที่ถูกต้อง 67
ภาพ 38 ผล electropherogram ที่สามารถออกผลได้ 67
ภาพ 39 ไอคอนโปรแกรม PSU_Calpat 68
ภาพ 40 Dashboard ของโปรแกรม PSU_Calpat 69
ภาพ 41 หน้าต่างลงข้อมูลตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (1) 69
ภาพ 42 หน้าต่างลงข้อมูลตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (2) 70
ภาพ 43 หน้าต่างลงข้อมูลตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (3) 70
ภาพ 44 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (1) 71
ภาพ 45 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (2) 71
ภาพ 46 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (3) 72
ภาพ 47 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (4) 72
ภาพ 48 รายงานผลการตรวจวิเคราะห์ 74

สารบัญตาราง

ตาราง 1 อัตราส่วนสำหรับการเตรียม master mix ต่อ 1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ 51
ตาราง 2 ปริมาณของ DNA TEMPLATE ที่เติมลงไปในแต่ละ REACTION 51
ตาราง 3 PCR CODITION สำหรับการทำ ASTR ที่ใช้กับน้ำยา VF-PLUS 52
ตาราง 4 อัตราส่วนสำหรับ SIZE STD แต่ละ REACTION 54
ตาราง 5 ตารางบอกสถานะเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 genetic analyze 57
ตาราง 6 TECHNICAL CHECK และ ADMINISTRATIVE CHECK 73
ตาราง 7 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน 77

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิ 1 โครงสร้างองค์กร (Organization chart) 11
แผนภูมิ 2 โครงการบริหารการบริการ (Administration chart) 12
แผนภูมิ 3 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (activity chart) 13
แผนภูมิ 4 กระบวนการหลักในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ 39

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก หรือที่รู้จักในชื่อ ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid; DNA) เป็นโมเลกุลชีวภาพที่มีความซับซ้อน ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บรักษาและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยสารพันธุกรรมของมนุษย์กำหนดลักษณะเฉพาะบุคคลและสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไป กระบวนการดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยดีเอ็นเอยังเป็นคลังข้อมูลที่สะท้อนสู่แง่สุขภาพ และลักษณะทางกายภาพที่แสดงออกรวมถึงข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่และการทำงานของระบบต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ นอกจากนี้ดีเอ็นเอยังเก็บข้อมูลที่ใช้ระบุตัวบุคคลได้ด้วยสารพันธุกรรมถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1869 โดยนักชีวเคมีชาวสวิส โยฮันน์ ฟรีดริช มีเชอร์ (Johann friedrich miescher) ซึ่งเรียกสารที่พบว่า “นิวคลีอิน” (nuclein) ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 เจมส์ วัตสัน (James watson) และฟรานซิส คริก (Francis crick) เสนอแบบจำลองโครงสร้างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้เข้าใจกระบวนการถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่นได้อย่างเป็นระบบ จากองค์ความรู้ดังกล่าว พบว่าโครงสร้างของสารพันธุกรรมประกอบด้วยพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่จับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่าง “เบสคู่สม” โดยเบสไนโตรเจนมีสี่ชนิด ได้แก่ adenine และ guanine ซึ่งเป็นเบสตระกูล purine ส่วน cytosine และ thymine เป็นเบสตระกูลไพริมิดีน หลักการจับคู่คือ A จับคู่กับ T และ C จับคู่กับ G เสมอ จัดเรียงเป็นโครงสร้างเกลียวคู่ (double helix) แบบเวียนขวา คล้ายบันไดเวียน การจับคู่ในลักษณะนี้ทำให้เมื่อทราบลำดับเบสของสายหนึ่ง ก็สามารถทำนายลำดับของสายคู่สม (complementary strand) ได้อย่างแม่นยำและตรวจสอบได้ โดยปกติดีเอ็นเอของมนุษย์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ จะกำหนด “ยีน” (gene) ซึ่งเป็นหน่วยหน้าที่ของพันธุกรรม การทำงานของยีนถูกควบคุมโดยโมเลกุลชีวภาพหลายชนิดทำให้เกิดการควบคุมการทำงานของเซลล์และลักษณะทางพันธุกรรมที่แสดงออกภายนอก (phenotype) ซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่าความรู้เชิงโครงสร้างและการจับคู่ของดีเอ็นเอนี้จึงเป็นรากฐานสำคัญของวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ รวมทั้งนิติวิทยาศาสตร์ ชีวการแพทย์ และชีวโมเลกุลสมัยใหม่ทางด้านการแพทย์และต่อยอดไปสู่สาขา นิติเวชศาสตร์ และอื่นๆ อีกมากมาย[1]

การพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ โดยอาศัยการตรวจตำแหน่งที่มีการซ้ำของเบสในลำดับสั้นๆที่เรียกว่า short tandem repeats (STRs) ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มี

ดับเบสสั้นๆ และซ้ำกันเป็นชุดติดกัน โดยจำนวนชุดที่ซ้ำจะมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ลักษณะดังกล่าวจะกระจายอยู่บนโครโมโซมร่างกาย (autosomal) การวิเคราะห์ตำแหน่งเบสเหล่านี้ สามารถทำการตรวจได้ด้วย ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายให้เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ หลังจากนั้นจึงอ่านผลเพื่อกำหนดจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่ง วิธีนี้ได้รับการใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลกและเป็นหนึ่งในแกนหลักของการระบุตัวบุคคล

ปัจจุบันการพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ หน่วยอณูพยาธิวิทยากายวิภาคและนิติเวช งานพยาธิวิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มีอัตราค่าบริการอยู่ที่ 4,000 บาทต่อราย โดยการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลดำเนินการด้วยเทคนิค capillary electrophoresis (CE) บนเครื่องอัตโนมัติ Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (ABI 3500 GA) ทั้งนี้งานตรวจความสัมพันธ์ทางสายโลหิต (บิดา–มารดา–บุตร) ได้เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison; ILC) กับสมาคมนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย (forensic DNA network of thailand) เพื่อยืนยันว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ และสร้างความน่าเชื่อถือแก่ผู้รับบริการ[2]

จากข้อมูลพบว่า ความต้องการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี ทั้งในกลุ่มคดีอาญาและกรณีบุคคลสูญหาย และเพื่อสนับสนุนหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว นับว่าการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลจำเป็นต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจอย่างลึกซึ้งทั้งทางนิติเวชศาสตร์ (forensic medicine) และอณูชีววิทยา (molecular biology) ควบคู่กับทักษะการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ (laboratory skills) ที่ถูกต้องเพื่อบรรเทาความคลาดเคลื่อนของผลซึ่งอาจเกิดจากผู้ปฏิบัติงาน (human error) นอกจากนี้ขั้นตอนการแปลผลยังต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้เชี่ยวชาญเป็นองค์ประกอบสำคัญ ดังที่กล่าวมาการตรวจความสัมพันธ์ทางสายโลหิตเป็นงานที่มีความซับซ้อน ทั้งในเชิงปฏิบัติการและการตีความผลจึงมีเหตุอันสมควรในการจัดทำ “คู่มือการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 GA ให้เป็นเอกสารมาตรฐานประจำหน่วย

ความสำคัญของคู่มือเล่มนี้ คือทำหน้าที่เป็นแนวทางปฏิบัติงานมาตรฐานที่ครบถ้วนและใช้งานได้จริงโดยเจ้าหน้าที่ใหม่สามารถอ่านแล้วปฏิบัติงานได้ทันที ภายใต้การกำกับดูแลของเจ้าหน้าที่ให้ห้องปฏิบัติการ และนอกจากนี้คู่มือยังครอบคลุมลำดับขั้นตอนทั้งหมดตั้งแต่การรับตัวอย่างและการควบคุมเอกสาร (chain of custody; CoC) วิธีปฏิบัติในห้องปฏิบัติการและการควบคุมคุณภาพเกณฑ์การยอมรับผลพร้อมตัวอย่างการรายงาน ไปจนถึงข้อควรระวังและการแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้า อันจะช่วยลดความแปรปรวนระหว่างผู้ที่ปฏิบัติงาน โดยจะยกระดับความถูกต้องน่าเชื่อถือของผล และคงความสม่ำเสมอของบริการในภาพรวมของหน่วยงาน

วัตถุประสงค์

1. จัดทำเพื่อเป็นแนวทางปฏิบัติงานให้เป็นมาตรฐาน สำหรับการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยวิธี fragment analysis บนเครื่อง Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer ภายในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ หน่วยอณูพยาธิวิทยากายวิภาคและนิติเวช งานพยาธิวิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ครอบคลุมตั้งแต่รับตัวอย่างจนถึงการรายงานผล เพื่อใช้อ้างอิงในการให้บริการ
2. จัดทำเพื่อเป็นคู่มือภาษาไทยเพื่อการบริการและการเรียนรู้สำหรับ นักเทคนิคการแพทย์ แพทย์ที่ปฏิบัติงานอยู่ภายใต้ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อยกระดับความรู้ และทักษะการปฏิบัติงานให้ได้ผลตรวจที่ถูกต้อง รวดเร็ว แม่นยำ ตรวจสอบย้อนกลับได้

ขอบเขต

คู่มือการปฏิบัติการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลฉบับนี้จัดทำขึ้น เพื่อกำหนดกรอบหรือแนวทาง และขอบเขตการปฏิบัติงานด้านนิติพันธุศาสตร์ของห้องปฏิบัติการ ซึ่งเริ่มตั้งแต่กระบวนการก่อนการวิเคราะห์ (pre-analytical) ระหว่างการวิเคราะห์ (analytical) และหลังการวิเคราะห์ (post-analytical) ให้เป็นไปตามหลักวิชาการ มาตรฐานวิชาชีพ และระบบคุณภาพที่สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้

ขอบเขตของคู่มือได้ครอบคลุมการปฏิบัติงานตามลำดับขั้นตอนที่กำหนดไว้อย่างชัดเจน ได้แก่ การรับสิ่งส่งตรวจและตรวจสอบเอกสาร การลงทะเบียนและกำหนดรหัสตัวอย่าง การสกัดและวัดปริมาณสารพันธุกรรม การคำนวณและปรับปริมาณดีเอ็นเอให้เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแบบทวีคูณ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ การวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ การตีความผลการตรวจวิเคราะห์ และการรายงานผลอย่างเป็นทางการ โดยทุกขั้นตอนเชื่อมโยงกับการควบคุมคุณภาพ การบันทึกข้อมูล และการตรวจสอบย้อนกลับตามระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

คู่มือฉบับนี้มุ่งเน้นการอธิบายขั้นตอนการปฏิบัติงานในเชิงปฏิบัติจริงของห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ด้านการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยครอบคลุมการควบคุมคุณภาพภายใน การติดตามและประเมินผลการปฏิบัติงาน การทบทวนผลการตรวจ และการประกันคุณภาพผ่านการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ สม่ำเสมอ และสามารถนำไปใช้เป็นหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ได้อย่างเหมาะสม

นิยามศัพท์เฉพาะ/คำจำกัดความ

เครื่องอัตโนมัติ Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (ABI 3500 GA) เป็นระบบที่แยกและวิเคราะห์ดีเอ็นเอตามน้ำหนักของขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านหลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary electrophoresis) แบบอัตโนมัติโดยใช้สีย้อมเรืองแสงหลายช่องสี และการอ่านสัญญาณจาก PCR product ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง fluorescent จึงเหมาะเป็นแกนกลางของงาน STRs profiling และงานวิเคราะห์ลำดับหรือวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็ก ในตัวเครื่องอัตโนมัติมีองค์ประกอบหลักประกอบด้วยเช่น ชุดหลอดคาพิลลารี (capillary array) จำนวน 8 เส้น สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาด เลเซอร์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวตรวจจับสัญญาณเรืองแสง พอลิเมอร์สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ทำหน้าที่เปลี่ยนสถานะไอออนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ รวมถึงสารมาตรฐานระบุขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (internal size standard) ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแน่นอน เติมลงในแต่ละตัวอย่างเพื่อใช้เทียบหาขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจวิเคราะห์ โดยรายงานเป็นจำนวนคู่เบส (bp) และซอฟต์แวร์ควบคุมประมวลผล การทำงานเริ่มจากดูดตัวอย่างผ่านหลอดขนาดเล็กด้วยแรงดันไฟฟ้า แยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาด แล้วตรวจวัดสัญญาณเรืองแสง โดยซอฟต์แวร์คำนวณขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป็นหน่วยคู่เบส (bp) เทียบกับสารมาตรฐานภายใน (internal lane standard; ILS) จากนั้นเปรียบเทียบกับชุดดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบหมายเลขอัลลีล (allelic ladder) เพื่อระบุหมายเลขอัลลีลของตัวอย่างในแต่ละตำแหน่ง STRs

การใช้งานต้องมีการสอบเทียบสเปกตรัม (spectral calibration) เพื่อที่จะสร้างเมทริกซ์แยกสีเพื่อลดการเกิดสัญญาณรบกวนข้ามช่องสี (pull-up หรือ bleed-through) ซึ่งเกิดจากการแยกสัญญาณสีเรืองแสงได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ปรากฏพีคแทรกในช่องสีอื่นและอาจทำให้แปลผลอัลลีลคลาดเคลื่อน การตั้งค่า แรงดันและเวลาในการฉีด การเลือกพอลิเมอร์และอุณหภูมิระหว่างการ injection ให้สอดคล้องกับน้ำยาชุดตรวจ และกำกับคุณภาพทุกชุดน้ำยาด้วยตัวอย่างควบคุมผลบวก/ผลลบ รวมถึงเกณฑ์ผ่านของ ladder/ILS นอกจากนี้มีการบำรุงรักษาตามรอบได้แก่ เปลี่ยนพอลิเมอร์และบัฟเฟอร์ การล้างหลอดคาพิลลารี การตรวจรอยรั่ว และการบันทึกผลการตรวจสอบสมรรถนะ (performance check) เพื่อความถูกต้องแม่นยำของผล โดยข้อดีของ ABI 3500 GA คือมีความเสถียรของสัญญาณ ความสามารถในการให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกันเมื่อทดสอบซ้ำ และกระบวนการอัตโนมัติที่ลดความเสี่ยงที่เกิดจากความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติงาน ข้อจำกัดที่ต้องระวังคือพีคอิ่มตัว (off-scale) จากตั้งค่า injection time ที่นานเกินไป การเกิดสเปกตรัมคลาดเคลื่อนหากไม่ได้ทำการสอบเทียบ (calibration) ตามรอบ และสัญญาณแทรกที่ไม่ใช่อัลลีลจริง (artifacts) เช่น พีคแทรกจากสัญญาณรบกวนข้ามช่องสี (pull-up) และพีคกว้างจากสีเรืองแสงอิสระที่ไม่ได้จับกับไพรเมอร์ (dye blob) ซึ่งอาจรบกวนการระบุอัลลีลของตัวอย่าง โดยสรุป เครื่อง ABI 3500 GA จัดว่าเป็น

เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติมาตรฐานสำหรับการอ่านผล STRs ในห้องปฏิบัติการที่พร้อมรองรับระบบคุณภาพ และการทวนสอบย้อนกลับได้ครบถ้วนตามข้อกำหนดวิชาชีพ[3]

การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล คือกระบวนการประยุกต์ตามหลักวิทยาศาสตร์และมาตรฐานวิชาชีพเพื่อระบุหรือยืนยันตัวบุคคลจากพยานหลักฐานทางชีวภาพและไม่ใช่ชีวภาพ ภายใต้ระบบคุณภาพที่สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ ครอบคลุมตั้งแต่การรับตัวอย่างเซลล์กระพุ้งแก้มบนไม้ป้ายแบบแห้งและตัวอย่างเลือดบนกระดาษ FTA card การเก็บรักษาตัวอย่างในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้อง หลีกเลี่ยงความร้อน ความชื้น และแสงแดด โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง การบรรจุตัวอย่างแต่ละรายแยกกันและส่งมอบจากจุดเก็บตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการภายในหน่วยงาน พร้อมบันทึกผู้ส่ง ผู้รับ และวันเวลารับส่ง เพื่อให้ตรวจสอบย้อนกลับได้ ก่อนนำตัวอย่างไปสกัดดีเอ็นเอและตรวจวิเคราะห์ STRs สำหรับพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ที่สอดคล้องกับหลักการห่วงโซ่วัตถุพยาน และต้องมีการทดสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคที่เหมาะสมเช่น การตรวจดีเอ็นเอแบบ STRs ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นแบบ PCR และการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านหลอดแก้วขนาดเล็ก รวมถึงการควบคุมคุณภาพ pre-analytics, analytic และ post-analytics ไปจนถึงการตีความผลด้วยกรอบสถิติที่เหมาะสม เช่น random match probability (RMP) หรือ likelihood ratio (LR) และการรายงานผลอย่างโปร่งใสสอดคล้องข้อกฎหมาย โดยมีจุดมุ่งหมายคือให้ได้ผลที่สามารถนำไปใช้ได้จริงทั้งเชิงวิทยาศาสตร์ และนิติวิทยาศาสตร์ โดยจำเป็นต้องยึดตามหลักมาตรฐานที่ยอมรับอาธิเช่น ISO/IEC 17025/15189 และแนวทางสาขา ENFSI/SWGDAM ในเอกสารนี้จะใช้ถ้อยคำ “การตรวจพิสูจน์อัตตลักษณ์บุคคล” ตามข้อเสนอของกรรมการ และระบุควบคู่ว่า “การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล” เป็นรูปสะกดที่ใช้แพร่หลายในวงวิชาการ เพื่อให้เกิดความเข้าใจร่วมกันและรองรับการสืบค้นอ้างอิงทั้งสองรูปแบบ[4]

แคพพะเลอรี อิเล็กโตรฟอริซีส (capillary electrophoresis, CE) ในเชิงงานนิติวิทยาศาสตร์หรือการตรวจสอบหลักฐานทางนิติเวช แคพพะเลอรีอิเล็กโตรฟอริซีส เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการแยกและวิเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างในที่เกิดเหตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ใช้ในการตรวจสอบ STRs ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการพิสูจน์ตัวบุคคลและเปรียบเทียบดีเอ็นเอจากตัวอย่างกับฐานข้อมูลดีเอ็นเอ

การทำงานในแลปนิติวิทยาศาสตร์จะเกี่ยวข้องกับการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ได้จากที่เกิดเหตุ เช่น เลือด น้ำลาย หรือเส้นผม จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR ทำให้เกิดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะถูกแยกผ่าน CE ในกระบวนการนี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านชุดหลอดคาพิลลารีขนาดเล็กตามขนาดและประจุ ทำให้สามารถระบุลำดับ STRs ที่เป็นเอกลักษณ์ของบุคคลได้ เครื่องมือ CE ที่ใช้ในงานนิติเวชสามารถเชื่อม

ต่อกับระบบตรวจจับแบบฟลูออเรสเซนซ์ที่ติดแท็กกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้สามารถบันทึกผลการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้อย่างแม่นยำ การวิเคราะห์ผลนี้สามารถใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างจากผู้ต้องสงสัยหรือจากฐานข้อมูล เพื่อระบุตัวตนหรือยืนยันความสัมพันธ์ของหลักฐาน

แฟรกเมนต์ อะแนลลิซิส (fragment analysis, FA) เป็นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragments) โดยในคู่มือนี้ใช้วิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ STRs ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสง แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอตามขนาดด้วยเทคนิคแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis; CE) ซึ่งขนาดของแฟรกเมนต์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมพร้อมทั้งส่วนของการลายพันธุ์ในตำแหน่งเฉพาะบนโครโมโซมได้ การวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (fragment analysis) นี้สามารถประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหลายด้าน ปัจจุปันการวิเคราะห์ STRs ถูกใช้เป็นการวิเคราะห์อัตลักษณ์บุคคลในงานนิติวิทยาศาสตร์โดยเป็นการตรวจสอบรูปแบบการซ้ำกันของดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites) เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมถึงการวิเคราะห์การกลายพันธุ์หรือการแปรปรวนในลำดับยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค[9]

ในบริบทของงานนิติวิทยาศาสตร์ FA มีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อระบุตัวตนหรือเชื่อมโยงตัวอย่างหลักฐานจากที่เกิดเหตุกับผู้ต้องสงสัย โดยนับเป็นหนึ่งในการใช้งานที่แพร่หลายคือการตรวจวิเคราะห์ STRs ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง และใช้ในการพิสูจน์ตัวบุคคล[5]

บทที่ 2
บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบ

บทบาทหน้าที่ความรับผิดชอบของตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์

นักเทคนิคการแพทย์ที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ เป็นผู้ปฏิบัติงานวิชาชีพที่มีบทบาทสำคัญในการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยลักษณะงานมิใช่เป็นเพียงงานตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่นับว่าเป็นงานที่ต้องอาศัยความรู้เฉพาะทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ นิติพันธุศาสตร์ ชีววิทยาโมเลกุล พันธุศาสตร์มนุษย์ และระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการร่วมกันอย่างเป็นระบบ ผู้ปฏิบัติงานต้องสามารถเชื่อมโยงความรู้ตั้งแต่ขั้นตอน ก่อนการตรวจวิเคราะห์ ระหว่างการตรวจวิเคราะห์ และหลังการตรวจวิเคราะห์ โดยลักษณะงานของตำแหน่งนี้ยังเป็นงานที่มีความซับซ้อนทางวิชาการและทางปฏิบัติ เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องมีความเข้าใจทั้งหลักการทางทฤษฎีและทักษะเชิงเทคนิคในระดับที่สามารถควบคุมความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากตัวอย่าง เครื่องมือ น้ำยา วิธีการ และผู้ปฏิบัติงานเองได้อย่างเหมาะสม ซึ่งงานด้านตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติอาศัยการทำงานที่ละเอียดอ่อน ตั้งแต่การจัดการตัวอย่างที่มีความหลากหลาย การป้องกันการปนเปื้อน การควบคุมคุณภาพด้วย positive control, negative control, allelic ladder และ internal size standard ไปจนถึงการประเมินความสมบูรณ์ของข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ หากผู้ปฏิบัติงานขาดความชำนาญหรือขาดความเข้าใจในหลักการที่เกี่ยวข้อง อาจส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดในการทดสอบหรือการแปลผล ซึ่งมีผลกระทบต่อความถูกต้องของรายงานและความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้น ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ในงานนิติพันธุศาสตร์จึงต้องอาศัยประสบการณ์ ความแม่นยำ ความสามารถในการวิเคราะห์ปัญหา และการตัดสินใจภายใต้กรอบมาตรฐานวิชาชีพอย่างเคร่งครัด

ลักษณะงานของตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์

นักเทคนิคการแพทย์ในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์มีบทบาทในการสนับสนุนในการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยมีการใช้เทคนิคเฉพาะทางชีววิทยาโมเลกุลรวมถึงการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ การให้บริการวิชาการ การประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และการพัฒนาทักษะอย่างต่อเนื่อง เพื่อสนับสนุนภารกิจของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ด้านบริการทางนิติวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ นักเทคนิคการแพทย์ยังมีบทบาทหน้าที่อื่น ๆ ภายในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้

1. ด้านการปฏิบัติการ

1.1 รับสิ่งตรวจและตรวจรับตัวอย่างลงทะเบียน เพื่อทำการการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ตรวจเอกสารประกอบตามเกณฑ์รับเข้า ลงรหัสเฉพาะให้ตรงห่วงโซ่วัตถุพยาน และประเมินสภาพการเก็บรักษาก่อนเข้าสู่กระบวนการทดสอบ

1.2 ปฏิบัติการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล การสกัดสารพันธุกรรม การวัดปริมาณสารพันธุกรรม การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR และการทำ capillary electrophoresis บน ABI 3500 GA พร้อมควบคุมคุณภาพ (positive/negative controls, allelic ladder, ISS) และบันทึกแบบบันทึกครบถ้วนตาม ระเบียบปฏิบัติงานมาตรฐาน (standard operating procedure; SOP) ของหน่วยอณูกายวิภาควิทยาและนิติเวช

1.3 การแปลผลและรายงานภายใต้มาตรฐาน และตีความตามเกณฑ์ของการวิเคราะห์ผลต่างๆ การทบทวนสองชั้น (ผู้ออกผลการทดสอบ, ผู้ตรวจสอบผลการทดสอบ) พร้อมทั้งการทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory comparison) กับเครือข่ายสมาคมนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และอ้างอิงแนวทางสากล ENFSI/SWGDAM เพื่อคงความถูกต้อง เทียบเคียงได้ และน่าเชื่อถือของผล

2. ด้านการบริหาร

2.1 วางแผนและบริหารการใช้วัสดุอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมี และชุดทดสอบ ให้เพียงพอเหมาะสม และสอดคล้องกับปริมาณงานบริการ รวมทั้งตรวจสอบสถานะคงคลัง วันหมดอายุ และความพร้อมใช้งานของทรัพยากรที่จำเป็นต่อการตรวจวิเคราะห์

2.2 บริหารจัดการการใช้เครื่องมือ บุคลากร และรอบการปฏิบัติงานให้เหมาะสมกับชนิดและจำนวนตัวอย่าง เพื่อให้การดำเนินงานมีประสิทธิภาพ ลดการสูญเสียทรัพยากร และรองรับภาระงานบริการได้อย่างต่อเนื่อง

3.ด้านการประสานงาน

3.1 ประสานงานรับ-ส่งสิ่งส่งตรวจและเอกสารประกอบการตรวจจากหน่วยงานต้นทางหรือผู้ขอรับบริการพร้อมตรวจสอบความครบถ้วนและความสอดคล้องของข้อมูลให้เป็นไปตามขั้นตอนในคู่มือก่อนเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์

3.2 ประสานและสื่อสารข้อกำหนดเกี่ยวกับการเก็บ การระบุข้อมูล การบรรจุ และการขนส่งสิ่งส่งตรวจ ให้เหมาะสมต่อการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยวิธีที่กำหนดในคู่มือ เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนและลดปัญหาตัวอย่างไม่เหมาะสม

3.3 ติดตามและประสานสถานะของการดำเนินงานของสิ่งส่งตรวจในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงแจ้งและแก้ไขปัญหาที่เกี่ยวข้องกับข้อมูล เอกสาร หรือตัวอย่าง เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างต่อเนื่องและไม่กระทบต่อคุณภาพผลการตรวจและระยะเวลาการให้บริการ

3.4 ประสานการส่งมอบรายงานผล การแจ้งความคืบหน้า และการรองรับการตรวจประเมินจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อสนับสนุนให้การปฏิบัติงานให้เป็นไปตามระบบคุณภาพแนวทางที่กำหนดในคู่มือ

4. ด้านบริการ

4.1 ให้บริการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล และการทดสอบต่างๆ ภายในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ อย่างโปร่งใส รักษาความลับข้อมูลส่วนบุคคล

4.2 จัดทำรายงานการแปลผลการทดสอบ

4.3 ควบคุมกระบวนการปฏิบัติงานให้เป็นไปตามระยะเวลาการให้บริการ turnaround time ที่หน่วยงานกำหนด พร้อมวิเคราะห์และลดปัจจัยที่อาจทำให้เกิดความล่าช้า เช่น การขาดแคลนน้ำยา ความไม่พร้อมของเครื่องมือ หรือข้อจำกัดด้านการจัดลำดับงาน

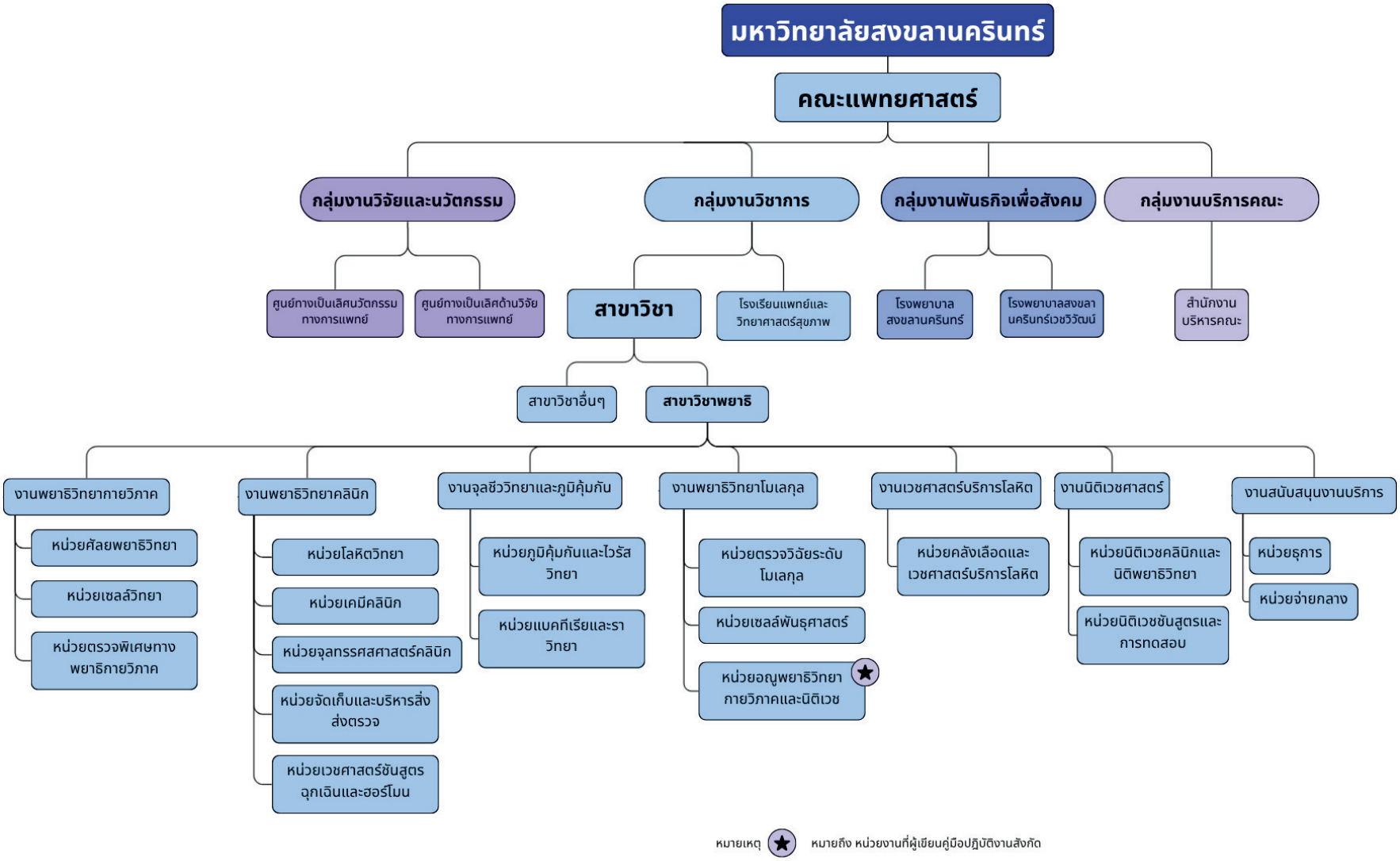
โครงสร้างบริหารจัดการ

โครงสร้างองค์กร (Organization chart)

ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ หน่วยอณูพยาธิวิทยากายวิภาคและนิติเวช งานพยาธิวิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำนักงานตั้งอยู่ที่ชั้น 2 อาคารพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ โดยมีโครงสร้างของสาขาวิชาพยาธิวิทยา แบ่งออกเป็น 2 หน่วยงานใหญ่ คือ

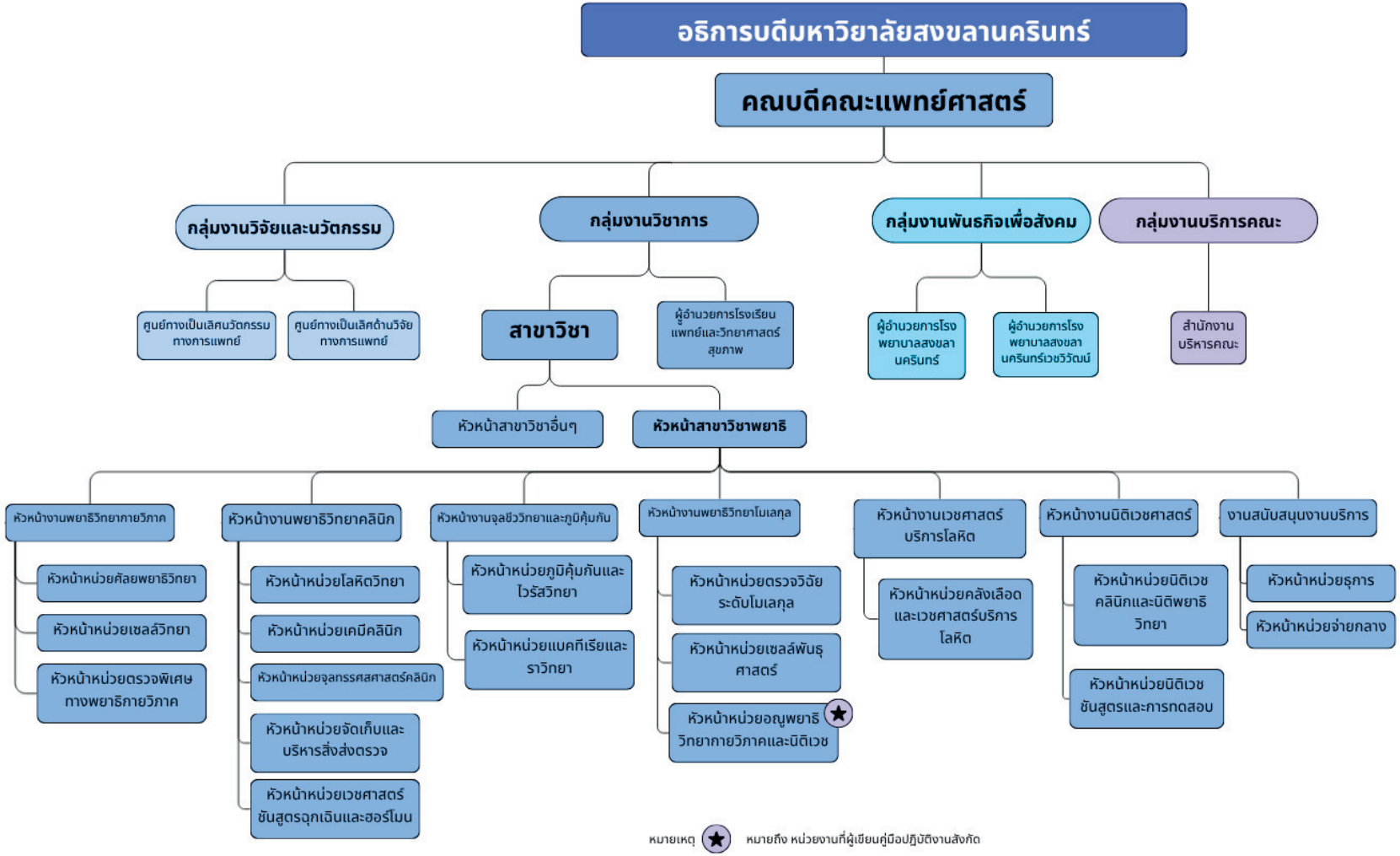
- หน่วยงานบริการ ซึ่งหน่วยงานบริการประกอบด้วย 6 งาน ได้แก่
    - งานพยาธิวิทยาคลินิก โดยมีหน่วยงาน 5 หน่วยงาน คือ หน่วยเคมีคลินิก หน่วยโลหิตวิทยา หน่วยจุลทรรศนศาสตร์ หน่วยเวชศาสตร์ฉุกเฉินและฮอร์โมน หน่วยจัดเก็บและบริหารสิ่งส่งตรวจ
    - งานพยาธิวิทยาโมเลกุล โดยมีหน่วยงาน 3 หน่วยงานคือ หน่วยวินิฉัยระดับโมเลกุล หน่วยเซลล์พันธุศาสตร์ หน่วยอณูพยาธิกายวิภาคและนิติเวช
    - งานจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา โดยมีหน่วยงาน 2 หน่วยงาน คือ หน่วยภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา หน่วยแบคทีเรียวิทยาและราวิทยา
    - งานนิติเวชศาสตร์ โดยมีหน่วยงาน 2 หน่วยงาน คือ หน่วยนิติเวชคลินิกและนิติพยาธิวิทยา หน่วยนิติเวชชันสูตรและการทดสอบวิเคราะห์
    - งานเวชศาสตร์บริการโลหิต โดยมีหน่วยงาน 1 หน่วยงาน คือ หน่วยคลังเลือดและเวชศาสตร์บริการโลหิต
    - พยาธิวิทยากายวิภาค โดยมีหน่วยงาน 3 หน่วยงานคือ หน่วยศัลพยาธิวิทยา หน่วยเซลล์วิทยา หน่วยตรวจพิเศษทางพยาธิวิทยากายวิภาค
- หน่วยงานสนับสนุนงานบริการ ประกอบด้วย 2 หน่วยงาน คือ หน่วยธุรการสาขาวิชาพยาธิวิชาและหน่วยจ่ายกลาง ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

โครงสร้างองค์กร (organization chart)



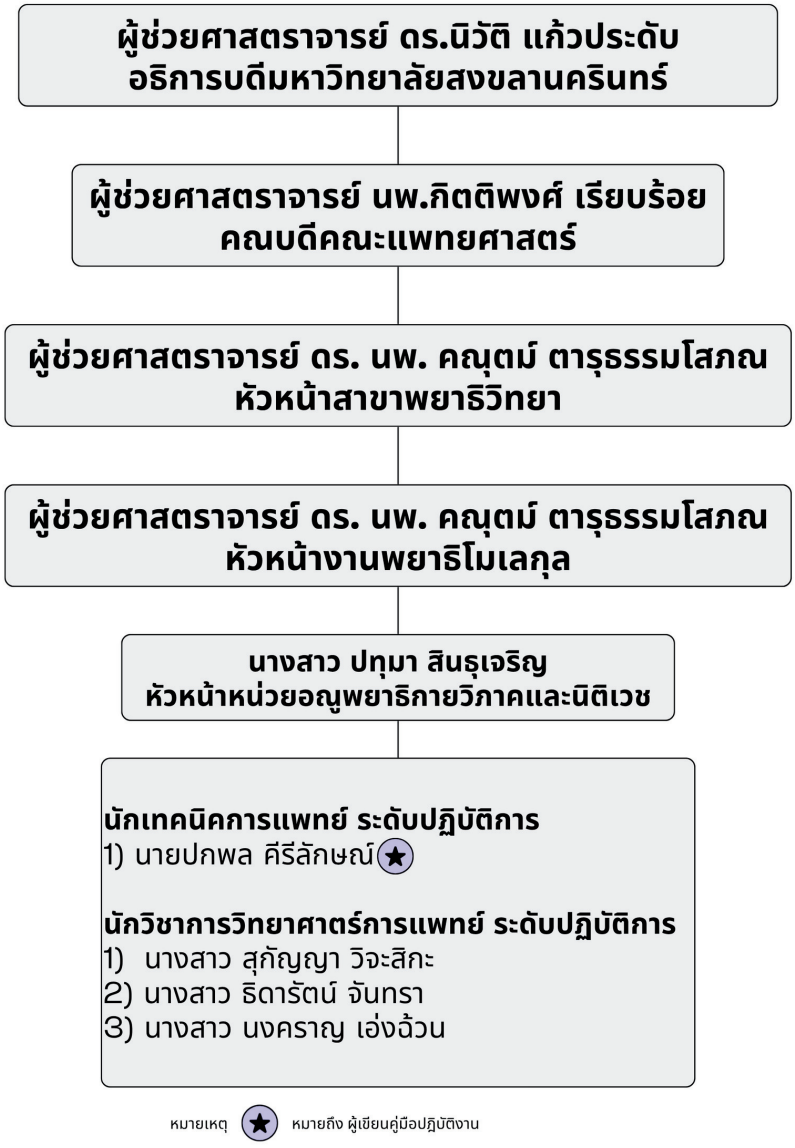
แผนภูมิ 1 โครงสร้างองค์กร (Organization Chart)

โครงสร้างการบริหาร (administration chart)



แผนภูมิ 2 โครงสร้างการบริหาร (Administration Chart)

โครงสร้างการปฏิบัติงาน (activity chart)



แผนภูมิ 3 โครงสร้างการปฏิบัติงาน (activity chart)

บทที่ 3
หลักเกณฑ์วิธีการปฏิบัติงานและเงื่อนไข

หลักเกณฑ์การปฏิบัติงาน

คู่มือปฏิบัติงานฉบับนี้จัดทำขึ้นโดยอิงตามหลักเกณฑ์ กฎ ระเบียบ และแนวทางที่เกี่ยวข้องกับการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลโดยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ซึ่งได้ยึดถือและปฏิบัติตามข้อกำหนดจากหลายแหล่งที่เกี่ยวข้อง รวมถึงแนวทางขององค์การอนามัยโลก (WHO guidelines for molecular testing laboratories) มาตรฐาน ISO/IEC 15189 สำหรับห้องปฏิบัติการด้านการแพทย์ และ ISO/IEC 17025 สำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยเฉพาะระเบียบและข้อบังคับของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ว่าด้วยการบริหารงานบุคคลและจรรยาบรรณวิชาชีพ ตลอดจนมาตรฐานวิชาชีพนักเทคนิคการแพทย์ที่ประกาศโดยสภาเทคนิคการแพทย์ อีกทั้งยังคำนึงถึงหลักเกณฑ์ด้านคุณภาพห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุลตามแนวทางของ ISO/IEC 17025 และแนวปฏิบัติจากสมาคมนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย ซึ่งใช้ควบคู่กับคู่มือการใช้งานเครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer และซอฟต์แวร์ GeneMapper™

นอกจากนี้ ยังให้ความสำคัญกับหลักจริยธรรมในการปฏิบัติงาน โดยเน้นความเป็นกลาง (impartiality) และการรักษาความลับของข้อมูล (confidentiality) อย่างเคร่งครัด ทั้งในด้านการสื่อสาร การเก็บรักษา การวิเคราะห์ และการรายงานผลข้อมูลทางพันธุกรรมของผู้เข้ารับบริการ อีกทั้งคู่มือฉบับนี้ยังได้บูรณาการข้อกำหนดตามพระราชบัญญัติคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคล พ.ศ. 2562 (PDPA) ซึ่งกำหนดให้ข้อมูลทางชีวภาพและพันธุกรรมถือเป็นข้อมูลอ่อนไหวที่ต้องได้รับการดูแลเป็นพิเศษ โดยการเก็บ ใช้ และเปิดเผยข้อมูลจะต้องเป็นไปโดยความยินยอมของเจ้าของข้อมูล มีการระบุวัตถุประสงค์อย่างชัดเจน และจำกัดเฉพาะบุคลากรที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องเท่านั้น นอกจากนี้ ผู้ปฏิบัติงานทุกคนต้องผ่านการประเมินสมรรถนะ (competency test) อย่างสม่ำเสมอ และมีส่วนร่วมในโครงการทดสอบความเชี่ยวชาญภายนอก (external quality assessment) เช่น การทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (interlaboratory test) ที่จัดโดยสมาคมนิติพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย เพื่อรับรองว่าบุคลากรมีความสามารถ และปฏิบัติงานได้ตามมาตรฐานวิชาชีพ โดยเน้นความเป็นกลางและการรักษาความลับของข้อมูล อย่างเคร่งครัด ทั้งในด้านการสื่อสาร การเก็บรักษา การวิเคราะห์และการรายงานผลข้อมูลทางพันธุกรรมของผู้เข้ารับบริการ นอกจากนี้คู่มือฉบับนี้ยังได้บูรณาการข้อกำหนดตามพระราชบัญญัติคุ้มครองข้อมูลส่วนบุคคล พุทธศักราช 2562 (PDPA) ซึ่งกำหนดให้ข้อมูล

ทางชีวภาพ และพันธุกรรมถือเป็นข้อมูลอ่อนไหวที่ต้องได้รับการดูแลเป็นพิเศษ โดยการเก็บ ใช้ และเปิดเผยข้อมูลจะต้องเป็นไปโดยความยินยอมของเจ้าของข้อมูล มีการระบุวัตถุประสงค์อย่างชัดเจน และจำกัดเฉพาะบุคลากรที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องเท่านั้น

ทั้งนี้ คู่มือฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานของนักเทคนิคการแพทย์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ก่อให้เกิดความถูกต้องและแม่นยำพร้อมสอดคล้องกับกฎระเบียบ และเป็นไปตามมาตรฐานวิชาชีพที่ยอมรับ

วิธีการปฏิบัติงาน

วิธีการปฏิบัติงานที่ระบุในคู่มือฉบับนี้ ได้รับการกำหนดขึ้นโดยอิงตามหลักเกณฑ์ กฎระเบียบและมาตรฐานวิชาชีพที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้กระบวนการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยเทคนิคชีววิทยาโมเลกุลมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้อย่างเป็นระบบ การดำเนินงานภายใต้คู่มือนี้จึงได้กำหนดขั้นตอนการปฏิบัติงานที่ครอบคลุมตั้งแต่ขั้นตอน pre-analytics, analytic และ post-analytics

- Pre-analytics เป็นจุดบ่งชี้ถึงคุณภาพและผลการตรวจในงานนิติพันธุศาสตร์ เพราะข้อผิดพลาดส่วนใหญ่เกิดตั้งแต่ขั้นตอนก่อนห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการกำหนดขั้นตอนที่ชัดเจนจึงจำเป็นต่อความถูกต้อง ความน่าเชื่อถือ และความสามารถตรวจสอบย้อนกลับตามหลักมาตราฐานของ ISO/IEC 17025/15189 และจริยธรรม รวมถึงเรื่องความเป็นส่วนตัวของข้อมูลชีวภาพ (PDPA)
    - การเก็บตัวอย่างชีวภาพ ชนิดตัวอย่างที่แนะนำคือ buccal swab เนื่องจากเก็บง่ายราคาถูก เพื่อลดความเสี่ยงปนเปื้อน ควรเตรียมพื้นที่และใช้อุปกรณ์ปลอดเชื้อ อาทิเช่น PPE หน้ากาก ถุงมือให้เปลี่ยนทุกราย และควรทำความสะอาดพื้นผิวบริเวณปฏิบัติงานด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ที่ความเข้มข้นตามวิธีที่ห้องปฏิบัติการรับรอง ให้พื้นผิวเปียกสัมผัสสารอย่างน้อย 10 นาที แล้วเช็ดสารตกค้างออกด้วยน้ำกลั่น
        - Buccal swab: ป้ายกระพุ้งแก้ม 10–15 ครั้งต่อไม้ จำนวนอย่างน้อย 2–3 ไม้/ราย วางตากแห้งในซองกระดาษระบายอากาศ
        - Flinders technology associates card: หยดเลือดให้ชุ่มช่องที่กำหนดประมาณ 1-2 หยด หลังจากนั้นปล่อยแห้งสนิทก่อนบรรจุซอง การเก็บตัวอย่างในซองบรรจุต้องมีซองดูดความชื้นอยู่ในซองเก็บตัวอย่าง
    - การระบุตัวอย่างและผนึกป้องกันการงัดแงะ ตัวอย่างทุกรายต้องมี รหัสเฉพาะ (sample ID) ที่สอดคล้องกันทุกสื่อเช่น ฉลากหน้าซองเก็บตัวอย่าง แบบฟอร์มใบนำส่ง รหัสตัวอย่างที่อยู่บนโปรแกรม sample tracking system ของหน่วยงาน และต้องปิดผนึกด้วย tamper-evident seal และเปลี่ยนเลขผนึกใหม่ทุกครั้งเมื่อ เปิด–ปิด พร้อมบันทึกเลขผนึกใน CoC เมื่อมีการรับตัวอย่างเข้ามาในห้องปฏิบัติการ
    - เกณฑ์การยอมรับหรือการปฏิเสธตัวอย่าง

- ยอมรับ: sample ID ตรงกับสอดคล้องกันทุกสื่อ และมีการปิดผนึกอย่างสมบูรณ์, ตัวอย่างแห้งสนิทไม่ความชื้น, ไม่มีคราบหรือเชื้อรา, เอกสารครบถ้วน แห้งสนิทไม่ความชื้น, ไม่มีคราบหรือเชื้อรา, เอกสารครบถ้วน
- ปฏิเสธหรือพิจารณาใหม่: รหัสไม่ตรงกัน, ฉลากหลุดหรืออ่านไม่ได้, ผนึกฉีกขาดโดยไม่มีบันทึก, ภาชนะปนเปื้อนชัดเจน, เอกสารไม่ครบหรือยินยอมไม่ถูกต้อง, การตัดสินใจทุกกรณีต้องบันทึกไว้ในระบบพร้อมการสื่อสารผู้ส่ง

  - การจัดเก็บและสิ่งแวดล้อมโดยแยกพื้นที่ pre-PCR (รับ–เปิดซอง–สกัด) ออกจาก post-PCR อย่างเด็ดขาด เพื่อลดการปนเปื้อน โดยมีวิธีเก็บตัวอย่างดังนี้
    - Swab/FTA: อุณหภูมิห้องประมาณ 25-30°C มีซองกันชื้น/กล่องปิดทึบ หลีกเลี่ยงแสงและความชื้น
    - เลือด/ของเหลว: ตามชนิดภาชนะ ถ้าเป็นของเหลวให้ 2–8 °C ชั่วคราว และ −20 °C หากเก็บรักษาระยะยาว โดยตู้หรือห้องเก็บรักษาตัวอย่างต้องมีบันทึกอุณหภูมิเป็นประจำทุกวัน

- Analytics ขั้นตอนการวิเคราะห์ครอบคลุมตั้งแต่ การสกัด การปรับเตรียมดีเอ็นเอ การทำ PCR ตลอดจนถึงการทำ capillary electrophoresis และการเตรียมผลการวิเคราะห์ โดยต้องควบคุมคุณภาพทุกขั้นตอนโดย ให้เป็นไปตาม SOP ของหน่วย และบันทึกตรวจสอบย้อนกลับได้
  - การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ พร้อมทั้งปรับเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอก่อน PCR โดยเลือกวิธีสกัดตามชนิดตัวอย่าง เช่น การย่อยทำลายโปรตีนโดย proteinase K และ chelex 100 สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่เป็น swab และ FTA card ขั้นตอนการสกัดให้ใช้พื้นที่ pre-PCR เท่านั้นเพื่อลดการปนเปื้อน หลังจากนั้นทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop เพื่อนำไปปรับปริมาณเพื่อใช้ในการทำ PCR ให้เหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยง การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่น้อยหรือมากเกินไปได้ และบันทึกผลการวัดปริมาณดีเอ็นทุกตัวอย่าง
  - การเตรียมตัวอย่างและการทำ PCR (multiplex STR) ทำการปรับความเข้มข้นของตัวอย่างให้เหมาะสมด้วย nuclease free water และทำการเตรียม mastermix ของปฏิกิริยา PCR ตามระบุในเอกสารชุดน้ำยาและใช้ negative control (reagent blank) และ positive control ของชุดน้ำยาที่ใช้ในครั้งนั้น โดยกำหนดเกณฑ์ผ่านของ control ล่วงหน้า เช่น ช่วง RFU ที่คาดหวังของ positive control ต้องอยู่ในช่วง 3000 RFU ขึ้นไป ส่วน negative control ต้องไม่มีการตรวจพบลักษณะ peak ใน electropherogram
  - การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการ Injection สำหรับ CE ทำได้โดยผสม PCR product กับสาร formamide ที่มีการเติม internal size standard ตามสัดส่วนที่กำหนด โดยใช้แผงยางปิด microplate ใหม่ตามรอบตรวจเช็คปริมาณโพลิเมอร์ และบัฟเฟอร์ให้อยู่ในเกณฑ์ที่บริษัทกำหนด พร้อมทั้งตรวจสภาพ capillary array ตามกำหนด หลังจากนั้นบันทึก lot วันหมดอายุทุกชนิดสารเคมีในแผงฉีด
  - เกณฑ์เชิงวิเคราะห์ (analytical criteria) ที่ต้องประยุกต์ต่อเนื่อง ได้แก่

- AT (analytical threshold): ค่าขีดตัดสัญญาณขั้นต่ำต่อ โดยอิงข้อมูล validation ของหน่วยงาน (>2,000 RFU) ใช้กรองสัญญาณพื้นฐาน
- ST (stochastic threshold): ค่าขีดตัดลดความเสี่ยง allele dropout ในพีคที่มีค่าน้อยกว่า ST (<150 RFU) และต้องใช้หลักฐานประกอบ (replicate/cross-locus) ก่อนแปลผล
- Stutter filter: สัดส่วนสตัดเตอร์จำเพาะในแต่ละโลคัสที่แตกต่างกันในแต่ละชุดน้ำยาที่ใช้การตรวจวิเคราะห์

- การเรียกผล (allele calling) สามารถทำโดยเรียกผลด้วยซอฟต์แวร์โดยอ้าง allelic ladder และ ILS ใน injection เดียวกัน ตรวจความแม่นยำขนาด (sizing precision) และความเสถียรสัญญาณต่อโลคัส โดยใช้โปรแกรม GeneMapper™ แล้วต้องทวนสอบตัวควบคุมว่าผ่านเกณฑ์ก่อนยอมรับผลของตัวอย่างจริง หากตัวควบคุมผิดปกติให้ หยุดการอ่านผลของรอบการวิเคราะห์ในรอบนั้น และดำเนินการแก้ไขโดยทำการทวนสอบหาสาเหตุปัญหา และแก้ไขปัญหานั้นๆ เพื่อทำการวิเคราะห์และแปลผลต่อไป

- Post-analytic ครอบคลุมการตีความเชิงสถิติ การทบทวนผลแบบสองชั้น การจัดทำรายงานผลการตรวจ และส่งมอบรายงาน รวมถึงการเก็บรักษาข้อมูลและการปรับปรุงคุณภาพต่อเนื่อง เป้าหมายคือให้ผลที่ใช้การได้จริงในเชิงวิทยาศาสตร์และกฎหมาย ตรวจสอบย้อนกลับได้ และสื่อสารอย่างโปร่งใส

- กรอบการตีความเชิงสถิติ สามารถทำได้โดยการนำผลจาก GeneMapper™ มาทำการคำนวณด้วยโปรแกรม PSUcalpat โดยที่หน่วยงานจะใช้การคำนวณตามหลักการ Likelihood ratio (LR) ใช้ประเมินว่าผลตรวจเพื่อสนับสนุนสมมติฐานว่า ผลดีเอ็นเอนั้นมาจากบุคคลที่ตรวจเปรียบเทียบ มากกว่ามาจากบุคคลอื่นเพียงใดหรือ probabilistic genotyping (PG) เป็นวิธีวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยแบบจำลองความน่าจะเป็น โดยเฉพาะ ดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนของบุคคลอื่นผสม เพื่อนำกลับมาคำนวณ LR ครับ และทำการบันทึกข้อมูลลงใน database ของหน่วยงาน
- การทบทวนผลแบบสองชั้น
  - Technical review: ผู้ตรวจทานมีหน้าที่ทบทวนจากผลของ peak ที่แปลผลจากโปรแกรม GeneMapper™ และความสมเหตุผลของการแปลผลในแง่ของการ allele calling
  - Administrative review: ตรวจความครบถ้วน รูปแบบรายงาน เลขอ้างอิงตัวอย่าง วันที่เวอร์ชันเอกสาร การสะกดชื่อ การระบุผู้จัดทำ–ผู้ตรวจทาน–ผู้อนุมัติ การทบทวนต้องลงชื่อ/วันเวลา และบันทึกข้อสังเกต/การแก้ไขทุกครั้ง
- การรายงานผล ประกอบไปด้วย
  - Alleles calling (DNA profiling)
  - Sample ID, ชื่อสกุล ผู้รับการตรวจ
  - วันที่รับตัวอย่าง

- ชนิดของสิ่งส่งตรวจ
- การลงนามของ ผู้รายงานผลการตรวจ ผู้ตรวจสอบผลการตรวจ ผู้รับรองผลการตรวจ
- วันที่ออกผลการตรวจ

- การส่งมอบรายงานและการเก็บรักษาข้อมูล โดยจะถูกดำเนินหลังจากมีการตรวจสอบและลงชื่อรับรองผลการทดสอบของรายงานนั้นๆ เรียบร้อยแล้ว ผลจะถูกส่งไปยังหน่วย นิติเวชคลินิกและนิติพยาธิวิทยา เพื่อทำการแจ้งผลให้ผู้รับบริการ และข้อมูลของผู้รับบริการจะถูกจัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูลของห้องปฏิบัติการ

เงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน

การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล โดยเครื่องอัตโนมัติ Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer ที่ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาตร์ มีเงื่อนไข/ข้อสังเกต/ข้อควรระวัง/สิ่งที่ควรคำนึงในการปฏิบัติงาน ดังนี้

Pre-analytic

- เอกสารการยินยอม และ ห่วงโซ่วัตถุพยาน: แบบคำขอ/หนังสือยินยอม/CoC ต้องครบและลงนามถูกต้องทุกจุด รหัสตัวอย่าง (sample ID) ต้องสอดคล้องทุกสื่อ หากขัดข้องให้หยุดกระบวนการและเปิดการดำเนินการแก้ไขและการดำเนินการป้องกัน (corrective and preventive action, CAPA)
- การเก็บตัวอย่าง: ใช้ PPE ในการเก็บตัวอย่างและ เปลี่ยนถุงมือต่อการเก็บทุกรายและทำในพื้นที่สะอาดควรมีพื้นที่ปฏิบัติงานที่เหมาะสมหลีกเลี่ยงปฏิบัติงานที่อาจทำให้ตัวอย่างมีการปนเปื้อน
- ผนึกการขนส่ง: ใช้ tamper-evident seal และ เปลี่ยนเลขผนึกทุกครั้ง ที่เปิดหรือปิด หากผนึกเสียหายโดยไม่มีบันทึก ให้เก็บตัวอย่างไว้ตรวจสอบ
- เกณฑ์รับ: ปฏิเสธตัวอย่างเมื่อฉลากหลุดหรืออ่านไม่ได้หรือ รหัสตัวอย่างที่ระบุบนตัวอย่างไม่ตรงกัน เอกสารไม่ครบถ้วน ตัวอย่างเปียกพบเชื้อรา หรือไม่ตรงชนิดตามคำขอ และต้องทำบันทึกและแจ้งผู้ส่งให้ทราบ
- การจัดเก็บ: แยกส่วนของพื้นที่ pre-PCR ออกจาก post-PCR อย่างเด็ดขาด บันทึกอุณหภูมิและการเข้าถึงที่เก็บตัวอย่างดังนี้
    - เยื่อบุกระพุ้งแก้มบนสำลีปลายไม้ เก็บที่ 37 °C หรือ อุณหภูมิห้อง
    - หยดเลือดบน FTA card เก็บที่ 37 °C หรือ ณหภูมิห้อง
    - เลือด EDTA blood เก็บที่ 4 °C

Analytic

- การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ: ต้องใช้พื้นที่ pre-PCR ในการปฏิบัติงานเท่านั้น ทำการบันทึกผลปริมาณดีเอ็นเอของทุกอย่าง รวมถึงอัตราส่วนในการปรับปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อปรับความเข้มข้นของ DNA template ให้เหมาะสมต่อการทำ PCR
- ชุดควบคุมการทดสอบพีซีอาร์: ทุกครั้งที่การทำ PCR ต้องมี positive/negative control โดยเกณฑ์ผ่านถูกกำหนดไว้ล่วงหน้า ถ้า negative control มีพีคจริงให้ยกเลิกการวิเคราะห์ผลทุกตัวอย่างใน injection run เดียวกันทั้งหมดและค้นหาสาเหตุ

- เกณฑ์วิเคราะห์: ใช้ AT/ST/stutter filters ตามข้อมูล validation ของหน่วย ห้ามปรับเฉพาะเคสโดยไม่บันทึกเหตุผล

Post-analytic

- กรอบสถิติ: เลือก LR/PG สำหรับเคสเปรียบเทียบในระบุฐานข้อมูลความถี่
- ทบทวนสองชั้น: technical review จาก raw data และ administrative review ตรวจความครบถ้วนรูปแบบรายงาน ลงชื่อ วันเวลา
- การรายงานผลและการสื่อสาร: ใช้ภาษาชัดเจน อธิบายน้ำหนักพยาน ข้อจำกัด หลีกเลี่ยงสำนวนชี้ขาดเกินหลักฐาน บันทึกการส่งมอบ การชี้แจงทุกครั้ง
- การเก็บรักษา: กำหนดระยะเก็บตัวอย่าง เอกสาร ตัวอย่าง พร้อมสิทธิ์เข้าถึงและการสำรองข้อมูล ตรวจความสมบูรณ์ไฟล์เป็นระยะ

แนวคิด/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล (forensic identification) เป็นรากฐานของกระบวนการยุติธรรมสมัยใหม่ ทั้งในมิติการสืบสวนสอบสวน การพิสูจน์ข้อเท็จจริงในชั้นศาล การระบุตัวผู้เสียชีวิตในสาธารณภัยและเหตุการณ์หมู่ ตลอดจนการบริหารจัดการคดีที่เกี่ยวข้องกับสิทธิในชีวิต ร่างกาย ทรัพย์สิน และศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ ความถูกต้องเชิงวิทยาศาสตร์ของการระบุอัตลักษณ์ส่งผลโดยตรงต่อความน่าเชื่อถือของผลการพิจารณาคดีและความไว้วางใจของสังคมต่อหน่วยงานรัฐ ดังนั้น หลักฐานทางชีววิทยาและไม่ใช่ชีววิทยาที่ใช้ระบุตัวบุคคลเช่น ลายนิ้วมือ ลายฝ่ามือ ลายเท้า รอยกัด ข้อมูลทันตเวชศาตร์ การจดจำใบหน้า ไปจนถึงสารพันธุกรรมจึงต้องอาศัยกรอบของแนวคิดวิธีการและมาตรฐานที่พิสูจน์ ตรวจสอบย้อนกลับได้ และความสามารถในการทวนซ้ำ (repeatability)ได้อย่างสม่ำเสมอ

ในบรรดาเครื่องมือทั้งหมดในการตรวจพิสูจน์ด้วยสารพันธุกรรม โดยเฉพาะเทคนิค short tandem repeats (STRs) ได้กลายเป็นมาตรฐานสากลสำหรับการยืนยันอัตลักษณ์ เนื่องจากมีความจำเพาะสูง อำนาจในการจำแนก (discriminatory power) สูง และรองรับการคำนวณเชิงสถิติที่มีหลักฐานรองรับ STRs เป็นลำดับเบสสั้น ๆ ที่เกิดซ้ำจำนวนครั้งต่างกันระหว่างบุคคล ทำให้เกิดความหลากหลาย (polymorphism) สูง เมื่อนำดีเอ็นเอจากหลักฐานแวดล้อมมาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วแยกด้วย capillary electrophoresis ทำให้ระบุ “จีโนไทป์” ของบุคคลได้อย่างเป็นระบบ โดยใช้ allelic ladder เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการระบุหมายเลขแอลลีล ทั้งนี้การตีความผลต้องยึดตามเกณฑ์ห้องปฏิบัติการที่ผ่านการรับรอง เช่น ค่า AT/ST ความสมดุลความสูงของพีคในเฮเทอโรไซโกตการ กรองสตัตเตอร์ และสัญญาณรบกวน รวมถึงแนวทางจัดการตัวอย่างที่พบลักษณะของ แอลลีลนอกเกณฑ์อ้างอิง (off-ladder) การตรวจไม่พบแอลลีล (dropout) และดีเอ็นเอผสม (mixture) ซึ่งเป็นประเด็นที่พบบ่อยในงานภาคสนาม

แก่นของแนวคิด ในการพิสูจน์อัตลักษณ์ คือการแปลผลเชิงเทคนิคให้เป็นข้อความเชิงกฎหมายที่เข้าใจได้และตรวจสอบได้ หลักฐานดีเอ็นเอจะไม่สามารถบอกว่าใช่หรือไม่ใช่ หากแต่ให้น้ำหนักทางสถิติ ผ่านการอ้างอิงฐานข้อมูลความถี่อัลลีลของประชากรและแบบจำลองทางสถิติ เช่น random match probability (RMP) หรือ likelihood ratio (LR) การประมาณค่าสถิติเหล่านี้ตั้งอยู่บนสมมติฐานประชากร (เช่น สมดุลฮาร์ดี–ไวน์เบิร์ก, การไม่ขึ้นต่อกันของโลคัส) และต้องพิจารณาปัจจัยโครงสร้างประชากร (population substructure) และค่าสัมประสิทธิ์การผสมในเครือญาติเมื่อจำเป็น งานพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (kinship) ก็อาศัยกรอบเดียวกัน โดยเลือกใช้แบบจำลองที่เหมาะสมกับคู่ความสัมพันธ์ (พ่อ–ลูก แม่–ลูก ญาติข้ามรุ่น ฯลฯ) และจำนวน/คุณภาพของเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีอยู่[6]

จากงานทบทวนของ Butler ซึ่งสรุปพัฒนาการด้านนิติพันธุศาสตร์ในช่วงปี 2019 ถึงช่วงปี 2022 พบว่า การพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลยังคงอาศัยการตรวจดีเอ็นเอเป็นแกนหลักของการระบุตัวบุคคลในงานคดี งานพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายโลหิต และการระบุตัวผู้สูญหาย โดยเฉพาะการใช้ระบบ STR typing ที่ยังเป็นมาตรฐานในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ร่วมสมัยขณะเดียวกัน งานวิจัยดังกล่าวยังชี้ให้เห็นว่า องค์ความรู้ในสาขานี้ได้ขยายไปสู่การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีของงาน Next-generation sequencing (NGS), PG, lineage markers และ microhaplotypes เพื่อสนับสนุนการวิเคราะห์คดีที่มีความซับซ้อนมากขึ้นและ การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลในปัจจุบันจึงมิได้อาศัยเพียงการสร้าง DNA profilie เท่านั้น แต่ยังต้องอาศัยกรอบการตีความและมาตรฐานคุณภาพที่ชัดเจนควบคู่กันไปด้วย[7]

ความน่าเชื่อถือของผลจึงไม่ได้เกิดจากวิธีวิเคราะห์เพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากระบบคุณภาพทั้งห่วงโซ่ (chain of custody) ตั้งแต่การเก็บรักษาของกลาง การบันทึกและรักษาสายการส่งมอบ การป้องกันการปนเปื้อน การควบคุมคุณภาพก่อนระหว่างและหลังการทดสอบ (controls, calibrations, proficiency testing) การตรวจสอบสมรรถนะวิธี (validation/verification) การฝึกอบรมและประเมินสมรรถนะบุคลากร ตลอดจนการควบคุมเอกสารที่ชัดเจนตามหลักมาตรฐาน เช่น ISO/IEC 17025/15189 และแนวทางจากคณะทำงานระดับนานาชาติ ข้อกำหนดเหล่านี้ทำให้ผลวิเคราะห์สามารถอธิบาย ทวนซ้ำได้ และตรวจประเมินได้โดยผู้ประเมินภายนอกและศาล

Chain of Custody (CoC) จัดว่าเป็นหัวใจของความน่าเชื่อถือของพยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ เพราะเป็นระบบบันทึก เส้นทางการครอบครอง–การจัดการ–การโอนย้าย ของวัตถุพยานตลอดวัฏจักร ตั้งแต่จุดเกิดเหตุจนถึงการคืนหรือการทำลาย ทำให้ตรวจสอบย้อนกลับได้ว่าใครทำอะไรกับของกลางชิ้นใด เมื่อใด ที่ไหน และด้วยเหตุผลใด เอกสารเชิงมาตรฐานอธิบายว่า CoC เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่หล่อเลี้ยง ความสมบูรณ์ (integrity) ของวัตถุพยานในภาพรวมของกระบวนการนิติวิทยาศาสตร์จากที่เกิดเหตุถึงศาลโดยตรง ความชัดเจนของ CoC ไม่เพียงมีผลในทางวิทยาศาสตร์แต่ยังเชื่อมกับข้อรับฟังในชั้นพิจารณาคดีสถาบันยุติธรรมของสหรัฐอธิบายไว้ว่า เหตุผลของการจัดทำ CoC ก็เพื่อป้องกันการสับเปลี่ยน การงัดแงะ การระบุผิดตัว การทำลาย/เปลี่ยนสภาพ การสูญหายหรือการปลอมแปลงของกลางก่อนถึงศาล ซึ่งล้วนบั่นทอนน้ำหนักพยานหลักฐานได้ทั้งสิ้น

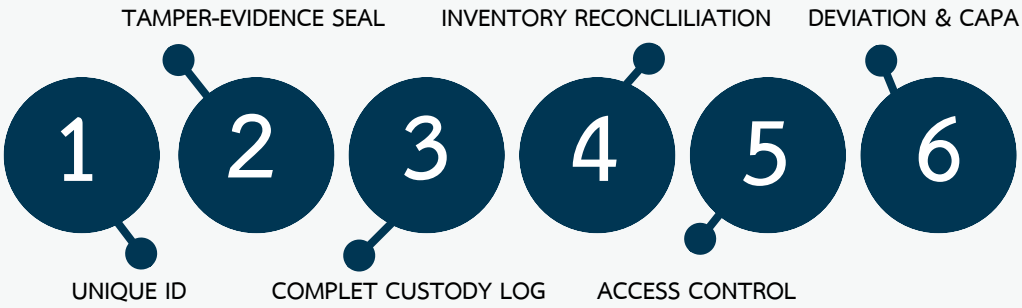
ในเชิงคำจำกัดความหลายแหล่งให้ถ้อยคำที่สอดคล้องกันได้แก่ บันทึกลำดับเหตุการณ์อย่างเป็นระบบของการโอน การจัดการ และการจัดเก็บวัตถุพยาน ตั้งแต่เก็บรวบรวมจนถึงการคืนหรือการทำลาย และ เอกสารลำดับเวลา ที่บันทึกลำดับการครอบครอง ควบคุม โอนย้าย วิเคราะห์และจัดเก็บ/จำหน่ายทำลาย ซึ่งต่างย้ำว่าความสามารถในการพิสูจน์ว่าใครแตะต้องอะไรและทำอะไรเมื่อใดคือสาระสำคัญของ CoC ในเชิงกรอบมาตรฐานสากล ตระกูลมาตรฐาน ISO 21043 สำหรับ

นิติวิทยาศาสตร์ระบุข้อกำหนดและคำจำกัดความที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้ ระเบียน การเก็บรวบรวม การขนส่ง และการเก็บรักษาของกลาง ซึ่งล้วนเป็นกิจกรรมที่ CoC ต้องครอบคลุมและบันทึกอย่างสอดคล้องกันทั้งในภาคสนาม และในสถานที่ปฏิบัติงาน นอกจากนี้แนวปฏิบัติหลายสำนักชี้ตรงกันว่าการรักษา CoC เริ่มตั้งแต่หน้างานไม่ใช่รอถึงห้องปฏิบัติการ สำหรับสถานที่เกิดเหตุกำหนดให้มีการระบุรหัสเฉพาะ (unique identification) ติดฉลากไม่กำกวม บันทึกการส่งมอบ และควบคุมการติดตามย้อนกลับของทุกรายการทั้งที่หน้างานและในห้องปฏิบัติการ รวมถึงการบันทึกการเปิด–ปิดผนึก การทำ aliquot และการคืน/ทำลายให้ตรวจสอบได้ตลอดสาย ด้านคู่มือของ FBI ซึ่งใช้แพร่หลายในสายปฏิบัติงานระบุรายละเอียดเชิงปฏิบัติการของการรับ บรรจุหีบห่อ ขนส่ง จัดเก็บ ตลอดจนข้อกำหนดด้านความปลอดภัยและเอกสารกำกับ (เช่น แบบฟอร์ม CoC) เพื่อคงหลักฐานให้ถึงห้องปฏิบัติการโดยไม่สูญเสียความสมบูรณ์และสามารถกระทบยอดกับบันทึกได้ตลอดเส้นทาง[8]

ในประเด็น CoC แนวทางของ ENFSI ระบุอย่างชัดเจนว่าการรักษาความต่อเนื่องของการรับ–ส่ง–เก็บ–ใช้ และการติดตามสถานะของวัตถุพยาน เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของการสร้างผลตรวจที่ให้ผลถูกต้องและคงเส้นคงวาตั้งแต่จุดเก็บตัวอย่างจนถึงการนำเสนอผลต่อศาล หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยงานวิจัยดังกล่าวมุ่งเน้นว่าการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอจะมีความน่าเชื่อถือได้ก็ต่อเมื่อมีการควบคุมขั้นตอนการจัดการวัตถุพยานอย่างเป็นระบบ ทั้งด้านการระบุตัวอย่าง การจัดเก็บ การบันทึกเอกสาร และการควบคุมความเป็นกลางและความลับของข้อมูล นอกจากนี้ แนวทางดังกล่าวยังวางระบบ CoC ไว้เป็นส่วนหนึ่งของระบบคุณภาพโดยรวม ไม่ใช่เป็นเพียงงานเอกสารประกอบเท่านั้น จึงสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่าห่วงโซ่วัตถุพยานเป็นรากฐานของความน่าเชื่อถือของผลตรวจในทางนิติวิทยาศาสตร์[9]

หลักฐานเชิงประจักษ์สมัยใหม่สะท้อนว่าความท้าทายของ CoC เพิ่มขึ้นตามความซับซ้อนของเคสและเทคโนโลยี ทั้งการจัดการหลักฐานชีวภาพปริมาณต่ำหรือเสื่อมสภาพ การแยกส่วนผสมของสารพันธุกรรมและการบูรณาการระบบดิจิทัลในสายงาน ตั้งแต่ LIMS, บาร์โค้ด/QR, ไปจนถึงลายมือชื่ออิเล็กทรอนิกส์และบันทึกเหตุการณ์ งานทบทวนร่วมสมัยชี้ให้เห็นว่าการสถาปนาและธำรงรักษา CoC ต้องอาศัยทั้งมาตรฐาน กระบวนการ และวัฒนธรรมคุณภาพในองค์กร เพื่อทำให้ศาลและผู้ประเมินภายนอก เชื่อได้ว่าหลักฐานยังคงเดิม (identity and integrity preserved) ตลอดเวลา นอกจากนี้ สาขานิติวิทยาศาสตร์ดิจิทัลเองก็พัฒนากรอบ CoC แบบอิเล็กทรอนิกส์ที่ติดตามตลอดวงจรชีวิตของหลักฐานดิจิทัล ตั้งแต่การรวบรวม การปกป้อง ไปจนถึงการวิเคราะห์และการนำเสนอ ซึ่งสะท้อนแนวโน้มการบันทึกแบบเวลาจริง และการตรวจสอบย้อนกลับอัตโนมัติในยุคข้อมูลข่าวสาร

องค์ประกอบสำคัญของ CoC ที่พบร่วมกันดังภาพ 1 ได้แก่ (1) การระบุตัวอย่างแบบเฉพาะตัวและสอดคล้องกันทุกสื่อ (unique ID) (2) การใช้ผนึกชนิดตรวจพบการงัดแงะและการเปลี่ยนเลขผนึกเมื่อเปิดปิดทุกครั้ง (tamper-evident seals) (3) การบันทึกผู้ส่ง –> ผู้รับ –> วัน เวลา –> สถานที่ –> วัตถุประสงค์ –> สภาพแวดล้อมอย่างครบถ้วน (complete custody log) (4) ตำแหน่งจัดเก็บ (inventory reconciliation) (5) การควบคุมสิทธิ์การเข้าถึง และการทำบัญชีคงคลังเป็นระยะ (access control) และสุดท้าย (6) การจัดการความเบี่ยงเบน และการจัดการเมื่อพบข้อผิดปกติ (deviation & CAPA) ซึ่งสอดคล้องกับกรอบของ ENFSI/ISO และแนวปฏิบัติของ FBI/NIJ ที่มุ่งให้เส้นทางการครอบครองไม่ขาดตอน และตรวจประเมินได้ตลอดเวลา[10]



ภาพ 1 องค์ประกอบสำคัญขั้นต่ำของ CoC

โดยสรุปแนวทางองค์กรชี้ตรงกันว่า CoC ไม่เป็นเพียงเอกสารประกอบเฉพาะกิจ แต่เป็นระบบควบคุมคุณภาพเชิงโครงสร้างขององค์กรตามมาตรฐานสากล (ISO 21043) แนวปฏิบัติสาขา (ENFSI/NIJ/FBI) และเครื่องมือดิจิทัลเพื่อให้ตรวจสอบได้ว่าวัตถุพยานเป็นชิ้นเดิมและได้รับการดูแลอย่างเหมาะสมของพยานหลักฐานตั้งแต่หน้างานจนถึงศาล ทั้งนี้ การออกแบบ–ทบทวน–อบรม–ตรวจติดตาม CoC อย่างเป็นระบบคือเงื่อนไขสำคัญที่ทำให้ผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการได้รับการยอมรับและได้รับการตรวจประเมิน

กรอบมาตรฐานและหลักฐานเชิงปฏิบัติการ ประกันคุณภาพของผลตรวจนิติพันธุศาสตร์ไม่ได้พึ่งแค่เทคนิควิเคราะห์ แต่ตั้งอยู่บนระบบที่ครอบคลุมตั้งแต่ก่อนเริ่มงานจนถึงการรายงานผล และ ทบทวนหลักการประกอบด้วยการควบคุมคุณภาพในทุกขั้นตอนได้แก่ (1) pre-analytical (2) analytical (3) post-analytical (4) การทดสอบความชำนาญภายนอก (5) การตรวจสอบสมรรถนะวิธี (validation/verification) การฝึกอบรมและประเมินความสามารถบุคลากร ตลอดจนการควบคุมเอกสารตามมาตรฐานสากลอย่าง ISO/IEC 17025 และ ISO 15189 ซึ่งเน้นถึงความสามารถ ความเป็นกลาง และการดำเนินงานที่สม่ำเสมอของห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผลเชื่อถือได้อย่างต่อเนื่อง

(1) Pre-analytical แก่นสำคัญคือการควบคุมขั้นตอนเริ่มให้ถูกต้องตั้งแต่รับตัวอย่าง

ระบุรหัสเฉพาะ (Sample ID) ให้สอดคล้องทุกสื่อ และบันทึก chain of custody ไม่ขาดตอน ที่มีเกณฑ์ยอมรับหรือปฏิเสธตามเกณฑ์ การติดฉลากผนึกสภาพขนส่ง ตลอดจนกำหนดสภาวะการเก็บรักษาให้เหมาะสมกับชนิดและสภาพของตัวอย่าง เช่น เก็บคราบเลือดที่แห้งแล้วในที่แห้งและป้องกันความชื้น พร้อมแผนควบคุมการปนเปื้อนและเอกสารคู่ควบ (request form, CoC, metadata) แนวปฏิบัติ ENFSI ในสายงาน human forensic biology หรือ ดีเอ็นเอกำหนดให้ความติดตามย้อนกลับ (traceability) ครอบคลุมตั้งแต่ที่เกิดเหตุจนถึงกระบวนการศาล และให้ใช้แบบแผนควบคุมมาตรฐานที่เชื่อมต่อกันทั้งระบบ เพื่อลดความเสี่ยงในการให้เกิดการผิดพลาด

(2) Analytical ต้องมีตัวควบคุมคุณภาพตามรอบการตรวจวิเคราะห์เชิงระบบทุก run ได้แก่ reagent blank/negative control เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน, positive control เพื่อตรวจสมรรถนะวิธี, allelic ladder/size standard สำหรับการเทียบขนาดและตรวจความเสถียรของระบบของการแยก dna รวมถึงการกำหนด AT/ST รวมถึงเงื่อนไขของการเชื่อถือของการตรวจวัดอย่างชัดเจนอาทิเช่น heterozygote balance, stutter filters, pull-up เอกสารแนวทางของ SWGDAM ระบุกรอบการตั้งเกณฑ์และการตีความผล ที่ห้องปฏิบัติการต้องวางเกณฑ์ลง SOP พร้อมหลักฐานการตรวจสอบสมรรถนะอย่างเป็นระบบก่อนนำใช้จริง นอกจากนั้น การสอบเทียบและการตรวจสอบสมรรถนะของเครื่องมือ เช่น การทำ spectral calibration การตรวจสอบสมรรถนะของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) และการสอบเทียบปิเปต รวมถึงการตรวจสอบย้อนกลับถึงมาตรฐานการวัด เช่น การใช้เครื่องวัดอุณหภูมิที่ผ่านการสอบเทียบและสอบกลับถึงมาตรฐานอ้างอิงได้ ล้วนเป็นส่วนสำคัญของการควบคุมคุณภาพตาม ISO/IEC 17025 เพื่อให้ผลการวัดและผลการทดสอบมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ

(3) Post-analytical โครงสร้างคุณภาพที่ดีต้องมีการตรวจสอบการปฏิบัติตามเกณฑ์ ความครบถ้วนของไฟล์อิเล็กทรอนิกส์ และเอกสารที่เป็น hard copy ความสอดคล้องของรายงานกับหลักฐาน รวมถึง workflow ทั้งนี้รายงานด้าน human factors สำหรับการตีความดีเอ็นเอได้เน้นย้ำว่าการทบทวนขั้นตอนนี้และการสร้างวัฒนธรรมคุณภาพส่งผลให้ช่วยลด cognitive bias และจะช่วยยกระดับความน่าเชื่อถือของการสื่อสารผลทางสถิติในชั้นศาลได้จริง

(4) การทดสอบความชำนาญภายนอก ISO/IEC 17025 กำหนดให้ห้องปฏิบัติการต้องติดตามความเที่ยงตรงของผลอย่างต่อเนื่องรวมถึงการเข้าร่วม proficiency testing (PT) การเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการที่มีอยู่และเหมาะสมเพื่อยืนยันความสามารถของระบบงานส่วน ISO/IEC 17043:2023 เป็นมาตรฐานสำหรับผู้ให้บริการ PT ที่ยกระดับความสอดคล้องของโครงการทั่วโลกส่งผลให้ผลประเมินสมรรถนะของห้องปฏิบัติการมีความน่าเชื่อถือ และเปรียบเทียบได้มากขึ้น (เช่น ข้อกำหนดด้านความสามารถ ความเป็นกลาง การออกแบบแผนทดสอบ และการจัดทำสถิติสรุปผล) ใน

สาขาดีเอ็นเอเองมาตรฐานหรือแนวทางของ FBI QAS และ SWGDAM ใช้ PT เป็นกลไกหลักประกอบการรับรองและตรวจประเมิน ซึ่งมักผูกกับการทบทวน SOP การอบรมซ้ำเมื่อผล PT ไม่ถูกต้อง

(5) การตรวจสอบสมรรถนะวิธี (validation/verification) ก่อนใช้งานวิธีทดสอบรวมทั้งซอฟต์แวร์ในการแปลผล ห้องปฏิบัติการต้องแสดงหลักฐานว่ามีความเหมาะสมต่อการใช้งาน ผ่านด้าน developmental หรือ internal validation ซึ่งครอบคลุมความไวขีดจำกัด (LoD/LoQ) ความจำเพาะ (specificity) ความเที่ยงของผลการทดสอบภายใต้สภาวะเดียวกัน (repeatability) และภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน (reproducibility) ความทนต่อสารกวน (concordance) และขอบเขตการตีความ เช่น กำหนด ST/AT และ stutter regression รวมทั้ง DNA mixture[11]

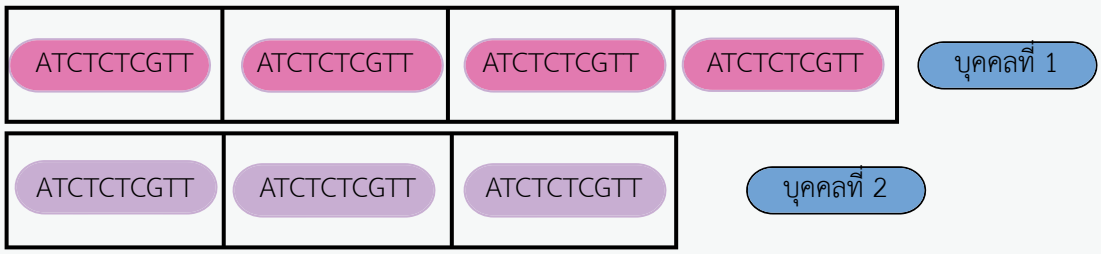
ในด้านการบริหารคุณภาพงานของ McAndrew, Speaker และ Houck ได้ทบทวนวรรณกรรมด้านของงานทาง forensic management และชี้ว่าประเด็นเรื่อง quality assurance, benchmarking, operational decision-making และการบริหารจัดการห้องปฏิบัติการ เป็นหัวข้อสำคัญอย่างต่อเนื่องในวรรณกรรมสมัยใหม่ โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์หลักฐานทางชีวภาพ งานทบทวนดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าความน่าเชื่อถือของผลตรวจมิได้เกิดจากเทคนิคการวิเคราะห์เพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากระบบที่ครอบคลุมการควบคุมคุณภาพ การตรวจสอบย้อนกลับ การประเมินสมรรถนะของบุคลากร และการทดสอบความชำนาญภายนอกควบคู่กัน ขณะเดียวกัน ENFSI ก็ระบุว่า การสร้างผลที่เชื่อถือได้จำเป็นต้องอาศัย validation, methodology, quality assurance, interpretation และการนำเสนอผลที่เป็นระบบ ดังนั้น การกล่าวถึง validation/verification, PT/ILC และ document control ในคู่มือนี้จึงมีฐานสนับสนุนจากวรรณกรรมและแนวทางวิชาชีพระดับสากลอย่างชัดเจน[12]

วิธีการตรวจดีเอ็นเอในงานพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล การตรวจดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลได้ผ่านพัฒนาการหลายยุค โดยมีแรงขับจากข้อจำกัดเชิงตัวอย่างเช่น ปริมาณดีเอ็นเอน้อย เสื่อมสภาพและปนเปื้อน รวมถึงความต้องการจำแนก (discriminatory power) เวลาและต้นทุน กรอบมาตรฐานคุณภาพที่เกี่ยวข้องเพิ่มมากขึ้น โดยเส้นทางการพัฒนาของเทคโนโลยีสามารถเรียงได้ตั้งแต่ (1) ยุคก่อนดีเอ็นเอ (2) ยุค RFLP/VNTR (3) ยุค PCR และ STR multiplex (4) ยุคลำดับเชื้อสายและไมโตคอนเดรีย (5) ยุค SNPs and mini-STRs (6) ยุค massively parallel sequencing (MPS/NGS) ตลอดจน เครื่องมือเร่งผลและระบบอัตโนมัติ ในปัจจุบัน

(1) ยุคก่อนดีเอ็นเอ คือการใช้ซีรั่ม โปรตีน และ human leukocyte antigen (HLA) ก่อนการใช้กรดนิวคลีอิกโดยตรงงานระบุตัวบุคคลอาศัย หมู่เลือด ABO โดยใช้หลักการของการจับกันระหว่าง antigen และ antibody สำหรับการตรวจหมู่เลือด ส่วนไอโซเอนไซม์โปรตีน จะใช้หลักการ electrophoresis เพื่อแยกไอโซเอนไซม์อย่าง PGM, ESD, AK, GLO1 และ ในด้านของ HLA typing

จะใช้หลักการ HLA serology (micro-lymphocytotoxicity) จุดเด่นคือเหมาะสำหรับตัวอย่างเก็บใหม่ แต่ข้อจำกัดคือความสามารถในการจำแนกต่ำ และความไวการเสื่อมสภาพของตัวอย่าง ถึงแม้ว่ามีการรวมหลายการทดสอบแล้วก็ยังให้ความสามารถในการจำแนกต่ำ ดังนั้นปัจจุบันวิธีเหล่านี้ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนบริบทหรือคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น[13]

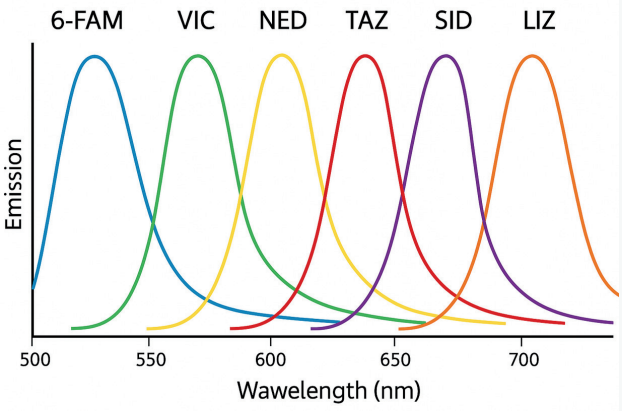
(2) ยุค RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นการวิเคราะห์ variable number of tandem repeats (VNTR) โดย RFLP เป็นวิธีตรวจ ความแตกต่างความยาวชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำการแยกดีเอ็นเอไปโดยขนาดบนเจล แล้วย้ายดีเอ็นเอลงเมมเบรน หรือที่รู้กันในชื่อ southern blot หลังจากนั้นทำการจับ VNTR ด้วย probe ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่ง VNTR คือตำแหน่งของมินิแซทเทลไลต์ ที่มีความยาวของลำดับเบสประมาณ ~10–100 bp เรียงต่อๆกันเป็นชุดๆ และจำนวนชุดที่ซ้ำต่างกันในแต่ละคนความยาวบริเวณนั้นจึงมีความแตกต่างกัน การเห็นลายแถบดีเอ็นเอจะจำเพาะกับบุคคลผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จำเพาะและถ่ายโอนสู่ southern blot ซึ่งจัดเป็นหลักฐานเชิงโมเลกุลยุคแรกๆ ที่ใช้ในงานพยานหลักฐาน ข้อดีคือความสามารถในการจำแนกสูงมาก จากแถบจำเพาะจำนวนมากในแต่ละบุคคล แต่ข้อจำกัดสำคัญคือต้องการดีเอ็นเอปริมาณมาก คุณภาพดี และไม่เสื่อมสภาพกระบวนการทำงานใช้เวลาเป็นสัปดาห์ ปัจจุบันจึงแทนที่โดยเทคโนโลยีที่อาศัย PCR เป็นหลัก[14]



ภาพ 2 ลักษณะการเรียงตัวของ VNTR ที่มีจำนวนซ้ำที่ความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล

(3) ยุค PCR และ STRs multiplex การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์ด้วย short tandem repeats บนแพลตฟอร์ม multiplex PCR และอ่านผลด้วย capillary electrophoresis ได้กลายเป็นมาตราฐานสากลของหลักปฏิบัติงานในทางนิติพันธุศาสตร์ทั่วโลก เพราะผสานอำนาจการจำแนกสูงสุด ความไวในการตรวจวิเคราะห์ และความสามารถในการกำหนดเกณฑ์เชิงวิเคราะห์ที่ตรวจสอบได้เช่น AT/ST, PHR, stutter filters ฯลฯ เข้ากับกรอบสถิติอย่าง RMP/LR และฐานข้อมูลความถี่อัลลีลที่กว้างขวาง วิธีนี้อาศัยความแปรผันของจำนวนหน่วยซ้ำในลำดับสั้นๆ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยมากเป็นเทตรานิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างโปรไฟล์อัลลีลหลายตำแหน่งพร้อมกัน ตั้งแต่ 15 ตำแหน่งไปถึง 24 ตำแหน่งในรุ่นปัจจุบันทั้งนี้การจำนวนหลายตำแหน่งการตรวจจึงส่งผลให้เพิ่มอำนาจการแยกแยะตัวบุคคลมากขึ้น เมื่อรวมผลทุกตำแหน่งในหลักการปฏิบัติงานจริงเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยซิลิกา

หรือแมกเนติบีดส์ และการวัดปริมาณด้วยวิธี real-time PCR เฉพาะทางนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งมักรายงานทั้ง autosomal target และ Y-target และดัชนีความเสื่อม (degradation index) เพื่อช่วยตัดสินใจเรื่องปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้และจำนวนรอบ PCR ขั้นตอนนี้ลดความเสี่ยง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR น้อยหรือมากเกินไป และเป็นฐานให้เกณฑ์ตีความเชื่อถือได้ จากนั้นใช้ multiplex PCR ที่ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับตำแหน่งให้มีโลคัสช่วงขนาดต่างกัน และติดฉลากไพรเมอร์ด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dyes) โดยชุดน้ำยา VeriFiler™ Plus ใช้ระบบ 6 สี ได้แก่ 6-FAM™, VIC™, TED™, TAZ™ และ SID™ สำหรับตรวจชิ้นดีเอ็นเอของตัวอย่าง และ LIZ™ สำหรับสารมาตรฐานขนาดภายใน ค่าความยาวคลื่นที่ปล่อยแสงสูงสุด (emission maximum) โดยประมาณได้แก่ 6-FAM™ 522 nm, VIC™ 554 nm, TED™ 583 nm, TAZ™ 603 nm, SID™ 618 nm และ LIZ™ 655 nm ดังภาพที่ 3 ค่านี้เป็นค่าอ้างอิงของสารเรืองแสงจากคู่มือและเอกสารสิทธิบัตรของผู้พัฒนา อาจแตกต่างตามสภาวะการวัด และไม่ใช่ค่าตั้งเครื่องเฉพาะสำหรับชุดน้ำยา VeriFiler™ Plus ชุดน้ำยาได้รับการพัฒนาให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แม้มีสารที่อาจรบกวนปฏิกิริยา PCR เช่น กรดฮิวมิก (humic acid) หรือฮีมาติน (hematin) รวมทั้งช่วยลดสัญญาณแทรกที่ไม่ใช่อัลลีลจริง และทำให้สัญญาณจากตำแหน่ง STRs ต่าง ๆ มีความสมดุลมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอและสภาวะการตรวจที่เหมาะสม เพื่อป้องกันสัญญาณสูงเกินช่วงที่เครื่องตรวจวัดได้ (off-scale) นอกจากนี้ยังออกแบบให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจบางตำแหน่งมีขนาดสั้นเพื่อเพิ่มโอกาสตรวจได้ในตัวอย่างที่ดีเอ็นเอเสื่อมสภาพและแตกเป็นชิ้นเล็ก ๆ (degraded DNA) [15]



ภาพ 3 ช่วงความยาวคลื่นของสีย้อม fluorescence dye

การแยกและตรวจวิเคราะห์ใช้ capillary electrophoresis ที่อาศัยพอลิเมอร์ภายในท่อหลอดแก้วขนาดเล็ก และการตรวจ fluorescence แบบเลเซอร์โดยใช้ CCD มีการทำ spectral-calibration สร้างเมทริกซ์แยกสีเพื่อลดการรบกวนข้ามช่องสัญญาณสี (cross-talk) และใช้ internal size standard (ILS) ในแต่ละหลอดเพื่อคำนวณขนาดเป็นคู่เบสอย่างแม่นยำ เช่นการตั้งค่าการ injection ในส่วนของแรงดัน และเวลาในการ injection รวมถึงการใช้พอลิเมอร์และการควบคุม

อุณหภูมิที่เหมาะสมช่วยให้การวัดขนาดชิ้นดีเอ็นเอซ้ำได้ผลใกล้เคียงกัน โดยค่าที่วัดได้แต่ละครั้งแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในระดับต่ำกว่า 1 คู่เบส (bp) ก่อนอ่านผลต้องผ่าน allelic ladder ซึ่งมีอัลลีลมาตรฐานของแต่ละโลคัสเพื่อสร้าง bin และเส้นโค้งเทียบขนาด หาก ladder และ ILS ผ่านเกณฑ์จึงอนุญาตให้เรียกอัลลีลของตัวอย่างในชุดที่ทำการ วิเคราะห์นั้นๆ สิ่งนี้ทำให้การเรียกผลเชื่อมกับมาตรฐานและตรวจประเมินได้ซ้ำในภายหลัง ซึ่งหัวใจของความน่าเชื่อถือของผลตรวจอยู่ที่เกณฑ์เชิงวิเคราะห์ และการตีความที่ตั้งอยู่บนข้อมูลตรวจสอบการ validation และ verification ของห้องปฏิบัติการเองไม่ใช่ตัวเลขสากลตายตัว โดยทั่วไปจะกำหนด analytical threshold เพื่อกรองตัวรบกวนเช่น noise และ stochastic threshold เพื่อควบคุมความเสี่ยงภาวะ dropout และ heterozygote พร้อมทั้ง peak height ratio เป็นเกณฑ์สมดุลพีคในเฮเทอโรไซโกตขณะเดียวกันต้องจัดการอาร์ติแฟกต์สำคัญ เช่น stutter (มักที่ตำแหน่ง –1 repeat หรือบางระบบพบ +1/–2) การเกิดพีคแทรกจากสัญญาณเรืองแสงรบกวนข้ามช่องสี (pull-up หรือ bleed-through) จากการสอบเทียบสีไม่สมบูรณ์หรือพีคอิ่มตัว spike หรือที่แข้าใจกันอย่างแพร่หลายว่า dye blob รวมถึง off-ladder และ microvariant ที่อยู่นอกบินของ ladder ซึ่งทุกชนิดต้องมี กฎตีความและฟิลเตอร์เฉพาะโลคัสช่องสีระดับสัญญาณที่ต้องระบุใน SOP อย่างชัดเจน การมี replicate และการฉีดซ้ำแบบควบคุมเป็นทางยืนยันสัญญาณที่เสี่ยง

เมื่อได้จีโนไทป์หลายโลคัสแล้ว การคำนวณค่าทางเชิงสถิติทำได้สองแนวคือ random match probability (RMP) สำหรับการเปรียบเทียบโปรไฟล์กับฐานข้อมูลภายใต้สมมติฐานบุคคลไม่ทราบตัวและโลคัสอิสระ และ likelihood ratio (LR) สำหรับตั้งสมมติฐานคู่เปรียบเทียบทั้งแบบ thresholded และ probabilistic genotyping (PG) ที่แบบจำลองการส่งสัญญาณเช่น drop-in, dropout, stutter, peak variance และ mixture ratios[16]

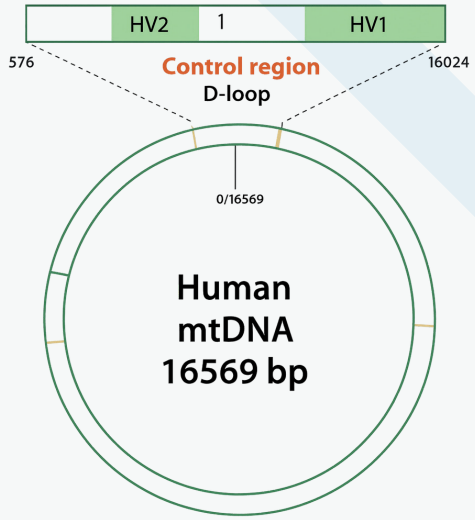
นอกเหนือจาก autosomal STR ซึ่งเป็นแกนหลัก ยังมี Y-STR และ X-STR เป็นอีกรูปแบบในการตรวจสารพันธุกรรมที่สำคัญในประเด็นเฉพาะทาง Y-STR ใช้ติดตาม สายพ่อ และแยกสารพันธุกรรมเพศชายในตัวอย่างคละเพศและมีประโยชน์ในคดีล่วงละเมิดทางเพศหรือการสืบหาญาติฝั่งชายโดย อาศัยการรายงานเป็น haplotype และการประเมินด้วยฐานข้อมูลเฉพาะ ข้อจำกัดคือ ไม่สามารถใช้ระบุตัวบุคคลได้ ในเครือญาติสายพ่อเดียวกันและต้องคำนึงอัตรากลาย mutation rate เมื่อเทียบเชิงเครือญาติ ส่วน X-STR ช่วยเพิ่มพลังจำแนกใน คดีเครือญาติซับซ้อน เช่น พ่อ–ลูกสาว พี่ชาย–น้องสาว ปู่–หลานสาว โดยเฉพาะเมื่อข้อมูล autosomal STR ไม่เพียงพอทั้งสองรูปแบบการตรวจ ยังคงทำงานบนแพลตฟอร์ม CE เช่นเดียวกับ autosomal STR จึงผสานเข้าเวิร์กโฟลว์ได้อย่างลื่นไหล สำหรับตัวอย่างที่เสื่อมสภาพหรือมีดีเอ็นเอน้อย ชุดน้ำยาในการตรวจรุ่นใหม่จะมีแอมพลิคอนสั้น (หรือเลือกใช้ mini-STR) เพื่อลดโอกาส dropout และเพิ่มอัตราความสำเร็จของการอ่านผลการ

วิเคราะห์ในกลุ่มของตัวอย่างที่มีการเสื่อมสลายของสารพันธุกรรมดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ให้หลีกเลี่ยง polymorphism บริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับ (SNP in primer binding site) และการเพิ่มสารเคมีบางกลุ่มที่ทนต่อสาร PCR inhibitor เป็นแนวทางที่รุ่นปัจจุบันใช้แพร่หลาย นอกจากนี้การตั้งค่าการ injection ของตัวอย่างและการจัดสมดุลสัญญาณข้ามโลคัสช่วยให้ dynamic range ของผลอยู่ในช่วงตีความที่ปลอดภัย ลดทั้ง off-scale และการสูญเสียพีค minor ที่สำคัญอีกด้วย

จุดแข็งสำคัญอีกด้านของการตรวจรูปแบบที่กล่าวนี้ คือความพร้อมด้านมาตรฐานและคุณภาพที่เทคโนโลยีนี้มีอย่างครบวงจรได้แก่ positive control กับ negative control และ allelic ladder ทุกชุดการตรวจวิเคราะห์ การทำ spectral array calibration และตรวจสมรรถนะเครื่องมืออย่างสม่ำเสมอ วาง stutter filters/AT/ST/PHR จากข้อมูล validation ของตนเอง รวมไปถึงการควบคุมคุณภาพหลังงานด้วย การทบทวนความถูกต้องของผลตรวจดีเอ็นเอ (technical review) และการตรวจสอบความครบถ้วนถูกต้องของรายงาน และเอกสารประกอบ (administrative review) พร้อม audit trail ครบถ้วนคือ ตารางพีค electropherograms พารามิเตอร์ที่ใช้เรียกผล ทั้งหมดนี้ถูกวางอยู่ภายใต้ QMS ตาม ISO/IEC 17025/15189 และแนวทางสาขา เช่น ENFSI/SWGDAM ทำให้ผลทำซ้ำได้ ตรวจสอบได้ และยืนหยัดในชั้นศาลได้อย่างต่อเนื่อง

ถึงแม้แพลตฟอร์มหรือเทคโนโลยี Massively parallel sequencing (MPS/NGS) จะเปิดทางสู่การอ่านลำดับสารพันธุกรรมและเสริมพลังการแปลผลของกลุ่มตัวอย่างที่มีความซับซ้อน แต่ในเวิร์กโฟลว์ประจำ CE-STR ยังคงจัดเป็น gold standard ด้วยความสมดุลของประสิทธิภาพ ต้นทุน มาตรฐาน เวลา และการยอมรับเชิงนิติวิทยาศาสตร์ระดับสากล แนวโน้มร่วมสมัยจึงเป็น การบูรณาการใช้ CE-STR เป็นแกนหลักผนวก mini-STR/Y-STR/X-STR ตามโจทย์ และพิจารณา MPS/PG กับคดีที่ซับซ้อนหรือหลักฐานจำกัด เพื่อให้ได้คำตอบที่ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ที่กำหนด (fit-for-purpose) มากที่สุดภายใต้ข้อกำกับคุณภาพเดียวกัน[17]

(4) ยุคลำดับเชื้อสายและไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) จัดเป็นหนึ่งในรูปแบบของการตรวจสารพันธุกรรมที่สำคัญในงานนิติพันธุศาสตร์ คุณสมบัติพื้นฐานที่แตกต่างกันจากดีเอ็นเอนิวเคลียร์อย่างชัดเจน กล่าวคือรูปแบบสารพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอถ่ายทอดทางสายมารดาเท่านั้นและมีจำนวน copy ของสารพันธุกรรมต่อเซลล์ที่สูงและคงทนกว่าเมื่อตัวอย่างเสื่อมสภาพ มีรายงานการใช้กับตัวอย่างเส้นผมไร้ราก เล็บ กระดูกหรือฟันอายุหลายปี รวมถึงวัตถุพยานที่มีปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยมากซึ่งวิธีตรวจออโตโซมแบบมาตรฐานไม่สามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ โดยแนวทางที่ใช้แพร่หลายคือการอ่านลำดับบริเวณ control region ของไมโตคอนเดรียโดยเฉพาะในส่วนที่เป็น hypervariable regions I (ตำแหน่ง 16,024-16,365) และ hypervariable regions II (ตำแหน่ง 73-340) แสดงดังภาพที่ 4 เพื่อให้ได้ลำดับการกลายพันธ์ หลังจากนั้นจะนำไปเทียบกับญาติสาย



ภาพ 4 โครงสร้างไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของมนุษย์

มารดาหรือฐานข้อมูลประชากรที่เกี่ยวข้อง โดยงานวิจัยจำนวนมากชี้ตรงกันว่า แม้ว่า mtDNA จะไม่จำเพาะถึงระดับปัจเจกเท่าการตรวจออโตโซม แต่ก็สามารถให้หลักฐานสนับสนุนที่มีค่าน้ำหนักเมื่อใช้เหมาะกับโจทย์และสื่อสารข้อจำกัดอย่างโปร่งใส

ในเชิงประยุกต์ด้านงานวิจัยภาคสนามสะท้อนบทบาทในการตรวจ mtDNA ชัดเจนในสามสถานการณ์หลัก ได้แก่ การระบุตัวจากชิ้นส่วนเก่าและเสื่อม การดึงสัญญาณจากเส้นผมไร้รากและการยืนยันความเกี่ยวพันทางมารดาในกรณีผู้สูญหายหรือสาธารณภัย โดยในทุกสถานการณ์ การออกแบบแนวทางการปฏิบัติงานต้องมีความเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ ซึ่งเป็นหัวใจของความสำเร็จเริ่มตั้งแต่การคัดกรองด้วยการตรวจออโตโซม หากไม่เพียงพอจึงยกระดับสู่ mtDNA กำหนดจุดตัดสินใจเรื่องการอ่านเฉพาะบริเวณ control region หรือทั้ง whole genome ตามทรัพยากร และความพร้อมของห้องปฏิบัติการ รวมถึงการเตรียมการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับหลักฐานและข้อจำกัดของข้อมูลนั้น ๆ

โดยสรุปการทำงานในห้องปฏิบัติการและทางคดีแสดงให้เห็นว่า mtDNA เป็นเครื่องมือหรือรูปแบบการตรวจแบบหนึ่งที่เพิ่มโอกาสเมื่อการตรวจออโตโซมไม่สามารถให้คำตอบได้โดยข้อดีของ mtDNA อยู่ที่ความทนทานต่อการเสื่อมสลายและจำนวนปริมาณสารพันธุกรรมที่มี ส่วนข้อจำกัด คือ บุคคลที่มีเชื้อสายทางมารดาร่วมกันอาจมีรูปแบบ mtDNA เหมือนกันจึงไม่สามารถใช้ผลตรวจ mtDNA เพียงอย่างเดียวเพื่อระบุว่าเป็นบุคคลใดบุคคลหนึ่งได้ จึงต้องพึ่งพาการควบคุมที่เข้มงวดและการแปลผลการตรวจ การผสานระหว่างเทคโนโลยีอ่านลำดับที่ครอบคลุม การควบคุมคุณภาพอย่างเป็นระบบ และการตีความบนฐานข้อมูลประชากรที่เหมาะสม ทำให้ mtDNA ยังคงมีบทบาทสำคัญและได้รับการยอมรับในงานนิติพันธุศาสตร์ร่วมสมัย โดยไม่สร้างภาระการทำความเข้าใจแก่ผู้ประเมินหรือศาลเกินจำเป็น[18]

(5) ยุค SNPs และ mini-STRs คือตัวบ่งชี้ หรือ microhaplotypes และ single nucleotide polymorphisms โดยชุดการตรวจ SNP ใกล้กันที่ให้ amplicon ชิ้นสั้นๆ ซึ่งนับเป็นข้อได้เปรียบเมื่อตัวอย่างการตรวจเป็นกลุ่มที่มีดีเอ็นเอเสื่อมมาก เนื่องจากมีแอมพลิคอนสั้นกว่าการตรวจ STRs แบบทั่วไป และในงานสืบจำแนกเชื้อสายใช้การตรวจรูปแบบกลุ่มนี้เพื่อใช้ระบุลักษณะภายนอก เช่น สีตา ผม ผิว รูปแบบการใช้ชีวิต (เช่น การสูบบุหรี่) แต่ข้อเสียคืออำนาจจำแนกต่อมาร์กเกอร์จะต่ำกว่า STRs แต่เมื่อใช้ panel มาร์กเกอร์เป็นหลัก 100-1,000 มาร์กเกอร์ก็ให้พลังแยกสูงและข้อมูลเชิงประชากรที่ลึกได้[19]

(6) ยุค Massively Parallel Sequencing (MPS/NGS) เทคโนโลยี MPS/NGS ทำให้สามารถอ่านลำดับจริงภายในการซ้ำของเบสใน STRs และบริเวณจุดจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอ โดยยังสามารถเปิดโอกาสให้จำแนกไอโซอัลลีล (isoalleles) ที่การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง capillary electrophoresis มองไม่เห็น นอกจากนี้การตรวจด้วย NGS เทคโนโลยีสามารถเพิ่มอำนาจการจำแนกและช่วยการแยกองค์ประกอบของรูปแบบดีเอ็นเอผสม (deconvolution) ในเคสที่พบการปนเปื้อนบางประเภท นอกจากนี้ยังใช้กับ mtDNA ทั้ง whole genome, panel-SNP, RNA และ DNA-methylation ในด้านงานนิติเวชด้านอื่นเช่น สำหรับระบุชนิดคราบชีวภาพแนวโน้มร่วมสมัยคือการใช้ MPS เป็นแพลตฟอร์มเสริมควบคู่กับ capillary electrophoresis โดยต้องผ่าน validation ตามบริบทของห้องปฏิบัติการ[20]

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ short tandem repeated (STR) และกรอบแนวทางเกณฑ์หลัก ของเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer

การแปลผลของ STRs ในงานนิติพันธุศาสตร์ตั้งอยู่บนกรอบเกณฑ์เชิงข้อมูลที่ได้มาจากการตรวจสอบสมรรถนะวิธี (validation/verification) ของห้องปฏิบัติการที่ไม่ใช่ค่ามาตรฐานสากล โดยแนวคิดเน้นให้กำหนดเกณฑ์แบบอิงข้อมูลจริง (data-driven) ที่พิจารณาจากเครื่องตรวจงวิเคราะห์, ชุดน้ำยา, โปรโตคอล, ระดับสัญญาณในแต่ละห้องปฏิบัติการ และบันทึกเหตุผลของการตัดสินใจในการแปลผลทุกกรณีเพื่อให้ตรวจสอบย้อนกลับได้ โดยหลักการแปลผลต้องอาศัยข้อมูลของกลุ่มต่อไปนี้

(1) Analytical threshold (AT)

ความหมาย: ค่าขีดตัดขั้นต่ำของความสูงสัญญาณ ซึ่งวัดเป็นหน่วย RFU ใช้แยกสัญญาณที่นำมาพิจารณาเป็นอัลลีลออกจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน ทั้งนี้ สัญญาณที่สูงกว่าเกณฑ์ยังต้องได้รับการตรวจสอบว่าเป็นอัลลีลจริงหรือสัญญาณแทรก เช่น พีคสัญญาณรบกวนที่แหลมและแคบผิดปกติ (spike)

หลักการกำหนด: วิเคราะห์การกระจายของสัญญาณพื้นฐานต่อช่องสี/โลคัส/เครื่อง โดยอ้างอิงจากข้อมูล validation และเผื่อความผันผวนเชิงเครื่องมือ จากการกำหนด AT ควรที่จะจำเพาะช่องสี

และมักจะมีค่า RFU ที่อยู่ต่ำกว่า ST เสมอ

การใช้งาน: พีคที่ <AT ไม่ถูกพิจารณาในฐานะพยานอัลลีล แต่ยังควรถูกเก็บเป็น "สัญญาณประกอบไว้พิจรณา" ในรีวิวทางเทคนิคหากพบรูปแบบซ้ำในหลายการฉีด/การทำซ้ำ

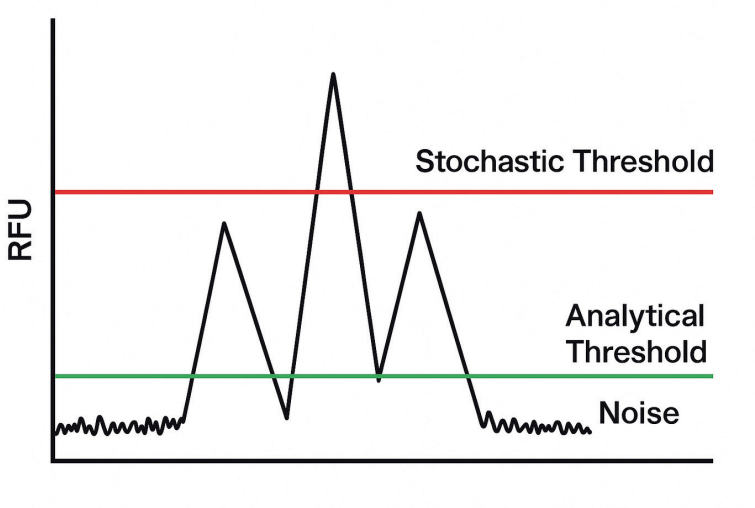
(2) Stochastic threshold (ST)

ความหมาย: ค่า cut-off ซึ่งความเสี่ยงต่อภาวะ allele dropout ของคู่เฮเทอโรไซโกตอยู่ในระดับต่ำพอที่จะเชื่อถือการมี หรือไม่มีอัลลีลได้จริง

หลักการกำหนด: อาศัยข้อมูลความสมดุลความสูงพีคของเฮเทอโรไซโกต (ดูหัวข้อ PHR) และการกระจายของพีคต่ำ ๆ จากชุดทดลองความไวในปริมาณต่ำ และจาก replicate analysis

การใช้งาน:

- *พีค ≥ST: เชื่อถือได้สูงสำหรับการให้ข้อสรุปเชิงจีโนไทป์*
- *AT≤พีค<ST: ถือเป็นเขต "เสี่ยง dropout" ต้องใช้หลักฐานอื่นๆประกอบ*



ST (stochastic threshold)
ค่าขีดจำกัดที่บ่งชี้ว่าหากสัญญาณสูงกว่านี้มีความมั่นใจสูงว่า peak ครบทั้งสองอัลลีลของ heterozygote และลดความเสี่ยงของ allele drop-out.

AT (analytical threshold)
ค่าขีดจำกัดขั้นต่ำของสัญญาณที่สามารถระบุได้ว่าเป็น peak ของ DNA จริง

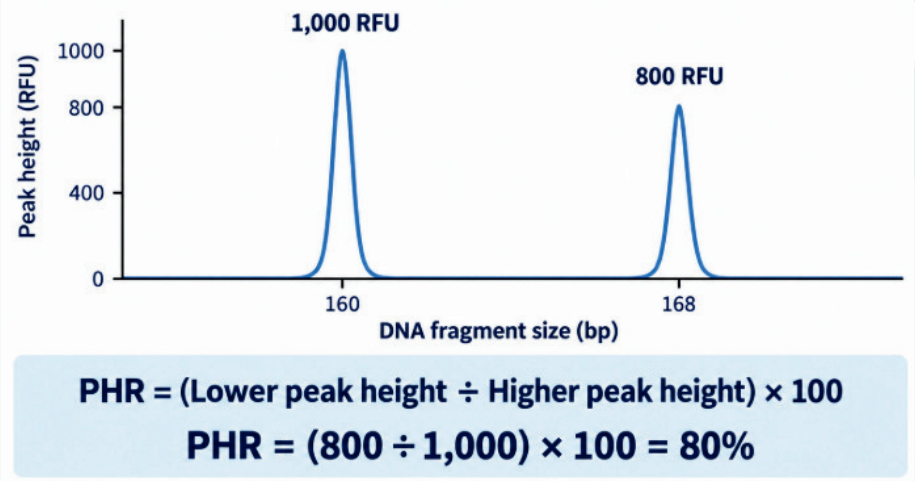
ภาพ 5 ลักษณะของ peak ที่เป็น ST และ AT

(3) Heterozygote peak height ratio (PHR)

ความหมาย: อัตราส่วนความสูงพีคของอัลลีลสองข้างในเฮเทอโรไซโกต ใช้วัด balance ของผล

หลักการกำหนด: ประเมิน PHR distribution ตามช่วงความสูงพีค ปริมาณเทมเพลต โลคัส ช่องสี ค่า cut-off ควรมาจากสถิติของการทำ validation เช่นเปอร์เซนไทล์ต่ำของ PHR ในสภาพปกติ "และอาจปรับเกณฑ์ขั้นต่ำของ PHR ให้เหมาะกับระดับความสูงของพีค โดยพีคที่สูงอาจกำหนดให้มีค่า PHR ขั้นต่ำสูงขึ้น ทั้งนี้ ต้องอ้างอิงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในห้องปฏิบัติการ

การใช้งาน: PHR ที่ต่ำกว่าค่า cut-off มันจะพบโอกาสที่เกิดภาวะ allelic imbalance ในตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ หรือภาวะ dropout ต้องพิจารณาด้วยข้อมูล ST หรือลักษณะของดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ



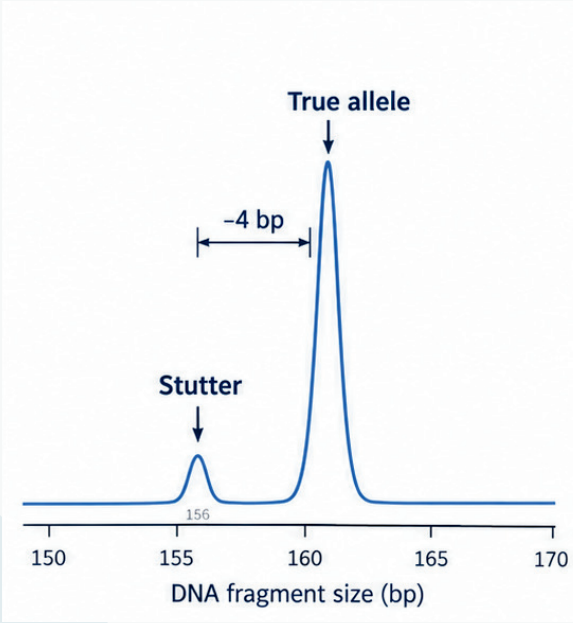
ภาพ 6 การคำนวณ Heterozygote peak height ratio (PHR)

(4) Stutter

ความหมาย: พีคอาร์ติแฟกต์ที่เกิดจากการจากการทำงานของ DNA polymerase enzyme โดยทั่วไปจะมักพบที่ตำแหน่ง –1 repeat ของโลคัส 4 bp และอาจพบ +1, –2 ในบางโลคัส

หลักการกำหนด: คำนวณจากค่าของ stutter percentage จำเพาะโลคัส/ช่องสี/ระดับสัญญาณ และสร้าง stutter filter (เช่น เส้นถดถอยหรือขีดสูงสุดต่อช่วงความสูงพีค)

การใช้งาน: พีคที่อยู่ในตำแหน่งสตัตเตอร์และต่ำกว่าเกณฑ์ฟิลเตอร์ให้ระบุเป็น artifact โดยไม่ตีความเป็นอัลลีล แต่หากเกินฟิลเตอร์หรือมีรูปแบบผิดปกติ (เช่น forward stutter เด่น) ต้องทบทวนความเป็นไปได้ของ mixture หรือข้อผิดพลาดอื่น



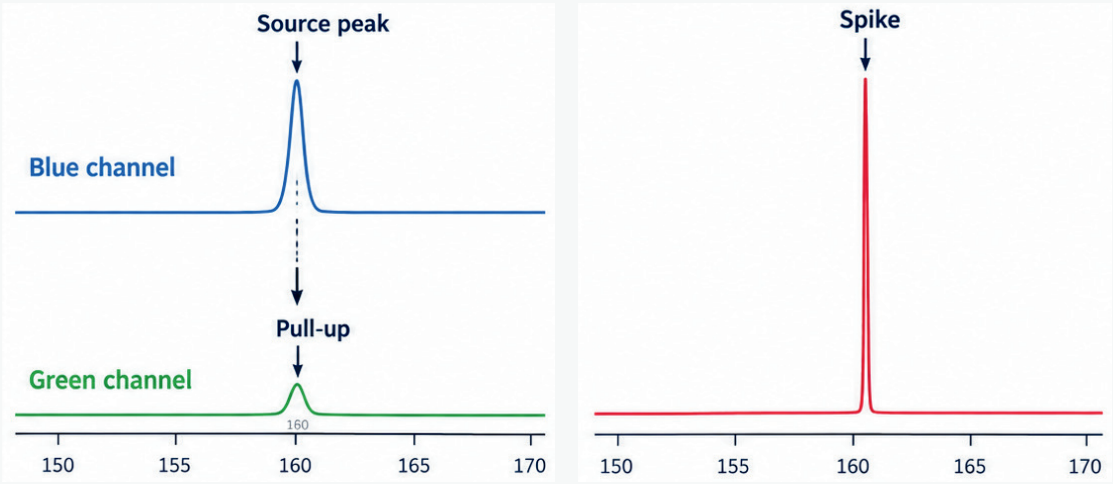
ภาพ 7 ลักษณะของ peak ที่เป็น stutter

(5) Pull-up / Bleed-through and artifact

ความหมาย: Pull-up/Bleed-through คือสัญญาณการเกิดขึ้นของสีข้างเคียง เมื่อการแยกสเปกตรัมสีไม่สมบูรณ์หรือพีคอิ่มตัว ทำให้เห็นพีคแนวเดียวกันครบทุกช่องสีที่ตำแหน่ง bp เดียวกันทั้งที่ความจริงมีเพียงช่องสีเดียวที่เป็นอัลลีลจริง อาร์ติแฟกต์อื่นที่พบบ่อยได้แก่ dye blob หรือก้อนย้อมสีช่วงต้นรันลักษณะพีคกว้างฐานแบนไร้รูปแบบอัลลีล spike คือพีคแหลมแคบจุดเดียวทั้งนี้อาจเกิดจากที่มีสัญญาณของ stutter จาก PCR ที่ผิดปกติ

หลักการกำหนด: กำหนด threshold สำหรับ stutter ต่อโลคัส เช่น stutter ratio cut-off

การใช้งาน: พีคที่อยู่ในตำแหน่งสตัตเตอร์และต่ำกว่าเกณฑ์ฟิลเตอร์ให้ระบุเป็นอาร์ติแฟกต์ โดยไม่ตีความเป็นอัลลีล แต่หากเกินฟิลเตอร์หรือมีรูปแบบผิดปกติ (เช่น forward stutter เด่น) ต้องทบทวนความเป็นไปได้ของ mixture หรือข้อผิดพลาดอื่น



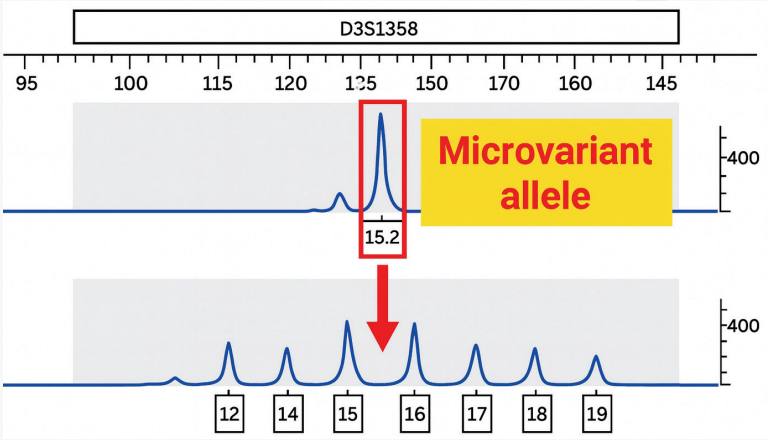
ภาพ 8 ลักษณะของ peak ที่เป็น Pull-up และ spike artifact

(6) Off-ladder (OL) และ Microvariant

ความหมาย: Off-ladder (OL) คือพีคที่ไม่ปรากฏไม่ตรงกับช่องของ bin ใน allelic ladder ของการทดสอบนั้นๆ ส่วน microvariant ดังภาพ 9 คืออัลลีลที่จำนวนซ้ำไม่ใช่จำนวนเต็ม เช่น 13.2 หรือมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณ flank ทำให้ขนาดต่างจากอัลลีลมาตรฐาน

หลักการกำหนด: ใช้ bin set/ladder เวอร์ชันล่าสุด และกำหนดนโยบาย “OL-call”

การใช้งาน: หากพบพีคไม่เข้ากับ allelic ladder ให้ทำการตรวจกลุ่ม internal control เช่น QC/ISS/ladder หลังจากนั้นให้ทำการ injection อีกครั้งหากคงเดิมให้ตรวจโดยใช้ชุดตรวจที่ต่างกัน โดยมี loci ที่ตำแหน่งเดียวกัน หลังจากนั้นจึงตัดสินใจ microvariant



ภาพ 9 ลักษณะ peak ที่เป็น microvariant allele

การแปลผลการตรวจวิเคราะห์ short tandem repeats (STRs) บนเครื่องอัตโนมัติ ABI GA3500 จำเป็นต้องอาศัยทั้งคุณภาพของข้อมูลจากเครื่องและกรอบเกณฑ์การตีความที่ผ่านการตรวจสอบสมรรถนะแล้ว โดยการศึกษาของ SWGDAM ระบุว่าการตีความผล STRs ควรตั้งอยู่บนเกณฑ์สำคัญ เช่น analytical threshold (AT), stochastic threshold (ST), heterozygote peak height ratio (PHR), stutter, pull-up และการประเมินตัวอย่างผสม เพื่อให้การเรียกอัลลีลและการสรุปผลเป็นไปอย่างสม่ำเสมอและสามารถทวนสอบได้ ซึ่งขณะเดียวกัน งานตรวจสอบสมรรถนะของ Butts และคณะ พบว่าเครื่อง ABI GA3500 มีความเหมาะสมสำหรับงานนิติพันธุศาสตร์ในด้านความไวต่อการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ความแม่นตรงของการกำหนดขนาดชิ้นดีเอ็นเอ และความสามารถในการทำซ้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาดังกล่าวเน้นว่าการกำหนด threshold ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นองค์ประกอบสำคัญของการแปลผลบนแพลตฟอร์ม ABI GA3500 นอกจากนี้คู่มือผู้ใช้ของ applied biosystems ยังระบุว่า peak amplitude threshold ที่ใช้ในการตีความควรอ้างอิงจาก developmental validation และการประเมินภายในของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง ทั้งนี้เนื่องจากค่า threshold อาจแตกต่างกันไปตาม workflow, chemistry และสภาวะการใช้งานจริงของแต่ละห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการแปลผล STRs บนเครื่อง ABI GA3500 จึงไม่ได้อาศัยเพียงการอ่านส่วนของผล electropherogram จากเครื่องเพียงเท่านั้นแต่ต้องดำเนินภายใต้กรอบเกณฑ์เชิงวิเคราะห์ที่ชัดเจนและสอดคล้องกับผล validation ของหน่วยงาน เพื่อให้ได้ผลตรวจที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเหมาะสมต่อการใช้งานในงานพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล[21][22]

ส่วนประกอบและน้ำยาที่สำคัญของเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer

(1) Capillary array 36 cm

เป็นชุดท่อหลอดแก้วขนาดเล็กที่ใช้สำหรับแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้า ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ capillary electrophoresis คุณภาพของชุดท่อหลอดแก้วขนาดเล็กมีผลโดยตรงต่อความคมชัดของพีคและความแม่นยำในการคำนวณขนาดชิ้นดีเอ็นเอ

(2) Polymer (POP-4)

เป็นพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวกลางภายใน capillary สำหรับการแยกชิ้นดีเอ็นเอเหมาะสำหรับงาน STRs โดยให้เกิดสมดุลระหว่างความเร็วในการแยกและความละเอียดของสัญญาณ ต้องทำการเปลี่ยนตามรอบจำนวนของ injection เพื่อป้องกันการเสื่อมคุณภาพที่อาจกระทบผลการวิเคราะห์

(3) Anode buffer

เป็นสารละลายขั้วไฟฟ้าประจุบวก ทำหน้าที่รักษาสภาวะไฟฟ้า และไอออนให้คงที่ระหว่าง injection การดูแลระดับและคุณภาพของบัฟเฟอร์ช่วยลดความแปรปรวนของสัญญาณไฟฟ้า

(4) Cathode buffer

เป็นสารละลายขั้วไฟฟ้าประจุลบ ใช้ร่วมกับ anode buffer เพื่อสร้างสนามไฟฟ้าสำหรับการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอต้องตรวจสอบการปนเปื้อนและเปลี่ยนตามรอบที่กำหนดเพื่อคงประสิทธิภาพของการแยก

(5) Septum และ reservoir caps

ใช้สำหรับปิดผนึกภาชนะบรรจุ plate และ buffer เพื่อป้องกันการระเหย การปนเปื้อน และการรั่วโดยการเปลี่ยน septum ตามรอบช่วยลดความเสี่ยงของฟองอากาศและความผิดปกติของแรงดันในระบบ

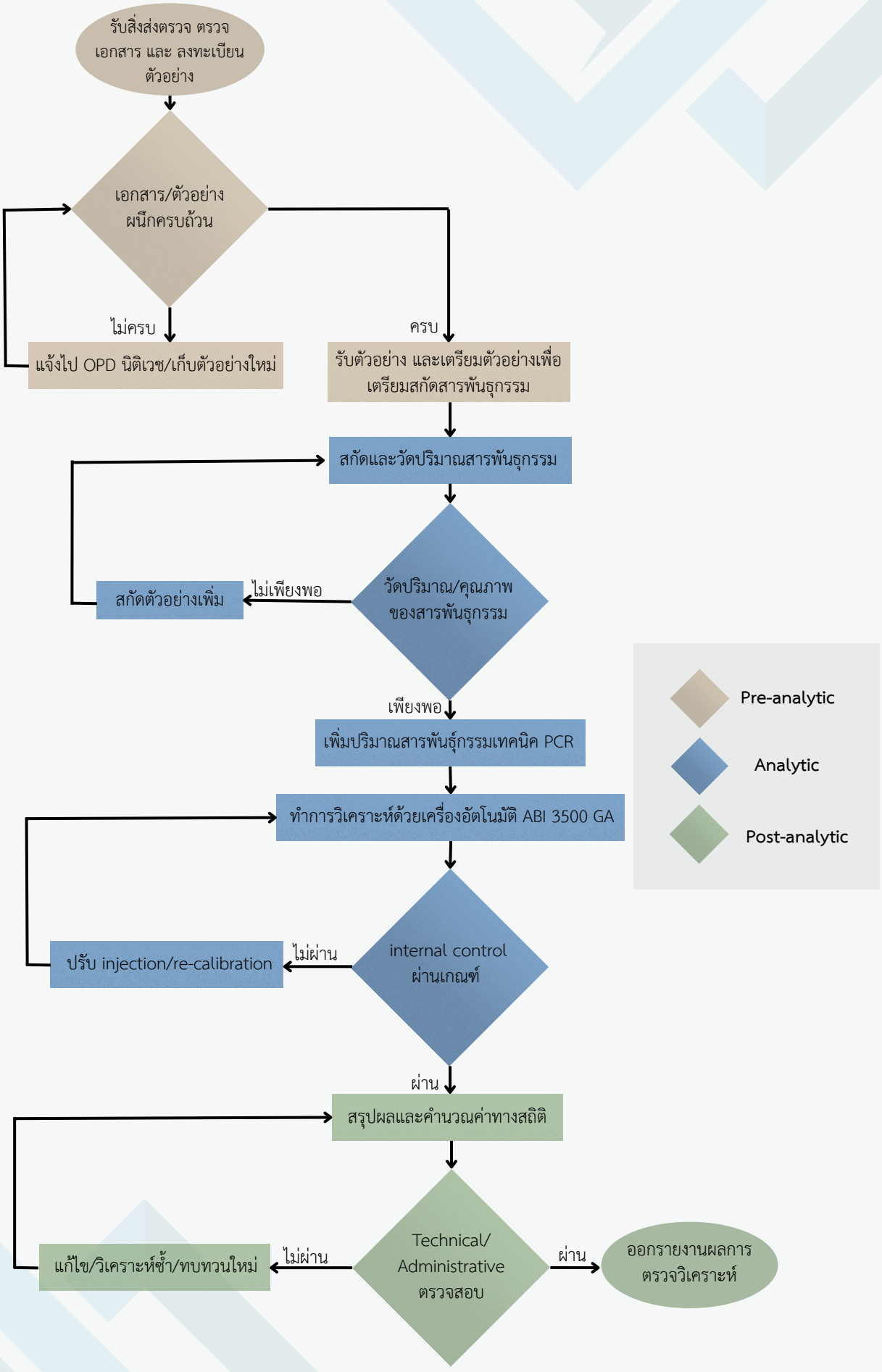
บทที่ 4
เทคนิคในการปฏิบัติงาน

แผนปฏิบัติงาน

การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลโดยเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer ทางห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ หน่วยนิติเวชศาสตร์และพิษวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้มีการเลือกใช้ชุดน้ำยาการตรวจวิเคราะห์ให้มีความละเอียดและเหมาะสมมากขึ้น ทั้งด้านการควบคุมคุณภาพในการตรวจวิเคราะห์ และความถูกต้องของการรายงานผลการตรวจโดยบุคลากร หรือเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการที่มีหน้าที่ในการตรวจวิเคราะห์ต้องมีความรู้ความเข้าใจถึงหลักการ หรือเครื่องมือในทุกขั้นตอนที่ใช้ในการตรวจได้แก่

1) รับสิ่งส่งตรวจ ตรวจเอกสาร และลงทะเบียนตัวอย่าง
2) สกัดสารพันธุกรรม และวัดปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรม
3) คำนวณปริมาณสารพันธุกรรม
4) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบทวีคูณ
5) ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ
6) วิเคราะห์ผลการทดสอบ
7) รายงานผลการตรวจวิเคราะห์

แผนภูมิ 4 กระบวนการหลักในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์



ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

1) การรับสิ่งส่งตรวจ ตรวจสอบเอกสาร และลงทะเบียนรับตัวอย่าง

การรับสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างทางนิติพันธุศาสตร์ ถือเป็นขั้นตอนเริ่มต้นที่สำคัญที่สุดในกระบวนการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล เพราะความถูกต้องในขั้นตอนนี้มีผลโดยตรงต่อความน่าเชื่อถือของผลการตรวจวิเคราะห์ในขั้นต่อไป ทั้งนี้ การปฏิบัติงานต้องเป็นไปตามหลักการ CoC เพื่อให้สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ในทุกช่วงเวลา เริ่มตั้งแต่การเก็บตัวอย่างจากพื้นที่เกิดเหตุ จนไปถึงการรายงานผลสุดท้าย ก่อนรับสิ่งส่งตรวจเจ้าหน้าที่ผู้รับต้องเตรียมพื้นที่ทำงานให้สะอาด ปลอดการปนเปื้อน และสวมอุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล ได้แก่ ถุงมือ และ เสื้อกาวน์ ตามข้อกำหนดของห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ จากนั้นจึงดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเอกสารประกอบการส่งตรวจ ได้แก่ หนังสือสัญญายินยอมให้ตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรม ซึ่งต้องมีข้อมูลครบถ้วน เช่น ชื่อ–สกุลของผู้ตรวจ เลขประจำตัวประชาชน ที่อยู่ เบอร์ติดต่อ ประเภทสิ่งส่งตรวจ วันที่เก็บตัวอย่าง และวัตถุประสงค์การตรวจสอบ นอกจากนี้ต้องมีเอกสาร CoC ที่แสดงลำดับการส่งมอบตัวอย่างจากต้นทางถึงห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์พร้อมทำการลงชื่อรับตัวอย่าง และวันที่กำกับอย่างชัดเจนทุกช่วงดังภาพ 10 และ 11

รับรายงานจาก .....วันที่.....เวลา.....

แบบส่งตรวจห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์
งานนิติเวชศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1. ข้อมูลทั่วไป **นัดฟังผล 28 เมษายน 2568 ขอผลภาษาไทย 4 ชุด ค่ะ**

เลขที่ทะเบียนรวม **68000** **เลขที่ครอบครัว FXXXA-1**
สถานที่เก็บตัวอย่าง งานนิติเวชศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ ม.สงขลานครินทร์
วันเวลาที่เก็บตัวอย่าง วันพุธ ที่ 26 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2568 เวลา 11.00 น.
วัตถุประสงค์ ตรวจเพื่อยืนยันตัวบุคคล
ชนิดการส่งตรวจ **Autosomal DNA (A)**

2. หนังสือแสดงเจตจำนงยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือดและ/หรือเนื้อเยื่อในร่างกาย เพื่อนำไปใช้ในการตรวจ

พิสูจน์รูปแบบดีเอ็นเอ มีรายละเอียดดังนี้

ผู้รับการตรวจ		ความสัมพันธ์	วันเดือนปีเกิด	สถานที่เกิด	เลขที่สิ่งส่งตรวจ
1.	นาย xxxxxxxx xxxxxxxx	ยืนยันตัวบุคคล	xx-xx-xxxx	xxxx	FXXXA-1

ยินยอมให้แพทย์ และ/หรือเจ้าหน้าที่งานนิติเวชศาสตร์ สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม และ/หรือเจาะเลือด **เพื่อนำไปใช้ในการตรวจพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก หรือพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด เช่น ความเป็นพี่น้อง และ/หรือญาติร่วมสายมารดาหรือร่วมสายบิดาเดียวกัน** การเก็บตัวอย่างในร่างกายข้างต้นได้กระทำขึ้นต่อหน้าผู้ลงนามทุกฝ่าย และผู้ลงนามทั้งหมดได้ให้ความยินยอมอย่างบริสุทธิ์ใจโดยปราศจากการบังคับขู่เข็ญใดๆ ทั้งปวง

ลงชื่อ.....
นาย xxxxxxxx xxxxxxxx
(ผู้ให้ความยินยอม 1)

ลงชื่อ.....
นาย xxxxxxxx xxxxxxxx
(พยาน 1)

ลงชื่อ.....
(ชื่อเจ้าหน้าที่)
ผู้พิมพ์สัญญาและผู้เก็บเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม

ภาพ 10 หนังสือสัญญายินยอมให้ตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรม (1)

3. การนำส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์

ชนิดชนิดตัวอย่าง ☑ เซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม จำนวน 3 ชิ้น

ผู้รับตัวอย่าง ☐ ครบ ☐ ขาด.....

ลงชื่อผู้ส่งตัวอย่าง (ชื่อเจ้าหน้าที่)
วันที่ 26 มี.ค. 2568 เวลา.....น

ลงชื่อผู้รับตัวอย่าง (ชื่อเจ้าหน้าที่)
วันที่ 26 มี.ค. 2568 เวลา.....น

ยินยอมให้ส่งผลการตรวจทางไปรษณีย์ จำนวน 1 ชุด ให้แก่

นาย xxxxxxxx xxxxxxxx

เบอร์โทร xxx-xxx-xxxx

บ้านเลขที่ xxxxx หมู่บ้าน xxxxxxxx

ตำบล xxxxx อำเภอ xxxxxxx

จังหวัด xxxxxx เลขไปรษณีย์ xxxxxxxx

ลงชื่อ..... (ผู้รับการตรวจ)

ลงชื่อ..... (พยาน)

วันที่ส่ง.....

ภาพ 11 หนังสือสัญญายินยอมให้ตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรม (2)



ภาพ 12 ซองบรรจุและป้ายกำกับสิ่งส่งตรวจ

เมื่อได้รับสิ่งส่งตรวจเจ้าหน้าที่ต้องตรวจสภาพภายนอกของบรรจุภัณฑ์ เช่น ซองบรรจุ swab หรือภาชนะบรรจุตัวอย่างอื่น ๆ มีการปิดผนึกแน่นหนา ไม่มีรอยเปิด ไม่มีร่องรอยเปียกชื้นหรือฉีกขาด และมีการติดป้ายชื่อหรือรหัสกำกับที่ตรงกับเอกสารประกอบดังภาพ 12 และหากพบความไม่สอดคล้องกันของข้อมูลต้องระบุเป็นหมายเหตุในแบบบันทึกการรับสิ่งส่งตรวจ และทำการแจ้งกลับไปยังส่วนของ OPD นิติเวชศาสตร์ซึ่งเป็นผู้เก็บตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบและหาข้อไม่สอดคล้อง โดยห้ามแกะหรือเปิดตัวอย่างก่อน

ภายหลังการตรวจสอบความถูกต้องของสิ่งส่งตรวจเรียบร้อยแล้ว ให้ผู้รับตัวอย่างและผู้ส่งตรวจลงนามในระบบ sample tracking เพื่อบันทึกเป็น CoC และเพื่อยืนยันการส่งมอบพร้อมบันทึกเวลา วันที่ และสถานที่รับตัวอย่างอย่างครบถ้วน สิ่งส่งตรวจทุกชิ้นจะถูกจัดเก็บตามประเภทตัวอย่าง โดยตัวอย่างชนิดแห้ง เช่น cotton swab ให้เก็บในซองกระดาษแห้งสนิทปิดผนึกเพื่อเลี่ยงไม่ให้สิ่งส่งตรวจถูกแสงแดดตรงๆ และใส่ซองดูดความชื้นป้องกันการเกิดเชื้อรา จากนั้นเก็บไว้ในตู้เก็บตัวอย่างเฉพาะที่มีการควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 30 °C และเร่งดำเนินการสกัดภายใน 24 ชั่วโมง

2) สกัดสารพันธุกรรม และวัดปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ จากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้มเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากในงานตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลเนื่องจากตัวอย่างสามารถเก็บได้ง่าย และให้ปริมาณเซลล์เพียงพอสำหรับการตรวจ STRs การสกัดด้วย Chelex® 100 ร่วมกับ proteinase K เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการทำ PCR โดยลดความเสี่ยงจากสารยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibitors) ได้ดี

ก่อนเริ่มการสกัด ให้เตรียมพื้นที่ใน ห้อง Pre-PCR และจัดเตรียมอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อาทิเช่น microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL พร้อมทั้งระบุรหัสของสิ่งส่งตรวจนั้น micropipette พร้อม filter-tip น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส และเครื่องปั่นเหวี่ยง สำหรับหลอดขนาด 1.5 mL โดยเจ้าหน้าที่ต้องสวมถุงมือ หน้ากาก เสื้อกาวน์ และเปลี่ยนถุงมือใหม่ทุกครั้งที่เปลี่ยนตัวอย่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามตัวอย่าง

ลำดับขั้นตอนการปฏิบัติ

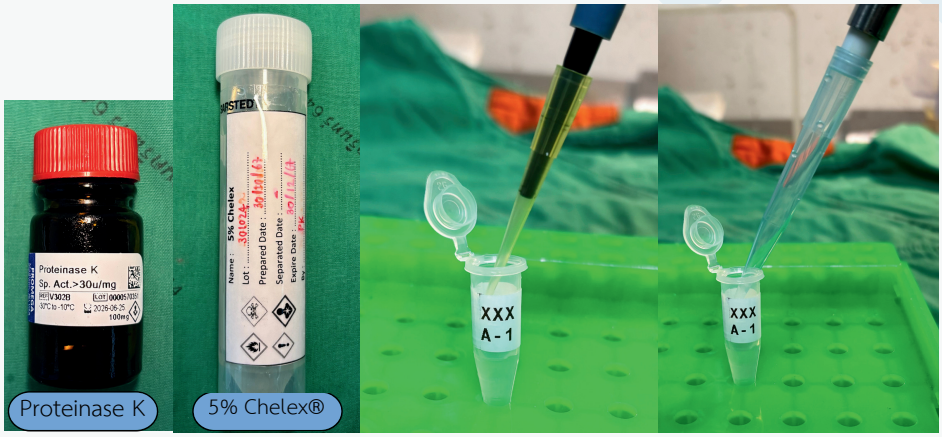
2.1 นำ swab ใส่ในหลอด eppendorf 1.5 mL ให้ก้านสำลีส่วนปลายที่สัมผัสภายในกระพุ้งแก้มลงในหลอด eppendorf ที่มีน้ำ น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส ประมาณ 300 µL และหมุนวนให้ทั่วเพื่อช่วยให้เซลล์เยื่อบุหลุดออกจากก้านไม้ประมาณ 5-10 รอบหมุน ดังภาพ 13



ภาพ 13 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (1)

2.2 ปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์ตกตะกอนปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว 12,000 rpm ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เซลล์แพ็คตัวอยู่ก้นหลอด จากนั้นใช้ micropipette ดูดน้ำส่วนใสออกให้หมดอย่างระมัดระวัง โดยถูกตะกอนเซลล์ให้ฟุ้ง

2.3 เติมสารในขั้นตอนสลายเซลล์ (ขั้นตอน lysis) โดยเติม Proteinase K ปริมาณ 15 µL และ 5% Chelex® resin ปริมาณ 200 µL ลงในหลอดตัวอย่าง ดังภาพ 14 ปิดฝาให้แน่นแล้ว vortex เบา ๆ เพื่อให้ส่วนผสมกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ



ภาพ 14 ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เยื่อบุกระพุ้งแก้ม (2)

2.4 Incubate ที่ 56 °C เพื่อย่อยผนังเซลล์โดยการนำหลอดไปวางในเครื่อง thermomixer และตั้งอุณหภูมิที่ 56 °C ตั้งค่า shaking speed 1,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เอนไซม์ Proteinase K ย่อยโปรตีนภายในเซลล์และปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา

2.5 หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ และทำให้ 5% Chelex® จับโลหะหนักโดยหลังครบเวลาในขั้นตอนย่อยเซลล์ให้นำหลอดไป incubate ที่ 95 °C เป็นเวลา 8 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และทำให้ chelex resin จับไอออนโลหะหนัก (เช่น Mg^{2+}) ที่อาจเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ DNase ซึ่งจะย่อยสลายดีเอ็นเอได้

2.6 ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นสารละลายดีเอ็นเอด้วยการปั่นที่ความเร็ว 12,000 rpm ประมาณ 3 นาที เพื่อให้เม็ดเรซิน chelex ตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ส่วนสารละลายใสด้านบนจะเป็นสารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมใช้งาน

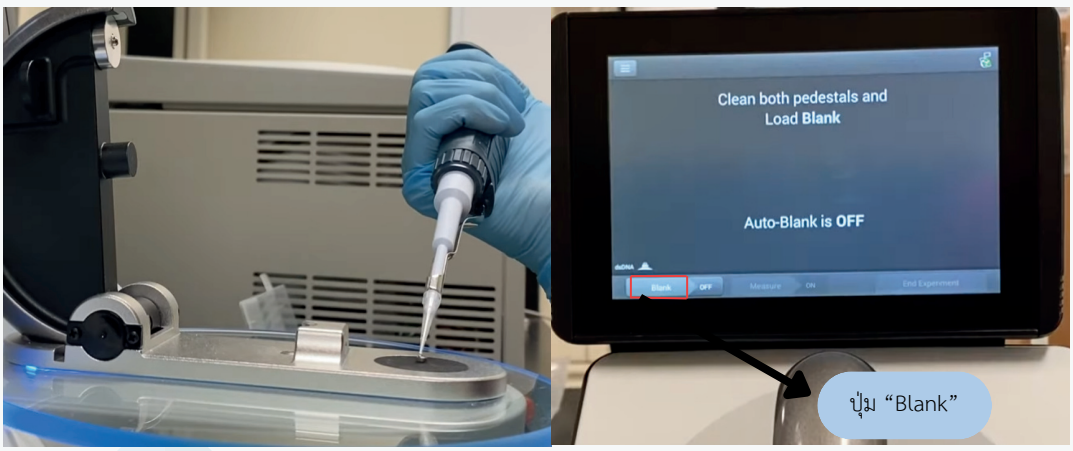
- *ห้าม VORTEX หรือดูดสารละลายแรงเกินไปหลังจากใส่ CHELEX เพราะอาจทำให้เรซินฟุ้งและปนเปื้อนเข้าสู่สารละลาย DNA*
- *ห้ามนำสารละลาย DNA ที่มีเม็ด Chelex ตกค้างไปทำ PCR เพราะเรซินจะจับ Mg^{2+} ใน master mix ทำให้ปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอถูกยับยั้งไม่เกิด*

2.7 ก่อนเริ่มการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารพันธุกรรม เจ้าหน้าที่ต้องตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง NanoDrop™ โดยเปิดเครื่อง ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้ระบบแสงและเซนเซอร์คงที่ จากนั้นทำความสะอาดพื้นผิวเลนส์วัดและแขนปิด (pedestal arm) ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ชนิดปราศจากขุย (kimwipe) ชุบด้วยน้ำกลั่นและเช็ดซ้ำด้วยเอทานอล 70% เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีคราบดีเอ็นเอจากการวัดครั้งก่อนตกค้างอยู่ ดังภาพ 15



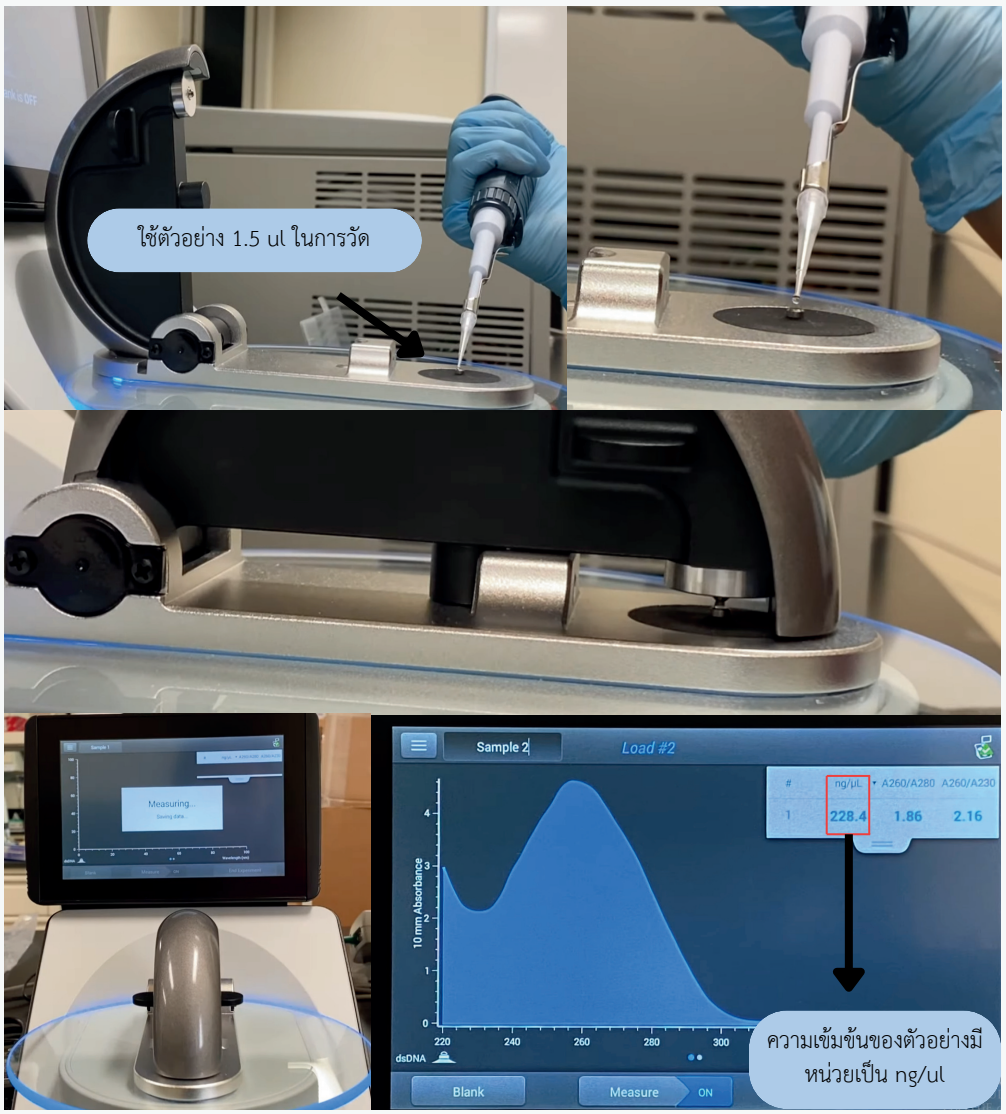
ภาพ 15 ขั้นตอนการทำความสะอาดพื้นผิวเลนส์วัด

2.8 เตรียมสารละลายเปล่า (blank) เพื่อใช้ตั้งค่าพื้นฐานการดูดกลืนแสง โดยใช้ น้ำกลั่น nuclease-free water ทำการดูดสารละลายเปล่าประมาณ 1.5 µL วางบนเลนส์ด้านล่างของเครื่องอย่างระมัดระวัง ปิดแขนวัดให้แนบสนิท แล้วกดปุ่ม “Blank” ดังภาพ 16 เพื่อให้เครื่องบันทึกค่าการดูดกลืนแสงพื้นฐาน หลังจากเครื่องแจ้งว่า blank เสร็จสิ้นให้ยกแขนขึ้นและเช็ดเลนส์ให้แห้งสนิทก่อนนำตัวอย่างจริงมาวัด



ภาพ 16 ขั้นตอนการตั้งค่า blank ก่อนการวัดตัวอย่างจริง

2.9 จากนั้นจึงเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการวัดปริมาณความเข้มข้น โดยก่อนเริ่มวัดปริมาณของตัวอย่างควรทำการปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็ว 10,000 rpm ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เม็ดเรซินตกตะกอนอยู่ด้านล่างป้องกันไม่ให้เรซินลอยขึ้นมารบกวนการวัด จากนั้นใช้ pipette ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 1.5 µL วางลงบนเลนส์ด้านล่าง และปิดแขนวัดให้สนิทดังภาพ 17 โปรแกรมทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างอัตโนมัติที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร พร้อมคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วย ng/µL และแสดงค่าอัตราส่วน A260/A280 และ A260/A230 บนจอ



ภาพ 17 วิธีการวัดตัวอย่างดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Nanodrop

2.10 ภายหลังการอ่านค่าของตัวอย่างแต่ละหลอด ให้ใช้กระดาษ Kimwipe ที่ชุบน้ำกลั่นเช็ดเลนส์ทั้งด้านบนและล่าง เพื่อป้องกันการสะสมของคราบเกลือหรือสารตกค้าง และควรทำการวัด blank ใหม่ทุกๆ 10 ตัวอย่างเพื่อรักษาความแม่นยำของการวัดในระยะยาว โดยผลการวัดทั้งหมดจะถูกบันทึกลงสมุดภายในห้องปฏิบัติการทุกตัวอย่าง

3) คำนวณปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอนถัดมาเป็นการปรับปริมาณสารพันธุกรรม เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) การปรับปริมาณ DNA template ที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดสัญญาณสูงผิดปกติ (off-scale peak) หรือเกิดสัญญาณรบกวน เช่น pull-up และ stutter มากขึ้น ในขณะที่ปริมาณที่ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดปัญหา allele drop-out หรือได้ DNA profile ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีการกำหนดปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ต้องการใช้ต่อหนึ่งปฏิกิริยาไว้ชัดเจน โดยอ้างอิงจากบริษัทผู้ผลิตน้ำยา ในที่นี้กำหนดเป้าหมายที่ 1 ng ของ ดีเอ็นเอในปริมาตรรวม 17.5 ul ก่อนจะเติม master mix อื่น ๆ ให้ครบปริมาตรปฏิกิริยา

ข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการคำนวณคือ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง NanoDrop™ หรือ real-time PCR ซึ่งแสดงผลในหน่วย นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µL) เมื่อทราบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ หรือ stock DNA แล้วจะสามารถคำนวณได้ว่าต้องใช้ปริมาตรดีเอ็นเอกี่ไมโครลิตร จึงจะได้มวลรวม 1 นาโนกรัมในปริมาตรรวม 17.5 ไมโครลิตร และต้องเติมน้ำกลั่น น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส เพิ่มเท่าใดเพื่อให้ได้ปริมาตรรวมตามที่กำหนด โดยอาศัยหลักการคำนวณพื้นฐานใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ (ng) = ความเข้มข้น (ng/ul) × ปริมาตร (ul)

เมื่อกำหนดปริมาณที่ต้องการไว้แล้ว (ในที่นี้คือ 1 ng) ก็สามารถจัดรูปสมการเพื่อหาปริมาตร DNA ที่ต้องใช้ได้ว่า

ปริมาตรดีเอ็นเอที่ต้องใช้ (ul) = ปริมาณที่ต้องการ (ng) ÷ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ul)

จากนั้นจึงนำปริมาตรดีเอ็นเอที่คำนวณได้ไปหักออกจากปริมาตรรวม 17.5 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือจะเป็นปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้เจือจางดีเอ็นเอให้อยู่ในข้อกำหนดของปฏิกิริยา เพื่อให้เห็นภาพชัดเจน สามารถยกตัวอย่างการคำนวณดังนี้ สมมติว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอจาก NanoDrop™ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 2 ng/µL และต้องการเตรียมส่วนของ DNA template สำหรับใส่ในหลอด PCR โดยกำหนดให้มีดีเอ็นเอปริมาณ 1 ng ในปริมาตรสุดท้าย 17.5 µL ให้คำนวณปริมาตรดีเอ็นเอที่ต้องใช้จากสมการข้างต้น

ปริมาตรดีเอ็นเอ ที่ต้องใช้ = 1 ng ÷ 2 ng/µL = 0.5 µL

ผลลัพธ์นี้หมายความว่า หากดูดดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 2 ng/µL ปริมาตร 0.5 ul จะมีมวลรวมของดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ng พอดี ขั้นต่อมาคือการปรับปริมาตรรวมให้เป็น 17.5 ul เพื่อเตรียมเป็นส่วนของ template ที่พร้อมเติม master mix ต่อไป

ดังนั้น ปริมาตรของน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ที่ต้องเติมคือ

ปริมาตรน้ำ = ปริมาตรรวมที่ต้องการ – ปริมาตรดีเอ็นเอ

= 17.5 µL – 0.5 µL

= 17.0 µL

เมื่อรวมสองส่วนนี้เข้าด้วยกัน จะได้ส่วนผสมในหลอดหนึ่งที่ประกอบด้วย

- ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 2 ng/µL ปริมาตร 0.5 µL (คิดเป็น 1 ng DNA)
- น้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์ 17.0 µL

รวมเป็นปริมาตรสุดท้าย 17.5 µL ซึ่งมี มวลรวมของดีเอ็นเอเท่ากับ 1 ng ตามที่กำหนด โดยสามารถนำส่วนผสมนี้ไปเติม master mix ในขั้นตอน

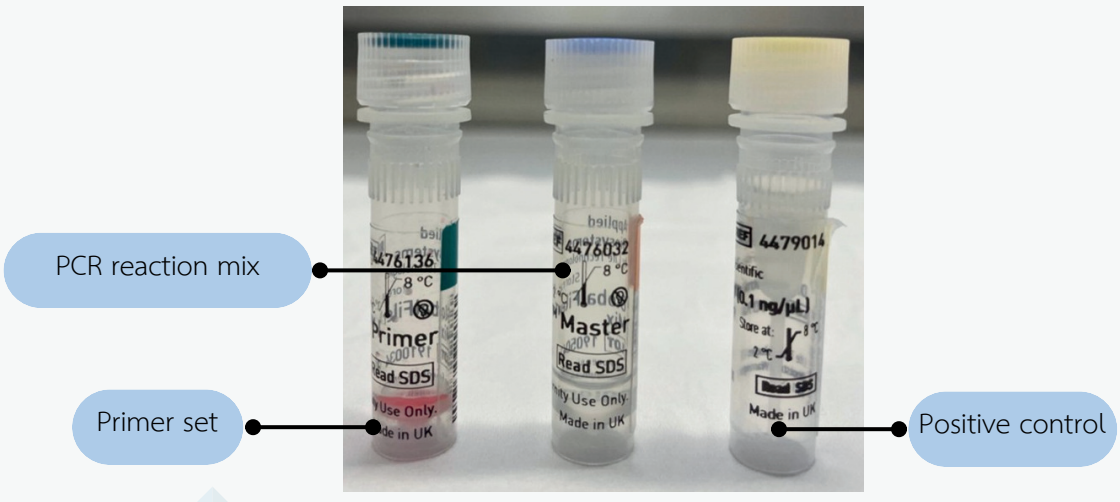
- *หลีกเลี่ยงการใช้ปริมาตร DNA เกินความจำเป็นซึ่งปริมาณ DNA ที่มากเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยา PCR เกิดสัญญาณสูงผิดปกติ (OFF-SCALE PEAK) และอาจเพิ่มโอกาสเกิด ARTIFACT เช่น PULL-UP หรือ STUTTER ทำให้การตีความผลทางนิติวิทยาศาสตร์คลาดเคลื่อนได้*
- *ห้ามปัดเศษตัวเลขหรือคำนวณปริมาตรโดยประมาณการคำนวณและปิเปตปริมาตร DNA ต้องมีความแม่นยำสูง โดยเฉพาะเมื่อทำงานกับตัวอย่างเข้มข้นต่ำ (low-template DNA) การคลาดเคลื่อนเพียง 0.1–0.2 ml อาจทำให้ปริมาณ DNA ในปฏิกิริยาต่างจากเป้าหมายอย่างมีนัยสำคัญ ควรให้ผู้ตรวจสอบอีกคนทวนตรวจความเข้มข้นดีเอ็นเอทุกครั้งก่อนเริ่ม PCR*

4) การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบทวีคูณ (PCR)

หลังจากปรับปริมาณสารพันธุกรรมให้เหมาะสมแล้ว ขั้นตอนถัดไปคือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบทวีคูณ ซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลโดยเทคนิค PCR การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้องอาศัยความแม่นยำทั้งในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา การตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler และการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้ได้ balanced peak profile ที่ดีและปราศจากสัญญาณรบกวนที่อาจส่งผลต่อการรายงานผล

ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์เลือกใช้ชุดน้ำยา VeriFiler™ Plus PCR Amplification (VF-PLUS) ซึ่งออกแบบมาเพื่อการตรวจโครโมโซมร่างกาย autosomal STRs จำนวน 23 ตำแหน่ง พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวมีการติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์หลายช่องสัญญาณ (multicolor dye) และมี buffer เฉพาะทางที่ช่วยเพิ่มความไวต่อดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำรวมถึงความทนต่อสารยับยั้งบางชนิดในตัวอย่างชีวภาพ โดยก่อนเข้าสู่การทำ PCR ให้เจ้าหน้าที่เตรียมพื้นที่ทำงานในห้อง Pre-PCR อย่างเคร่งครัดเช็ดพื้นผิวโต๊ะด้วย 70% ethanol และเปิด UV อย่างน้อย 15 นาทีเพื่อกำจัดดีเอ็นเอที่อาจตกค้าง เครื่องมือและอุปกรณ์ทั้งหมด เช่น micropipette, filter tip, microtube, cooling rack ต้องผ่านการอบฆ่าเชื้อและพร้อมใช้งาน ผู้ปฏิบัติงานต้องสวมถุงมือใหม่ทุกครั้งหลังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามตัวอย่างโดยมีขั้นตอนดังนี้

4.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับชุด VF-PLUS ประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก ได้แก่ PCR reaction mix, primer set ดังภาพ 18 และ DNA template ที่ผ่านการปรับปริมาณให้ได้ 1 นาโนกรัมในปริมาตร 17.5 µL ตามที่คำนวณไว้ก่อนหน้า



ภาพ 18 น้ำยา VeriFiler™ Plus PCR Amplification

4.2 ทำการเตรียม master mix ของกระบวนการ multiplex PCR โดยขั้นตอนนี้จะประกอบไปด้วย nucleases free water, dNTPs, $MgCl_2$, buffer PCR, และ taq polymerase ทั้งนี้ปัจจุบันนี้เพื่อให้การปฏิบัติงานมีความสะดวกและลดความเสี่ยงของ human error ได้มีน้ำยาสำเร็จรูปมากมายให้เลือกใช้ โดยทั่วไปน้ำยาในการทำปฏิกิริยาเหล่านี้จะประกอบไปด้วยสองส่วนหลักๆ ได้แก่ master mix ที่ประกอบไปด้วยสารข้างต้นที่รวบรวมมาในหลอดเดียว และ primer set ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR โดยน้ำยาสำเร็จรูปที่ห้องปฏิบัติการใช้คือ VF-PLUS โดยอัตราส่วนในการเตรียม master mix ต่อ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์เป็นดังตาราง 1

ตาราง 1 อัตราส่วนสำหรับการเตรียม master mix ต่อ 1 ตัวอย่างการวิเคราะห์

COMPONENT	VOLUME PER REACTION
master mix	5.0 uL
primer set	2.5 uL

**ขั้นตอนการเตรียมควรคำนึงถึงปริมาณเนื้อสารที่อาจจะหายไประหว่างการแบ่งดูดที่เกิดจากการ CARRY OVER ในแต่ละครั้ง*

4.3 หลังจากเตรียม master mix ตามจำนวนตัวอย่างที่จะทำการทดสอบแล้วทำการ vortex สารประมาณ 3 วินาที แล้วหลังจากนั้นใช้การปั่นเหวี่ยงเพื่อ spin down สารทั้งหมดให้ตกลงมาก้นหลอดทดลองทำการดูดแบ่งสาร 7.5 µl ลงในแต่ละช่องของ MicroAmp™ optical 96-well reaction plate หรือ MicroAmp™ tube เติม DNA template ที่ทำการปรับความเข้มข้นที่เหมาะโดยอัตราส่วนเป็นดังตาราง 2 ต่อจำนวน 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

ตาราง 2 ปริมาณของ DNA TEMPLATE ที่เติมลงไปในแต่ละ REACTION

SAMPLE	ADD
negative control	17.5 uL of nuclease-free water
test sample	17.5 uL of DNA template*

**หากปริมาณตัวอย่างรวม >500 pg ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส หรือลดความเข้มข้นด้วย low-TE buffer ให้ได้ปริมาณ 500 pg ในปริมาณ 17.5 uL หรือถ้าหากปริมาณตัวอย่างรวม <17.5 uL ให้เติมด้วยน้ำ Nucleases free water หรือ low-TE buffer ให้ได้ปริมาณ 17.5 uL*

4.4 ทำการเตรียมตัวควบคุม (positive control) โดยอัตราส่วนปริมาณเท่ากับ 10 µl ของ DNA control 007 (ที่มีความเข้มข้น 0.1 ng/ µl) หลังจากนั้นทำการผสมให้เนื้อสารเข้ากันอย่างเป็นเนื้อเดียวด้วยเครื่อง vortex 1,200 rpm เวลา 3 วินาที แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อเตรียมตัวอย่างครบทุกหลอดแล้วให้ปิดฝาหลอดให้แน่น จากนั้นย้ายหลอดเข้าเครื่อง Thermal Cycler ทำการตั้งโปรแกรมการทำปฏิกิริยา PCR บนเครื่อง thermal cycle ที่รองรับโหมด “9700 Simulation Mode” โดยให้ใช้อุณหภูมิและเวลารวมของโปรแกรม PCR นี้ 54 นาที 20 วินาที โดยไม่รวมช่วงเปลี่ยนอุณหภูมิและการพักที่ 4°C ดังตาราง 3

ตาราง 3 PCR CONDITION สำหรับการทำ ASTR ที่ใช้กับน้ำยา VF-PLUS

Initial incubation HOLD	First stage (2cycles)		Second stage (27cycles)		Final extension HOLD	Final hold HOLD
	denature	Anneal/extended	denature	Anneal/extended		
	CYCLE (29 cycles)					
95 °C	96 °C	62 °C	96 °C	59 °C	60 °C	4 °C
1min	10s	90s	10s	90s	5 min	up to 24 hr

4.5 วาง MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate หรือ MicroAmp™ tube ที่บรรจุ master mix และ DNA template ลงบนเครื่อง thermal cycle และกดปุ่มเลือก protocol PCR ข้างต้นแล้วกด “Start RUN” โปรแกรมการรัน PCR ของชุด VF-PLUS ประกอบด้วยช่วง denaturation, annealing และ extension ที่กำหนดไว้อย่างชัดเจนตามคู่มือชุดตรวจ โดยทั่วไปเริ่มต้นที่อุณหภูมิสูงเพื่อแยกสายคู่ของดีเอ็นเอตามด้วยช่วง annealing ที่ primer เข้าเกาะกับตำแหน่ง STRs และขั้นตอนสุดท้ายด้วยช่วง extension ที่ DNA polymerase สังเคราะห์สายใหม่ซ้ำกันหลายรอบจนได้จำนวน copy number ของดีเอ็นเอที่มากพอสำหรับการตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer ระยะเวลาการ injection โดยรวมประมาณ 1-1:30 ชั่วโมงต่อ 1 injection

4.6 เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ PCR หากไม่ต้องการทำการตรวจวิเคราะห์ต่อในขั้นตอนถัดไปให้เก็บ plate ในอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 2°C ถึง 8°C อุณหภูมิดังกล่าวสามารถเก็บ PCR product ได้ยาวนานประมาณไม่เกิน 14 วัน หากมากกว่า 14 วันแนะนำให้เก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ –25°C ถึง –15°C

5) วิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จนได้ PCR product สำหรับใช้ในการวิเคราะห์อัตลักษณ์บุคคลโดยใช้หลักการ fragment analysis กับเครื่อง ABI 3500 GA สีฟลูออเรสเซนต์จะติดอยู่กับ ดีเอ็นเอ ซึ่งการประยุกต์ใช้งานส่วนใหญ่ตัวอย่างดีเอ็นเอจะถูกแยกสายเป็น ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-strand DNA) โดยเริ่มต้นระบบ ในระหว่างช่วงเวลาทำงานเครื่องจะทำการเตรียมความพร้อมของ capillary โดยการส่งโพลิเมอร์ใหม่ภายใต้ความดันสูงจากปั๊มส่งโพลิเมอร์ ไปที่ตำแหน่งของเสีย (waste) ในแทงค์ cathode buffer (CBC) หลังจากนั้นจะทำการฉีดตัวอย่างด้วยวิธีอิเล็กโตรไคเนติกคอลลี่ (electrokinetically) เข้าไปใน capillary โดยใช้แรงดันไฟฟ้าต่ำเพียงแค่ไม่กี่วินาที หลังจากนั้นเครื่องจะทำการล้างปลาย capillary ในตำแหน่งล้าง (rinse position) ของ CBC จากนั้น capillary จะกลับสู่ตำแหน่งบัฟเฟอร์ (buffer position) ของ CBC ระดับของแรงดันไฟฟ้าค่อยๆ ขึ้นไปจนกระทั่งคงที่ สนามไฟฟ้าแรงสูงจะถูกสร้างขึ้นระหว่างปลายล่างของ anode Buffer (ABC) และแรงดันไฟฟ้าขั้วลบใช้กับส่วนหัวที่โหลดตัวอย่างของแผงแคปปิลารี่ (capillary array) สนามไฟฟ้าแรงสูงจะดึงดีเอ็นเอที่มีประจุลบแยกออกจากกัน โดยผ่านโพลิเมอร์ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ และไปถึงตำแหน่งตรวจสอบสารเรืองแสงก่อนเพื่อควบคุม

การแยกขนาดที่เหมาะสมและรักษาการแยกสายของ ดีเอ็นเอ ส่วน capillary จะถูกควบคุมความร้อนใน oven และในตำแหน่งของตัวตรวจสอบ (detection cell) โดยที่ oven จะมีระบบให้ความร้อนคือ peltier และพัดลมหมุนเวียนอากาศ (fan-circulated air)

เมื่อตัวอย่างเดินทางมาถึงตำแหน่งของตัวตรวจสอบ (detection cell) สีที่ติดอยู่กับดีเอ็นเอ จะถูกกระตุ้นด้วยลำแสงเลเซอร์ช่วงแคบ แสงเลเซอร์จะตรงไปยังระนาบของ capillary ทั้งจากด้านล่างและด้านบน แสงเลเซอร์จำนวนเล็กน้อยจะถูกดูดกลืนโดยสีและปลดปล่อยความยาวคลื่นของแสงออกไปทุกทิศทาง การจับภาพแสงฟลูออเรสเซนต์บนระบบแสงของเครื่องจะเกิดขึ้นขณะที่ปิดกั้นแสงเลเซอร์ แสงจะถูกส่งผ่านเกรตติง (grating) ซึ่งจะกระจายแสงออก แสงที่กระจายแล้วจะถูกถ่ายภาพไปยังแผง CCD ที่ถูกทำให้เย็น (cooled; scientific-grade CCD array) สำหรับแต่ละ capillary จะมีการเก็บข้อมูล 20 โซนบน CCD เพื่อให้ได้ข้อมูลทั้ง 6 ช่องสีสำหรับแต่ละ capillary และทำการแปลงข้อมูลของ 20 สีเป็นข้อมูล multi-dye สำหรับทุกรอบสำหรับงาน sequencing สีที่แตกต่างกัน 4 สีจะถูกใช้ในการกำหนดเบสทั้ง 4 ได้แก่ A, G, C และ T สำหรับงานวิเคราะห์ fragment สามารถตรวจสอบได้มากถึง 6 สีใน รอบเดียว ซึ่งทำให้สามารถตรวจตำแหน่งของ STRs พร้อมกันได้หลายตำแหน่ง

เมื่อเครื่องตรวจจับสัญญาณเรืองแสงแล้ว ซอฟต์แวร์ในเครื่องจะแสดงผลเป็นกราฟพีค (electropherogram) และจะทำการระบุขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบเวลาที่ชิ้นดีเอ็นเอเคลื่อนผ่านตำแหน่งตรวจจับกับสารมาตรฐานขนาดภายใน (internal size standard) ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบขนาด และเติมลงในแต่ละตัวอย่าง ซอฟต์แวร์จะสร้างเส้นโค้งมาตรฐานเพื่อคำนวณขนาดชิ้นดีเอ็นเอของตัวอย่างเป็นหน่วยคู่เบส (bp) จากนั้นซอฟต์แวร์จะใช้ข้อมูลช่องสีและช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเพื่อระบุตำแหน่ง STRs แล้วทำการเปรียบเทียบขนาดที่วัดได้กับชุดดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบหมายเลขอัลลีล (allelic ladder) โดยพิจารณาร่วมกับช่วงขนาดที่กำหนดสำหรับแต่ละอัลลีล (allele bin) เพื่อระบุหมายเลขอัลลีลที่สัมพันธ์กับจำนวนหน่วยซ้ำ เช่น อัลลีล 10 หมายถึงมีหน่วยซ้ำสมบูรณ์ 10 หน่วยตามเกณฑ์การเรียกชื่อของตำแหน่งนั้น การระบุจำนวนซ้ำจึงอาศัยการเทียบกับอัลลีลอ้างอิง ไม่ใช่การนำขนาดชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดหารด้วยจำนวนเบสต่อหน่วยซ้ำโดยตรง ทั้งนี้ต้องตรวจสอบคุณภาพของสารมาตรฐานขนาดภายในและ allelic ladder ให้ผ่านเกณฑ์ก่อนยอมรับผลการระบุอัลลีล โดยขั้นตอนการใช้งานมีดังนี้

5.1 ทำการเตรียมสารตัวกลางที่เป็นการทำละลาย PCR product ก่อนจะทำการ injection เข้าไปยังเครื่องตรวจวิเคราะห์ซึ่งสารทำละลายดังกล่าวประกอบไปด้วย สารสองชนิดได้แก่ Hi-Di™ formamide มีหน้าที่หลักเป็นตัวทำละลาย และ GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 มีหน้าที่เป็นเหมือน internal control ลงไปในแต่ละตัวอย่าง โดยอัตราส่วนที่ผสมต้องมีความถูกต้องแม่นยำดังตาราง 4

ตาราง 4 อัตราส่วนสำหรับ SIZE STD แต่ละ REACTION

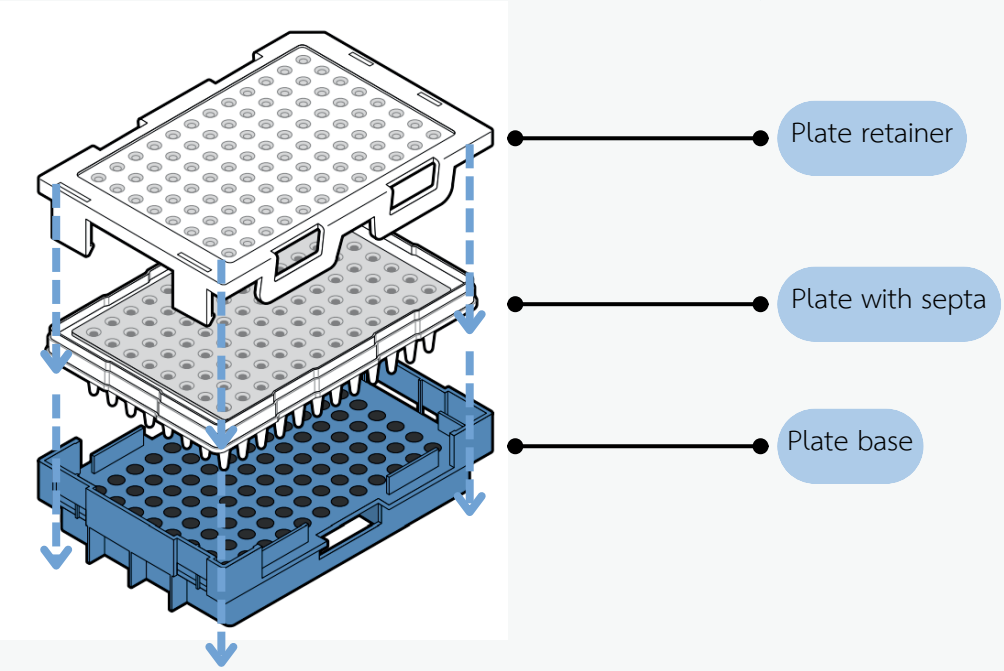
REAGENT	VOLUME PER REACTION
GeneScanTM 600 LIZ™ Size Standard v2.0	0.4 uL
HiDi™ Formamide	9.6 uL

5.2 หลังจากผสมส่วนประกอบสารข้างต้นไปแล้วให้ทำการ vortex 1,000 rpm 5 วินาทีแล้วทำการ spin down ให้เนื้อสารหลุดออกจากขอบภาชนะบรรจุ แล้วหลังจากนั้นจึงทำการเติมสารลงใน MicroAmp™ optical 96-well reaction plate ดังนี้

- o HiDi formamide ที่ผสม Size Standard แล้วปริมาณ 10 ul
- o PCR product, Negative control, Positive control หรือ Ladder ปริมาณ 1 uL

ทำการปิด plate ด้วย Septa แล้วทำการปั่นเหวี่ยง plate เพื่อให้สารลงไปยังก้นของ plate

5.3 นำ plate ไป heat ที่เครื่อง thermal cycle ที่ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที และอุณหภูมิ 4°C เวลาประมาณ 3 นาที หลังจากนั้นทำการประกอบ plate-based และ plate-retainer กับตัว MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate ดังภาพ 19



ภาพ 19 ขั้นตอนการประกอบ plate

5.4 หลังจากเตรียม plate เพื่อ injection เรียบร้อยแล้วจึงทำการ ให้เปิดคอมพิวเตอร์ของเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer แล้วทำการเข้าสู่ระบบ windows โดยให้ใส่ username และ password ที่ทางห้องปฏิบัติการตั้งค่าไว้คือ

- Username: **ADMIN-INSTR**
- Password: **ADMIN-INSTR**

เมื่อกรอกรหัสเพื่อเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์เรียบร้อยแล้ว ให้ทำการเปิดสวิตซ์ของตัวเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer กดที่ปุ่ม ปิด/เปิด ที่อยู่ด้านหน้าของเครื่องรุ่น 3500 และรอจนกระทั่งไฟแสดงสถานะเป็นสีเขียว ดังภาพ 20

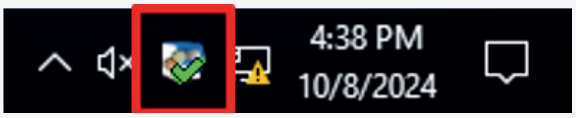


ภาพ 20 ตำแหน่งของปุ่มเปิด/ปิดเครื่อง และ สถานะสัญญาณไฟของเครื่อง

ตาราง 5 ตารางบอกสถานะเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 genetic analyze

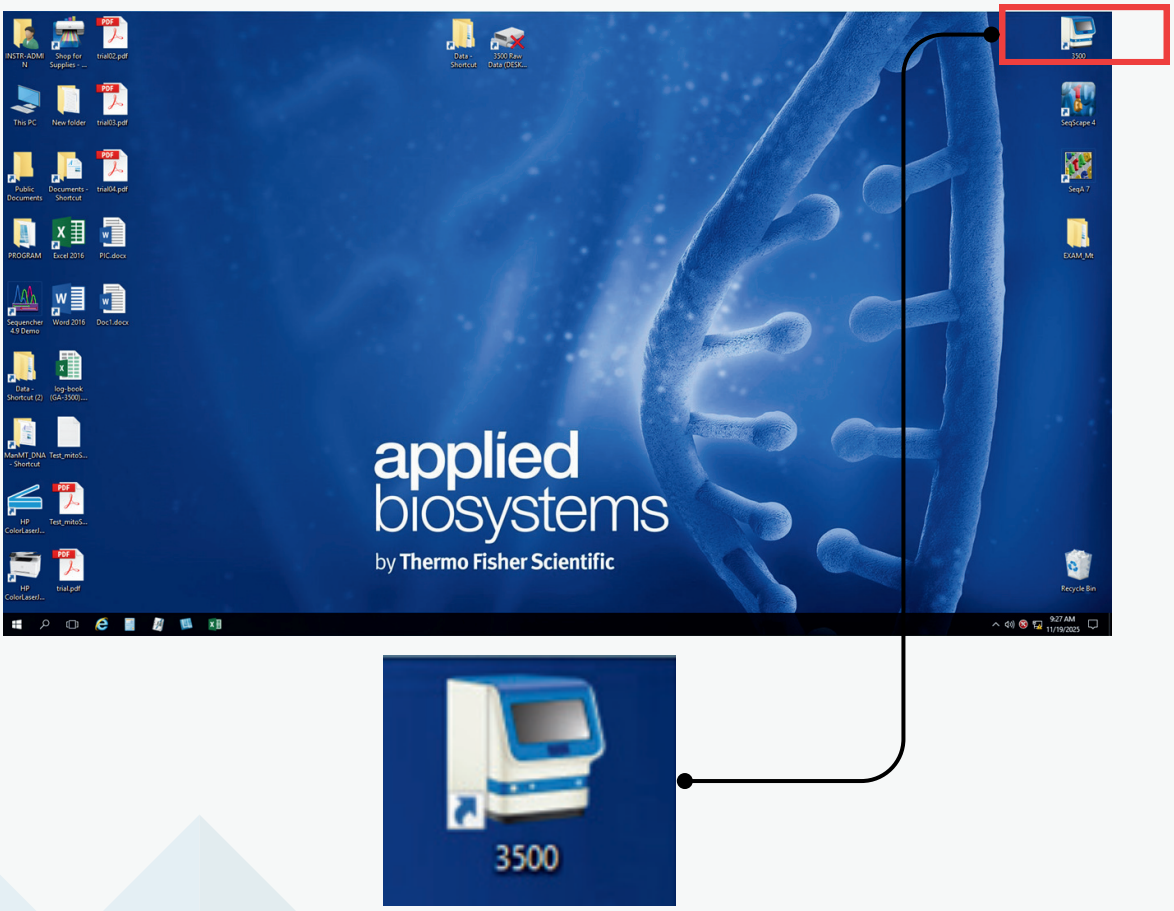
ตัวชี้วัด	*สถานะ*
ไฟปิดทั้งหมด	*เครื่องปิด*
ไฟสีเขียว	*เครื่องกำลังทำงาน (รอทำงาน) หยุดการทำงานชั่วคราว(Pause run),หยุดการทำงาน(terminate run),ปุ่มหยุดการฉีดตัวอย่าง(ใน SW) กดปุ่มโดยผู้ปฏิบัติงานหมายเหตุ :ผู้ปฏิบัติงานสามารถยกเลิกการฉีดตัวอย่างเมื่อไฟสีเขียวกระพริบเท่านั้น ไม่ควรทำเมื่อไฟเป็นสีเขียวทึบ*
ไฟสีเขียว (กระพริบ)	*เครื่องกำลังทำงาน (ทำงานต่อเนื่อง)*
ไฟสีส้ม (กระพริบ)	*กระแสไฟฟ้าขึ้น กำลังตรวจสอบระบบอัติโนมัติการทำงานหยุดชั่วคราวประตูเปิดการทำงานล้มเหลว และไม่จำเป็นต้อง restart เครื่อง 3500*
ไฟสีส้ม	*เตรียมพร้อม (Standby)*
ไฟสีแดง	*การตรวจสอบระบบอัตโนมัติล้มเหลว เครื่องมือมีปัญหา ต้องการ restart เครื่อง 3500 และคอมพิวเตอร์*

5.4 หลังจากเปิดตัวเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyzer แล้วให้สังเกตไอคอนบริเวณตรงมุมล่างของจอโดยเป็นการตรวจสอบสถานะของไอคอนที่มุมล่างด้านขวาของจอจะแสดงการตรวจสอบเซิร์ฟเวอร์ของเครื่อง (3500 server monitor) ถ้าพร้อมใช้งานไอคอนจะแสดงเครื่องหมาย ✓ สีเขียวดังภาพ 21

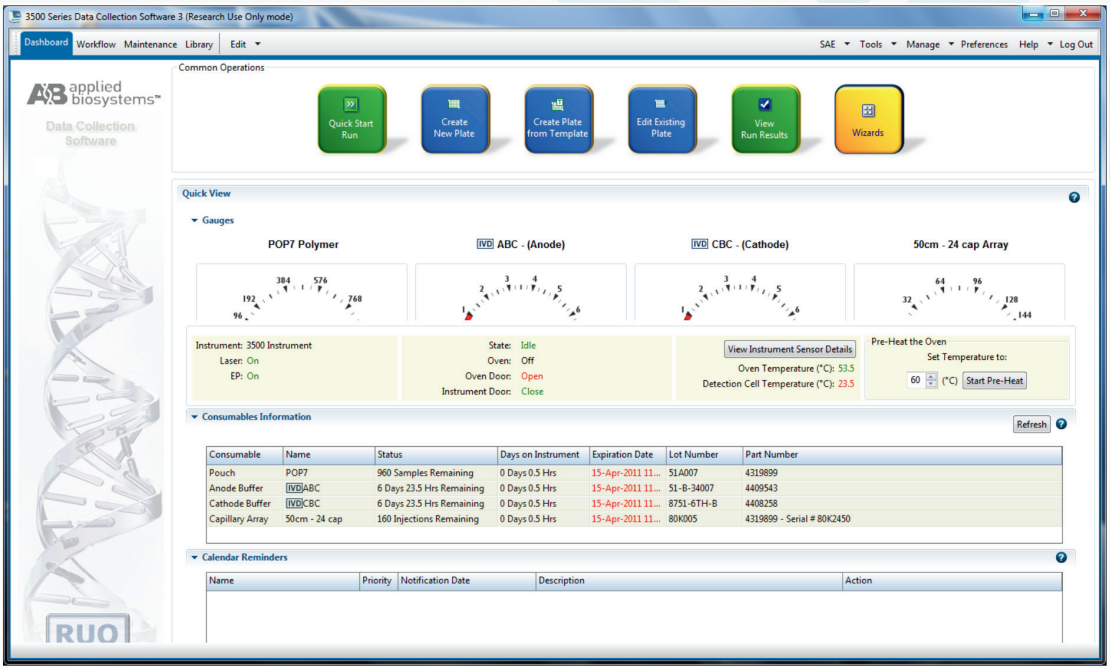


ภาพ 21 ไอคอนบ่งบอกสถานะ server ของเครื่อง
ABI 3500 Genetic Analyze

5.5 กดเข้าโปรแกรม 3500 data collection software ดังภาพ 22 โดยเมื่อเข้าสู่โปรแกรมแล้วจะพบกับ dashboard หน้าจอแรกที่ปรากฏขึ้นเมื่อเริ่มปฏิบัติงานกับ 3500 data collection software ดังภาพ 23



ภาพ 22 ไอคอนโปรแกรมของเครื่องอัตโนมัติ
ABI 3500 Genetic Analyze



ภาพ 23 Dashboard ของโปรแกรมของเครื่องอัตโนมัติ ABI 3500 Genetic Analyze

5.6 เมื่อโปรแกรมแสดง dashboard เรียบร้อยแล้วให้ทำการสร้าง plate ของตัวอย่างเพื่อทำการ injection โดยกดที่ปุ่ม “Create new plate” ดังภาพ 24

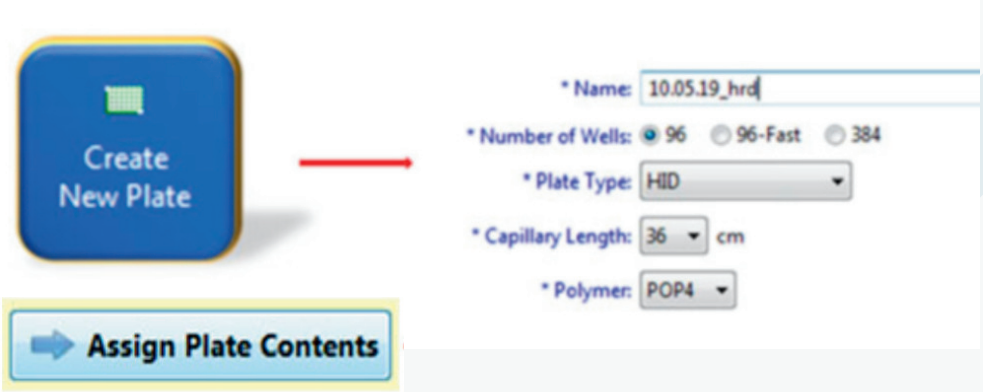


ภาพ 24 ปุ่มคำสั่งเพิ่มเริ่มสร้าง plate สำหรับการตรวจวิเคราะห์

5.7 ทำการกำหนดลักษณะการทดสอบของ plate โดยให้เลือกชนิดของ plate เป็น

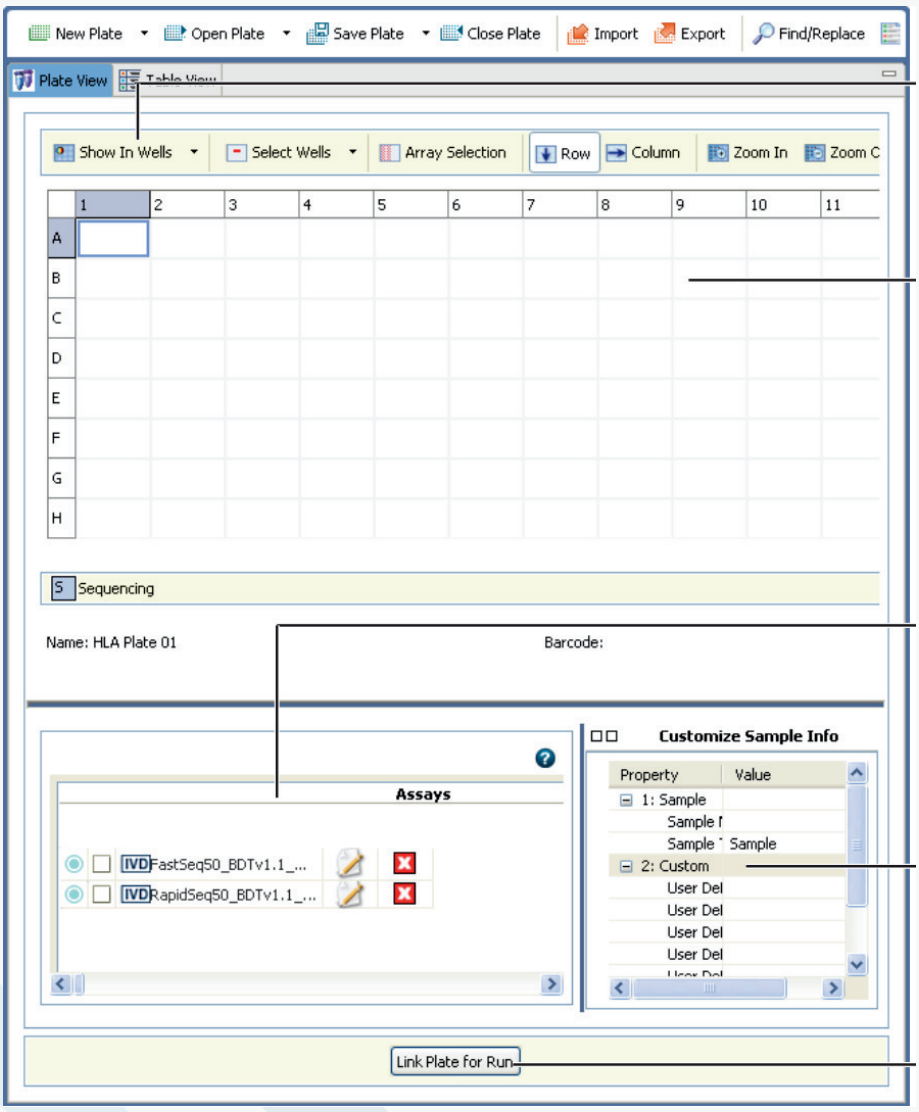
- o Name: ใส่ชื่อของ plate ที่ต้องการทดสอบ
- o Number of plates: 96 well-plates
- o Plate type: HID เป็นการตรวจ (Human identification)
- o Capillary Length: ความยาวของเส้น capillary 36 เซนติเมตร
- o Polymer: POP-4 Polymer

ดังภาพ 25 หลังจากนั้นให้กดตรงปุ่ม “Assign plate content” เพื่อเข้าไปสู่ขั้นตอนการบอกตำแหน่งของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ใน plate ที่กำลังจะทำการ injection

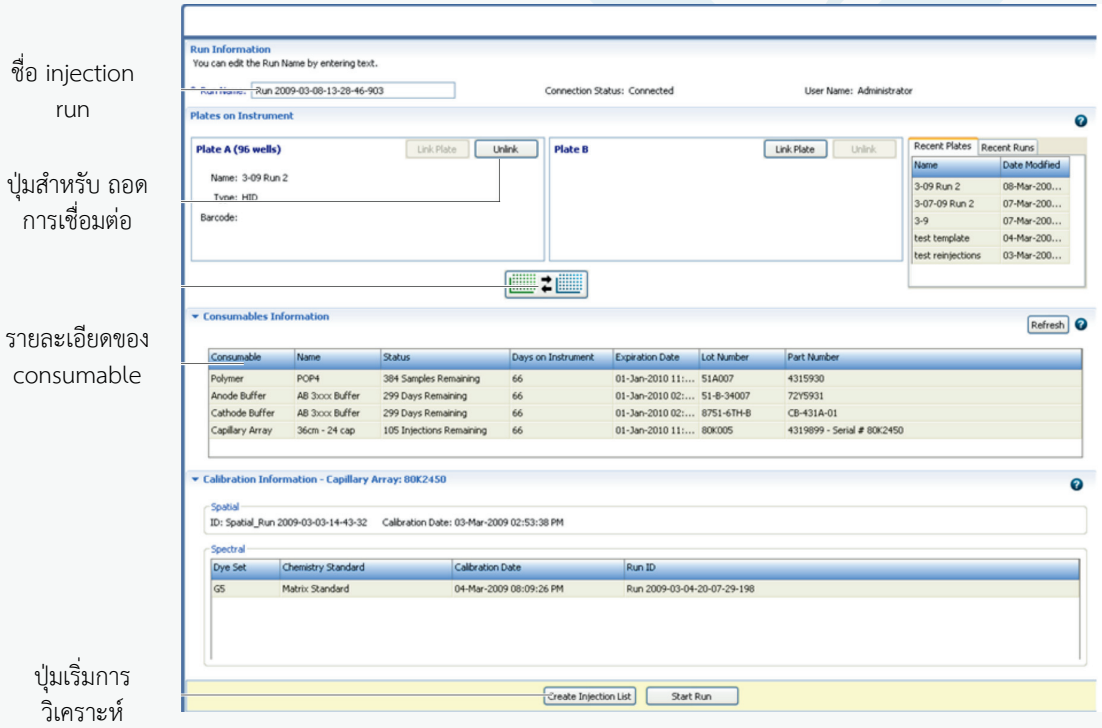


ภาพ 25 หน้าต่างสำหรับกำหนดลักษณะของ plate ในการวิเคราะห์ (1)

5.8 เมื่อกดปุ่ม Assign plate content แล้วจะพบกับหน้าต่างดังภาพ 26 เป็นหน้าต่างเพื่อกำหนดตำแหน่งและลักษณะต่างๆในการตรวจวิเคราะห์ที่อยู่บน plate ที่จะทำการ injection ซึ่งมีลักษณะดังนี้ เมื่อกรอกข้อมูลครบให้กดปุ่ม “Link Plate for Run” เพื่อเชื่อมต่อกับเครื่อง



ภาพ 26 หน้าต่างสำหรับกำหนดลักษณะของ plate ในการวิเคราะห์ (2)



ภาพ 27 บ่งบอกสถานะการเชื่อมต่อของ plate กับเครื่องตรวจวิเคราะห์

5.9 หลังจากทำการ link plate for run เรียบร้อยแล้วจะพบกับหน้าต่างแสดงสถานะการเชื่อมต่อระหว่าง plate ที่จะตรวจวิเคาะห์กับเครื่อง ดังภาพ 27 ให้ทำการตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้ง คือตำแหน่งที่วาง plate ในเครื่อง (position A หรือ position B) ชื่อของ plate และ consumable ให้อยู่ในสถานะที่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ หลังจากนั้นให้กดปุ่ม “Start Run” ให้เครื่องทำการ injection ตัวอย่าง

5.10 ในกรณีที่ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า internal control หรือสัญญาณควบคุมคุณภาพไม่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ให้ผู้ปฏิบัติงานตรวจสอบความพร้อมของเครื่องมือและ consumables เช่น ตรวจสอบวันหมดอายุของ consumables ที่ใช้ในการ injection รอบนั้น รวมถึงพิจารณาปรับค่า injection ให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์รอบนั้น เช่นการปรับลดหรือเพิ่มค่า injection time หลักจากดูผลของปริมาณตัวอย่างที่ถูก injection ในรอบนั้นๆ เช่นหากพบว่าตัวอย่างของ peak ต่ำกว่า cut-off ที่มีไว้เพื่อ calling allele ให้เพิ่มค่า injection time ครั้งละ 1 วินาที หากยังพบความผิดปกติของสัญญาณหรือค่าการแยกขนาดไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ควรแนะนำให้ดำเนินการ re-calibration ตามแนวทางการดูแลรักษาเครื่องมือของห้องปฏิบัติการ ซึ่งการ re-calibration จำเป็นต้องแจ้งผู้ดูแลเครื่องมือจากทางบริษัทเป็นผู้ดำเนินการ re-calibration ให้หลังจากตรวจสอบและแก้ไขเรียบร้อยแล้ว จึงทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ

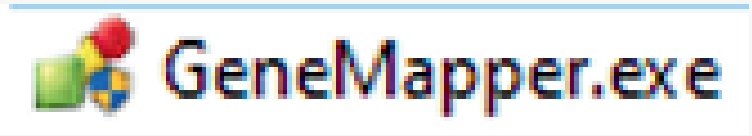
6) วิเคราะห์ผลการทดสอบ

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ injection ตัวอย่างด้วยเครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer ข้อมูลที่ได้จะถูกแปลงให้อยู่ในรูปของ electropherogram ซึ่งจัดเป็น raw data ซึ่งจะแสดงพีคของสัญญาณแต่ละชนิด allele ตามลำดับขนาดของแต่ละ locus ที่ต่างกันโดยการอ่านผลต้องดำเนินการผ่านซอฟต์แวร์ GeneMapper™ โดยพิจารณาจากความชัดเจนของพีค ความสูงของพีค (peak height) ความสมดุลของ allele (peak balance) และตำแหน่งของ allelic ladder เพื่อระบุขนาดของ allele ในแต่ละ locus อย่างถูกต้อง การอ่านผลควรพิจารณาเฉพาะพีคที่มีลักษณะตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด เช่น มีค่าความเข้มเกินเกณฑ์ threshold ไม่มีลักษณะ stutter หรือ pull-up peak รบกวน และต้องปรากฏ internal size standard ครบทุกตำแหน่งในทุกตัวอย่างหากพบความผิดปกติควรพิจารณาทบทวนกระบวนการก่อนหน้า เช่น PCR amplification หรือการโหลดตัวอย่างซ้ำ โดยขั้นตอนการนำ raw data มาวิเคราะห์ผลมีขั้นตอนดังนี้

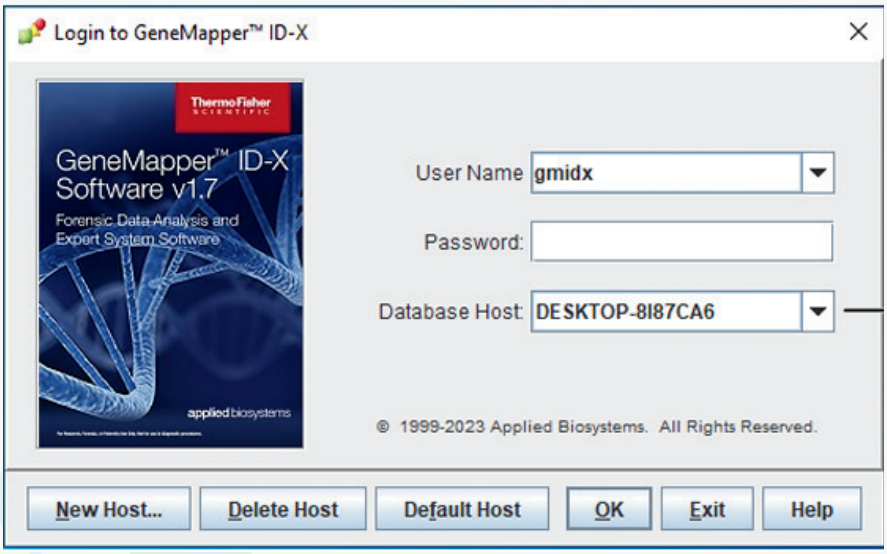
6.1 ทำการเปิดโปรแกรม GeneMapper™ ดังภาพ 28 แล้วทำการเข้าสู่ระบบโดยให้ใส่ Username และ Password ที่ทางห้องปฏิบัติการตั้งค่าไว้คือ

- o Username: **gmidx**
- o Password: **s3rvic3**

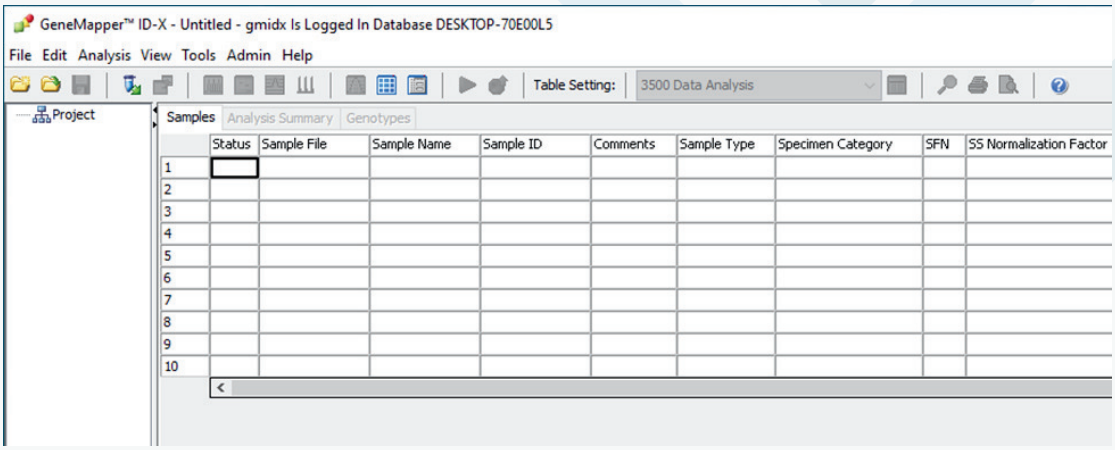
ดังภาพ 29 หลังจากเข้าสู่โปรแกมแล้วจะพบกับหน้าต่างหลักของโปรแกรม ดังภาพ 30



ภาพ 28 ไอคอนโปรแกรม GeneMapper™

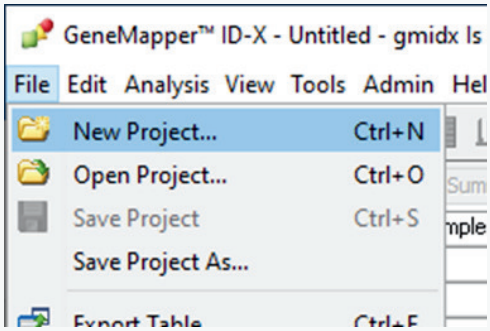


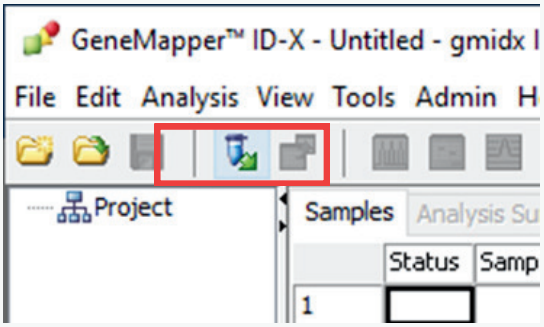
ภาพ 29 หน้าต่าง login เข้าโปรแกรม GeneMapper™

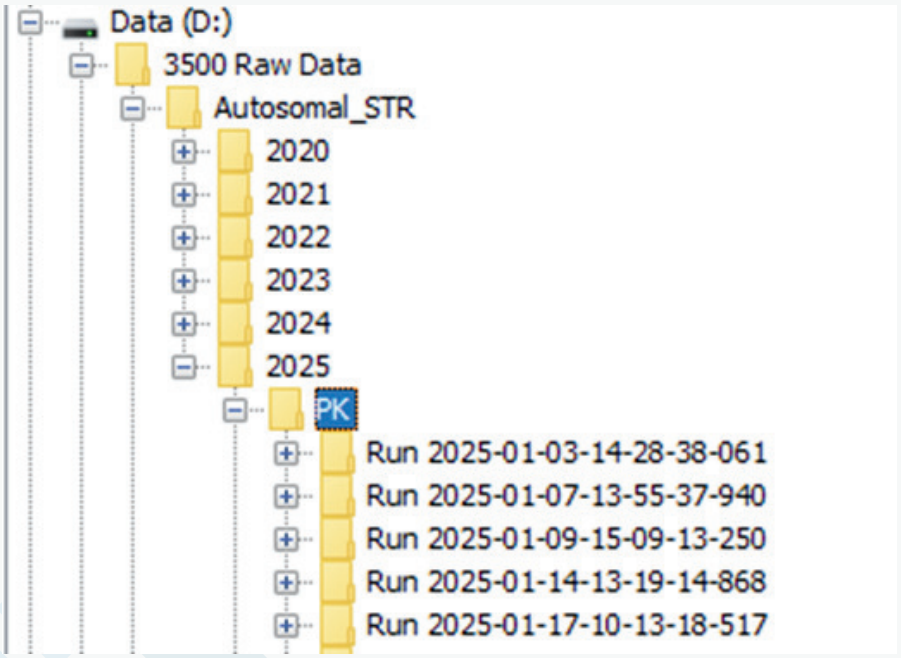


ภาพ 30 หน้าต่างหลักของโปรแกรม GeneMapper™

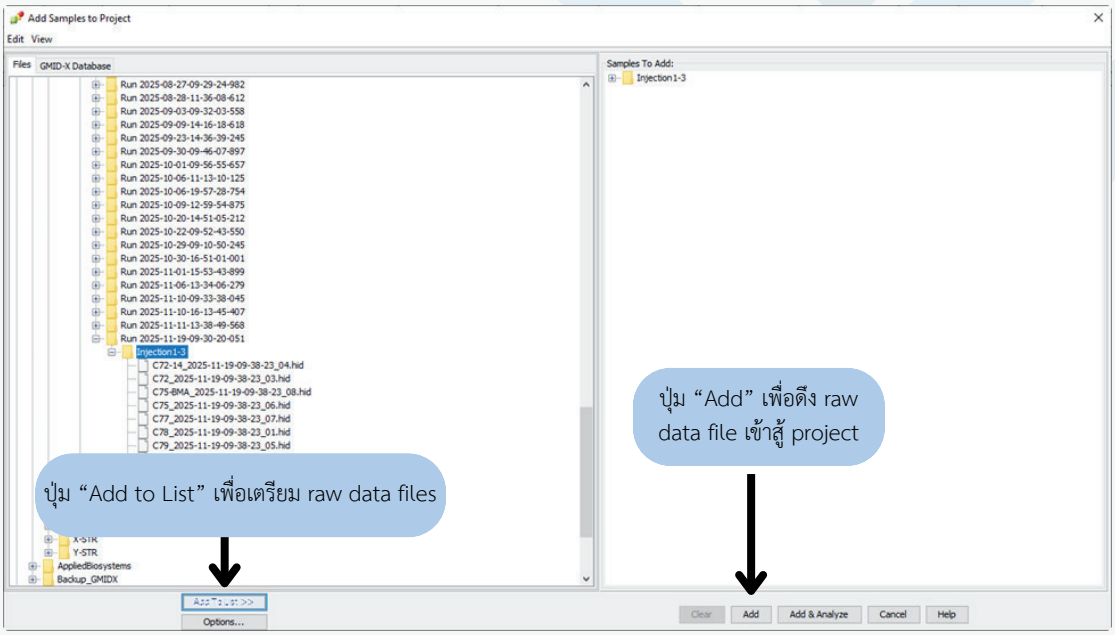
6.2 ทำการ import raw data file ที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปยัง project โดยเข้าไปที่คำสั่ง File - > New Project - > กดที่ icon - > เลือก folder ที่มี raw file ที่ต้องการวิเคราะห์หลัง จากนั้นกดปุ่ม “Add to List - > Add” ดังภาพ 31-32 เพื่อทำการดึง raw file เข้าสู่ project







ภาพ 31 ขั้นตอนการใช้ raw data files เพื่อทำการวิเคราะห์ (1)



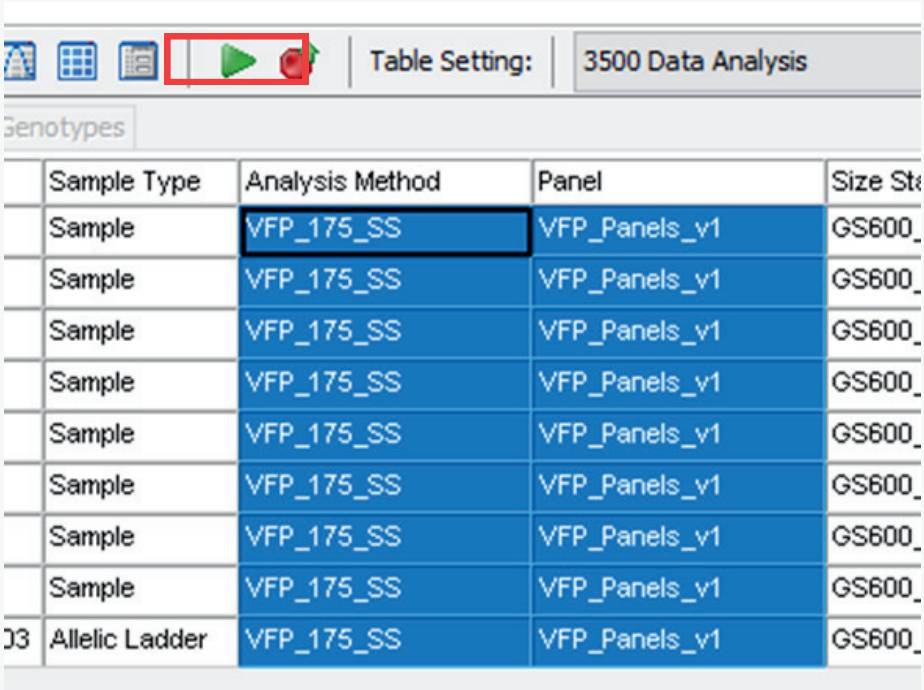
ภาพ 32 ขั้นตอนการใช้ raw data files เพื่อทำการวิเคราะห์ (2)

6.3 หลังจาก import raw data files เข้าสู่ project เรียบร้อยให้ทำการกำหนด ดังภาพ 33

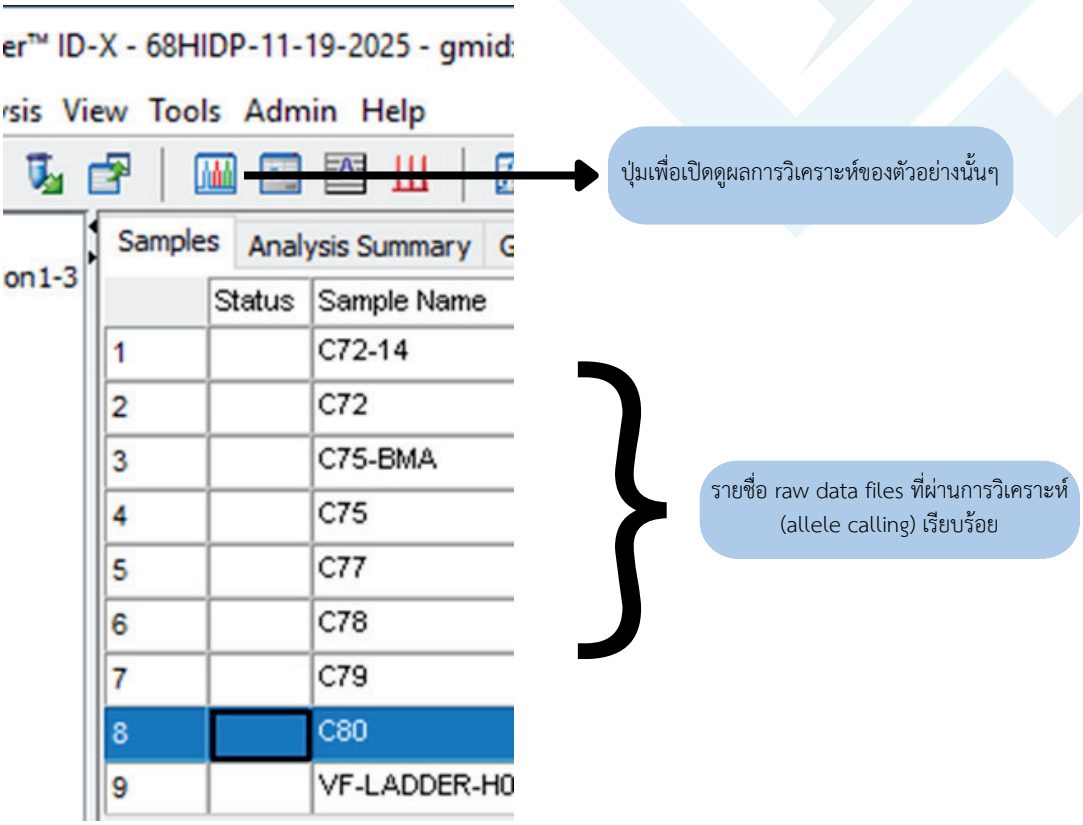
o Method Analysis: VFP_175_SS (เป็นชุดกฎที่ใช้ในการประมวลผลไฟล์)

o Panels: VFP_Panels_v1 (ชุดข้อมูลที่บอกว่าตัวอย่างนี้ใช้ STRs markers ชนิดไหน)

หลังจากนั้นทำการกดปุ่ม  เพื่อเริ่มการวิเคราะห์

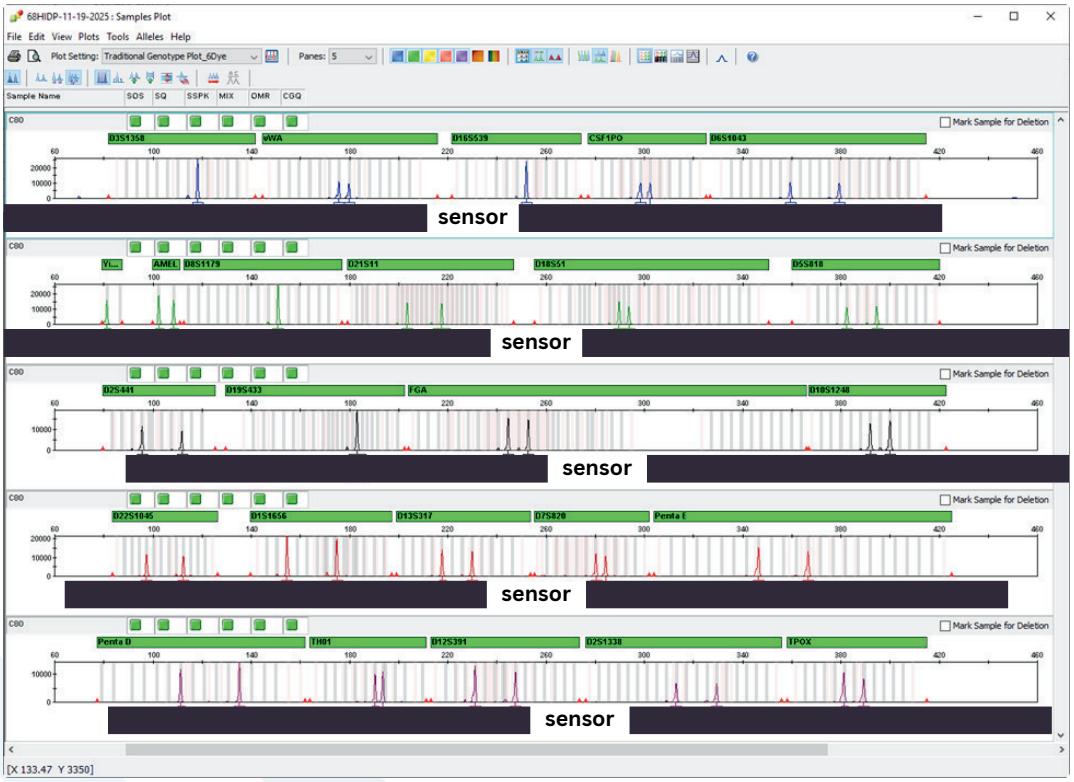


ภาพ 33 การตั้งค่าการวิเคราะห์ตัวอย่าง



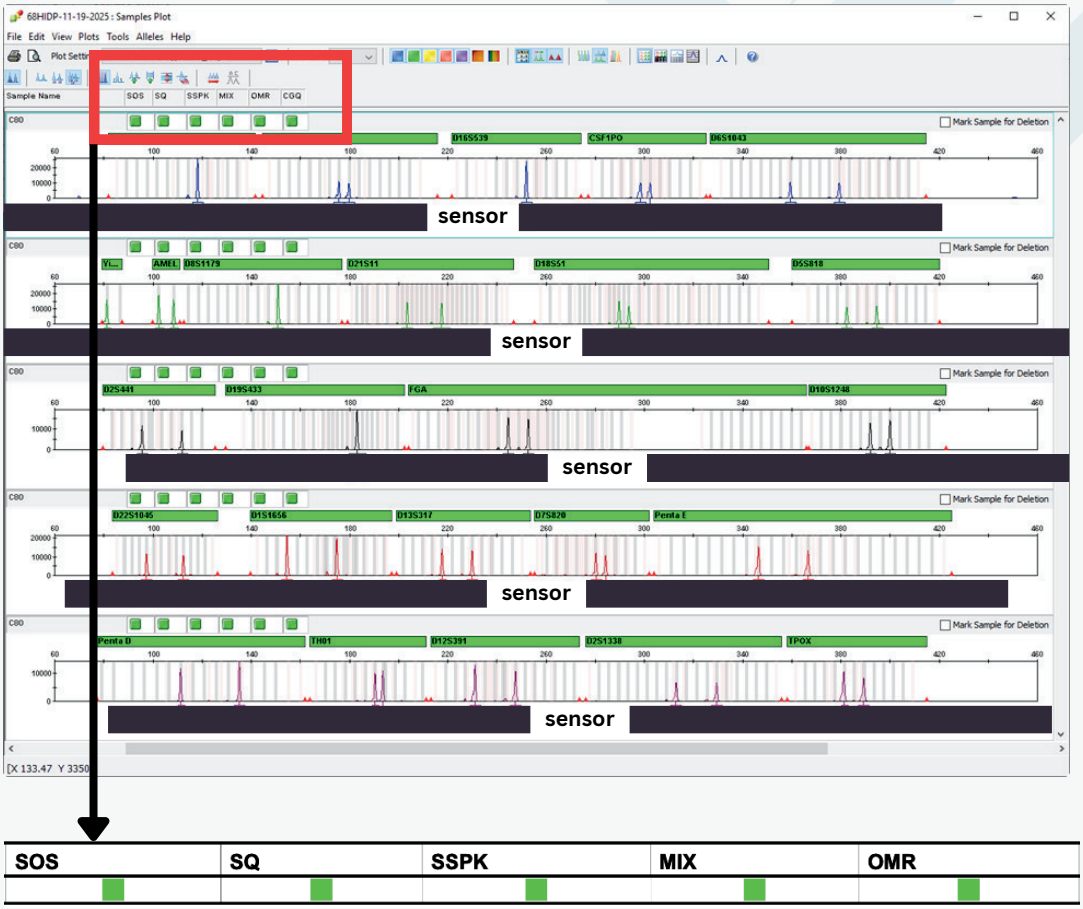
ภาพ 34 ขั้นตอนเข้าดูผลตัวอย่างที่ผ่านการทำ allele calling

6.4 ทำการเปิดดูผลตัวอย่างการวิเคราะห์ (allele calling) โดยกดที่ชื่อตัวอย่างที่ต้องการดูผล แล้วทำการกดปุ่ม  ดังภาพ 34 หลังจากนั้นหน้าต่างผลการวิเคราะห์จะแสดงขึ้นดังภาพ 35



ภาพ 35 electropherogram ของตัวอย่างวิเคราะห์

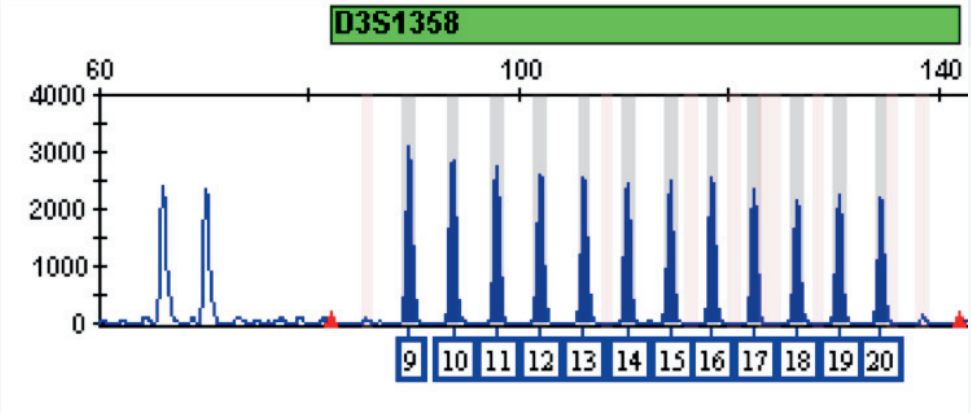
- ความหมายของ ALERT FLAG แต่ละ PARAMETER ของตัวอย่างวิเคราะห์



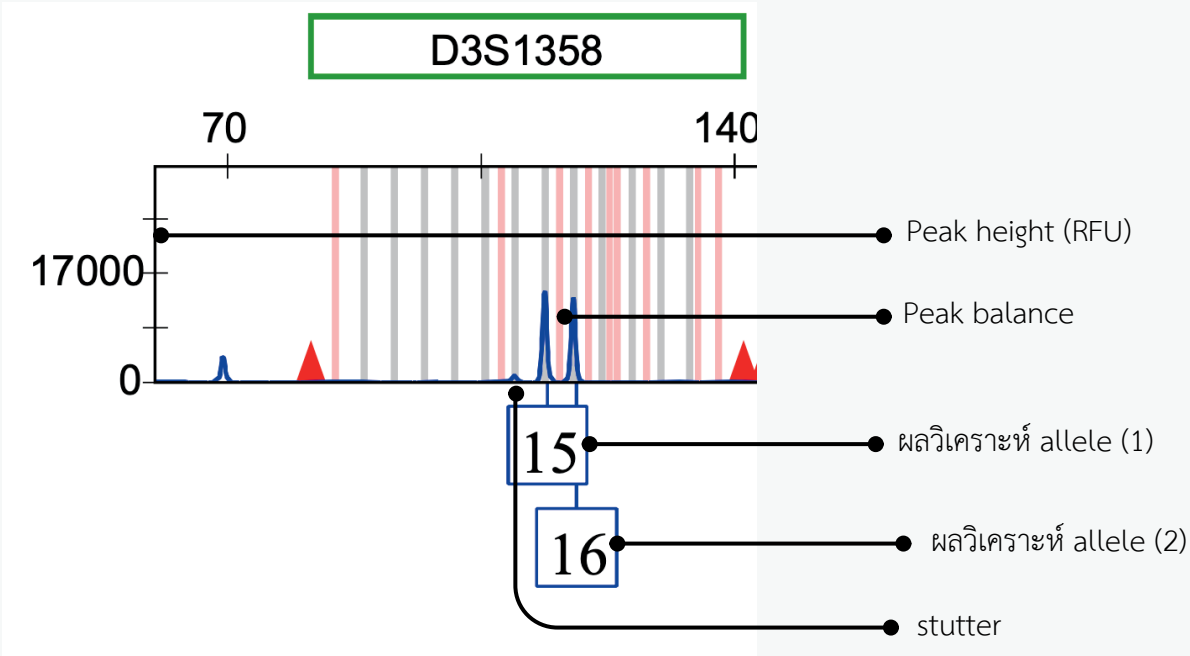
ภาพ 36 parameter ของตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ในโปรแกรม GeneMapper™

- ลักษณะของ Alert flag แต่ละ parameters นั้นหมายถึง
    - *SOS (Sample Overloaded Signal): เป็นการเตือนว่า สัญญาณของ allele บางพีคมีความเข้มสูงเกินค่าที่กำหนด (Overloaded) ซึ่งอาจเกิดจากการใส่ DNA มากเกินไปในขั้นตอนการ PCR หรือโหลดตัวอย่างมากเกินไป*
    - *SQ (Sizing Quality): เป็นการเตือนว่า คุณภาพของการจัดขนาด (size calling) ของ fragment ไม่ผ่านเกณฑ์คุณภาพ*
    - *SSPK (Single Source Peak): เตือนว่าพบ พีคเดียวในตำแหน่งที่ควรมี 2 พีค (ในกรณี diploid marker)*
    - *MIX (Mixture): พบสัญญาณที่ บ่งชี้ว่าตัวอย่างอาจเป็นส่วนผสมของ DNA มากกว่า 1 บุคคล*
    - *OMR (Off-Marker Region): พีคที่ตรวจพบ อยู่นอกช่วงขนาดของ marker ที่คาดไว้ (off-ladder)*

- ตรวจสอบตำแหน่งของ allelic ladder เพื่อระบุขนาดของ allele ในแต่ละ locus อย่างถูกต้อง



ภาพ 37 ผลของ Allelic lader electropherogram ที่ถูกต้อง



ภาพ 38 ผลการตรวจวิเคราะห์ของ electropherogram ที่สามารถออกผลได้

- เกณฑ์การอ่านผล electropherogram ของตัวอย่างวิเคราะห์
  - *มีค่าความเข้มเกินเกณฑ์ threshold หรือ มี Peak high >4,000 RFU*
  - *ไม่พบ stutter calling*
  - *ไม่พบ pull-up peak*
  - *ความสมดุลของ allele (peak balance)*

7) รายงายผลการตรวจวิเคราะห์

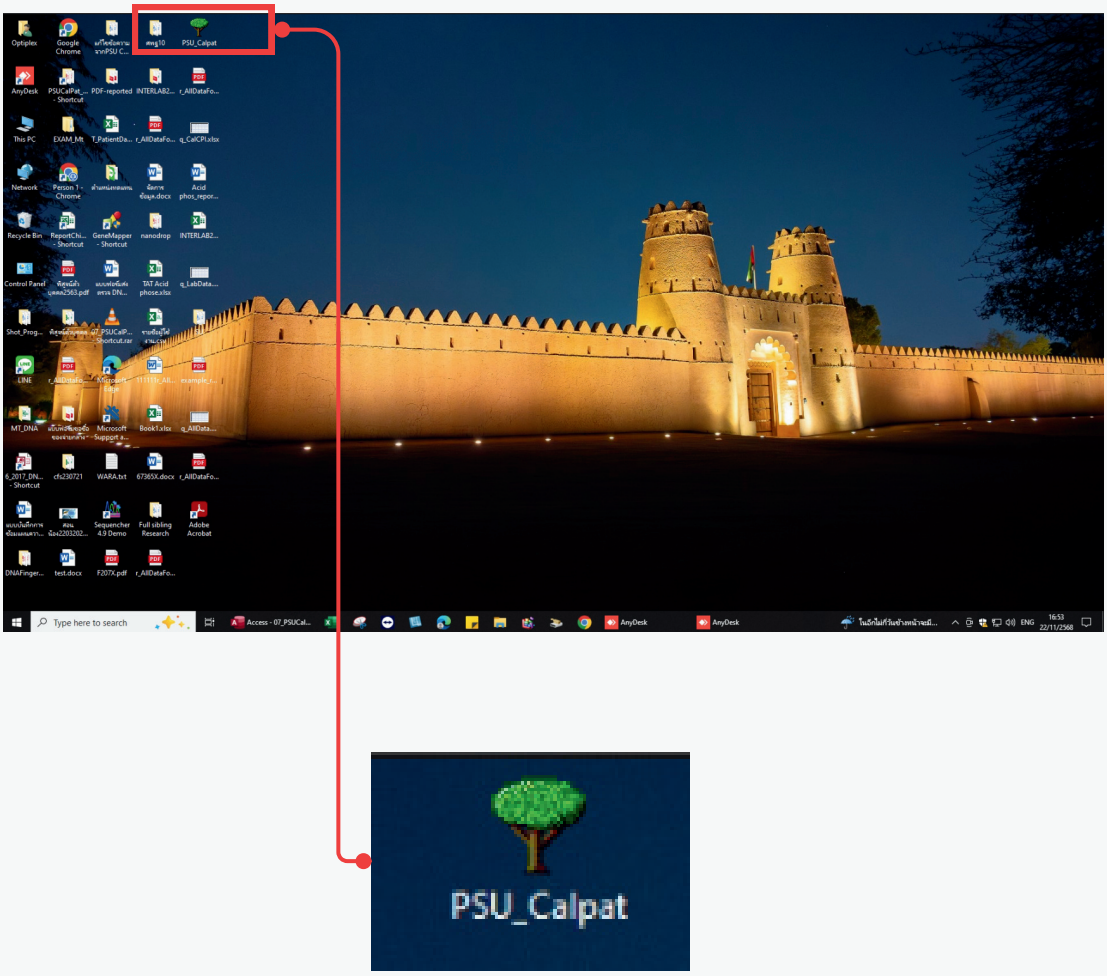
หลังจากทำการอ่านผลส่วนที่เป็นกราฟ electropherogram ของตัวอย่างวิเคราะห์เรียบร้อยแล้วให้ทำการปริ้นผลเป็น hard copy เพื่อนำไปพิมพ์รายงานการตรวจวิเคราะห์โดยมีขั้นตอนดังนี้

7.1 ทำการเปิดคอมพิวเตอร์ของเครื่องที่มีโปรแกรมรายงานผล “PSU_calpat” แล้วทำการเข้าสู่ระบบ windows โดยให้ใส่ Username และ Password ที่ทางห้องปฏิบัติการตั้งค่าไว้คือ

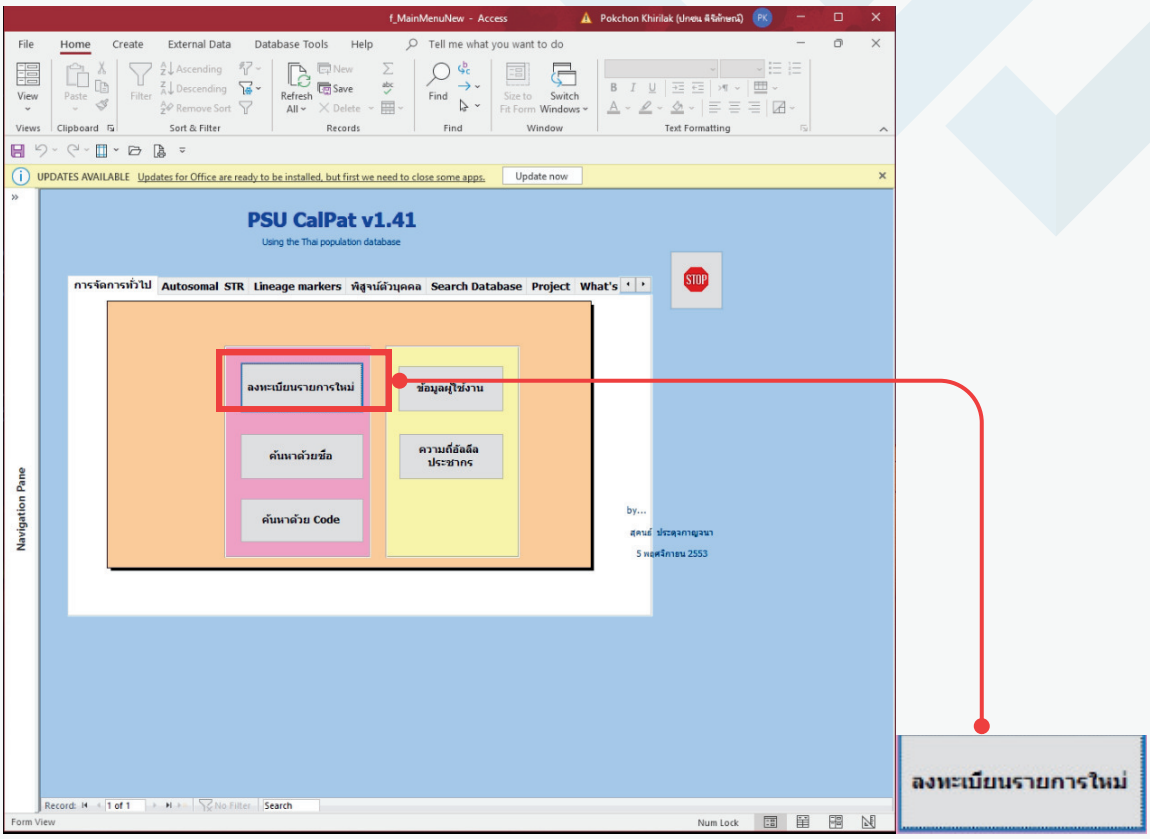
o Username: **ADMIN-INSTR**

o Password: **dnna357dnna**

กดเข้าโปรแกรม PSU_calpat ดังภาพ 39 โดยเมื่อเข้าสู่โปรแกรมแล้วจะพบกับ Dashboard หน้าจอแรกที่ปรากฏขึ้น ดังภาพ 40

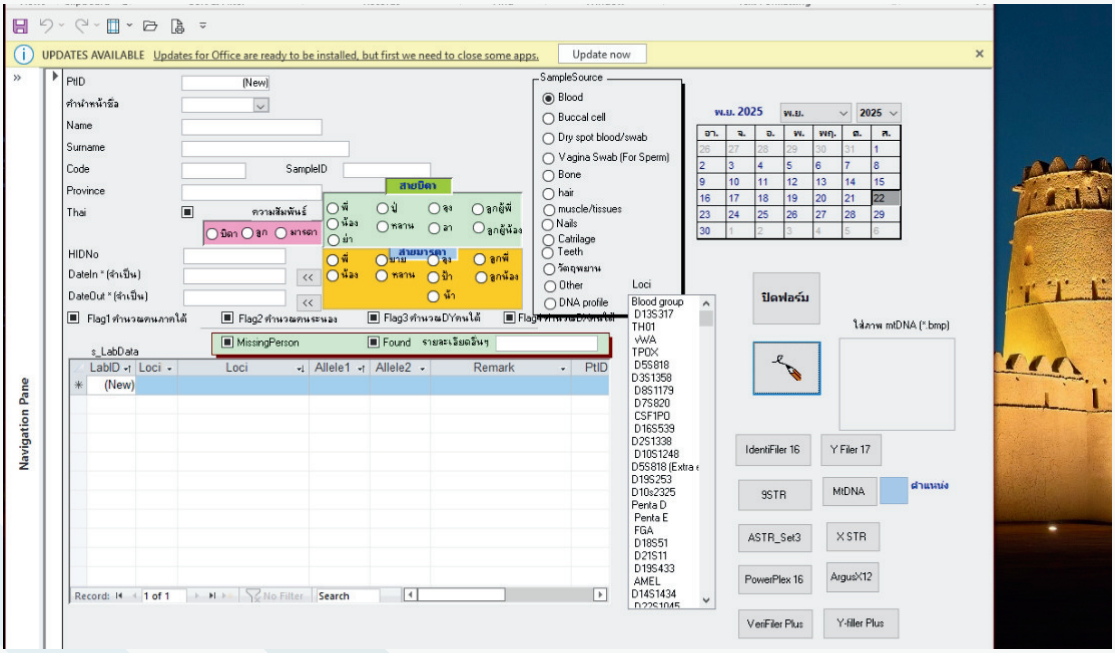


ภาพ 39 ไอคอนโปรแกรม PSU_Calpat



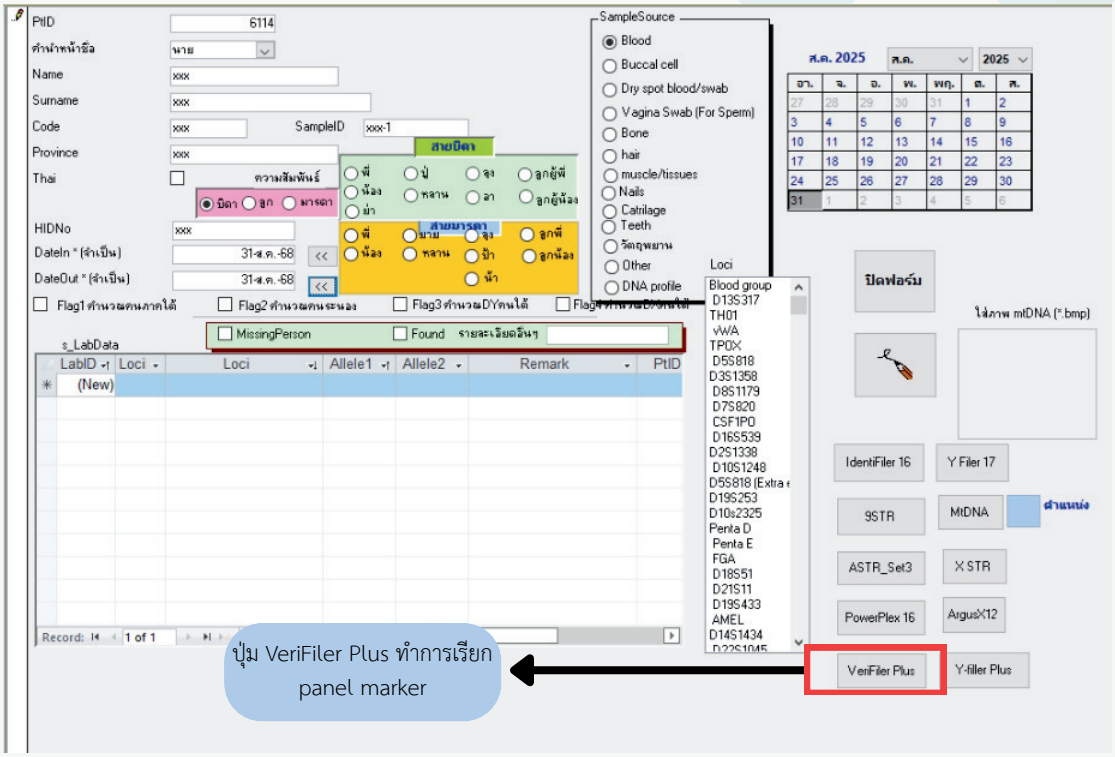
ภาพ 40 dashboard ของโปรแกรม PSU_Calpat

7.2 หลังจากนั้นให้กดปุ่ม “ลงทะเบียนรายการใหม่” เพื่อทำการบันทึกข้อมูลรายละเอียดต่างๆ เช่น sample ID ของตัวอย่าง ชื่อของตัวอย่าง วันที่รับส่งตัวอย่าง และผลการตรวจวิเคราะห์ของตัวอย่างนั้นๆ พร้อมทำการลงผลการตรวจวิเคราะห์หลังจากนั้นโปรแกรมจะแสดงหน้าต่างดังภาพ 41 เพื่อทำการกรอกข้อมูลข้างต้น



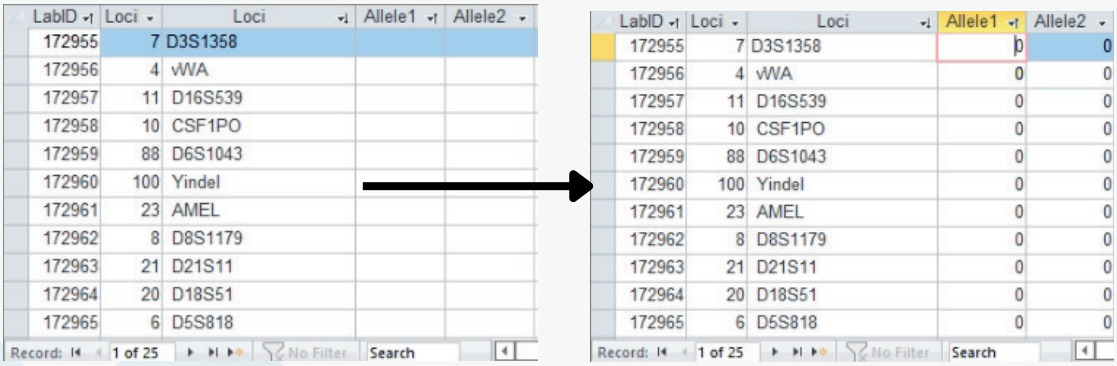
ภาพ 41 หน้าต่างการลงข้อมูลของตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (1)

7.3 หลังจากกรอกข้อมูลตัวอย่างตรวจวิเคราะห์เสร็จแล้วให้ทำการกดปุ่ม “VeriFiler Plus” ดังภาพ 42 เพื่อทำการเรียก panel marker ในการลงผลการตรวจวิเคราะห์



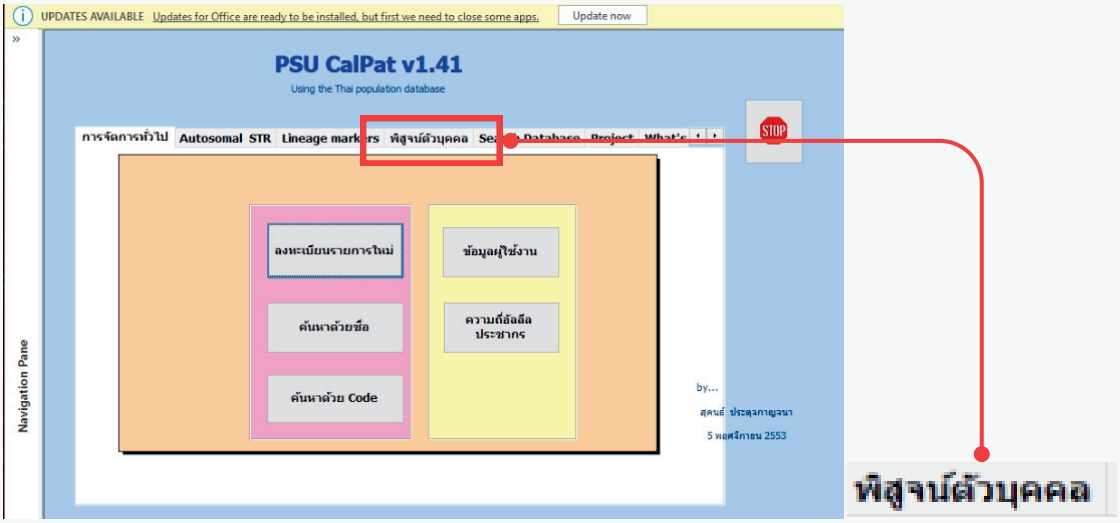
ภาพ 42 หน้าต่างการลงข้อมูลของตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (2)

7.4 หลังกดปุ่ม “VeriFiler Plus” รายชื่อ panel marker จะปรากฏตรงส่วนล่างของตารางดังภาพ 43 หลังจากนั้นทำการกรอกผลการตรวจวิเคราะห์ตามกราฟ electropherogram ที่ปริ้นออกมาเป็น hard copy จากขั้นตอนข้างต้น



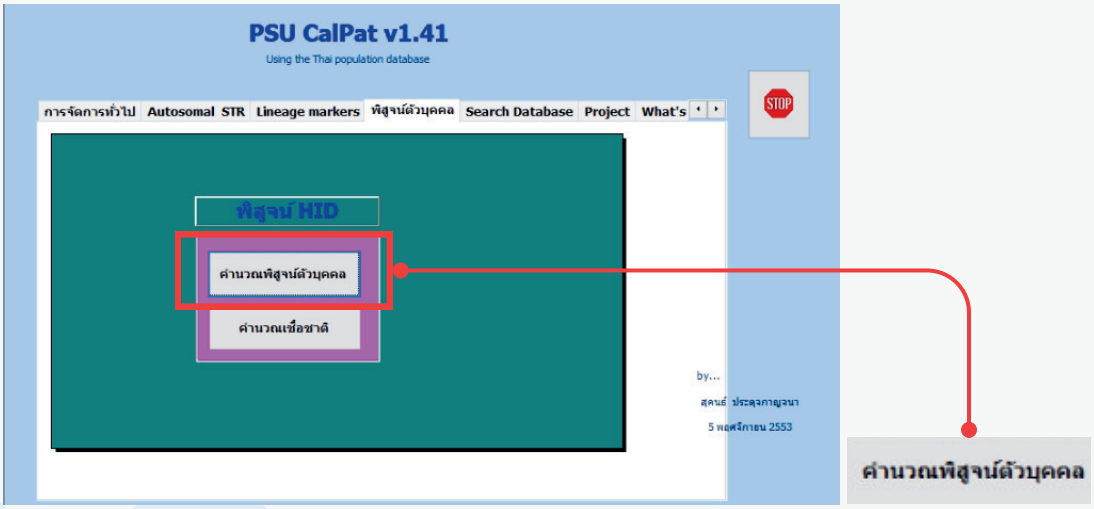
ภาพ 43 หน้าต่างการลงข้อมูลของตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ (3)

7.5 เมื่อลงผลการตรวจวิเคราะห์หลังจากนั้นให้ทำการปิดหน้าต่าง แล้วหน้าจอจะกลับมาที่หน้าของ dashboard ของโปรแกรม PSU_Calpat และให้ทำการกดปุ่ม “พิสูจน์ตัวบุคคล” ดังภาพ 44 เพื่อเข้าไปยังหน้าต่างการพิมพ์รายงานการตรวจวิเคราะห์



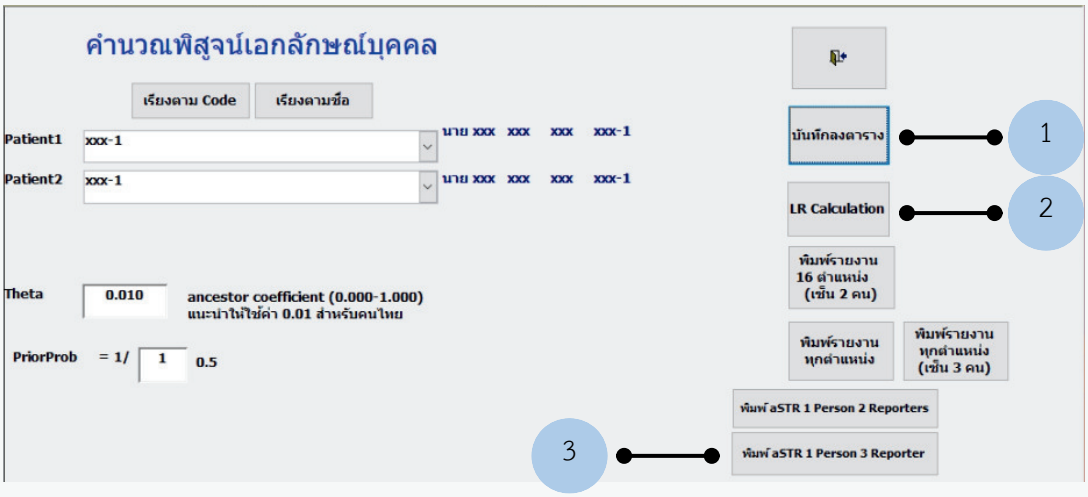
ภาพ 44 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (1)

7.6 หลังจากกดปุ่ม “พิสูจน์ตัวบุคคล” หน้าต่างดังภาพ 45 จะแสดงให้เห็นปุ่มคำสั่ง และให้กดปุ่ม “คำนวณพิสูจน์ตัวบุคคล” เพื่อกรอก รหัส SampleID ของตัวอย่างตัวเวิเคราะห์ที่ต้องการพิมพ์ ดังภาพ 44

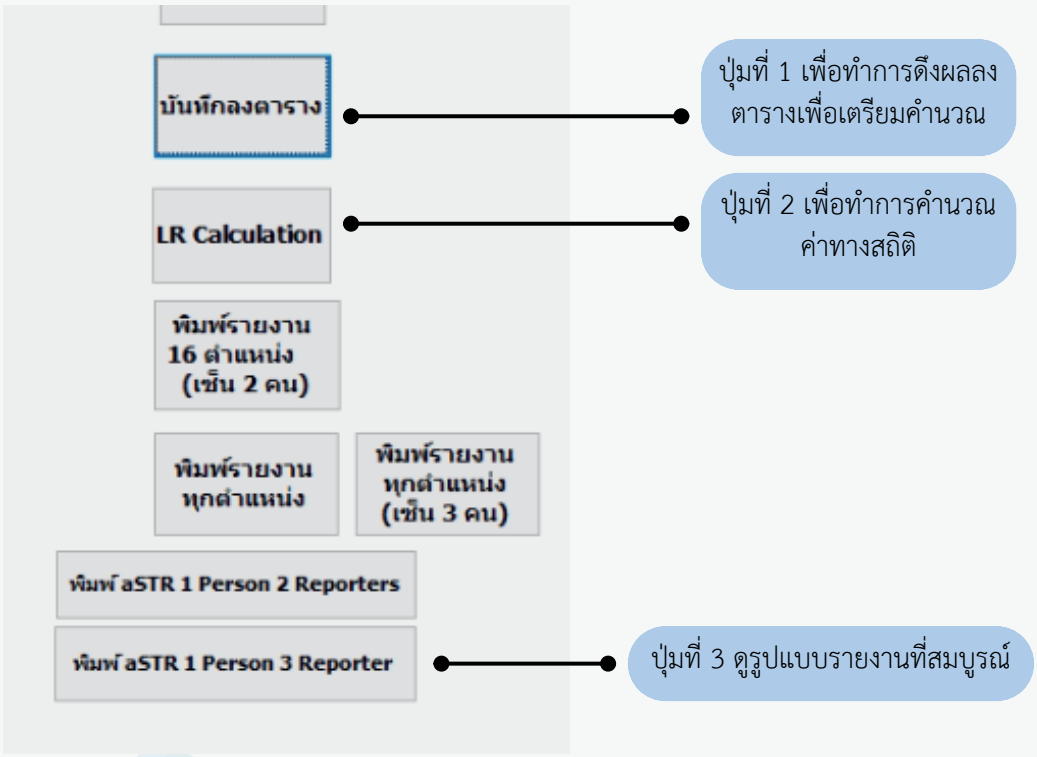


ภาพ 45 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (2)

7.7 ให้กรอก รหัส sampleID ของตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ที่ต้องการพิมพ์ที่ช่อง “Patient1” และ “Patient2” ให้ทำการกรอกเป็นรหัสเดียวกันทั้งสองช่อง ดังภาพ 46 และให้เรียงลำดับดังนี้ “บันทึกลงตาราง” - > “LR Calculation” - > “พิมพ์ aSTR 1 Person 3 Reporter” ดังภาพ 47 หลังจากนั้นโปรแกรมจะแสดงหน้าต่างรูปแบบรายงานที่สมบูรณ์ ดังภาพ 48



ภาพ 46 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (3)



ภาพ 47 ขั้นตอนการพิมพ์ผลการตรวจวิเคราะห์ (4)

7.8 ในกรณีที่ผลการตรวจวิเคราะห์หรือรายงานผลมีข้อมูลผลวิเคราะห์ที่ผิดพลาด มีการให้ผู้ปฏิบัติงานทำการทบทวนข้อมูลจาก raw data และ electropherogram อีกครั้ง โดยตรวจสอบความถูกต้องของรหัสตัวอย่าง การกำหนด allele การแปลผล peak และรายละเอียดที่บันทึกในรายงานฉบับจริงให้สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ ทั้งนี้หากพบความคลาดเคลื่อนจากการบันทึก การพิมพ์รายงาน หรือการแปลผล ให้ดำเนินการแก้ไขให้ถูกต้องก่อนทำการส่งผล แต่หากพบว่าข้อมูลจากการวิเคราะห์ยังไม่ชัดเจน หรือมีข้อสงสัยเกี่ยวกับคุณภาพของสัญญาณ ให้พิจารณาทำการวิเคราะห์ซ้ำหรือทบทวนผลร่วมกับผู้รายงานผลตรวจ เพื่อให้รายงานผลมีความถูกต้อง ครบถ้วน และน่าเชื่อถือดังตาราง 6

ตาราง 6 TECHNICAL CHECK และ ADMINISTRATIVE CHECK

Technical	Administrative
ตรวจ raw data และ electropherogram *ตรวจสอบความสมบูรณ์ของสัญญาณ คุณภาพ baseline ความชัดเจนของ peak และความเหมาะสมของผลการวิเคราะห์ว่าตรงตามเกณฑ์ที่ห้องปฏิบัติการกำหนด*	**ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลผู้รับบริการและรหัสตัวอย่าง** *ตรวจสอบชื่อ–สกุล เลขอ้างอิง รหัสตัวอย่าง และรายละเอียดประกอบอื่น ๆ ในรายงานให้ตรงกับเอกสารต้นทางและข้อมูลในระบบ*
ตรวจสอบความถูกต้องของการกำหนด allele และการแปลผล *ตรวจสอบว่าการเรียก allele การอ่านตำแหน่ง STRs การแปลผล homozygote/heterozygote รวมถึง peak ต่าง ๆ เช่น stutter, pull-up หรือ peak ผิดปกติ ได้รับการพิจารณาอย่างเหมาะสม*	**ตรวจสอบความครบถ้วนของเอกสารและแบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง** *ตรวจสอบว่าเอกสารประกอบการตรวจ แบบฟอร์มบันทึกผล ใบงาน และเอกสารควบคุมต่าง ๆ มีความครบถ้วน ลงนาม และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้*
ตรวจสอบผลควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ *พิจารณาผลของ positive control, negative control, allelic ladder, internal size standard และตัวควบคุมอื่นที่เกี่ยวข้อง ว่าผ่านเกณฑ์และไม่พบข้อบ่งชี้ที่กระทบต่อความน่าเชื่อถือของผล*	**ตรวจสอบรูปแบบและข้อความในรายงานผล** *ตรวจสอบการพิมพ์ ชื่อหัวข้อ หน่วย คำสะกด การใช้ถ้อยคำสรุปผล และข้อความหมายเหตุหรือข้อจำกัด ให้ถูกต้อง ชัดเจน และเป็นไปตามรูปแบบรายงานของหน่วยงาน*

ผลการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอทางนิติเวชศาสตร์
รูปแบบดีเอ็นเอชนิดโครโมโซมร่างกาย

งานนิติเวชศาสตร์
สาขาวิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เลขที่ xxxxxxxx

บุคคลที่ 1 : นาย xxxxxxxx xxxxxxxx

เลขที่ตัวอย่าง FXXA-1 วันที่รับตัวอย่าง : 26 มีนาคม 2568 ตัวอย่างตรวจ : Buccal cells

	LociName	FXXA-1
1	Yindel	0, 0
2	D8S1179	0, 0
3	D21S11	0, 0
4	D7S820	0, 0
5	CSF1PO	0, 0
6	D3S1358	0, 0
7	TH01	0, 0
8	D13S317	0, 0
9	D16S539	0, 0
10	D2S1338	0, 0
11	D19S433	0, 0
12	vWA	0, 0
13	TPOX	0, 0
14	D18S51	0, 0
15	D5S818	0, 0
16	FGA	0, 0
17	AMEL	0, 0
18	Penta D	0, 0
19	D22S1045	0, 0
20	Penta E	0, 0
21	D10S1248	0, 0
22	D12S391	0, 0
23	D1S1656	0, 0
24	D2S441	0, 0
25	D6S1043	0, 0

ตัวอย่างตรวจดังกล่าว เป็นของมนุษย์ เพศชาย ตรวจรูปแบบดีเอ็นเอบนโครโมโซมร่างกาย จำนวน 25 ตำแหน่ง ดังแสดงด้านบน

.....	.....	.....
(xxxxxxxx)	(xxxxxxxx)	(xxxxxxxx)
นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์	นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ	อาจารย์แพทย์นิติเวชศาสตร์
ผู้รายงานผลการตรวจ	ผู้ตรวจสอบผลการตรวจ	ผู้รับรองผลการตรวจ
วันที่	วันที่	วันที่

ภาพ 48 รายงานผลการตรวจวิเคราะห์

วิธีการติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงาน

การติดตามและการประเมินผลการปฏิบัติงานมีวัตถุประสงค์เพื่อให้มั่นใจว่าทุกขั้นตอนของกระบวนการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ตั้งแต่การรับสิ่งส่งตรวจจนถึงการรายงานผลเป็นไปตามมาตรฐานวิชาชีพหลักวิชาการ และระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ โดยสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ทำซ้ำได้ และมีความน่าเชื่อถือเพียงพอสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนกยุติธรรม

ระยะก่อนการวิเคราะห์ (pre-analytical monitoring)

- ตรวจสอบความครบถ้วนและความถูกต้องของเอกสารประกอบการส่งตรวจ
- ตรวจสอบ chain of custody ว่ามีความต่อเนื่อง ไม่ขาดตอน
- ประเมินความเหมาะสมของชนิดและสภาพสิ่งส่งตรวจ
- ตรวจสอบการกำหนดรหัสตัวอย่างให้สอดคล้องกันทุกเอกสาร
- บันทึกข้อมูลในระบบทะเบียนหรือระบบสารสนเทศห้องปฏิบัติการ (LIMS) เพื่อรองรับการติดตามย้อนหลัง

ระยะการวิเคราะห์ (analytical monitoring)

- ใช้ negative control/reagent blank ในทุกชุดการสกัดและ PCR เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน
- ใช้ positive control เพื่อประเมินสมรรถนะของน้ำยาและกระบวนการ
- ใช้ allelic ladder และ internal size standard ในทุก injection
- ติดตามค่าพารามิเตอร์เชิงวิเคราะห์ เช่น AT/ST/PHR/stutter ratio
- ตรวจสอบและบันทึกผลการทำ spectral calibration ตามรอบที่กำหนด
- ตรวจสอบความเสถียรของระบบแยก (sizing precision, resolution)
- บันทึก performance check และ maintenance log อย่างต่อเนื่อง

ระยะหลังการวิเคราะห์ (post-analytical monitoring)

- ตรวจสอบความครบถ้วนของไฟล์ข้อมูลดิบ
- ตรวจสอบความสอดคล้องของ genotype
- ดำเนินการ technical review โดยผู้มีคุณสมบัติเหมาะสม
- ดำเนินการ administrative review ก่อนออกผลรายงาน
- ตรวจสอบว่ารายงานอธิบายผลการตรวจและเหตุผลประกอบข้อสรุปได้ชัดเจน พร้อมระบุข้อจำกัดที่อาจมีผลต่อการแปลผล

การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญ

- ห้องปฏิบัติการต้องเข้าร่วม EQA หรือ interlaboratory comparison

จรรยาบรรณ/คุณธรรม/จริยธรรมในการปฏิบัติงาน

การปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล ในห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ได้ดำเนินการภายใต้กรอบข้อบังคับของ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ว่าด้วยเรื่องจรรยาบรรณของผู้ปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยในพุทธศักราช 2551 ซึ่งได้กำหนดให้ผู้ที่ปฏิบัติงานในมหาวิทยาลัยต้องยึดถือจรรยาบรรณเป็นแนวทางในการประพฤติปฏิบัติตนและการปฏิบัติหน้าที่ราชการ เพื่อธำรงไว้ซึ่งความซื่อสัตย์ ความเป็นธรรม ความรับผิดชอบ และความน่าเชื่อถือขององค์กร ในฐานะนักเทคนิคการแพทย์ผู้ปฏิบัติงานด้านนิติเวชผู้ปฏิบัติงานต้องนำหลักจรรยาบรรณดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับการดำเนินงานในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด ดังนี้

1) จรรยาบรรณต่อตนเอง

ผู้ปฏิบัติงานต้องประพฤติตนเป็นผู้มีความซื่อสัตย์สุจริตมีวินัยรับผิดชอบต่อหน้าที่ และพัฒนาความรู้ความสามารถทางวิชาชีพอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลได้อย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ และมาตรฐานที่กำหนดการปฏิบัติงานต้องดำเนินไปด้วยความรอบคอบไม่ประมาทเลินเล่อ และไม่ละเลยขั้นตอนที่กำหนดไว้ในระบบคุณภาพของห้องปฏิบัติการ

2) จรรยาบรรณต่อผู้บังคับบัญชา ผู้ร่วมงาน และผู้ใต้บังคับบัญชา

ผู้ปฏิบัติงานต้องเคารพและปฏิบัติตามคำสั่งของผู้บังคับบัญชาที่ชอบด้วยกฎหมายและระเบียบราชการ ให้ความร่วมมือในการทำงานเป็นทีม เคารพความคิดเห็นของผู้อื่น และไม่กระทำการใดที่เป็นการกลั่นแกล้ง ดูหมิ่น หรือสร้างความเสียหายแก่ผู้ร่วมงาน ในบริบทของห้องปฏิบัติการนิติพันธุ์ศาสตร์ การทำงานร่วมกันอย่างมีจริยธรรมช่วยให้กระบวนการตรวจพิสูจน์ดำเนินไปอย่างราบรื่น ลดความเสี่ยงของความผิดพลาด และเสริมสร้างความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์

3) จรรยาบรรณต่อผู้รับบริการ ประชาชน และสังคม

ผู้ปฏิบัติงานต้องให้บริการแก่ผู้รับบริการ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องด้วยความสุภาพเป็นธรรม และไม่เลือกปฏิบัติโดยคำนึงถึงประโยชน์ของประชาชนและสังคมเป็นสำคัญ ผลการตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลต้องสะท้อนข้อเท็จจริงทางวิทยาศาสตร์ไม่บิดเบือนข้อมูล และไม่กระทำการใดที่ก่อให้เกิดความเข้าใจผิดหรือสร้างความเสียหายต่อผู้รับบริการหรือกระบวนการยุติธรรม

4) การรักษาความลับและความรับผิดชอบต่อองค์กร

ผู้ปฏิบัติงานต้องรักษาความลับของข้อมูลส่วนบุคคล และข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากการปฏิบัติงาน โดยไม่เปิดเผยหรือใช้ข้อมูลดังกล่าวในทางที่ไม่เหมาะสม และเกินกว่าหน้าที่ที่ได้รับมอบหมายการดำเนินงานซึ่งต้องไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อชื่อเสียง เกียรติภูมิ ความน่าเชื่อถือของมหาวิทยาลัย โดยต้องปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับ และนโยบายของมหาวิทยาลัยอย่างเคร่งครัด

บทที่ 5
ปัญหาอุปสรรคและแนวทางในการแก้ไขและพัฒนางาน

ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน

ตาราง 7 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน

ปัญหาอุปสรรค	แนวทางในการแก้ไข	การพัฒนางาน
สิ่งส่งตรวจหรือเอกสารประกอบการตรวจมีข้อมูลไม่ครบถ้วน ข้อมูลไม่ตรงกัน หรือระบุรายละเอียดไม่ชัดเจน ทำให้เกิดความล่าช้าในการรับตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการตรวจวิเคราะห์	ตรวจสอบความครบถ้วนของสิ่งส่งตรวจและเอกสารก่อนรับเข้าระบบอย่างเคร่งครัด หากพบความไม่สอดคล้องให้ประสานหน่วยงานต้นทางเพื่อแก้ไขก่อนดำเนินการต่อ	จัดทำ checklist มาตรฐานสำหรับการรับสิ่งส่งตรวจ และพัฒนาแนวทางสื่อสารข้อกำหนดการส่งตรวจให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเข้าใจตรงกัน เพื่อลดข้อผิดพลาดในขั้นตอนต้นทาง
ปริมาณหรือคุณภาพของสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจบางชนิดไม่เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ ส่งผลให้ผลการตรวจไม่สมบูรณ์หรือจำเป็นต้องทดสอบซ้ำ	ประเมินความเหมาะสมของตัวอย่างก่อนการตรวจ เลือกวิธีการสกัดสารพันธุกรรมให้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งส่งตรวจ และควบคุมการเก็บรักษาตัวอย่างอย่างเหมาะสม	พัฒนาระบบคัดกรองและจำแนกชนิดตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งทบทวนและปรับปรุงวิธีการสกัดสารพันธุกรรมให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่พบในงานบริการมากขึ้น
มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของตัวอย่างหรือสารพันธุกรรมระหว่างการปฏิบัติงาน ซึ่งอาจกระทบต่อความถูกต้องของผลการตรวจ	ปฏิบัติงานตามหลักการแยกพื้นที่ก่อนและหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างเคร่งครัด ใช้อุปกรณ์ป้องกันส่วนบุคคล เปลี่ยนถุงมือและทำความสะอาดพื้นที่ปฏิบัติงานอย่างสม่ำเสมอ	เสริมสร้างระบบควบคุมคุณภาพภายในและทบทวนมาตรการป้องกันการปนเปื้อนอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งพัฒนาความรู้และความตระหนักของผู้ปฏิบัติงานด้าน contamination control
น้ำยา สารเคมี วัสดุสิ้นเปลือง หรือเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์อาจมีไม่เพียงพอ หรือไม่พร้อมใช้งาน ส่งผลกระทบต่อความต่อเนื่องของงานบริการ	ติดตามสถานะคงคลัง ตรวจสอบวันหมดอายุ และประสานการบำรุงรักษาเครื่องมือให้พร้อมใช้งานอยู่เสมอ	พัฒนาระบบบริหารทรัพยากรและการวางแผนการใช้วัสดุอุปกรณ์ น้ำยา และเครื่องมือให้สอดคล้องกับปริมาณงานบริการ เพื่อให้การดำเนินงานมีประสิทธิภาพ

ตาราง 7 ปัญหาอุปสรรคในการปฏิบัติงานและแนวทางแก้ไขและพัฒนางาน (ต่อ)

ปัญหาอุปสรรค	แนวทางในการแก้ไข	การพัฒนางาน
ปริมาณงานบริการที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้กระบวนการตรวจวิเคราะห์ การทบทวนผล และการออกรายงานผลล่าช้ากว่าระยะเวลาที่กำหนด	จัดลำดับความสำคัญของงาน วางแผนรอบการตรวจให้เหมาะสมกับจำนวนตัวอย่าง และติดตามความคืบหน้าของงานในแต่ละขั้นตอนอย่างใกล้ชิด	พัฒนาระบบการบริหารงานบริการให้สอดคล้องกับ Turnaround Time (TAT) ของหน่วยงาน พร้อมทั้งปรับปรุงการจัดสรรทรัพยากรและขั้นตอนการปฏิบัติงานให้มีความคล่องตัวมากขึ้น
การแปลผลการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมในบางกรณีมีความซับซ้อนและต้องอาศัยความรู้ ความชำนาญ และประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานสูง	ทบทวนผลการตรวจอย่างเป็นระบบ และให้มีการตรวจสอบผลโดยผู้มีความรู้หรือผู้ที่ได้รับมอบหมายตามขั้นตอนของหน่วยงาน	ส่งเสริมการพัฒนาศักยภาพของผู้ปฏิบัติงานผ่านการอบรม การศึกษากรณีตัวอย่าง การแลกเปลี่ยนเรียนรู้ และการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญเพื่อเพิ่มความถูกต้องและความเชื่อมั่นในการแปล

ข้อเสนอแนะ

1. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการควรได้รับการเสริมสร้างความรู้และทักษะในการตรวจวิเคราะห์พิสูจน์อัตลักษณ์บุคคล เพื่อให้สามารถดำเนินงานได้อย่างถูกต้องและแม่นยำสูงสุด การพัฒนาความรู้สามารถดำเนินการได้หลากหลายรูปแบบ เช่น การเข้าร่วมสัมมนาวิชาการ การแลกเปลี่ยนประสบการณ์กับเจ้าหน้าที่จากหน่วยงานอื่น การฝึกอบรมภาคปฏิบัติร่วมกับผู้เชี่ยวชาญ หรือการศึกษาดูงานในห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐานใกล้เคียงกัน
2. ควรมีกิจกรรมให้ความรู้หรือคู่มือแนะนำแก่เจ้าหน้าที่เกี่ยวกับวิธีการเก็บตัวอย่างเพื่อการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเออย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ เช่น การเก็บเลือด น้ำลาย หรือหลักฐานชีวภาพจากสถานที่เกิดเหตุอย่างถูกวิธี ป้องกันการปนเปื้อนและคงสภาพดีเอ็นเอให้พร้อมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ การดำเนินการดังกล่าวสามารถทำผ่านการจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ การให้คำปรึกษาผ่านสื่ออิเล็กทรอนิกส์ หรือการจัดทำคู่มือแนะนำในรูปแบบที่เข้าใจง่ายและนำไปใช้ได้จริง
3. เพื่อให้การตรวจพิสูจน์อัตลักษณ์บุคคลด้วยเครื่อง ABI 3500 Genetic Analyzer มีความถูกต้องเชื่อถือได้ และจัดแป็นมาตรฐานระดับสากลควรมีการทบทวนกระบวนการตรวจวิเคราะห์อย่างสม่ำเสมอ ทั้งในด้านวิธีการวิเคราะห์ การควบคุมคุณภาพ และการรายงานผล โดยเฉพาะควรมีการ สอบเทียบเครื่องมือ และ ตรวจสอบระบบวิเคราะห์ซอฟต์แวร์ (GeneMapper™) อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มั่นใจว่าเครื่องสามารถให้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องตามเกณฑ์
4. ควรจัดให้มี การอบรมหรือพัฒนาศักยภาพของเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านทฤษฎีและปฏิบัติ รวมถึงการวิเคราะห์กรณีศึกษาจากตัวอย่างที่มีปัญหา เพื่อเพิ่มความสามารถในแปลผลที่ซับซ้อนและลดความเสี่ยงจากความผิดพลาดจากกรณีของผลที่มีความซับซ้อน
5. ควรมีการจัดทำ ฐานข้อมูลภายใน สำหรับเก็บผลวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการเปรียบเทียบ หรือใช้ประกอบการตรวจสอบซ้ำในกรณีที่เกิดข้อโต้แย้ง รวมถึงควรมีแนวทางป้องกันการปนเปื้อนอย่างเข้มงวดในทุกขั้นตอน โดยมุ่งเน้นการแยกพื้นที่การเตรียมตัวอย่าง การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ผลให้ชัดเจน
6. สุดท้าย ควรมีการประเมินและปรับปรุง แนวทางปฏิบัติงานมาตรฐาน (SOP) อย่างสม่ำเสมอ โดยอ้างอิงจากแนวทางของหน่วยงานวิชาการ เช่น SWGDAM หรือ ISO/IEC 17025 เพื่อให้การปฏิบัติงานมีความทันสมัยและรองรับต่อการตรวจสอบจากหน่วยงานภายนอกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 7th ed. New York: Garland Science; 2022
2. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*. 1st ed. Waltham: Academic Press; 2015.
3. Thermo Fisher Scientific. *Applied Biosystems™ 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide*. Rev. F. Waltham, MA: Thermo Fisher Scientific; 2018.
4. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). *SWGDAM Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories*. Approved Jan 2020.
5. Green RL, Lagacé RE, Oldroyd NJ, Hennessy LK. Capillary electrophoresis technology for forensic DNA analysis. *Electrophoresis*. 2014;35(21-22):307–318.
6. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) DNA Working Group. *Guidelines for the Interpretation of DNA Profiles*. ENFSI; 2016 (updated 2020).
7. Butler JM. Recent advances in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 2019-2022. Forensic Sci Int Synerg. 2023;6:100311.
8. International Organization for Standardization (ISO). *ISO 21043-1:2018 Forensic Science — Part 1: Terms and Definitions.* Geneva: *ISO*; 2018.
9. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI). Best practice manual for human forensic biology and DNA profiling. ENFSI-DNA-BPM-03. Version 01. 2022.
10. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI). *Best Practice Manual for Human Forensic Biology and DNA Profiling (ENFSI-DNA-BPM-003)*. Version 01. ENFSI; 2022
11. National Institute of Standards and Technology (NIST). *Forensic Science Foundational Review: Forensic DNA Analysis*. Gaithersburg, MD: NIST; 2021.
12. McAndrew WP, Speaker PJ, Houck MM. Interpol review of forensic management, 2019-2022. Forensic Sci Int Synerg. 2023;6:100301.
13. Jobling MA, Gill P. *Encoded evidence: DNA in forensic analysis*. Nat Rev Genet. 2014;15(9):592–602.

บรรณานุกรม (ต่อ)

14. Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet*. 2014;15(4):318–32
15. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) DNA Working Group. *Best Practice Manual for Forensic STR Analysis.* ENFSI; 2019.
16. Taylor D, Bright JA, Buckleton J. The interpretation of single source and mixed DNA profiles. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;24:91–103.
17. Parson W, Ballantyne KN, Budowle B. Massively parallel sequencing for forensic genetics: Current status and future prospects. Forensic Sci Int Genet. 2016;25:85–89.
18. Parson W, Strobl C. Forensic mitochondrial DNA analysis: Current practice and future potential. Forensic Sci Int Genet. 2020;44:102–155.
19. Kidd KK, Pakstis AJ. Microhaplotypes: A new paradigm in forensic genetics. Forensic Sci Int Genet. 2017;31:128–137.
20. Parson W, Ballard D, Budowle B, Butler JM, Gettings KB, Gill P, et al. Massively parallel sequencing of forensic STRs: Opportunities and challenges. Forensic Sci Int Genet. 2019;41:6–20.
21. Office of Chief Medical Examiner, City of New York. STR analysis on 3500xL genetic analyzers. New York: NYC OCME; 2024.
22. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). Interpretation guidelines for autosomal STR typing by forensic DNA testing laboratories. 2017.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายปกพล คีรีลักษณ์

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pokphon Khirilak

ติดต่อ 074-451570, 074-451571

Pokpon.sk@gmail.com

kpokpon@medicine.psu.ac.th

สถานที่ทำงาน โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ หน่วยอณูกายวิภาคชิ้นเนื้อและนิติเวช

ตำแหน่ง นักเทคนิคการแพทย์ (ปฏิบัติการ)

ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	สถาบันการศึกษา	ประเทศ	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
ปริญญาตรี	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	2558
ปริญญาโท	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเวชศาสตร์)	2563