Chula Med J Vol. 54 No. 6 November - December 2010

การจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เก็บจากศพ โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

กนก พฤฒิวทัญญู*
นนทชัย เอกชัยวรวุฒิ** ภาณุวัฒน์ ชุติวงศ์***
นันทนา ศิริทรัพย์*** เผด็จ สิริยะเสถียร*

Preativatanyou K, Eakachaiworrawut N, Chutivongse P, Sirisup N, Siriyasatien P. Molecular identification of maggots captured from forensic cases. Chula Med J 2010 Nov - Dec; 54(6): 637 - 47

Problem/Background : *The estimation of the postmortem interval (PMI) is necessary for supporting justice to the dead. During the early stage of death, estimation of PMI of the corpses depends on the changing of muscle contraction and physical conditions, but this method can be used effectively in case of death within 24 hours. Flies are the first organisms which swarm on corpses. Consequently, accuracy of the estimation of PMI using fly larvae collected from corpses depends on identification of the species of flies. However, the macroscopic method using posterior spiracle is not definite for identifying the species of flies. Therefore, the molecular identification is used for solving this problem.*

Objective : *To demonstrate the application of mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene in identification of maggot species by using molecular techniques.*

Design : *Descriptive study*

* ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
*** ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Setting : *The Department of Parasitology and the Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.*

Methods : *Six maggot samples were collected from six forensic cases at the Department of Forensic Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital in 2004 - 2007. Before DNA extraction, posterior spiracles of specimens were morphologically investigated under stereomicroscope. Then, mitochondrial maggot DNA was extracted and amplified for cytochrome oxidase I gene (COI) via polymerase chain reaction (PCR) technique using specific primers. The PCR products were cloned into pGEM®-T easy vector and further verified by blue/ white screening and selection system. Positive clones were propagated and extracted. Recombinant plasmids harboring PCR insert were analyzed by automated DNA sequencing. Obtained nucleotide sequences were compared with GenBank database using the BLAST N bioinformatics programme.*

Results : *Sequencing reactions revealed that PCR yielded a single 351 bp in all maggot specimens. Sequence analyses, based on percentage of identity with available data from GenBank, demonstrated that five (83%) specimens and the remaining one (17%) were identified as Sarcophaga ruficornis and Chrysomya rufifacies, respectively.*

Conclusions : *This is the first report that provides promising data of molecular identification of the maggot species captured from forensic cases in Thailand.*

Keywords : *Maggots, cytochrome oxidase I, species identification.*

Reprint request : Preativatanyou K. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. December 20, 2009.

กนก พฤฒิวทัญญู, นนทชัย เอกชัยวรวุฒิ, ภาณุวัฒน์ ชุติวงศ์, นันทนา ศิริทรัพย์, เผด็จ สิริยะเสถียร. การจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เก็บจากศพโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2553 พ.ย. – ธ.ค.; 54(6): 637–47

เหตุผลของการทำวิจัย : *การประมาณเวลาตายของศพในทางนิติเวชมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาข้อเท็จจริงเพื่อให้ความเป็นธรรมแก่ผู้เสียชีวิต โดยปกติแล้วการประมาณเวลาตาย สามารถตรวจดูจากการแข็งตัวของกล้ามเนื้อและลักษณะทางกายภาพเป็นหลัก ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดในกรณีที่ศพได้เสียชีวิตมาแล้วไม่เกิน 24 ชั่วโมง แมลงวันเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกที่เข้าไปตอมศพ และการระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้องสามารถนำมาใช้ในการประมาณเวลาตายได้ (postmortem interval, PMI) อย่างไรก็ตาม การจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น posterior spiracle ก็ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการจำแนกสปีชีส์หนอนแมลงวันโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้*

วัตถุประสงค์ : *สามารถประยุกต์ใช้ยีน cytochrome oxidase (COI) ในการระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา*

รูปแบบการศึกษา : *การศึกษาเชิงพรรณนา*

สถานที่ทำการศึกษา : *ภาควิชาปรสิตวิทยา และภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

วิธีการศึกษา : *ตัวอย่างหนอนแมลงวันเก็บได้จากศพที่ผ่านการชันสูตรที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในระหว่าง พ.ศ. 2547 - 2550 และเก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของ posterior spiracles ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอก่อนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ในบริเวณยีน COI ด้วยไพรเมอร์จำเพาะโดยเทคนิค PCR ผลผลิตที่ได้จากขั้นตอน PCR จะถูกโคลนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T easy และตรวจหาโคโลนีที่มีชิ้นส่วนดังกล่าวด้วยวิธีคัดเลือกสีฟ้าหรือขาว (blue/white screening and selection) จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อและสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคโลนีที่ให้ผลบวกเพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรมชีวสารสนเทศ BLAST N*

ผลการวิจัย : *ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ให้ผลผลิตที่มีขนาด 351 คู่เบสเท่ากันในทุกตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า 5 ตัวอย่างสามารถระบุว่าเป็นสปีชีส์ Sarcophaga ruficornis และ 1 ตัวอย่างที่เหลือเป็นสปีชีส์ Chrysomya rufifacies*

สรุป : *เป็นการศึกษาวิจัยที่แสดงให้เห็นชัดว่าสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพและให้ผลที่น่าเชื่อถือ ซึ่งนับว่าเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทย*

คำสำคัญ : *หนอนแมลงวัน, ไซโตโครม ออกซิเดส, การจำแนกสปีชีส์.*

ปัจจุบันความรู้ทางด้านนิติวิทยาศาสตร์และอณูชีววิทยาได้มีการพัฒนาไปอย่างมาก[1] และการประมาณเวลาตายของศพในทางนิติเวชนั้นก็มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการหาข้อเท็จจริงเพื่อผดุงความเป็นธรรมให้แก่ผู้เสียชีวิต ซึ่งโดยปกติแล้วการประมาณเวลาตายของศพสามารถประมาณได้โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การตรวจดูการแข็งตัวของกล้ามเนื้อเป็นหลัก แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในกรณีที่ศพได้เสียชีวิตมาแล้วมากกว่า 24 ชั่วโมง ศพจะเริ่มเน่าทำให้การนำลักษณะทางกายภาพมาประมาณเวลาตายจะไม่ใกล้เคียงกับความเป็นจริง ดังนั้นจึงได้มีการนำงานด้านกีฏวิทยาทางการแพทย์มาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยงานทางด้านนิติเวชศาสตร์ โดยการใช้หนอนแมลงวันที่อาศัยเจริญเติบโตบริเวณเนื้อเยื่อของศพเป็นหลักฐานทางกีฏวิทยามาใช้ในการประมาณเวลาตายได้[2,3]

จากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยในต่างประเทศ อาทิเช่น การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงโมเลกุลเพื่อการจำแนกสปีชีส์หนอนแมลงวัน ซึ่งมีความสำคัญในงานนิติเวชศาสตร์ที่ประเทศไต้หวัน โดยทำการศึกษาก่อนปี ค.ศ. 2000 สามารถระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่พบบนศพได้ 8 สปีชีส์ได้แก่ *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *Chrysomya pinguis* (Walker), *Chrysomya rufifacies* (Macquart), *Hemipyrellia ligurriens* (Wiedemann), *Lucilia bazini Seguy*, *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Lucilia hainanensis Fan*, และ *Lucilia prophyrina* (Walker)[4] อีกรายงานคือประเทศมาเลเซีย โดยทำการศึกษาในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1993-1996 พบว่าหนอนแมลงวันที่พบบนศพส่วนใหญ่ถึง 73.7% เป็นแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya spp.* และที่เหลือเป็นหนอนแมลงวันสปีชีส์อื่นเช่น *Sarcophaga spp., Lucilia spp.* และ *Hermetia spp* เป็นต้น[5] ในส่วนประเทศสหรัฐอเมริกา รัฐนอร์ท คาโรไลนาก็มีรายงานบันทึกครั้งแรกของรัฐนี้เกี่ยวกับการศึกษาหนอนแมลงวัน *Chrysomya rufifacies* ระยะที่ 3 (third instar larvae) จากซากหมู ซึ่งเป็นตัวอย่างข้อมูลที่มีประโยชน์ในการประกอบการสืบสวนทางนิติเวชศาสตร์[6]

นอกจากนี้ยังมีอีกหลายประเทศที่ให้ความสนใจในการศึกษาด้านนิติกีฏวิทยา (forensic entomology) เช่นประเทศญี่ปุ่นโดยทำการจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันหัวเขียวโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งยีน COI[7] ส่วนประเทศเยอรมนีศึกษาทั้งในตำแหน่งยีน COI และ COII ซึ่งจากรายงานกล่าวว่าเป็นวิธีที่สามารถจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้อย่างรวดเร็วและเป็นประโยชน์ในทางนิติเวชศาสตร์เป็นอย่างมาก[8]

ส่วนการศึกษาทางนิติเวชศาสตร์ในประเทศไทยได้มีการรายงานการพบศพลอยน้ำครั้งแรก ริมแม่น้ำในจังหวัดลำปาง เป็นชายไม่ทราบชื่อและอายุ จากการชันสูตรและเก็บตัวอย่างพบหนอนแมลงวันหัวเขียว *Chrysomya megacephala* (Fabricius) และ *Chrysomya rufifacies* (Macquart) ระยะที่ 3 โดยเมื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปเข้ากระบวนการพิสูจน์วงชีวิตพบว่าตายมาประมาณ 7 วัน[9] ในส่วนงานวิจัยที่มีการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพในแถบภาคเหนือของประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 - 2006 พบว่าแมลงวันหัวเขียวเป็นกลุ่มที่พบได้มากที่สุด[10] จะเห็นได้ว่างานวิจัยในหลายประเทศได้มีการศึกษาเพื่อจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่พบบนศพตามที่ต่างๆ อย่างไรก็ตามก็ยังมีความแตกต่างของถิ่นที่อยู่อาศัย แต่อย่างน้อยก็เป็นประโยชน์ในการช่วยเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่พบศพกับสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้เช่นกัน

นอกจากนั้นแล้วนิติกีฏวิทยา เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเมื่อไปเก็บวัตถุพยานในที่เกิดเหตุ หนอนแมลงวันมีบทบาทที่สำคัญเนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มแรกที่พบบนศพและยังพบเป็นจำนวนมากอีกด้วย[4] แต่หลักฐานที่เก็บมานั้นจะน่าเชื่อถือเพียงใด ก็ต้องคำนึงถึงการระบุสปีชีส์ที่ถูกต้อง แต่เนื่องจากการอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะจำแนกสปีชีส์หนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้อง จำเป็นที่จะต้องอาศัยวิธีการจำแนกอื่นซึ่งมีความถูกต้อง แม่นยำและให้ผลออกมาเป็นที่ยอมรับ[8, 11, 12] ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจ

เป็นอย่างยิ่งในการจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพ โดยอาศัยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่งยีน COI ใน mitochondrial DNA (mtDNA) ขนาด 351 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนที่เหมาะสมกับการศึกษาทางวิวัฒนาการ และพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากยีนส่วนนี้มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากทำให้เราทราบถึงสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันของหนอนแมลงวันแต่ละชนิดได้[12]

วิธีการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาจากตัวอย่างหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพในช่วงปี พ.ศ. 2547 - 2550 โดยคัดแยกหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพลงในกระบอกพลาสติกใสสะอาดที่บรรจุ 70% ethanol มีฝาปิด ทำการบันทึกรายละเอียดสำคัญของศพพร้อมระบุหมายเลข code ตัวอย่างหนอนแมลงวัน (ตารางที่ 1) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างหนอนจากศพที่ส่งมาชันสูตรที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1. แสดงรายละเอียดของตัวอย่าง และรหัสที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับ	หมายเลขศพ	CODE
1.	0311/50	1/50
2.	0311/50	2/50
3.	1426/48	3/50
4.	0345/47	4/50
5.	0484/49	5/50
6.	0111/49	6/50

1. การจำแนกหนอนแมลงวันทางสัณฐานวิทยา

ทำการจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยสัณฐานวิทยาของ posterior spiracle ซึ่งเป็นท่อลมบริเวณด้านท้าย ของหนอนแมลงวัน มีจำนวน 1 คู่ เริ่มจากการนำหนอนแมลงวันที่เก็บมาตัดตามขวาง บริเวณด้านท้ายของตัวหนอนในส่วนของ posterior spiracle และนำชิ้นส่วนที่ได้มาถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (รุ่น SZX9, Olympus, Tokyo, Japan) และเก็บข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ในขั้นตอนการเปรียบเทียบต่อไป ความแตกต่างของ posterior spiracle นี้สามารถจำแนกสปีชีส์หนอนแมลงวันได้อย่างพอสังเขป[2, 3]

2. การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อของหนอนแมลงวัน (DNA extraction)

ทำการสกัด mitocondrial DNA จากเนื้อเยื่อของหนอนแมลงวันบริเวณส่วนหัว โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN INC., Valencia, CA) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย UV spectrophotometer (Bio-Rad, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและเก็บที่ 4 ^{O}C เพื่อใช้ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต่อไป

2.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการการเพิ่มจำนวน DNA อย่างจำเพาะในบริเวณ mitochondrial cytochrome oxidase I โดยอาศัยดีเอ็นเอที่สกัดได้ในขั้นตอนก่อนหน้านี้เป็นแม่พิมพ์ (template) และใช้ forward primer และ reverse primer ซึ่งมีลำดับเบส 5' CAGCTACTTTATGAGCTTTAGG 3' และ 5' CATTCAAGCCTTGTGTAAGCATC 3' ตามลำดับ [8] ปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนผสมดังตารางที่ 2 โดยอาศัยเครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler (Applied Biosystem, USA) ซึ่งมีขั้นตอนและระยะเวลาดังตารางที่ 3 จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 2. แสดงองค์ประกอบและปริมาณที่ใช้ในเทคนิค PCR

องค์ประกอบ	ปริมาณ
10X PCR Buffer	2.5 μL
$MgCl_2$	25 mM
dNTPs	200 μM
Forward primer	0.4 μM
Reverse primer	0.4 μM
Taq polymerase (5U/μl)	1 unit
DNA Template	50 ng
DNase free water	Up to 25μL

ตารางที่ 3. แสดงขั้นตอนและระยะเวลาของเทคนิค PCR

ขั้นตอน	ระยะเวลา
Step 1: Initial Denaturation ที่ 95 ^{O}C	3 นาที
Step 2: Amplification	30 รอบ
Denaturation ที่ 95 ^{O}C	30 วินาที
Annealing ที่ 56 ^{O}C	30 วินาที
Extension ที่ 72 ^{O}C	30 วินาที
Step 3: Final Extension ที่ 72 ^{O}C	5 นาที

2.3 การสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA)

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากเทคนิค PCR มาเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะชนิด pGEM®-T easy (Promega, USA) โดยใช้ Rapid DNA ligation kit (Promega) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นทำการถ่ายโอน (transform) พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากปฏิกิริยาเชื่อมต่อเข้าสู่อัลตราคอมพีเทนต์เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งเตรียมด้วย Inoue method [13] และเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมบนจานเพาะเชื้อที่ประกอบด้วย Luria-Bertani (LB) agar, 50 μg/mL Ampicillin, 100 mM IPTG และ 50 μg/mL X-Gal บ่มจานเพาะเชื้อที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเขี่ยเชื้อที่ได้โดยเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาว (แยกหลอด) ประมาณ 10 โคโลนี ลงในอาหารเหลว LB ที่มี 50 μg/mL Ampicillin บ่มที่ 37 ^{O}C, 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ QIA Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สนใจจากพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่สกัดแยกได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (New England Biolabs) โดยทำตามขั้นตอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการคัดเลือกพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเพื่อการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

2.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ผล

ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดีเอ็นเอที่สนใจในพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยใช้ ABI PRISM BigDye ™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster city, CA) โดยใช้ T7 promotor primer และ SP6 promotor primer เป็น primer สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง automated ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จะถูกวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool)

ผลการวิจัย

การจำแนกหนอนแมลงวันทางสัณฐานวิทยา

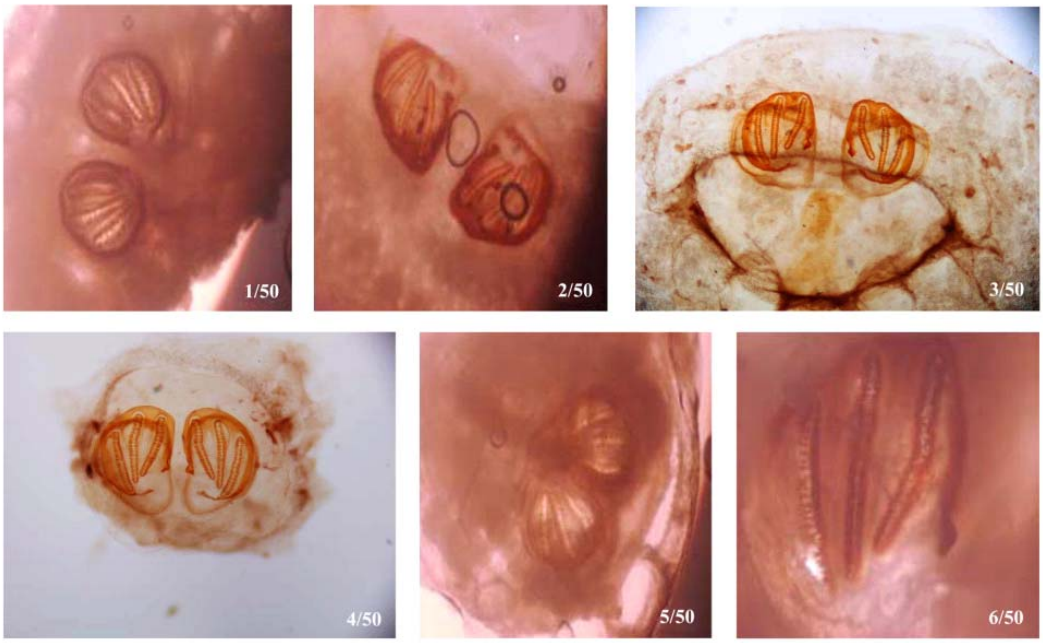
จากการจำแนกทางสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะ posterior spiracle ของตัวอย่างหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพจำนวน 6 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกันดังรูปที่ 1 ข้อมูลดังกล่าวเป็นเพียงส่วนหนึ่งที่จะช่วยจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้เพียงคร่าว ๆ แต่ไม่สามารถที่จะระบุสปีชีส์ที่ถูกต้องได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่พบบนศพเพื่อช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว หากสามารถระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้องก็จะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลเพื่อช่วยประมาณระยะเวลาตายได้

การวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยา

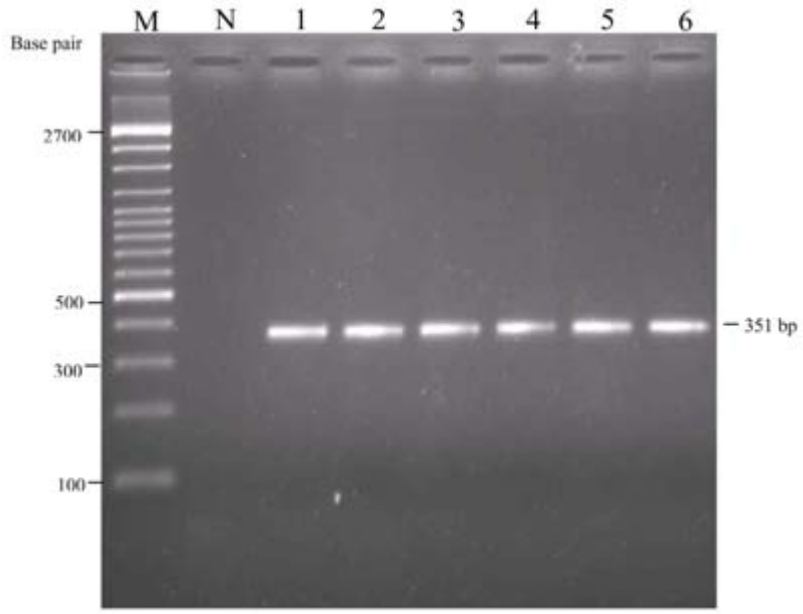
จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR ที่ตำแหน่งยีน mitochondrial COI และทำการสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าดีเอ็นเอที่สนใจมีขนาด 351 คู่เบสในทุกตัวอย่างหนอนแมลงวัน (รูปที่ 2) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับในฐานข้อมูล GenBank ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 4) สามารถจำแนกได้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Sarcophaga ruficornis* มี 5 ราย (code 2/50, 3/50, 4/50, 5/50 และ 6/50) คิดเป็น 87 % และ *Chrysomya rufifacies* มีเพียง 1 ราย (code 1/50) คิดเป็น 13 %

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาพบว่าหนอนแมลงวันจากศพจำนวน 6 ราย สามารถจำแนกได้ 2 สปีชีส์ได้แก่ *Sarcophaga ruficornis* จำนวน 5 ราย (83%) และ *Chrysomya rufifacies* จำนวน 1 ราย (17 %) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการเก็บรวบรวมข้อมูลจากศพตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 - 2549 ในแถบจังหวัดเชียงใหม่ ที่รายงานไว้ว่าพบแมลงวันหัวเขียวใน Family Calliphoridae มากที่สุด ส่วนแมลงวันหลังลาย ใน Family Sarcophagidae พบเป็นลำดับรองลงมา[10] แต่จากการศึกษาครั้งนี้ได้ผลที่แตกต่างออกไป กล่าวคือพบแมลงวันหลังลายสปีชีส์ *Sarcophaga ruficornis* มากกว่าแมลงวันหัวเขียวสปีชีส์ *Chrysomya rufifacies* แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างยังน้อยจึงไม่สามารถสรุปได้ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 1. แสดงลักษณะ posterior spiracles ของตัวอย่างหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพ



M: 100 base pair marker N: Negative control
1: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 1/50
2: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 2/50
3: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 3/50
4: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 4/50
5: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 5/50
6: ดีเอ็นเอจากตัวอย่างหนอนแมลงวัน code 6/50

รูปที่ 2. แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR ขนาด 351 คู่เบสในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 4. แสดง % identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับฐานข้อมูล GenBank

Fly species sequenced for this analysis		GenBank record or otherwise previously published COI haplotype		
species	Number of specimen	Accession number	% Identity	Reference
Chrysomya rufifacies	1	DQ328666.1	97%	Yin,X.-H., Wang, J.-F. and Chen, Y.-C.[13]
		EF125866	97%	Preativatanyou, K., Sirisup, N., Poovorawan, Y., Thavara, U., Tawatsin,A., Sungpradit, S. and Siriyasatien, P.[12]
Sarcophaga ruficornis	5	EF405941.1	98%	Tan, S.H., Mohd-Aris, E., Omar, B., Johari, S., Kurahashi, H. and Mohamed, Z.[14]

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างหนอนแมลงวันจากศพ สามารถพบความแตกต่างกันคือ จะพบลักษณะ posterior spiracle แบบ complete peritreme และมี button ในหนอนแมลงวันหัวเขียว ขณะที่หนอนแมลงวันหลังลายจะเป็นแบบ incomplete peritreme และไม่มี button อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกได้อย่างชัดเจน เพียงแต่ช่วยในการจำแนกสปีชีส์ของหนอนแมลงวันได้อย่างคร่าว ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างหนอนแมลงวันกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีบางตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน โดย *Chrysomya rufifacies* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 342 ตำแหน่งจาก 351 ตำแหน่ง คิดเป็น 97 % ในขณะที่ *Sarcophaga ruficornis* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 345 ตำแหน่งจาก 351 ตำแหน่ง คิดเป็น 98 % ซึ่งการวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยานี้สามารถระบุสปีชีส์ของตัวอย่างหนอนแมลงวันได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ

สรุป

ข้อมูลจากหนอนแมลงวันที่พบบนศพสามารถบ่งบอกเวลาตาย โดยความแม่นยำขึ้นอยู่กับการระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันเหล่านั้น การประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการระบุสปีชีส์ของหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพและให้ผลที่น่าเชื่อถือ ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้มุ่งเน้นการจำแนกสปีชีส์ของตัวอย่างหนอนแมลงวันที่เก็บได้จากศพด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งนับว่าเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทย และสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการประมาณเวลาตาย โดยอาศัยข้อมูลร่วมกับวงจรชีวิตและอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมในสถานที่เกิดเหตุ ซึ่งเป็นการศึกษาในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนวิจัย Pilot project คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ้างอิง

1. สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร, ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. เวชศาสตร์โมเลกุล (molecular medicine). กรุงเทพฯ: Text add Journal Publication, 2546
2. นายบุญเสริม อ่วมอ่อง. แมลงวัน: กีฏวิทยาและการควบคุม. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2543
3. Siriyasatien P, Sirisup N. Estimation of post-mortem interval (PMI) using data from lifecycle of flies on corpses. Chula Med J 2005 Apr; 49(4):195-200
4. Chen WY, Hung TH, Shiao SF. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. J Med Entomol 2004 Jan;41(1):47-57
5. Lee HL. Recovery of forensically important insect larvae from human cadavers in Malaysia (1993-1996). Malays J Pathol 1996 Dec;18(2): 125-7
6. Tomberlin JK, Albert AM, Byrd JH, Hall DW. Interdisciplinary workshop yields new entomological data for forensic sciences: Chrysomya rufifacies (Diptera: Calliphoridae) established in North Carolina. J Med Entomol 2006 Nov;43(6):1287-8
7. Saigusa K, Takamiya M, Aoki Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. Leg Med (Tokyo) 2005 May;7(3):175-8
8. Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. Forensic Sci Int 2003 Mar;132(1):76-81

9. Sukontason KL, Narongchai P, Sukontason K, Methanitikorn R, Piangjai S. Forensically important fly maggots in a floating corpse: the first case report in Thailand. J Med Assoc Thai 2005 Oct;88(10):1458-61
10. Sukontason K, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Sribanditmongkol P, Bhoopat T, Kurahashi H, Chockjamsai M, Piangjai S, Bunchu N, et al. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. Parasitol Res 2007 Oct;101(5):1417-23
11. Nelson LA, Wallman JF, Dowton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Med Vet Entomol 2007 Mar;21(1):44-52
12. Preativatanyou K, Sirisup N, Poovorawan Y, Thavara U, Tawatsin A, Sungpradit S, Siriyasatien P. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. Forensic Sci Int. In 2010 Oct 10; 202(1-3): 97-101
13. Inoue H. Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 1990 Nov; 96(1): 23-8