

**การประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรม :
การตรวจหาแหล่งที่มาของไวรัสตับอักเสบ ซี ที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว**

**Application of Molecular Evolution in Court :
Source Identification in A Large Hepatitis C Virus Outbreak**

บุญเรือง คำศรี^{1, 2}

Boonruang Kham Sri

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต การเกิดวิวัฒนาการร่วมกัน และการสอบสวนทางระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล เป็นต้น บทความปริทัศน์นี้เสนอหลักการของการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต ไวรัสตับอักเสบ ซี การตรวจหาแหล่งที่มาของไวรัสตับอักเสบ ซี ที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว ณ เมืองบาเลนเซีย ประเทศสเปน และข้อควรตระหนักในการประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรมเพื่อพิสูจน์แหล่งที่มาของเชื้อก่อโรคซึ่งจะนำไปสู่การชดเชยความเสียหาย

คำสำคัญ : วิวัฒนาการระดับโมเลกุล, ไวรัสตับอักเสบ ซี, การแพร่เชื้อในโรงพยาบาล, การพิสูจน์หลักฐาน, การชดเชยความเสียหาย

¹ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



Abstract

Molecular phylogenetic analyses are used in various applications, such as studying the diversity of organisms, co-evolution, investigation of molecular epidemiology, etc. This review presents principle of molecular phylogenetic analysis by comparison of nucleotide sequences, hepatitis C virus, source identification in a large hepatitis C virus outbreak at Valencia, Spain, and consideration in application of molecular evolution in court for investigation of pathogen source that would lead to liability compensation.

Keywords : molecular evolution, hepatitis C virus, nosocomial transmission, forensics, liability compensation

1. บทนำ

การดูแลและรักษาสุขภาพนับเป็นเรื่องที่สำคัญในชีวิตของมนุษย์ การเข้ารับบริการสาธารณสุขจึงเป็นเรื่องจำเป็นสำหรับทุกคน ระบบบริการสาธารณสุขซึ่งมีมนุษย์เป็นผู้ให้บริการจึงมีโอกาสเกิดความผิดพลาดขึ้นได้แม้ผู้ให้บริการจะถูกเรียกว่า “วิญญาณชน” ก็ตาม เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าความเสียหายจากการรับบริการสาธารณสุขเป็นสิ่งที่พบได้ในระบบบริการสาธารณสุขทั่วโลก กลไกช่วยเหลือผู้เสียหายให้ได้รับการชดเชยอย่างเป็นธรรมและมีประสิทธิภาพนับว่ามีความสำคัญ การเรียกร้องค่าชดเชยอาจต้องอาศัยกระบวนการทางศาลยุติธรรมเพื่อพิสูจน์ข้อเท็จจริงในกรณีของการติดเชื้อจากการรับบริการสาธารณสุขจำเป็นต้องพิสูจน์ให้ได้ว่า ผู้เสียหายได้รับเชื้อก่อโรคมาจากผู้ให้บริการจริงซึ่งต้องอาศัยเทคนิคหรือวิธีการวิเคราะห์ที่สะท้อนให้เห็นถึงระดับสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคนั้นๆ การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลถูกนำมาใช้เพื่อการสอบสวนทางระบาดวิทยาของการระบาดอย่างรวดเร็วและการติดต่อของโรคที่มีสาเหตุมาจากไวรัสที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอซึ่งมีวิวัฒนาการที่รวดเร็ว ในอดีตมีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ในกระบวนการยุติธรรมเพื่อพิสูจน์ว่าเหยื่อ (ผู้ที่ได้รับเชื้อ) ติดเชื้อมาจาก ผู้ต้องสงสัยที่คาดว่าเป็นแหล่งของเชื้อสาเหตุ ซึ่งนำไปสู่การจ่ายค่าเสียหายให้กับเหยื่อ เช่น กรณีการแพร่เชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากคัลลยแพทย์ทรวงอกไปสู่ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาตัดหัวใจที่เมือง บาร์เซโลนา ประเทศสเปน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงปี พ.ศ. 2531–2536 (Esteban et al., 1996) ในบทความนี้จะกล่าวถึงการศึกษาความสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต ไวรัสตับอักเสบบี การประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรมซึ่งเป็นการตรวจหาแหล่งที่มาของไวรัสตับอักเสบบี ที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว ณ เมืองบาเลนเซีย ประเทศสเปน และข้อควรตระหนักในการประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรม

2. การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิต

การลำดับเหตุการณ์การเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ ทั้งจากการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแนวทางการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น โดยอยู่บนพื้นฐานของการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงและความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่นำมาศึกษา แนวทางเช่นนี้เรียกว่า ระบบวิทยา (systematics) ซึ่งเป็นการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต และการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการหรือไฟโลเจนี (phylogeny) ระหว่างสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น ไม่ว่าจะเป็นด้วยข้อมูลจากผลการศึกษาเปรียบเทียบด้านกายวิภาค นิเวศวิทยา สรีรวิทยา หรือชีวเคมี นักระบบวิทยาต้องพิจารณาว่าการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องตามธรรมชาตินั้นควรที่จะสะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอีกด้วย ซึ่งเห็นได้ชัดเจนว่าสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่ถูกจัดไว้เป็นกลุ่ม

เดียวกันเนื่องจากมีลักษณะต่างๆ จำนวนมากคล้ายคลึงกันนั้น เกิดจากการสืบทอดเผ่าพันธุ์เป็นลูกหลานจากบรรพบุรุษร่วม (common ancestor) เดียวกัน โดยเรียกวิธีนี้ว่า การจัดจำแนกเชิงวิวัฒนาการ (evolutionary classification) ซึ่งจะช่วยให้เห็นถึงเส้นลำดับที่แสดงความเป็นเครือญาติหรือพงสาวลี (genealogy) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มอีกด้วย การค้นหาให้พบลำดับการเป็นเครือญาติหรือไฟโลเจนีที่แท้จริงของสิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่มทำได้โดยการหาความสัมพันธ์เชิงไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetic relationship) ซึ่งนักชีววิทยาส่วนใหญ่สนใจรูปแบบของวิวัฒนาการในลักษณะที่สายบรรพบุรุษแยกแตกออกเป็นสายใหม่หลายสปีชีส์ มองเห็นเป็นกระจุกหรือเคลด (clade) ของสปีชีส์ วิวัฒนาการในรูปแบบนี้เรียกว่า การแตกกิ่งแบบไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetic branching) หรือ เคลโดเจเนซิส (cladogenesis) และมีแนวทางการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตให้เป็นไปตามรูปแบบวิวัฒนาการ ได้แก่ แคลดิสติกส์ (cladistics) หรือเรียกอีกอย่างว่า ระบบวิทยาไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetic systematics) วิธีนี้ถูกเสนอโดย วิลลี เฮนนิก (Willi Hennig) นักกีฏวิทยาชาวเยอรมัน โดยให้ลำดับขั้นตอนทางวิวัฒนาการเกิดขึ้นในแบบที่สิ่งมีชีวิตบนกิ่งหนึ่ง เกิดวิวัฒนาการแตกออกเป็น 2 กิ่ง หรือเรียกว่าเป็นแท็กซาพี่น้อง (sister taxa) นักแคลดิสติกส์จะศึกษาลักษณะของสิ่งมีชีวิตเพื่อแยกแยะระหว่างลักษณะดั้งเดิม (primitive character) ของบรรพบุรุษออกจากลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป (derived character) ของรุ่นลูกหลาน จากนั้นจะนำเอาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้มาใช้ในการสร้างไฟโลเจนีขึ้น โดยอาศัยการมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปร่วมกัน (shared derived character) นำมาคำนวณด้วยเทคนิควิธีการทางคณิตศาสตร์แบบต่างๆ (เจาะจงเด่นดวงบริพันธ์, 2555: 126–140) ได้แก่ 1) วิธีที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (distance-based approach) เช่น เนเบอร์ จอยนิง (neighbor-joining: NJ) โดยมีหลักการคือมีการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และสร้างตารางแสดงระยะห่างทางพันธุกรรม (distance matrix) จากนั้นจึงสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ (phylogenetic tree) โดยวิเคราะห์ผลจากตารางดังกล่าว ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงสายวิวัฒนาการของคู่สิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ตามด้วยสิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากขึ้นตามลำดับ วิธี NJ เป็นวิธีที่ใช้ในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ค่อนข้างได้รับความนิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลเร็วเป็นแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ซึ่งโดยมากไม่มีการตรึงราก (unrooted tree) คู่ของสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์คล้ายกันมากที่สุด (มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด) จะถูกนำมาเชื่อมโยกัน เรียกว่า ‘neighbor’ หรือ “เพื่อนบ้าน” 2) วิธีที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สถานะของลักษณะที่เป็นลำดับกรดอะมิโนหรือลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยตรง (character-based approach) เช่น แมกซิมีม พาร์ซิโมนี (maximum parsimony: MP) โดยมีหลักการคือ การวิเคราะห์สถานะของลักษณะที่เป็นลำดับกรดอะมิโนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงเพื่อหาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปร่วมกันที่มีความสำคัญในการสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ โดยวิธี MP นี้จะเลือกแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่มีจำนวนการเปลี่ยนแปลงของสถานะของลักษณะน้อยที่สุด และอีกวิธีคือ แมกซิมีม ไคลด์ลิตูด (maximum likelihood: ML) โดยมีหลักการคือ การคำนวณความน่าจะเป็น

(probability หรือ likelihood) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (หรือลำดับกรดอะมิโน) ที่แสดงสถานะของลักษณะที่ปรากฏ โดยสมมติให้ข้อมูลชุดนี้มีการวิวัฒนาการภายใต้แบบจำลองวิวัฒนาการที่กำหนด แผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ML ที่มีค่าความน่าจะเป็นสูงที่สุด จัดว่าเป็นแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่ดีที่สุดและจะถูกเลือกให้เป็นสมมติฐานที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา (อัจฉริยา รังษิรุจิ, 2555: 199–208)

สิ่งมีชีวิตบางกลุ่มที่สนใจศึกษา เช่น ไวรัส เป็นต้น มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาไม่ชัดเจนทำให้ยากต่อการค้นหาลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปร่วมกัน ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการที่มีความละเอียดและซับซ้อนขึ้น โดยการนำเอาเทคนิคสมัยใหม่ทางชีววิทยาเชิงโมเลกุล (molecular biology) ซึ่งอาศัยเครื่องมือที่ทันสมัยและการวิเคราะห์ผลที่รวดเร็วและแม่นยำโดยใช้คอมพิวเตอร์ วิธีการเหล่านี้เน้นการศึกษาในระดับโมเลกุล ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การศึกษาในระดับโปรตีน และการศึกษาในระดับกรดนิวคลีอิก ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการหาข้อมูลวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (molecular evolution) ของกรดนิวคลีอิกโดยการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์เท่านั้น ซึ่งเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงเพราะศึกษาที่ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง การศึกษาเริ่มต้นจากการสกัดกรดนิวคลีอิกจากสิ่งมีชีวิตที่สนใจศึกษา อาทิเช่น สิ่งมีชีวิตที่สนใจในการศึกษาค้างคาวคือ ไวรัสตับอักเสบ ซี ซึ่งมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอ จำเป็นต้องเปลี่ยนอาร์เอ็นเอให้เป็นดีเอ็นเอแล้วค่อยนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากดีเอ็นเอมีคุณสมบัติในการคงตัวสูงกว่าอาร์เอ็นเอนั่นเอง จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) หากดีเอ็นเอมีจำนวนจำกัด ควรนำไปเพิ่มปริมาณก่อนด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction: PCR) จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปเข้าสู่ขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือหากต้องการทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้มีความคงตัวอาจนำไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะและส่งทอดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (แบคทีเรีย) แล้วเพาะเลี้ยง และสกัดดีเอ็นเอออกมาทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำเข้าสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์หลายโปรแกรมเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เช่น MEGA 5 (Tamura et al., 2011), PHYLIP 3.695 (Felsenstein, 2013) เป็นต้น โดยใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ดังที่กล่าวมา และผ่านการทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์โดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ เช่น การวิเคราะห์บูตสตรัป (bootstrap analysis) หลักการสำคัญของวิธีการวิเคราะห์คือ ถ้าความเกี่ยวข้องระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์สองลำดับมีมาก การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงบาง นิวคลีโอไทด์แบบไม่จำเพาะเจาะจงไม่น่าจะมีผลต่อความเกี่ยวข้องนี้ ในทางตรงกันข้ามถ้าสองลำดับนั้นเกี่ยวข้องกันน้อยมาก การเปลี่ยนแปลงบางนิวคลีโอไทด์จะมีผลอย่างมาก การวิเคราะห์เริ่มจากการสุ่มเลือกลักษณะแล้วนำกลับเข้าที่เดิม (resampling points from one's own data, with replacement) เป็นการสุ่มตัวอย่างย่อยๆ ในแต่ละคอลัมน์จากคอลัมน์ใดๆ ของชุดข้อมูล เพื่อสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่ที่มีจำนวนสปีชีส์และจำนวนลักษณะ

เท่ากับข้อมูลเดิม จากนั้นนำข้อมูลชุดใหม่มาสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์สำหรับแต่ละตัวอย่างย่อย เช่น อาจสร้างแผนภาพต้นไม้ 1,000 แผนภาพ และสรุปผลโดยการสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่สอดคล้อง ซึ่งประกอบด้วยการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เหมือนกันมากกว่าร้อยละ 50 ของแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ทั้งหมด (majority-rule consensus tree) จากการคำนวณค่าความถี่ที่ส่วนต่างๆ ของแผนภาพซึ่งถูกสร้างขึ้นในแต่ละตัวอย่างย่อยที่สุ่มมาเหล่านั้น เช่น หากพบการจัดกลุ่มของลำดับแบบหนึ่งๆ ในทุกแผนภาพต้นไม้ของทุกตัวอย่างย่อย หมายความว่าค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของบูทสเตรป (bootstrap support) เท่ากับร้อยละ 100 หากพบเพียง 3 ใน 4 ของแผนภาพต้นไม้ของตัวอย่างย่อย แสดงว่าค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของบูทสเตรปเท่ากับร้อยละ 75 ซึ่งค่านี้จะถูกแสดงไว้ที่ปลายของแผนภาพต้นไม้เรียกว่า ความน่าจะเป็นภายหลัง (posterior probability) เป็นค่าที่แสดงถึงความเชื่อมั่นภายหลังจากพิจารณาว่าความเชื่อมั่นที่จะจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตได้ถูกต้องมีค่าเท่ากับเท่าไร (Felsenstein, 1985) องค์ประกอบของแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ ได้แก่ ส่วนที่เป็นกิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งแบบหลังนี้พบน้อยมาก ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า ปม (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับ นิวคลีโอไทด์หรือสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ยอด (tip) หรือแท็กซอน (taxon) ถ้าเป็นพหุพจน์จะเรียกว่า แท็กซา (taxa) การนำเสนอข้อมูลแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์มีแนวปฏิบัติ ดังนี้ 1) ความยาวของกิ่งก้านจะเขียนตามสัดส่วนทุกครั้ง 2) แสดงค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของบูทสเตรปเป็นร้อยละ (%) และ 3) ใช้ชื่อแท็กซาหรือชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความหมาย การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยเทคนิคด้านดีเอ็นเอนั้น ยังทำให้สามารถศึกษาไปถึงระดับสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม อัตราการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลของยีนที่นำมาศึกษาเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอย่างมากเมื่อนำยีนใดยีนหนึ่งมาใช้ เนื่องจากแนวคิดหลักของวิธีการต่างๆ ที่ใช้สร้างไฟโลเจนีที่บอกว่า ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการเกิดขึ้นจากระดับความแตกต่างของการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ทำให้ถ้าสิ่งมีชีวิตยังมีปริมาณความแตกต่างระหว่างกันจากผลของการกลายพันธุ์มากขึ้นเท่าไร สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นยิ่งน่าจะมีระยะห่างทางวิวัฒนาการมากขึ้นตามไปด้วย นักวิวัฒนาการจึงใช้แนวคิดนี้เป็นหลักในการวิเคราะห์ลำดับชั้นเวลาของการเกิดวิวัฒนาการขึ้นได้ กล่าวคือ ถ้ากำหนดให้สิ่งมีชีวิตมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ แล้ววิวัฒนาการผ่านช่วงเวลาจากอดีตมาถึงปัจจุบัน จะประมาณค่าช่วงเวลาสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นใช้ในการวิวัฒนาการได้จากค่าระยะห่างทางการกลายพันธุ์ที่วัดได้จากการศึกษาเชิงโมเลกุล ซึ่งแนวคิดนี้เรียกว่า นาฬิกาวิวัฒนาการ (evolutionary clock) หรือนาฬิกาโมเลกุล (molecular clock) (เจษฎาเด่นดวงบริพันธ์, 2555: 151-152) การวิเคราะห์นาฬิกาโมเลกุล (molecular clock analysis) ทำได้ด้วยเทคนิควิธีแบบเบย์ (Bayesian method) (Dos Reis et al., 2012) เช่น โปรแกรมการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบเบย์โดยการสุ่มเลือกแผนภาพต้นไม้ (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees: BEAST) (Drummond and Rambaut, 2007) เป็นต้น

3. ไวรัสตับอักเสบ ซี

ไวรัสตับอักเสบ ซี เป็นไวรัสขนาดเล็ก (40–50 นาโนเมตร) ที่มีเปลือกหุ้ม มีลักษณะของจีโนมและการเรียงลำดับยีนที่จัดเป็นไวรัสสกุลเฮปาซีไวรัส (*Hepacivirus*) ในวงศ์ฟลาวีไวรัส (*Flaviviridae*) จีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว สายบวก ขนาดประมาณ 9.6 กิโลเบส มีส่วนที่สามารถแสดงออกมาเป็นโปรตีน (open reading frame: ORF) ขนาดยาวซึ่งมีรหัสสำหรับพอลิโปรตีน (polyprotein) ขนาดกรดอะมิโน 3,000 ตัว ORF นี้ถูกประกบด้วยลำดับ (sequence) ของปลาย 5' และ 3' ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ถูกแปลรหัส (untranslated regions: UTR) มีความยาว 341 และ 230 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ส่วนนี้มีลำดับซ้ำ (direct repeat) สั้นๆ อยู่ด้วย จึงเกิดลักษณะเหมือนที่หนีบผมเป็นรูปตัวยู (U-shaped hairpin) เป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรและสำคัญต่อการสร้าง polyprotein และการจำลองสารพันธุกรรมของไวรัส ที่ปลาย 5' มี internal ribosome entry site (IRES) ที่จับกับ 40S ribosomal subunit เพื่อเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส ส่วนที่ปลาย 3' ไม่มี poly A ลำดับของยีน คือ 5'–C, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4, NS5–3' เมื่อ polyprotein ของไวรัสถูกสร้างโดยเซลล์เจ้าบ้านและย่อยให้มีขนาดเล็กลงโดยเอนไซม์ทั้งของเซลล์เจ้าบ้านและไวรัส ทำให้ได้โปรตีนส่วนโครงสร้าง (structural proteins) ของไวรัส 3 ชนิด คือ แคปซิด (Core, C) เปลือกหุ้ม (Envelope 1: E1, Envelope 2: E2) และส่วนประกอบที่ไม่ใช่เป็นส่วนโครงสร้าง (Non Structural proteins) ของไวรัส ได้แก่ P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B (Penin et al., 2004) ในปี พ.ศ. 2532 นักวิทยาศาสตร์ของบริษัท Chiron Corporation ได้ค้นพบไวรัสตับอักเสบ ซี (Choo et al., 1989) ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีการค้นพบไวรัสชนิดใหม่โดยการศึกษาในระดับโมเลกุลแต่เพียงอย่างเดียว โดยการสร้าง complementary DNA (cDNA) clone จากพลาสมาของลิงชิมแปนซีที่ถูกฉีดด้วยพลาสมาของผู้ป่วยตับอักเสบที่ไม่ใช่จากไวรัสตับอักเสบเอ และ บี (Non-A, Non-B hepatitis) การศึกษาในระยะเริ่มแรกได้นำปัจจัยที่ช่วยในการแข็งตัวของเลือด คือ แฟคเตอร์ 8 (factor VIII) ชุดเดียวกับที่ใช้ในผู้ป่วยโรคฮีโมฟีเลีย (hemophiliacs) แล้วทำให้ผู้ป่วยเกิดเป็นตับอักเสบขึ้นมาฉีดเข้าลิงชิมแปนซี โดยคาดว่าพลาสมาของลิงชิมแปนซีจะเป็นแหล่งใหญ่ที่จะได้ไวรัสมาทำการศึกษา นำพลาสมาดังกล่าวมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงยิ่งยวด (ultracentrifuge) และนำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ จากนั้นนำกรดนิวคลีอิกที่ได้ไปสร้าง cDNA และทำการตัดและเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะชนิดสร้างโปรตีน (expression vector) พบว่ามี 1 โคลนที่สามารถผลิตโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มจากผู้ป่วยตับอักเสบชนิด non-A, non-B รายหนึ่ง หลังจากนั้นจึงใช้โคลนดังกล่าวเป็นตัวตรวจสอบเพื่อหาข้อมูลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของไวรัส (ชโลบล อยู่สุข, 2540: 13.23) ในปัจจุบันทั่วโลกมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ประมาณ 130–170 ล้านคน มีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 25 เท่านั้นที่สามารถกำจัดไวรัสออกไปจากร่างกายได้ ส่วนอีกประมาณร้อยละ 75 เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้จะไม่มีอาการ หรืออาจมีเพียงอ่อนเพลียเล็กน้อยเท่านั้น และหากเป็นเรื้อรังก็จะ

ค่อยๆ เกิดพังผืดที่ตับ (hepatic fibrosis) กลายเป็นตับแข็ง (cirrhosis) รวมถึงอาจเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) หรือตับวาย (liver failure) ตามมา (Hajarizadeh et al., 2013) การติดต่อของไวรัสตับอักเสบบี เกิดขึ้นได้ในช่วงเวลาที่กว้างมาก เริ่มตั้งแต่การติดเชื้อแบบเฉียบพลันที่สามารถกำจัดไวรัสได้ไปจนถึงการติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งไม่แสดงอาการใดๆ แต่สามารถแพร่กระจายไวรัสไปยังบุคคลอื่นได้ ช่องทางหลักของการแพร่กระจายไวรัสนี้คือ จากการรับเลือดและส่วนประกอบของเลือด (Feinstone et al., 1975) นอกจากนี้ยังพบในผู้ที่ใช้ยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น ผู้ที่สักตามร่างกาย เจาะหู ผ่าเข็มรักษาโรค หากเครื่องมือและวัสดุไม่ได้รับการฆ่าเชื้อที่ถูกต้อง ก็อาจเป็นสาเหตุของการติดต่อได้ ส่วนการติดต่อทางเพศสัมพันธ์และการติดต่อจากมารดาไปสู่ทารกพบได้แต่น้อยมาก (Pradat and Trepo, 2000) อีกช่องทางหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการแพร่กระจายของไวรัสได้คือ การให้บริการทางการแพทย์ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ทำให้มีโอกาสติดเชื้อได้ทั้งจากผู้ป่วยไปยังบุคลากรทางการแพทย์และจากบุคลากรทางการแพทย์ไปยังผู้ป่วย อาทิเช่น การฟอกเลือดล้างไต การเปลี่ยนไต การสัมผัสเชื้อโดยบังเอิญของบุคลากรทางการแพทย์ การใช้เข็มและกระบอกฉีดยาซ้ำ เป็นต้น (Esteban et al., 2008)

4. การตรวจหาแหล่งที่มาของไวรัสตับอักเสบบี ที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว ณ เมืองบาเลนเซีย ประเทศสเปน

กรณีที่จะนำมาเป็นตัวอย่างในการประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นสาธิตครั้งนี้ ถูกเผยแพร่ในวารสาร BMC Biology โดยคณะผู้วิจัยชาวสเปนซึ่งนำโดย Fernando González-Candelas (González-Candelas et al., 2013) ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 ได้เกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยการผ่าตัดเล็กในโรงพยาบาลเอกชนแห่งหนึ่งที่เมืองบาเลนเซีย ประเทศสเปน จากการสอบสวนทางระบาดวิทยาของเจ้าหน้าที่สาธารณสุขเพื่อพิสูจน์ว่า แหล่งที่มาของไวรัสนี้มาจากวิสัญญีแพทย์รายหนึ่งที่ปฏิบัติงานในโรงพยาบาลแห่งนี้และโรงพยาบาลที่ใกล้เคียงหรือไม่ ผลการรวบรวมข้อมูลพบว่า มีผู้ติดเชื้อนับร้อยรายซึ่งล้วนเกี่ยวข้องกับการเข้ารับการรักษาจากบุคลากรทางการแพทย์รายนั้นในทั้งสองโรงพยาบาล จากการรวบรวมหลักฐานทางระบาดวิทยาในช่วง 3 เดือนแรกยืนยันได้ว่า การแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบบี ที่รวดเร็วในครั้งนี้เกิดจากบริการทางการแพทย์โดยวิสัญญีแพทย์รายดังกล่าว นักระบาดวิทยาทดสอบถึงความสัมพันธ์จากบุคคลมากกว่า 66,000 รายที่เกี่ยวข้องกับการรักษาด้วยวิธีผ่าตัดในทั้งสองโรงพยาบาลกับปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการติดเชื้อในกระบวนการผ่าตัด อาทิเช่น ศัลยแพทย์ ห้องผ่าตัด ประเภทของการผ่าตัด วิสัญญีแพทย์ ประเภทของการให้ยาระงับความรู้สึก และอื่นๆ พบว่า ปัจจัยเสี่ยงที่มีนัยสำคัญคือ วิสัญญีแพทย์เท่านั้น ยิ่งกว่านั้นในกลุ่ม ผู้ติดเชื้อที่พบช่วงแรกจำนวน 197 ราย พบว่า 184 รายเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวางยาระงับความรู้สึกจาก วิสัญญีแพทย์รายดังกล่าว ซึ่งผู้ติดเชื้อเหล่านี้ปฏิเสธปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ จากหลักฐานทางระบาดวิทยาเหล่านี้ทำให้สมมติฐานที่สงสัยว่าไวรัสมาจากแหล่งอื่นต้องถูกตัดออกไป

ผู้บริหารสูงสุดของหน่วยงานทางด้านสาธารณสุขและกระบวนการยุติธรรมที่รับผิดชอบในการสอบสวนทางระบาดวิทยาและทางกฎหมายได้ร้องขอคณะผู้วิจัยที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการให้ดำเนินการเพื่อ (1) ตรวจสอบว่าผู้ต้องสงสัยเป็นสาเหตุของการระบาดครั้งนี้อย่างแท้จริงหรือไม่ (2) ค้นหาผู้ป่วยรายใดที่ติดเชื้อจากแหล่งทั่วไปและอาจถูกพิจารณา นำมารวมไว้ใน การระบาด และผู้ป่วยรายใดที่ติดเชื้อมาจากแหล่งอื่น (3) ตัดแหล่งที่มาอื่นๆ หรือเหตุการณ์ที่แตกต่างแต่เกิดขึ้นในเวลาเดียวกันออกไป (4) ค้นหาช่วงเวลาของการเกิดการระบาด (5) ระบุวันเวลาที่เกิดการติดเชื้อของผู้ป่วยแต่ละรายที่เกิดขึ้นในการระบาด และ (6) ระบุวันเวลาของการติดเชื้อของผู้ต้องสงสัย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุลเชิงวิวัฒนาการของการระบาดอย่างรวดเร็วครั้งนี้โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ซึ่งได้จากแหล่งที่มาของไวรัสที่สันนิษฐานไว้ (ผู้ต้องสงสัย) และของผู้ป่วย วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นครั้งนี้คือ เพื่อ (1) คัดผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากแหล่งทั่วไปออกจากกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากผู้ต้องสงสัย (2) ให้มีการประเมินความเป็นไปได้ที่จะเกิดเหตุการณ์ความเสี่ยงเฉพาะส่วนของงานที่ได้รับมอบหมาย (3) ได้มีการประมาณค่าวันเวลาของการติดเชื้อสำหรับผู้ป่วยแต่ละราย

การทดลองเริ่มต้นด้วยการเก็บตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่มีผลเลือดบวกต่อไวรัสตับอักเสบ ซี ชนิด HCV-1a และชนิด HCV-1b จำนวน 322 และ 290 ตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้เคยติดต่อกับ ผู้ต้องสงสัยหรือเคยเข้ารับการรักษาทางการแพทย์จากโรงพยาบาลที่ผู้ต้องสงสัยปฏิบัติงานอยู่ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจากผู้ต้องสงสัยพบว่า มีเพียง HCV-1a เท่านั้น คณะผู้วิจัยจึงแยกการวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมที่มี HCV-1b นอกจากนี้ยังได้นำตัวอย่างซีรัมจากผู้ที่มี HCV-1a ซึ่งอยู่ในเมืองบาเลนเซียแต่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การระบาดครั้งนี้ จำนวน 44 ตัวอย่าง เพื่อนำมาเป็นกลุ่มควบคุม การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 2 บริเวณบนจีโนมของไวรัสตับอักเสบ ซี เริ่มจากการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอด้วยกระบวนการรีเวอร์สทรานสคริปชัน (reverse transcription) แล้วตามด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธี hemi-nested PCR จากนั้นนำผลผลิต PCR ขนาด 229 นิวคลีโอไทด์ ของยีน NS5B ซึ่งเป็นบริเวณที่อนุรักษ์ (conserved region) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ และบริเวณที่สองคือ E1-E2 ขนาด 406 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นบริเวณที่แปรผัน (variable region) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปวิเคราะห์หา ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคโนโลยีของแซงเกอร์ (Sanger method)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 320 ชุด ของยีน NS5B ที่มาจาก HCV-1a และกลุ่มควบคุม ถูกนำไปจัดเรียงและเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS5B ที่มาจากผู้ต้องสงสัยและทดสอบการกระจายของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่าง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS5B ที่มาจากผู้ต้องสงสัย พบว่า เป็นไวรัสสายพันธุ์ HCV-1a คณะผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาเฉพาะตัวอย่างที่เป็น HCV-1a เท่านั้น ส่วนตัวอย่างอื่นๆ ที่นอกเหนือจากนี้ ได้ถูกกันออกไปจากกลุ่มที่ต้องศึกษา ท่ามกลางลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 229 นิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างซีรัมที่มาจาก



ระบาศ พบว่า มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่มาจากผู้ต้องสงสัยตั้งแต่ 0–19 นิวคลีโอไทด์ (ค่าเฉลี่ย = 2.37 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 3.31) ในขณะที่ถ้าเป็นการเปรียบเทียบชุดลำดับนิวคลีโอไทด์จากกลุ่มควบคุมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่มาจากผู้ต้องสงสัย พบว่า มีความแตกต่างอยู่ระหว่าง 3–14 นิวคลีโอไทด์ (ค่าเฉลี่ย = 6.61 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 2.75) นอกจากนี้ยังสังเกตว่ามีจำนวนตัวอย่างสูงถึง 150 ราย ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่มาจาก ผู้ต้องสงสัยอย่างสมบูรณ์ (100% identity) มี 69 รายที่แตกต่างเพียง 1 นิวคลีโอไทด์ และ 23 รายที่แตกต่าง 2 นิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่า มีการกระจายของความแตกต่างแบบไม่สมมาตรอย่างมากของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่มาจากผู้ต้องสงสัยที่เป็นสาเหตุของการระบาด ซึ่งจะแตกต่างจากการกระจายที่พบในกลุ่มควบคุมอย่างสิ้นเชิง ฉะนั้น จากการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่า ตัวอย่างจำนวนมากที่มี HCV-1a แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับไวรัสที่มีในผู้ต้องสงสัยมากกว่ากลุ่มควบคุม แม้ว่าจะไม่สามารถแยกทั้ง 2 กลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจนก็ตาม จากการนำชุดลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *NS5B* ของไวรัสทั้งจากกลุ่มตัวอย่าง กลุ่มควบคุม และผู้ต้องสงสัยไปเทียบเคียง (aligned sequences) และสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) และ maximum likelihood (ML) พบว่า ไม่สามารถรวมกลุ่มควบคุมไว้ในกลุ่มโมโนไฟเลติก (monophyletic group) ได้ ยิ่งกว่านั้น ไม่มีปมของแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ที่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของบูทสเตรป (bootstrap support) สูงเกินกว่าร้อยละ 70 จากแต่ละวิธีการสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ ดังที่กล่าวมาแล้วว่า ยีน *NS5B* มีการเปลี่ยนแปลงที่ล่าช้ากว่าบริเวณอื่นๆ บนจีโนมของไวรัสตับอักเสบ ซี (โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ E1–E2) และอาจเป็นเพราะขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาค่อนข้างสั้น ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ไม่สามารถแยกกลุ่มของผู้ป่วยได้ จึงมุ่งศึกษาบริเวณ E1–E2 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 4,184 ชุด ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากกลุ่มตัวอย่าง 274 ราย (3,038 ชุด) กลุ่มตัวอย่างที่อยู่นอกการระบาด 47 ราย (559 ชุด) กลุ่มควบคุม 42 ราย (453 ชุด) และผู้ต้องสงสัย จำนวน 134 ชุด ด้วยการสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์ด้วยวิธี NJ และ ML ซึ่งผลการวิเคราะห์ทั้งสองได้ค่า bootstrap support ที่สูงมาก คือ ร้อยละ 100 และ 96 หลังจากที่มีการวิเคราะห์ข้อมูลใหม่จำนวน 1,000 ครั้งด้วยวิธี NJ และ ML ตามลำดับ พบว่า สามารถจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากกลุ่มตัวอย่าง 274 รายไปอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากผู้ต้องสงสัย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากกลุ่มตัวอย่างที่อยู่นอกการระบาด 47 รายและกลุ่มควบคุม 42 ราย ผลการวิเคราะห์ด้วยการสร้างแผนภาพต้นไม้ไฟโลเจเนติกส์สอดคล้องกับหลักฐานทางระบาดวิทยาในการบ่งชี้ว่าผู้ต้องสงสัยเป็นต้นตอของการระบาดอย่างรวดเร็วของไวรัสตับอักเสบ ซี ครั้งนี้

ลำดับถัดไปคือ การประมาณค่าวันเวลาของการติดเชื้อในผู้ป่วยจำนวน 274 ราย เกิดขึ้นเมื่อใด โดยใช้วิธีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแบบเบย์โดยการสุ่มเลือกแผนภาพต้นไม้

(Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees: BEAST) ชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E1-E2 จากผู้ป่วยแต่ละรายถูกนำมาประมาณเวลาที่เริ่มปรากฏว่ามีบรรพบุรุษร่วมเมื่อไม่นานมานี้ (time of the most recent common ancestor: TMRCA) กับชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E1-E2 จากผู้ต้องสงสัย ในการระบาดครั้งนี้ มีผู้ป่วยจำนวน 24 ราย ที่ทราบวันที่ติดเชื้อ โดยก่อนที่จะเข้ารับบริการทางการแพทย์จากผู้ต้องสงสัย ผู้ป่วยจำนวนนี้มีผลเลือดลบต่อไวรัสตับอักเสบ ซี และมีผลเลือดบวกต่อไวรัสตับอักเสบ ซี หลังจากรับบริการทางการแพทย์จากผู้ต้องสงสัย เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสจากผู้ป่วยชุดนี้จึงถูกนำมาเปรียบเทียบกับนาฬิกาโมเลกุล (molecular clock) เพื่อประมาณ TMRCA ของผู้ป่วยแต่ละรายและผู้ต้องสงสัย ผลการวิเคราะห์ค่าเวลาที่เกิดบรรพบุรุษร่วมของการระบาดขึ้นนั้นพบว่า ผู้ป่วยแต่ละรายได้รับไวรัสจากผู้ต้องสงสัยอยู่ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2530-เมษายน พ.ศ. 2541 ซึ่งค่านี้สอดคล้องกับค่ามัธยฐานของ 95% Bayesian highest posterior density (95% HPD) สำหรับแต่ละวันที่ประมาณ TMRCA กับผู้ต้องสงสัย เมื่อพิจารณาช่วงเวลาแล้ว พบว่า ไม่ขัดแย้งกับการตรวจพบการระบาดในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 ส่วนการประมาณค่าวันเวลาการติดเชื้อของผู้ต้องสงสัย ผลการวิเคราะห์พบว่า เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2531 ซึ่งประมาณค่าแบบช่วง (95% HPD) อยู่ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2527-ตุลาคม พ.ศ. 2534 ดังนั้นจึงสอดคล้องกับการประมาณค่าในระยะต้นของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่พบในการระบาด การประมาณค่าวันเวลาของการติดเชื้อในผู้ป่วยแต่ละรายถูกนำไปเปรียบเทียบกับการประมาณค่าอย่างอิสระจากการฟingerprinting ในระหว่างการพิจารณาคดีของศาลยุติธรรม ซึ่งกระบวนการเกิดขึ้นโดยใช้หลักฐานจากบันทึกของโรงพยาบาลและเอกสารอื่นๆ และไม่ได้พิจารณาข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่อย่างใด

5. ข้อควรตระหนักในการประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรม

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ด้วยเหตุผลหลักคือ เป็นเทคนิคที่สะดวกและมีความแม่นยำในการที่จะศึกษาจีโนม และวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบขนาน แม้ว่า การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือจำเพาะ มีราคาแพง และใช้ความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์ ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีของการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง ทำให้สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้น และได้ปริมาณนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มากขึ้น ซึ่งเรียกเทคโนโลยีนี้ว่า next generation sequencing technology (NGS) รวมถึงการพัฒนาระบบหรือโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ง่ายต่อการใช้งานเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตาม การประยุกต์ใช้เทคนิคนี้โดยตรงเพื่อการวิเคราะห์ทางพิสูจน์หลักฐานจำเป็นต้องทำ แม้ว่าจะต้องใช้ด้วยความระมัดระวังมากกว่าการใช้เพื่อสอบสวนทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป เพราะอาจมีผลลัพธ์ที่ร้ายแรงตามมาคือ การอนุมานหรือการสรุปที่ไม่



ถูกต้องในบริบททางอาชญากรรม นอกจากนี้ การเลือกใช้บริเวณบนจีโนมในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการอนุมานที่ผิดพลาด ดังเช่นในตัวอย่างกรณีศึกษาครั้งนี้ที่เลือกใช้บริเวณ NS5B ของไวรัสตับอักเสบ ซี เพื่อวิเคราะห์การระบาด อีกประเด็นที่มีความสำคัญคือ การรายงานผลเพื่อนำไปเป็นพยานหลักฐานในกระบวนการยุติธรรม ดังที่กล่าวไว้ว่า การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวัฒนาการในระดับโมเลกุลต้องอาศัยวิธีการคำนวณทางคณิตศาสตร์และการทดสอบทางสถิติ ฉะนั้นนักวิเคราะห์นอกจากจะมีความสามารถในการวิเคราะห์แล้วยังต้องมีความชำนาญในการแปลผลและอภิปรายผลด้วย ซึ่งจะทำให้ได้ใบรายงานผลที่น่าเชื่อถือ สร้างความมั่นใจให้กับผู้พิพากษาโดยไม่มีข้อโต้แย้งใดๆ

6. กฎหมายคุ้มครองผู้รับบริการสาธารณสุขของประเทศไทย

เดิมที่ประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายคุ้มครองผู้รับบริการสาธารณสุขที่มีมาตรการการเยียวยาความเสียหายโดยตรงให้แก่ผู้รับบริการ หากผู้รับบริการต้องการการเยียวยาความเสียหายที่ได้รับจากบริการสาธารณสุข ผู้รับบริการจำต้องดำเนินการด้วยตนเองโดยอาศัยกฎหมายที่มีอยู่ เช่น ดังที่ปรากฏในพระราชบัญญัติ ให้ใช้บทบัญญัติบรรพ 1 แห่งประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ ที่ได้ตรวจชำระใหม่ พ.ศ. 2535 โดยอาศัยหลักละเมิดตาม “ประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ บรรพ 2 หนี้ ลักษณะ 5 ละเมิด หมวด 1 ความรับผิดเพื่อละเมิด มาตรา 420 ผู้ใดจงใจหรือประมาทเลินเล่อ ทำต่อบุคคลอื่นโดยผิดกฎหมายให้เขาเสียหายถึงแก่ชีวิตก็ดี แก่ร่างกายก็ดี อนามัยก็ดี เสรีภาพก็ดี ทรัพย์สินหรือสิทธิอย่างหนึ่งอย่างใดก็ดี ท่านว่าผู้นั้นทำละเมิดจำต้องใช้ค่าสินไหมทดแทนเพื่อการนั้น” (ศูนย์ทนายความทั่วไป, 2553ก) อย่างไรก็ตาม การเยียวยาผู้บริโภคซึ่งได้รับความเสียหายอันสืบเนื่องมาจากการบริโภคสินค้าหรือบริการนั้น ยังดูเหมือนว่าจะไม่เพียงพอต่อการให้ความเป็นธรรมแก่ผู้บริโภคอย่างแท้จริง (แผนกคดีผู้บริโภค ศาลฎีกา, 2549) ในปัจจุบันมีกฎหมายสองฉบับที่ได้กำหนดมาตรการการเยียวยาความเสียหายให้กับผู้รับบริการสาธารณสุขอย่างชัดเจน ได้แก่ พระราชบัญญัติหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ พ.ศ. 2545 หมวด 4 กองทุนหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ ได้ระบุไว้ว่า “มาตรา 41 ให้คณะกรรมการกันเงินจำนวนไม่เกินร้อยละหนึ่งของเงินที่จะจ่ายให้หน่วยบริการไว้เป็นเงินช่วยเหลือเบื้องต้นให้แก่ผู้รับบริการ ในกรณีที่ผู้รับบริการได้รับความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการรักษาพยาบาลของหน่วยบริการ โดยหาผู้กระทำผิดมิได้หรือหาผู้กระทำผิดได้ แต่ยังไม่ได้รับค่าเสียหายภายในระยะเวลาอันสมควร ทั้งนี้ ตามหลักเกณฑ์วิธีการ และเงื่อนไขที่คณะกรรมการกำหนด มาตรา 42 ในกรณีที่ผู้รับบริการได้รับความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการรักษาพยาบาลของหน่วยบริการ โดยหาผู้กระทำผิดได้แต่ยังไม่ได้รับค่าเสียหายภายในระยะเวลาอันสมควรตามมาตรา 41 เมื่อสำนักงานได้จ่ายเงินช่วยเหลือเบื้องต้นให้แก่ผู้รับบริการไปแล้ว สำนักงานมีสิทธิไต่เบี่ยเอาแก่ผู้กระทำผิดได้” (ศูนย์ทนายความทั่วไป, 2553ข) และพระราชบัญญัติวิธีพิจารณาคดีผู้บริโภค พ.ศ. 2551 หมวด 2 วิธีพิจารณาคดีผู้บริโภคในศาลชั้นต้น

ส่วนที่ 3 คำพิพากษาและคำสั่งชี้ขาดตัดสินคดี ได้ระบุไว้ว่า “มาตรา 40 ในกรณีที่มีความเสียหายเกิดขึ้นแก่ร่างกาย สุขภาพ หรืออนามัยและในเวลาพิพาทคดีเป็นการพินิจจะหยั่งรู้ได้แน่ชัดว่า ความเสียหายนั้นมีแท้จริงเพียงใด ศาลอาจกล่าวในคำพิพากษาหรือคำสั่งว่ายังสงวนไว้ซึ่งสิทธิที่จะแก้ไขคำพิพากษาหรือคำสั่งนั้นอีกภายในระยะเวลาที่ศาลกำหนด ทั้งนี้ ต้องไม่เกินสิบปีนับแต่วันที่ศาลมีคำพิพากษาหรือคำสั่ง แต่ก่อนการแก้ไขต้องให้ออกาสคู่ความอีกฝ่ายที่จะคัดค้าน” (ศูนย์ทนายความทั่วไทย, 2553ค) นอกจากนี้ยังมีร่าง พระราชบัญญัติคุ้มครองผู้เสียหายจากการรับบริการสาธารณสุข พ.ศ. ... ซึ่งอยู่ในกระบวนการตราพระราชบัญญัติและพระราชบัญญัติประกอบรัฐธรรมนูญ ตามรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทย พุทธศักราช 2550 (สำนักงานคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติ, 2553)

7. บทสรุป

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลร่วมกับเทคนิควิธีการทางคณิตศาสตร์และกรอบแนวคิดทางสถิติ สามารถนำไปใช้เชิงประยุกต์ โดยนำมาวิเคราะห์เพื่อหาข้อมูลที่เป็นประโยชน์ เช่น การพิสูจน์ทราบแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อสาเหตุของความเจ็บป่วย (อาทิ ไวรัสตับอักเสบ ซี) ซึ่งอาจเกิดจากการแพร่กระจายเชื้อโดยที่ไม่ได้ตั้งใจผ่านทางกระบวนการดูแลและรักษาผู้รับบริการทางการแพทย์ หรือการติดเชื้อในโรงพยาบาล เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเป็นพยานหลักฐานทางระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลในการประกอบการพิจารณาคดีในชั้นศาลยุติธรรม เป็นต้น ซึ่งต้องอาศัยบุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านชีววิทยาเชิงวิวัฒนาการในการวิเคราะห์ การแปลผล และการรายงานผล เพื่อให้การตัดสินคดีความเป็นไปอย่างยุติธรรมและโปร่งใส รวมทั้งผู้เสียหายจากการรับบริการสาธารณสุขได้รับการช่วยเหลือหรือชดเชยอย่างเป็นธรรมและมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

หนังสือ

- เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. (2555). **วิวัฒนาการ (Evolution)**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชโลบล อยู่สุข. (2540). “ไวรัสก่อโรคตับอักเสบ.” ใน: พิไลพันธ์ พุฒินนะ, ชโลบล อยู่สุข, บุญยศ เรืองสกุลราช, วรณีย์ กันสูงกุลมาลากุล, บรรณาธิการ. **ไวรัสวิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: อักษรสมัย. 13.23.
- อัจนรียา รังษิรุจิ. (2555). **วิวัฒนาการ: จากทฤษฎีสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

แหล่งสารสนเทศบนอินเทอร์เน็ต

- แผนกคดีผู้บริโภค ศาลฎีกา. (2549). **ประวัติแผนก**. สืบค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556, จาก <http://www.supremecourt.or.th/webportal/maincode/content.php?content=component/content/view.php?id=2&base=17&base=17>.
- สำนักงานคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติ. (2553). **ข้อมูลประกอบการพิจารณาร่างพระราชบัญญัติคุ้มครองผู้เสียหายจากการรับบริการสาธารณสุข**. สืบค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556, จาก http://www.nationalhealth.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=329:2010-08-16-05-03-16&catid=95:2010-02-22-23-30-10.
- ศูนย์ทนายความทั่วไทย. (2553ก). **พระราชบัญญัติ ให้ใช้บทบัญญัติบรรพ 1 แห่งประมวลกฎหมายแพ่งและพาณิชย์ที่ได้ตรวจชำระใหม่ พ.ศ. 2535**. สืบค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556, จาก <http://www.thailandlawyercenter.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538976485&Ntype=21>.
- _____. (2553ข). **พระราชบัญญัติหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ พ.ศ. 2545**. สืบค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556, จาก <http://www.thailandlawyercenter.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538976332&Ntype=19>.
- _____. (2553ค). **พระราชบัญญัติวิธีพิจารณาคดีผู้บริโภค พ.ศ. 2551**. สืบค้นเมื่อ 5 ตุลาคม 2556, จาก <http://www.thailandlawyercenter.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=538975434&Ntype=19>.

Articles

- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." **Science**. 244 (4902) : 359–62.
- Dos Reis, M., Inoue, J., Hasegawa, M., Asher, R.J., Donoghue, P.C.J. and Yang, Z. (2012). "Phylogenomic datasets provide both precision and accuracy in estimating the timescale of placental mammal phylogeny." **Proc R Soc B**. 279 (1742) : 3491–500.
- Drummond, A.J. and Rambaut, A. (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." **BMC Evol Biol**. 7 : 214.
- Esteban, J.I., Gómez, J., Martell, M., Cabot, B., Quer, J., Camps, J., et al. (1996). "Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon." **N Engl J Med**. 334 (9) : 555–60.
- Esteban, J.I., Sauleda, S. and Quer, J. (2008). "The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe." **J Hepatol**. 48 : 148–62.
- Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z., Purcell, R.H., Alter, H.J. and Holland, P.V. (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." **N Engl J Med**. 292 (15) : 767–70.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." **Evolution**. 39 (4) : 783–91.
- González-Candelas, F., Bracho, M.A., Wróbel, B. and Moya, A. (2013). "Molecular evolution in court: analysis of a large hepatitis C virus outbreak from an evolving source." **BMC Biol**. 11 : 76.
- Hajarizadeh, B., Grebely, J. and Dore, G.J. (2013). "Epidemiology and natural history of HCV infection." **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 10 (9) : 553–62.
- Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D. and Pawlotsky, J.M. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." **Hepatology**. 39 (1) : 5–19.
- Pradat, P. and Trepo, C. (2000). "HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread." **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 14 (2) : 201–10.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." **Mol Biol Evol**. 28 (10) : 2731–9.

Websites

- Felsenstein, J. (2013). PHYLIP: Phylogeny Inference Package Version 3.695, April, 2013. Retrieved September 9, 2013, from <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/doc/main.html>.