

บทความทั่วไป

การตรวจพิสูจน์คราบเลือด

Identification of Blood stains

ผศ. ศิริพร พันธศรี*

ในจำนวนของเหลวจากร่างกายทั้งหมด เลือดเป็นชีววัตถุพยานที่สำคัญที่สุดในการนำไปใช้ตรวจหาหมู่เลือดและดีเอ็นเอ เพื่อบ่งบอกว่าเป็นเลือดของใคร และยังสามารถใช้เป็นหลักฐานในการเชื่อมโยงผู้เสียหาย ผู้ต้องสงสัย และสถานที่เกิดเหตุเข้าไว้ในเหตุการณ์เดียวกัน โดยอาศัยลักษณะของคราบเลือดที่ปรากฏในที่เกิดเหตุ เช่น ปริมาณเลือด ขอบเขตการกระจายของเลือด รอยป้าย รอยลาก เป็นต้น นอกจากนี้ลักษณะรูปร่างของหยดเลือดยังสามารถบ่งบอกถึงระยะและทิศทางของเลือดที่มาจากกระทบบพื้นผิวได้ ข้อมูลเหล่านี้ล้วนเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการที่จะนำไปใช้ประกอบการพิจารณาถึงพฤติการณ์ของคดีที่เกิดขึ้น สำหรับการตรวจคราบเลือดในห้องปฏิบัติการนั้น คราบเลือดควรมีปริมาณมากพอต่อการตรวจพิสูจน์ และควรระมัดระวังปัจจัยบางอย่างซึ่งมีผลต่อการทำลายคุณสมบัติของเลือด ได้แก่ เวลา การเกิดสนิมของอาวุธ ความร้อน ความชื้น และการซักล้างกรณีเป็นคราบที่เสื้อผ้า เป็นต้น

การตรวจคราบเลือดแบ่งตามขั้นตอนได้ดังนี้

1. ตรวจว่าเป็นเลือดหรือไม่¹⁻⁴ ใช้วิธี benzidine, o-tolidine, phenolphthalein, leucomalachite green, และ luminol ซึ่งวิธีทั้งหมดนี้เป็น catalytic test โดยวิธี benzidine และ o-tolidine จะให้ความไวสูงกว่า แต่มีความจำเพาะน้อยกว่าวิธี phenolphthalein และ leucomalachite green นอกจากนี้ benzidine และ o-tolidine ยังเป็นสารก่อมะเร็งจึงไม่นิยมใช้กัน วิธี phenolphthalein มีไวสูงกว่า leucomalachite green ฉะนั้นวิธี phenolphthalein หรือ Kastle-Meyer color test (K-M

test) จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป โดยมีหลักการคือ อาศัย peroxidase-like activity ของ hemoglobin และใช้ hydrogen peroxide เป็น peroxide เมื่อ reduced phenolphthalein ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีถูก oxidized จะเปลี่ยนเป็นสารสีชมพู

วิธีตรวจ: หยด working phenolphthalein solution 2 หยด ลงบนตัวอย่าง ถ้าหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้น เติม 3% hydrogen peroxide 2 หยด หากตัวอย่างเป็นคราบเลือดจะเกิดสีชมพูภายในเวลา 10 วินาที วิธีนี้มีความไว 1: 5,000,000 (working phenolphthalein solution: ผสม stock solution 20 mL กับ ethanol 80 mL; stock solution: phenolphthalein 2.0 g, potassium hydroxide 20 g, ผงสังกะสี 20 g และน้ำกลั่น 100 mL นำไปต้มโดยใช้ reflux condensor ต้มประมาณ 2-3 ชม. จนกระทั่งสารละลายไม่มีสี เติมผงสังกะสีอีกเล็กน้อย เพื่อให้อยู่ใน reduced form ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น)

สำหรับวิธี luminol test⁵ นั้นเหมาะที่จะนำไปใช้ตรวจในภาคสนาม โดยเฉพาะเป็นสถานที่ที่มีบริเวณกว้างๆ การทดสอบใช้วิธีฉีดพ่นน้ำยา luminol ไปที่บริเวณที่สงสัยว่าจะมีคราบเลือดตกค้างอยู่ ซึ่งไม่สามารถเห็นด้วยตาเปล่าได้โดยง่าย เช่นคราบเลือดที่ติดอยู่ตามพื้นที่มีสีเข้ม รอยเช็ด รอยรองเท้า รอยแตกของพื้นหรือผนัง เป็นต้น ข้อจำกัดในการตรวจคือ บริเวณที่ตรวจต้องมีมืด จึงจะสามารถเห็นการเรืองแสงของคราบเลือดที่เกิดจากปฏิกิริยาของเลือดกับสาร luminol ได้

2. ตรวจว่าเป็นเลือดมนุษย์หรือสัตว์? โดยวิธีทาง immunology ได้แก่ precipitin test เป็นวิธีมาตรฐาน

* ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ที่ใช้ในการทดสอบคราบเลือด หลักการคือแอนติบอดีเมื่อจับกับแอนติเจนที่ความจำเพาะต่อกัน จะเกิดตะกอนขึ้นขาว ถ้าเป็นเลือดมนุษย์จะเกิดแถบตะกอนขึ้นขาวบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ และ antihuman serum ใน capillary tube อาจจะใช้วิธี gel diffusion โดยหยดตัวอย่างเลือดที่สกัดได้ และ antihuman serum ใส่ในหลุม 2 หลุมที่อยู่ตรงกันข้ามกัน ถ้าเป็นเลือดมนุษย์จะเกิดเส้นตะกอนขาวระหว่างหลุมทั้ง 2 ที่แอนติบอดีและแอนติเจนซึมผ่าน agar gel-coated plate มาพบกัน อาจใช้วิธี electrophoresis เพื่อช่วยเร่งให้แอนติบอดีและแอนติเจนซึมผ่าน agar ได้เร็วขึ้น precipitin test นี้มีความไวสูง สามารถให้ผลบวกกับคราบเลือดแห้งที่ถูกเก็บไว้นาน 10-15 ปี รวมทั้งตัวอย่างเนื้อเยื่อของมัมมี่ที่มีอายุ 4-5 พันปีได้ และจะไม่ให้ผลบวกกับเลือดของสัตว์อื่น ๆ ยกเว้นลิง

3. ตรวจว่าเป็นเลือดใคร? ในปัจจุบันนิยมตรวจใน 2 ลักษณะคือการตรวจหาหมู่เลือดระบบ ABO และการตรวจเพื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ

การตรวจหาหมู่เลือดระบบ ABO แม่เม็ดเลือดแดงจะแตกหมดแล้ว แต่แอนติเจน แอนติบอดี ยังคงอยู่ในคราบเลือดนั้น เราจึงสามารถตรวจหาสารหมู่เลือดได้โดยใช้วิธีการดังนี้

3.1 Absorption-elution method⁶ หลักการคือแอนติเจนในคราบเลือดจะจับกับแอนติบอดีชนิดเดียวกัน หลังจากนั้นเมื่อนำไปอบที่ความร้อน 56° ซ แอนติบอดีจะหลุดออกมา นำไปทดสอบต่อกับเม็ดเลือดแดง

วิธีตรวจ: ละลายตัวอย่างคราบเลือดด้วยน้ำเกลือเล็กน้อย ตูดตัวอย่างเลือดใส่หลุม (flat-bottomed microtitre plate) A, B และ H หลุมละ 1 หยด นำไปอบที่ 56°ซ นาน 1-2 ชม. จนคราบเลือดแห้งสนิท เติม anti A, B และ H อย่างละ 1 หยดลงในหลุม A, B และ H ตามลำดับ ใส่ใน moisture chamber ไว้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นสะบัด anti A, B และ H ทั้ง ล้างด้วยน้ำเกลือเย็น (4°ซ) 3 ครั้ง เติมน้ำเกลือเย็นให้เต็มหลุม เก็บไว้ในตู้เย็น 30 นาที สะบัดน้ำเกลือทิ้ง และล้างด้วยน้ำเกลือเย็น (4°ซ) อีก 3 ครั้ง แล้วเติม 0.5% suspensions of A, B and O cells ในหลุม A, B และ H หลุมละ 1 หยด ตามลำดับ ใส่ใน moisture chamber นำไปอบที่ 56°ซ 15 นาที นำไป

เขย่าด้วยเครื่อง Rotator นาน 30 นาที ดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ (x 40) หรือแว่นขยาย วิธีนี้นอกจากจะนิยมใช้ในการตรวจหาหมู่เลือดจากคราบเลือดแล้ว ยังสามารถดัดแปลงไปใช้ในการตรวจหาหมู่เลือดจากเส้นผมได้⁷

3.2 Absorption-inhibition method หลักการคือ แอนติเจนในคราบเลือดจะจับแอนติบอดีชนิดเดียวกันที่เติมลงไป ทำให้แอนติบอดีลดลงจากเดิมหรือหมดไป เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่เติมลงไปภายหลังน้อยลงหรือไม่จับกลุ่ม

วิธีตรวจ: ละลายตัวอย่างคราบเลือดด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) เล็กน้อย ตูดตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดแก้ว (10x75 mm) 3 หลอด คือ A, B และ H หลอดละ 1 หยด เติม anti A, anti B และ anti H ที่เจือจางด้วยน้ำเกลือ (ความเจือจางอยู่ในระดับที่เมื่อนำไปทดสอบกับเม็ดเลือดแดงแล้ว จะเกิดการจับกลุ่มประมาณ + หรือ ++) ใส่ในหลอดแก้ว A, B และ H หลอดละ 1 หยด ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 2 ชม. หรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4°ซ 1 คืน (อาจนำไปเจือจางในแนวตั้งอีกครั้ง เรียก two-dimensional absorption inhibition⁸ เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาแอนติเจน ABH จากคราบเหงื่อ ปัสสาวะ น้ำอสุจิ น้ำลายและของเหลวอื่นๆ ของคนที่เป็น secretor ได้) เติม 2% suspensions of A, B และ O cells ลงในหลอดแก้ว A, B และ H หลอดละ 1 หยด ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 30 นาที บั่นที่ 2,400 rpm นาน 30 วินาที อ่านผลการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ใช้ น้ำเกลือแทนตัวอย่างคราบเลือด

3.3 การตรวจหาแอนติบอดี A และ B โดยวิธี Lattes crust test

วิธีตรวจ: วางคราบเลือดขนาด 4 x 4 mm จำนวน 3 ชิ้นบนแผ่นสไลด์ A, B และ O แผ่นละ 1 ชิ้น ปิดด้วย cover slip เติม 0.02% suspensions of A, B and O cells ที่ slide A, B และ O ตามลำดับ ใส่ใน moisture chamber ทิ้งไว้ 6 ชม. ดูการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง อาจใช้วิธี microplate method⁹ โดยใช้ microplate แทนแผ่นสไลด์

ความคงทนของสารหมู่เลือด แอนติเจนมีความ

คงทนมากกว่าแอนติบอดี แอนติเจนอยู่ได้นานเป็นปี ถึงแม้จะเก็บคราบเลือดแห้งนั้นไว้ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการสลายตัวของโปรตีนในคราบเลือดจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับ ความร้อน และความชื้นในสภาพแวดล้อม รวมทั้งสิ่งรอบรับคราบเลือดนั้นๆ และเนื่องจากการเกิดเชื้อราหรือแบคทีเรียในคราบเลือดอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การตรวจหมู่เลือดให้ผลบวกเท็จหรือผลลบเท็จได้¹⁰ ดังนั้นคราบเลือดที่แห้งเร็วจะช่วยรักษาคุณสมบัติของเลือดได้ดีกว่าคราบเลือดที่ยังเปียกชื้นอยู่

ในกรณีที่ผลการตรวจหมู่เลือดของตัวอย่างเลือดมีหมู่เลือดตรงกับผู้เสียหายหรือผู้ต้องสงสัย จำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วยการตรวจเปรียบเทียบดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนสุดท้ายต่อไป

วิธีเก็บและรักษาสภาพของคราบเลือด
เนื่องจากเลือดเป็นวัตถุพยานที่มีมักจะตรวจพบได้จากสถานที่เกิดเหตุ เช่น พื้นห้อง ฝาผนัง ลูกบิดประตู हु้ดิ่งลิ้นชัก ก๊อกน้ำ เสื้อผ้า ของใช้ต่างๆ และอาวุธ เป็นต้น ตัวอย่างคราบเลือดดังกล่าว นอกจากจะตรวจพิสูจน์ว่าเป็นเลือดของใครแล้ว บางครั้งอาจจำเป็นต้องตรวจหายาหรือสารพิษจากตัวอย่างเลือดดังกล่าว เพราะฉะนั้นการเก็บและรักษาสภาพของคราบเลือดที่ถูกวิธีจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง วิธีเก็บตัวอย่างคราบเลือดขึ้นอยู่กับลักษณะต่างๆ ของคราบเลือดดังนี้

เลือดสด

ก. ใช้ dropper หรือ syringe ดูดเลือด 5-10 mL เก็บใส่หลอดแก้วหรือขวดแก้วที่สะอาด และมีสารกันเลือดแข็งตัว เช่น sodium fluoride, EDTA, heparin, หรือ potassium oxalate ปิดจุกให้สนิท ถ้าหากไม่สามารถนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติในทันที ต้องเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็น ที่เป็นช่องเย็นธรรมดา ห้ามเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง เพราะจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ทำให้ยากแก่การตรวจหมู่เลือด

ข. ใช้ cotton swab (หรือเศษผ้าฝ้ายสีขาว ขนาด 1/4 x 1/4 ตารางนิ้ว) ชั้บเลือด ฝั้งตัวอย่างเลือดให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง นำใส่ในซองกระดาษ หรือหลอดแก้ว อุดปากหลอดแก้วด้วยจุกสำลีเพื่อนำมาส่งตรวจ

คราบเลือดแห้ง

ก. คราบเลือดที่ติดอยู่บนวัตถุ เก็บส่งตรวจทั้งชิ้น แต่ถ้าเป็นวัตถุชิ้นใหญ่ และไม่สามารถนำส่งตรวจทั้งชิ้นได้ หรือเป็นคราบเลือดที่ติดอยู่ตามฝาผนัง พื้นห้อง ให้ใช้มีดบางคมขูดออก หรือใช้ cotton swab ชุบน้ำกลั้่นหมาดๆ เช็ดออก และใช้ cotton swab อีกอันชุบน้ำกลั้่นหมาดๆ เช็ดบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีคราบเลือดเป็น control sample ฝั้ง swab ทั้งสองให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง แยกใส่ในซองกระดาษ หรือหลอดแก้ว อุดปากหลอดแก้วด้วยจุกสำลีเพื่อนำมาส่งตรวจ

ข. คราบเลือดที่ติดอยู่ตามร่างกายใช้ cotton swab ชุบน้ำกลั้่นหมาด ๆ เช็ดออก และใช้ cotton swab อีกอันเช็ดบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีคราบเลือด ฝั้ง swab ทั้งสองให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง แยกใส่ในซองกระดาษ หรือหลอดแก้ว อุดปากหลอดแก้วด้วยจุกสำลีเพื่อนำมาส่งตรวจ ตัวอย่างเช่น

ข1. คราบเลือดที่ติดอยู่ที่เล็บมือ ใช้วิธีขูดออก หรือตัดปลายเล็บออก แยกเล็บมือข้างซ้ายและข้างขวา ใส่ซองกระดาษข้างละซอง

ข2. เสื้อผ้าที่มีคราบเลือดติดอยู่ต้องฝั้งให้แห้งสนิทก่อนที่จะบรรจุในถุงกระดาษเพื่อนำส่งตรวจ

ข3. คราบเลือดที่ติดอยู่ที่พรมปูพื้นห้อง ใช้ cotton swab ชุบน้ำกลั้่นหมาดๆ เช็ดออก และใช้ cotton swab อีกอันชุบน้ำกลั้่นหมาดๆ เช็ดบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีคราบเลือด ฝั้ง swab ให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง แยกใส่ในซองกระดาษ หรือจะตัดพรมบริเวณที่มีคราบเลือด และบริเวณใกล้เคียงที่ไม่มีคราบเลือดส่งตรวจก็ได้

โดยสรุปแล้ว จะเห็นว่า การตรวจพิสูจน์คราบเลือดนั้น วิธี K-M test เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ มีความไวสูง สะดวก และรวดเร็ว เหมาะที่จะใช้ตรวจคัดกรองตัวอย่าง และยังสามารถที่จะนำไปใช้ในสถานที่เกิดเหตุได้ สำหรับการตรวจพิสูจน์ว่า ไซ้เลือดของมนุษย์หรือไม่นั้น วิธี precipitin test ที่ใช้ capillary tube นั้น เป็นวิธีที่ สะดวก ค่าใช้จ่ายไม่แพง และมีความไวเท่ากับวิธี electrophoresis จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป และขั้นตอนสุดท้ายคือการตรวจว่าเป็นเลือดของใครนั้น เนื่องจากอัตราค่าตรวจดีเอ็นเอค่อนข้างสูง ฉะนั้นควรตรวจหมู่เลือดเพื่อคัดกรองตัวอย่างให้น้อยลง ก่อนที่

จะตรวจยืนยันด้วยการตรวจดีเอ็นเอต่อไป การตรวจหมู่เลือดระบบ ABO นั้น วิธีการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี Absorption-elution จะสะดวกกว่าวิธี Absorption-inhibition ควรตรวจแอนติบอดีควบคู่กันไปด้วยทุกครั้ง เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือให้กับผลการตรวจ และวิธีสุดท้ายที่ไม่ควรจะมีมองข้ามไป นั่นคือ วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างที่ถูกต้อง ทำให้สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน โดยที่ยังคงอยู่ในสภาพที่ดี เพื่อรอรับการตรวจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Saferstein R. Criminalistics: An Introduction to Forensic Science. 8th ed, New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004: 336-9.
2. Fisher BAJ. Techniques of Crime Scene Investigation. 7th ed, New York: CRC Press, 2004: 206-11.
3. Sutton TP. Presumptive testing for blood. In: James SH. Scientific and Legal Applications of Bloodstain Pattern Interpretation. New York: CRC Press, 1999: 49-70.
4. http://www.tpub.com/content/combat/14137/css/14137_456.htm. 2005.
5. Laux DL. The detection of blood using luminol. In: James SH, Eckert WG (eds). Interpretation of Bloodstain at Crime Scenes. 2nd ed, New York: CRC Press, 1998: 153-66.
6. Davie MJ. ABO, Gm and Km grouping of bloodstains on microtitre plates. J Forensic Sci Soc 1979; 19(1): 59-64.
7. Nynbrandt F, Chisum WJ. Determination of the ABO blood group in hair. J Forensic Sci Soc 1971; 11: 201-4.
8. Lee HC, Gaensslen RE, Pagliaro EM, Novitch B. Two-dimensional absorption-inhibition. J Forensic Sci 1988; 33(5): 1127-38.
9. Mudd JL. A microplate method for reverse ABO typing of bloodstains. J Forensic Sci 1986; 31(2): 418-25.
10. Kubo S. Changes in the specificity of blood groups induced by enzymes from soil fungi. J Forensic Sci 1989; 34(1): 96-104.