

แนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจ Y-STR
โดย....คณะทำงานวิทยาศาสตร์ด้านวิธีการตรวจพิสูจน์ดีเอ็นเอ (SWGDM)

แปลจาก

*Y-chromosome Short Tandem Repeat
(Y-STR) Interpretation Guidelines*

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM)

http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/oct2009/standards/2009_01_standards01.htm/

แปลโดย....สุคนธ์ ประดุงกาญจนา* และ ภูวดล ธนะเกียรติไกร**

*หน่วยนิติเวชศาสตร์และพิษวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

**ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90110

วันที่ 11 กรกฎาคม 2555

บทนำ

การแปลผลการตรวจพิสูจน์ศพทางนิติเวช เป็นเรื่องที่ต้องใช้ความรู้ ความชำนาญเฉพาะทาง ซึ่งไม่มีกฎเกณฑ์เฉพาะใดสามารถใช้อธิบายเหตุการณ์ได้ทุกอย่าง จึงเป็นความสำคัญอย่างยิ่งที่ห้องปฏิบัติการ แต่ละแห่งจะต้องกำหนดแนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ไว้เป็นลายลักษณ์อักษร ซึ่งเอกสารชุดนี้ จะเป็นกรอบโครงสร้างของแนวปฏิบัติในการแปลผลการตรวจ Y-STR โดยสรุปขึ้นจากข้อมูลผลการตรวจสอบ ความน่าเชื่อถือ ข้อมูลจากรายงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ เครื่องมือที่ใช้ และ/หรือประสบการณ์ในการตรวจ พิสูจน์ศพทางนิติเวช

ข้อมูล Y-STR มักใช้ในการอธิบายเพิ่มเติมผลการตรวจ autosomal STR ในบางกรณี ข้อมูล Y-STR อาจเป็นเพียงข้อมูลเดียวที่มีอยู่ จึงต้องตระหนักไว้ว่า รูปแบบ Y-STR มีลักษณะเหมือนกันในชายที่ร่วมบรรพบุรุษสายบิดาเดียวกัน ข้อเท็จจริงนี้จะต้องใช้พิจารณาร่วมด้วยทุกครั้งในการสรุปผลการตรวจดีเอ็นเอ

1. การประเมินข้อมูลขั้นต้น

1.1 ห้องปฏิบัติการจะต้องกำหนดเกณฑ์การตัดสินใจว่า ผลการทดสอบมีคุณภาพที่ดีเพียงพอหรือไม่ สำหรับการแปลผลการทดสอบโดยใช้วิธีทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ และต้องมีการประเมิน เกณฑ์การตัดสินใจนี้โดยใช้ข้อมูลของห้องปฏิบัติการเอง

1.1.1 การประเมินรูปแบบ STR โดยใช้ผลการทดสอบเชิงปริมาณ เช่น ความสูงของกราฟ จะต้องมีการกำหนดระดับการตรวจวิเคราะห์ (analytical threshold) และ ระดับการใช้แปลผล (interpretational threshold)

1.1.1.1 ระดับการตรวจวิเคราะห์ จะต้องกำหนดความเข้มข้นสัญญาณระดับต่ำสุด และความเข้มข้นสัญญาณระดับสูงสุด ข้อมูลที่อยู่ระหว่างนี้จึงจะเป็นข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือ และนำไปใช้ในการ กำหนดค่าอัลลีล

1.1.1.2 ระดับการใช้แปลผล ต้องมีการกำหนดความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่อัลลีลจะถูก นำไปใช้ในการคำนวณทางสถิติ

1.2 ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการกำหนดเกณฑ์การประเมิน internal lane size standard และ/หรือ allelic ladder

1.3 ต้องมีการใช้ตัวควบคุม (control) ในการประเมินขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1.3.1 ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการกำหนดเกณฑ์การประเมินตัวควบคุมที่ใช้ในการตรวจ วิเคราะห์ เช่น reagent blank controls, amplification blank controls, female positive controls และ male positive controls

1.3.2 ห้องปฏิบัติการจะต้องกำหนดเกณฑ์การแปลผลการทดสอบและมีการจดบันทึกผล การประเมินตัวควบคุมเหล่านี้

1.4 ห้องปฏิบัติการที่ใช้การทดสอบ Y-STR ชนิด multiplex หลายชุดที่มีตำแหน่งที่ทับซ้อนกัน ต้อง กำหนดเกณฑ์ด้านความสอดคล้องของข้อมูลที่ได้

2. การระบุ

2.1 ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการกำหนดเกณฑ์การระบุอัลลีลตามรูปภาพหรือแถบสีที่เหมาะสม

2.1.1 การระบุตำแหน่ง (locus designation) ห้องปฏิบัติการต้องกำหนดตำแหน่งที่ตรวจ สำหรับอัลลีล

2.1.2 การระบุอัลลีล (allele designation) ห้องปฏิบัติการจะต้องระบุอัลลีล เป็นรูปแบบที่ สอดคล้องกับข้อกำหนดของคณะกรรมการ ISFG (DNA commission of the International Society of Forensic Genetics)

2.1.2.1 หากเป็นไปได้ การระบุอัลลีลต้องกำหนดเป็นจำนวนซ้ำ และต้องมีการ เปรียบเทียบกับ allelic ladder

2.1.2.2 การระบุอัลลีลที่ไม่เต็มจำนวนซ้ำ เช่น off-ladder (กราฟอยู่ในช่อง ระหว่างอัลลีลใน ladder) ต้องมีการระบุอัลลีลที่เป็นจำนวนเต็ม ตามด้วยจุดทศนิยม และจำนวนคู่เบสที่ไม่ สมบูรณ์ (เช่น DYS385 อัลลีล 15.2)

2.1.2.3 หากอัลลีลอยู่ในช่วงที่มากกว่าอัลลีลที่มากที่สุด หรือน้อยกว่าอัลลีลที่น้อยที่สุดของ allelic ladder การระบุอัลลีล ต้องระบุว่า มากกว่า หรือน้อยกว่า ค่าที่กำหนดในอัลลีลของ ladder นั้นๆ หรือหากอยู่ในวิสัย อาจมีการประมาณค่าของอัลลีลนั้นๆได้

2.1.2.4 สำหรับตำแหน่งที่มีอัลลีลซ้ำ และไม่สามารถที่จะแยกอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งให้เป็นของตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งได้ (เช่น DYS385I และ DYS385II) ตามข้อกำหนดของคณะกรรมการ ISFG (DNA commission of the International Society of Forensic Genetics) การระบุอัลลีล ให้ระบุเป็นแบบ genotype (เช่น DYS385 อัลลีล 11-14)

2.2 ผลแปลกล้อมที่เกิดขึ้น ต้องมีการจดบันทึก ทั้งนี้รวมถึง pull-up, stutter การเติมเบสที่ไม่สมบูรณ์ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเพศหญิงแบบไม่จำเพาะ และอื่นๆ

3. การแปลผลการทดสอบ

3.1 แนวปฏิบัติในการแปลผลต้องมีการกำหนดเกณฑ์ตัดสินใจ ถ้ากราฟที่ปรากฏเป็นอัลลีลจริงตามข้อกำหนดในหัวข้อ 2.1 ห้องปฏิบัติการต้องมีการสรุปข้อมูลที่ได้ ว่ามีแหล่งที่มาจากดีเอ็นเอเพศชายที่มาจากผู้ชายคนเดียว หรือผู้ชายที่มีญาติร่วมบรรพบุรุษร่วมสายบิดาที่แตกต่างกันสองคนหรือมากกว่านั้น ซึ่งประเมินได้จากจำนวนอัลลีลที่แต่ละตำแหน่ง และ อัตราส่วนความสูงของกราฟ (peak height ratio) ที่ตำแหน่งที่มีอัลลีลซ้ำ เช่น ตำแหน่ง DYS385

3.1.1 แหล่งที่มาจากผู้ชายคนเดียว: ตัวอย่างตรวจที่มีแหล่งที่มาจากผู้ชายคนเดียวจะมีจำนวนอัลลีลที่แต่ละตำแหน่งเพียงแค่อัลลีลเดียว และมีอัตราส่วนความเข้มสัญญาณที่ตำแหน่งซ้ำคองที่ โดยต้องประเมินจากตำแหน่งที่ตรวจทั้งหมด นอกจากนี้พึงระลึกไว้เสมอว่า อาจมีกรณีที่ผู้ชายคนเดียวมีอัลลีลซ้ำในตำแหน่งอื่นๆที่นอกเหนือจากตำแหน่ง DYS385 ได้

3.1.2 แหล่งที่มาแบบผสมไม่เท่ากัน ระหว่างผู้ชาย หลัก/รอง: ตัวอย่างตรวจที่เป็นแบบผสมไม่เท่ากันจากผู้ชายหลัก/รอง นี้ มีความเข้มสัญญาณของอัลลีลแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งต้องพิจารณาจากทุกตำแหน่งที่ตรวจเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจ

3.1.3 แหล่งที่มาแบบผสมจากผู้ชายที่รู้รูปแบบดีเอ็นเอกับผู้อื่น: ในบางกรณีอาจมีแหล่งที่มาของผู้ชายที่รู้รูปแบบดีเอ็นเอ (เช่น เหยื่อ หรือผู้ถูกกระทำ) ผสมกับรูปแบบดีเอ็นเอจากผู้ชายคนอื่น ซึ่งอาจใช้การหักลบรูปแบบดีเอ็นเอของผู้ชายที่รู้รูปแบบดีเอ็นเอออกจากรูปแบบผสม เพื่อให้ทราบรูปแบบดีเอ็นเอจำเพาะของอีกคนได้

3.1.4 แหล่งที่มาแบบผสมจากผู้ชายที่ไม่ทราบรูปแบบดีเอ็นเอ: กรณีนี้ผู้มีส่วนร่วมทั้งหลักและรอง ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เกิดขึ้นเมื่อความเข้มสัญญาณที่ตำแหน่งเดียวกัน มีความใกล้เคียงกันหรือปรากฏว่ามีอัลลีลที่ตำแหน่งนั้นเหมือนกัน ซึ่งอาจคัดผู้ชายบางคนออกหรืออาจไม่สามารถคัดผู้ชายบางคนออกจากรูปแบบผสมนี้ได้

3.2 ห้องปฏิบัติการต้องมีแนวปฏิบัติในการแปลผลกรณีที่มีรูปแบบดีเอ็นเอเพียงบางส่วน (รูปแบบที่มีตำแหน่งน้อยกว่าจำนวนตำแหน่งที่ตรวจวิเคราะห์) ซึ่งอาจเกิดจากตัวอย่างตรวจมีการเสื่อมสภาพ หรือมีปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างจำกัด หรือมีสารยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในบางครั้งการขาดหายไปของโครโมโซมบางส่วน (deletion) หรือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ อาจเป็นสาเหตุของการไม่สามารถตรวจวิเคราะห์บางตำแหน่งได้

4. การสรุปผลและการรายงานผลการทดสอบ

4.1 ห้องปฏิบัติการต้องมีแนวปฏิบัติสำหรับสรุปผลการทดสอบจากการเปรียบเทียบตัวอย่างวัตถุพยานกับตัวอย่างตรวจอ้างอิง

4.1.1 กำหนดแนวทางการสรุปผลการวิเคราะห์เป็น inclusion หรือ เข้ากันได้; คัดออก หรือ เข้ากันไม่ได้; ไม่สามารถสรุปผลได้ หรือไม่สามารถแปลผลได้; และ ไม่มีผล

4.1.2 จากการเปรียบเทียบแล้วพบว่ามีการ haplotype เหมือนกัน แสดงว่าไม่สามารถแยกได้ระหว่างผู้ชายที่มีญาติร่วมบรรพบุรุษสายบิดาเดียวกัน ซึ่งควรต้องระบุไว้ในกรณีที่ผลการเปรียบเทียบเข้ากันได้

5. การแปลผลทางสถิติ

5.1 Y-STR เป็นตำแหน่งบนโครโมโซมวายที่ไม่มี recombination ดังนั้นจึงต้องพิจารณาความสัมพันธ์ของตำแหน่งที่ตรวจทั้งหมดเป็นหนึ่งตำแหน่ง ฐานข้อมูลของ Y-STR ต้องประกอบด้วยความถี่ของรูปแบบ haplotype มากกว่าที่จะเป็นความถี่อัลลีล นอกจากนั้นควรมีการระบุแหล่งที่มาของฐานข้อมูลประชากร ประชากรที่เกี่ยวข้องพันใกล้ชิดกันซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่ใช้คำนวณค่าความถี่จะต้องมีการระบุเชื้อชาติให้ชัดเจน ฐานข้อมูลของ U.S. Y-STR (<http://usystrdatabase.org>) ควรนำมาใช้ในการประมาณค่าความถี่ประชากร นอกจากนั้นยังมีฐานข้อมูลความถี่รูปแบบ haplotype ของ Y-STR อื่นๆที่เป็นฐานข้อมูลออนไลน์อีกหลายฐานที่สามารถนำมาใช้ในการคำนวณได้ (ค้นหารายการฐานข้อมูลเหล่านี้ได้จากเว็บไซต์ของ NIST: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/y_strs.htm)

5.2 การรายงานผลกรณีที่ผลการตรวจเข้ากันได้ ต้องมีการค้นหารูปแบบ haplotype ในฐานข้อมูลประชากร โดยใช้ตำแหน่งที่ตรวจทั้งหมดจากตัวอย่างตรวจวัตถุพยาน กรณีที่มีข้อมูลตำแหน่งจากตัวอย่างตรวจอ้างอิงน้อยกว่าตัวอย่างตรวจจากวัตถุพยาน ให้ใช้เฉพาะตำแหน่งที่ปรากฏจากตัวอย่างตรวจทั้งสองชนิดในการค้นหาในฐานข้อมูล

5.3 ความถี่รูปแบบ haplotype คำนวณด้วยวิธีการนับ (the counting method) การคำนวณเพิ่มความถี่ด้วยค่าช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) เป็นการแก้ไขขนาดของฐานข้อมูล และความแปรปรวนของการสุ่มตัวอย่างให้มีความถูกต้องมากขึ้น การรายงานผลการนับรูปแบบ haplotype โดยไม่คำนวณเพิ่มความถี่ความเชื่อมั่น อาจยอมรับได้ในฐานะที่เป็นข้อเท็จจริงที่ปรากฏจากการค้นหาในฐานข้อมูล

5.3.1 ถ้าคำนวณเพิ่มเติมโดยใช้ช่วงความเชื่อมั่น อาจคำนวณได้ตามตัวอย่างดังนี้

5.3.1.1 กรณีที่ค้นรูปแบบ haplotype แล้วไม่พบรูปแบบนี้ในฐานข้อมูล
คำนวณโดยใช้สูตรระดับบนของช่วงความเชื่อมั่น 95% ตามสูตรนี้
$$1 - (0.05)^{1/n}$$

เมื่อ n เป็นจำนวนข้อมูลในฐานข้อมูล

5.3.1.2 กรณีที่ค้นรูปแบบ haplotype แล้วพบว่ามียูรูปแบบนี้ในฐานข้อมูล
คำนวณโดยใช้สูตรระดับบนของช่วงความเชื่อมั่น 95% ตามสูตรนี้

$$p + 1.96 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

เมื่อ $p = x/n$; n เป็นจำนวนข้อมูลในฐานข้อมูล; และ x เป็นจำนวนนับของรูปแบบ haplotype นี้ที่พบในฐานข้อมูล

5.4 สำหรับ Y-STR ที่เป็นแบบผสมที่ไม่สามารถแยกแยะรูปแบบเป็น haplotype เดี่ยวได้ อาจคำนวณค่าทางสถิติเป็นค่า probability of exclusion (PE) และ likelihood ratio (LR) ได้

5.5 หากมีข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างตรวจทั้ง autosomal และ Y-STR อาจใช้การคำนวณแบบคูณกัน (product rule) ของค่า match probability ของ autosomal STR genotype กับค่าความถี่รูปแบบ haplotype ของ Y-STR

5.6 การคำนวณค่าทางสถิติของรูปแบบ haplotype ของ Y-STR ในกรณีที่มีกลุ่มประชากรย่อย (population substructure) จากการศึกษาในฐานข้อมูลประชากรในปัจจุบันพบว่า ค่า F_{st} มีค่าน้อยมากในประชากรส่วนใหญ่ ดังนั้นการใช้วิธีการนับร่วมกับคำนวณเพิ่มระดับบนของช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% นี้จึงเป็นค่าที่เหมาะสมและมีความอนุรักษ์เพียงพอ ซึ่งเป็นวิธีการทางสถิติที่ครอบคลุมการประเมินความเข้ากันได้ไว้แล้ว

6. บรรณานุกรม และเอกสารแนะนำให้อ่านเพิ่มเติม

Balding, D. J. *Weight-of-Evidence for Forensic DNA Profiles*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2005, pp. 99–101.

Ballantyne, J., Fatolitis, L., and Roewer, L. Creating and managing effective Y-STR databases, *Profiles in DNA* (2006) 9(2)10–13. Also available:http://www.promega.com/profiles/902/ProfilesinDNA_902_10.pdf.

Buckleton, J., Walsh, S., and Harbison, S. Nonautosomal forensic markers. In: *Forensic DNA Evidence Interpretation*. J. Buckleton, C. M. Triggs, and S. J. Walsh, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2004, pp. 299–331.

Budowle, B., Adamowicz, M., Aranda, X. G. et al. Twelve short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: Genetic analysis of populations residing in North America, *Forensic Science International* (2005) 150:1–15.

Budowle, B., Jianye, G., and Chakraborty, R. Basic principles for estimating the rarity of Y-STR haplotypes derived from forensic evidence. In: *Proceedings of the Eighteenth International Symposium on Human Identification*, 2007.

Available:<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp18proc/oralpresentations/Budowle.pdf>.

Budowle, B., Sinha, S. K., Lee, H. S., and Chakraborty, R. Utility of Y-chromosome short tandem repeat haplotypes in forensic applications, *Forensic Science Review* (2003) 15:153–162.

Butler, J. M. Recent developments in Y-short tandem repeat and Y-single nucleotide polymorphism analysis, *Forensic Science Review* (2003) 15:91–111.

Available:http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/Butler2003b.pdf.

Butler, J. M. Y Chromosome DNA Testing. In: *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. J. M. Butler, Ed. Elsevier Academic Press, New York, 2005, pp. 201–239.

Butler, J. M., Decker, A. E., Kline, M. C., and Vallone, P. M. Chromosomal duplications along the Y-chromosome and their potential impact on Y-STR interpretation, *Journal of Forensic Sciences* (2005) 50:853–859. Available:http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/ButlerJFS_Y-STRduplication.pdf.

DNA Advisory Board. Quality assurance standards for forensic DNA typing laboratories, *Forensic Science Communications* [Online]. (July 2000).

Available:<http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis2a.htm>.

Dupuy, B. M., Stenersen, M., Egeland, T., and Olaisen, B. Y-chromosomal microsatellite mutation rates: Differences in mutation rate between and within loci, *Human Mutation* (2004) 23:117–124.

Gill, P., Brenner, C., Brinkmann, B. et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs, *International Journal of Legal Medicine* (2001) 114:305–9 and *Forensic Science International* (2001) 124:5–10.

Gusmão, L., Butler, J. M., Carracedo, A. et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis, *Forensic Science International* (2006) 157:187–197 and *International Journal of Legal Medicine* (2006) 120:191–200.

Gusmão, L., Sánchez-Diz, P., Calafell, F. et al. Mutation rates at Y chromosome specific microsatellites, *Human Mutation* (2005) 26:520–528.

Hammer, M. F., Chamberlain, V. F., Stover, D. et al. Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases, *Forensic Science International* (2006) 164:45–55.

Kayser, M., Brauer, S., Schädlich, H. et al. Y chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. populations of African, European and Hispanic ancestry, *Genome Research* (2003) 13:624–634.

Kayser M., Caglià, A., Corach, D. et al. Evaluation of Y chromosomal STRs: A multicenter study, *International Journal of Legal Medicine* (1997) 110:125–133, 141–149.

Krenke, B. E., Viculis, L., Richard, M. et al. Validation of a male-specific, 12-locus fluorescent short tandem repeat (STR) multiplex, *Forensic Science International*(2005) 148:1–14.

Mulero, J. J., Chang, C. W., Calandro, L. M. et al. Development and validation of the AmpF/STR® Yfiler™ PCR amplification kit: A male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system, *Journal of Forensic Sciences* (2006) 51:64–75.

National Research Council, Committee on DNA Forensic Science. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. 2nd ed. National Academies Press, Washington, D.C., 1996.

Prinz, M., Ishii, A., Coleman, A., Baum, H. J., and Shaler R. C. Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex, *Forensic Science International*(2001) 120:177–188.

Schoske, R., Vallone, P. M., Kline, M. C., Redman, J. W., and Butler, J. M. High-throughput Y-STR typing of U.S. populations with 27 regions of the Y chromosome using two multiplex PCR assays, *Forensic Science International* (2004) 139:107–121.

Available: http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/pub_pres/Schoske2004.pdf.

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Short Tandem Repeat (STR) Interpretation Guidelines, *Forensic Science Communications* [Online]. (July 2000).

Available: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/strig.htm>.

Sinha, S. K., Budowle, B., Chakraborty, R. et al. Utility of the Y-STR typing systems Y-PLEX™ 6 and Y-PLEX™ 5 in forensic casework and 11 Y-STR haplotype database for three major population groups in the United States, *Journal of Forensic Sciences*(2004) 49:691–700.

Walsh, B., Redd, A. J., Hammer, M. F. Joint match probabilities for Y chromosomal and autosomal markers, *Forensic Science International* (2008) 174:234–238.