Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

Duration of post-coital stability of semenogelin in vaginal canal and sensitivity of the tests between RSID-Semen™ and acid phosphatase test

ระยะเวลาที่ตรวจพบ semenogelin ได้ในช่องคลอดหลังจากมีเพศสัมพันธ์ และการศึกษาเปรียบเทียบความไวของการทดสอบด้วยชุดตรวจ RSID™-Semen กับวิธีการตรวจหาแอสิดฟอสฟาเตส

Jindamanee Saenboonsiri, M.Sc.*, Nitikorn Poriswanish, M.D.*, Orawan Kiriwat, M.D., Visutr Fongsiripaibul, M.D.***

Department of Forensic Medicine and **Department of Obstetrics and Gynaecology , Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

จินดามณี แสนบุญศิริ, วท.ม.†, นิติกร โปริสวาณิชย์, พ.บ.†, อรวรรณ คีรีวัฒน์, พ.บ.††, วิสูตร ฟองศิริไพบูลย์, พ.บ.†

†ภาควิชานิติเวชศาสตร์ และ ††ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ10700, ประเทศไทย.

Abstract

Objective: Microscopic identification of spermatozoa is the most popular and reliable confirming method for detection of semen, but in many of the cases, spermatozoa may not be found. Acid phosphatase (AP) is the most popular presumptive, but the least reliable, test for semen due to its specificity. Nowadays, semenogelin (Sg) becomes more attractive novel confirming marker for its sensitivity and specificity. This study was designed to assess sensitivity from stability of Sg in vaginal canal after sexual intercourse in comparison with AP test.

Materials and Methods: Vaginal swabs from consented female volunteers who reported for a normal sexual intercourse in a total number of 185 were obtained and classified into 5 groups regarding postcoital periods (1, 2, 3, 4 and 5 days), then they were extracted for seminal component to test for AP by using Brentamine reaction, and Sg by using RSID™-Semen test.

Results: The result showed that AP test could identify semen as about 44% within 72 hours of post-coital period where Sg could be detected for 55 % in a longer length of time which was up to 120 hours (5 days). 143 of total 185 vaginal swab specimens (77%) were positive for Sg, but only 47% were positive for AP.

Conclusion: The immunochromatographic test for Sg is commercially available, in our study, RSID™-Semen test was used. This test demonstrated a potential positive result and a convenient way of

identifying semen. This may be a suggestion for forensic laboratories to use a Sg test as an only test for semen identification in the future.

Keywords: Semenogelin, Acid phosphatase, Semen, Forensic, Immunochromatographic test

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การตรวจหาตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ถือว่าเป็นวิธีที่นิยมใช้ยืนยันการตรวจพบตัวน้ำอสุจิมากที่สุด แต่ในบางกรณีอาจจะไม่สามารถตรวจพบได้ จึงมีวิธีที่ใช้ตรวจคัดกรองหาน้ำอสุจิที่นิยมมากที่สุดได้แก่การตรวจหาสาร acid phosphatase (AP) เพราะเชื่อกันว่ามีความไวสูงที่สุด ในปัจจุบันพบว่ามีโปรตีนในน้ำอสุจิที่สำคัญอีกชนิดที่น่าจะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้น้ำอสุจิคือ Semenogelin (Sg) เพราะน่าจะมีทั้งความไวและความจำเพาะดี ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อประเมินไวของการตรวจจากความคงทนของ Sg ในช่องคลอดภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีแอสิดฟอสฟาเตส

วัสดุและวิธีการศึกษา: เก็บรวบรวมตัวอย่างของเหลวจากช่องคลอดของอาสาสมัครสตรีที่มีเพศสัมพันธ์อย่างสมัครใจและเชื่อถือได้จำนวนทั้งสิ้น 185 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มทดสอบตามระยะเวลาหลังมีเพศสัมพันธ์ครั้งล่าสุดได้ 5 กลุ่ม (วันที่ 1-5) แล้วนำมาสกัดตรวจหา APด้วยวิธี Brentamine กับตรวจหา Sg ด้วยชุดตรวจ RSID™-Semen

ผลการศึกษา: พบว่าวิธีแอสิดฟอสฟาเตสสามารถบ่งชี้น้ำอสุจิได้ประมาณร้อยละ 44 หลังจากมีเพศสัมพันธ์มาภายใน 72 ชั่วโมง ในขณะที่การตรวจหา Sg สามารถตรวจพบถึงร้อยละ 55 ได้ยาวนานกว่าถึง 120 ชั่วโมงหรือ 5 วัน นอกจากนี้จากตัวอย่างไม้พันสำลีป้ายของเหลวจากช่องคลอดจำนวน 143 ตัวอย่างจากทั้งหมด 185 ตัวอย่างให้ผลบวกในการตรวจหา Sg คิดเป็นร้อยละ77 เมื่อเทียบกับวิธีแอสิดฟอสฟาเตสซึ่งให้ผลบวกเพียงร้อยละ 47

สรุป: ปัจจุบันได้มีการผลิตชุดตรวจหา Sg เป็นการพาณิชย์อยู่มากมาย โดยใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี (immunochromatography) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ผู้ศึกษาใช้ชุดตรวจชื่อว่า RSID™-Semen และพบว่าเป็นวิธีการตรวจหาน้ำอสุจิที่สะดวกและมีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง ดังนั้นชุดตรวจนี้อาจจะใช้เป็นวิธีการตรวจหาน้ำอสุจิเพียงวิธีเดียวทางห้องปฏิบัติการนิติเวชศาสตร์ในอนาคตได้

คำสำคัญ: เซมิโนเจลิน (Sg), แอสิดฟอสฟาเตส(AP), การตรวจน้ำอสุจิ, นิติเวชศาสตร์

บทนำ

โดยทั่วไปเมื่อมีคดีข่มขืนกระทำชำเราเกิดขึ้น สิ่งสำคัญคือการตรวจหาหลักฐานเพื่อยืนยันการมีเพศสัมพันธ์ระหว่างผู้ต้องสงสัยและผู้เสียหาย ซึ่งการตรวจพบตัวอสุจิในช่องคลอดของผู้เสียหายเป็นสิ่งที่ยืนยันว่ามีการหลั่งน้ำอสุจิจากการร่วมเพศอย่างสำคัญที่สุด[1] แต่ในคนที่ทำหมันหรือไม่มีตัวอสุจิหรือมีปัจจัยรบกวนอื่น อาจจะไม่สามารถตรวจยืนยันการมีเพศสัมพันธ์ด้วยวิธีนี้ได้ ซึ่งพบว่ามีชายเป็นหมันถึง 8% ในประชากรชายทั่วไป[2] ดังนั้นการตรวจหาน้ำอสุจิจากช่องคลอดจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

วิธีการตรวจหา acid phosphatase (AP) ที่เรียกว่า Brentamine เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิ เนื่องจากเป็นโปรตีนที่พบมากในน้ำอสุจิชนิดหนึ่งและก็เชื่อกันว่าวิธีตรวจเช่นนี้นี้มีความไวสูง แต่ก็พบว่ามีผลบวกปลอมได้จากพืชบางชนิดรวมถึง AP จากช่องคลอดด้วย ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นเพียงวิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้น ไม่มีคุณค่าในการใช้ยืนยันลงความเห็นมากนัก[3-5]

วิธีที่ใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันน้ำอสุจิวิธีหนึ่งคือ การตรวจหา prostatic specific antigen (PSA) ซึ่งสร้างจากต่อมลูกหมาก ซึ่งคนที่เป็นหมันก็ยังคงตรวจพบได้ อย่างไรก็ตาม PSA ก็ยังสามารถตรวจพบได้จากสารคัดหลั่งต่างๆจากร่างกายทั้งในชายและหญิง เช่น จากซีรัม ปัสสาวะ น้ำนม รวมถึงจากสารคัดหลั่งจากช่องคลอดสตรีที่ไม่มีเพศสัมพันธ์ เป็นต้น เพียงแต่มีปริมาณน้อยกว่า PSA จากต่อมลูกหมากเท่านั้น การตรวจจึงต้องใช้วิธีการหาปริมาณควบคู่กันด้วย ซึ่งพบว่ายุ่งยาก[4-6] ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาโปรตีนชนิดอื่นที่มีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิมากกว่าและตรวจได้ง่ายกว่า PSA

ในปี ค.ศ.1986 เริ่มมีการค้นพบโปรตีนชนิดอื่นที่จำเพาะต่อน้ำอสุจิ และให้ชื่อว่า Seminal Vesicles Specific Antigen (SVSA) ต่อมาจึงรู้จักกันในชื่อ Semenogelin (Sg) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากถุงอัณฑะ พบว่ามีการสร้างในปริมาณมากกว่า PSA และมีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิของมนุษย์ อีกทั้งยังไม่พบในสารคัดหลั่งอื่นๆ รวมทั้งสารคัดหลั่งจากช่องคลอดด้วย จึงเชื่อว่ามีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิมากกว่า PSA[7] นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการผลิตชุดตรวจที่ง่ายสำหรับการหา Sg ด้วยวิธี immunochromatography ด้วย

นอกจากปัจจัยด้านปริมาณและความจำเพาะที่ทำให้น่าสนใจต่อการใช้แล้ว ปัจจัยสำคัญในการตรวจพบยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่โปรตีนเหล่านี้คงอยู่ได้ หรือสามารถตรวจพบได้ในช่องคลอดภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์ เคยมีการศึกษาหาระยะเวลาที่สามารถตรวจพบ AP และ PSA ในช่องคลอดภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์แล้ว แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาระยะเวลาที่สามารถตรวจพบ Sg ได้ในช่องคลอด[4-8] ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความคงทนของ Sg ในช่องคลอดภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์โดยใช้ชุดทดสอบ RSID™-Semen และเปรียบเทียบสัดส่วนผลบวกกับวิธี Brentamine สำหรับ AP ซึ่งเชื่อกันว่าตรวจได้ไวและมีผลบวกลวงมากที่สุด เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาความเหมาะสมในการนำวิธีการตรวจหา Sg ในน้ำอสุจิมาใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์ในอนาคต

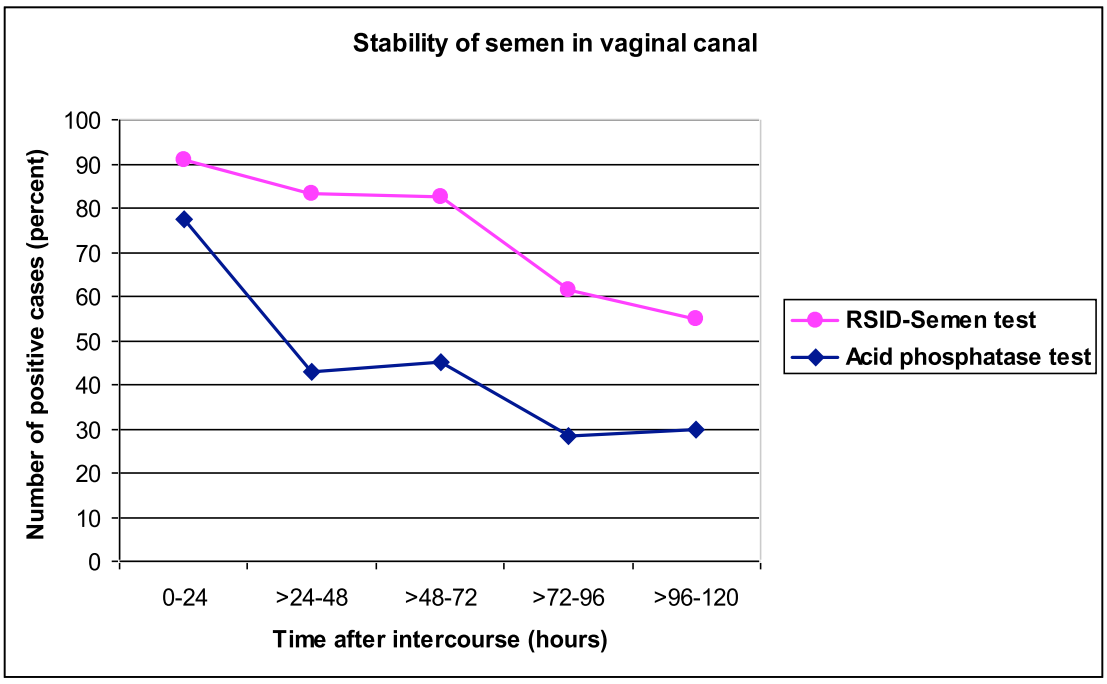
วัสดุและวิธีการศึกษา

กระทำโดยการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากหญิงที่มารับบริการที่หน่วยอนามัยการเจริญพันธุ์และการวางแผนครอบครัว ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลศิริราช เพื่อเข้าร่วมการศึกษา ทำการเก็บข้อมูลเบื้องต้นรวมถึงระยะเวลาการมีเพศสัมพันธ์ครั้งล่าสุดและแบ่งกลุ่มเป็น 5 กลุ่มตามจำนวนวันภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์ คือวันที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างไม้พันสำลีป้ายของเหลวจากช่องคลอด (vaginal swab) ใส่ในหลอดที่มีกระดาษกรองอยู่ภายในเพื่อนำมาตรวจหา AP ด้วยวิธี Brentamine ตามขั้นตอนของ Davies และคณะ 8 แล้วจึงนำไม้พันสำลีนั้นมาสกัดเอาน้ำอสุจิเพื่อตรวจด้วยชุดตรวจ RSID™-Semen ตามขั้นตอนของชุดตรวจที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี McNemar's Chi-square test ซึ่งจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ต่อเมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 185 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์กับผลบวกจากวิธี AP และชุดตรวจ RSID™-Semen พบว่าสามารถตรวจพบ Sg ได้จนถึงวันที่ 5 ภายหลังจากมีเพศสัมพันธ์หรือมากกว่า 96-120 ชั่วโมง ได้ถึงร้อยละ 55 เปรียบเทียบกับ AP ซึ่งตรวจพบเพียงร้อยละ 30 ดังแผนภาพที่ 1



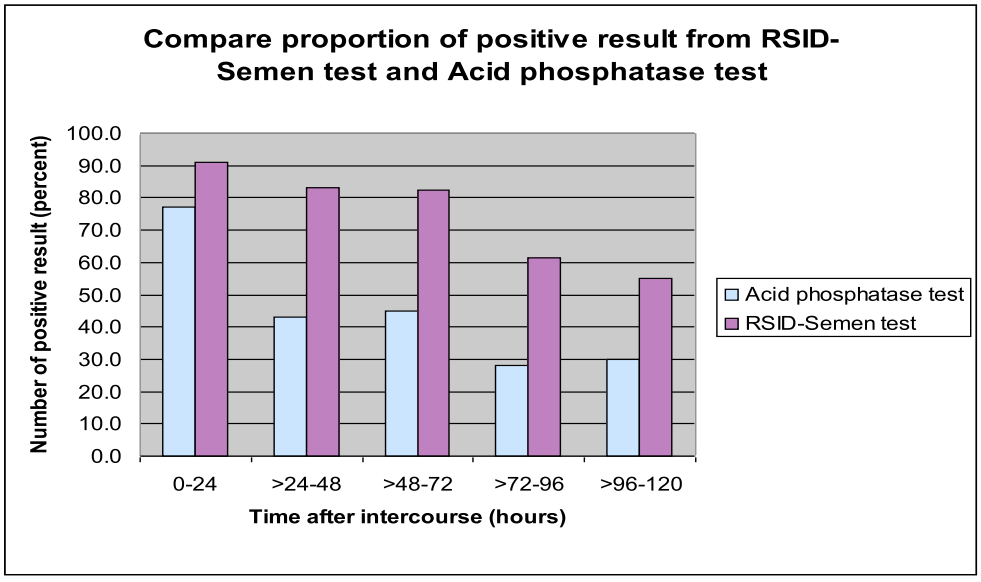
แผนภาพที่ 1. แสดงความคงทนของโปรตีนในน้ำอสุจิเมื่อตรวจด้วยวิธี Acid phosphatase และวิธี RSID™-Semen จากตัวอย่าง vaginal swabs ที่เก็บหลังมีเพศสัมพันธ์ในวันต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนผลบวกของทั้งสองวิธี พบว่า 143 ตัวอย่างจากทั้งหมด 185 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 77 ให้ผลบวกกับวิธี RSID-Semen แต่มีเพียง 87 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี AP ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 47 และพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสัดส่วนผลบวกที่มากที่สุดของทั้งสองวิธี ได้จากตัวอย่างที่มีเพศสัมพันธ์มาแล้ว 1 วันหรือภายในไม่เกิน 24 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 1

Time after intercourse (hours)	Positive result for AP test	Positive result for RSID™-Semen test	Total number of samples	*p-value*
0-24	34 (77.3%)	40 (90.9%)	44	0.070
>24-48	18 (42.9%)	35 (83.3%)	42	0.000
>48-72	18 (45.0%)	33 (82.5%)	40	0.000
>72-96	11 (28.2%)	24 (61.5%)	39	0.004
>96-120	6 (30.0%)	11 (55.0%)	20	0.180
Total	87 (47.0%)	143 (77.3%)	185	0.000

ตารางที่ 1. แสดงสัดส่วนผลบวกจากวิธี acid phosphatase เปรียบเทียบกับวิธี RSIDTM-Semen

จากตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างแต่ละกลุ่ม พบว่าตัวอย่างที่เก็บหลังจากมีเพศสัมพันธ์ภายในไม่เกิน 24 ชั่วโมงให้ผลไม่แตกต่างกันทั้งสองวิธี (p- value > 0.05) แต่พบว่าแตกต่างกันมากขึ้นเมื่อทดสอบกับตัวอย่างที่เก็บหลังจากมีเพศสัมพันธ์มาแล้ว 24-96 ชั่วโมง ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2. กราฟแท่งแสดงสัดส่วนผลบวกจากวิธี acid phosphatase เปรียบเทียบกับวิธี RSID™-Semen

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลที่ได้จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนผลบวกของทั้งสองวิธีในตัวอย่างแต่ละกลุ่ม พบว่าวิธี RSIDTM-Semen ให้ผลบวกมากกว่าในทุกกลุ่ม และเป็นวิธีที่ใช้ได้ดีและไวมากกว่าวิธี Brentamine สำหรับตรวจหา acid phosphatase โดยเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่มีเพศสัมพันธ์มาแล้วมากกว่า 3 วันหรือ 72 ชั่วโมง

สำหรับตัวอย่างที่เก็บหลังจากมีเพศสัมพันธ์มากกว่า 96-120 ชั่วโมงนั้น ก็ยังให้ผลบวกกับวิธี RSIDTM-Semen ถึงร้อยละ 55 แม้ว่าตัวอย่างในกลุ่มนี้มีเพียง 20 ตัวอย่าง หากมีจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ และเก็บตัวอย่างหลังจากมีเพศสัมพันธ์มามากกว่า 120 ชั่วโมงด้วย อาจจะพบข้อเท็จจริงได้มากขึ้น

อย่างไรก็ตาม เราตรวจพบ AP ได้ภายหลัง 72 ชั่วโมง ทั้งๆที่มีความเข้าใจกันว่าน่าจะตรวจพบได้ไม่เกินช่วงเวลาดังกล่าว ทั้งนี้เป็นเพราะเกณฑ์ในการแปลผลเราใช้ตามที่ Davies และคณะ[8] แนะนำไว้ คือให้ถือว่าผลบวกเป็น AP จากน้ำอสุจิก็ต่อเมื่อเกิดสีจากการทดสอบปฏิกริยาในเวลาน้อยกว่า 30 วินาที โดยที่รู้กันจากประสบการณ์ทั่วไปของห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์และนิติวิทยาศาสตร์ทั่วโลกว่า วิธีนี้สามารถตรวจพบการเกิดสีจากปฏิกริยาจากของเหลวในช่องคลอดของหญิงบางคนที่มิได้มีเพศสัมพันธ์มาเป็นเวลานาน ได้ในเวลาที่น้อยกว่า 20 วินาทีด้วยซ้ำ ทั้งนี้สันนิษฐานกันว่าน่าจะมาจาก AP ที่ถูกสร้างขึ้นในช่องคลอดของหญิงบางคนในปริมาณสูง แต่ถึงอย่างนั้น การตรวจหา Sg ก็ยังให้ผลบวกหรือความไวเหนือกว่า AP ตลอดทุกคาบเวลา โดยที่ Sg ไม่มีทางจะเป็นผลบวกลวงได้เลย ย่อมเป็นที่แสดงได้ชัดว่า Sg เป็นสารที่มีคุณค่าในทางวิทยาศาสตร์ควรแก่การนำมาใช้ตรวจทดแทน AP แต่ถึงกระนั้น ข้อดีเพียงประการเดียวของการตรวจ Brentamine ก็คือ ราคาต้นทุนที่ย่อมเยากว่าหลายเท่าตัว

สรุป

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจหา semenogelin ในน้ำอสุจิโดยใช้ชุดตรวจ RSID™-Semen เป็นวิธีการตรวจหาน้ำอสุจิที่สะดวกและมีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง ดังนั้นชุดตรวจนี้น่าจะนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจหาน้ำอสุจิเพียงวิธีเดียวทางห้องปฏิบัติการนิติเวชศาสตร์ในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

1. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rouge D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. J Forensic Sci 2001; 46(2):349-51.
2. Kamenev L, Leclercq M, Francois-Greard Ch. An enzyme immunoassay for prostate-specific p30 antigen detection in the postcoital vaginal tract. Journal of forensic science society 1989; 29:233-41.
3. วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์, วิสูตร ฟองศิริไพบูลย์, อรวรรณ คีรีวัฒน์. ปฏิกิริยาอะศิดฟอสฟาเตสจากก้อนสำลีที่ป้ายจากช่องคลอดภายหลังการร่วมเพศ. สารศิริราช 2526; 35:677-84.
4. Pang B.C.M., Cheung B.K.K. Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. Forensic Science International 2007; 169:27-31.
5. Christine K, Mauck MD. Biomarkers of Semen Exposure. Sexually Transmitted Diseases 2009; 36:s81-3.
6. Sato I, Barni F, Yoshiike M, Rapone C, Berti A, Nakaki S, et al. Applicability of Nanotrap Sg as a semen detection kit before male-specific DNA profiling in sexual assaults. Int J Legal Med 2007; 121:315-9.
7. Sato.I, Kojima.K, Yamasashi.T, Yoshida.K, Yoshida.M, Takano.S, et al. Rapid detection of semenogelin by one-step immunochromatographic assay for semen identification. J Imm Met 2004; 287:137-45.
8. Hobbs MM, Steiner MJ, Rich KD, Gallo MF, Warner L, Macaluso M. Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: a cautionary tale. Contraception 2010; 82:291-5.
9. Davies A, Wilson B. The Persistence of Seminal Constituents in the Human Vagina. Forensic Science 1974; 3:45-55.