

THE COMPARATIVE STUDY OF SPERMATOZOA STAINING METHODS**การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการย้อมสีอสุจิด้วยวิธีต่างๆ**

Nitayaporn Ruangrith B.N.S.*, Visutr Fongsiripaibul M.D.*, Orawan Kiriwat M.D.***, Nitikorn Poriswanish M.D.*

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

นิตยาภรณ์ เรืองฤทธิ์, พย.บ.†, วิสูตร ฟองศิริไพบูลย์, พ.บ.†, อรวรรณ คีรีวัฒน์, พ.บ.††, นิตกร โปริสวานิชย์, พ.บ.†

† ภาควิชานิติเวชศาสตร์ และ †† ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10700, ประเทศไทย.

Abstract

Objective: To compare in the issues of the degree, the sensitivity of sperm detection and the over-all working interval among the three spermatozoa staining methods (Hematoxylin & Eosin, Christmas tree stain and Diff-Quik®).

Materials and Methods: The vaginal swabs from 186 women with consent were divided into 3 groups by post-coital interval; thus, 1, 2 and 3 days. Each swab was extracted, smeared and stained with those 3 methods and then identified spermatozoa by microscopic examination. Numbers of sperms found were recorded.

Results: The study showed that Christmas tree stain was the highest degree of positive sperm cell detection and the most sensitive method to the rest ($p < 0.001$). On the other hand, Diff-Quik® was the least degree of positive sperm cell detection, which might not be appropriate for a routine rape sample. Among 3 staining methods, Hematoxylin & Eosin was the most time consuming but Diff-Quik® method was the most rapid staining procedure.

Conclusion: Christmas tree stain was the best detection method due to its most visible and grading density of sperm following by Hematoxylin & Eosin and Diff-Quik®.

Keywords: Sperm staining, rape, Christmas tree stain, Diff-Quik®

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบ, ความไว และระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสีอสุจิเปรียบเทียบกัน 3 วิธี คือ Hematoxylin & Eosin, Christmas tree และ Diff-Quik® เพื่อหาวิธีการย้อมสีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหาตัวอสุจิสำหรับการตรวจประจำทางนิติเวชศาสตร์

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา: การศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างไม้พ่นสำลีป้ายของเหลวจากช่องคลอดอาสาสมัครจำนวน 186 คน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือวันที่ 1, 2 และ 3 หลังจากมีเพศสัมพันธ์ ในแต่ละตัวอย่างจะถูกสัปดาห์และแบ่งเป็น 3 สไลด์เพื่อย้อมสีทั้ง 3 วิธีและดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลการศึกษา: การย้อมสีอสุจิด้วยวิธี Christmas tree ให้ระดับของผลบวกในการหาตัวอสุจิมากที่สุดเมื่อเทียบกับวิธี Hematoxylin & Eosin และ Diff-Quik[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ส่วนการย้อมสีด้วยวิธี Diff-Quik[®] ให้จำนวนผลบวกในการหาตัวอสุจิได้น้อยที่สุดและไม่เหมาะสมในการตรวจหาตัวอสุจิจากตัวอย่างในช่องคลอด นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี Hematoxylin & Eosin ใช้ระยะเวลาในการย้อมมากกว่าวิธีอื่น ส่วนวิธี Diff-Quik[®] ใช้ระยะเวลาในการย้อมน้อยที่สุด

สรุป: การย้อมสีอสุจิด้วยวิธี Christmas tree มีความไวในการหาตัวอสุจิที่ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มากกว่าวิธี Hematoxylin & Eosin และ Diff-Quik[®]

คำสำคัญ: การย้อมสีอสุจิ, คติทางเพศ

บทนำ

การกระทำความผิดทางเพศที่เกิดขึ้นในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากลักษณะการกระทำความผิดประเภทนี้มักเกิดขึ้นในที่รโหฐาน¹ และไม่มีประจักษ์พยานรู้เห็น^{1,2} ทำให้การจับกุมผู้กระทำความผิดมาลงโทษตามกฎหมายเป็นไปได้ยาก ฉะนั้นหลักฐานสำคัญอย่างหนึ่งของคดีความผิดทางเพศคือการตรวจพบน้ำอสุจิและตัวอสุจิในช่องคลอดของผู้เสียหาย³ แต่ในบางครั้งพบว่าการตรวจหาน้ำอสุจิบางวิธีให้ผลลบได้ง่ายหรือบางครั้งยังให้ผลบวกลวงกับสารเคมี แบบที่เรียกว่าพีชบางชนิด⁴ ดังนั้นการตรวจพบตัวอสุจิในช่องคลอดของผู้เสียหายจึงเป็นสิ่งที่ยืนยันได้ชัดเจนว่ามีการร่วมเพศเกิดขึ้นจริง^{2,3,5,6} ด้วยเหตุนี้ ความจำเป็นที่ต้องทำให้สามารถเห็นและตรวจพบตัวอสุจิได้ชัดเจนมากขึ้นในสิ่งส่งตรวจจากช่องคลอด เราจึงได้มีการย้อมสีเพื่อให้สามารถมองเห็นตัวอสุจิเพื่อให้แยกแยะออกจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆในช่องคลอดได้ง่ายขึ้น แต่มีสีย้อมอยู่หลายวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยที่ยังไม่มีผู้ศึกษาเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียอย่างรอบด้าน ทำให้ไม่มีมาตรฐานของการตรวจพิสูจน์ที่เป็นแนวทางเดียวกัน ผู้ศึกษาจึงทำการเปรียบเทียบวิธีการย้อมสีเพื่อหาวิธีการเหมาะสมที่สุดในการตรวจหาตัวอสุจิในงานประจำวันทางนิติวิทยาศาสตร์ จะได้เป็นหลักฐานสำหรับการอ้างอิงต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างและการเตรียมก่อนการย้อมสี

เก็บตัวอย่างไม้พ่นสำลีป้ายของเหลวจากช่องคลอดอาสาสมัครจำนวน 186 คนจากหญิงที่มาใช้บริการที่หน่วยวิจัยการเจริญพันธุ์และวางแผนครอบครัว ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลศิริราช โดยเลือกเก็บเป็นกลุ่มๆตามระยะเวลาหลังจากมีเพศสัมพันธ์ครั้งล่าสุดคือวันที่ 1 (0-24 ชั่วโมง), 2 (>24-48 ชั่วโมง) และ 3 (>48-72 ชั่วโมง) ได้จำนวนกลุ่มละ 62 ตัวอย่าง จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างอันมาทำการสัปดาห์ในสารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) แล้วนำตะกอนที่ได้มาป้ายแยกลงบนสไลด์ 3 แผ่นแล้วย้อมสีทั้ง 3 ชนิดในแต่ละแผ่น

การย้อมสี

Hematoxylin & Eosin 1

- นำสไลด์ที่ป้ายตะกอนแล้วแช่ลงใน absolute alcohol , 95% alcohol , 80% alcohol , 70% alcohol ตามลำดับ นานอย่างละ 5 นาที
- ย้อมลงในสี Harris's hematoxylin7 นาน 5 นาที
- นำสไลด์ล้างในน้ำสะอาดประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นล้างในน้ำกลั่นอีกครั้ง
- แช่ใน 1% acid alcohol (HCl) เพื่อเป็นการชะล้างสีส่วนเกินออก โดยจุ่มแล้วยกขึ้น
- ล้างในน้ำสะอาดจนออกเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นล้างในน้ำกลั่นอีกครั้ง
- ย้อมลงในสี eosin นาน 1 นาทีครึ่ง
- นำสไลด์ล้างในน้ำสะอาดอีกประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นล้างในน้ำกลั่นอีกครั้ง
- แช่สไลด์ลงใน 70% alcohol, 80% alcohol, 95% alcohol, absolute alcohol ตามลำดับ นานอย่างละ 5 นาที เพื่อ dehydration
- จุ่มสไลด์ลงใน xylene 3 ครั้งเพื่อให้ใส
- ทึบสไลด์ให้แห้ง ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้น้ำยา permount แล้วทึบไว้ให้แห้ง จากนั้นดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

Christmas tree stain 8, 9

- นำสไลด์ที่ป้ายแล้วแช่ลงใน 95 % alcohol นาน 15-30 นาที
- ย้อมในสี nuclear fast red นาน 15 นาที
- ล้างในน้ำสะอาดเบาๆ
- ย้อมในสี indigocarmin นาน 10 วินาที
- ล้างสีส่วนเกินออกใน 95 % alcohol นาน 5 นาที
- จุ่มสไลด์ลงใน xylene 3 ครั้งเพื่อให้ใส
- ทึบสไลด์ให้แห้ง ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้น้ำยา permount ทึบไว้ให้แห้ง จากนั้นดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

Diff-Quik® 10

- นำสไลด์ที่สเมียร์แล้วแช่ลงใน methanol นาน 15 วินาที
- ย้อมในสี eosin นาน 20 วินาที
- ย้อมในสี methylene blue นาน 30 วินาที
- ล้างสไลด์ที่ย้อมแล้วในน้ำก๊อกเพื่อล้างสีส่วนเกินออก

5. ทิ้งสไลด์ให้แห้ง จากนั้นปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้น้ำยา permount ทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะการติดสีของตัวอสุจิ

Hematoxylin & Eosin¹¹ : ส่วนของ acrosome จะติดสีฟ้าอ่อน และส่วน post acrosome จะติดสีฟ้าเข้มหรือสีม่วง บริเวณหางจะติดสีแดง

Christmas tree⁹ : ส่วนของ acrosome จะติดสีชมพูอ่อน และส่วน post acrosome จะติดสีแดงเข้ม บริเวณหางจะติดสีเขียว

Diff-Quik^{®10} : ส่วนของ acrosome จะติดสีฟ้าอ่อนหรือม่วงอ่อน และส่วน post acrosome จะติดสีม่วงเข้ม บริเวณหางจะติดสีแดงหรือสีฟ้า

การบันทึกผล

การศึกษานี้ได้ทำการบันทึกผล 2 แบบ คือ

1.การบันทึกผลเป็นผลบวกคือ ตรวจพบตัวอสุจิ และผลลบคือตรวจไม่พบตัวอสุจิ โดยมีเกณฑ์การให้ผลบวกดังนี้¹¹

1.1.พบตัวอสุจิที่สมบูรณ์ คือมีทั้งส่วนหัวและหาง อย่างน้อย 1 ตัวขึ้นไป

1.2.ถ้าพบเฉพาะส่วนหัว ต้องมีอย่างน้อย 2 หัวขึ้นไป

2.การบันทึกผลเป็นระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิที่ตรวจพบเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (grading of sperm cell detection) โดยใช้ six-point scale ของ Kind¹² ในปี ค.ศ. 1964

- 0 : ตรวจไม่พบตัวอสุจิ
- +FEW : ตรวจพบตัวอสุจิน้อยกว่า 20 ตัวเมื่อดูครบทุก field ในสไลด์
- 1+ : ตรวจพบตัวอสุจิมากกว่า 20 ตัวกระจายอยู่ทั่วไปทั้งสไลด์
- 2+ : ตรวจพบตัวอสุจิ 1 ตัวหรือมากกว่าในบาง field รวมกันเกิน 20 ตัวโดยไม่จำเป็นต้องหาทั้งสไลด์
- 3+ : ตรวจพบตัวอสุจิ 1 ตัวหรือมากกว่าในหลายๆ field ของสไลด์
- 4+ : ตรวจพบตัวอสุจิ 1 ตัวหรือมากกว่าเป็นส่วนใหญ่หรือเกือบทุก field ในสไลด์

ผลการศึกษา

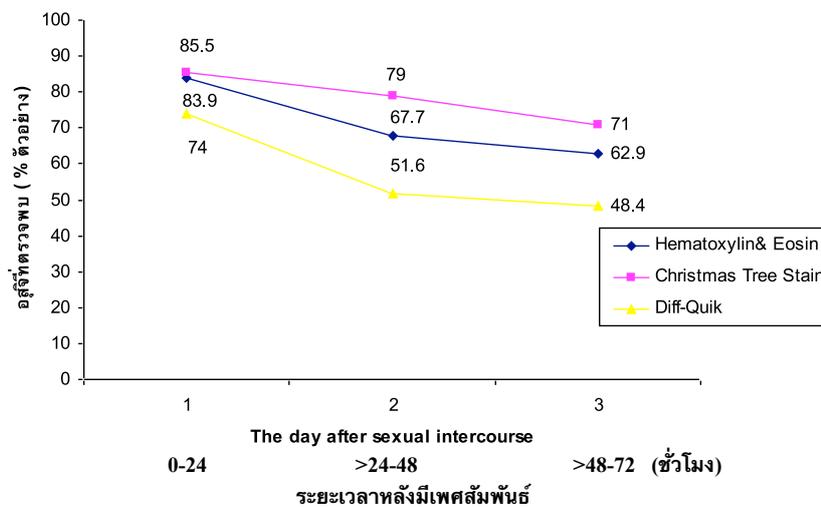
ระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบจากการย้อมสีแต่ละวิธี

ระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบในการย้อมสีแต่ละวิธีแตกต่างกันไปในแต่ละสีย้อม

(ตารางที่ 1) โดยสี Christmas tree มีระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบมากกว่าวิธีอื่นๆ (78.5 %) สี Diff-Quik[®] มีระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบน้อยกว่าวิธีอื่นๆ (58.1%) จากแผนภาพที่ 1 พบว่าระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบมีค่าลดลงเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาหลังจากมีเพศสัมพันธ์ (0-72 ชั่วโมง) เพิ่มขึ้นในทุกวิธีย้อม

วิธีการย้อม	ระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบ n (%)			
	0-24 ชั่วโมง	> 24-48 ชั่วโมง	> 48-72 ชั่วโมง	รวม
	(n=62)	(n=62)	(n=62)	(n=186)
Hematoxylin &Eosin	52 (83.9%)	42 (67.7%)	39 (62.9%)	133 (71.5%)
Christmas Tree Stain	53 (85.5%)	49 (79.0%)	44 (71.0%)	146 (78.5%)
Diff-Quik®	46 (74.0%)	32 (51.6%)	30 (48.4%)	108 (58.1%)

ตารางที่ 1 ระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบในวิธีการย้อมสี Hematoxylin&Eosin , Christmas tree และ Diff-Quik® ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากมีเพศสัมพันธ์



แผนภาพที่ 1 ระดับของผลบวกตัวอสุจิที่ตรวจพบในวิธีการย้อมสี Hematoxylin&Eosin, Christmas tree และ Diff-Quik® ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากมีเพศสัมพันธ์

ความไวในการตรวจพบตัวอสุจิและค่า Likelihood Ratio เปรียบเทียบระหว่างร้อยละของผลบวกและร้อยละของผลลบตัวอสุจิที่ตรวจพบของวิธี Christmas Tree Stain และ Diff-Quik เทียบกับ วิธี Hematoxylin & Eosin

ความไวในการตรวจพบตัวอสุจิด้วยวิธี Christmas tree มีค่ามากกว่าวิธี Diff-Quik® (99.2 และ 79.7 % ตามลำดับ) ส่วนค่า likelihood ratio เปรียบเทียบระหว่างร้อยละของผลบวกและร้อยละของผลลบตัวอสุจิที่ตรวจพบ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า วิธี Christmas tree มีค่ามากที่สุด (3.65) รองลงมาคือ วิธี Hematoxylin&Eosin และวิธี Diff-Quik® (2.51 และ 1.39 ตามลำดับ)

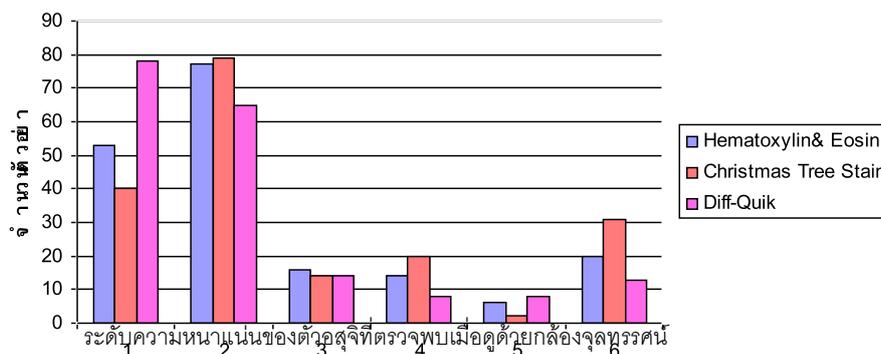
เวลา* (ชั่วโมง)	ความไว** (%)			Likelihood Ratio(LR)			Diff-Quik® เปรียบเทียบกับ H&E
	Christmas tree	Diff-Quik®	H&E	Christmas tree	Diff-Quik®	Christmas Tree Stain เปรียบเทียบกับ H&E	
0-24	100	88.5	5.20	5.89	2.87	1.13	0.55
>24-48	100	73.8	2.10	3.77	1.07	1.80	0.51
>48-72	97.4	74.4	1.70	2.44	0.94	1.44	0.55
เฉลี่ยรวม72 ชั่วโมง	99.2	79.7	2.51	3.65	1.39	1.45	0.55

ตารางที่ 2 ความไวในการตรวจพบตัวอสุจิและค่า likelihood ratio เปรียบเทียบระหว่างร้อยละของผลบวก และร้อยละของผลลบตัวอสุจิที่ตรวจพบของวิธี Christmas tree และ Diff-Quik® เทียบกับวิธี Hematoxylin&Eosin (H&E)

* เวลาหลังจากมีเพศสัมพันธ์; ** เทียบกับวิธี Hematoxylin&Eosin

ระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิที่ตรวจพบเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Grading of sperm cell detection) ในวิธีการย้อมสี Hematoxylin&Eosin , Christmas tree และ Diff-Quik® ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากมีเพศสัมพันธ์

เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าวิธี Christmas tree มีระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิที่ตรวจพบเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์มากที่สุดและเมื่อนำมาคำนวณทางสถิติด้วย Chi-square test เทียบกับระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิของวิธี Hematoxylin&Eosin พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และวิธี Diff-Quik® มีระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิน้อยกว่าการย้อมสีด้วยวิธีอื่นๆ เมื่อนำมาคำนวณทางสถิติด้วย Chi-square test เปรียบเทียบกับระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิของวิธี Hematoxylin&Eosin พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เช่นเดียวกัน



แผนภาพที่ 2 ระดับความหนาแน่นของตัวอสุจิที่ตรวจพบเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในวิธีการย้อมสี Hematoxylin&Eosin , Christmas tree และ Diff-Quik® ภายใน 72 ชั่วโมงหลังจากมีเพศสัมพันธ์

ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสี

เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสีทั้ง 3 วิธี พบว่า วิธี Hematoxylin&Eosin มีขั้นตอนและใช้ระยะเวลาในการย้อมมากที่สุดคือ ประมาณ 47.35 นาที รองลงมาคือ วิธี Christmas tree ใช้เวลาย้อมประมาณ 36.10

นาที่ ส่วนวิธี Diff-Quik® เป็นวิธีการย้อมที่รวดเร็วและมีขั้นตอนและใช้ระยะเวลาในการย้อมน้อยที่สุดคือประมาณ 1.05 นาที

อภิปรายผลการศึกษา

ระดับของผลบวกตัวของสัณฐานที่ตรวจพบในการย้อมสีแต่ละวิธีแตกต่างกันไปในแต่ละสีย้อม โดยสี Christmas tree มีระดับของผลบวกตัวของสัณฐานที่ตรวจพบมากกว่าวิธีอื่นๆ (78.5 %) ส่วนสี Diff-Quik® มีระดับของผลบวกตัวของสัณฐานที่ตรวจพบน้อยกว่าวิธีอื่นๆ (58.1%) โดยผลบวกที่ได้จากการศึกษานี้ในทุกวิธีถือว่าไม่มีผลบวกหลงเนื่องจากการตรวจพบตัวของสัณฐานเป็นวิธีการตรวจยืนยันโดยสภาพอยู่แล้วหากพบลักษณะของเซลล์ตามเกณฑ์กล่าวมาแล้ว ดังนั้นความจำเพาะในการตรวจหาตัวของสัณฐานโดยใช้กล้องจุลทรรศน์จึงมีค่า 100% เสมอ

สำหรับความไวในการตรวจพบตัวของสัณฐานด้วยวิธี Christmas tree พบว่ามีค่ามากกว่าวิธี Diff-Quik® (99.2 และ 79.7 % ตามลำดับ) โดยที่ผลการศึกษาข้างต้นจะพบว่าระดับของผลบวกของวิธี Christmas tree และ Hematoxylin&Eosin มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ Christmas tree มีระดับของผลบวกมากกว่าวิธี Hematoxylin & Eosin เล็กน้อย (71.5 และ 78.5 % ตามลำดับ) และเมื่อพิจารณาค่า likelihood ratio ที่เปรียบเทียบกันระหว่างร้อยละของผลบวกและร้อยละของผลลบที่ตรวจพบตัวของสัณฐานแล้วพบว่า วิธี Christmas tree มีค่ามากที่สุด (3.65) รองลงมาคือ วิธี Hematoxylin&Eosin และวิธี Diff-Quik® (2.51และ 1.39 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า เมื่อย้อมสีสัณฐานด้วยวิธี Christmas tree จะมีโอกาสตรวจพบตัวของสัณฐานได้มากกว่าวิธีย้อมอื่นๆ ทั้งนี้ น่าจะมาจากข้อได้เปรียบของการย้อมสีด้วยวิธี Christmas tree คือดูได้ง่าย และสามารถแยกออกจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่อยู่ในช่องคลอด เช่น ไข่สด เม็ดเลือดขาว หรือเซลล์เยื่อช่องคลอดได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าวิธี Hematoxylin&Eosin จะใช้ย้อมสีสัณฐานอย่างแพร่หลายในงานประจำวัน แต่บางครั้งก็แยกจากสิ่งแปลกปลอมเช่น ไข่สด ได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีเป็นจำนวนมาก ทำให้บางครั้งไม่สามารถมองเห็นตัวของสัณฐานได้หากตัวของสัณฐานมีน้อย เช่น เมื่อระยะเวลาหลังการร่วมเพศเพิ่มขึ้น ส่วนวิธีการย้อม Diff-Quik® จะเป็นวิธีการย้อมที่รวดเร็ว ใช้อุปกรณ์น้อย แต่จะติดสีสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย ได้อย่างชัดเจนทำให้การตรวจพบตัวของสัณฐานเป็นไปได้ยาก ดังนั้น วิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมในการตรวจหาตัวของสัณฐานจากตัวอย่างที่มาจากช่องคลอด

สรุป

จากการศึกษานี้ สรุปได้ว่าการย้อมสีสัณฐานด้วยวิธี Christmas tree ให้ระดับของผลบวกในการหาตัวของสัณฐานมากกว่าวิธี Hematoxylin&Eosin และDiff-Quik® ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาตัวของสัณฐานในห้องปฏิบัติการนิติเวชศาสตร์มากกว่าวิธีอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

1. วิสูตร ฟองศิริไพบุณย์, สุภิญญา นุญลกิจ. การเปรียบเทียบ 3 วิธีที่ใช้สกัดตัวของสัณฐานออกจากวัสดุที่ติดซับของเหลวจากช่องคลอดหญิงที่ถูกข่มขืนกระทำชำเรา . การประชุมพื้นฟูวิชาการประจำปี ครั้งที่ 34 คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์; 2537. หน้า 349-55.

2. Allery J, Telmon N, Miousset R, Blanc A, Rouge D. Cytological detection of spermatozoa : Comparison of three staining methods. J Forensic Sci, 2001;46 (2):349-51.
3. วิสูตร พงศ์ศิริไพบูลย์. การตรวจพบตัวอสุจิในช่องคลอดของหญิงที่ผ่านการร่วมประเวณีมา.วารสารนิติวิทยาศาสตร์, 2538;24:13-20.
4. วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์, วิสูตร พงศ์ศิริไพบูลย์. ปฏิกริยาแอซิดฟอสฟาเทสจากก้อนสำลีที่ป้ายจากช่องคลอดภายหลังร่วมเพศ. สารคดีราช 2526 กรกฎาคม;35:677-84.
5. วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์, สุมาลย์ เวชพันธุ์, วิไลรัตน์ เตียงทิพย์. การตรวจหาตัวอสุจิจากคราบที่ก้อนสำลีโดยใช้น้ำละลายผงซักฟอก. สารคดีราช, 2534;43:295-8.
6. วิฑูรย์ อึ้งประพันธ์, สุภิญญา นกุลกิจ. เทคนิคการตรวจหาตัวอสุจิจากคราบอสุจิโดยใช้เทปกาวยใสเพื่อให้ได้ผลเร็ว. สารคดีราช, 2531;40:587-90.
7. Preece A. A Manual for Histologic Technicians.1sted. London: J&A Churchill Ltd.,1959: p.94-109.
8. Campbell RJ, Department of Forensic Science. Forensic Biology Section: The Virginia Department of Forensic Science, 2005.
9. Oppitz E. Eine neue farbemethode zum nachweis der spermein beisittlichkeitsdelikten. Arch Kriminol, 1969;144:145-8.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge university Press,1999.
11. วิสูตร พงศ์ศิริไพบูลย์ . เอกสารประกอบการเรียน วิชา Laboratory technique (SIFO511): Biological evidences in sexual offence (Examination of semen): ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, 2553.หน้า 44-9.
12. James SH, Nordby JJ. Forensic science: An introduction to scientific and investigative techniques. CRC Press, 2005: p.261-8.