

บทปริทัศน์

การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิทางนิติเวชศาสตร์

ปภาณ สุทธิประสิทธิ์

บทคัดย่อ

การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิมีความสำคัญเป็นส่วนในการพิจารณาคดี (ข่มขืน) กระทำชำเราโดยชาย ในปัจจุบันการยืนยันน้ำอสุจิมีเพียงการพบตัวอสุจิเท่านั้น การตรวจเบื้องต้นในประเทศไทยคือ การตรวจหาสารสังกะสี เอ็นไซม์แอสิดฟอสฟาเทส สาร prostate specific antigen และสาร semenogelin โดยปัจจุบันสาร semenogelin มีความน่าเชื่อถือสูงที่สุดในการตรวจเบื้องต้น การตรวจพบ Y chromosome ไม่สามารถยืนยันน้ำอสุจิได้แต่สามารถระบุบุคคลได้ การใช้คลื่นแสงเฉพาะในการตรวจที่เกิดเหตุถือเป็นการตรวจเบื้องต้นเท่านั้น การตรวจที่น่าสนใจและอาจจะเป็นการตรวจยืนยันน้ำอสุจิได้ในอนาคตคือ การตรวจทางรามาน และการตรวจหา RNA ซึ่งมุ่งเน้นไปที่ miRNAs ซึ่งในอนาคตการตรวจยืนยันมาตรฐานอาจจะเป็นการตรวจร่วมระหว่างการหา miRNAs และ Y chromosome อย่างไรก็ตามการที่ตรวจไม่พบตัวอสุจิหรือส่วนประกอบของน้ำอสุจิ ตลอดจนการตรวจรูปแบบแห่งอนาคตไม่พบไม่ได้หมายความว่าไม่มีน้ำอสุจิ เนื่องจากทุกการทดสอบมีข้อจำกัดในตัวการทดสอบเอง

คำสำคัญ: การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิ, Zinc, Acid phosphatase, PSA, Semenogelin, Sperm

วันที่รับบทความ: ๒๙ สิงหาคม ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๗ กรกฎาคม ๒๕๖๑

บทนำ

เนื่องจากเกณฑ์ความรู้ความสามารถในการประเมินเพื่อรับใบอนุญาตเป็นผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม พ.ศ. ๒๕๕๕ ได้ระบุไว้ใน “ส่วนที่ ข. ความรู้ความสามารถทางวิชาชีพ และทักษะทางคลินิก ข้อ ๒.๑.๓๓ การล่วงละเมิด การล่วงละเมิดทางเพศ และการทารุณกรรม ข้อ ๒.๒.๓๔ Rape และ ข้อ ๒.๑๘.๑ maltreatment syndrome (e.g., child abuse, sexual abuse, battered child) ส่วนที่ จ. กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการประกอบวิชาชีพเวชกรรม ข้อ ๓.๑๖ ความผิดเกี่ยวกับเพศ (มาตรา ๒๗๖ - ๒๘๑)”^๑ แพทย์จึงถูกกำหนดให้ต้องสามารถปฏิบัติหน้าที่ตรวจผู้ป่วยถูกล่วงละเมิดทางเพศรวมถึงให้ความเห็นทางคดีได้

การ (ชมชื่น) กระทำชำเรา สามารถเป็นความผิดตามประมวลกฎหมายอาญา มาตรา ๒๗๖ และ ๒๗๗ และการกระทำชำเรานั้น กฎหมายได้ให้นิยามไว้ชัดเจน ตามประมวลกฎหมายอาญา มาตรา ๒๗๖ และ ๒๗๗ วรรคที่ ๒ โดยกฎหมายได้บัญญัติไว้ว่า “การกระทำชำเราตามวรรคหนึ่ง หมายความว่า การกระทำเพื่อสนองความใคร่ของผู้กระทำโดยการใช้อวัยวะเพศของผู้กระทำกระทำการกับอวัยวะเพศ ทวารหนัก หรือช่องปากของผู้อื่น หรือการใช้สิ่งอื่นใดกระทำการกับอวัยวะเพศหรือทวารหนักของผู้อื่น”^๒ การพิสูจน์ที่สำคัญ คือ การพิสูจน์ว่ามีการล่วงล้ำเข้าไปใน อวัยวะเพศ ทวารหนัก (และช่องปาก) หรือไม่ สามารถพิสูจน์โดยใช้การตรวจร่างกายและการตรวจพิสูจน์วัตถุพยานที่เก็บได้จากภายในอวัยวะดังกล่าว การตรวจพิสูจน์วัตถุพยาน โดยเฉพาะการพบเซลล์จากร่างกายผู้กระทำความช่วยในการพิสูจน์ ยืนยันตัวบุคคลและหากตรวจพบน้ำอสุจิย่อมมีส่วนช่วยในประเด็นเพื่อการสนองความใคร่ได้ในระดับหนึ่งอีกด้วย

การยืนยันตรวจพบน้ำอสุจิจากในช่องทวารของร่างกายสามารถช่วยบ่งบอกถึงการล่วงล้ำ และ/หรือ อาจสามารถบอกการสนองความใคร่ได้ ผลการตรวจพบทางห้องปฏิบัติการที่จะใช้ยืนยันในชั้นศาลนั้นต้องมีความน่าเชื่อถือ กระบวนการจัดการสิ่งส่งตรวจ ตั้งแต่การเก็บสิ่งส่งตรวจที่เก็บโดยผู้มีอำนาจหน้าที่ กระบวนการครอบครองสิ่งส่งตรวจ ต้องสามารถตรวจสอบย้อนหลังได้ (chain of custody)

การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิมีการทดสอบพิสูจน์ใน ๒ รูปแบบ

๑. การตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการ
๒. การตรวจ ณ ที่เกิดเหตุ

๑. การตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากน้ำอสุจิ มีส่วนประกอบ คือ ตัวอสุจิ (sperm) และส่วนประกอบของน้ำอสุจิ (seminal fluid) การตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการจึงมี ๒ รูปแบบ คือ ๑. การตรวจทางเคมีและการตรวจทางอิมมูโนวิทยา ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อหาส่วนประกอบของน้ำอสุจิและถือเป็นการตรวจเบื้องต้น (presumptive test or preliminary screening test) และ ๒. การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาตัวอสุจิ ซึ่งถือเป็นการตรวจยืนยัน (confirmatory test) นอกจากนี้ยังอาจมีการตรวจในรูปแบบอื่นซึ่งไม่ถือเป็นการตรวจประจำพื้นฐานของห้องปฏิบัติการในประเทศไทย

๑.๑ การตรวจทางเคมีและการตรวจทางอิมมูโนวิทยา

ในปัจจุบันนี้ในประเทศไทย การตรวจที่นิยมในประเทศไทยมีดังนี้

๑.๑.๑ การตรวจหาสารสังกะสี (Zinc)

วิธีการตรวจหาสารสังกะสี

ในปี ค.ศ. 1983 Suzuki และคณะ^๓ รายงานว่าพบสารสังกะสีมากในน้ำอสุจิและ Suzuki แนะนำว่าการตรวจสารสังกะสีมีประโยชน์ในการช่วยบ่งบอกถึงน้ำอสุจิในคดีข่มขืนกระทำชำเรา การตรวจหาสารสังกะสีโดยวิธีของ Suzuki ทำดังนี้: ทำการผสม 10 mg ของ PAN (1-(2-pyridylazo)-2-naphthol) reagent ใน 2 ml ของ triton X - 100 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปผสมใน 98 ml ของ 0.5 M Tris solution (0.5 M Tris solution นั้นได้มาจากการผสม 6.057 gm tris (hydroxymethyl) amion-methane ใน 100 ml ของ distilled water) แล้วใช้ทดสอบสิ่งส่งตรวจโดยเกณฑ์การตรวจพบคือ การเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีแดงดอกกุหลาบ แต่ปัญหาของน้ำยานี้คือ ความเสถียรที่มีอยู่น้อย เนื่องจากความไวในการตรวจจะลดลงมากหากผสมน้ำยาทิ้งไว้เกิน ๓ วัน^๔ ในปี ค.ศ. 1992 Hooft และคณะ^๕ ได้พัฒนาการตรวจโดยประยุกต์สูตรของ Suzuki ดังนี้: ทำการผสม 10 mg ของ PAN (1-(2-pyridylazo)-2-naphthol) reagent ใน 2 ml ของ triton X-100 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๓๐ นาที จึงนำสารละลายผสมกับ 1.3 ml dimethyl-sulfoxide analytical grade แล้วละลายทั้งหมดใน 98 ml 0.5 M Tris buffer (ซึ่ง 0.5 M Tris buffer ได้จากการผสม 6.057 g tris (hydroxymethyl) aminomethane ใน 100 ml distilled water) Hooft ได้กล่าวอ้างว่าน้ำยาที่ได้มีความ

เสถียรและมีความไวมากกว่าน้ำยาของ Suzuki โดยสามารถอยู่ในที่ที่บดแสงได้นานถึง ๓ เดือนโดยความไวในการตรวจไม่ลดลง อีกทั้งสามารถตรวจพบได้ในน้ำอสุจิที่เจือจางถึง ๑:๑๒๘ ขณะที่น้ำยาของ Suzuki ความไวในการตรวจลดลงเมื่อเจือจางน้ำอสุจิที่ระดับ ๑:๖๔

Hooft ยังได้พัฒนา แผ่นตรวจสำเร็จรูป โดยใช้แผ่นกระดาษกรองที่ชุ่มน้ำยาและทิ้งให้แห้ง การทดสอบสามารถทำได้โดยใช้ physiologic normal saline หยดบนวัตถุพยาน แล้วนำแผ่นตรวจสำเร็จรูปไปวางบนวัตถุพยานสังเกตการเปลี่ยนสี โดยเกณฑ์การตรวจพบ คือสีของแผ่นสำเร็จรูปจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วงแดงเข้ม^๔

ข้อจำกัด ในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วยสารสังกะสี

ในปี ค.ศ. 1994 Hooft และคณะ^๕ รายงานการปนเปื้อนของสารสังกะสีและสารแอซิดฟอสฟาเทสในสารคัดหลั่งอื่นนอกจากที่พบในน้ำอสุจิและในสิ่งแวดล้อม โดยส่วนของสารสังกะสีมีดังนี้

๑. สารคัดหลั่งหรือของเสียของมนุษย์: ๑) เลือดของมนุษย์ทั้งหมด พลาสมาและซีรัม ๒) อุจจาระที่ปนเปื้อนเลือด ๓) ปัสสาวะที่มีการติดเชื้อ* ๔) เลือดประจำเดือน

๒. ผักและผลไม้: ๑) กระเทียม* ๒) ผักโขม

๓. ปลาและสัตว์น้ำที่มีเปลือก: ๑) ปลาไหล* ๒) หอยนางรม* ๓) กุ้ง* ๔) ปลาลิ้นหมา*

๔. เนื้อสัตว์ดิบ: ๑) เนื้อวัว ๒) ไก่* ๓) เนื้อหมู ๔) เนื้อแกะ

๕. ผลิตภัณฑ์อาหาร: ๑) นำนมวัว* ๒) ไขมัน, ไข (มัสตาร์ด)*

๖. เครื่องดื่ม: ๑) สุรา/เหล้ากลั่น (เหล้ารัม)* ๒) เครื่องดื่มไม่มีแอลกอฮอล์ (น้ำแร่)*

๗. น้ำ: ๑) ลำห้วย (ปนเปื้อนมลภาวะ)* ๒) แม่น้ำ (ไม่ปนเปื้อนมลภาวะ)* ๓) แม่น้ำ (ปนเปื้อนมลภาวะ) ๔) น้ำฝน (จากแหล่งกักเก็บส่วนตัว)* ๕) น้ำปะปา (ผ่านการบำบัดแล้ว และ ยังไม่ผ่านการบำบัด)* ๖) บ่อน้ำส่วนตัว (เพื่อการอุตสาหกรรม, เพื่อใช้ส่วนตัว, บ่อน้ำร้อน)* ๗) สระว่ายน้ำ (สาธารณะ)

* = ไม่พบผลบวกลงในการทดสอบ acid phosphatase

ด้านความไวและความจำเพาะของการตรวจจากการศึกษาของ Allery และคณะ^๖ ซึ่งทำในหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์ พบว่า กรณีตรวจใน ๔๘ ชั่วโมง พบ ความไว ร้อยละ ๘๘

ความจำเพาะ ร้อยละ ๕๔ positive predictive value ร้อยละ ๔๙ negative predictive value ร้อยละ ๘๔ Allery สรุปว่าสารสังกะสีไม่เหมาะที่จะเป็นการตรวจเบื้องต้นของน้ำอสุจิเนื่องจากมี negative predictive value ที่ต่ำ ส่วนการศึกษาของ Suttiposit^๗ ซึ่งศึกษาวัตถุพยานจากหญิงซึ่งถูกข่มขืนกระทำชำเรา พบความไว ร้อยละ ๒๑ โดย ๒ การศึกษา ต่างจากงานของ Hooft และคณะ^๕ ซึ่งรายงานค่า positive predictive value ร้อยละ ๘๗ negative predictive value ร้อยละ ๙๘ แต่เนื่องจาก Hooft และคณะได้พัฒนาแผ่นตรวจสารสังกะสีสำเร็จรูป^๔ ดังนั้นการศึกษาที่เกิดขึ้นภายหลังอาจมีความน่าเชื่อถือได้

ความน่าเชื่อถือและการยอมรับในปัจจุบัน

ในรอบ ๑๐ ปีที่ผ่านมา การศึกษาเรื่องเกี่ยวกับสารสังกะสี ในแง่การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิไม่พบในฐานข้อมูลวารสารที่ได้รับการยอมรับระดับสากล เช่น pubmed และ scopus อีกทั้งความน่าเชื่อถือในการยืนยันน้ำอสุจิของสารสังกะสี มีน้อยมากเพราะพบในสิ่งแวดล้อมได้มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำต่างๆ ดังการศึกษาของ Hooft และคณะ^๕

๑.๑.๒ การทดสอบหาเอ็นไซม์แอซิดฟอสฟาเทส (enzyme acid phosphatase)

วิธีการตรวจหา enzyme acid phosphatase

ในปี ค.ศ. 1947 Lundquist^๘ ได้รายงานวิธี enzyme acid phosphatase มีมากในน้ำอสุจิและมีการนำมาใช้เพื่อพิสูจน์น้ำอสุจิในปี ค.ศ. 1947 โดย Kaye^๙ น้ำยาที่ใช้ตรวจหา enzyme acid phosphatase นั้น มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ ทำการเตรียม Solution A : Brentamine Fast Blue B 1 gm ผสมกับ sodium acetate (hydrated) 20 g ผสมกับ glacial acetic acid 10 ml รวมกันใน distilled water 100 ml. และเตรียม solution B : sodium naphthyl phosphate 0.8 g ใน distilled water 10 ml.^{๑๐} โดย working solution ทั้งสองนั้นจะต้องผสมใหม่ทุกวัน เมื่อจะทำการทดสอบให้ ผสม solution A 10 ml และ solution B 1 ml ใน distilled water 89 ml การศึกษาของ Davis และคณะ^{๑๑} ใช้วิธีการ indirect โดยใช้กระดาษกรองรองวัตถุพยานที่ชุ่มแล้วจึงนำ กระดาษกรองมาพันละอองน้ำยาทดสอบแล้วจึงสังเกตการเปลี่ยนสี โดยจะเปลี่ยนสีน้ำยาให้เป็นสีออกม่วง การทดสอบหา enzyme acid phosphatase มีการใช้แผ่นทดสอบสำเร็จรูปด้วยดังเช่นระบุไว้ในการศึกษาของ Allery และคณะ^๖

Vaginal acid phosphatase และ seminal acid phosphatase

ในปี ค.ศ. 1974 Wraxall และคณะ^{๑๒} ได้รายงานถึง การแยกแยะ vaginal acid phosphatase และ seminal acid phosphatase โดยใช้วิธี electrophoresis อย่างไร ก็ตาม ในปี ค.ศ. 1974 Davies และคณะ^{๑๓} ซึ่งระบุในศึกษาว่า ศึกษาในหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์และระบุว่าศึกษาในหญิง ที่รู้เวลาการมีเพศสัมพันธ์ที่ชัดเจน Davies และคณะ รายงาน ความแตกต่างระหว่าง vaginal acid phosphatase และ seminal acid phosphatase โดยใช้ระยะเวลาในการเปลี่ยน สีของน้ำยาทดสอบโดย vaginal acid phosphatase ส่วนมาก เปลี่ยนสีน้ำยาในเวลา ๔๐ - ๒๐๐ วินาที แม้มีบางรายได้ ถึง ๓๐ วินาที แต่โดยรวมแล้ว Davies และคณะสรุปว่า ความ ใสในการเปลี่ยนสีน้ำยาไวกว่า ๖๕ วินาทีพบน้อยมาก โดยส่วน มากจะอยู่ในช่วงเวลา ๙๐ - ๑๐๐ วินาที กรณี seminal acid phosphatase การเปลี่ยนสีน้ำยาใน ๓๐ วินาทีเป็นข้อบ่งชี้ถึง semen ที่ดีมาก และสัมพันธ์กับการ ejaculation ใน ๔๘ ชั่วโมง ส่วนกรณี ๓๐ - ๖๕ วินาที เป็นข้อบ่งชี้ถึง ejaculation ใน ๗๒ ชั่วโมง เหตุที่ระบุเวลา ๗๒ ชั่วโมง เนื่องจากผลการศึกษา หลัง ๗๒ ชั่วโมงข้อมูลไม่มากพอ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Allery และคณะ^{๑๔} พบว่าในกรณีหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์ swab จาก cervicovaginal area พบ acid phosphatase ร้อยละ ๙๖.๕ ในช่วงเวลา ๔๘ ชั่วโมง และ acid phosphatase สามารถคงอยู่สูงที่สุดที่ ๑๐๖ ชั่วโมง

วิธีการสกัด หรือเทคนิคการตรวจ มีผลต่อการตรวจ พบ enzyme acid phosphatase

การศึกษาของ Allard และคณะ^{๑๕} พบว่า หากตรวจ ด้วยวิธี direct detection (ใช้ swab บางส่วนมาทดสอบ โดยตรงกับน้ำยา) นั้นดีกว่า วิธี extraction (สกัดให้ได้ supernatant มาจาก swab) เนื่องจากวิธี extraction ต้องใช้ สารละลาย หรือ distilled water ในปริมาณที่ต้องพิจารณา ว่าจะต้องมากพอที่จะได้ตัวออกมาสักเท่าไรแต่ถ้ามากเกินไปจะได้ ความเข้มข้นของ acid phosphatase จะน้อยจนตรวจไม่พบ การศึกษาของ Lewis และคณะ^{๑๖} พบว่า direct detection (ใช้สเปย์หรือแอร์โรซอลน้ำยาทดสอบบนชิ้นส่วนของ swab) ดีกว่าวิธี indirect detection (วิธี extraction)

ข้อจำกัดของการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วย enzyme acid phosphatase

ด้านความจำเพาะ จากการศึกษาศึกษาของ Allery และ คณะ^{๑๔} ซึ่งทำในหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์ พบว่ากรณีมีเพศ

สัมพันธ์ใน ๔๘ ชั่วโมง ความไว ร้อยละ ๙๕ ความจำเพาะ ร้อยละ ๙๖ positive predictive value ร้อยละ ๙๓ negative predictive value ร้อยละ ๙๘ Allery สรุปว่า enzyme acid phosphatase เหมาะที่จะเป็นการตรวจเบื้องต้นของน้ำ อสุจิเนื่องจากมี positive และ negative predictive value ที่สูง ส่วนการศึกษาของ Suttipassit^{๑๗} ซึ่งทำในวัตถุพยานจาก หญิงซึ่งถูกข่มขืนกระทำชำเรา พบความไว ร้อยละ ๖๖.๕ โดย ทั้ง ๒ การศึกษาต่างจากงานของ Hooft และคณะ^{๑๘} ซึ่งทำใน หญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์และ Hooft รายงานว่า positive predictive value ร้อยละ ๘๐ negative predictive value ร้อยละ ๘๙ แต่ตั้งที่กล่าวไว้ในตอนต้นแล้วว่า Hooft และคณะ มีการพัฒนา แผ่นสำเร็จรูปในการตรวจหาสารสังกะสี^{๑๙} อาจมี ความแตกต่างได้

จากการรายงานของ Hooft และคณะ^{๑๘} พบการ ปนเปื้อนของ acid phosphatase ใน

๑. สารคัดหลั่งหรือของเสียของมนุษย์: ๑) เลือดของ มนุษย์ทั้งเลือดทั้งหมด พลาสมาและซีรัม ๒) อุจจาระที่ปนเปื้อน เลือด ๓) เลือดประจำเดือน ๔) น้ำคัดหลั่งจากช่องคลอดที่ไม่ได้ มีการติดเชื้อหรือมีเลือด*

๒. ผักและผลไม้: ๑) ดอกกระหล่ำปลี* ๒) ต้นซีคอรี่* ๓) ต้นหอม* ๔) ผักสลัด* ๕) ผักกระหล่ำ* ๖) ผักโขม ๗) พืช จำพวก บลอสสิกา คล้ายกระหล่ำ (Sprouts)*

๓. เนื้อสัตว์ดิบ: ๑) เนื้อวัว ๒) เนื้อไก่* ๓) เนื้อหมู ๔) เนื้อแกะ

๔. ผลิตภัณฑ์อาหาร: ๑) เนยแข็ง* ๒) โกลี/ชีสคอโก แลต*

๕. เครื่องเทศและสมุนไพร: ๑) อบเชย* ๒) ผลจันทร์เทศ* ๓) ผักชีฝรั่ง

๖. น้ำ: ๑) แม่น้ำ (ปนเปื้อนมลภาวะ) ๒) สระว่ายน้ำ น้ำ (สาธารณะ)

* = ไม่พบผลบวกลงในการทดสอบ Zinc test

การศึกษาของ Raju และคณะ^{๑๙} พบว่าสาร phenol and phosphate ion สามารถทำให้เกิด false positive ของการทดสอบ acid phosphatase Raju พบว่า asparagus, peanut, snake gourd, มะม่วง ขิง กระเทียม garlic, turnip, embic myrobalan ลูกเกด สารคัดหลั่งจาก อีเกา ไก่ เป็ด ทำให้ เกิด false positive ของการทำสอบหา acid phosphatase การศึกษาของ Aumüller และคณะ^{๒๐} พบ acid phosphatase

ในน้ำอสุจิของ ลิงบางสายพันธุ์ สุนัข กระต่าย หนูและหมู

ความน่าเชื่อถือและการยอมรับในปัจจุบัน

ในปัจจุบันการตรวจหา enzyme acid phosphatase ยังคงมีการศึกษาอยู่บ้างแต่จะเป็นในฐานะ screening test เช่น การศึกษาของ Martinez และคณะ^{๑๗} ในปี ค.ศ. 2015

๑.๑.๓ การตรวจหาสาร prostate specific antigen

Prostate specific antigen (PSA) ได้ถูกค้นพบและรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดย Flocks และคณะ^{๑๘} โดย Flocks และคณะพบว่า antigen ของ benign และ malignant prostate tissue คือตัวเดียวกัน

ในทางนิติเวช เมื่อ ค.ศ. 1978 Sensabaugh^{๑๙} ได้ทำการทดสอบหา ideal seminal protein marker เพื่อแก้ปัญหา การต้องยืนยันน้ำอสุจิในกรณีที่ผู้ชายคนนั้นมีภาวะ azoospermia หรือทำหมันชายแล้ว Sensabaugh ค้นพบ protein ๒ ตัวในน้ำอสุจิ โดยการใช้ gel electrophoresis และตั้งชื่อ protein ว่า “P30 และ P41” ตามน้ำหนักโมเลกุล 30 และ 41 kDa ตามลำดับ ในน้ำอสุจิสามารถพบ PSA อยู่ประมาณ 0.2 - 5.5 mg/ml^{๒๐}

การตรวจหา prostate specific antigen เป็นการตรวจหา glycoprotein ในอดีตได้ทำการทดสอบ เนื่องด้วยมีการผลิตชุดตรวจทาง immunoassay ซึ่งมีความไวและความจำเพาะที่สูงมากออกจำหน่ายในปัจจุบันจึงเป็นที่นิยมและด้วยเหตุผลด้านความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ผู้นิพนธ์เชื่อว่าไม่มีห้องปฏิบัติการใดจะย้อนกลับไปตรวจด้วยวิธีเดิม เช่น Elisa อีกแล้วยกเว้นเพื่อการวิจัยโดยเฉพาะ ตัวอย่าง เช่น ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล^{๒๑} ใช้การทดสอบ total PSA และ free PSA ในเลือดโดยใช้ Electrochemiluminescence immunoassay โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Elecsys 2010 และ Modular E170 สามารถตรวจ Total PSA ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้คือ 0.002 ng/ml ส่วนทางนิติเวชชุดตรวจสำเร็จรูปใช้หลักการ immunoassay มีจำหน่ายหลายบริษัท เช่น Seratec[®] ABACard[™] โดยชุดสำเร็จรูปเหล่านี้จะมีน้ำยาเพื่อทำการสกัดและทำการทดสอบ มาให้กับชุดตรวจด้วย เมื่อสกัดแล้วจะได้ supernatant เพื่อใช้ในการทดสอบ ชุดทดสอบเหล่านี้มีความไวในระดับ 4 ng/ml^{๒๒, ๒๓} การศึกษาของ Pang และคณะ^{๒๔} ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเราและใช้ชุดทดสอบ ABACard[™] พบอัตราการตรวจพบ PSA อยู่ที่ 32.43% ในวัตถุพยานใหม่และ 81.25% ในวัตถุพยานเก่า Martinez และคณะ^{๑๗} ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืน

และใช้ชุดทดสอบ Seratec[®] พบอัตราการตรวจพบ PSA อยู่ที่ร้อยละ ๖๑.๔ ในขณะที่ Sato และคณะ^{๒๕} ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืนและใช้ชุดทดสอบ Seratec[®] และ PSA-Check 1[™] พบอัตราการตรวจพบ PSA อยู่ที่ ร้อยละ ๘๑

High dose hook effect^{๒๖}

การตรวจทาง immunoassay หลักการคือ antigen ไปจับกับ anti-antigen-antibody gold label เกิด complex จากนั้นจึงจะไปจับกับ anti-antigen-antibody membrane เกิดแถบสีที่ membrane กรณีที่มี antigen มากจนเกินไป อาจจะมี antigen วิ่งไปที่ anti-antigen-antibody membrane โดยไม่ได้จับกับ anti-antigen-antibody gold label โดยวิ่งนำหน้า complex ที่เกิดขึ้นไปก่อนทำให้ไปขัดขวางไม่ให้ complex สามารถจับกับ anti-PSA-antibody membrane ได้จึงไม่ปรากฏแถบสีขึ้นที่ test line กลายเป็น false negative วิธีการแก้ไขคือ กรณีที่มีผลลบ ต้องมีการเจือจาง supernatant ตามข้อกำหนดของแต่ละบริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบแล้วจึงทดสอบซ้ำเสมอ

ข้อจำกัดของการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วย PSA

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการคงอยู่ของ PSA ในช่องคลอดของหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์ อยู่ได้นานในช่วง ๒๔ - ๔๘ ชั่วโมง^{๒๖ - ๒๗} ในปัจจุบันตรวจพบ PSA ในส่วนอื่นของร่างกาย ผู้หญิงปกติเช่น ในปัสสาวะของหญิงซึ่งรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด ในปัสสาวะของหญิงซึ่งมีเพศสัมพันธ์ เยื่อโพรงมดลูก รก น้ำนม มะเร็งเต้านม serum ของหญิงซึ่งเป็นมะเร็งหรือเนื้องอกเต้านมบางชนิด ที่ต่อม skene ซึ่งหลังสารคัดหลั่งที่มีคุณสมบัติและส่วนประกอบใกล้เคียงกับต่อมลูกหมากอย่างมาก รวมไปถึงเลือดของหญิงที่เป็นมะเร็งต่อม skene และเนื่องจากต่อม skene นั้นรูเปิดมักจะใกล้ปากช่องคลอดมากอาจมีการปนเปื้อนสารคัดหลั่งไปในช่องคลอดได้มากเช่นกัน^{๒๘ - ๓๐}

การศึกษาของ Aumüller และคณะ^{๓๑} พบ PSA ในน้ำอสุจิของ ลิงบางสายพันธุ์ สุนัข กระต่าย หนูและหมู การตรวจหา PSA ใน supernatant ที่ได้รับการแช่แข็งแล้วละลาย ปรากฏว่าในรอบที่สองของการนำไปละลายหลังแช่แข็งใหม่ ยังไม่พบการสูญหายไปของ PSA จากการศึกษานี้ของ Sato และคณะ แต่ในกรณีที่ละลายหลังจากแช่แข็งมากกว่า ๒ รอบ ยังไม่มีการยืนยันว่าไม่สูญหายไป^{๒๕}

ความน่าเชื่อถือและการยอมรับในปัจจุบัน

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ PSA ในฐานะ screening test ยังคงมีอยู่ แต่เนื่องจากการรายงานว่า พบในน้ำปัสสาวะของผู้หญิง^{๒๘} ความน่าเชื่อถืออาจลดลงไปมาก

๑.๑.๔ การตรวจหาสาร semenogelin (Sg, SEMG)

Semenogelin (Sg, SEMG) เป็น protein ที่สร้างจาก seminal vesicle มี ๒ ชนิดคือ SEMG1 และ SEMG2 มีน้ำหนัก 71 kDa และ 72 kDa ตามลำดับ semenogeling พบในน้ำอสุจิได้ถึง 20 mg/ml^[๓๗-๓๙] มีบทบาทในการเป็นเจลของน้ำอสุจิ เมื่อน้ำอสุจิเป็นเจลในแท่งจะทันทีต่อมาเจลที่เกิดขึ้นจะละลาย การละลายจะมี PSA เป็นตัว proteolytic cleavage ซึ่งมี Zinc เกี่ยวข้องด้วย^[๓๗] และความเข้าใจในกลไกการเป็นเจล การละลายของเจลทำให้มีการพัฒนาการคุมกำเนิดเพศชายในแนวใหม่ นอกเหนือจากการใช้ condom และทำหมันชาย คือ การยับยั้ง EPPIN (epididymal protease inhibitor) ซึ่งมีหน้าที่ในกระบวนการละลายและการเคลื่อนไหวของอสุจิในรูปแบบการใช้ anti-EPPIN ซึ่งมีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวและการปฏิสนธิได้ โดยเป็นการคุมกำเนิดชั่วคราวที่สามารถกลับมามีความสามารถในการสืบพันธุ์ได้ดังเดิม O'Rand และคณะได้ทำการทดลอง anti-EPPIN ในลิงปรากฏว่าได้ผลดีและสามารถกลับมามีความสามารถในการสืบพันธุ์ได้เช่นเดิมเมื่อระดับ anti-EPPIN ในเลือดลดลง^[๔๐]

การตรวจหา SEMG เป็นการตรวจหา protein ในอดีตได้ทำการทดสอบ ในปัจจุบันเนื่องจากตรวจทาง immunoassay มีความไวและความจำเพาะที่สูงมาก ในงานด้านนิติเวชจึงเป็นที่นิยมใช้ชุดสำเร็จรูปและด้วยเหตุผลด้านความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ผู้พิมพ์เชื่อว่าไม่มีห้องปฏิบัติการใดจะย้อนกลับไปตรวจด้วยวิธีเดิม ยกเว้นเฉพาะด้านงานวิจัยเท่านั้น ทางนิติเวชชุดตรวจสำเร็จรูปใช้หลักการ immunoassay มีจำหน่ายหลายบริษัท เช่น RSID™ ซึ่งสามารถตรวจระดับ SEMG ในช่วงระหว่าง 4 - 68 ng/mL^[๒๖] Nanotrap Sg™ ซึ่งสามารถตรวจระดับ SEMG ได้ไม่น้อยกว่า 4 ng/mL^[๒๔] การศึกษาของ Pang และคณะ^[๒๔] ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเราและใช้ชุดทดสอบ RSID™ พบอัตราการตรวจพบ SEMG อยู่ที่ 40.54% ในวัตถุพยานใหม่และ ร้อยละ ๘๑.๒๕ ในวัตถุพยานเก่า Martinez และคณะ^[๓๗] ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเราและใช้ชุดทดสอบ RSID™ พบอัตราการตรวจพบ SEMG อยู่ที่ ร้อยละ ๖๔.๘ ในขณะที่ Sato และคณะ^[๒๔] ซึ่งศึกษาในกรณีหญิงถูกข่มขืนและใช้ชุดทดสอบ Nanotrap Sg™ พบอัตราการตรวจพบ SEMG อยู่ที่ ร้อยละ ๖๘.๔

High dose hook effect^[๒๖]

เนื่องจากการทดสอบด้วยชุดสำเร็จรูปเป็นการใช้ immunoassay จึงเกิด hook effect ได้ดังเช่นที่เกิดกับชุดตรวจหา PSA การแก้ไขคือการเจือจาง supernatant ตามคำแนะนำของผู้ผลิตดังได้กล่าวไว้ในส่วนของการตรวจหา PSA

ข้อจำกัดในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วย SEMG

การคงอยู่ของ SEMG ในช่องคลอดของหญิงที่ยินยอมมีเพศสัมพันธ์ พบว่าอยู่ได้นานในช่วง ๔๘ - ๗๒ ชั่วโมง^[๒๖, ๒๗] ในปัจจุบันตรวจพบ SEMG ในส่วนอื่นของร่างกายมนุษย์ ได้แก่ skeletal muscle ไต เยื่อลำไส้ใหญ่ หลอดลม เนื้อปอด lung carcinomas และจอประสาทตา^[๔๑-๔๔] และปัจจุบันทราบที่สามารถค้นหาได้ในสารระบบวารสารการแพทย์สากล ยังไม่มีการพบ SEMG ในทางเดินปัสสาวะและทางเดินอวัยวะเพศหญิงในระดับการตรวจพบเป็นปริมาณ^[๓๗]

การศึกษาของ Aumüller และคณะ^[๓๖] พบ SEMG ในน้ำอสุจิของ ลิงบางสายพันธุ์ แต่ไม่พบในของ สุนัข กระต่าย หนู และหมู การตรวจหา SEMG ใน supernatant ที่ได้รับการแช่แข็งแล้วละลาย จากการศึกษานี้ของ Sato และคณะ^[๒๔] ปรากฏว่าในรอบที่สองของแช่แข็งแล้วละลายพบการสูญเสียไปของ SEMG ดังนั้นการตรวจหา SEMG จาก supernatant ที่แช่แข็งไว้แล้ว สามารถนำมาละลายและใช้แทนที่ที่ได้อีกเพียงครั้งเดียวเท่านั้น เมื่อละลายแล้วหากนำไปแช่แข็งอีกอาจทำให้ปริมาณ SEMG ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบเมื่อนำมาละลายตรวจอีกครั้ง

ความน่าเชื่อถือและการยอมรับในปัจจุบัน

ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ SEMG ในฐานะ screening test ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง แม้จะยังไม่เคยมีรายงานถึง SEMG ในทางเดินปัสสาวะหรือทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์หญิง^[๓๗] และไม่เป็นการสมเหตุสมผลที่เนื้อเยื่อของร่างกายที่มี SEMG จะมาปะปนใน สิ่งส่งตรวจทางการกระทำชำเรา^[๒๔] แต่การตรวจหา SEMG ยังไม่ใช่วิธีการตรวจยืนยันแน่นอน อย่างไรก็ดี การตรวจยืนยันมีเพียงการตรวจพบตัวอสุจิเท่านั้น ในปัจจุบัน ชุดตรวจสำเร็จรูปหาซื้อได้ทั้งในอเมริกา ญี่ปุ่น และยุโรป แต่เนื่องจากราคายังสูงอีกทั้งการต้องคำนวณต้นทุนเรื่องของ hook effect ที่ต้องทดสอบซ้ำทุกรายที่ตรวจไม่พบในประเทศไทยจึงมีเพียงสถาบันไม่กี่แห่งที่มีการทดสอบนี้เป็นการทดสอบประจำพื้นฐาน

๑.๑.๕ การตรวจอื่นที่ไม่เป็นที่นิยม

อาทิเช่น free choline แต่เนื่องจาก free choline คงอยู่ในช่องคลอดได้ประมาณ ๒๔ ชั่วโมง เท่านั้น^[๓๐] ในปัจจุบันรอบ ๑๐ ปีแทบไม่พบมีการศึกษา free choline กับ การพิสูจน์น้ำอสุจิ

๑.๒ การตรวจพิสูจน์ตัวอสุจิ

ในปัจจุบันการยืนยันถึงน้ำอสุจิ gold standard คือ การตรวจพบตัวอสุจิ^[๔๕] การตรวจในปัจจุบัน คือ การตรวจด้วย

กล้องจุลทรรศน์ และมีการย้อมที่หลากหลาย เช่น Papanicolaou Baecchi, May-Grunwald-Giemsa, Wright's stain, acridine orange แต่อย่างไรก็ตามการย้อมที่นิยมมากที่สุดโดยทั่วไป คือ hematoxylin/eosin และ nuclear fast red/picroindigo-carmine (Christmas tree staining)^{๔๖, ๔๗} ซึ่งการศึกษาของ Allery และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 พบว่าการย้อม คือ hematoxylin/eosin และ Christmas tree staining ไม่แตกต่างในด้านอัตราการตรวจพบตัวอสุจิ^{๔๘} การสกัดโดยทั่วไป นิยมสกัดตามวิธีของ Pollak คล้ายคลึงกับ วิธีของ Virginia Department of Forensic Science^{๔๙, ๕๐} กระบวนการสกัดและย้อมจะไม่ขอกกล่าวในที่นี้

การย้อมพิเศษ

การย้อมพิเศษที่มีผลต่อการตรวจพิสูจน์ตัวอสุจิและเป็นทางเลือก คือ Fluorescence in situ hybridization (FISH)-based methods โดยใช้ X and/or Y chromosomal specific probes การศึกษาของ De Moors และคณะ^{๕๑} พบว่าการใช้ (FISH)-based methods โดยใช้ Sperm Hy-LiterTM เพิ่มประสิทธิภาพของอัตราการตรวจพบ และสามารถลดระยะเวลาอ่านสไลด์ได้มาก ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากต่อการพิจารณาเพื่อความไวในการตรวจพบตัวอสุจิ และพิจารณาในแง่ต้นทุนของห้องปฏิบัติการ

การเลือกตำแหน่งในการเก็บวัตถุพยาน

การเลือกตำแหน่งในการเก็บวัตถุพยาน จากการศึกษาที่ผ่านมา เฉพาะกรณีเก็บจากอวัยวะเพศหญิงซึ่งถูกข่มขืนกระทำชำเรา การศึกษาจะมุ่งเน้นว่าเก็บจากตำแหน่งใดมีโอกาสจะตรวจพบตัวอสุจิสูงสุด การศึกษาของ Hellerud และคณะ Allard และคณะ และปลาญ^{๕๒ - ๕๔} แนะนำให้เก็บวัตถุพยานจากภายในช่องคลอดจะมีอัตราการตรวจพบที่สูงกว่าภายนอกช่องคลอด และอัตราการตรวจพบไม่มีความแตกต่างกันระหว่างตำแหน่งต่างๆ ในช่องคลอด เช่น posterior fornix หรือ cervix แต่ตำแหน่ง endocervix ไม่มีเคยมีระบุไว้ในการศึกษาที่ผ่านมา คือ ดังนั้นการเก็บวัตถุพยานจากตำแหน่ง endocervix ดังกล่าวต้องระมัดระวังในการแปลผลและอ้างอิงหลักฐานเชิงประจักษ์

จากการศึกษาของ Sharpe^{๕๕} พบว่าการคงอยู่ของตัวอสุจิจากกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเรานานที่สุดคือ ๑๗ วันที่ตำแหน่ง cervix ด้าน Green^{๕๖} ได้กล่าวในหนังสือ Encyclopedia of forensic sciences บท clinical forensic medicine ว่า พบตัวอสุจิในกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเราที่ cervix ได้นานถึง ๑๙ วัน นับเป็นการรายงานการคงอยู่ของตัวอสุจิในกรณีหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเรานานที่สุดที่สามารถ

ตรวจสอบได้ Green ยังกล่าวอีกว่า ที่ตำแหน่งช่องปากตัวอสุจิสามารถพบได้นาน ๓๑ ชั่วโมง ช่องลำไส้ใหญ่ส่วนปลายนานถึง ๑๑๓ ชั่วโมง

ข้อจำกัดในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วยการตรวจหาตัวอสุจิ

การตรวจไม่พบตัวอสุจิแม้จะมีน้ำอสุจิอาจมีสาเหตุหลายอย่าง เช่น ภาวะหมันทั้งไม่มีตัวอสุจิ (azospermia) หรือมีตัวอสุจิน้อย (oligospermia) ผู้กระทำเป็นหมันจากการทำหมันหรือการตัดลูกอัณฑะ การหลั่งน้ำอสุจิกายนอก การไม่หลั่งน้ำอสุจิ การหมดสมรรถภาพขณะกระทำชำเรา การใช้ถุงยางอนามัย การใช้สารฆ่าตัวอสุจิ การมาเก็บวัตถุพยานช้าเกินไป การทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศหญิง

การใช้ยาคุมกำเนิด มีการติดเชื้อในช่องคลอด การมีประจำเดือน เป็นต้น^{๕๗} รวมถึงปริมาณตัวอสุจิของเพศชายมีแนวโน้มลดลง^{๕๘}

ความน่าเชื่อถือและการยอมรับในปัจจุบัน

การตรวจพบ ตัวอสุจิถือว่า เป็นการยืนยันน้ำอสุจิเพียงอย่างเดียวที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน

๑.๓ การตรวจด้วยวิธีรามาน (RAMAN spectroscopy)

RAMAN spectroscopy คือ เทคนิคการตรวจการกระเจิงแสงอันไม่ปรกติของ โมเลกุลโฟตอนเมื่อได้รับพลังงานซึ่งหากใช้พลังงานเป็นลำแสงเลเซอร์ที่เข้มข้น โมเลกุลสารแต่ละชนิดเมื่อได้รับแสงเลเซอร์จะมีการปล่อยแสงออกมาเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นแสงเท่ากับความยาวคลื่นแสงที่ได้รับ เรียกว่า เลย์ไร (Rayleigh scatter) และจะปล่อยแสงอีกส่วนหนึ่งในปริมาณน้อยมากเป็นช่วงความยาวคลื่นที่ต่างจากแสงเลย์ไร เรียกว่า รามาน (Raman scatter) และ รามานนี้มีคุณสมบัติเฉพาะตัวของโมเลกุลสารนั้นซึ่งจะปล่อยแสงออกมาในคลื่นความถี่ที่แตกต่างกัน^{๕๙ - ๖๐} ในปี ค.ศ. 2009 Virkler และคณะ^{๖๑} ได้นำการตรวจด้วย RAMAN spectroscopy มาตรวจน้ำอสุจิ โดยตรวจคราบน้ำอสุจิที่แห้งพบสารที่เด่นในการตรวจด้วย RAMAN ๓ สารคือ tyrosine ส่วนประกอบของโปรตีนและอาจเป็น choline และสาร spermine phosphate hexahydrate ในปี ค.ศ. 2010 Sikirzhytski และคณะ^{๖๒} ได้พัฒนานำการตรวจ RAMAN มาตรวจเลือด น้ำอสุจิและน้ำลาย Sikirzhytski ได้ให้ความเห็นว่า รามานอาจจะสามารถใช้ตรวจยืนยันสารคัดหลั่งได้ แต่ยังต้องมีการค้นหาความจำเพาะของสารคัดหลั่งแต่ละอย่างต่อไปอีก (ต้องรวบรวมข้อมูลอีกมาก) แต่อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยเทคนิค RAMAN นั้นไม่สามารถทำได้ในทุกห้องปฏิบัติการ

ข้อจำกัดในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วย วิธีการรามา
การไม่สามารถมี RAMAN ได้ทุกห้องปฏิบัติการ และ
ยังคงอยู่ระหว่างการศึกษาระเบียบวิธีรวบรวมข้อมูลของแต่ละสาร
คัดหลังหรือเนื้อเยื่อของมนุษย์

๑.๔ การตรวจทาง serology

๑.๔.๑ การตรวจสารพันธุกรรม DNA

เป็นการตรวจหา Y chromosome ด้วยเทคนิคการ
ตรวจหาการซ้ำกัน shot tandem repeat (STR) เพื่อยืนยัน
บุคคล แต่การตรวจพบ Y chromosome ของชายนั้น ที่มาของ
Y chromosome อาจจะมาจก ตัวอสุจิ seminal epithelium
cells หรือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B หรือ T cells ก็ได้^{๖๓}
ดังนั้นการตรวจพบ Y-STR นั้นไม่เป็นการยืนยันการตรวจพบน้ำ
อสุจิแต่เป็นการยืนยันเซลล์จากเพศชายเท่านั้น ในส่วนเทคนิค
การตรวจจะไม่ขอกล่าวในที่นี้

ข้อจำกัดการพิสูจน์น้ำอสุจิด้วยตรวจ Y-STR

นอกจากประเด็นเรื่องของ ความไม่จำเพาะต่อตัวอสุจิ
แล้วยังมีเรื่องการคงอยู่ จากการศึกษาค้นคว้าของ Hall และคณะ^{๖๔}
พบว่า Y chromosome นั้นสามารถคงอยู่ในช่องคลอดและ
ปากมดลูกได้นานประมาณ ๔ วันด้วยการตรวจเทคนิค STR
แต่ต่อมาในปี ค.ศ. 2014 Hanson และคณะ^{๖๕} ได้พัฒนาเทคนิค
การตรวจและสามารถตรวจ Y chromosome ด้วยเทคนิค
Y-STR ในช่องคลอดและปากมดลูกได้นานถึง ๙ วันในกลุ่ม
ทดลองหญิงถูกข่มขืนกระทำชำเรา

๑.๔.๒. การตรวจหา RNA

Messenger RNA ในเซลล์แต่ละชนิดจะมีความ
แตกต่างกันไปตามหน้าที่ของเซลล์นั้นๆ แต่ mRNA มีปัญหา
เรื่อง stability มีรายงานว่า เสื่อมสลายได้จากความชื้นและ
แสง UV^{๖๖, ๖๗} microRNAs (miRNAs) เป็น RNA molecule ที่
มีความแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ มีความสำคัญในกระบวนการ
หลังการ transcription มีลักษณะเป็นสายสั้นเพียง ๑๘-๒๒
nucleotides ซึ่งทำให้มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมและคงทน
กว่า mRNA ที่ผ่านมาจึงพบว่าเริ่มมีศึกษาการนำ miRNAs มาใช้
ในการระบุชนิดสารคัดหลั่ง หรือเนื้อเยื่อของร่างกาย^{๖๘}

ข้อจำกัดการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิด้วย miRNAs

ยังอยู่ระหว่างการศึกษาระเบียบวิธีรวบรวมข้อมูล ทดสอบ
สารคัดหลั่ง รวมถึงเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย

๒. การตรวจ ณ ที่เกิดเหตุ

การตรวจที่เกิดเหตุต้องเป็นการตรวจที่รวดเร็ว
สะดวก ไม่ต้องมีกระบวนการทางห้องปฏิบัติการ และใช้ง่าย
แม้ไม่มีความรู้เฉพาะด้าน ซึ่งสามารถใช้การตรวจที่มี ชุดตรวจ

สำเร็จรูปได้ เช่น การตรวจสารสังกะสี enzyme acid phos-
phatase PSA SEMG และการตรวจโดยใช้ light source โดย
การตรวจ ณ ที่เกิดเหตุในปัจจุบันไม่สามารถตรวจหาตัวอสุจิซึ่ง
เป็นการยืนยันน้ำอสุจิได้

๒.๑ การตรวจโดยใช้ light source

การใช้ light source มีการพัฒนามาตั้งแต่การ
ใช้ Wood's Lamp BluemaxxTM BM500 Polilight และ
Lumatec Superlight 400^{๖๙} สารคัดหลั่งสามารถสะท้อน
แสงในบางคลื่นความถี่ได้ แต่มีปัจจัยรบกวนได้หลายอย่าง เช่น
ผงซักฟอก หรือสีของพื้นหลัง วัตถุที่มีคราบน้ำอสุจินั้นซึมซับได้
หรือไม่^{๖๙} และมีโอกาส false positive ได้สูงถึงเกือบ 50%^{๗๐}
การตรวจด้วย alternate light source ควรเป็นการตรวจ
เบื้องต้นเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

๑. แพทยสภา. ประกาศแพทยสภา ที่ ๑๒/๒๕๕๕ เรื่อง เกณฑ์
ความรู้ความสามารถในการประเมินเพื่อรับใบอนุญาตเป็น
ผู้ประกอบการวิชาชีพเวชกรรม พ.ศ. ๒๕๕๕ [อินเทอร์เน็ต].
๒๕๕๕ [เข้าถึงเมื่อ ๒๒ ส.ค. ๒๕๖๐] เข้าถึงได้จาก: [http://
www.tmc.or.th/file_08062012.pdf](http://www.tmc.or.th/file_08062012.pdf)
๒. สำนักคณะกรรมการกฤษฎีกา. พระราชบัญญัติให้ใช้
ประมวลกฎหมายอาญา พ.ศ. ๒๕๔๙ [อินเทอร์เน็ต]. ๒๕๕๙
[เข้าถึงเมื่อ ๒๒ ส.ค. ๒๕๖๐] เข้าถึงได้จาก : [http://web.
krisdika.go.th/data/law/law4/%bb06/%bb06-20-
9999-update.pdf](http://web.krisdika.go.th/data/law/law4/%bb06/%bb06-20-9999-update.pdf)
๓. Suzuki O, Asano M, Kido A, Oya M. Zinc test as
a new tool for identification of human seminal
stains. Forensic Sci Int 1983;22:231-5.
๔. Hooft P, Van de Voorde H, Van Dijck P. A more
sensitive modification of the zinc test for seminal
traces suitable for stable test paper strips. Forensic
Sci Int 1992 Mar;53(2):131-3.
๕. Hooft P, Van de Voorde H. Interference of body
products, food and products from daily life with
the modified zinc test and the acid phosphatase
test. Forensic Sci Int 1994 Jun 10;66(3):187-96.
๖. Allery JP, Telmon N, Blanc A, Mieusset R, Rougé
D. Rapid detection of sperm: comparison of two
methods. J Clin Forensic Med 2002;10:5-7.

๗. Suttipaisit P. Comparison of two seminal detection methods, the acid phosphatase test and the zinc test for sensitivities in sexually assaulted females positive of sperm. *Siriraj Med J.* 2015;67:168-72.
๘. Hooft PJ, Van de Voorde HP. Bayesian evaluation of the modified zinc test and the acid phosphatase spot test for forensic semen investigation. *Am J Forensic Med Pathol.* 1997;18:45-9.
๙. Lundquist F. *ACTA. PEYSIOL. SCAND* 1947;14:263.
๑๐. Kaye S. Identification of Seminal Stains. *J Crim Law Criminol* (1931) 1947 May-Jun;38(1):79-83.
๑๑. Davies A, Wilson E. The persistence of seminal constituents in the human vagina. *Forensic Sci.* 1974 Feb;3(1):45-55.
๑๒. Wraaxail K, Adams E. Phosphatases in body fluids: The differentiation of semen and vaginal secretion. *Forens Sci* 1974;3:57-62.
๑๓. Allard JE, Baird A, Davidson G, Jones S, Lewis J, McKenna L, et al. A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Sci Justice.* 2007 Dec;47(4):160-7.
๑๔. Lewis J, Baird A, McAlister C, Siemieniuk A, Blackmore L, McCabe B, et al. Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. *Sci Justice.* 2013 Dec;53(4):385-94.
๑๕. Raju P, Lyengar N. Acid Phosphatase Reaction as a Specific Test for the Identification of Seminal Stains. *J of Cri Law and Criminol.* 1964 Dec;15(4):522-5.
๑๖. Aumüller G, Seitz J, Lilja H, Abrahamsson PA, Von der Kammer H, Scheit KH. Species- and organ-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicles. *Prostate* 1990;17(1):31-40.
๑๗. Martinez P, Santiago B, Alcala B, Atienza I. Semen searching when sperm is absent. *Sci Justice.* 2015;55:118-23.
๑๘. Flocks RH, Ulrich VC, Patel CA, Opitz JM. Studies on the antigenic properties of prostatic tissue. I. *J Urol.* 1960;84:134-43.
๑๙. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci.* 1978;23:106-15.
๒๐. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci.* 1999 Sep;44(5):1057-60.
๒๑. ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. คู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ (IM-02-2-002-C1-02) Free PAS: total PSA ratio [อินเทอร์เน็ต]. ๒๕๖๐ [เข้าถึงเมื่อ ๒๒ สิงหาคม ๒๕๖๐] เข้าถึงได้จาก: <http://www.si.mahidol.ac.th/Th/departement/immunology/services/16.pdf>
๒๒. Gesellschaft fur Biotechnologie mbH, Goettingen Germany. PSA in body fluids an overview for users of the seratec semi quant test. http://www.seratec.com/docs/user_instructions/psa_in_body_fluids (accessed 22 August 2017).
๒๓. Hobbs MM, Steiner MJ, Rich KD, Gallo MF, Alam A, Rahman M. Good performance of rapid prostate-specific antigen test for detection of semen exposure in women: implications for qualitative research. *Sex Transm Dis* 2009 Aug;36(8):501-6.
๒๔. Pang BM, Cheung BKK. Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Sci Int* 2007;169:27-31.
๒๕. 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.

๒๖. Old J, Schweers BA, Boonlayangoor PW, Fischer B, Miller KW, Reich K. Developmental validation of RSID™-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *J Forensic Sci.* 2012;57(2):489-99.
๒๗. Laffan Á, Sawyer I, Quinones I and Daniel B. Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. *Med Sci Law.* 2011;51:11-7.
๒๘. Mannello F, Condemi L, Cardinali A, Bianchi G, Gazzanelli G. High concentrations of prostate-specific antigen in urine of women receiving oral contraceptives. *Clin Chem.* 1998;44:181-3.
๒๙. Breul J, Pick U, Hartung R. Prostate-specific antigen in urine. *Eur Urol.* 1994;26:18-21.
๓๐. Clements J, Mukhtar A. Glandular kallikreins and prostate-specific antigen are expressed in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:1536-9.
๓๑. Malatesta M, Mannello F, Luchetti F, Marcheggiani F, Condemi L, Papa S, et al. Prostate-specific antigen synthesis and secretion by human placenta: a physiological kallikrein source during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:317-21.
๓๒. Yu H, Diamandis EP. Prostate-specific antigen in milk of lactating women. *Clin Chem.* 1995;41:54-8.
๓๓. Yu H, Diamandis EF, Sutherland DJA. Immunoreactive prostate specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem* 1994;27:75-9.
๓๔. Jahir ET, Devi R, Borthakur BB. Study of serum total PSA and Free PSA as an oncological marker in breast tumour. *J Clin Diagn Res.* 2017 Mar;11(3):BC13-BC16.
๓๕. Zaviacic M, Ablin RJ. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in the human female. *Histol Histopathol* 2000 Jan;15(1):131-42.
๓๖. Thum S, Haben B, Christ G, Sen Gupta R. Female prostate cancer (abstract). *Pathologe* 2017 Jul;20.
๓๗. Roan NR, Liu H, Usmani SM, Neidleman J, Müller JA, Avila-Herrera A. Liquefaction of semen generates and later degrades a conserved semenogelin peptide that enhances HIV infection. *J Virol.* 2014 Jul;88(13):7221-34.
๓๘. Yoshida K, Yamasaki T, Yoshiike M, Takano S, Sato I, Iwamoto T. Quantification of seminal plasma motility inhibitor/semenogelin in human seminal plasma. *J Androl.* 2003 Nov-Dec;24(6):878-84.
๓๙. Lamirande de E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:60-68.
๔๐. O'Rand MG, Silva E, Hamil KG. Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. *Pharmacol Ther* 2016 January;157:105-11.
๔๑. Lundwall A, Bjartell A, Olsson AY, Malm J. Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in nongenital tissues. *Mol Human Reprod.* 2002;8:805-10.
๔๒. Rodrigues RG, Panizo-Santos A, Cashel JA, Krutzsch HC, Merino MJ, Roberts DD. Semenogelins are ectopically expressed in small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:854-60.
๔๓. Berti A, Virgili, D'Errico G, Vespi G, Lago G, Cavazana A. Expression of seminal vesicle-specific antigen in serum of lung tumor patients. *J Forensic Sci.* 2005;50:1114-5.
๔๔. Bonilha VL, Rayborn ME, Shadrach K, Lundwall A, Malm J, Bhattacharya SK, et al. Characterization of semenogelin proteins in the human retina. *Exp Eye Res* 2006;83:120-7.
๔๕. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, Shpitzen M, Herman Y, Gafny R. Demonstration of DSI-semen-A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci Int Genet* 2013;7:136-42.

๔๖. Dimo-Simonin N, Grange F, Brandt-Casadevall C. PCR-based forensic testing of DNA from stained cytological smears. *J. Forensic. Sci* 1997;42:506-9.
๔๗. Sanders CT, Sanchez N, Ballantyne J, Peterson DA. Laser microdissection separation of pure spermatozoa from epithelial cells for short tandem repeat analysis. *J Forensic Sci.* 2006;51:748-57.
๔๘. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci.* 2001 Mar;46(2):349-51.
๔๙. Pollak OJ. Semen and seminal stains. *Arch. Path.* 1943;35:140-96.
๕๐. Forensic biology section training manual <https://www.dfs.virginia.gov/wp-content/uploads/2013/07/210-D700-Forensic-Biology-Case-Approach-Training.pdf> (Issue Date: 18 July 2014; accessed 22 August 2017).
๕๑. De Moors A, Georgalis T, Armstrong G, Modler J, Fréreau CJ. Sperm Hy-Liter™: an effective tool for the detection of spermatozoa in sexual assault exhibits. *Forensic Sci Int Genet* 2013 May;7(3):367-79.
๕๒. Hellerud B, Bouzga M, Hoff-Olsen P, Mevag B. Semen detection: A retrospective overview from 2010. *Forensic Sci Int* 2011;3:e391-9.
๕๓. Allard JE. The collection of data from findings in cases of sexual assault and the significance of spermatozoa on vaginal, anal and oral swabs. *Science & Justice* 1997;37:99-108.
๕๔. ปภานู สุทธิประสิทธิ์. การตรวจหาตัวอสุจิในหญิงที่แจ้งว่าถูกข่มขืนกระทำชำเรา. *ธรรมศาสตร์เวชสาร.* ๒๕๕๙;๑๖(๒):๑๗๖-๘๔.
๕๕. Sharpe N. The significance of spermatozoa in victims of sexual offences. *Canad Med Ass J.* 1963;89:513-4.
๕๖. Green W. Sexual assault and semen persistence. In: Jay AS, editor. *Encyclopedia of forensic sciences.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2000. p. 399-403.
๕๗. Grossin C, Sibille I, Grandmaison G, Banasr A, Brion F, Durigon M. Analysis of 418 cases of sexual assault. *Forensic Sci Int.* 2003;131:125-30.
๕๘. Charlier P, Mathelin L, Benredjem L, Grandmaison G. Declining of spermatozoa viability in forensic practice: A consequence of environmental hazards? *Medical Hypotheses.* 2011;77:308-13.
๕๙. ห้องปฏิบัติการสเปกโตรสโกปี ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ. เทคนิคทางรามาน. *วารสารเทคโนโลยีและวัสดุ.* ๒๕๕๔;๒๔:๖๐-๖๓.
๖๐. Feine I, Gafny R, Pinkas I. Combination of prostate-specific antigen detection and micro-RAMAN spectroscopy for confirmatory semen detection. *Forensic Sci Int.* 2017 Jan;270:241-7.
๖๑. Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopic signature of semen and its potential application to forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int.* 2009 Dec 15;193(1-3):56-62.
๖๒. Sikirzhyski V, Virkler K, Lednev IK. Discriminant analysis of Raman spectra for body fluid identification for forensic purposes. *Sensors (Basel).* 2010;10(4):2869-84.
๖๓. Soares-Vieira JA, Billerbeck AE, Iwamura ES, Zampieri RA, Gattás GJ, Munoz DR, et al. Y-STRs in forensic medicine: DNA analysis in semen samples of azoospermic individuals. *J Forensic Sci.* 2007;52(3):664-70.
๖๔. Hall A, Ballantyne J. Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci Int.* 2003;136:58-72.
๖๕. Hanson E, Ballantyne J. A Y-short tandem repeat specific DNA enhancement strategy to aid the analysis of late reported (at or more than 6 days) sexual assault cases. *Med Sci Law.* 2014 Oct;54(4):209-18.
๖๖. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci.* 2008;53:296-305.

๖๗. Silva C, Teixeira A.L, Carneiro de Sousa MJ, Me-deiros R. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* 2015;14:1-10.
๖๘. Sauer E, Reinke AK, Courts C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four micro RNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2016 May;22:89-99.
๖๙. Sterzik V, Panzer S, Apfelbacher M, Bohnert M. Searching for biological traces on different materials using a forensic light source and infrared photography. *Int J Legal Med.* 2016 May;130(3): 599-605.
๗๐. Vandenberg N, Van Oorschot RA. The use of Polilight in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *J Forensic Sci.* 2006 Mar;51(2):361-70.

Abstract

Semen detection in forensic medicine

Papanu Suttipasit

Forensic department, Siriraj hospital, Mahidol University

Identification of semen is one of the most important evidence of sexual assault by male and influence to the court judgement. Till now, Identification of semen is only sperm detection. Presumptive tests in Thailand are Zinc test, Acid phosphatase test, Prostate specific antigen test and Semenogelin test. The Semenogelin test is the most reliable preliminary test at present. The Y-STR can be only personal identification but it could not be semen identification. The alternate light sources can also be use as presumptive semen stain identification at scene. In the future, RAMAN and/or the miRNAs could be confirmation of semen identification and standard laboratory testing for semen detection will be miRNAs and Y-STR/DNA. All of the semen detection tests have their weakness so even if all of the tests result in negative, it is not mean that there is no semen.

Key words: Semen detection, Zinc test, Acid phosphatase test, PSA test, Semenogelin test, Sperm detection