Original Articles/นิพนธ์ต้นฉบับ

ความไวในการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิด้วยวิธี ELISA*

ปริมล เบ็ดเสร็จ วท.บ.[1], สุภาวรรณ เศรษฐบรรจง พบ.[2], สุวิทย์ ลิมาวงษ์ปราณี ปรด.[3], ปัทมา เอกโพธิ์ ปรด.[4]

[1] นักศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
[2] ภาควิชานิติเวชศาสตร์, [3] ภาควิชาปรสิตวิทยา, [4] ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิและศึกษาความไวในการตรวจด้วยวิธีดังกล่าว

วิธีการศึกษา: เป็นการวิจัยเชิงการทดลอง (experimental research) โดยใช้ตัวอย่างน้ำอสุจิรวมที่ได้รับการบริจาคจากอาสาสมัครชายไทยที่มีสุขภาพดี งดการมีเพศสัมพันธ์หรือการสำเร็จความใคร่ด้วยตนเองอย่างน้อย 5 วัน จำนวน 20 คน อายุ 23-55 ปี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม พ.ศ. 2554 ตัวอย่างน้ำอสุจิทั้งหมดถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป ในการศึกษานี้ใช้วิธีการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากด้วยวิธี ELISA ตามที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้วโดยดัดแปลงและปรับสภาวะบางอย่างเพื่อให้เหมาะสมต่อการตรวจที่สุด เมื่อคำนึงถึงชนิดของสารละลาย อัตราการเจือจางและส่วนประกอบของสารละลายแต่ละชนิด และระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจ จากนั้นจึงทำการศึกษาความไวของการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิ

ผลการศึกษา: ผู้วิจัยได้รายงานวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากที่ได้ดัดแปลงและปรับสภาวะให้เหมะสมสำหรับการตรวจด้วยวิธี ELISA และพบว่าวิธี ELISA สามารถตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจาง $1:10^6$ เท่า ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 0.56 ± 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุป: วิธี ELISA เป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูงต่อการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิ จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิที่ใช้เป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างวัตถุพยานจำนวนมาก และสำหรับการตรวจวิเคราะห์แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในการศึกษาวิจัยต่อไปด้วย

คำสำคัญ: Enzyme-linked immunosorbent assay, ความไว, การตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิ, แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก

Corresponding Author: ผศ.พญ. สุภาวรรณ เศรษฐบรรจง, พ.บ., น.บ., วท.ม.
ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700
โทรศัพท์ 02-419-6547 โทรสาร 02-411-3426 อีเมล์ : supawon.sre@mahidol.ac.th

* การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

ในคดีข่มขืนกระทำชำเรา การตรวจพบน้ำอสุจิในช่องคลอด ในทวารหนัก หรือในช่องปากของเหยื่อเป็นพยานหลักฐานสำคัญที่ใช้ยืนยันว่ามีการกระทำชำเราเกิดขึ้นจริง ในกรณีที่ผู้กระทำชำเราสอดใส่อวัยวะเพศชายเข้าไปในช่องคลอด ช่องทวารหนัก หรือช่องปากของเหยื่อจนสำเร็จความใคร่[1] โดยทั่วไปแล้วการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิมี 2 ประเภท คือ การตรวจหาเซลล์อสุจิและส่วนประกอบของเซลล์อสุจิ ซึ่งการตรวจหาเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีมาตรฐานและมีความน่าเชื่อถือที่สุด ส่วนการตรวจหาส่วนประกอบของเซลล์อสุจิเป็นวิธีที่รายงานไม่นานนักและค่อนข้างซับซ้อนกว่ามาก และการตรวจหาสารต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของน้ำอสุจิ[2] โดยเฉพาะแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก (prostate specific antigen หรือ PSA) ซึ่งปัจจุบันใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิที่มีความน่าเชื่อถือรองลงมาจากการตรวจหาเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทั้งในกรณีที่เหยื่อยังมีชีวิตอยู่[2-4] เสียชีวิตแล้ว[5,6] หรือเน่าเปื่อย[7]

แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิของมนุษย์ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 โดย Flocks และคณะ[8] และถูกแยกให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายใหม่ในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1978 โดย Sensabaugh[9] แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากนี้เป็นไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งที่ผลิตจากต่อมลูกหมาก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน อยู่ภายใต้การควบคุมของสารพันธุกรรมโดยตรง มีความจำเพาะต่อน้ำอสุจิมนุษย์ มีความเสถียรในสภาวะที่แห้งหรือแช่แข็ง และตรวจพบได้แม้มีปริมาณเพียงเล็กน้อย จึงใช้การตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากเป็นวิธีการตรวจยืนยันน้ำอสุจิเพื่อใช้เป็นพยานหลักฐานในคดีข่มขืนกระทำชำเรา โดยเฉพาะในกรณีที่ชายไม่ผลิตเซลล์อสุจิหรือผ่านการทำหมันมาแล้ว[2-7,10] ซึ่งวิธีการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากนี้มีหลายวิธี เช่น วิธี Ouchterlony double diffusion, วิธี crossed-over immunoelectrophoresis, วิธี rocket immunoelectrophoresis, วิธี radial immunodiffusion, วิธี enzyme-linked immmunosorbent assay (ELISA), วิธี chromatographic immunoassay (CIA-direct read), วิธี antigen-specific monoclonal antibody membrane tests เช่น Abacus OneStep ABAcard, วิธี dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay (DELFIA) และวิธี nano-particle DNA เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวในการตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากได้ต่างกัน เช่น วิธี rocket immunoelectrophoresis สามารถตรวจพบในระดับ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, วิธี chromatographic immunoassay สามารถตรวจพบในระดับ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, วิธี ELISA สามารถตรวจพบในระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, วิธี Abacus OneStep ABAcard สามารถตรวจพบในระดับ 4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, วิธี DELFIA สามารถตรวจพบในระดับ 0.003 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี nano-particle DNA สามารถตรวจพบในระดับที่ต่ำกว่านั้นอีกเป็นต้น[2]

วิธี ELISA เป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก นอกจากมีความไวในการตรวจสูงกว่าวิธี immunoelectrophoresis มาตรฐานแล้ว ยังมีข้อดีอีกหลายประการ เช่น สามารถทำให้เป็นมาตรฐานเดียวกันและควบคุมคุณภาพได้สูงกว่าวิธีอื่น เป็นเครื่องมือที่มักมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทางคลินิก ใช้ผู้ตรวจที่มีทักษะในการตรวจระดับต่ำถึงปานกลาง และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำกว่าวิธีอื่น โดยเฉพาะเมื่อคำนึงถึงค่าแรงงานต่อตัวอย่างด้วยแล้วจึงมีค่าใช้จ่าย-ประสิทธิผลสูงกว่าการตรวจหาเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์[2,11] สำหรับชุดตรวจสำเร็จรูปแม้จะมีวิธีการตรวจที่ง่ายกว่าและใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า แต่มีความไวน้อยกว่าและไม่สามารถตรวจหาปริมาณได้[2,12] ส่วนวิธี DELFIA และวิธี nano-particle DNA แม้จะมีความไวในการตรวจมากกว่า แต่ใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อนกว่า มีค่าใช้จ่ายสูงกว่า และมีวิธีการตรวจตลอดจนการแปลผลการตรวจที่ใช้ทักษะมากกว่า[13,14] ทั้งไม่มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจในระดับที่ต่ำมากเช่นนั้น ซึ่งอาจให้ผลบวกเท็จได้ เนื่องจากสารคัดหลั่งในช่องคลอดและสารคัดหลั่งชนิดอื่นของหญิงมีแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยแต่ในปริมาณที่ต่ำกว่ามาก[2,3,15]

ในต่างประเทศได้ใช้วิธี ELISA ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากทั้งที่อยู่ในน้ำอสุจิและในของเหลวจากช่องคลอดของหญิงภายหลังการมีเพศสัมพันธ์หรือถูกข่มขืนกระทำชำเรามานานหลายปีแล้วและมีหลายรายงานที่ศึกษาความไวของการตรวจด้วยวิธีนี้ด้วย[11,16-19] สำหรับประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการนำวิธี ELISA มาใช้ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิมาก่อนเลย และยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความไวของการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวด้วย ถึงแม้จะมีรายงานการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากใน

ของเหลวจากช่องคลอดของหญิงภายหลังการถูกข่มขืนกระทำชำเราด้วยวิธี ELISA บ้างแล้วก็ตาม[4,5] แต่ในรายงานดังกล่าวไม่ได้พรรณนาวิธีการตรวจไว้ด้วย ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในตัวอย่างน้ำอสุจิของชายไทย และศึกษาความไวในการตรวจด้วยวิธีดังกล่าว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลอ้างอิงในการนำวิธี ELISA มาใช้ในการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิที่ใช้เป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์และในการตรวจวิเคราะห์แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิในการศึกษาวิจัยต่อไปด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิของชายไทย และศึกษาความไวในการตรวจด้วยวิธีดังกล่าว

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงการทดลอง (experimental research) โดยใช้ตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้รับบริจาคจากอาสาสมัครชายไทยในช่วงระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม พ.ศ. 2554 โดยผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (Si 682/2010)

1.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย เป็นตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้รับบริจาคจากอาสาสมัครชายไทย จำนวน 20 คน โดยมีเกณฑ์คัดเข้าคือ อาสาสมัครชายสัญชาติไทยที่มีสุขภาพดี มีอายุระหว่าง 20-60 ปี งดการมีเพศสัมพันธ์หรือสำเร็จความใคร่ด้วยตนเองก่อนการเก็บน้ำอสุจิอย่างน้อย 5 วัน และสมัครใจเข้าร่วมการวิจัยโดยรับทราบและปฏิบัติตามเงื่อนไขของการวิจัยพร้อมทั้งลงลายมือชื่อให้ความยินยอมในเอกสารการยินยอมเข้าร่วมการวิจัยที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนฯ และมีเกณฑ์คัดออก คือ อาสาสมัครที่มีไข้หรือเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ภายใน 5 วันก่อนและขณะเก็บตัวอย่าง

1.2 วิธีเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยให้อาสาสมัครแต่ละคนหลั่งน้ำอสุจิด้วยวิธีการสำเร็จความใคร่ด้วยตนเองและเก็บน้ำอสุจิในภาชนะที่จัดเตรียมไว้ให้ซึ่งติดสลากหมายเลข 1, 2, 3, ... เรียงต่อเนื่องกันไปตามลำดับ แล้วทำการบันทึกคุณลักษณะของน้ำอสุจิ ได้แก่ ปริมาณ สี และความข่น แล้วนำตัวอย่างน้ำอสุจิเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ เมื่อเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิได้ครบจำนวนแล้ว จึงนำตัวอย่างน้ำอสุจิทั้งหมดมารวมกันแล้วคนให้ทั่วจนเข้ากันดี (pooled semen samples) จากนั้นแบ่งตัวอย่างใส่ไว้ในหลอดจิ๋ว (eppendorf tubes) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลอด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°ซ เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2. การตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก โดยวิธี ELISA

ทำการปรับหาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้ผลดีในการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิ ด้วยวิธี ELISA ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Stowell และคณะ[19] ทั้งในส่วนของชนิดของสารละลาย อัตราส่วนการเจือจางและส่วนประกอบของสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา จนได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ จากนั้นจึงทำการทดสอบความไวของการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก ดังนี้

เคลือบถาดหลุม (flat-bottomed Maxisorp polystyrene Nunc-Immuno plate®, 442404 Kamstrup, Denmark) ด้วย polyclonal rabbit anti-human prostate-specific antigen (Dako®, A0562, Denmark) โดยเจือจาง 1:1,000 ด้วย 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6) แล้วทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4°ซ เมื่อครบระยะเวลา ล้าง 3 ครั้งด้วย washing buffer (phosphate buffered saline ที่ประกอบด้วย 0.05% Tween-20, pH 7.4) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยใช้เครื่องล้างอัตโนมัติ (BioTek®, ELx50, USA) เติม blocking buffer (phosphate buffered saline ที่ประกอบด้วย 0.05% Tween-20 และ 1% bovine serum albumin) ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำให้แห้งโดยใช้เครื่องล้างอัตโนมัติ

เติมตัวอย่างน้ำอสุจิโดยเจือจางตัวอย่างน้ำอสุจิในอัตรา 1:1x10^6, 1:2x10^6, 1:4x10^6, 1:8x10^6, และ 1:16x10^7 ด้วย phosphate buffered saline ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม พร้อมกับตัวอย่างควบคุมบวก (ใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อ

มิลลิลิตร) และตัวอย่างควบคุมลบ (ใช้ phosphate buffered saline) ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้างอัตโนมัติ เติม monoclonal mouse anti-human prostate-specific antigen (Dako®, MO750-29, Denmark) เจือจาง 1:1,000 ใน blocking buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง 3 ครั้ง ด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้างอัตโนมัติ เติม goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate (MERCK®, 401207, Germany) เจือจาง 1:2,000 ใน blocking buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างครั้งสุดท้าย 3 ครั้ง ด้วย washing buffer โดยใช้เครื่องล้างอัตโนมัติ เติมสารละลายตั้งต้น (สารละลายที่มีส่วนประกอบของ O-phenylenediamine) (Dako®, S2045, Denmark) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ในที่ปราศจากแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 4.2 M H_2SO_4 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) จากปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องอ่านอัตโนมัติ (SUNRISE®, TECAN, Austria) ที่ความยาวคลื่น 610 และ 490 นาโนเมตร และแปลผลการตรวจ โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจซ้ำสองครั้ง (duplicate) และในกรณีที่เป็นการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากจะทำการตรวจตัวอย่างละ 6 ตัวอย่างย่อย

3. กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากภายในวันเดียวกัน

การตรวจสอบคุณภาพของการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิด้วยวิธี ELISA โดยกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากภายในวันเดียวกัน (Within day assay) สามารถทำได้โดยการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แท้จริงจากการเจือจางแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐาน (PSA standard) ในอัตราต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยทำการตรวจภายในวันเดียวกัน จากนั้นจึงนำมาสร้างกราฟมาตรฐานที่เรียกว่า “calibration curve” (รูปที่ 1)

สำหรับการตรวจสอบกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากภายในวันเดียวกัน โดยใช้ independent t-test ได้ค่า p-value = 0.915 > 0.05 พบว่า ความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่เจือจางกับที่ตรวจได้มีค่าไม่แตกต่างกัน (95% CI: -0.13188 ถึง 0.1198) ดังนั้นสามารถเลือกใช้กราฟมาตรฐานในช่วง 10 ความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากได้ คือ 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสหสัมพันธ์ (r^2) = 0.99 และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นในการตรวจแต่ละครั้ง จึงทำการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากภายในวันเดียวกัน (within day assays) ในแต่ละวันที่ทำการทดลองในถาดเดียวกันกับที่ใช้ตรวจหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากของการทดลองในวันนั้น

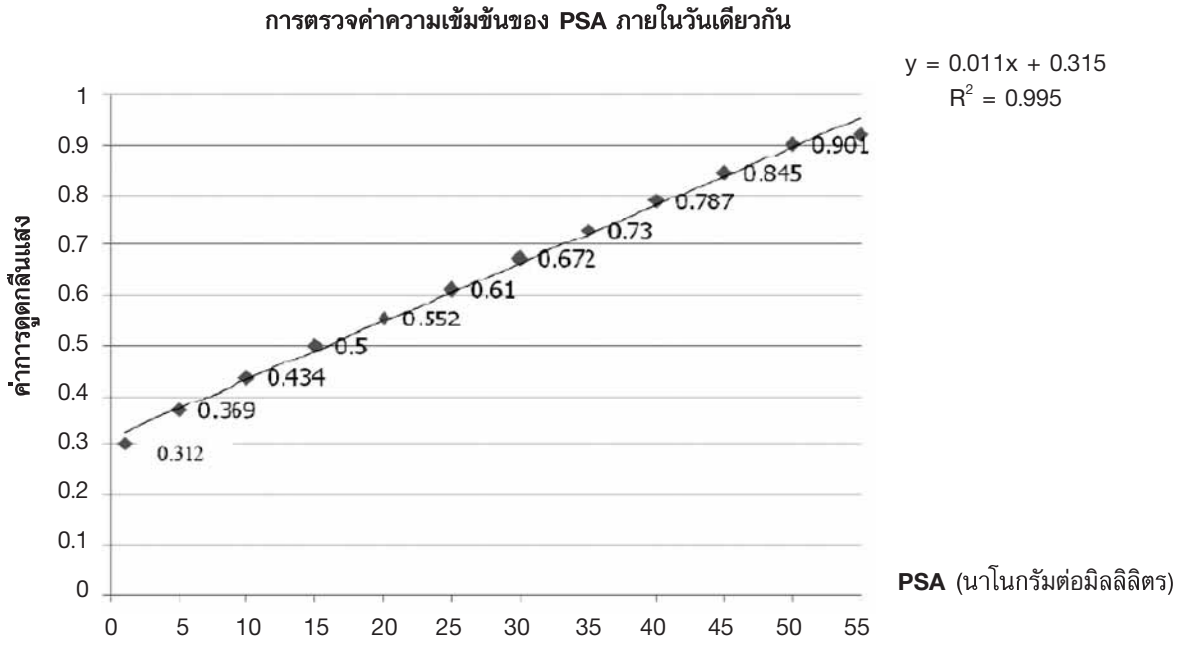
4. กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากระหว่างวัน

กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากระหว่างวัน (Between day assay) สามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก โดยทำการตรวจวันละครั้ง เป็นระยะเวลา 10 วัน (รูปที่ 2)

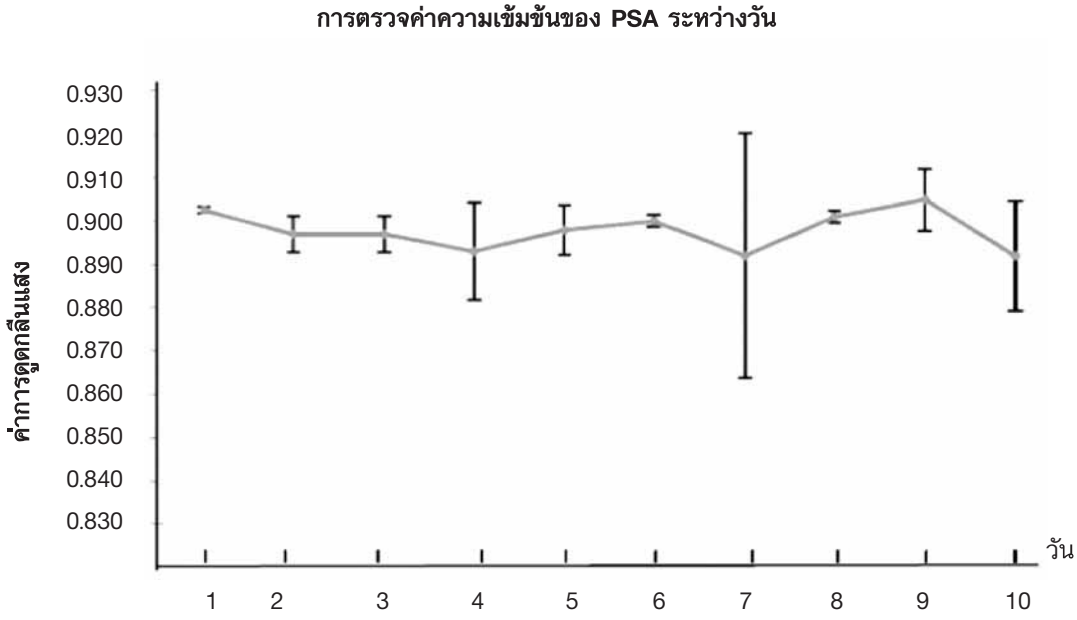
ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยในแต่ละวันมีค่าร้อยละความแตกต่าง 0.07, 0.42, 0.42, 1.13, 0.56, 0.14, 2.82, 0.14, 0.70 และ 1.27 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าแต่ละค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมีค่าร้อยละความแตกต่างไม่เกิน 10% ของค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient variation หรือ CV) จึงยอมรับได้ และสามารถคำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากได้ดังนี้ 53.50, 53.00, 53.36, 52.63, 53.09, 53.27, 52.54, 53.36, 53.72 และ 52.54 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 18.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, Illinois, USA) ในการวิเคราะห์ โดยรายงานในลักษณะของสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่



รูปที่ 1 *กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากภายในวันเดียวกัน โดยใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่เจือจางในระดับความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากสามารถคำนวณได้จากสมการ Y = 0.011X + 0.315 (โดย Y คือค่าความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมาก และ X แทนค่าการดูดกลืนแสง (OD): 0.312, 0.369, 0.434, 0.5, 0.552, 0.61, 0.672, 0.73, 0.787, 0.845, 0.901 และ 0.918) : 1.09, 5, 10.54, 16.90, 21.45, 26.90, 32.36, 36.90, 28.54, 47.81 และ 53.27 ตามลำดับ*



รูปที่ 2 *กราฟมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากระหว่างวัน (Between day assays) โดยตรวจซ้ำ 10 วัน (x เป็นค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย ส่วน I เป็นค่าร้อยละความแตกต่าง) และแต่ละค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยมีค่าร้อยละความแตกต่างไม่เกิน 10% ของค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (coefficient variation หรือ CV)*

ร้อยละ ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการตรวจสอบกราฟมาตรฐานที่ทำการตรวจภายในวันเดียวกัน (calibration curve) โดยใช้สถิติ independent t-test ที่ p-value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ตัวอย่างน้ำอสุจิจากอาสาสมัครที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย จำนวน 20 คน อายุ 23-55 ปี (ค่าเฉลี่ย ± 32.88 10.17 ปี, ค่ากลาง 29 ปี และฐานนิยม 24 ปี)

ผลการศึกษาความไวของการตรวจแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากด้วยวิธี ELISA ปรากฏตามรูปที่ 3 โดยแสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่การเจือจางน้ำอสุจิในระดับต่างๆ ($1:1x10^6$, $1:2x10^6$, $1:4x10^6$, $1:8x10^6$ และ $1:16x10^6$) และตารางที่ 1 โดยแสดงค่าความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจางหนึ่งล้านเท่า ($1:1x10^6$)

อภิปรายผลการศึกษา

วิธีแรกที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาตกตะกอนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยวิธี diffusion หรือ electrophoresis[10] ส่วนวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าได้มีผู้ศึกษาและพรรณนาไว้แล้ว[11,16-19] วิธี ELISA ที่ใช้ในการศึกษาที่ผ่านมาประกอบด้วย 2 วิธีย่อย คือ วิธีโดยอ้อม (indirect assay) อาศัยแอนติเจนที่อยู่นิ่ง

	$1:1x10^6$		$1:2x10^6$		$1:4x10^6$		$1:8x10^6$		$1:16x10^6$			
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	0.321 (+)	0.320 (+)	0.284 (-)	0.278 (-)	0.210 (-)	0.242 (-)	0.190 (-)	0.231 (-)	0.108 (-)	0.110 (-)	0.078 (-)	0.070 (-)
B	0.322 (+)	0.318 (+)	0.276 (-)	0.270 (-)	0.208 (-)	0.190 (-)	0.193 (-)	0.210 (-)	0.122 (-)	0.119 (-)	0.550 (+)	0.557 (+)
C	0.320 (+)	0.320 (+)	0.301 (-)	0.295 (-)	0.241 (-)	0.249 (-)	0.183 (-)	0.175 (-)	0.101 (-)	0.107 (-)		
D	0.321 (+)	0.318 (+)	0.290 (-)	0.297 (-)	0.250 (-)	0.248 (-)	0.201 (-)	0.196 (-)	0.009 (-)	0.013 (-)		
E	0.320 (+)	0.320 (+)	0.289 (-)	0.300 (-)	0.227 (-)	0.220 (-)	0.204 (-)	0.192 (-)	0.190 (-)	0.185 (-)		
F	0.321 (+)	0.320 (+)	0.278 (-)	0.284 (-)	0.241 (-)	0.251 (-)	0.187 (-)	0.185 (-)	0.150 (-)	0.139 (-)		
G	0.365 (+)	0.373 (+)	0.428 (+)	0.440 (+)	0.500 (+)	0.498 (+)	0.549 (+)	0.555 (+)	0.610 (+)	0.610 (+)	0.668 (+)	0.676 (+)
H	0.732 (+)	0.728 (+)	0.782 (+)	0.792 (+)	0.846 (+)	0.845 (+)	0.903 (+)	0.902 (+)				

รูปที่ 3 *แบบจำลองถาดหลุมแสดงผลการตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากโดยแสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) และผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น*

แถว A_{1-10}-F_{1-10} เติมตัวอย่างน้ำอสุจิเจือจาง $1:1x10^6$, $1:2x10^6$, $1:4x10^6$, $1:8x10^6$ และ $1:16x10^6$ ตัวอย่างละ 2 หลุมในแถวเดียวกันตามลำดับ และจำนวน 6 ตัวอย่างในคอลัมน์เดียวกัน

แถว A_{11-12} เติมตัวอย่างควบคุมลบ (phosphate buffered saline) 2 หลุมในแถวเดียวกัน

แถว B_{11-12} เติมตัวอย่างควบคุมบวก (แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) 2 หลุมในแถวเดียวกัน

แถว G_{1-12}-H_{1-8} เติมตัวอย่างแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างละ 2 หลุมในแถวเดียวกันตามลำดับ

(+) หมายถึง ผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นปรากฏสีส้มบ่งชี้ว่าได้ผลบวก

(-) หมายถึง ผลปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่ปรากฏสีบ่งชี้ว่าได้ผลลบ

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจาง 1:1x10^6

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.59
2	0.55
3	0.55
4	0.50
5	0.55
6	0.59
ค่าเฉลี่ย (mean)	**0.56**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	**0.03**

จับกับแอนติบอดีที่อยู่ในสารละลาย แล้วตรวจหาปริมาณแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีต่างชนิดกันที่ติดสลากด้วยเอนไซม์[16] และวิธีแซนวิช (sandwich assay) อาศัยแอนติบอดีที่อยู่นิ่งจับกับแอนติเจนที่อยู่ในสารละลาย แล้วตรวจหาปริมาณแอนติเจนโดยใช้แอนติบอดีชนิดเดียวกันที่ติดสลากด้วยเอนไซม์[17] หรือโดยใช้แอนติบอดีต่างชนิดกันที่ติดสลากด้วยเอนไซม์[11,18-19] ซึ่งวิธีแซนวิชมีความไวมากกว่าวิธีโดยอ้อมที่ทำการศึกษาโดย Stubbings และ Newall[16] ที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจาง 1:10^4 ด้วย

งานวิจัยนี้จึงใช้วิธีแซนวิชในการศึกษาหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิของชายไทย โดยดัดแปลงจากวิธีของ Stowell และคณะ[19] ทั้งในส่วนของชนิดของสารละลาย อัตราส่วนการเจือจางสารละลายต่างๆ และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาด้วย จนได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ตรวจหาปริมาณแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิตามที่ได้พรรณนาไว้แล้วในส่วนของวิธีดำเนินงานวิจัยข้างต้น โดยการศึกษานี้ใช้แอนติบอดีที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Stowell และคณะ[19] ที่ใช้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเอง จึงต้องมีการปรับสภาวะบางอย่างให้เหมาะสม ซึ่งภายหลังจากการเคลือบถาดหลุมด้วยแอนติบอดีแล้วทิ้งไว้ค้างคืนก็สามารถทำการตรวจวิเคราะห์เสร็จภายใน 4-5 ชั่วโมงเท่านั้น และสามารถทำการตรวจหลายตัวอย่างในขณะเดียวกันได้ ซึ่งหากมีจำนวนตัวอย่างมากจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรวจถูกลงอย่างมากและประหยัดเวลาด้วย

ส่วนการศึกษาความไวของการตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากด้วยวิธี ELISA พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจางถึงหนึ่งล้านเท่า (1:10^6) ที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 0.56 $\pm$ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาของ Kamenev และคณะ[18] และ Stowell และคณะ[19] ที่ตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิที่เจือจาง 1:10^6 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Johnson และ Kotowski[11] ที่พบว่าวิธีนี้สามารถตรวจพบแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากได้แม้มีความเข้มข้นน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในระดับความไวดังกล่าวไม่พบว่าตรวจได้ผลบวกเท็จกับสารคัดหลั่งต่างๆ รวมทั้งสารคัดหลั่งในช่องคลอดของหญิงด้วย[10,11,16-19] และมีความไวมากกว่าวิธีของ Graves และคณะ[17] ที่ตรวจพบแอนติเวนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในสารคัดหลั่งต่างๆ ของร่างกายที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด 3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรด้วย

สรุป

วิธี ELISA เป็นวิธีที่กระทำได้ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูงต่อการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากในน้ำอสุจิ จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจพิสูจน์น้ำอสุจิที่ใช้เป็นงานประจำในห้องปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์ โดยเฉพาะในกรณีที่มีตัวอย่างวัตถุพยานจำนวนมาก และสำหรับการตรวจวิเคราะห์แอนติเจนที่จำเพาะต่อต่อมลูกหมากที่ใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจาก “ทุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษาคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล” ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติแก้ไขเพิ่มเติมประมวลกฎหมายอาญา (ฉบับที่ 19) พ.ศ. 2550 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนที่ 56 ก วันที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2550 หน้า 1-4.
2. Mauck CK. Biomarkers of semen exposure. Sex Transm Dis 2009;36(Suppl):81-3.
3. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic Sci Int 2009;188:1-17.
4. Peonim V, Chirachariyavej T, Atamasirikul K, Talthip J. Comparable between rapid one step immunochromatographic assay and ELISA in the detection of prostate specific antigen in vaginal specimens of raped women. J Med Assoc Thai 2007;90:2624-8.
5. Talthip J, Chirachariyavej T, Peonim V, Atamasirikul K, Teerakamchai S. An autopsy report case of rape victim by the application of PSA test kit as a new innovation for sexual assault investigation in Thailand. J Med Assoc Thai 2007;90:348-51.
6. Levine B, Titus JM, Moore K, Fowler D. Use of prostate specific antigen in the identification of semen in postmortem cases. Am J Forensic Med Pathol 2004;25:288-90.
7. Healy DA, Hayes CJ, Leonard P, McKenna L, O'Kennedy R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. Trends Biotechnol 2007;25:125-31.
8. Flocks RH, Urich VC, Patel CA, Opitz JM. Studies on the antigenic properties of prostatic tissue. J Urol 1960;84:134-43.
9. 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.
10. Poyntz FM, Martin PD. Comparision of PSA and acid phosphatase levels in post coital vaginal swabs from donor and casework studies. Forensic Sci Int 1984;24:17-25.
11. Johnson ED, Kotowski TM. Detection of prostate specific antigen by ELISA. J Forensic Sci 1993;38:250-8.
12. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig, UB, Thali M, Dirnhofer R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. J Forensic Sci. 1999; 44:1057-60.
13. Smith DR, Rossi CA, Kijek TM, Henchal EA, Ludwig GV. Comparison of dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassays to enzyme-linked immunosorbent assays for detection of staphylococcal enterotoxin B, Yersinia pestis-specific F1 antigen, and Venezuelan equine encephalitis virus. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:1070-5.
14. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-barcodes for the ultrasensitive detection of proteins. Science 2003;301:1884-6.
15. Diamandis EP, Yu H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. J Urol Clin North Am 1997;24:275-82.
16. Stubbings NA, Newall PJ. An evaluation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and PSA determinations for the identification of semen on post coital vaginal swabs. J Forensic Sci 1985;30:604-14.
17. Graves HCB, Sensabaugh GF, Blake ET. Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. N Engl J Med. 1985;312:338-43.
18. Kamenev L, Leclercq M, Francosis-Gerard C. An enzyme immunoassay for prostate-specific antigen detection in the postcoital vaginal tract. J Forensic Sci Soc 1989;29:233-41.
19. Stowell LI, Sharman LE, Hamel K. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for prostate-specific antigen. Forensic Sci Int 1991;50:125-38.

Original Articles/นิพนธ์ต้นฉบับ

The Sensitivity of the Detection of Prostate Specific Antigen in Semen by ELISA.

Betset P, B.Sc.[1], Srettabunjong S, MD.[2], Limawongpanee S, Ph.D.[3], Ekpo P, Ph.D.[4]

[1] Graduate student in master degree of science program in Forensic Science, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Graduate School, Mahidol University. [2] Department of Forensic Medicine, [3] Department of Parasitology, [4] Department of Immunology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

Abstract

Background: In rape cases, examination of biological evidence, especially semen, is very important to identify whether the alleged crime actually happened, resulting in solving the cases. Prostate-specific antigen (PSA) is an ideal forensic marker for semen identification, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been described for many years and found to be still one of the sensitive and efficient methods for PSA detection.

Objective: The purposes of this study were to optimize the assay conditions regarding reagents used and assay time and to determine its sensitivity for the detection of PSA in semen.

Materials and Method: The semen samples were obtained from 20 consenting healthy Thai male volunteers aged 23-55 years during February-March 2011. All semen samples were stored at -80°C shortly after being secreted from the volunteers' body and until being used for the analyses. The ELISA method performed in the study followed the previously reported protocol with some optimization. The sensitivity of ELISA in detecting PSA in semen was then studied.

Results: An optimal ELISA condition for the detection of PSA was described with consideration for reagents used and assay time. For sensitivity, the authors found that this method was easily capable of detecting PSA in semen diluted approximately 10^6 fold with the concentration of 0.56 ± 0.03 ng/ml.

Conclusion: The optimal conditions of an ELISA method for the detection of PSA in semen described was found to be one of the sensitive and efficient methods for the detection of PSA in semen for routine analysis in forensic laboratories, especially in case of a lot of the evidence examined daily, and for further research analysis.

Keywords: Enzyme-linked immunosorbent assay, Prostate-specific antigen, Semen identification, Sensitivity

Corresponding Author: Srettabunjong S, M.D., LL.B., M.Sc., M.Tox.
Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, 10700, Thailand. Tel. 02-419-6547 Fax. 02-411-3426 E-mail: supawon.sre@mahidol.ac.th