มาตรฐานการชันสูตรโรควัณโรค–การตรวจทางพยาธิวิทยา (Tuberculosis)

1. บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังเกิดจากการติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. พยาธิสภาพของโรคจะมีรูปแบบแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อและชนิดของสัตว์ที่ติดโรค

พยาธิกำเนิด

เมื่อสัตว์ได้รับเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ macrophage จะพยายามเก็บกินเชื้อ ทำให้เชื้อบางส่วนถูกทำลาย แต่ไม่สามารถทำลายได้หมด เซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวที่ไม่สามารถทำลายเชื้อได้จะตาย ทำให้เชื้อถูกปล่อยออกมาและเพิ่มจำนวนมากขึ้น เชื้อที่ถูกปล่อยออกมานั้นจะสร้างสารไปกระตุ้นที-เซลล์ T-cell ที่อยู่ใกล้ๆ ทำให้เกิด mediated hypersensitivity และทำให้เกิดรอยโรค รอยโรคจะพบในต่อมน้ำเหลืองในบริเวณที่ติดเชื้อหลังจากนั้นจะแพร่ไปยังต่อมน้ำเหลืองอื่นๆ และเชื้อบางส่วนจะหลุดเข้าสู่กระแสเลือดทำให้เกิด hematogenous dissemination

รอยโรคที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

พบตุ่มเล็กๆ ที่มีลักษณะเฉพาะเรียกว่า tubercle มีรูปร่างไม่แน่นอน และขนาดต่างๆ กัน มีสีเหลืองปนเทา หรือสีเหลืองปนขาว สามารถตรวจพบได้ในอวัยวะภายในต่างๆ เมื่อฝานดูหน้าตัดจะพบลักษณะของ caseous mass มีสีเหลือง ในสัตว์บางชนิดจะพบ calcification ในบริเวณนี้

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

ในอวัยวะที่ติดเชื้อจะพบการอักเสบแบบ tuberculous granulomatous ซึ่งแบ่งเป็น 3 โซน ในบริเวณโซนตรงกลางของรอยโรคจะพบลักษณะเนื้อตายชนิด caseous necrosis ล้อมรอบด้วย epithelioid และ Langhans giant cell ลักษณะของ epithelioid จะมีขนาดใหญ่ nucleus มีลักษณะเป็น vesicular ส่วน cytoplasm ติดสีชมพูจางและขอบเขตไม่ชัดเจน จะอยู่ปะปนกับ Langhans giant cell ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ประกอบด้วยหลายๆ nucleus เรียงรายรอบๆ ขอบเซลล์ เรียกว่า eccentric nucleus ซึ่งเกิดจากการ fusion ของ macrophage ถัดออกมาเป็นโซนที่สองประกอบด้วย lymphocyte และ plasma cell โซนนอกสุดจะเป็น fibrous tissue จำนวนมาก เรียงตัวห่อหุ้มรอยโรคทั้งหมดเป็นลักษณะของ encapsulation เพื่อกักเชื้อไม่ให้แพร่กระจาย ต่อมาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหล่านี้จะกลายเป็น hyalin scar tissue นอกจากนี้อาจจะเกิด calcification ในบริเวณตรงกลางของรอยโรค ซึ่งจะพบได้ในสัตว์บางชนิดยกเว้นสัตว์ปีก

การย้อมสี acid fast จะทำให้ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* spp. ได้ ซึ่งจะพบในบริเวณ caseous necrosis epithelioid และ Langhans giant cells แต่จะต้องมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมาก ไม่ต่ำกว่า 10^6/น้ำหนัก 1 กรัม ของเนื้อเยื่อและต้องเป็นเชื้อที่ยังไม่ถูกทำลาย ถ้าเชื้อถูกทำลายหรือมีจำนวนน้อยเกินไปจะย้อมไม่ติดสี จำเป็นต้องตรวจด้วยวิธีอื่นคือ immunohistochemistry ดังนั้น ในคู่มือนี้จะกล่าวถึงวิธีการชันสูตรวัณโรคด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

1. การย้อมสี Hematoxylin-eosin staining (H&E) เพื่อตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา
2. การย้อมสี Ziehl-Neelsen (ZN) ซึ่งเป็นการย้อมสี acid fast ชนิดหนึ่ง เพื่อตรวจหาตัวเชื้อ
3. การย้อมสี Kossa เพื่อตรวจหา calcification
4. การตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry เทคนิคเพื่อตรวจหาตัวเชื้ออีกวิธีหนึ่ง

2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บอวัยวะที่มีรอยโรค tubercle แช่ใน 10% buffered formalin โดยให้ปริมาตรของน้ำยาประมาณ 10 เท่าของอวัยวะที่เก็บ ทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง อนึ่งในกรณีที่พบรอยโรค tubercle หรือรอยโรคที่สงสัยเป็น tubercle ไม่ควรผ่าเปิดตรงกลางเพราะจะทำให้เชื้อแพร่กระจายไปในอากาศ

3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางพยาธิวิทยา

นำเนื้อเยื่อที่แช่ใน 10% buffered formalin มาผ่านขบวนการต่างๆ เพื่อทำสไลด์เนื้อเยื่อ ดังนี้ คือ ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) กำจัดสารที่ใช้ดึงน้ำออกมาจากเนื้อเยื่อ (clearing) ทำให้เนื้อเยื่ออิ่มตัวด้วย paraffin (impregnating) การฝังเนื้อเยื่อในบล็อก paraffin (embedding) ตัดเนื้อเยื่อเพื่อวางบนสไลด์ (sectioning) และย้อมสี (staining)

3.1 การย้อมสี Hematoxylin-eosin (H&E)

หลักการ

Hematoxylin เป็นสีที่มีฤทธิ์เป็นด่างจึงทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเนื้อเยื่อที่เป็นกรดเช่น nucleus mitochondria hemaglobin เป็นต้น จึงเรียกปฏิกิริยานี้ว่า basophilic staining ส่วน eosin เป็นสีที่มีฤทธิ์เป็นกรดจึงสามารถย้อมองค์ประกอบของเนื้อเยื่อที่เป็นด่าง เช่น ส่วนประกอบโปรตีนในcytoplasm muscle fiber red blood cell เป็นต้น เรียกปฏิกิริยานี้ว่า acidophilic staining

วิธีการ

1. ละลาย paraffinในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยอบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน xylene และนำไปผ่านขบวนการ rehydration โดยแช่ใน ethanol ตั้งแต่ความเข้มสูงลงมาความเข้มข้นต่ำ ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	5 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	1 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที
7.	95% ethanol	5 นาที
8.	95% ethanol	2 นาที
9.	95% ethanol	2 นาที

2. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 5 นาที
3. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสี Mayer's hematoxylin นาน 5-7 นาที
4. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนานอย่างน้อย 15 นาที
5. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสี eosin นาน ½-1 นาที

6. Dehydration โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อลงใน ethanol ตามลำดับดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	95% ethanol	5 นาที
2.	95% ethanol	2 นาที
3.	95% ethanol	2 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที

7. Clearing เพื่อกำจัดสาร ethanol ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ใน xylene ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	5 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	2 นาที

8. ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย coverslip โดยเติม mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

ผล

nucleus : ติดสีน้ำเงิน

cytoplasm : ติดสีชมพูอ่อนจนถึงเข้ม

3.2 การย้อมสี Ziehl – Neelsen (ZN)

หลักการ

cell walls ของเชื้อ *Mycobacterium* spp. จะมีคุณสมบัติทนต่อกรด เมื่อนำมาย้อมด้วยสี carbol fuchsin ตัวแบคทีเรียจะติดสีแดง หลังจากนั้นนำไป decolorizations ด้วยกรด จะยังคงติดสีแดงอยู่

วิธีการ

1. ละลาย paraffin ในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยอบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 30 นาทีหลังจากนั้นนำไปแช่ใน xylene และนำไปผ่านขบวนการ rehydration โดยแช่ใน ethanol ตั้งแต่ความเข้มสูงลงมาความเข้มข้นต่ำ ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	5 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	2 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที

7.	95% ethanol	5 นาที
8.	95% ethanol	2 นาที
9.	95% ethanol	2 นาที

2. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 5 นาที
3. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย carbol fuchsin นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านเพื่อกำจัดสีส่วนเกิน
5. decolorization เนื้อเยื่อด้วย acid alcohol จนกระทั่งเนื้อเยื่อเป็นสีชมพู
6. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 8 นาที
7. นำสไลด์เนื้อเยื่อมา counterstain ด้วยสี methylene blue นาน 1-2 วินาที จะพบว่าเนื้อเยื่อติดสีน้ำเงินจางๆ
8. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยน้ำไหลผ่านจนกระทั่งใส
9. Dehydration โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อลงใน ethanol ตามลำดับดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	95% ethanol	5 นาที
2.	95% ethanol	2 นาที
3.	95% ethanol	2 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที

10. Clearing เพื่อกำจัดสาร ethanol ออกจากเนื้อเยื่อโดยการแช่ใน xylene ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	5 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	2 นาที

11. ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยแผ่น coverslip โดยเติม mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

ผล

acid fast bacilli : ติดสีแดง
เนื้อเยื่ออื่นๆ : ติดสีน้ำเงิน

3.3 การย้อมสี Kossa

หลักการ

เป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาการแทนที่แคลเซียมด้วยโลหะ โดยอาศัยส่วนที่เป็นขั้วลบของเกลือแคลเซียมเป็นหลัก ที่พบมากได้แก่ calcium phosphate และ carbonate เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับโลหะแล้วทำให้เกลือของแคลเซียมเปลี่ยนเป็นเกลือของโลหะซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยวิธีการต่างๆ ในเทคนิคนี้ นำเนื้อเยื่อมา

ทำปฏิกิริยากับสารละลาย silver nitrate โดย silver ซึ่งเป็นโลหะจะทำปฏิกิริยาแทนที่แคลเซียมเกิดเป็นเกลือของ silver salt ซึ่งเป็นสีเฉพาะที่ตรวจพบได้

วิธีการ

1. ละลาย paraffin ในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยอบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 30 นาทีหลังจากนั้นนำไปแช่ใน xylene และนำไปผ่านขบวนการ rehydration โดยแช่ใน ethanol ตั้งแต่ความเข้มสูงลงมาความเข้มข้นต่ำ ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	5 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	2 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที
7.	95% ethanol	5 นาที
8.	95% ethanol	2 นาที
9.	95% ethanol	2 นาที

2. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่นจน เนื้อเยื่อใส
3. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสารละลาย 5% silver nitrate นาน 6 นาที
4. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสารละลาย 5% sodium thiosulfate นาน 2-3 นาที
6. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 5 นาที
7. นำสไลด์เนื้อเยื่อมา counterstain ด้วยสารละลาย nuclear fast red (NFR) นาน 2-10นาที
8. ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลผ่านนาน 5 นาที

9. Dehydration โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อลงใน ethanol ตามลำดับดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	95% ethanol	5 นาที
2.	95% ethanol	2 นาที
3.	95% ethanol	2 นาที
4.	100% ethanol	5 นาที
5.	100% ethanol	2 นาที
6.	100% ethanol	2 นาที

10. Clearing เพื่อกำจัดสาร ethanol ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ใน xylene ดังนี้:

ภาชนะ	น้ำยา	เวลา
1.	xylene	2 นาที
2.	xylene	2 นาที
3.	xylene	2 นาที

11. ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย coverslip โดยเติม mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

ผล

แคลเซียม : ติดสีดำ

ส่วนประกอบอื่นๆ : ติดสีชมพู

3.4 การตรวจด้วยวิธี Immunohistochemistry : Streptavidin-biotin technique (SAB)

หลักการ

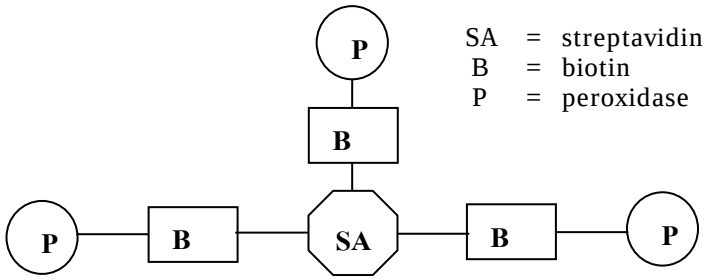
วิธี streptavidin-biotin มีหลักการที่สำคัญ คือ การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโรคที่ต้องการ โดยการจับแอนติเจนดังกล่าวด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นเรียกว่า primary antibody เนื่องจากเป็นแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจน แล้วจับต่อด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อprimary antibody ซึ่งมี biotin 1 โมเลกุล ติดอยู่ (biotinylated immunoglobulin) เรียกว่า secondary antibody จากนั้นจับต่อด้วย streptavidin-biotin peroxidase complex เหตุผลของการจับกันอย่างแน่นหนาของปฏิกิริยาดังกล่าวมีดังนี้

1. Primary antibody ถูกผลิตขึ้นมาให้มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาเท่านั้นโดยการฉีดแอนติเจนของโรคที่ต้องการตรวจให้แก่สัตว์ เช่น กระต่ายหรือหนูทดลอง เพื่อให้สัตว์ดังกล่าวสร้างแอนติบอดีขึ้นมา ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวจะมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ฉีดเข้าในร่างกายและจะสามารถจับกับแอนติเจนนี้ได้เสมอไม่ว่าแอนติเจนนี้จะอยู่ในเนื้อเยื่อใดหรือในสภาพใด

2. Secondary antibody คือ แอนติบอดี ที่ถูกผลิตขึ้นมาให้มีความจำเพาะต่อ primary antibody โดยการใช้หลักความจำเพาะของชนิดสัตว์ (species specific) ผลิตโดยฉีด immunoglobulin ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของแอนติบอดีของสัตว์ชนิดหนึ่งให้แก่สัตว์อีกชนิดหนึ่ง จากนั้นสัตว์ที่ได้รับ immuno-globulin ก็จะสร้างแอนติบอดีต่อ immunoglobulin ที่ได้รับ เช่น เมื่อฉีด immunoglobulin ของกระต่ายให้แพะ แพะก็จะสร้างแอนติบอดีต่อ immunoglobulin เรียกว่า goat anti-rabbit immunoglobulin ดังนั้นถ้าใช้ primary antibody ที่ผลิตจากกระต่าย ก็จะสามารถถูกจับได้อย่างจำเพาะโดย goat anti-rabbit immunoglobulin ได้เป็นอย่างดี และเพื่อจะทำให้สามารถจับกับ streptavidin-biotin peroxidase complex ในขั้นตอนต่อไปได้ จึงต้องนำ biotin ไป conjugate กับแอนติบอดีนี้ เรียกเป็น biotinylated immunoglobulin ในกรณีของการฉีด immunoglobulin ของกระต่ายให้แพะเรียกเต็มๆ ว่า biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin

3. Streptavidin-biotin peroxidase complex ประกอบด้วย streptavidin 1 โมเลกุล biotin 3 โมเลกุล ซึ่ง biotin ทั้ง 3 โมเลกุลจะ conjugate ด้วย peroxidase (ดังรูป) streptavidin มี คุณสมบัติคล้าย avidin ซึ่งเป็นโปรตีนในไข่ขาวมี affinity ที่จะจับ biotin ในอัตราส่วนของ streptavidin : biotin = 1:4 ดังนั้น complex ดังกล่าวจึงมีแขนอิสระอีก 1 แขนที่จะจับกับ biotin ที่ติดอยู่กับ biotinylated immunoglobulin ได้อย่างแน่นหนา

หลังจากปฏิกิริยาดังกล่าวเสร็จสิ้นแล้ว จะสามารถมองเห็นได้โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง peroxidase กับสารที่เติมลงไป 2 ชนิด คือ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งทำหน้าที่เป็น substrate และตัวทำให้เกิดสี chromogen ซึ่งมีหลายชนิดเช่น diaminobenzidine tetrahydrochloride หรือ DAB ดังนั้น ถ้าในเนื้อเยื่อมีแอนติเจนที่ต้องการตรวจก็จะติดสีตามชนิดของ chromogen ถ้าไม่มีแอนติเจนที่ต้องการตรวจก็จะไม่ติดสี



วิธีการ

1. Sectioning

- - นำเนื้อเยื่อที่ฝังใน paraffin block มาตัดให้มีความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตร และวางบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วยน้ำยา 2% ของ 3 - aminopropyl triethoxy silane (APS) ใน acetone

2. Deparaffinization และ rehydration ทำตามขั้นตอนดังนี้

- - อบสไลด์เนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 60°C อย่างน้อย 30 นาที
- - แช่แผ่นสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำยา xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
- - แช่แผ่นสไลด์เนื้อเยื่อใน 100% ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
- - แช่แผ่นสไลด์ใน 95% ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
- - จากนั้นแช่สไลด์ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที

3. Marking

- - เช็ดรอบๆ เนื้อเยื่อ และปล่อยให้แห้ง
- - ใช้ปากกา hydrophobic marker เขียนวงกลมล้อมรอบแผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์ แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง (ประมาณ 10-20 วินาที) เพื่อกันมิให้น้ำยาที่จะหยดลงบนแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อไหลออก

4. Quenching of endogenous peroxidase

- - นำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ในสารละลาย 0.35% H_2O_2 in methanol นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- - ล้างเนื้อเยื่อโดยแช่สไลด์ในสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) นาน 5 นาที

5. Unmasking antigen with protease

- - แช่สไลด์ในสารละลาย PBS นาน 5 นาที
- - หยดสารละลาย 0.1% actinase E ให้ท่วมสไลด์เนื้อเยื่อ ทิ้งไว้นาน 5 นาที ที่ 37°C
- - ล้างเนื้อเยื่อในสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

6. Blocking of non-specific staining

- - หยด nonimmune serum ซึ่งเป็นแอนติบอดีของสัตว์ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคใดๆ และควรเป็นชนิดเดียวกับ secondary antibody จำนวน 2-3 หยด บน สไลด์เนื้อเยื่อที่วางใน moisture chamber
- - อบสไลด์เนื้อเยื่อที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

7. Primary antibody

- - เท nonimmune serum
- - หยด primary antibody ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ดูภาคผนวก) บนสไลด์เนื้อเยื่อ จำนวน 2 หยด หรือ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อใน moisture chamber
- - อบสไลด์เนื้อเยื่อนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- - ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

8. Secondary antibody

- - เท PBS ส่วนที่เกินให้แห้ง
- - หยดน้ำยา biotinylated immunoglobulin (เป็นแอนติบอดีที่ต่อต้าน immu-noglobulin ของสัตว์ที่ใช้ทำ primary antibody) จำนวน 2 หยด หรือ 100 ไมโครลิตร บนสไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นบ่มใน moisture chamber นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- - ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9. Streptavidin-biotin peroxidase complex

- - เทสารละลาย PBS ส่วนที่เกินให้แห้ง

- - หยดสารละลาย streptavidin-biotin peroxidase complex จำนวน 2 หยด หรือ 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นบ่มใน moisture chamber นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

- - ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

10. Coloration

- - จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย 0.02% diaminobenzidine tetrahydro-chloride (DAB) ในน้ำยา Tris buffer 0.05 M pH 7.6 ซึ่งเติมน้ำยา 5% H_2O_2 จำนวน 150 ไมโครลิตร ลงไป ทิ้งไว้ 55 นาที

11. Counterstaining

- - ล้างสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำไหลนาน 5 นาที

- - จากนั้นล้างสไลด์เนื้อเยื่ออีกครั้งโดยแช่น้ำกลั่นนาน 5 วินาที

- - counterstain ด้วย methyl green นาน 10-20 นาที

- - ล้างในน้ำกลั่นนาน 10 วินาที

- - dehydration โดยแช่สไลด์เนื้อเยื่อใน 95% ethanol นาน 5 วินาที 100% ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที จากนั้น clearing เพื่อกำจัด ethanol ออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในน้ำยา xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

- - ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย coverslip โดยเติมน้ำยา mounting medium ประมาณ 1-2 หยด

ความจำเพาะของเทคนิคนี้ยังขึ้นอยู่กับตัวควบคุมบวก (positive tissue control) และตัวควบคุมลบ (negative tissue control) โดยการนำตัวควบคุมบวกมาปฏิบัติตามขั้นตอนเดียวกัน (จากขั้นที่ 1 ถึงขั้นที่ 11) สำหรับตัวควบคุมลบสามารถนำมาปฏิบัติได้ 2 กรณีดังนี้ คือ

1. นำเนื้อเยื่อที่มีแอนติเจน TB มาทำการย้อมตามขั้นตอนจาก 1-11 ยกเว้นในขั้นตอน ที่ 7 ให้ใช้สารละลาย PBS หรือ normal serum แทนการใช้ primary antibody

2. นำเนื้อเยื่อปกติ มาทำการย้อมตามขั้นตอนจาก 1-11

ผล

แบคทีเรีย หรือ แอนติเจน : ติดสีน้ำตาล

ส่วนประกอบอื่นๆ : ติดสีเขียว

4. ภาคผนวก

4.1 น้ำยาสำหรับย้อมสี Hematoxylin-eosin (H&E)

Mayer's hematoxylin solution

Hematoxylin crystals	1.00 g	
Distilled water (D.W.)	100.00	g
Sodium iodate	0.20	g
Ammonium or potassium alum	50.00	g
Citric acid	1.00	g
Chloral hydrate	50.00	g

Eosin solution

1% Stock alcoholic eosin solution

Eosin Y water soluble	1.0	g
D.W.	20.0	ml
ทำให้ละลายแล้วจึงเติม		
95% Ethanol	80.0	ml

Working eosin solution

1% Eosin stock solution	1	part
80% Ethanol	3	part

โดยก่อนนำไปใช้ให้เติม glacial acetic acid 0.5 ml ในทุก 100 ml ของ working eosin solution แล้วผสมให้เข้ากัน

4.2 น้ำยาสำหรับย้อมสี Ziehl-Neelsen (ZN)

Carbol fuchsin solution

Phenol	5.0	ml
100% Ethanol	10.0	ml
Basic fuchsin	1.0	ml
D.W.	100.0	ml
กรองก่อนนำไปใช้		

Acid alcohol solution

70% Ethanol	100.0	ml
conc. HCl	1.0	ml

Methylene blue solution

Stock solution

Methylene blue	1.4	g
95% Ethanol	100.0	ml

Working solution

Stock solution	10.0	ml
Tap water	90.0	ml

4.3 น้ำยาสำหรับย้อมสี Kossa's

5% Silver nitrate solution

Silver nitrate	5.0	g
D.W.	100.0	ml

5% Sodium thiosulfate solution

Sodium thiosulfate	5.0	g
D.W.	100.0	ml

Nuclear fast red solution – NFR

ละลาย aluminum sulfate 5 g และ NFR 0.1 g ด้วย D.W. 100 ml

↓

ต้ม 5 นาที

↓

ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

↓

กรอง

↓

นำไปใช้

4.4 น้ำยาสำหรับตรวจด้วย Streptavidin-biotin technique

การเคลือบแผ่นสไลด์

- - ล้างแผ่นสไลด์ใน acetone 2 ครั้ง
- - จุ่มแผ่นสไลด์ใน 2% ของ 3-aminopropyl triethoxyl silane (APS) ใน acetone นาน 10 วินาที
- - สลัดน้ำยา APS ทิ้ง
- - ล้างแผ่นสไลด์ใน acetone 2 ครั้ง อย่างเร็ว
- - ล้างในน้ำกลั่น
- - เป่าให้แห้งหรืออบในเตาอบที่อุณหภูมิ 36-37°C ทิ้งค้างคืน

0.3% H_2O_2 in methanol

35% H_2O_2	1.5	ml
Methanol	150	ml

Phosphate buffered saline (PBS)

Stock solution

NaCl	800.0	g
KH_2PO_4	20.0	g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	290.0	g
KCl	20.0	g
D.W.	10.0	L

Working solution

Stock solution	1.0	L
D.W.	9.0	L

0.1% Actinase E

Actinase E	0.15	g
PBS	150.00	ml

0.5 M Tris buffer (pH 7.6)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	6.1	g
D.W.	50.0	ml
1N HCl	37.0	ml
เติม D.W. จนครบ	1000	ml

(การเตรียม 1N HCl ⇒ เตรียมโดยใช้ conc. HCl 8.33 ml มาเติมลงในน้ำกลั่น 91.67 ml)

Diaminobenzidine tetrahydro-chloride solution (DAB)

DAB	0.02	g
0.5 M Tris buffer (pH 7.6)	100.00	ml

5% H_2O_2 100.00ml

(5% H_2O_2 เตรียมโดยนำ 35% H_2O_2 จำนวน 14.00 ml และเติมน้ำกลั่น 86.00 ml)

Methyl green solution

1. Sodium acetate trihydrate	0.02 g
2. Barbital sodium	0.82 g
3. D.W.	140.00ml
4. 0.1 M HCl	60.00ml
5. Methyl green	2.00 g

กรองก่อนนำไปใช้

(0.1 M HCl เตรียมโดยนำ conc. HCl 0.83 ml มาเติมลงในน้ำกลั่น 99.17 ml)

ความเข้มข้นของ Primary antibody

1. เจือจางแอนติบอดีด้วย PBS (การเจือจางแบบสองเท่า 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, etc.)

2. ทำตามขั้นตอนจาก 1-11 ของวิธี Immunohistochemistry technique ด้วยแอนติบอดีความเข้มข้นต่างๆ

3. ตรวจด้วย microscope เพื่อตัดสินคัดเลือกหาความเข้มข้นที่เหมาะสม