



การับสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มอลิน โดยวิธี Immunohistochemistry

ISBN 978-616-413-506-2

สัตวแพทย์หญิงทองทอง ปังฉิมศิริ
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

การชันสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์

จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอर्मาลินโดยวิธี Immunohistochemistry

รหัสมาตรฐานสากลประจำหนังสือ :

ISBN 978-616-413-506-2

ชื่อหนังสือ : การชันสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์

จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอर्मาลินโดยวิธี Immunohistochemistry

จัดทำโดย : สัตวแพทย์หญิงดวงทอง ปิจฉิมศิริ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ครั้งที่พิมพ์ : ครั้งที่ 1 จำนวน 50 เล่ม

ปีที่พิมพ์ : พ.ศ. 2559

พิมพ์ที่ : 10 สปีด เลเซอร์ปริ้นต์

คำนำ

นักพยาธิวิทยา ได้ใช้องค์ความรู้และศาสตร์ทางพยาธิวิทยา ในการตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการทางพยาธิวิทยาพื้นฐาน ได้แก่ การผ่าซาก การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีรอยโรคสำคัญ การรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน และการทำสไลด์เนื้อเยื่อ จนสามารถศึกษารายละเอียดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องสว่าง แล้วนำมาแปลผลและประมวล เพื่อให้ได้ผลการชันสูตรหาสาเหตุของโรค หรือการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ หากมีรอยโรคที่ชัดเจนและตรงตามลักษณะเฉพาะ (Pathognomonic lesions) จะสามารถระบุสาเหตุหรือปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้ ในกรณีที่ไม่มีรอยโรคที่ชัดเจน ยังสามารถตอบชันสูตรในลักษณะความน่าจะเป็น หรือนำมาประกอบการชันสูตรด้วยวิธีอื่น เช่น การเพาะแยกเชื้อ การตรวจทางพิษวิทยาและชีวเคมี เป็นต้น การตรวจเนื้อเยื่อด้วยวิธี Immunohistochemistry (IHC) เป็นวิธีที่นำมาต่อยอดกระบวนการทางพยาธิวิทยา โดยอาศัยวิทยาการหลายแขนงเข้าด้วยกัน ได้แก่ กายวิภาคศาสตร์พยาธิวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน และชีวเคมี เพื่อตรวจหาสิ่งที่ต้องการในเนื้อเยื่อ โดยอาศัยปฏิกิริยาแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจน (Antigen) ของเชื้อโรคหรือของเซลล์ในร่างกายที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ กับแอนติบอดี (Antibody) ที่เติมลงไปในสไลด์เนื้อเยื่อ โดยปัจจัยที่สำคัญได้แก่การติดสลาด้วยเอนไซม์ให้แก่แอนติบอดีที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ร่วมกับการขยายขนาดปฏิกิริยาดังกล่าว และการทำให้มองเห็นด้วยสารสีจนสามารถตรวจสอบปฏิกิริยานั้นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องสว่าง

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยกลุ่มพยาธิวิทยา ได้เล็งเห็นถึงประโยชน์และความสำคัญของวิธี IHC จึงได้เริ่มนำวิธีดังกล่าวมาพัฒนา ภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการระหว่าง Japan International Cooperation Agency (JICA) และกรมปศุสัตว์ โดย JICA ได้มอบหมาย ให้นักวิชาการจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติแห่งประเทศญี่ปุ่น (National Institute of Animal Health, Japan) ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ นักวิชาการของกลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ซึ่งนับถึงวันนี้เป็นเวลา กว่า 25 ปีเศษแล้ว ในปัจจุบันเราได้พัฒนางานด้านนี้อย่างมีประสิทธิภาพและต่อเนื่อง จนสามารถนำมาใช้ในงานชันสูตรและงานวิจัยเป็นจำนวนมาก เพื่อเตรียมความพร้อมในการตรวจโรคที่สำคัญในสัตว์ โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน และโรคอุบัติใหม่ที่เกิดขึ้นจำนวนมาก

“การชันสูตรโรคติดเชื้อมนุษย์จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน โดยวิธี Immunohistochemistry” เล่มนี้ มีเนื้อหารายละเอียดที่เกี่ยวข้องอย่างครบถ้วน กระชับและครอบคลุม ทำให้สามารถปฏิบัติตามได้เป็นอย่างดี ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์แก่นักวิชาการด้านพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณ นางลัดดา ตรงวงศา และนางสาวทริกา จันทมนิชิตี ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะและแก้ไข นางจิรา คงครอง นางบุศณีย์ จันทรประเสริฐ (ผู้ล่วงลับ) นางสนทนา มิมะพันธุ์ และนายเจษฎา รัตโณภาส ที่ได้พัฒนาวิธี IHC ในการชันสูตรโรคต่างๆ ของกลุ่มพยาธิวิทยา ขอขอบคุณพนักงานราชการของกลุ่มพยาธิวิทยาทุกท่านที่ได้ช่วยทำการทดสอบโดยวิธี IHC สำหรับการชันสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอर्मาลิน นางสาวชนกพร บุญศาสตร์ และนายพลกฤต มหานาม ที่ได้จัดเรียงเอกสารและจัดวางรูปภาพทำให้หนังสือเล่มนี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี

อนึ่ง ผู้เขียนขอขอบพระคุณท่านอาจารย์คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ด้านการสัตวแพทย์ ซึ่งได้ใช้ประกอบวิชาชีพตั้งแต่เริ่มต้น ทำงานจนถึงปัจจุบันและสืบไปเบื้องหน้า ขอขอบพระคุณ นางสมบุญ สุธิรัตน์ ที่ได้ถ่ายทอดองค์ความรู้ในงานด้านพยาธิวิทยาเพื่อการปฏิบัติงานให้เป็นคนแรก และที่สำคัญยิ่งขอกราบเท้าพ่อ-แม่ ด้วยความเคารพรัก ที่ได้ให้ตัวตนอย่างที่เป็น และตั้งใจประกอบสัมมาอาชีพในระบบราชการตั้งแต่ เริ่มเป็นบัณฑิต

ดวงทอง ปัจฉิมะศิริ
สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

สารบัญ

	หน้า
1. บทนำ	1
2. นิยามของคำต่างๆ ที่ควรรู้	2
3. หลักการของวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี	4
4. กระบวนการของวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี	7
5. สิ่งสำคัญ ขั้นตอน และกระบวนการต่างๆ ที่มีผลต่อวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี	8
6. วิธีการย้อม IHC แบบใช้แอนติบอดี	11
7. การแปลผล (Interpretation)	17
8. สิ่งแปลกปลอม (Artifacts)	17
9. การแก้ไขปัญหาที่พบบ่อย (Trouble shooting)	17
10. การตรวจโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ด้วยวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี	23
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	26
- การปฏิบัติที่ดี	
- การเตรียม Moisture chamber	
- การเตรียมรีเอเจนต์ (Reagent preparation)	
- การเคลือบแผ่นสไลด์แก้วด้วย 2% 3-Aminopropyl triethoxy silane	
- การทำ Antigen retrieval โดยการใช้คลื่นไมโครเวฟ	

สารบัญภาพ

รูปแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการย้อมด้วยวิธี IHC	14
โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI)	31
โรคโอดี (Infectious bursal disease, IBD)	39
โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND)	41
วัณโรคสัตว์ปีก (Avian tuberculosis, ATB)	46
โรคไข้เวสต์ไนล์ (West Nile fever, WNF)	47
โรคบรูเซลเลลโลซิส (Brucellosis)	48
ไคว (Q fever)	50
วัณโรค (Tuberculosis, TB)	51
โรคพาราทูเบอร์คิวโลซิส (Paratuberculosis/Johne's disease)	53
โรคทริปปาโนโซโมสิส (Trypanosomiasis)	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
โรควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy, BSE)	57
โรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ (Foot and mouth disease type O, FMD type O)	59
กลุ่มอาการพาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)	60
โรคพอร์ซายเอพิเดมิกไดอะเรีย (Porcine epidemic diarrhea, PED)	62
โรคติดเชื้อพอร์ซายน์เซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus infection, PCV)	64
โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah encephalitis)	66
โรค Colibacillosis	68

1. บทนำ

วิธี Immunohistochemistry (IHC) เป็นการย้อมสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อตรวจหา Antigen บนสไลด์เนื้อเยื่อ โดยใช้ Antibody ที่จำเพาะกับ Antigen นั้น ปัจจุบันนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการชันสูตรโรคสัตว์ทางพยาธิวิทยา เนื่องจากการพัฒนาวิธีการอย่างต่อเนื่อง จนทำให้มีความง่าย สะดวก และมีความจำเพาะสูง ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว การตรวจด้วยวิธีนี้ทำได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิดตามวัตถุประสงค์ของงาน ได้แก่ เนื้อเยื่อสดแช่แข็ง (Fresh frozen tissue) เนื้อเยื่อที่ตัดมาจากสัตว์ที่ยังมีชีวิต (Biopsy) เลือดป้ายสไลด์ (Blood smear) หรือเนื้อเยื่อจากสัตว์ตายและผ่านการรักษาสภาพหรือตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน แล้วนำมาผ่านกระบวนการฝังในพาราฟินและทำสไลด์เนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นกระบวนการเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา จากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อมาดำเนินการต่อเพื่อตรวจหา Antigen ที่ต้องการในเนื้อเยื่อ เช่น Antigen ของเชื้อต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส เชื้อปรสิต เชื้อรา และไพรอนโปรตีน (Prion protein) เป็นต้น จึงนับเป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง กล่าวคือ สามารถใช้ตรวจยืนยันผลการชันสูตรร่วมกับวิธีที่มีความจำเพาะอื่นๆ และที่สำคัญในบางกรณีที่เชื้อตายไม่สามารถทำการเพาะเชื้อหรือแยกเชื้อได้ เนื่องจากสภาวะทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือการใช้ยาปฏิชีวนะของสัตว์ วิธี IHC ยังสามารถตรวจได้โดยตรง Antigen ที่หลงเหลือในสภาพไม่สมบูรณ์ได้ นอกจากนี้ยังให้ผลดีในการศึกษาด้านระบาดวิทยา โดยศึกษาย้อนหลังถึงการระบาดของโรคต่างๆ เนื่องจากเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินมีคุณสมบัติเก็บไว้ได้นาน รวมถึงช่วยแก้ปัญหาการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่อยู่ห่างไกล ที่ไม่สามารถเก็บเนื้อเยื่อสดเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพาะแยกเชื้อได้ทันเวลา

วิธี IHC ทำได้ 2 แบบ ได้แก่ แบบใช้สารเรืองแสง (Immunofluorescence) เช่น Fluorescein หรือ Rhodamine และแบบใช้เอนไซม์ (Immunoenzyme) เช่นเอนไซม์ Peroxidase ในขั้นตอนของปฏิกิริยาเป็นผลให้การตรวจสอบปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อแตกต่างกันด้วย กล่าวคือ แบบใช้เอนไซม์จะตรวจดูปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง (Light microscope) สามารถเห็นรายละเอียดของเซลล์และเนื้อเยื่อเหมือนการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ทำให้ทราบตำแหน่งของปฏิกิริยาแบบจำเพาะที่เกิดขึ้นในเซลล์และเนื้อเยื่อได้อย่างชัดเจน ส่วนแบบใช้สารเรืองแสงจะดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence microscope) เพื่อตรวจดูสารเรืองแสง แต่ไม่สามารถดูลักษณะรายละเอียดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ดีนัก เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบทั้ง 2 วิธี แบบใช้เอนไซม์มีข้อดีและความได้เปรียบกว่าแบบใช้สารเรืองแสง ประกอบกับกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่างมีราคาถูกกว่าและใช้งานได้ง่าย สะดวกกว่ากล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ โดยไม่ต้องใช้ห้องมืด กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จึงได้เลือกแบบใช้เอนไซม์มาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในตัวอย่างที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลินอย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ในการชันสูตรและวิจัยโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ ได้แก่ สัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร และสัตว์ปีก อาทิ โรคบรูเซลเลสิส (Brucellosis) วัณโรค (Tuberculosis) พาราทูเบอร์คิวโลสิส (Paratuberculosis) โรคทริปาโนโซโมสิส (Trypanosomosis) กลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome/PRRS) โรคพอร์ชาน์อีพิดेमิกไดอะเรีย (Porcine epidemic diarrhea) โรคไข้หวัดนก (Highly pathogenic avian influenza) โรคไข้เวสต์ไนล์ (West Nile fever) โรคโอบีดี (Infections bursal disease) เป็นต้น

การชันสูตรโรคติดเชื้อในปศุสัตว์จากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึงด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน โดยวิธี IHC เล่มนี้ เนื้อหาประกอบไปด้วยหลักการ วิธีการ การแปลผล และการแก้ปัญหาสำหรับผู้ใช้ ทำให้สามารถปฏิบัติได้จริงในการชันสูตรโรคติดเชื้อต่างๆ จำนวน 17 โรค โดยมีวิธีการและรูปภาพประกอบอย่างชัดเจน นักวิชาการที่สนใจงานด้าน IHC สามารถใช้เป็นแนวทางในการทำงานและประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดี

2. นิยามของคำต่างๆ ที่ควรรู้

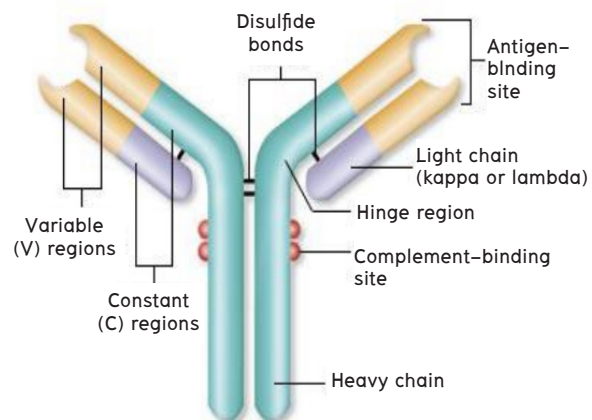
ก่อนที่จะเข้าสู่เนื้อหาของหนังสือนี้ มีความจำเป็นที่ผู้อ่านจะต้องเข้าใจนิยามของคำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย้อมด้วยวิธี IHC แบบใช้เอนไซม์ เพื่อให้เกิดความเข้าใจได้ง่ายขึ้น ได้แก่

Antigen

Antigen คือสารที่สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง Antibody ชนิดจำเพาะต่อมันได้ และสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ Antibody ที่สร้างขึ้นนั้น โดย Antigen มี Epitope ต่างๆ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่สุดที่ร่างกายจะสร้าง Antibody ที่จำเพาะขึ้นมา

Antibody

Antibody คือกลุ่มของโปรตีน เรียกอีกชื่อว่า Immunoglobulin (Ig) อยู่ในเลือดของมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูงอื่นๆ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Antigen กล่าวคือ เป็นภูมิคุ้มกันของร่างกายนั่นเอง สร้างขึ้น โดยเซลล์ B lymphocyte ซึ่งอยู่ในอวัยวะระบบน้ำเหลือง ได้แก่ ม้ามและต่อมน้ำเหลือง Ig มีหน้าที่จับ (Bind) และทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส เป็นต้น Ig แต่ละชนิดจะจดจำโมเลกุลเป้าหมายที่จำเพาะ Ig ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 2 ส่วน คือ Heavy chain (H chain) 1 คู่ และ Light chain (L chain) 1 คู่ L chain มี 2 ชนิด คือ Kappa และ Lambda และมีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน ใน Ig แต่ละชนิด มี Disulfide bond ทำหน้าที่เป็นพันธะที่ยึด L chain กับ H chain และ H chain กับ H chain (ภาพที่ 1) H chain มีคุณสมบัติและโครงสร้างที่แตกต่าง และเป็นตัวกำหนดชนิดของ Ig ซึ่งมี 5 ชนิดหลัก (5 Major classes) ได้แก่ IgG IgA IgM IgD และ IgE



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของ Immunoglobulin

แหล่งที่มา ([http://www.path.queensu.ca/qlmp/sites/default/les/Principles_of_Immunohisto_Chemistry%20\(1\).pdf](http://www.path.queensu.ca/qlmp/sites/default/les/Principles_of_Immunohisto_Chemistry%20(1).pdf))

B lymphocyte

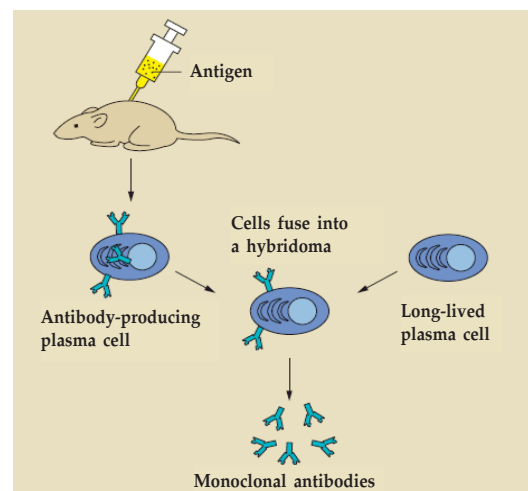
B lymphocyte หรือ B cell เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวประเภทลิมโฟไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารแปลกปลอมหรือ Antigen จะพัฒนาเป็น Plasma cell มีหน้าที่หลั่ง Antibody มาจับกับ Antigen B cell มีแหล่งกำเนิดในร่างกายจาก Stem cell ที่ชื่อว่า Haematopoietic stem cell ในไขกระดูก พบครั้งแรกในไขกระดูกบริเวณก้นกบของไก่ ที่ชื่อว่า Bursa of Fabricius จึงใช้ชื่อว่า B cell (บางแหล่งอ้างว่า B ย่อมาจาก Bone marrow หรือไขกระดูกซึ่งเป็นที่กำเนิดของ B cell) B cell เป็นส่วนประกอบสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune system)

Polyclonal antibody

Polyclonal antibody คือ Antibody ที่ผลิตโดย B cell ในร่างกาย เป็นส่วนผสมของ Ig ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ Epitope ตำแหน่งต่างๆ (หลายตำแหน่ง) ของ Antigen นั้นๆ ผลิตโดยการให้สัตว์ได้รับ Antigen หรือ Immunogen ที่มีหลาย Epitope สัตว์จะสร้าง Antibody ที่จำเพาะกับ Antigen ดังกล่าว ต่อมาจึงเก็บซีรัมจากสัตว์นั้น ซึ่งจะมี Polyclonal antibody ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยาตรวจหา Antigen ที่จำเพาะได้ต่อไป

Monoclonal antibody

Monoclonal antibody คือ Antibody ที่สร้างโดยโคลนเดี่ยวของ B cell (Single clone of B cell) ไม่ใช่สารที่เกิดจากธรรมชาติ แต่สร้างขึ้นด้วยเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาโดยการฉีด Antigen หรือ Immunogen ที่เตรียมให้มีเพียง 1 Epitope เข้าไปในหนูทดลองเพื่อให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ Antigen ชนิดนั้นๆ จากนั้นทำการสกัด B cell ที่ทำหน้าที่สร้าง Antibody ออกมา (B cell เมื่อสร้าง Antibody จะเรียกอีกชื่อว่า Antibody-producing plasma cell) B cell นี้ไม่สามารถเลี้ยงต่อได้ จึงต้องนำไปเชื่อมรวมกับ Tumor cell เช่น Myeloma cell หรือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยใช้เทคนิคการสร้างเซลล์ผสม (Hybridoma technology) ระหว่าง B cell และ Myeloma cell เพื่อสร้างเป็น Hybridoma ที่มีความสามารถในการหลั่ง Monoclonal antibody ที่ต้องการ (ภาพที่ 2) Antibody ที่ได้ จะมีความสามารถในการจับแบบจำเพาะกับเพียง 1 Epitope ของ Antigen เท่านั้น



ภาพที่ 2 แสดงการผลิต Monoclonal antibody

แหล่งที่มา ([http://www.path.queensu.ca/qhmp/sites/default/files/Principles_of_Immunohisto_Chemistry%20\(1\).pdf](http://www.path.queensu.ca/qhmp/sites/default/files/Principles_of_Immunohisto_Chemistry%20(1).pdf))

Primary antibody

Primary antibody คือ Antibody ตัวแรกที่ใช้จับ Antigen แบบจำเพาะที่ตำแหน่ง Epitope ในเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจหา มีทั้ง Monoclonal antibody และ Polyclonal antibody กล่าวได้ว่า Primary antibody มีความสำคัญที่สุดในกระบวนการย้อมด้วยวิธี IHC เพราะหาก Primary antibody ไม่สามารถจับกับ Antigen ที่ต้องการตรวจได้แล้ว จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนอื่นๆ ต่อไปได้

Secondary antibody

Secondary antibody คือ Antibody ที่ใช้จับ Primary antibody ที่จับกับ Antigen ที่จำเพาะในเนื้อเยื่อแล้ว Secondary antibody จะถูกติดฉลาก (Label) ด้วยเอนไซม์ ซึ่งต่อมาจะอาศัยปฏิกิริยาอีกขั้นตอนหนึ่ง ได้แก่ Chromogenic-Substrate เพื่อช่วยให้เกิดสีและมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องสว่าง

Specific staining

Specific staining คือการย้อมที่จำเพาะ ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Antigen-Antibody โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นสิ่งแสดงถึง Primary antibody ที่จับ Antigen ที่จำเพาะในเนื้อเยื่อแล้ว

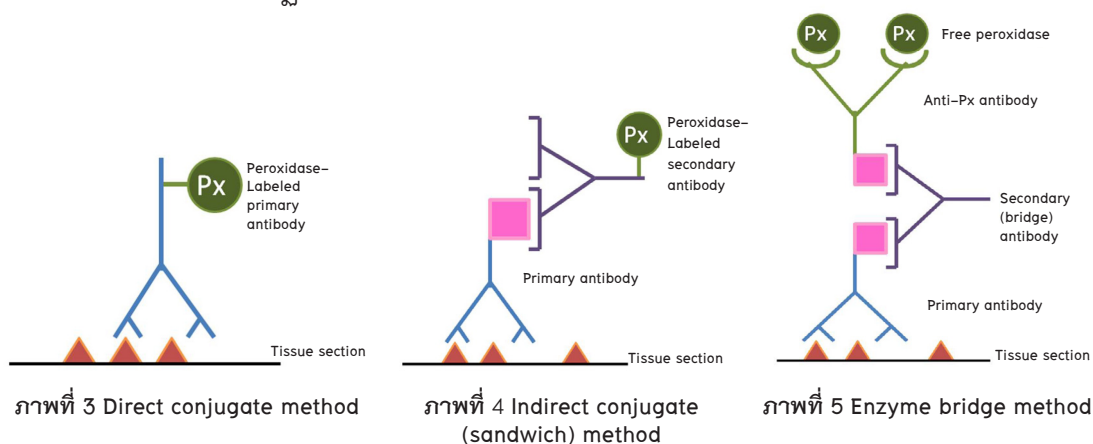
3. หลักการของวิธี IHC แบบใช้เอนไซม์

หลักการของวิธี IHC แบบใช้เอนไซม์ กล่าวคือ “เป็นการย้อมเพื่อตรวจหา Antigen ที่ต้องการตรงตำแหน่งที่อยู่ในเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยใช้ Primary antibody ที่จำเพาะต่อ Antigen ที่ต้องการตรวจหาเป็นตัวจับ (Bind) จากนั้นทำให้ปฏิกิริยาหรือสัญญาณของ Antigen-Antibody ดังกล่าวนี้น่ามีขนาดใหญ่ขึ้น (Amplification) โดยการจับต่อด้วย Secondary antibody ร่วมกับการลดปฏิกิริยาการย้อมแบบไม่จำเพาะ (Non-specific staining) แล้วอาศัยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ โครโมเจน (Chromogen) และซับสเตรท (Substrate) เพื่อให้อยู่ในสภาพที่สามารถตรวจสอบได้หรือมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง”

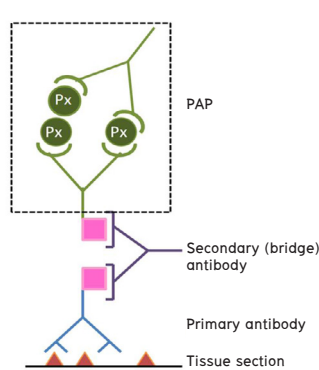
ทั้งนี้ก่อนจะกล่าวถึงหลักการและวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน มีความจำเป็นต้องนำที่มาจากพัฒนาการของวิธี IHC เมื่อเริ่มแรกมาให้รับทราบ เพื่อให้เกิดความเข้าใจโดยลำดับตั้งแต่พื้นฐานและสามารถประยุกต์ใช้ชุดทดสอบที่อาจเกิดขึ้นใหม่ในอนาคต

วิธี IHC เริ่มเป็นที่รู้จัก ตั้งแต่ปี ค.ศ.1930 จนกระทั่ง Coons และคณะ ได้รายงานครั้งแรก ในปี 1942 โดยการใช้ Antibody ที่ติดฉลากด้วย Fluorescein isothiocyanate (FITC) ในการตรวจหาเชื้อ Pneumococcal ในเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ ต่อมาได้มีการพัฒนาโดยการนำมาใช้กับเนื้อเยื่อที่ผ่านการรักษาสภาพด้วยน้ำยาฟอร์มาลิน จนในปัจจุบันเป็นที่แพร่หลายและนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคและวิจัย

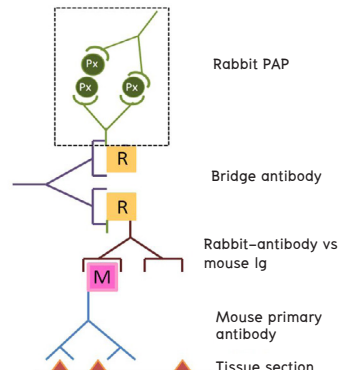
ปีค.ศ. 1968 มีการพัฒนาวิธี IHC แบบใช้เอนไซม์ โดยวิธี Direct เรียกว่า Direct conjugate method (ภาพที่ 3) โดยติดฉลาก Primary antibody ด้วยเอนไซม์ Peroxidase (Peroxidase-labeled antibody) แล้วนำไปจับแบบจำเพาะกับ Antigen ที่ต้องการตรวจหา จากนั้นทำให้มองเห็นได้ด้วยการเกิดสีของสาร Chromogen ที่ถูกกระตุ้นด้วย Substrate ซึ่งได้แก่ Hydrogen peroxide นับเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องติดฉลาก Primary antibody ทุกครั้ง และใช้ความเข้มข้นของ Primary antibody สูง ทำให้สิ้นเปลือง จึงได้พัฒนาวิธี Indirect เรียกว่า Indirect conjugate (Sandwich) method (ภาพที่ 4) โดยนำ Primary antibody ที่ไม่ติดฉลาก จับแบบจำเพาะกับ Antigen ที่ต้องการตรวจ แล้วจับต่อด้วย Secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น Peroxidase และมีความจำเพาะกับ Primary antibody โดยผลิตให้มีความจำเพาะกับชนิดสัตว์ที่ผลิต Primary antibody วิธีนี้จะใช้ Primary antibody ความเข้มข้นต่ำ แต่อาจเกิดปฏิกิริยาแบบ ไม่จำเพาะขึ้น



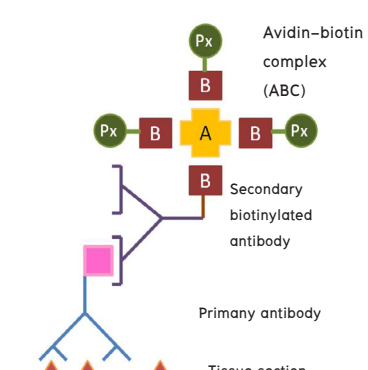
ต่อมาได้พัฒนาวิธีที่มีความซับซ้อนขึ้นคือ Unlabeled antibody method ทำได้ 2 วิธี คือ Enzyme bridge method (ภาพที่ 5) และ Peroxidase anti-peroxidase (PAP) method โดยวิธีแรก ใช้ Secondary antibody เป็นตัวกลางเชื่อมระหว่าง Primary antibody กับ Anti-peroxidase antibody ซึ่งในที่สุดจะทำปฏิกิริยากับ Free peroxidase ส่วนอีกวิธีคล้ายวิธีแรก และมี 2 แบบ คือ แบบ 3 ขั้นตอน และ 4 ขั้นตอน แบบ 3 ขั้นตอน ใช้ Secondary antibody หรือ Bridge antibody เป็นตัวกลางเชื่อมระหว่าง Primary antibody กับ PAP reagent ที่ประกอบด้วย Antibody ที่คอนจูเกตด้วย Peroxidase (ภาพที่ 6) ส่วนแบบ 4 ขั้นตอน จะเพิ่ม Antibody อีก 1 ชนิด เชื่อมระหว่าง Primary antibody กับ Bridge antibody (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 Peroxidase anti-peroxidase (PAP) method แบบ 3 ขั้นตอน



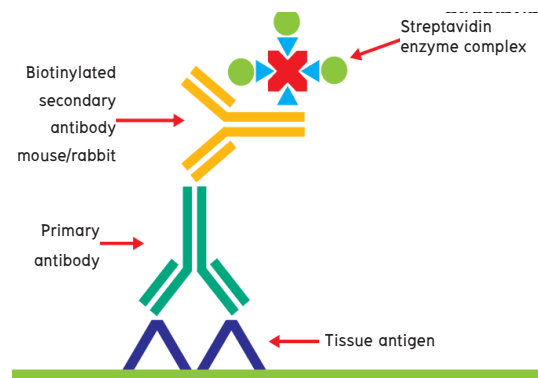
ภาพที่ 7 Peroxidase anti-peroxidase (PAP) method แบบ 4 ขั้นตอน



ภาพที่ 8 Avidin-biotin method (ABC)

หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1981 ได้เข้าสู่ยุคใหม่ของวิธี IHC โดยการนำ Avidin-biotin complex method (ABC method) (ภาพที่ 8) มาใช้อย่างแพร่หลาย โดยอาศัยหลักการจับแบบความชอบ (Affinity) ระหว่าง Avidin (โปรตีนในไข่ขาว) และ Biotin (วิตามิน) โดย Avidin 1 โมเลกุล จะจับกับ Biotin ได้ 4 โมเลกุล วิธีนี้ติดฉลาก Secondary antibody ด้วย Biotin หรือเรียกว่า Secondary biotinylated antibody แล้วจับต่อกับ Avidin-biotin complex (ABC) ซึ่งประกอบด้วย Avidin 1 โมเลกุล Biotin 3 โมเลกุล คอนจูเกตด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase ABC จะสามารถจับกับ Biotin อีก 1 โมเลกุลของ Secondary biotinylated antibody ได้พอดี จากนั้น เข้าสู่กระบวนการทำให้มองเห็นได้ ด้วยการเกิดสีของสาร Chromogen ที่ถูกกระตุ้นด้วย Substrate (Hydrogen peroxide)

ในปัจจุบันนิยมใช้ Streptavidin-biotin complex (SAB) ซึ่งประกอบด้วย Streptavidin 1 โมเลกุล Biotin 3 โมเลกุล ที่คอนจูเกตด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (ภาพที่ 9) แทน ABC เนื่องจากพบว่า Avidin มี Oligopolysaccharide residue ของไข่ขาวติดมา ซึ่งมักจะไปจับกับ Lecthin ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการย้อมแบบไม่จำเพาะส่วน Streptavidin ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* ไม่มี Oligopolysaccharide residue และยังสามารถจับได้ดีกับ Biotin ได้เช่นเดียวกับ Avidin



ภาพที่ 9 Streptavidin-biotin complex (SAB)
แหล่งที่มา http://www.biotech.illinois.edu/sites/biotech.illinois.edu/files/upload/08002_03aug09_ihc_guidebook_5th_edition_chapter_9.pdf

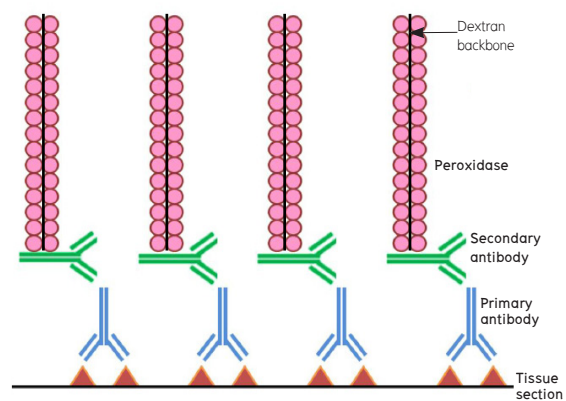
เหตุผลของการจับกันอย่างแข็งแรงของปฏิกิริยาดังกล่าวมีดังนี้

1. Primary antibody ถูกผลิตขึ้นมาให้มีความจำเพาะต่อ Antigen ที่ต้องการตรวจหาเท่านั้น และจะสามารถจับกับ Antigen นี้ได้เสมอไม่ว่าจะอยู่ในเนื้อเยื่อใดหรือในสภาพใด

2. Secondary antibody คือ Antibody ที่ถูกผลิตขึ้นมาให้มีความจำเพาะต่อ Primary antibody โดยการใช้หลักความจำเพาะของชนิดสัตว์ (Species specific) ผลิตโดยชนิด Ig ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ Antibody ของสัตว์ชนิดหนึ่งเข้าไปในสัตว์อีกชนิดหนึ่ง จากนั้นสัตว์ที่ได้รับ Ig จะสร้างภูมิคุ้มกันต่อ Ig ดังกล่าว เช่น เมื่อฉีด Ig ของกระต่ายให้แพะ แพะจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อ Ig ของกระต่าย เรียกซีรัมที่ได้ว่า Goat-anti-rabbit immunoglobulin antibody ดังนั้นถ้า Primary antibody ถูกผลิตจากกระต่าย จะสามารถถูกจับได้อย่างจำเพาะโดย Goat-anti-rabbit immunoglobulin antibody นี้ และเพื่อจะทำให้สามารถจับกับ SAB ในขั้นตอนต่อไปได้ จึงต้องติดสลาก Biotin เข้าไปที่ Antibody นี้ เรียกเป็น Biotinylated antibody หรืออาจเรียกเต็มๆ ว่า Biotinylated goat-anti-rabbit antibody

3. SAB มี Streptavidin ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย Avidin คือมีความชอบ (Affinity) ที่จะจับกับ Biotin ในอัตราส่วนของ Streptavidin:Biotin 1:4 ดังนั้น SAB จึงมีแขนอิสระอีก 1 แขนที่จะจับกับ Biotin ที่ติดอยู่กับ Biotinylated antibody ได้อย่างแข็งแรง

อย่างไรก็ตามการใช้ ABC และ SAB ในบางกรณีอาจพบปัญหาการเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะจากการจับกับ Biotin ในเนื้อเยื่อ (Endogenous biotin) Biotin พบได้ในเนื้อเยื่อของต่อมหมวกไต ตับ ไต ทางเดินอาหาร ปอด ม้าม ตับอ่อน สมอง เต้านม เนื้อเยื่อไขมัน และเนื้อเยื่อน้ำเหลือง ในปัจจุบันจึงมีวิธีที่หลีกเลี่ยงการใช้ Avidin-Biotin เพื่อป้องกันมิให้เกิดผลบวกปลอม คือวิธี Two-step polymer method (ภาพที่ 10) โดยมีผู้ผลิต Dextran polymer conjugate ซึ่งประกอบด้วย Secondary



ภาพที่ 10 Two-step polymer method

antibody และเอนไซม์จำนวนมาก มีทั้ง Horseradish peroxidase หรือ Alkaline phosphatase เกาะอยู่กับ Dextran backbone ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความไวในการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งเป็นการลดขั้นตอนในการย้อม

ปฏิกิริยาการเกิดสี

หลังจากปฏิกิริยาดังกล่าวเสร็จสิ้นแล้ว สามารถทำให้เกิดการมองเห็นได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ Peroxidase กับสารที่เติมลงไป 2 ชนิดคือ Chromogen (สารเคมีตั้งต้นในการสร้างเม็ดสี) ทำหน้าที่เป็น Electron donor และ Substrate ได้แก่ Hydrogen peroxide ทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง (Catalyse) ให้ Chromogen เกิดสี โดย Hydrogen peroxide เมื่อจับกับ Peroxidase จะเร่งให้ Chromogen ปลดปล่อยประจุอิเล็กตรอนออกมาเกิดเป็นสีขึ้น ดังนั้นถ้าในเนื้อเยื่อมี Antigen ที่ต้องการตรวจจะติดสีตามชนิดของ Chromogen ถ้าไม่มี Antigen ก็จะไม่ติดสี

Chromogen ในปัจจุบันมีหลายชนิด อาทิ Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ให้สีน้ำตาลเข้ม 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) ให้สีแดง 4-Chloro-1-Naphthol ให้สีน้ำเงิน Hanks-Yates reagent ให้สีน้ำเงินดำ และ α -Naphthol pyronin ให้สีม่วงแดง

4. กระบวนการของวิธี IHC แบบใช้แอนไซม์

วิธี IHC มีกระบวนการที่เกี่ยวข้องทั้งก่อนและหลัง จึงแบ่งกระบวนการ IHC ออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนก่อนทำการทดสอบ (Pre-analytical steps) ขั้นตอนทดสอบ (Analytical steps) และขั้นตอนหลังทำการทดสอบ (Post-analytical steps)

ขั้นตอนก่อนทำการทดสอบ ได้แก่กระบวนการทางพยาธิวิทยา ตั้งแต่การตรวจจุลทรรศน์อวัยวะ และเนื้อเยื่อต่างๆ (Animal examination) เก็บส่วนของเนื้อเยื่อไปรักษาสภาพหรือตรึง (Fix) ในน้ำยา Fixative ได้แก่ 10% Neutral buffered formalin นำมาตัดแต่ง (Trimming) เข้าสู่กระบวนการดองน้ำออกจากเนื้อเยื่อแล้วแทนที่ด้วยพาราฟิน (Tissue processing) ผึ่งในพาราฟิน (Tissue embedding) และตัดด้วย Microtome ให้ได้สไลด์เนื้อเยื่อมีขนาดหนา 2-6 ไมครอน วางบนแผ่นสไลด์แก้ว นำไปละลายพาราฟินแล้วเติมน้ำให้สไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี IHC ต่อไป

ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี IHC ใช้วิธีการปฏิบัติและอุปกรณ์เหมือนการย้อมสีในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิวิทยา อาทิ การจุ่มแช่ การล้าง จึงเรียกวินิจฉัย IHC ว่าเป็นการย้อม ทั้งนี้มีอุปกรณ์ที่จำเป็นเพิ่มขึ้น ได้แก่ กล่องเก็บความชื้น (Moisture chamber) และ Micropipette เนื่องจากในขั้นตอนการย้อมสีให้สไลด์เนื้อเยื่อแห้ง เพราะจะเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่แห้งได้ กล่องเก็บความชื้นจะช่วยรักษาสภาพความชื้นให้สไลด์เนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดีตลอดการย้อม และป้องกันการแห้งของสไลด์เนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้การเจือจางและการหยด Antibody บนสไลด์เนื้อเยื่อต้องใช้ Micropipette ที่สามารถกำหนดปริมาณน้ำยาที่ใช้ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี IHC ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

1. การเติมน้ำ (Rehydration) ให้สไลด์เนื้อเยื่อ
2. การคืนสภาพ Antigen (Antigen retrieval)
3. การกำจัดเอนไซม์ Peroxidase ในเนื้อเยื่อ (Endogenous peroxidase)
4. การเติม Primary antibody
5. การเติม Secondary antibody ที่ติดสลาด้วยแอนไซม์
6. การเติม Substrate และ Chromogen เพื่อให้เกิดสีและมองเห็นปฏิกิริยา
7. การเติมสีย้อมทับ (Counter stain) เพื่อให้เห็นเซลล์และเนื้อเยื่อที่แตกต่างจากสีของปฏิกิริยา

Antigen-Antibody ได้อย่างชัดเจน

8. การกำจัดน้ำ (Dehydration) ออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ และหยดน้ำยา Mounting medium เพื่อครอบปิดสไลด์ด้วย Cover slip

ขั้นตอนหลังทำการทดสอบ คือการแปลผลการทดสอบโดยนักพยาธิวิทยา ด้วยการตรวจดูสไลด์เนื้อเยื่อทดสอบ ตัวอย่างควบคุมบวก ตัวอย่างควบคุมลบ และตัวอย่างควบคุมแทนที่ แล้วรายงานผลต่อผู้เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการชันสูตรโรคต่อไป

5. สิ่งสำคัญ ขั้นตอน และกระบวนการต่างๆ ที่มีผลต่อวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี

ความจำเพาะของ Antibody (Antibody specific)

ความจำเพาะของ Antibody เป็นสิ่งสำคัญประการแรกที่ต้องคำนึงถึง แม้ว่า Antibody ส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับ Epitope นั้นๆ อย่างไรก็ตาม ยังอาจมี Antibody ที่ขาดความจำเพาะและสามารถจับกับ Epitope ได้หลากหลาย นอกจากนี้การเลือก Antibody ให้เหมาะสมกับงาน IHC เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง จึงควรพิจารณาเลือกใช้ Antibody ที่มีความเหมาะสม มีความจำเพาะสูงและมีคุณภาพที่ดี ดังนั้น Antibody ที่ได้มาใหม่ทุกครั้ง ต้องทำการทดสอบความถูกต้อง (Validation) และควรหาค่าการเจือจาง (Dilution) ที่เหมาะสม ก่อนทำการทดสอบจริง

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ระหว่าง Monoclonal antibody และ Polyclonal antibody นั้นพบว่า Polyclonal antibody มีความไวมากกว่าแต่มีความจำเพาะน้อยกว่า เนื่องจาก Polyclonal antibody จัดจำหลาย Epitope ในขณะที่ Monoclonal antibody จัดจำเพียง epitope เดียว

กระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาที่มีผลต่อวิธี IHC

ก่อนทำการย้อมด้วยวิธี IHC เนื้อเยื่อที่ต้องการทดสอบต้องผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา ที่มีผลกระทบท่อวิธี IHC ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การตรึง กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อแล้วแทนที่ด้วยพาราฟิน และการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน

การตรึง (Fixation)

การแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยา 10% Neutral buffered formalin ในสภาพที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์คงสภาพของรูปร่างและไม่ทำลาย Antigen การแช่ชิ้นเนื้อในระยะเวลาสั้นเกินไปอาจช่วยให้ Antigen คงสภาพ แต่ไม่สามารถคงรูปร่างของเซลล์ได้ ในทางกลับกัน การแช่ชิ้นเนื้อในเวลานานเกินไป เซลล์จะคงสภาพดี แต่ฟอร์มาลินอาจบดบังและทำลายโครงสร้างของโปรตีน รวมถึง Antigen ได้ เพื่อให้เกิดผลดีที่สุดจึงควรปฏิบัติตามนี้ กล่าวคือ ระหว่างทำการเก็บตัวอย่างเพื่อการตรึงไม่ควรปล่อยให้ชิ้นเนื้อแห้ง ควรรีบนำชิ้นเนื้อลงแช่ในฟอร์มาลินทันที ชิ้นเนื้อแห้งเมื่อนำไปย้อมจะทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะที่บริเวณขอบของแผ่นเนื้อเยื่อได้ ขนาดชิ้นเนื้อที่พอเหมาะควรมีขนาด 20X20X4 มิลลิเมตร (กว้างxยาวxหนา) แช่ในน้ำยา 10% Neutral buffered formalin ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หรือประมาณ 10 เท่า ชิ้นเนื้อที่มีขนาดใหญ่เกินไป น้ำยาจะแทรกซึมได้ไม่ดี และเวลาที่เหมาะสมในการแช่คือ 6-12 ชั่วโมง และไม่ควรเกิน 48 ชั่วโมง หากนานกว่านั้น จะทำให้เกิดการจับกันระหว่างโมเลกุลของกรดอะมิโนด้วยพันธะเพปไทด์ ภายในโมเลกุลของเนื้อเยื่อ เป็นการทำลายคุณสมบัติที่ดีของ Antigen (Antigenicity) ได้

กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและแทนที่ด้วยพาราฟิน (Tissue processing)

กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและแทนที่ด้วยพาราฟิน โดยการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรึง แล้วแทนที่ด้วยพาราฟิน กระบวนการดังกล่าวส่งผลต่อปฏิกิริยาของ Antigen-Antibody ในทางลบ เนื่องจากในขั้นตอนนี้ ใช้สารเคมีที่มีความรุนแรงได้แก่ Xylene และ Ethanol ซึ่งจะบดบังและทำลายโครงสร้างของโปรตีนรวมถึง Antigen ในเนื้อเยื่อได้เป็นผลให้คุณภาพของ Epitope ของ Antigen ลดลงหรือสูญเสีย

การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (Tissue embedding)

การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟินต้องใช้ความร้อนประมาณ 60°C ซึ่งทำลายโครงสร้างของโปรตีนรวมถึง Antigen ในเนื้อเยื่อ ก่อให้เกิดผลที่ไม่จำเพาะ (Non-specific binding) หรือผลลวง (Artifacts) ได้เช่นกัน นอกจากนี้การเก็บสไลด์เนื้อเยื่อหลังการตัด (Sectioning) เป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ต้องพิจารณาให้มีความเหมาะสม โดยไม่เก็บในที่อุณหภูมิสูงเกินไปเพราะอาจส่งผลให้ Antigen ลดคุณภาพลง

อย่างไรก็ตามวิธี IHC ต้องผ่านกระบวนการเหล่านี้ อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ จึงมีความจำเป็นต้องอาศัยการคืนสภาพ Antigen (Antigen retrieval)

การคืนสภาพ Antigen (Antigen retrieval)

การคืนสภาพ Antigen คือการปรับสภาพหรือเปิดเผย Antigen ให้มีคุณสมบัติที่ดี (Unmask antigenicity) เนื่องจาก Antigen ถูกทำลายโครงสร้างจากกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยา ดังได้กล่าวมาแล้ว การคืนสภาพ Antigen ช่วยให้ Antigen มีสภาพพร้อมที่จะถูกจับโดย Antibody ที่จำเพาะได้ ในปัจจุบันมีวิธีที่สามารถคืนสภาพ Antigen หลายวิธี อาทิ การใช้เอนไซม์ การใช้คลื่นไมโครเวฟ การใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) และการต้มภายใต้ความดัน (Pressure cooking) เป็นต้น

1. การใช้เอนไซม์ (Enzymatic digestion) โดยการเติม Proteolytic enzyme ที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ 37°C เอนไซม์ ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น Actinase E, Trypsin, Proteinase K และ Pepsin เป็นต้น
2. การใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave irradiation) โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วนำไปอุ่นในเครื่องไมโครเวฟ โดยตั้งค่าความร้อนและระยะเวลาให้เหมาะสม
3. การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclaving) โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วนำไปนึ่งในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ โดยการตั้งค่าอุณหภูมิและระยะเวลาให้เหมาะสม ซึ่งส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. การต้มภายใต้ความดัน (Autoclaving or pressure cooking) โดยการแช่สไลด์เนื้อเยื่อในน้ำยาบัฟเฟอร์ แล้วนำไปอุ่นในหม้อความดันภายใต้ความดัน (Pressure cooking pot)

ทั้งนี้บัฟเฟอร์ที่ใช้มีหลายชนิด เช่น Tris buffer, Sodium citrate buffer และ Ethylenediamine tetraacetic (EDTA) buffer นอกจากนี้ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่จะเลือกใช้ต้องพิจารณาตามความเหมาะสมที่จะช่วยคืนสภาพ Antigen แต่ไม่มากเกินไปจนทำลาย Epitope อย่างไรก็ตามการคืนสภาพ Antigen มีทั้งข้อดีและข้อเสีย กล่าวคือ เป็นการเพิ่มปฏิกิริยาของ Antigen-Antibody ทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ จึงควรคำนึงถึงขณะทำการแปลผล

การกำจัด Endogenous peroxidase

Endogenous peroxidase เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่โดยปกติในเนื้อเยื่อ พบได้ในเซลล์ทุกชนิดที่มี Hemoprotein ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวพวก Granulocytes และ Monocytes รวมทั้งเนื้อเยื่อตับและไต ซึ่ง Endogenous peroxidase จะมีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ Horseradish peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย้อมด้วยวิธี IHC จึงสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะได้ จำเป็นต้องกำจัดออกให้หมด หรือให้มากที่สุด โดยการเติม Substrate ซึ่งก็คือ Hydrogen peroxide

การกำจัดหรือสกัดกั้นการจับของโปรตีนกับเซลล์ (Protein block)

เนื่องจาก Primary antibody มีคุณสมบัติดังเช่นโปรตีนทั่วไป กล่าวคือ สามารถจับกับเซลล์ผ่านปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิตย์ (Electrostatic) และปฏิกิริยาต้านน้ำ (Hydrophobic) เป็นผลให้เกิดการย้อมแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific staining) ได้ จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการกำจัดหรือสกัดกั้น การจับของโปรตีนกับเซลล์ (Protein block) โดยการล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Phosphate buffered saline (PBS) ในทุกขั้นตอนของการย้อม ร่วมกับการใช้ Antibody อื่นๆ ในซีรัม หรือน้ำนม (Casein) ก่อนขั้นตอน Primary antibody โดย Antibody เหล่านี้จะจับกับเซลล์ทั่วไป ซึ่งจะช่วยลดหรือกำจัดการย้อมแบบไม่จำเพาะได้ดียิ่งขึ้น ข้อพิจารณาที่สำคัญในการใช้ Antibody ในขั้นตอนนี้คือ ต้องเลือกใช้ Antibody ที่ผลิตจากสัตว์ชนิดเดียวกันกับที่ผลิต Secondary antibody ซึ่งทำให้มั่นใจได้ว่า Secondary antibody จะไม่จับกับ Antibody เหล่านี้

การทดสอบความถูกต้องของความจำเพาะของ Antibody (Validation of antibody specific)

การทดสอบความถูกต้องของความจำเพาะของ Antibody เป็นสิ่งที่ต้องทำทุกครั้ง เนื่องจาก Antibody เป็นสารชีวภาพซึ่งมีความแปรผันในการจับกับ Antigen ตามความชอบ (Affinity) และความจำเพาะ (Specificity) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องย้อมตัวควบคุมบวกและลบด้วยทุกครั้งเพื่อเป็นการทดสอบความถูกต้องของความจำเพาะของ Antibody หรือเรียกว่า Antibody control

Antibody control

Antibody control เป็นการควบคุมเพื่อดูความจำเพาะของ Primary antibody ในการย้อมแต่ละครั้ง โดยการแทนที่ Primary antibody ด้วย Negative control antibody ซึ่งไม่สามารถจับกับ Epitope ของ Antigen ที่ต้องการตรวจ

การเลือกใช้ Negative control antibody นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของ Primary antibody กรณี Primary antibody เป็น Polyclonal antibody ในปัจจุบันนิยมใช้ ซีรัมของกระต่ายหรือแพะ ซึ่งมีผู้ผลิตขายโดยการนำซีรัมของสัตว์ดังกล่าวที่ไม่ได้รับ Antigen ใดๆ (Preimmune serum) มาผลิต

เพื่อเป็นการยืนยันความจำเพาะในการย้อมด้วยวิธี IHC ในการทำการทดสอบแต่ละครั้ง จึงควรมีตัวอย่างควบคุมดังนี้

1. ตัวอย่างควบคุมบวก (Positive control) คือตัวอย่างที่มี Antigen ชนิดเดียวกันกับ Antigen ที่ต้องการทดสอบ นำไปผ่านวิธีการเดียวกันทุกประการกับตัวอย่างทดสอบ
2. ตัวอย่างควบคุมลบ (Negative control) คือตัวอย่างที่ไม่มี Antigen ชนิดเดียวกันกับ Antigen ที่ต้องการทดสอบ นำไปผ่านวิธีการเดียวกันทุกประการกับตัวอย่างทดสอบ
3. ตัวอย่างควบคุมแทนที่ (Substitution control) คือตัวอย่างทดสอบที่นำไปผ่านวิธีการเดียวกันทุกประการกับตัวอย่างทดสอบ แต่ใส่ Negative control antibody แทน Primary antibody

ผลที่ดีที่สุดคือ ความเข้มของสีมากที่สุด ที่แสดงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง Antigen-Antibody และไม่ให้สีในส่วนที่ไม่ใช่ปฏิกิริยาจำเพาะ

การเจือจาง Antibody (Antibody dilution)

การเจือจาง Antibody ในที่นี้หมายถึงการเจือจาง Primary antibody (Monoclonal antibody และ Polyclonal antibody) ทั้งนี้การเริ่มใช้ Primary antibody ที่ได้มาใหม่ ผู้ขายหรือเจ้าของ Antibody มักแนะนำค่าการเจือจางให้ อย่างไรก็ตามผู้ใช้ควรต้องหาค่าการเจือจางที่เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อให้ได้ค่าการเจือจางที่สิ้นเปลือง Primary antibody น้อยที่สุด และให้ผลในการการย้อมดีที่สุด กล่าวคือ เกิดปฏิกิริยาที่ถูกต้องชัดเจนและปราศจากการย้อมแบบไม่จำเพาะ เนื่องจาก Primary antibody มีราคาแพงและผลิตได้ยาก ในกรณีที่ไม่มีความแนะนำ ผู้ใช้ควรเริ่มจากการเจือจาง 1:100 หรือ 1:500 แล้วทำ Serial dilution ของ Primary antibody เพื่อเลือกค่าการเจือจางที่ให้ผลดีที่สุดและมีค่าการเจือจางสูงสุด

แผ่นสไลด์แก้ว

แผ่นสไลด์แก้ว ที่ใช้ในการย้อมด้วยวิธี IHC ต้องใช้ชนิดพิเศษที่สามารถยึดเนื้อเยื่อไม่ให้หลุดออกตลอดการย้อม เพราะหากหลุดออก การย้อมจะล้มเหลว เป็นการเสียเวลาและงบประมาณโดยไม่จำเป็น แผ่นสไลด์แก้วที่นิยมใช้คือ แผ่นสไลด์แก้วชนิดมีประจุบวก (Positive charged slide) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า และแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย 2% 3-Aminopropyl triethoxy silane ซึ่งสามารถนำแผ่นสไลด์แก้วธรรมดาามาเคลือบเองได้ เป็นการลดค่าใช้จ่าย

6. วิธีการย้อม IHC แบบใช้เอนไซม์

วิธีการย้อม IHC ที่จะกล่าวต่อไปนี้เป็นวิธีการทั่วๆ ไป ซึ่งในการปฏิบัติงานจริง ผู้ปฏิบัติสามารถปรับค่าความเข้มข้นของสารหรือน้ำยาในบางขั้นตอน หรือใช้ทางเลือกอื่นๆ ได้ตามความเหมาะสม

1. นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการแช่น้ำยา 10% Neutral buffered formalin เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง มาตัดแต่งขนาดกว้าง×ยาว ไม่เกิน 2×3 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.3 เซนติเมตร จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและแทนที่ด้วยพาราฟินด้วยเครื่อง Tissue processor
2. นำชิ้นเนื้อจากข้อ 1 มาฝังในพาราฟินเหลว 3-5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งให้เย็นจะได้พาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ
3. นำพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้เป็นแผ่นหนา 2-6 ไมครอน วางบนแผ่นสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย 2% 3-Aminopropyl triethoxy silane หรือสไลด์แก้วชนิดมีประจุบวก (*1)
4. อบสไลด์ที่ได้ในตู้อบ 60°C นาน 30 นาที
5. นำสไลด์แช่ใน Xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เพื่อละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffinization) (ภาพที่ 11)
6. นำสไลด์แช่ใน 100% Ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามด้วย 95% Ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เพื่อเติมน้ำเข้าสู่สไลด์เนื้อเยื่อ (Rehydration) (ภาพที่ 11)
7. นำสไลด์ไปแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที
8. นำสไลด์มาเป่าให้แห้งด้วยลมเย็น แล้วเขียนวงรอบแผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยปากกา ไฮโดรโฟบิก มาร์คเกอร์ (Hydrophobic marker) เพื่อสร้างวงกั้นมิให้น้ำยาที่จะหยดลงบนแผ่นเนื้อเยื่อไหลออก (ภาพที่ 12) (ข้อนี้อาจไม่ปฏิบัติก็ได้)

9. นำสไลด์แช่ใน 0.3% Hydrogen peroxide ใน Methanol 30 นาที (*2) เพื่อกำจัด Endogenous peroxidase ในเนื้อเยื่อ ป้องกันมิให้เกิดปฏิกิริยาสับสนกับ Peroxidase ใน Complex (ภาพที่ 13)

10. ล้างสไลด์ในน้ำยา PBS (*3) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (ภาพที่ 14)

11. วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น (Moisture chamber) แล้วหยดเอนไซม์ เช่น Proteinase K และ Trypsin 30 นาที เพื่อขจัดสิ่งบดบัง Antigen ที่ต้องการตรวจหาหรือคืนสภาพ Antigen (Antigen retrieval หรือ Unmasking antigenicity) (*4) (ภาพที่ 15)

12. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำยา PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น แล้วหยด 10% Normal goat serum (Preimmune goat serum) (*5) แผ่นละ 100–200 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับขนาดของเนื้อเยื่อ) เป็นเวลา 15–20 นาทีเพื่อกำจัดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (Non-specific reaction) (ภาพที่ 16)

14. เท 10% Normal goat serum ที่วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น แล้วหยด Primary antibody แผ่นละ 100–200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที (ภาพที่ 17) หรือถ้าต้องการเก็บข้ามคืน ให้นำกล่องเก็บความชื้นแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C (เมื่อนำสไลด์ออกจากตู้เย็นแล้วควรปล่อยให้สไลด์คลายความเย็นลงจนเท่าอุณหภูมิห้องก่อนดำเนินการในขั้นตอนต่อไป)

15. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำยา PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

16. วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น แล้วหยด Secondary antibody (Biotinylated goat-anti-rabbit antibody) แผ่นละ 100–200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที (*6) (ภาพที่ 18)

17. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำยา PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

18. วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น แล้วหยด SAB แผ่นละ 200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที (ภาพที่ 19)

19. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำยา PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

20. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำกลั่น 10 วินาที

21. วางสไลด์ในกล่องเก็บความชื้น แล้วหยดด้วย DAB solution 100–200 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1–5 นาที เพื่อให้เกิดสี (*7) (ภาพที่ 20)

22. นำสไลด์ไปล้างโดยแช่ในน้ำกลั่น 10 วินาที 2 ครั้ง (ภาพที่ 21)

23. นำสไลด์ไปย้อมทับโดยแช่ในสี Haematoxylin ประมาณ 10 วินาที (*8) (ภาพที่ 22)

24. นำสไลด์ไปแช่ในน้ำก๊อกไหล 5 นาที (ภาพที่ 23)

25. นำสไลด์ไปแช่ใน 95 % Ethanol 5 วินาที ตามด้วย 100% Ethanol 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที เพื่อดึงน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ (Dehydration) (ภาพที่ 24)

26. นำสไลด์ไปแช่ใน Xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที

27. นำสไลด์มาหยดน้ำยาสำหรับยัดแผ่นสไลด์และแผ่นกระจกบางชนิด Non-aqueous mounting medium 1–2 หยด (ภาพที่ 25) ปิดด้วยแผ่นกระจกบาง (Coverglass slip) (ภาพที่ 26)

28. นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้ (ภาพที่ 27) ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ส่องสว่าง

(*1) เพื่อให้เนื้อเยื่อยึดติดแน่นกับแผ่นสไลด์ เนื่องจากในขั้นตอนต่างๆ ไม่สามารถปล่อยให้เนื้อเยื่อแห้ง ดังนั้นเนื้อเยื่อจะเปียกตลอดระยะเวลาของการย้อม ประกอบกับมีการล้างจำนวนหลายครั้ง

หากเนื้อเยื่อไม่ยึดติดแน่นกับแผ่นสไลด์แก้ว จะหลุดไประหว่างการย้อมได้ ทำให้การย้อมไม่ประสบผลสำเร็จและเป็นการสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็น

(*2) สามารถเพิ่มค่า %Hydrogen peroxide ใน Methanol ตามความเหมาะสม และสามารถผสม Hydrogen peroxide ในน้ำกลั่นได้

(*3) สามารถใช้ Tris-buffered saline (TBS) 0.05 M pH 7.6 แทน PBS

(*4) สามารถใช้คลื่นไมโครเวฟ และต้มด้วยความร้อนภายใต้ความดัน ซึ่งหากเลือกวิธีเหล่านี้ นิยมทำก่อนการกำจัด Endogenous peoxidase ด้วย Hydrogen peroxide ใน Methanol

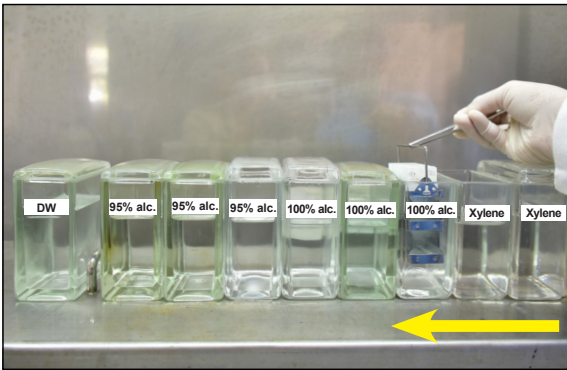
(*5) สามารถใช้ 5–10% Skim milk แทน

(*6) หากใช้ Dextran polymer system ให้ข้ามไปทำข้อ 19

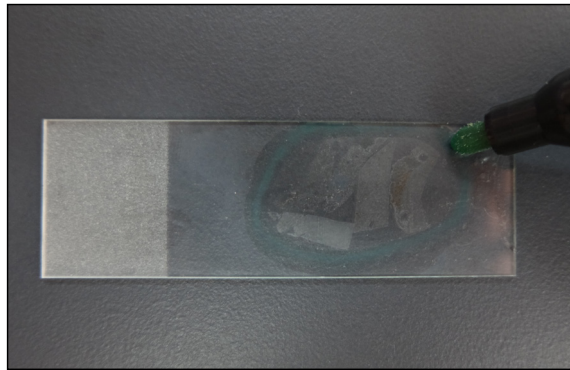
(*7) หากเลือกใช้ AEC ให้ข้ามขั้นตอนที่ 25–26 (เนื่องจาก Ethanol และ Xylene จะละลายสีของ AEC ออกได้) แล้วนำสไลด์มาหยดน้ำยาสำหรับย้อมแผ่นสไลด์และแผ่นกระจกบาง ชนิด Aqueous mounting medium 1–2 หยด ปิดด้วยแผ่นกระจกบาง

(*8) สามารถเลือกใช้สี Methyl green แทน

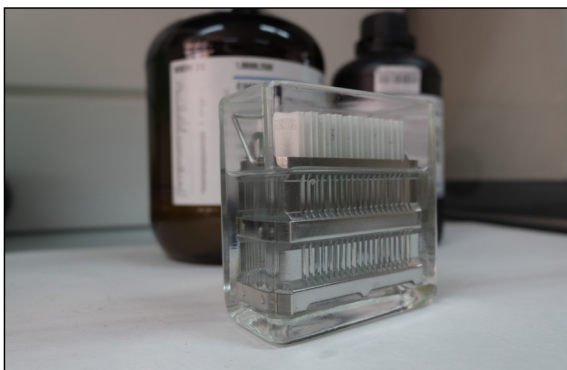
ภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการย้อมด้วยวิธี IHC



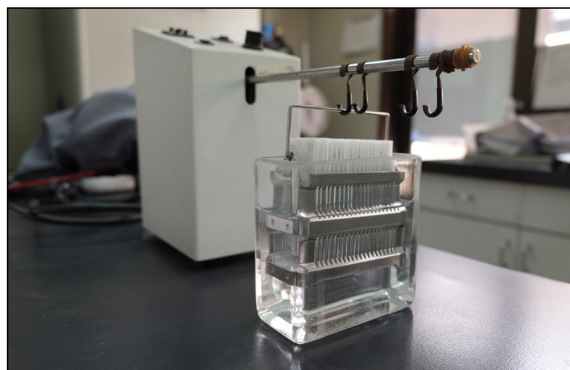
ภาพที่ 11 Deparaffinization และ Rehydration



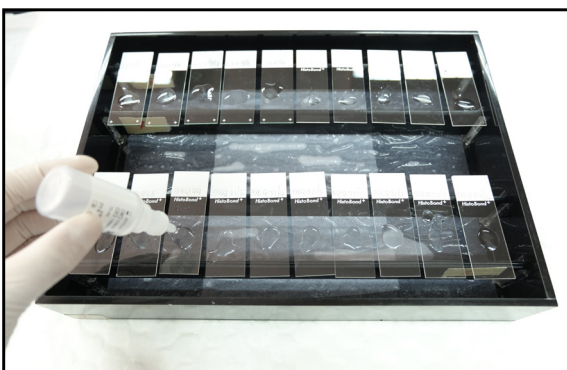
ภาพที่ 12 นำสไลด์มาเป่าให้แห้งด้วยลมเย็น แล้วเขียนวงรอบแผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วย Hydrophobic marker



ภาพที่ 13 กำจัด Endogenous peroxidase



ภาพที่ 14 ล้างสไลด์เนื้อเยื่อด้วย PBS

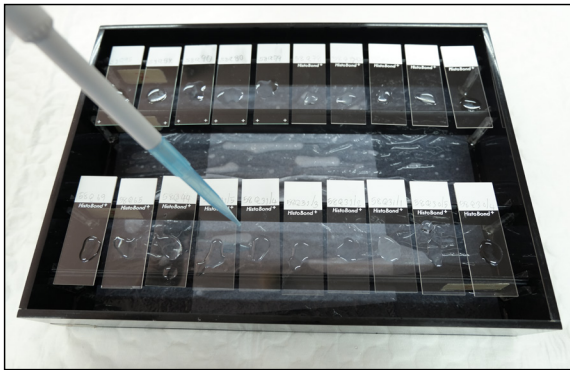


ภาพที่ 15 Antigen retrieval ด้วยเอนไซม์

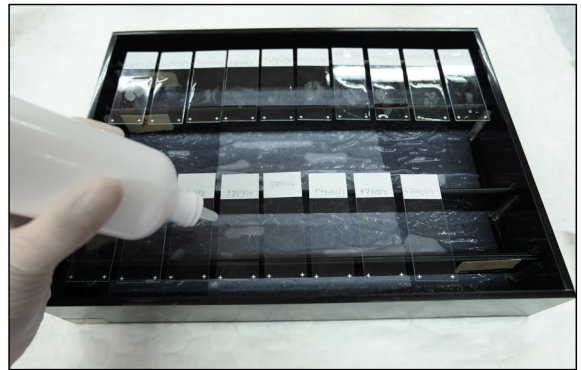


ภาพที่ 16 Protein block ด้วย Normal serum

ภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการย้อมด้วยวิธี IHC (ต่อ)



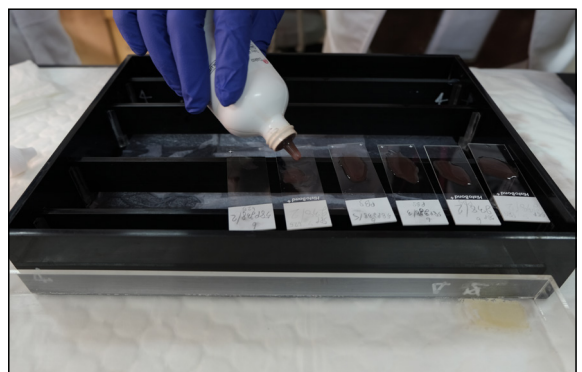
ภาพที่ 17 หยด Primary antibody บนสไลด์เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 18 หยด Secondary antibody บนสไลด์เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 19 หยด SAB บนสไลด์เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 20 หยดน้ำยา DAB บนสไลด์เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 21 แสสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น

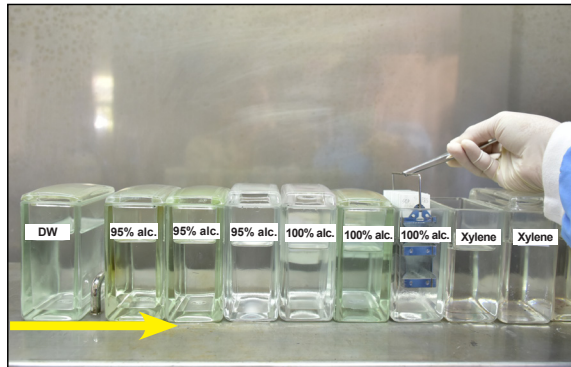


ภาพที่ 22 ย้อมทับด้วยสี Haematoxylin

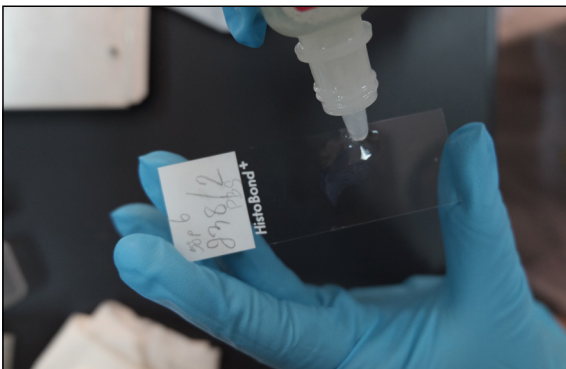
ภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการย้อมด้วยวิธี IHC (ต่อ)



ภาพที่ 23 แช่สไลด์เนื้อเยื่อในน้ำก๊อกไหล



ภาพที่ 24 ดึงน้ำออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ (Dehydration)



ภาพที่ 25 หยดน้ำยา Mounting medium



ภาพที่ 26 ปิดทับด้วย Cover glass slip



ภาพที่ 27 สไลด์เนื้อเยื่อที่ได้

7. การแปลผล (Interpretation)

การแปลผลทำโดยการเปรียบเทียบปฏิกิริยาจำเพาะ ระหว่าง Antigen–Antibody ของตัวอย่างทดสอบ (ตัวอย่างที่ต้องการตรวจหา Antigen) กับตัวอย่างควบคุมบวก ตัวอย่างควบคุมลบ และตัวอย่างควบคุมแทนที่ ซึ่งต้องให้ผลตรงตามที่ควรจะเป็น กล่าวคือ ตัวอย่างควบคุมบวกให้ผลบวก ส่วนตัวอย่างควบคุมลบและตัวอย่างควบคุมแทนที่ให้ผลลบ จึงจะสามารถแปลผลของตัวอย่างทดสอบได้ ผลบวกแสดงโดยการเกิดสี ตรงตำแหน่งของ Antigen ที่ต้องการตรวจหา ลักษณะการติดสีแบ่งเป็นกลุ่มก้อน (Focal) และกระจาย (Diffuse) ซึ่งจะพบอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของเซลล์ได้แก่ ในไซโตพลาสซึม ในนิวเคลียส และที่ผิวของเซลล์ เซลล์แต่ละเซลล์ย่อมมี Antigen ในปริมาณต่างๆ กัน ความเข้มของสีที่ปรากฏจึงมีความเข้มต่างกัน ซึ่งถ้าปราศจากลักษณะดังกล่าวนี้ เช่น สีมีลักษณะสม่ำเสมอ และเท่ากันทุกเซลล์ อาจเกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ ซึ่งอาจพบได้ในเนื้อเยื่อคอลลาเจน (Collagen) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครเฟจ (Macrophage) มักพบปฏิกิริยาจำเพาะได้เนื่องจากแมคโครเฟจ Antigen เข้าไป

8. สิ่งแปลกปลอม (Artifacts)

สิ่งแปลกปลอมคือ สิ่งที่ทำให้เกิดความสับสนกับปฏิกิริยาจำเพาะในการอ่านผล มี 4 แบบคือ

1. ตะกอน (Precipitates) สังเกตจากลักษณะที่ไม่ได้อยู่ในเซลล์ แต่จะกระจายอยู่บนแผ่นเนื้อเยื่อ ตะกอนเกิดจากการใช้สีย้อมทับที่ไม่ได้กรอง การแช่ชิ้นเนื้อในน้ำยาฟอรัมาลินที่ไม่ใช้บัฟเฟอร์ฟอรัมาลิน และ Chromogen ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาแต่หลงเหลืออยู่
2. เนื้อเยื่อ (Tissue artifact) เนื้อเยื่อที่ตัดหนาเกินไป เนื้อเยื่อที่เกิดรอยพับ และเนื้อเยื่อที่มีเลือดออก จะทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะได้
3. เซลล์ (Cell artifact) เซลล์ที่ติดสีเข้มสม่ำเสมอ ไม่ใช่ปฏิกิริยาที่แท้จริง มักพบในเซลล์ที่ตายแล้ว หรือเซลล์แตก
4. ปฏิกิริยาจำเพาะ (Specific background staining) การติดสีของปฏิกิริยาจำเพาะบางครั้งก็อาจรบกวนการแปลผลได้ ในกรณีที่เนื้อเยื่อมีเลือดออกมาก จะทำให้ซีรัมแทรกเข้าไประหว่างเนื้อเยื่อได้ ถ้าในซีรัมดังกล่าว มี Antigen ที่ต้องการตรวจหาอยู่ในปริมาณมาก จะติดสีเข้มซึ่งอาจจะบดบัง Antigen ที่อยู่ในเซลล์ได้

9. การแก้ไขปัญหาที่พบ (Trouble shooting)

ในการย้อม IHC แต่ละครั้ง อาจเกิดปัญหาต่างๆ ที่ทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการย้อม ต้องวิเคราะห์ หาสาเหตุที่เป็นไปได้ จึงจะสามารถแก้ปัญหาได้อย่างถูกต้องตรงจุด ปัญหาที่พบบ่อย มีสาเหตุ และสามารถแก้ไขได้ ดังในตารางที่ 1 (ที่มา : Dako IHC Guidebook Sixth Edition. 2015)

ตารางที่ 1 แสดงปัญหาที่พบ สาเหตุ และการแก้ไขในการย้อม IHC

	ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
1	ตัวอย่างควบคุมบวกและตัวอย่างทดสอบ ไม่ติดสีหรือติดสีจางมาก	ข้ามขั้นตอน Primary antibody หรือขั้นตอนการเติม Reagent ตัวอื่นๆ	ปฏิบัติตามขั้นตอนอย่างเคร่งครัด โดยปฏิบัติตามเอกสารขั้นตอนการทำงาน (Worksheet)
		เจือจาง Primary antibody มากเกินไป รวมถึงเวลาและอุณหภูมิ ในการทำปฏิกิริยาของ Primary antibody ไม่เหมาะสม	ควรเจือจาง Primary antibody ให้เหมาะสม เวลาและอุณหภูมิ ในการทำปฏิกิริยาของ Primary antibody เป็นค่าที่ผูกพันกัน หากใช้เวลานาน เช่น ซ้ำคืน ควรใช้อุณหภูมิต่ำเช่น 4°C หากใช้เวลาน้อย เช่น 30 นาที -1 ชั่วโมง ควรใช้อุณหภูมิสูง เช่น 37°C
		เจือจาง Primary antibody ในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่ไม่เหมาะสม หรือมี Detergent ปนเปื้อนในน้ำยาบัฟเฟอร์	ควรเจือจาง Primary antibody ในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม เช่น PBS หรือ TBS และควรตรวจสอบสูตรการเตรียมให้ดี
		Primary antibody หรือ Reagent เสื่อมคุณภาพ หรือหมดอายุ	- ไม่ใช้ Primary antibody หรือ Reagent หมดอายุ - เก็บ Primary antibody หรือ Reagent ตามคำแนะนำของผู้ผลิต - หากจะแช่แข็ง Primary antibody ควรแบ่งเก็บ (Aliquot) และหลีกเลี่ยงการแช่แข็ง และการละลายซ้ำๆ - Reagent แบบพร้อมใช้ไม่ควรแช่แข็ง และควรปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิต
		การแยกตัวหรือหลุดของ Primary antibody ระหว่างการล้างหรือการทำปฏิกิริยากับ Antibody หรือ Reagent อื่นๆ	ควรเจือจาง Primary antibody ให้เหมาะสม ไม่ควรเจือจางมากเกินไป
		ใช้สีย้อมทับ หรือ Mounting media ที่มีแอลกอฮอล์ มีผลให้ Chromogen ชนิดละลายในน้ำหลุดออก	- ใช้สีย้อมทับหรือ Mounting media ชนิด Water-based - ใช้ Chromogen เช่น DAB ซึ่ง Organic solvent ไม่มีผลกระทบ
		สีย้อมทับบดบังปฏิกิริยา ผลบวก เพราะความเข้มของสีย้อมทับมากเกินไป	ใช้สีย้อมทับที่สีไม่เข้มจนเกินไปหรือลดระยะเวลาในการย้อมสีย้อมทับลง

ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
	เตรียมส่วนผสม Substrate–Chromogen ไม่ถูกต้อง	เตรียมส่วนผสม Substrate–Chromogen โดยระมัดระวัง Chromogen ที่มากเกินไป อาจลดการเกิดปฏิกิริยา
	น้ำยาบัพเฟอร์มี Sodium azide (Antibacterial agent) ซึ่งจะขัดขวางการทำปฏิกิริยา ของ Horseradish peroxidase	หลีกเลี่ยงการใช้ยาบัพเฟอร์ที่มี Sodium azide กับ Horseradish peroxidase
	ใช้น้ำยา Fixative ที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจะทำลาย Epitope ของ Antigen	เลือกน้ำยา Fixative ตามคำแนะนำของผู้ผลิต Antibody ซึ่งมักมีคำแนะนำในขั้นตอนการย้อม
	Antigen ถูกทำลายในขั้นตอนการฝังในพาราฟิน	ควรใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการฝังในพาราฟินประมาณ 60°C ไม่ควรสูงกว่านี้
	Antigen ถูกทำลายในขั้นตอนละลายพาราฟินที่อุณหภูมิสูงและเป็นเวลานาน	– ตู้อบ (Oven) ไม่ควรมีอุณหภูมิมากกว่า 60°C – ทำ Antigen retrieval
	ผิวหน้าของเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน ถูกตัดไปจากการตัดคราก่อน และสัมผัสอากาศเป็นผลให้ ลดความคุณสมบัติที่ดีของ Antigen	– ควรใช้สไลด์เนื้อเยื่อที่ตัดในคราวแรก – เมื่อตัดเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟินเสร็จแล้วควรปิดหน้าบล็อกด้วยพาราฟินเพื่อป้องกันเนื้อเยื่อมิให้ถูกอากาศ ทำให้สามารถใช้เนื้อเยื่อดังกล่าวได้อีก
	น้ำยาที่ใช้ในการล้าง หรือ Antibody ที่ใช้ในขั้นตอน Protein block หลงเหลือบนสไลด์เนื้อเยื่อมากเกินไปในขั้นตอนการย้อม	ควรสลับทั้งน้ำยาที่ใช้ในการล้าง หรือ Antibody ที่ใช้ในขั้นตอน Protein block ออกจากสไลด์เนื้อเยื่อให้มากที่สุด
	การทำ Antigen retrieval ไม่เหมาะสม หรือข้ามขั้นตอนนี้	ต้องทำ Antigen retrieval ทุกครั้งที่ย้อม และควรทำซ้ำๆ เพื่อหาค่า Antigen retrieval ที่เหมาะสม
	ใช้ Antigen retrieval buffer ซ้ำ	ห้ามใช้ Antigen retrieval buffer ซ้ำ
	สไลด์เนื้อเยื่อกำจัดพาราฟินออกไม่หมด	ใช้น้ำยา Xylene ที่เตรียมใหม่
	การทำ Antigen retrieval โดยใช้ความร้อนล้มเหลว	– เลือกใช้วิธี Antigen retrieval ที่เหมาะสม หากไม่ได้ผลควรเลือกปรับให้ได้ค่าที่เหมาะสม

	ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
2	ตัวอย่างควบคุมบวก ติดสีดี แต่ตัวอย่างทดสอบที่คาดหวังว่ามี Antigen ไม่ติดสี	ตัวอย่างทดสอบ ตรึงอยู่ในน้ำยา Formalin นานเกินไป (มากกว่า 48 ชั่วโมง) ซึ่งจะเกิด Cross-linking บดบัง Epitope ของ Antigen	- ตัวอย่างทดสอบ ควรตรึงอยู่ในน้ำยา Formalin ไม่มากกว่า 48 ชั่วโมง - ทำ Antigen retrieval ซึ่งจะช่วยให้คลาย Cross-linking
3	ตัวอย่างควบคุมบวก ติดสีดี แต่ตัวอย่างทดสอบที่คาดหวังว่ามี Antigen ติดสีจาง	เนื้อเยื่อมี Antigen ที่ต้องการตรวจ ปริมาณน้อย	- เพิ่มเวลาของ Primary antibody - เพิ่มความเข้มข้นของ Primary antibody
		Antigen เสื่อมสภาพจากการตรึงที่ไม่เหมาะสม คือนานเกินไป	ทำ Antigen retrieval
		น้ำยาที่ใช้ในการล้าง หรือ Antibody ที่ใช้ในขั้นตอน Protein block หลงเหลือบนสไลด์เนื้อเยื่อมากเกินไปในขั้นตอนการย้อม	ควรสลับทั้งน้ำยาที่ใช้ในการล้าง หรือ Antibody ที่ใช้ในขั้นตอน Protein block ออกจากสไลด์เนื้อเยื่อให้มากที่สุด
4	ตัวอย่างควบคุมไม่มี Background ส่วน ตัวอย่างทดสอบมี Background ระดับต่างๆ (Background staining มักพบที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อไขมัน และ เยื่อบุผิว)	กำจัด Endogenous peroxidase ในตัวอย่างทดสอบไม่หมด	เพิ่มเวลาในการกำจัด Endogenous peroxidase
		ตัวอย่างทดสอบหนาเกินไป	ตัดตัวอย่างทดสอบให้บางตามขนาดที่เหมาะสม (2-6 ไมครอนเมตร)
		ตัวอย่างทดสอบมี Antigen ปริมาณมาก	- ลดระยะเวลาในการเติม Substrate - เจือจาง Primary antibody
		Protein block ไม่สมบูรณ์ Blocking serum เจือจางไป	เพิ่มความเข้มข้นของ Blocking serum
		สไลด์เนื้อเยื่อมีรอยย่นจากการตัดด้วยใบมีดที่อับ	ตัดสไลด์เนื้อเยื่อใหม่ด้วยใบมีดคม
		สไลด์เนื้อเยื่อของตัวอย่างทดสอบมีเนื้อตายที่ไม่เกี่ยวข้องกับโรคหรือเกิดจากการทำลายทางกายภาพ	ไม่นำปฏิกิริยาที่เกิดบริเวณนี้มาแปลผล
		น้ำยา Fixative ซึมเข้าเนื้อเยื่อตัวอย่างทดสอบไม่ทั่วถึง (Unfixed)เนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว จะสูญเสีย สภาพความเป็น Antigen ที่ดี และมักจับกับ Reagent ต่างๆ แบบไม่จำเพาะได้	ตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดพอเหมาะ ไม่ใหญ่จนเกินไป และเติมน้ำยา Fixative ในปริมาณที่เหมาะสมคือ 10 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อ
		สไลด์แก้วเคลือบด้วย Silane ไม่สม่ำเสมอ Reagents บางตัว อาจจับกับ Silane ในบริเวณที่มีมากเกินไป	เคลือบสไลด์แก้วด้วย Silane ให้สม่ำเสมอ หรือใช้ Positive charge slide
		Antigen เกิดการกระจายตัวออกจากบริเวณที่มันอยู่ก่อนการตรึงเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดปฏิกิริยานอกบริเวณที่ควรเป็น	หลีกเลี่ยงการตรึงเนื้อเยื่อที่ช้าเกินไป

	ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
5	พบ Background ในตัวอย่างควบคุมบวกและตัวอย่างทดสอบ	ระยะเวลาในขั้นตอน Substrate–Chromogen นานเกินไป	ลดระยะเวลาในขั้นตอน Substrate–Chromogen
		เตรียมน้ำยา Substrate–Chromogen ไม่ถูกต้อง	เตรียมน้ำยา Substrate–Chromogen ให้ถูกต้อง
		Secondary antibody จับ Antigen อื่นบนสไลด์เนื้อเยื่อ (จับแบบไม่จำเพาะกับเนื้อเยื่อของสัตว์)	ใช้ Secondary antibody ที่มีการดูดซึมส่วนที่จะจับกับเนื้อเยื่อของสัตว์ หรือใช้ Secondary antibody ที่ผลิตจากสัตว์ที่ไม่มีการจับแบบไม่จำเพาะกับเนื้อเยื่อของสัตว์นั้น
		Secondary antibody หรือน้ำยา Reagent มีความเข้มข้นมากเกินไป	เตรียม Secondary antibody หรือน้ำยา Reagent ให้ถูกต้องและควรคำนึงถึงระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา
		เตรียมนส่วนผสม Substrate–Chromogen ไม่ถูกต้อง	เตรียมนส่วนผสม Substrate–Chromogen ให้ถูกต้อง
		ล้างสไลด์เนื้อเยื่อไม่สะอาด	ล้างสไลด์เนื้อเยื่อให้สะอาด โดยเปลี่ยนน้ำยาบัพเฟอร์ทุกครั้ง
		ผสม Saline ในน้ำยาบัพเฟอร์น้อยเกินไป	ผสม Saline ในน้ำยาบัพเฟอร์ตามสูตร
		ใช้ Blocking serum ไม่ถูกต้อง	ใช้ Blocking serum จากสัตว์ชนิดเดียวกันที่ผลิต Secondary antibody
6	ตัวอย่างควบคุมแทนที่ติดสี Background ส่วนตัวอย่างควบคุม บวก และลบติดสีถูกต้อง	เจือจาง Negative control antibody ไม่เพียงพอ	เจือจาง Negative control antibody ให้ถูกต้อง โดยมีค่าเท่ากับ Polyclonal primary antibody และ Monoclonal primary antibody
		Negative control antibody มีการปนเปื้อนทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะ	เปลี่ยนใช้ Negative control antibody ที่ไม่ปนเปื้อน
		Negative control antibody มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา	เปลี่ยนใช้ Negative control antibody ที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา
7	ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างทดสอบ พบบริเวณที่ติดสีไม่สม่ำเสมอ	Chromogen เป็นก้อน ไม่ละลายตัว	ละลาย Chromogen ในรูปเม็ดหรือผงให้ดี หรือเปลี่ยนเป็นแบบของเหลวพร้อมใช้

	ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
		เนื้อเยื่อบางส่วนแห้งก่อนการตรึงในน้ำยา Fixative ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่แห้งก่อนการตรึงจะย้อมได้ปกติ	จุ่มเนื้อเยื่อทันทีในน้ำยา Fixative
		สไลด์เนื้อเยื่อแห้งระหว่างการย้อม	- รักษาสภาพความชื้นตลอด การย้อม - ใช้กล่องรักษาสภาพความชื้น (Moisture chamber) ทุกขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา
8	พบ Background ในเนื้อเยื่อไขมัน ในตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างควบคุมแทนที่ ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ	เกิดจากปฏิกิริยาแบบ Hydrophobic และ Ionic ระหว่าง Ig และสาร Lipoid ในเนื้อเยื่อ ไขมัน ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้เป็นปกติ และไม่รบกวนการแปลผลของปฏิกิริยาแบบจำเพาะ Primary antibody และ Negative control antibody เจือจางไม่ดีพอ	- หาค่าการเจือจางที่เหมาะสมใหม่ของ Primary antibody และ Negative control antibody
9	พบ Background ในเยื่อบุผิว โดยเฉพาะชั้น Epidermal epithelium และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ของตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างควบคุมแทนที่ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ	Primary antibody และ Negative control serum มีการปนเปื้อนของ Antibody ที่สามารถจับบางส่วนของเยื่อบุเช่น Cytokeratins ตัวอย่างทดสอบ ตรึงอยู่ในน้ำยา Formalin นานเกินไป (มากกว่า 48 ชั่วโมง) ซึ่งจะเกิด Cross-linking บดบัง Epitope ของ Antigen	- เพิ่มการเจือจาง Primary antibody และ Negative control antibody - เพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยา - เปลี่ยน Primary antibody - ทำ Antigen retrieval ซึ่งจะทำลาย Cross-linking
10	พบ Background ในตัวอย่างทดสอบตัวอย่างควบคุมแทนที่ ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ เมื่อใช้ Immunoperoxidase staining system	ไม่ได้กำจัด Endogenous peroxidase หรือกำจัดไม่หมด (เซลล์ Eosinophils และ Mast cells จะทนต่อการกำจัด Endogenous peroxidase)	- กำจัด Endogenous peroxidase หรือใช้เอนไซม์อื่น เช่น Alkaline phosphatase
11	พบ Background ในตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างควบคุมแทนที่ ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ เมื่อใช้ SAB	- มี Endogenous biotin ในเนื้อเยื่อ	- ใช้ Biotin block หรือใช้การย้อมแบบไม่ใช้ Biotin

	ปัญหาที่พบ	สาเหตุ	การแก้ไข
12	พบ Background ในกล้ามเนื้อเรียบและกล้ามเนื้อลายของตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างควบคุมแทนที่ ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ	สาเหตุไม่ทราบแน่ชัด อาจเกิดจาก Antibody ต่อ Muscle antigen ใน Primary antibody และ Negative reagent control serum ซึ่ง ไม่รบกวนการแปลผลที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบจำเพาะ	-
13	พบการติดสีเป็นหย่อม ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อในชั้นใต้ผิวหนังของเนื้อเยื่อทดสอบ	อาจเกิดจาก Passive absorption ของ Plasma proteins เข้าไปยัง Epidermal cell ที่เสื่อมสภาพซึ่งพบได้น้อยและไม่รบกวนการแปลผลที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบจำเพาะ	-
14	การติดสีที่ผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวของตัวอย่างทดสอบ ตัวอย่างควบคุมแทนที่ ตัวอย่างควบคุมบวก และตัวอย่างควบคุมลบ	การจับของ Ig โดย Receptor ของผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิด Macrophage Monocyte Granulocyte และ Lymphocyte	เติม Detergent ในน้ำยาบัพเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการล้าง
15	การติดสีที่เซลล์ Histiocyte และ Granulocyte ในตัวอย่างทดสอบ	กระบวนการเก็บกิน Antigen (Phagocytosis) โดย Histiocyte และ Granulocyte ให้ผลบวกได้เช่นกัน ซึ่งพบได้น้อย และไม่รบกวนการแปลผลที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบจำเพาะ	-

10. การตรวจโรคติดเชื้อในปศุสัตว์ด้วยวิธี IHC แบบใช้แอนติบอดี

ในหนังสือเล่มนี้ แสดงการตรวจโรคต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza) โรคไอบีดี (Infectious bursal disease) โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease) วัณโรคสัตว์ปีก (Avian tuberculosis) โรคไข้เวสต์ไนล์ (West Nile fever) โรคบรูเซลโลสิส (Brucellosis) ไข้ควี (Q fever) วัณโรค (Tuberculosis) โรคพาราทูเบอร์คิวโลสิส (Paratuberculosis/Johne's disease) โรคทริปปาโนโซโมสิส (Trypanosomosis) โรควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy) โรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ (Foot and mouth disease type O) กลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome/PRRS) โรคพอร์ซายเอพิเดมิกไดอะเรีย (Porcine epidemic diarrhea) โรคติดเชื้อพอร์ซายน์เซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus infection) โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah encephalitis) และโรค Colibacillosis ซึ่งแสดงลักษณะปฏิกิริยาผลบวกของวิธี IHC ของทุกโรค ควบคู่กับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (ย้อมสี Haematoxylin & Eosin/ H&E) ของเนื้อเยื่อที่ตำแหน่งเดียวกัน ในรูปภาพประกอบตั้งแต่ภาพที่ 36 ถึงภาพที่ 167

สำหรับขั้นตอนต่างๆ ในการย้อมสามารถดูจากข้อ 6 วิธีการย้อม IHC แบบใช้แอนติบอดี ทั้งนี้ในการย้อมแต่ละโรคควรพิจารณาสิ่งที่สำคัญ 2 ประการ คือ ค่าการเจือจาง Primary antibody (Dilution) และการคืนสภาพ Antigen (Antigen retrieval) ดังตัวอย่างในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดง Antibody คำการเจาะ และวิธีค้นสภาพ Antigen ของแต่ละโรค

Disease	Antibody	Antibody source	Dilution*	Antigen retrieval
1. Avian influenza	Monoclonal antibody against nucleoprotein of A type influenza virus	EVS™	1:2,000	Proteinase k 15 min
2. Infectious bursal disease	Rabbit anti- Infectious bursal disease virus polyclonal antibody	National Institute of Animal Health, Japan	1:8,192	Proteinase k 15 min
3. Newcastle disease	NDV monoclonal antibody (Mix Q24, Q91-6, Q4-5, Q50)	Australian Animal Health Laboratory	1:10	Proteinase k 15 min
4. Avian tuberculosis	Rabbit anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> polyclonal antibody	DAKO™	1:2,048	Proteinase k 10 min
5. West Nile fever	Rabbit anti-West Nile virus polyclonal antibody	Abcam™	1:100	Autoclave 121°C, 10 min in Tris-EDTA pH9.
6. Brucellosis	Rabbit anti- <i>Brucella abortus</i> polyclonal antibody	National Institute of Animal Health, Japan	1:2,048	Proteinase k 15 min
7. Q fever	Rabbit anti- <i>Coxiella burnetii</i> polyclonal antibody	Armed Forces Research Institute Medical Sciences	1:500	Tris/EDTA pH9 in Microwave 900 w 3 min, 300 w 10 min
8. Tuberculosis	Rabbit anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> polyclonal antibody	DAKO™	1:2,048	Proteinase k 10 min
9. Paratuberculosis	Rabbit anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> polyclonal antibody	DAKO™	1:2,048	Proteinase k 10 min
10. Trypanosomosis	Rabbit anti- <i>Trypanosoma evansi</i> polyclonal antibody	Parasitology section, National Institute of Animal Health, Thailand	1:200	Proteinase k 20 min
11. Bovine spongiform encephalopathy	Rabbit anti-prion protein polyclonal antibody	University of Bern, Switzerland	1:1,500	Proteinase k 5 ug/ml 15 min and autoclave 121°C 20 min
12. Foot and mouth disease virus type O	Monoclonal antibody against foot and mouth disease virus type O	National Institute of Animal Health, Japan	1:8 or 1:16	Tris/EDTA pH9 in Microwave 900 w 3 min, 300 w 10 min
13. Porcine reproductive and respiratory syndrome	Rabbit anti-PRRS virus polyclonal antibody	National Institute of Animal Health, Japan	1:8,000	Proteinase k 15 min
14. Porcine epidemic diarrhoea	Monoclonal antibody against PED virus (3F12)	Median™	1:50	Proteinase k 15 min
15. Porcine Circovirus infection	Rabbit anti-PCV2 virus polyclonal antibody	RIT™	1:50	Proteinase k 15 min
16. Nipah encephalitis	Rabbit anti-Nipah encephalitis virus polyclonal antibody	Australia Animal Health Laboratory	1: 400	Proteinase k 20 min
17. Colibacillosis	Rabbit anti- <i>E. coli</i> K12 C600 polyclonal antibody	DAKO™	1:2,048	Proteinase k 15 min

* ควรทดสอบเพื่อหาค่าความเจือจางของแอนติบอดีที่เหมาะสมก่อนการย้อมแต่ละครั้ง เนื่องจากแอนติบอดีอาจเสื่อมสภาพตามระยะเวลาที่เก็บ

บรรณานุกรม

- ABCAM. 2015. IHC-PARAFFIN PROTOCOL. 13 pages. [Online]. Available: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf. Accessed Jun 7, 2015.
- Batson, M. 2008. Immunohistochemistry methods for disease diagnosis (Formalin-fixed tissue sections). CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory. 30 pages.
- Boudreau, L. 2011. Queen's Laboratory for Molecular. Principles of Immunohistochemistry Pathology. 12 pages. [Online]. Available: [http://www.path.queensu.ca/qlmp/sites/default/files/Principles_of_Immunohistochemistry%20\(1\).pdf](http://www.path.queensu.ca/qlmp/sites/default/files/Principles_of_Immunohistochemistry%20(1).pdf). Accessed Jun 7, 2015.
- Bourne, J.A. 1983. Handbook of immunoperoxidase staining methods. Immunohistochemistry laboratory, DAKO Corporation, CA.
- Cancela, M.M. and Marin, J.F. 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of Mycobacterium bovis in bovine and caprine tuberculosis lesions. J. Comp. Path. 109: 361-370.
- Dabbs, D.J. 2006. Diagnostic Immunohistochemistry. 2nd eds. Churchill Livingstone Elsevier, Elsevier Inc. 828 pages.
- Dako guidebook. 2015. Immunohistochemical Staining Methods. [Online]. Available: http://www.dako.com/dist/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm?undefined&from=fb2_ihc_guidebook#.VWqdudKqPHw. Accessed May 31, 2015.
- Frevert, C.W., Johnson, B., and Stahi, W.L. 2014. Immunohistochemistry: Antibody specific. Pathology of Human Disease. pp. 3807-3816.
- Innova Biosciences. 2014. Immunohistochemistry. [Online]. Available: <http://www.innovabiosciences.com/applications/immunohistochemistry.html>. Accessed Jun 7, 2015.
- Key, M. 2006. Immunohistochemical staining methods. 4th eds. Dako. Carpinteria, California. 174 pages.
- Life Technologies. 2015. Overview of Immunohistochemistry. [Online]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/th/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html>. Accessed Jun 7, 2015.
- Merriam-webster. 2015. Chromogen. [Online]. Available: <http://www.merriam-webster.com/dictionary/chromogen>. Accessed Jun 7, 2015.
- Millar, M. 2013. Immunohistochemistry – an Introduction, Techniques and an Evolution Towards Robots. Microscopy & Imaging. [Online]. Available: <http://bitesizebio.com/13425/immunohistochemistry-an-introduction-techniques-and-an-evolution-towards-robots/>. Accessed May 23, 2015
- Momotani, E., Kubo, M., Ishikawa, Y. and Yoshino, T. 1989. Immunohistochemical localization of immunoglobulins in bovine granulomatous lesions. J. Comp. Path. 100: 130-136.
- Thoresen, O.F., Falk, K. and Evensen, O. 1994. Comparison of immunohistochemistry, acid-fast staining and cultivation for detection of Mycobacterium paratuberculosis in goats. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 195-199.

ภาคผนวก

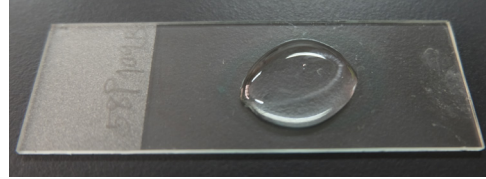
การปฏิบัติที่ดี

1. Primary antibody เมื่อได้มาใหม่ควรเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C หรือ -80°C และควรแบ่งเก็บในหลอดเล็กๆ ปริมาณหลอดละไม่เกิน 100 ไมโครลิตร เมื่อสิ้นสุดการปฏิบัติงานในแต่ละครั้งให้นำส่วนที่เหลือเก็บไว้ในตู้เย็นตามเดิม

2. ควรเก็บ Hydrogen peroxide ไว้ในตู้เย็น 4°C เนื่องจากเป็นสารระเหยง่าย

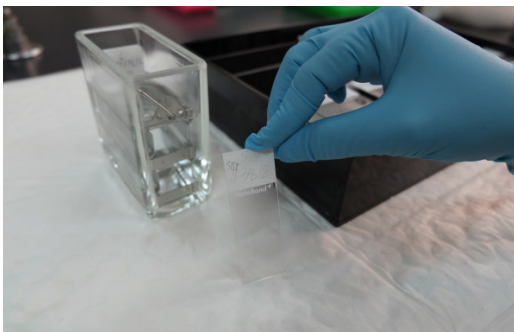
3. Hydrogen peroxide ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

4. กรณีที่ใช้ปากกา Hydrophobic marker วรอบสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อกัน Reagent หกออกจากสไลด์เนื้อเยื่อ ควรปล่อยให้สไลด์เนื้อเยื่อแห้งก่อน หรือเป่าสไลด์เนื้อเยื่อให้แห้งด้วยลมเย็น และควรวกรปากกาให้ชิดขอบสไลด์เนื้อเยื่อโดยไม่ทับบนสไลด์เนื้อเยื่อ (ภาพที่ 28)

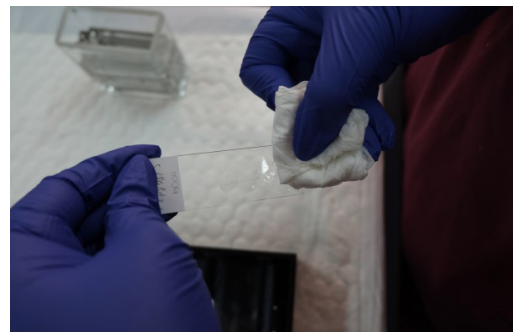


ภาพที่ 28 แสดงวงของปากกา Hydrophobic marker รอบสไลด์เนื้อเยื่อเพื่อกันมิให้ Reagent หกออก

5. กรณีที่ไม่ใช้ปากกา Hydrophobic marker วรอบสไลด์เนื้อเยื่อ ควรปฏิบัติโดย เท Reagent ที่ให้มากที่สุดพร้อมกับเคาะบนกระดาษรองซับ (ภาพที่ 29) จากนั้นเช็ด Reagent รอบๆ สไลด์เนื้อเยื่อที่อยู่ด้านบนสไลด์แก้ว และเช็ดด้านล่างสไลด์แก้วด้วยผ้าซับน้ำจนหมาด (ภาพที่ 30) แล้วจึงวางและหยด Reagent บนสไลด์เนื้อเยื่อ ช่วยให้ Reagent อยู่บนสไลด์เนื้อเยื่อได้ดีไม่หกออกตลอดการย้อม



ภาพที่ 29 เท Reagent ที่จ และเคาะสไลด์แก้วบนกระดาษรองซับ



ภาพที่ 30 เช็ด Reagent รอบๆ สไลด์เนื้อเยื่อ และเช็ดด้านล่างแผ่นสไลด์แก้วด้วยผ้าซับน้ำจนหมาด

6. ขณะย้อม ในขั้นตอนการหยด Reagent ต่างๆ บนสไลด์เนื้อเยื่อ ไม่ควรวางแผ่นสไลด์แก้วติดกัน ควรวางให้ห่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 31) เพราะ Reagent อาจไหลไปยังแผ่นสไลด์แก้วข้างเคียงเกิดการปนเปื้อนที่ไม่พึงประสงค์ได้

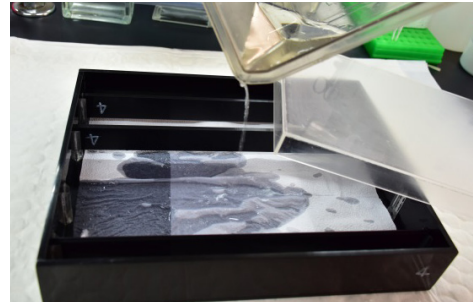


ภาพที่ 31 ขณะย้อมควรวางแผ่นสไลด์แก้วห่างกันเล็กน้อย

การเตรียม Moisture chamber

Moisture chamber (กล่องเก็บความชื้น) เป็นอุปกรณ์ที่จำเป็นในการย้อมด้วยวิธี IHC ใช้ในการรักษาสภาพความชื้นให้แก่สไลด์เนื้อเยื่อขณะย้อม มีลักษณะเป็นกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมมีฝาปิด ภายในมีที่วางสไลด์เนื้อเยื่อในแนวนอน สามารถใช้กล่องพลาสติกที่มีขายทั่วไปโดยเลือกรูปแบบที่เหมาะสมกับงาน

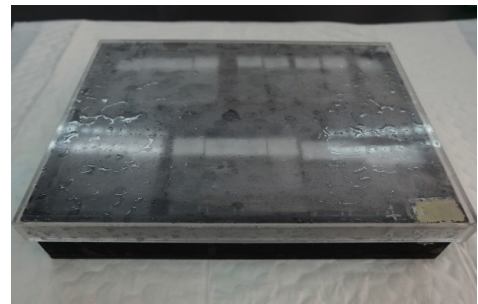
การเตรียม Moisture chamber ทำโดยนำแผ่นกระดาษทิชชูวางที่ก้นกล่อง แปะให้ทั่วพื้นกล่อง แล้วเทน้ำลงไปให้ชุ่มกระดาษทิชชูดังกล่าว (ภาพที่ 32) จากนั้นวางที่วางสไลด์เนื้อเยื่อ (ภาพที่ 33) แล้วปิดฝา กล่องเพื่อให้ไอน้ำความชื้นแพร่ไปทั่วกล่อง (ภาพที่ 34) กล่องที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว สามารถใช้ได้ตลอดการย้อม ทั้งนี้ถ้า น้ำที่เต็มแห้งหรือกระดาษแห้งให้รีบเติมน้ำลงไปทันที



ภาพที่ 32 เทน้ำลงไปให้ชุ่มกระดาษทิชชู



ภาพที่ 33 วางที่วางสไลด์เนื้อเยื่อ



ภาพที่ 34 ปิดฝากล่องเพื่อให้ไอน้ำความชื้นแพร่ไปทั่วกล่อง

การเตรียมรีเอเจนต์ (Reagent preparation)

สูตรการเตรียม 10% Neutral buffered formalin

Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4)	4	กรัม
Sodium dibasic phosphate (Na_2HPO_4)	6	กรัม
37% Formaldehyde solution (HCHO)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

สูตรการเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

Stock		
Sodium chloride (NaCl)	800	กรัม
Potassium di-hydrogenphosphate (KH_2PO_4)	20	กรัม
Di-sodium hydrogenphosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	290	กรัม ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 115.008$ กรัม)
Potassium chloride (KCl)	20	กรัม
น้ำกลั่น	10	ลิตร
Working solution		
Stock	1	ลิตร
น้ำกลั่น	9	ลิตร

สูตรการเตรียม 0.3% Hydrogen peroxide ใน Methanol

30% Hydrogen peroxide (H_2O_2)	1.5	มิลลิลิตร
Methanol	150	มิลลิลิตร

สูตรการเตรียม 2% Skim milk

Skim milk	2	กรัม
TBST	10	มิลลิลิตร

สูตรการเตรียมสีย้อมทาบ Methyl green

Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	0.54	กรัม
Barbital sodium ($C_2H_2O_2CCONHC(ONa):NCO$)	0.82	กรัม
น้ำกลั่น	140	มิลลิลิตร
0.1 M Hydrochloric acid (HCl)	60	มิลลิลิตร
Methyl green ($C_{27}H_{35}ClN_3 \cdot ZnCl_2$)	2	กรัม
กรองก่อนใช้		
0.1 M HCl		
Conc. HCl	0.83	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	99.17	มิลลิลิตร

การเคลือบแผ่นสไลด์แก้วด้วย 2% 3-Aminopropyl triethoxy silane (APS)

- จุ่มแผ่นสไลด์แก้วใน Acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที
- จุ่มแผ่นสไลด์แก้วใน 2% APS in acetone 10 วินาที
- จุ่มแผ่นสไลด์แก้วใน Acetone 2 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที
- ล้างแผ่นสไลด์แก้วในน้ำกลั่น
- ปลอຍให้แห้ง หรืออบที่ 37°C ซ้ำมคืน

การทำ Antigen retrieval โดยใช้คลื่นไมโครเวฟ

การทำ Antigen retrieval โดยใช้คลื่นไมโครเวฟ มีเครื่องมือ อุปกรณ์ และน้ำยาที่จำเป็น ได้แก่ เครื่องไมโครเวฟ (ใช้ได้ทั้งแบบธรรมดาและแบบที่ตั้งค่าความร้อนเป็นวัตต์) กลังหรือภาชนะสำหรับวางสไลด์ เนื้อเยื่อที่สามารถใช้ในเครื่องไมโครเวฟได้ (Microwavable) และน้ำยา Antigen retrieval buffer ซึ่งที่นิยมใช้ใน ปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น 10x Tris/EDTA pH9, 10 mM Sodium citrate buffer pH 6.0 และ 1 mM EDTA pH 8

- วางสไลด์เนื้อเยื่อบนที่วาง (Rack) นำใส่กลังหรือภาชนะที่สามารถใช้ในเครื่องไมโครเวฟได้ใส่ Antigen retrieval buffer เช่น 1xTris/EDTA pH9 ให้ท่วม
- นำไปวางในตู้ไมโครเวฟ (ภาพที่ 35) ตั้งค่าที่ High power 3 นาที 30% Power 10 นาที (หรือ 450 วัตต์ 20 นาที)
- นำออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง 20-30 นาที
- นำสไลด์เนื้อเยื่อจุ่มใน TBST buffer (0.1% tween 20 in 1x TBS) 5 นาที



ภาพที่ 35 แสดงการวางสไลด์เนื้อเยื่อในตู้ไมโครเวฟ

สูตรการเตรียม Antigen retrieval buffer

10x Tris/EDTA pH9

น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร
Trisma-base ($C_4H_{11}NO_3$)	1.21	กรัม
EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)	0.372	กรัม
ปรับ pH 9 ด้วย HCl (เริ่มที่ pH 9.5)		
เติมน้ำกลั่น ให้ได้ปริมาตร	1	ลิตร

10 mM Sodium citrate buffer

Sodium citrate trisodium salt dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	2.94	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH 6 ด้วย HCl		

1 mM EDTA pH 8

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$)	0.372	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH 8 ด้วย HCl		

TBST buffer (0.1% tween 20 in 1x TBS)

10x TBS		
Trisma-base	24.2	กรัม
Sodium chloride (NaCl)	80	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ปรับ pH 7.6 ด้วย HCl		

การทำ Antigen retrieval ด้วยเครื่อง Autoclave

การทำ Antigen retrieval ด้วยเครื่อง Autoclave สามารถใช้เครื่อง Autoclave ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ โดยปฏิบัติดังนี้

- วางสไลด์เนื้อเยื่อนที่วาง นำใส่กล่องหรือภาชนะที่สามารถใช้ในเครื่อง Autoclave ได้ ใส่ Antigen retrieval buffer เช่น 1xTris/EDTA pH9 ให้ท่วม
- นำไปวางในเครื่อง Autoclave ตั้งค่าที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

IHC staining worksheet

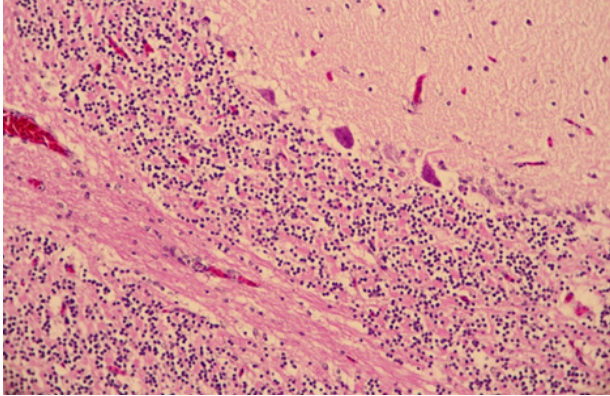
Date.....Perform by.....Disease.....
 Antibody used..... Antibody dilution.....
 Positive control number.....
 Negative control number.....
 Results.....
 Problem found.....

No.	Details	Time	Done
1	Xylene 3 times	3,3,3 min	
2	Absolute ethanol 3 times	3,3,3 min	
3	Ethanol 95% 3 times	3,3,3 min	
4	DW	5 min	
5	Air dry and hydrophobic marker (or skip)	–	
6	0.3% Hydrogen peroxide in methanol	30 min	
7	PBS 3 times	5,5,5 min	
8	Antigen retrieval (Proteinase K)	(15 – 20 min)	
9	PBS 3 times	5,5,5 min	
10	10% Preimmune serum (eg. Normal goat serum)	15 min	
11	Primary antibody at room temperature (or at 4°C in refrigerator)	30 min (Overnight)	
12	PBS 3 times	5,5,5 min	
13	Secondary antibody	15 min	
14	PBS 3 times (Skip if use Dextran polymer system)	5,5,5 min	
15	SAB (Skip if use Dextran polymer system)	15 min	
16	PBS 3 times	5,5,5 min	
17	DW	10 sec	
18	DAB/AEC	1 – 5 min	
19	DW 2 times	10,10 sec	
20	Haematoxylin	5 – 10 sec	
21	DW	10 min	
22	Ethanol 95% 3 times (Skip if use AEC)	3,3,3 min	
23	Absolute ethanol 3 times (Skip if use AEC)	3,3,3 min	
24	Xylene 3 times (Skip if use AEC)	3,3,3 min	
25	Mount with non-aqueous mounting medium (For AEC mount with aqueous mounting medium)	–	

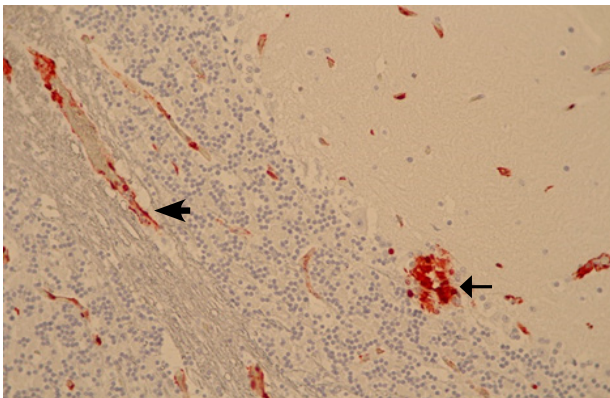
หมายเหตุ: ในการย้อมแต่ละครั้ง ควรปฏิบัติตามขั้นตอนต่างๆ ให้ครบถ้วนและถูกต้อง จึงควรมีเอกสาร IHC staining worksheet เพื่อบันทึกข้อมูล

ภาพแสดงผลการย้อมด้วยวิธี IHC
และภาพแสดงจุลพยาธิวิทยา (ย้อมด้วยสี H&E) ที่ตำแหน่งเดียวกัน

โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI)

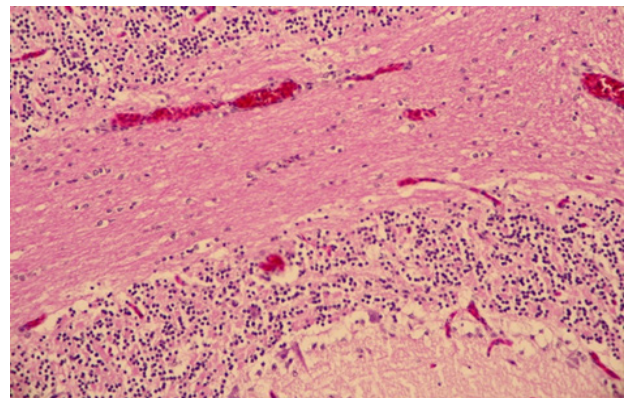


ภาพที่ 36 Cerebellum, chicken, AI (H&E 40x)

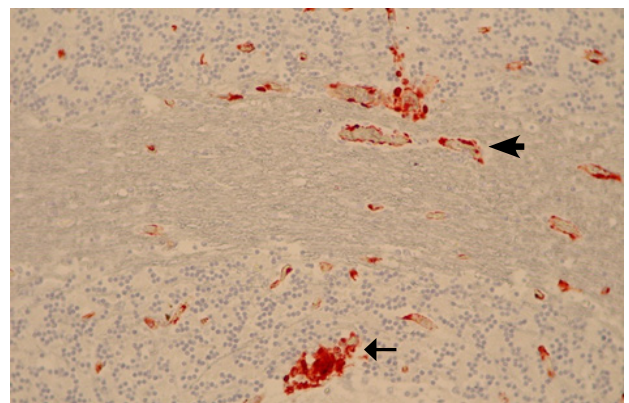


ภาพที่ 37 Cerebellum, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ←
และ Glial cell ← (IHC 40x)

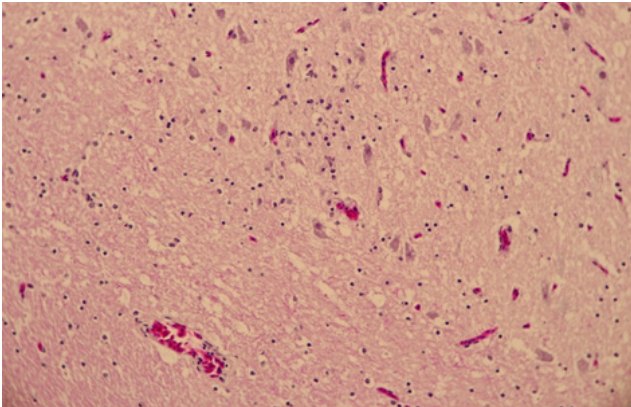
ภาพที่ 38 Cerebellum, chicken, AI (H&E 40x)



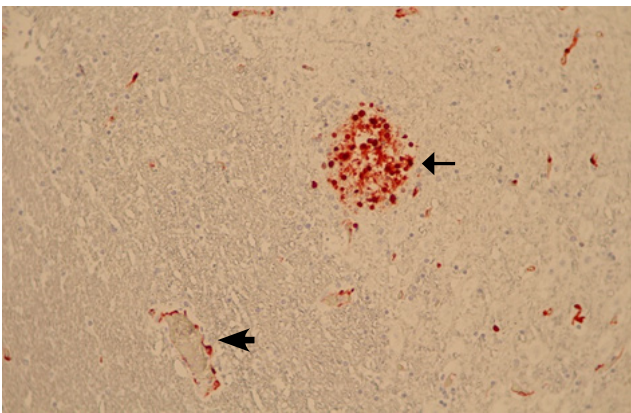
ภาพที่ 39 Cerebellum, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ←
และ Glial cell ← (IHC 40x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

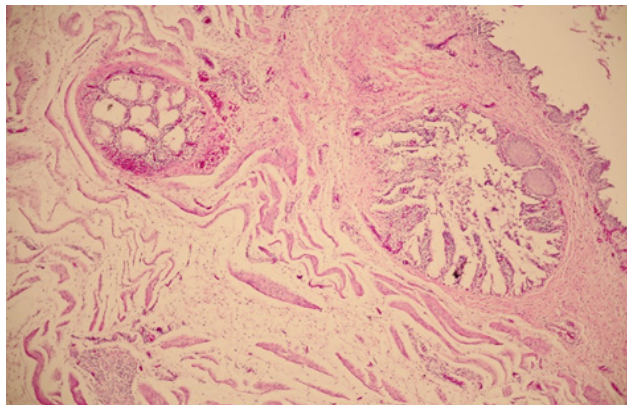


ภาพที่ 40 Cerebrum, chicken, AI
(H&E 40x)

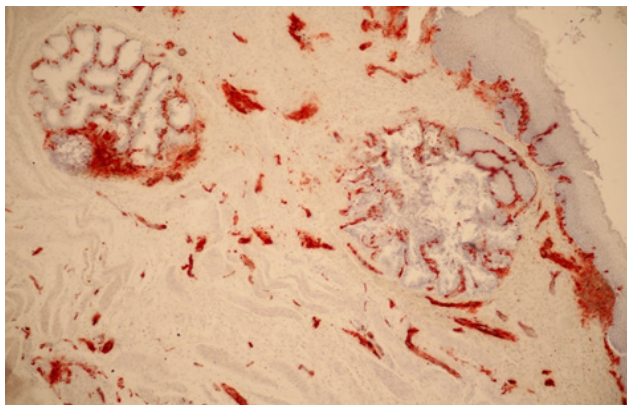


ภาพที่ 41 Cerebrum, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Glial cell ← (IHC 40x)

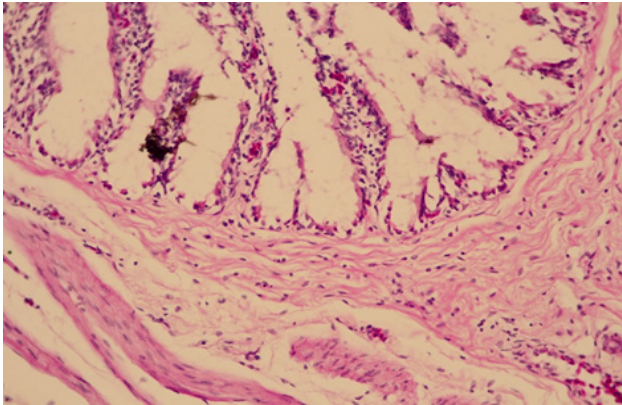
ภาพที่ 42 Esophagus, chicken, AI (H&E 10x)



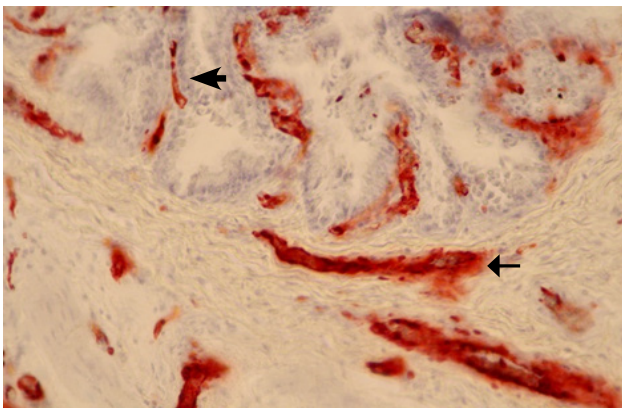
ภาพที่ 43 Esophagus, chicken, AI (IHC 10x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

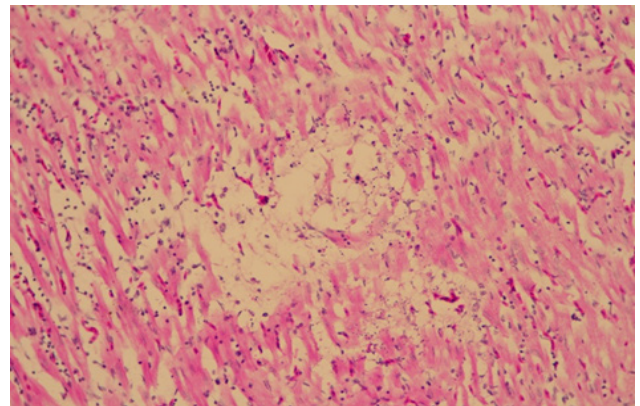


ภาพที่ 44 Esophagus, chicken, AI (H&E 40x)

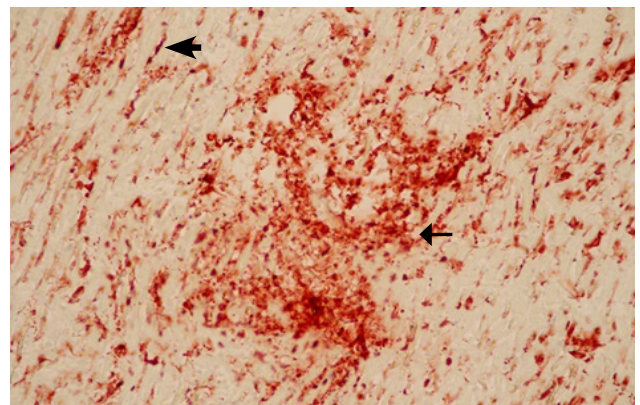


ภาพที่ 45 Esophagus, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ◀ และ
Epithelial cell ◀ (IHC 40x)

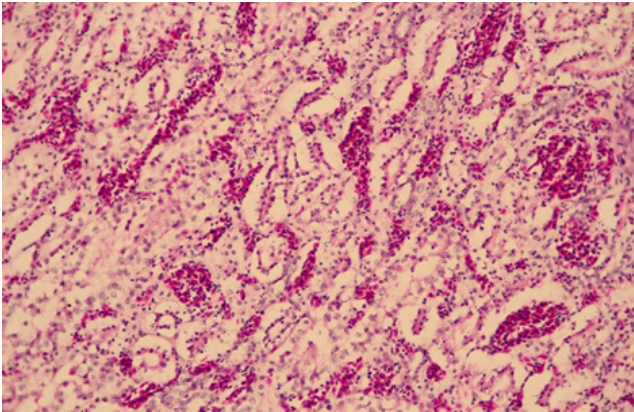
ภาพที่ 46 Heart, chicken, AI (H&E 40x)



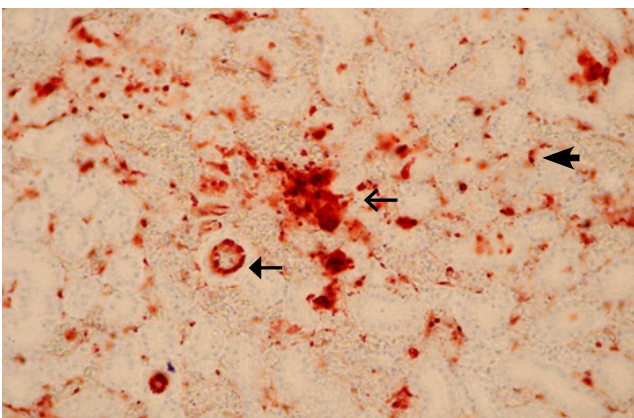
ภาพที่ 47 Heart, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ◀ และ
Necrotic area ◀ (IHC 40x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

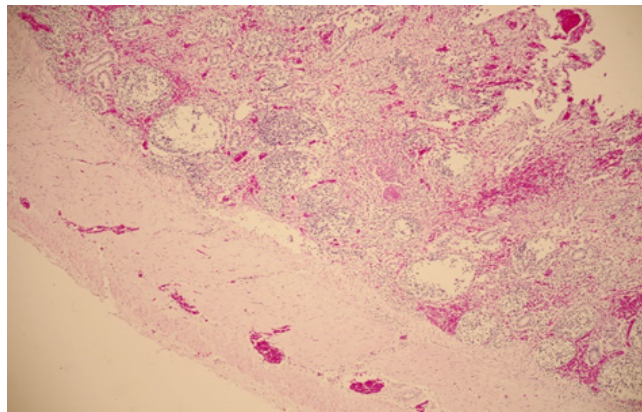


ภาพที่ 48 Kidney, chicken, AI (H&E 40x)

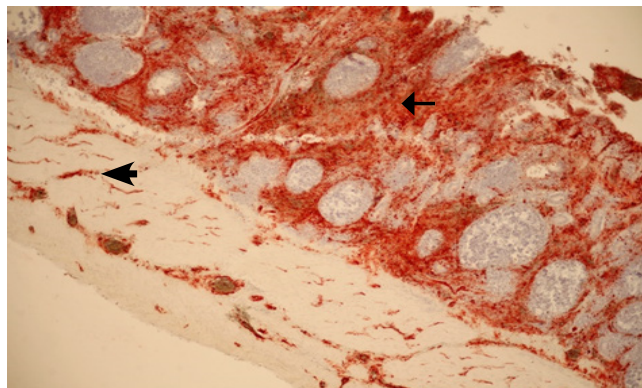


ภาพที่ 49 Kidney, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell, Epithelial cell และ Inflammatory cell (IHC 40x)

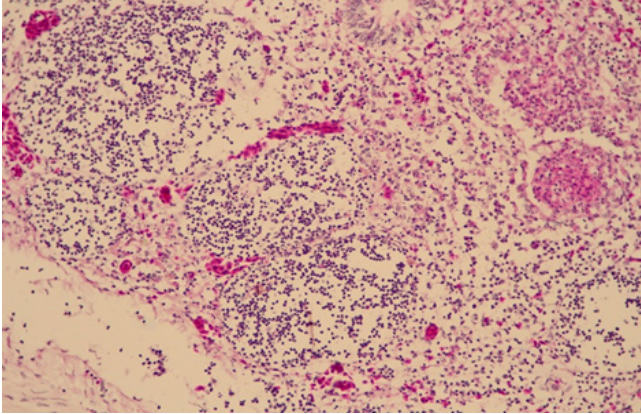
ภาพที่ 50 Large intestine, chicken, AI (H&E 10x)



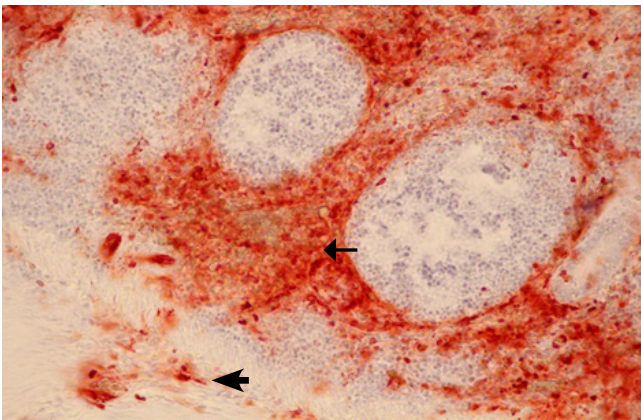
ภาพที่ 51 Large intestine, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell และ Inflammatory cell (IHC 10x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

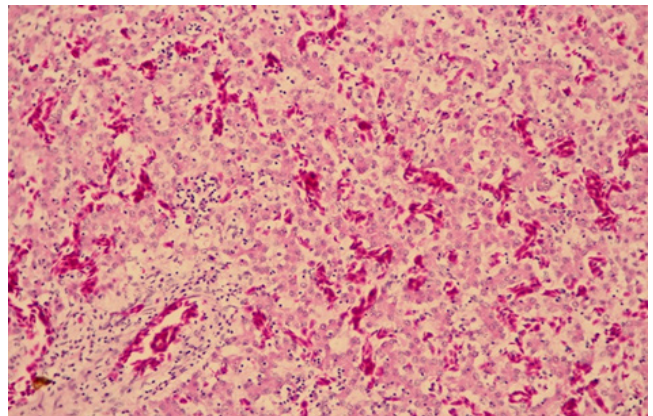


ภาพที่ 52 Large intestine, chicken, AI
(H&E 40x)

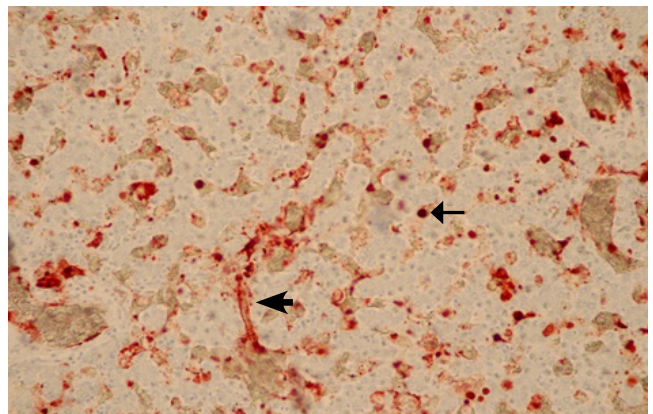


ภาพที่ 53 Large intestine, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Inflammatory cell ← (IHC 40x)

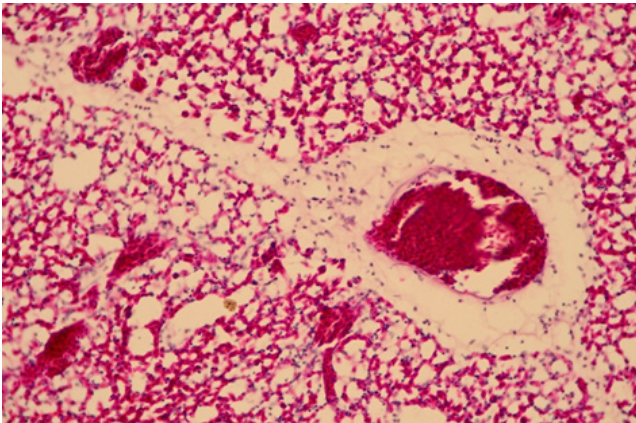
ภาพที่ 54 Liver, chicken, AI
(H&E 40x)



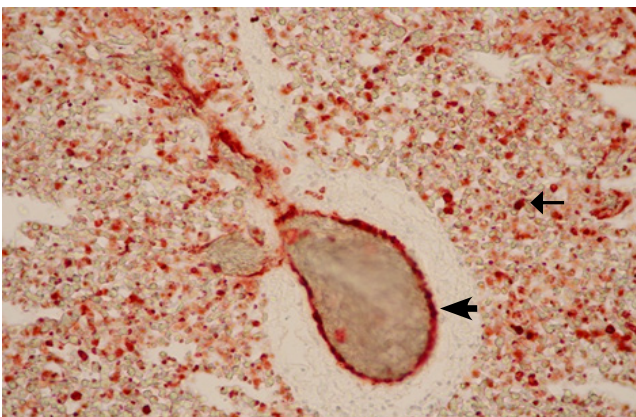
ภาพที่ 55 Liver, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Hepatocyte ← (IHC 40x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

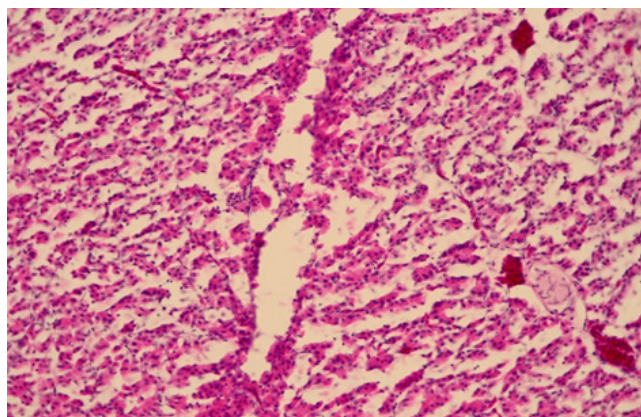


ภาพที่ 56 Lung, chicken, AI
(H&E 40x)

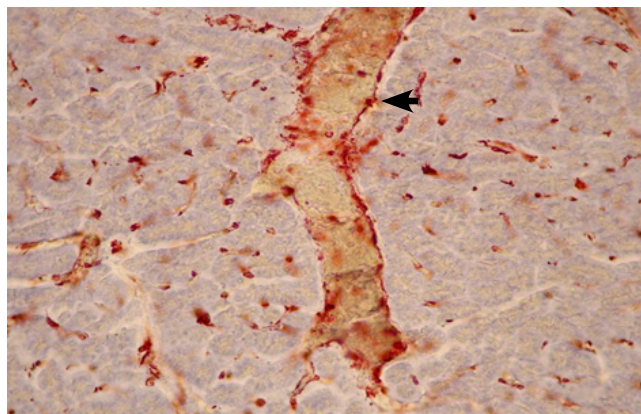


ภาพที่ 57 Lung, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Macrophage ← (IHC 40x)

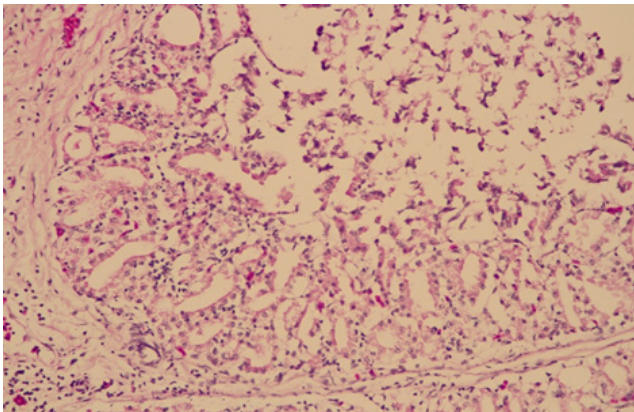
ภาพที่ 58 Pancreas, chicken, AI
(H&E 40x)



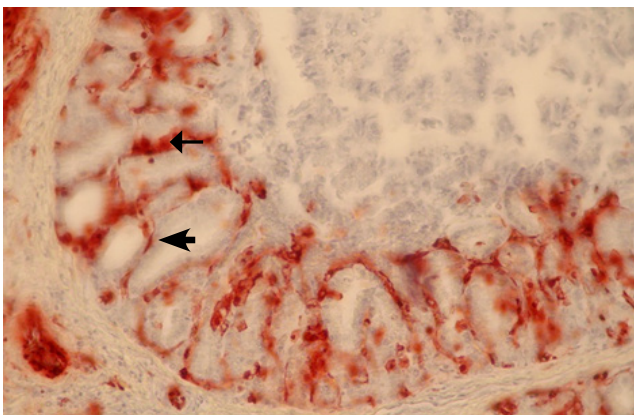
ภาพที่ 59 Pancreas, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ←
(IHC 40x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

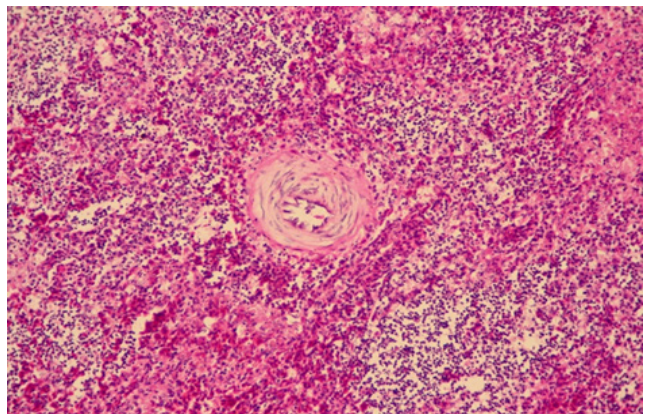


ภาพที่ 60 Proventriculus, chicken, AI
(H&E 40x)

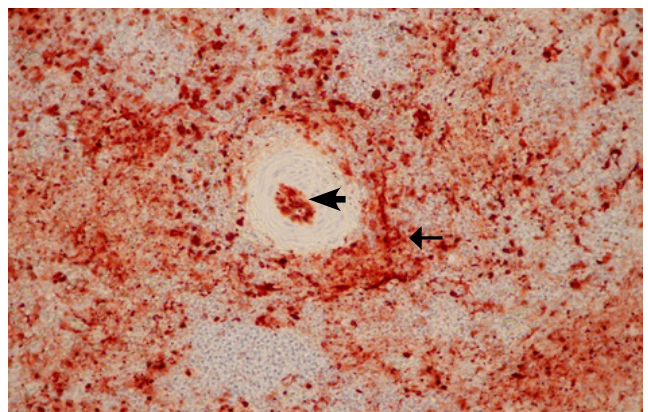


ภาพที่ 61 Proventriculus, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Macrophage ← (IHC 40x)

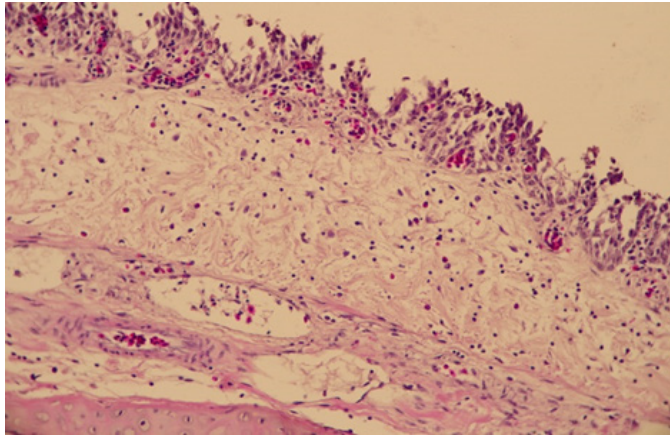
ภาพที่ 62 Spleen, chicken, AI
(H&E 40x)



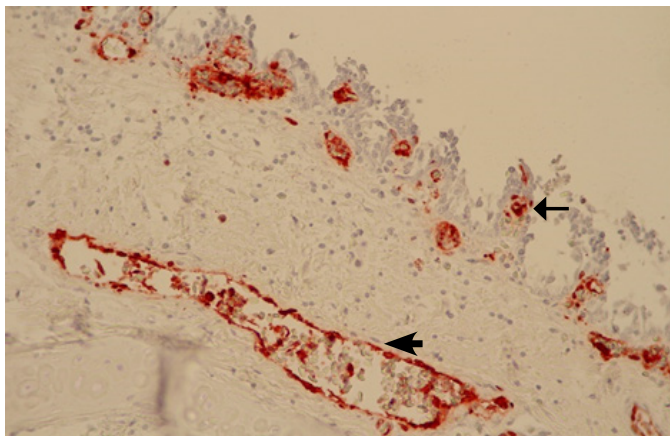
ภาพที่ 63 Spleen, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ← และ
Macrophage ← (IHC 40x)



โรคไข้หวัดนกในสัตว์ปีก (Avian influenza, AI) (ต่อ)

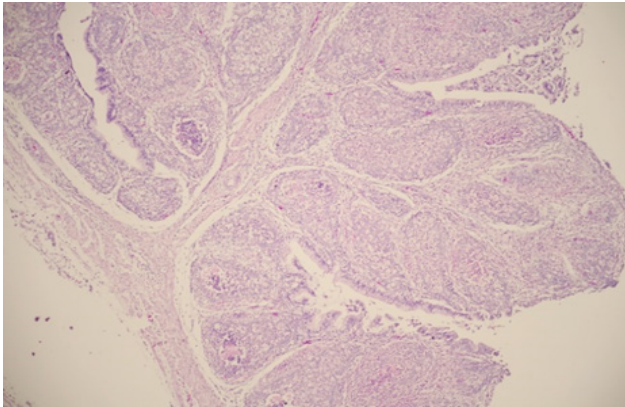


ภาพที่ 64 Trachea, chicken, AI (H&E 40x)

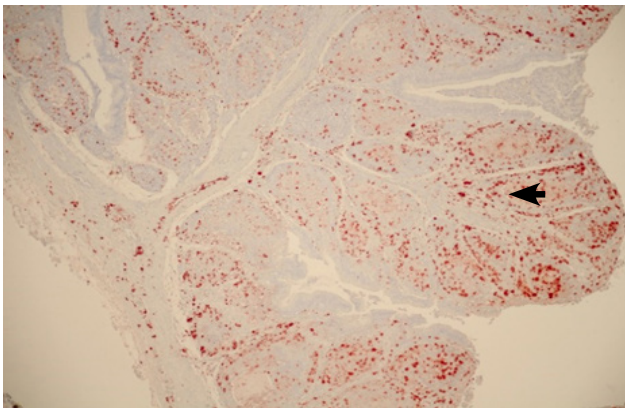


ภาพที่ 65 Trachea, chicken, AI
ผลบวกที่ Endothelial cell ◀ และ Inflammatory cell ◀ (IHC 40x)

โรคไอบีดี (Infectious bursal disease, IBD)

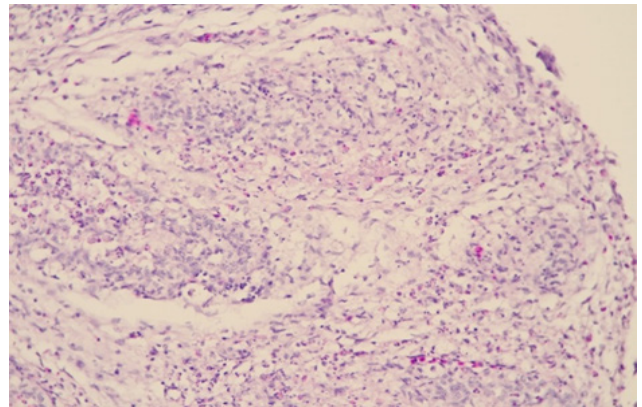


ภาพที่ 66 Bursa of Fabricius, chicken, IBD
(H&E 10x)

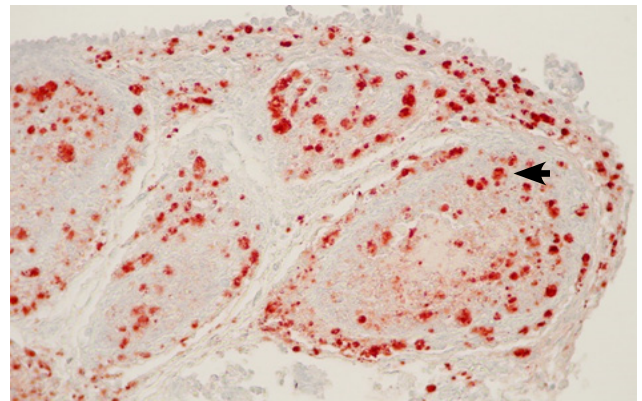


ภาพที่ 67 Bursa of Fabricius, chicken, IBD
ผลบวกที่ B lymphocyte ◀ (IHC 10x)

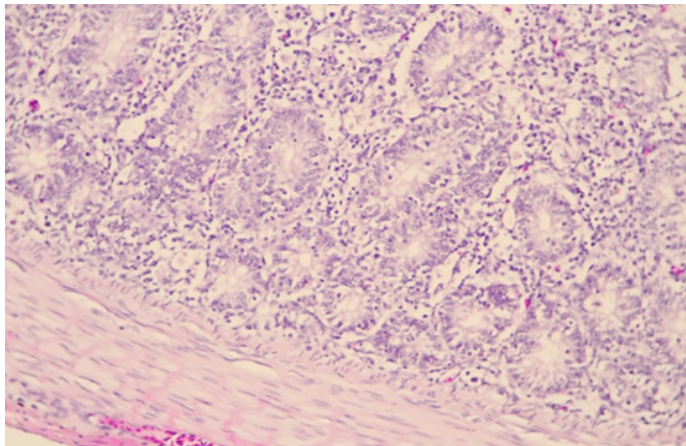
ภาพที่ 68 Bursa of Fabricius, chicken, IBD
(H&E 40x)



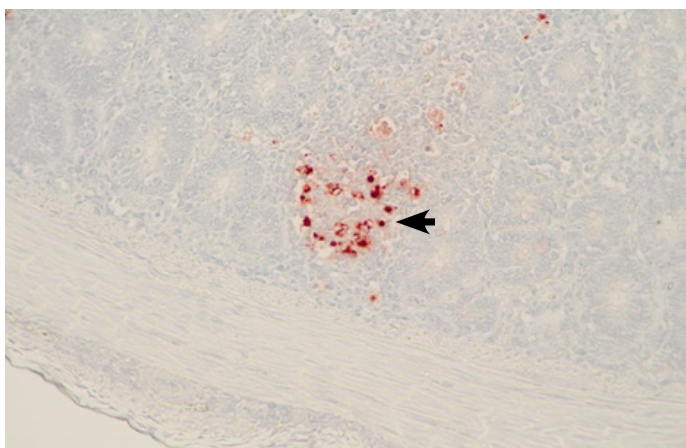
ภาพที่ 69 Bursa of Fabricius, chicken, IBD
ผลบวกที่ B lymphocyte ◀ (IHC 40x)



โรคไอบีดี (Infectious bursal disease, IBD) (ต่อ)

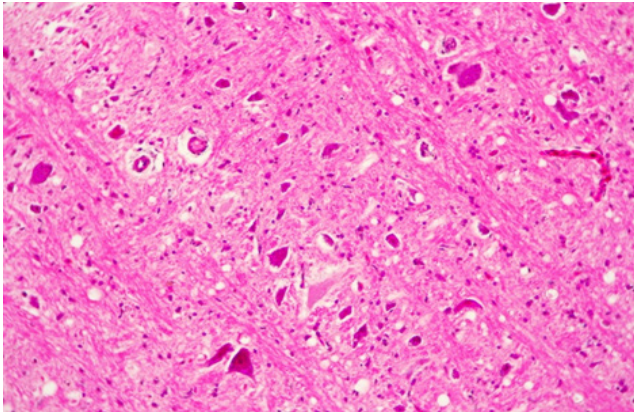


ภาพที่ 70 Intestine, chicken, IBD (H&E 40x)

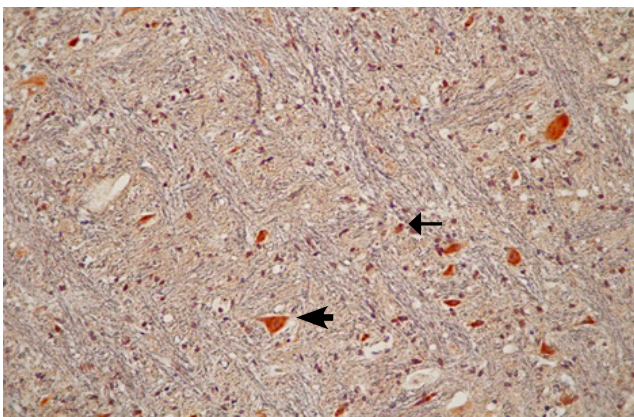


ภาพที่ 71 Intestine, chicken, IBD ผลบวกที่ Lymphocyte ◀ (IHC 40x)

โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND)

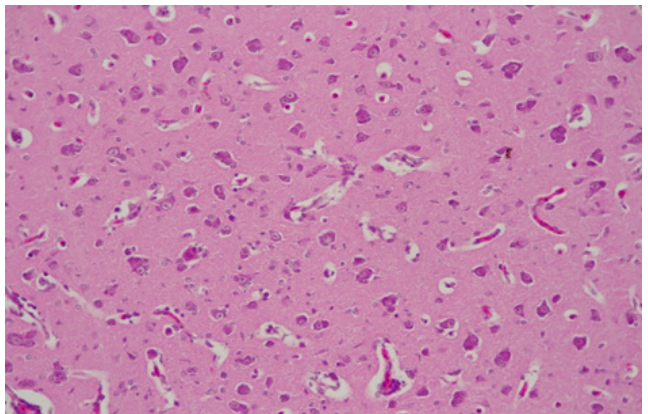


ภาพที่ 72 Cerebrum, chicken, ND
(H&E 40x)

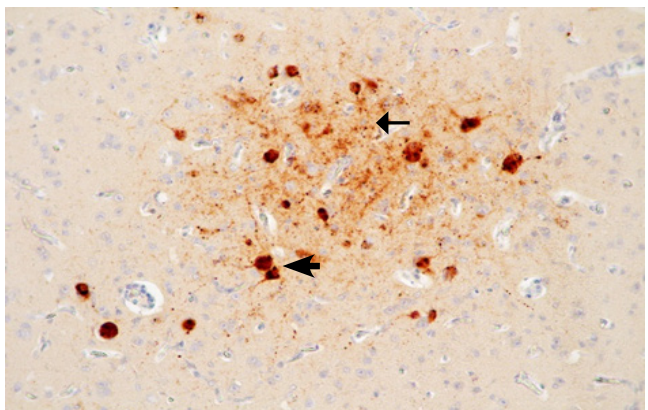


ภาพที่ 73 Cerebrum, chicken, ND
ผลบวกที่ Neuron ← และ Glial cell ←
(IHC 40x)

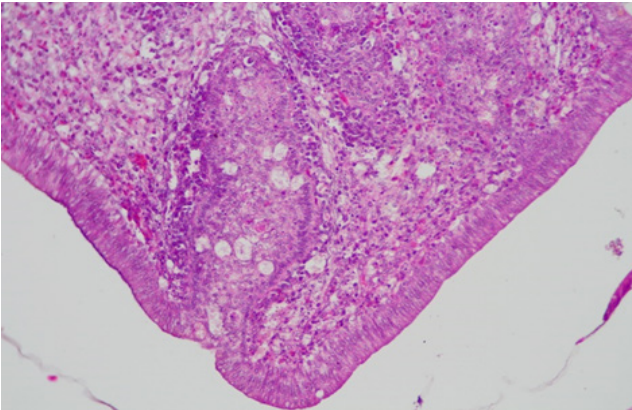
ภาพที่ 74 Cerebrum, chicken, ND
(H&E 40x)



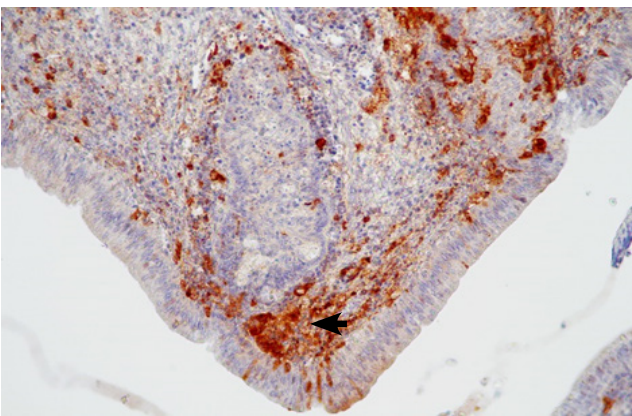
ภาพที่ 75 Cerebrum, chicken, ND
ผลบวกที่ Neuron ← และ Glial cell ←
(IHC 40x)



โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND) (ต่อ)

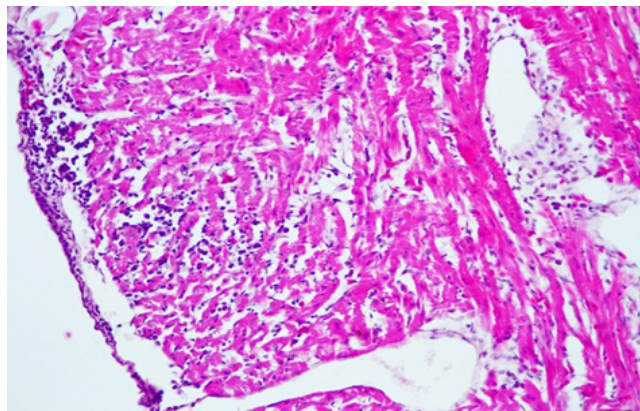


ภาพที่ 76 Bursa of Fabricius, chicken, ND
(H&E 40x)

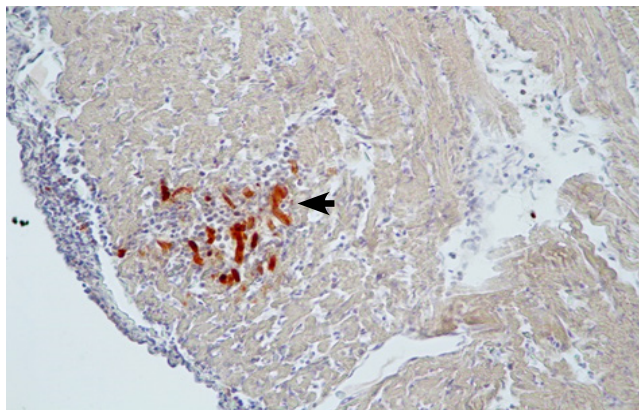


ภาพที่ 77 Bursa of Fabricius, chicken, ND
ผลบวกที่ B lymphocyte ◀ (IHC 40x)

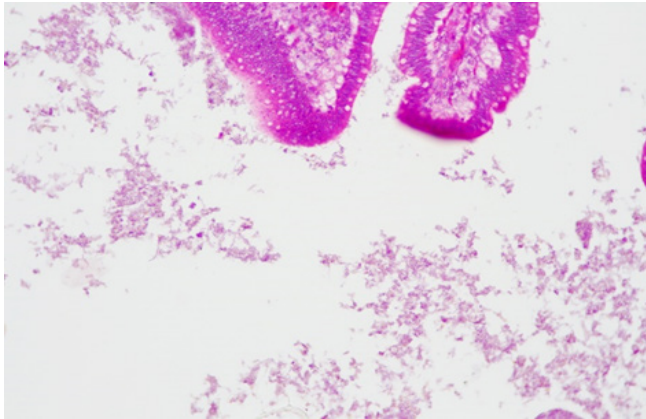
ภาพที่ 78 Heart, chicken, ND
(H&E 40x)



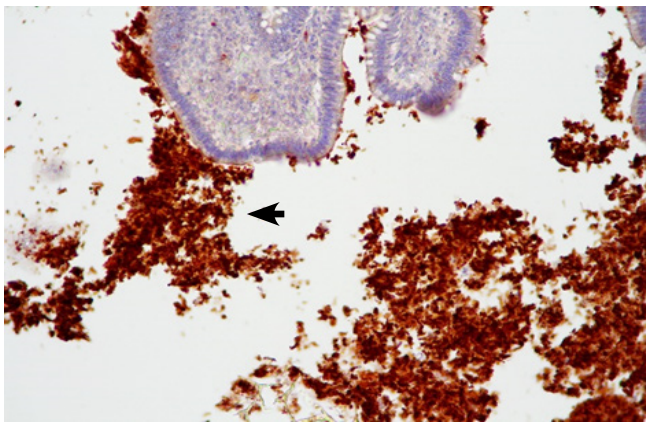
ภาพที่ 79 Heart, chicken, ND
ผลบวกที่ Myocyte ◀ (IHC 40x)



โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND) (ต่อ)

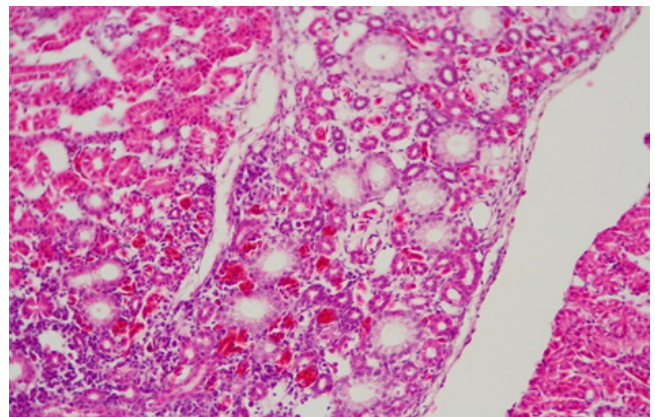


ภาพที่ 80 Intestine, chicken, ND
(H&E 40x)

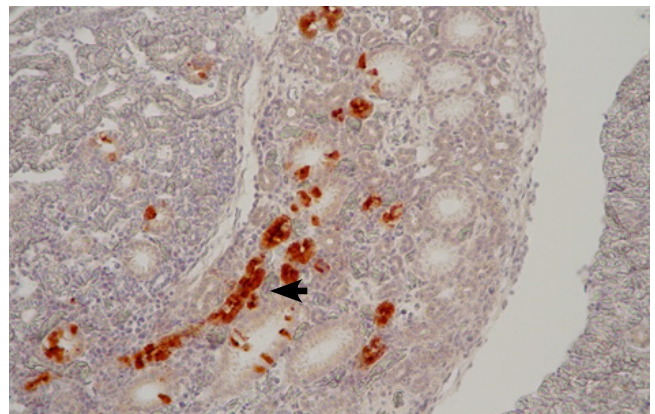


ภาพที่ 81 Intestine, chicken, ND
ผลบวกที่ Intestinal content ◀ (IHC 40x)

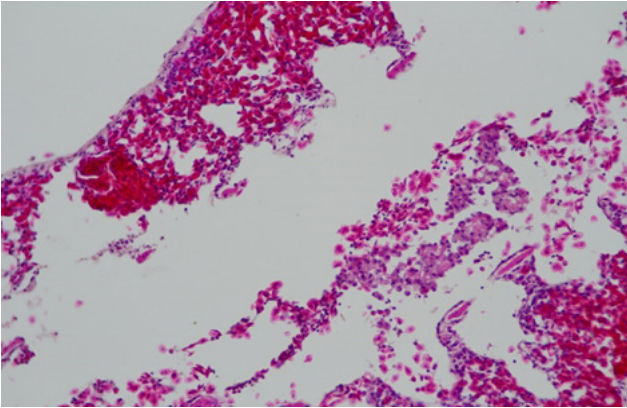
ภาพที่ 82 Kidney, chicken, ND
(H&E 40x)



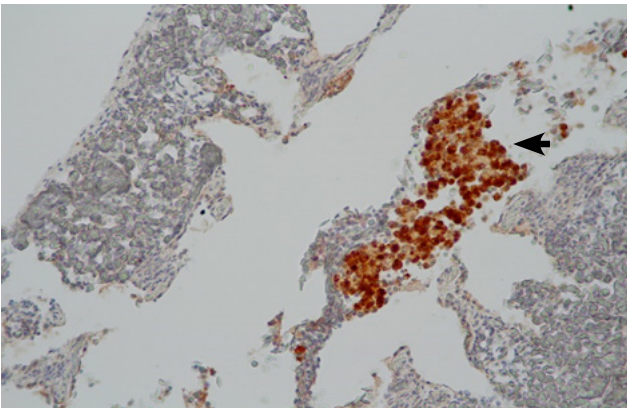
ภาพที่ 83 Kidney, chicken, ND
ผลบวกที่ Tubular cell ◀ (IHC 40x)



โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND) (ต่อ)

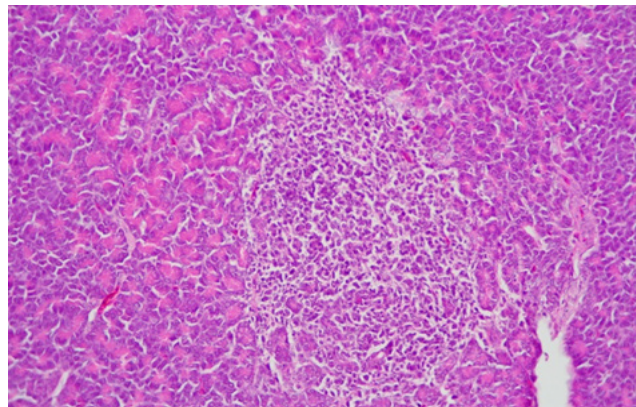


ภาพที่ 84 Lung, chicken, ND
(H&E 40x)

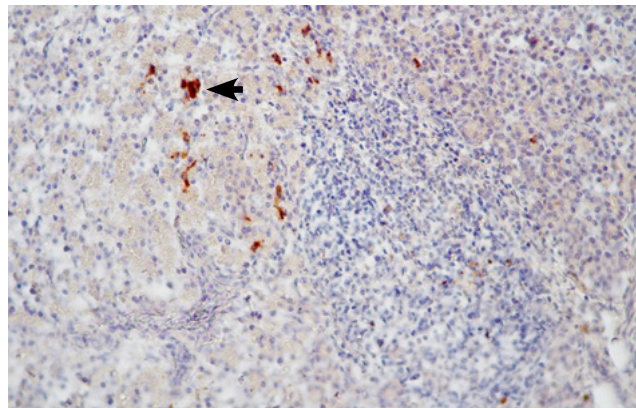


ภาพที่ 85 Lung, chicken, ND
ผลบวกที่ Necrotic inflammatory cell ◀
(IHC 40x)

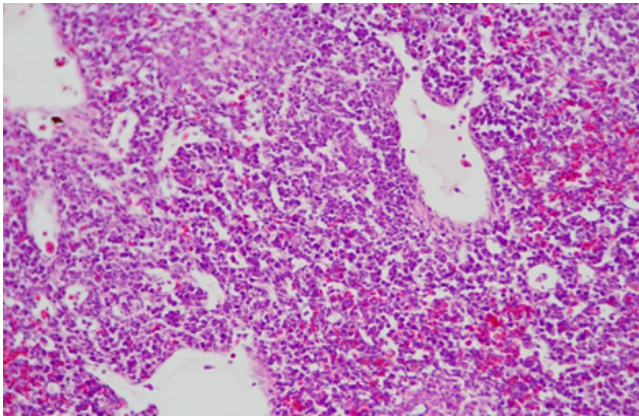
ภาพที่ 86 Pancreas, chicken, ND
(H&E 40x)



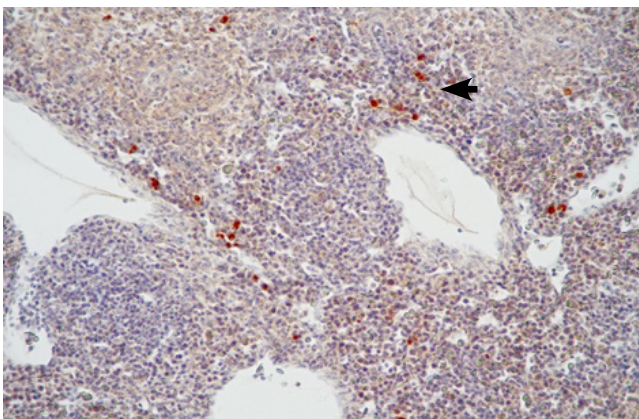
ภาพที่ 87 Pancreas, chicken, ND
ผลบวกที่ Lymphoid cell ◀ (IHC 40x)



โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND) (ต่อ)

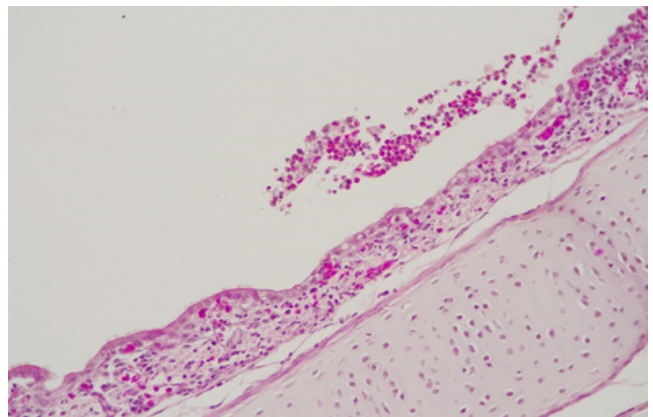


ภาพที่ 88 Spleen, chicken, ND
(H&E 40x)

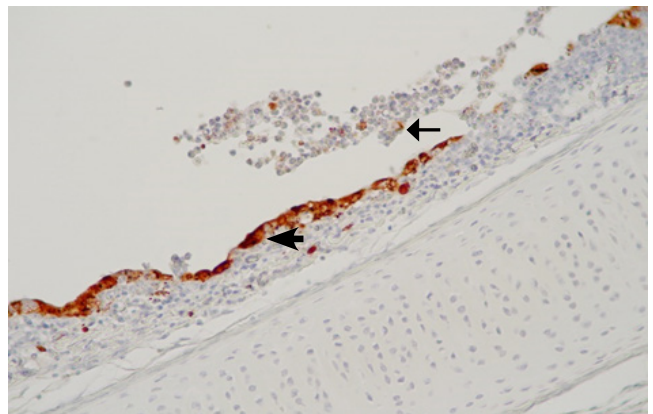


ภาพที่ 89 Spleen, chicken, ND
ผลบวกที่ Lymphoid cell ◀ (IHC 40x)

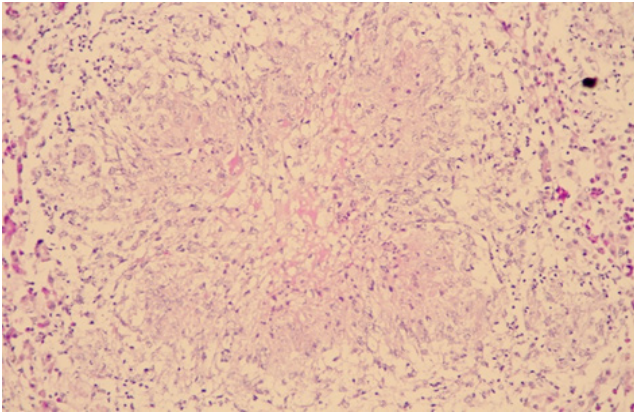
ภาพที่ 90 Trachea, chicken, ND
(H&E 40x)



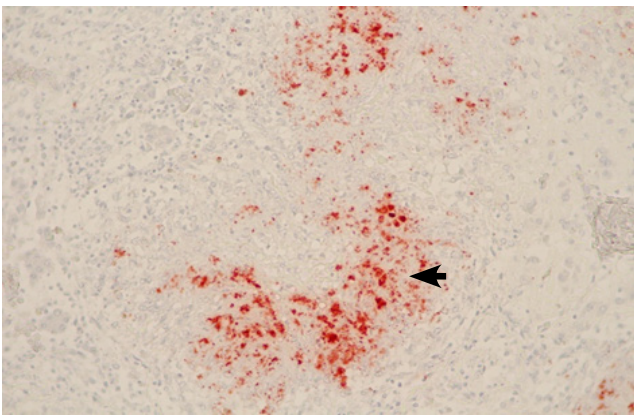
ภาพที่ 91 Trachea, chicken, ND
ผลบวกที่ Epithelial cell ◀ และ
Inflammatory cell ◀ (IHC 40x)



วัณโรคสัตว์ปีก (Avian tuberculosis, ATB)

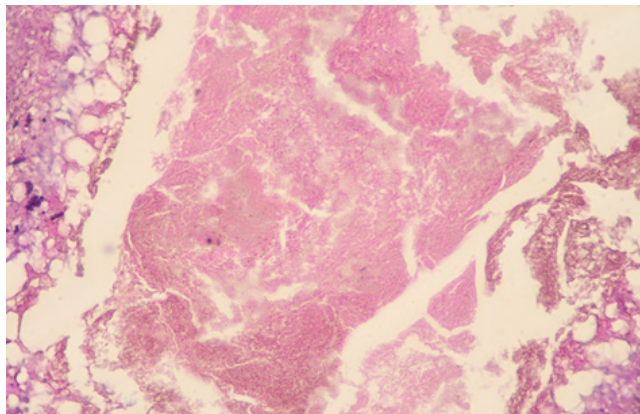


ภาพที่ 92 Liver, duck, ATB
(H&E 40x)

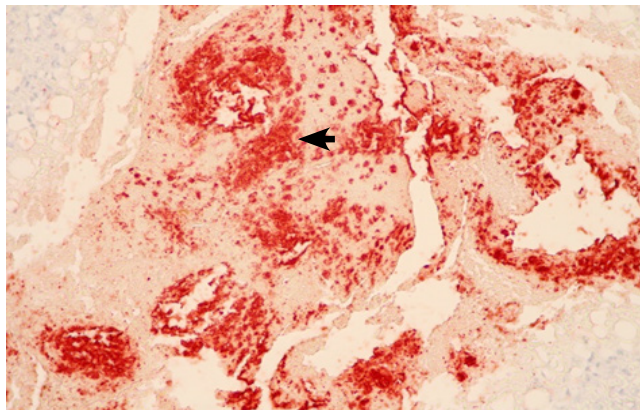


ภาพที่ 93 Liver, duck, ATB
ผลบวกที่ Necrotic area ◀ (IHC 40x)

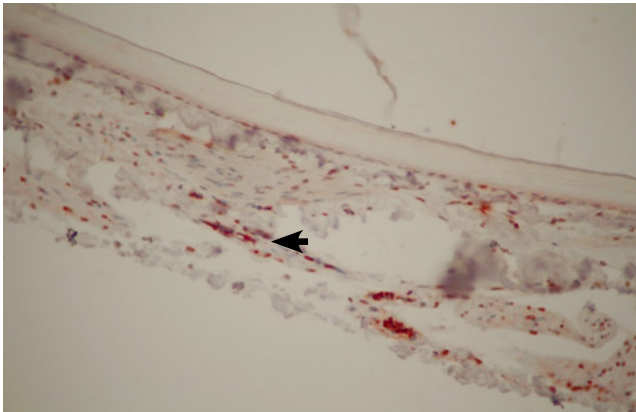
ภาพที่ 94 Spleen, duck, ATB
(H&E 40x)



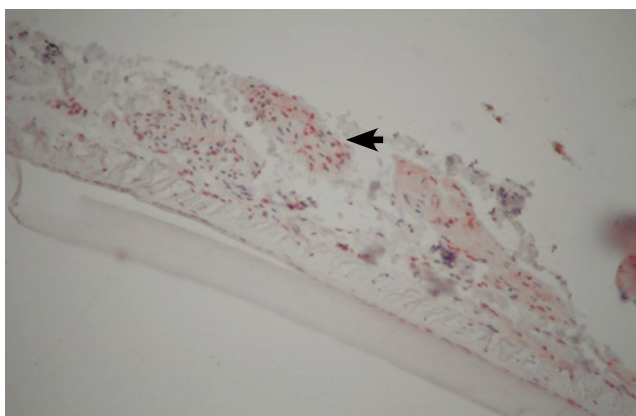
ภาพที่ 95 Spleen, duck, ATB
ผลบวกที่ Necrotic area ◀ (IHC 40x)



โรคไข้เวสต์ไนล์ (West Nile fever, WNF)

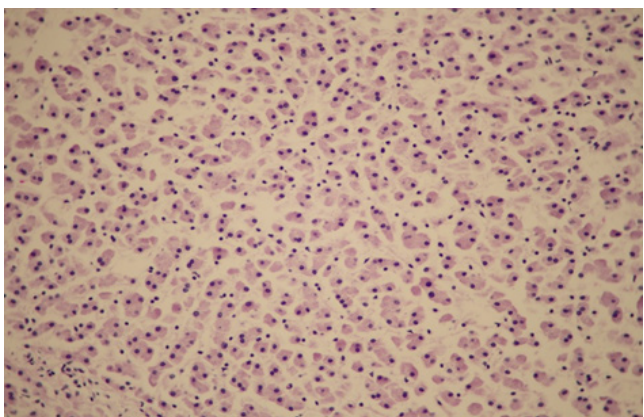


ภาพที่ 96 Skin, crow, WNF
ผลบวกที่ Fibrous tissue ◀ (IHC 40x)

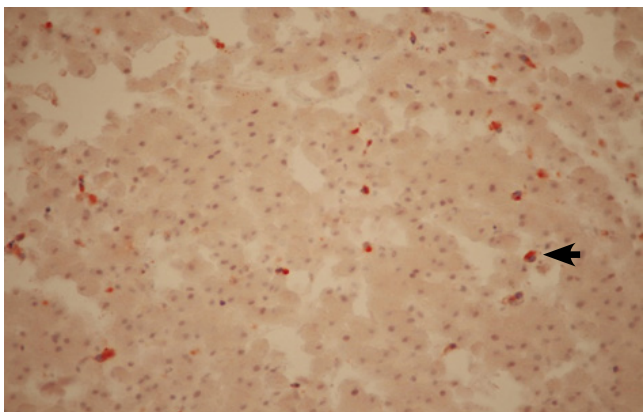


ภาพที่ 97 Skin, crow, WNF
ผลบวกที่ Fibrous tissue ◀ (IHC 40x)

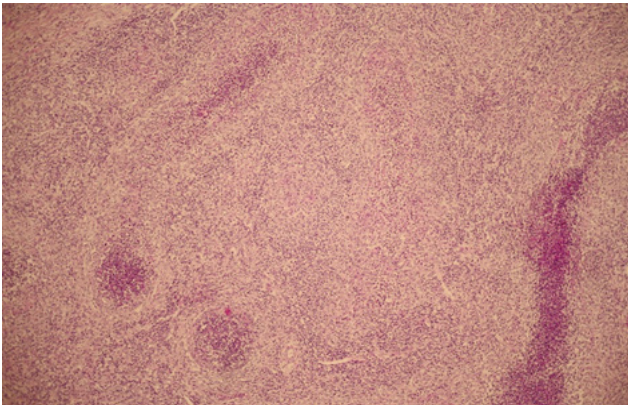
ภาพที่ 98 Liver, crow, WNF
(H&E 40x)



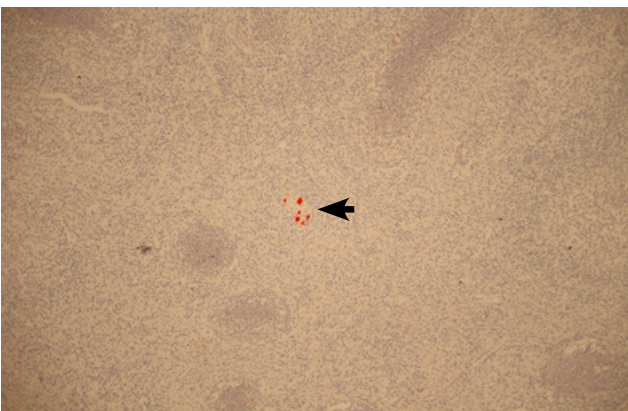
ภาพที่ 99 Liver, crow, WNF
ผลบวกที่ Hepatocyte ◀ (IHC 40x)



โรค бруเซลเลอสิส (Brucellosis)

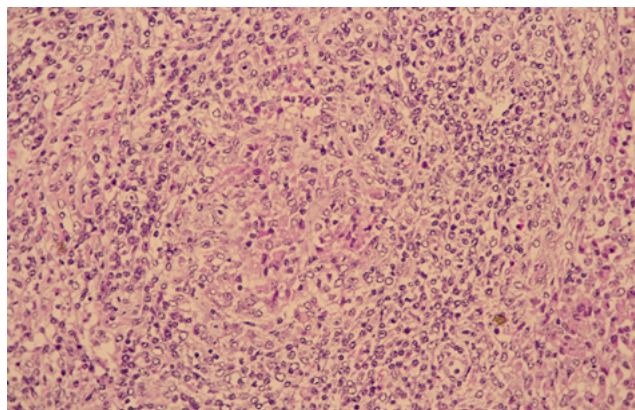


ภาพที่ 100 Liver, cattle, brucellosis
(H&E 10x)

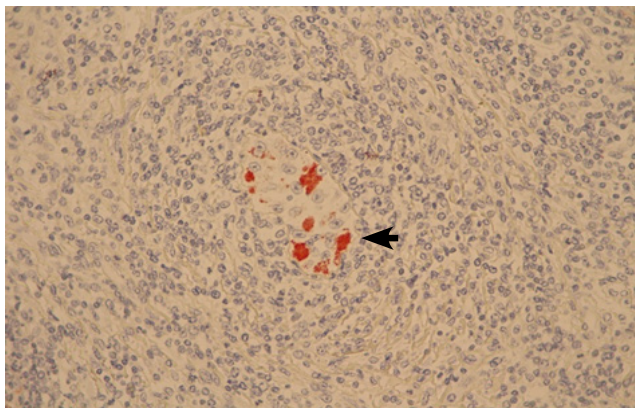


ภาพที่ 101 Liver, cattle, brucellosis
ผลบวกที่ Brucella nodule ◀ (IHC 10x)

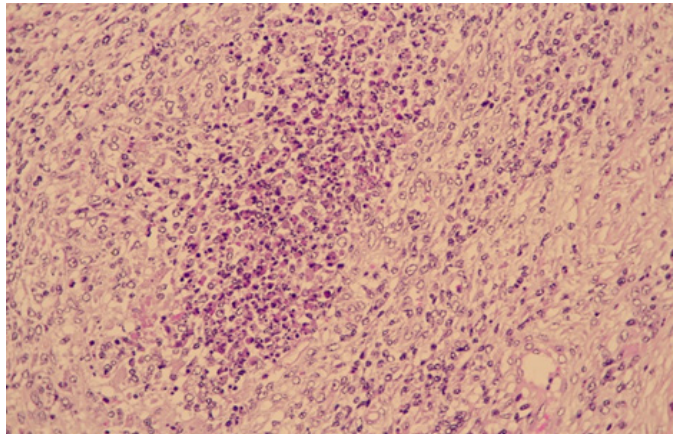
ภาพที่ 102 Liver, cattle, brucellosis
(H&E 40x)



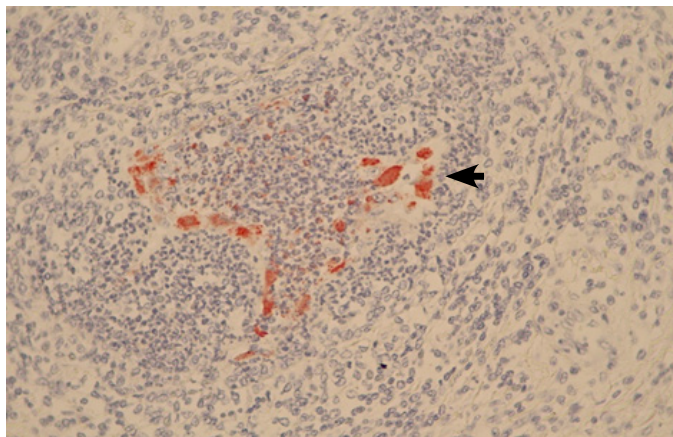
ภาพที่ 103 Liver, cattle, brucellosis
ผลบวกที่ Brucella nodule ◀ (IHC 40x)



โรค бруเซลเลอสิส (Brucellosis) (ต่อ)

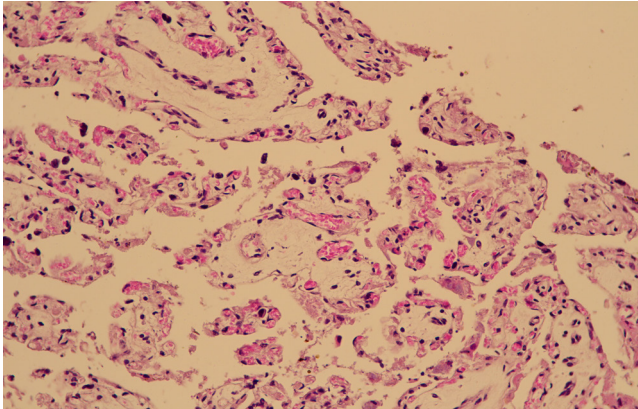


ภาพที่ 104 Liver, cattle, brucellosis (H&E 40x)

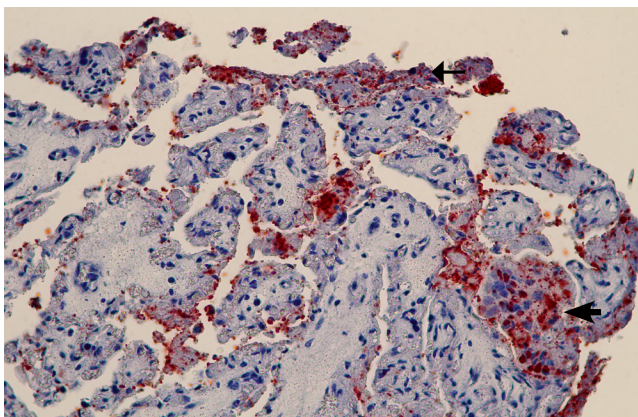


ภาพที่ 105 Liver, cattle, brucellosis ผลบวกที่ Brucella nodule ◀ (IHC 40x)

ไข้คว (Q fever)

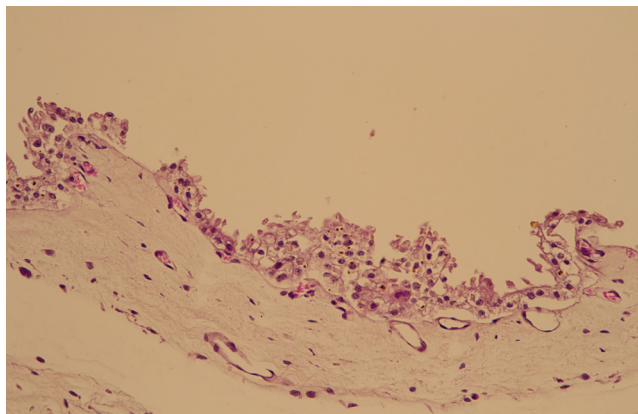


ภาพที่ 106 Placenta, cattle, Q fever
(H&E 40x)

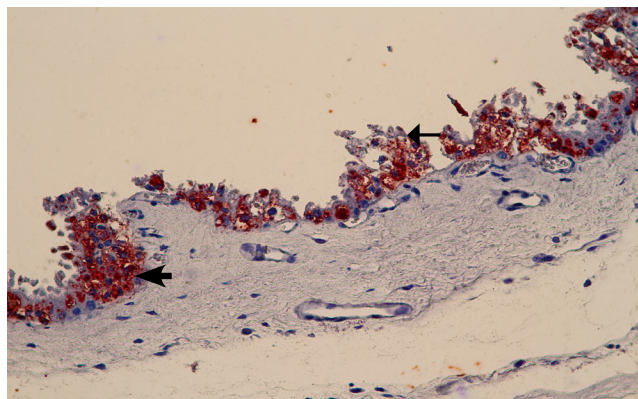


ภาพที่ 107 Placenta, cattle, Q fever
ผลบวกที่ Epithelial cell ← และ
Necrotic inflammatory cell ← (IHC 40x)

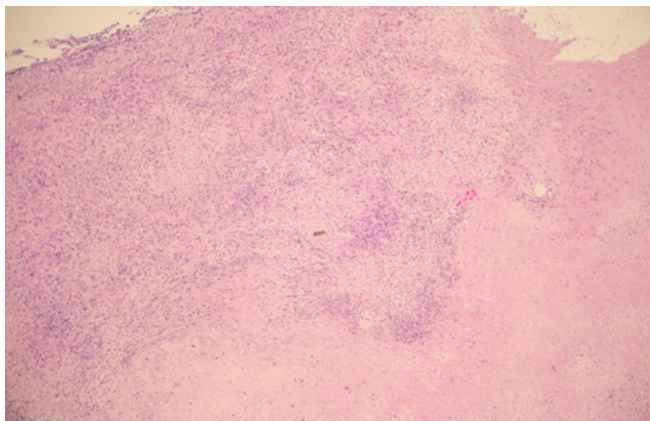
ภาพที่ 108 Placenta, cattle, Q fever
(H&E 40x)



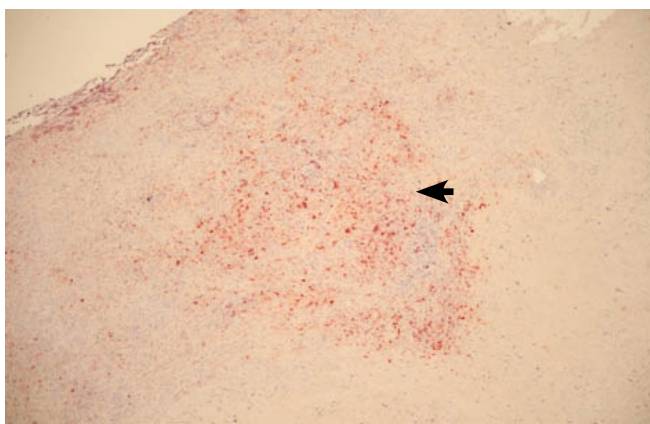
ภาพที่ 109 Placenta, cattle, Q fever
ผลบวกที่ Epithelial cell ← และ
Necrotic inflammatory cell ← (IHC 40x)



วัณโรค (Tuberculosis, TB)

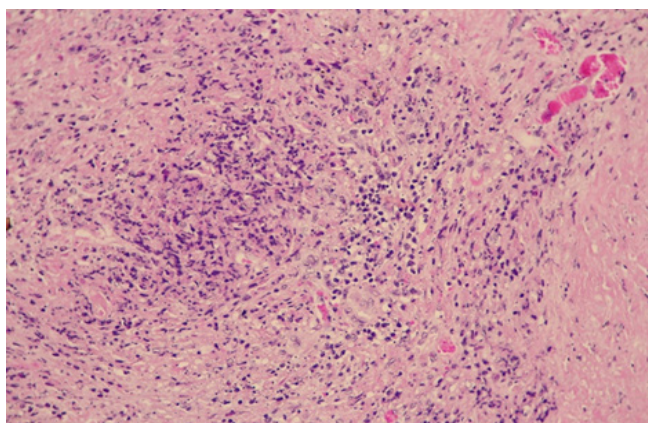


ภาพที่ 110 Lymph node, buffalo, TB
(H&E 10x)

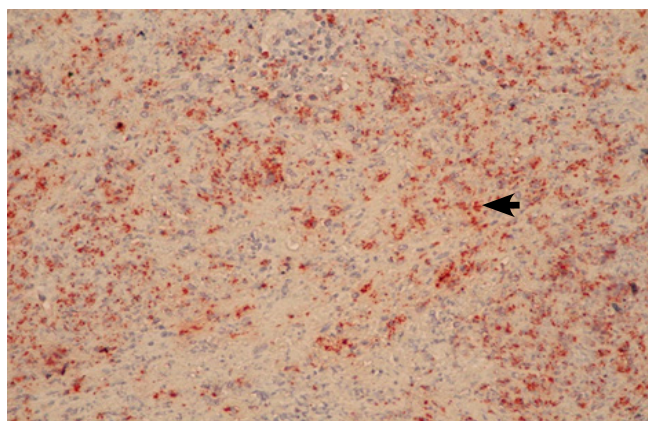


ภาพที่ 111 Lymph node, buffalo, TB
ผลบวกที่ Necrotic area ◀ (IHC 10x)

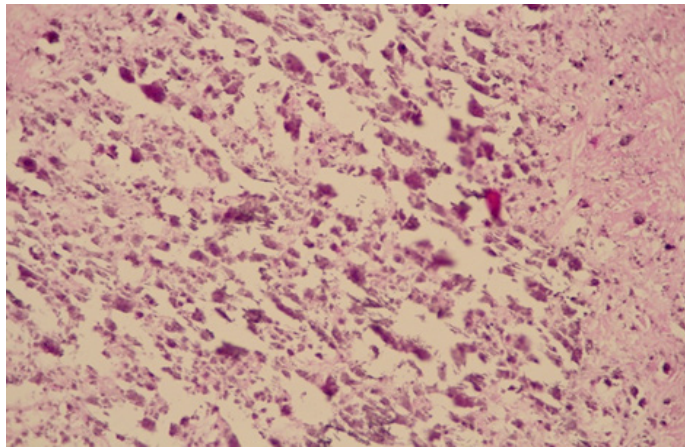
ภาพที่ 112 Lymph node, buffalo, TB
(H&E 40x)



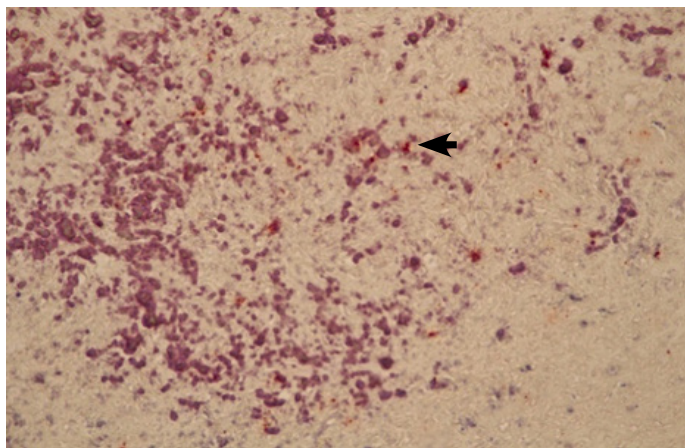
ภาพที่ 113 Lymph node, buffalo, TB
ผลบวกที่ Necrotic area ◀ (IHC 40x)



วัณโรค (Tuberculosis, TB) (ต่อ)

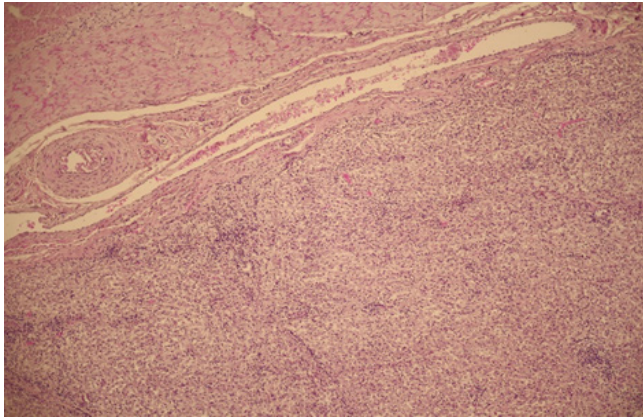


ภาพที่ 114 Lymph node, buffalo, TB (H&E 40x)

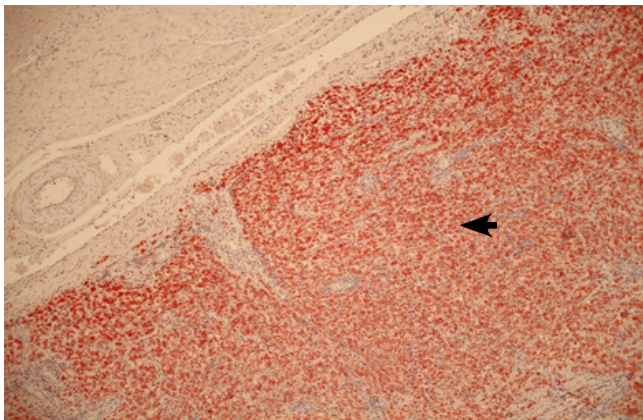


ภาพที่ 115 Lymph node, buffalo, TB ผลบวกที่ Necrotic area ◀ (IHC 40x)

โรคพาราทูเบอร์คิวโลสิส (Paratuberculosis/Johne's disease)

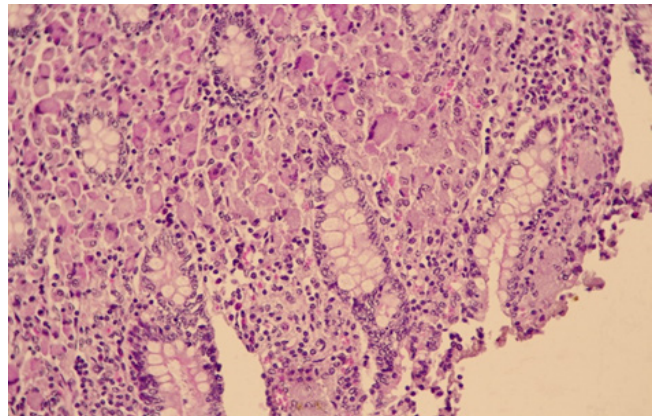


ภาพที่ 116 Intestine, cattle, paratuberculosis
(H&E 10x)

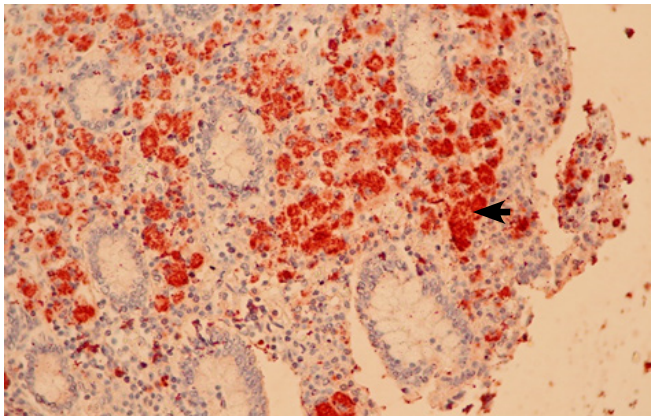


ภาพที่ 117 Intestine, cattle,
paratuberculosis
ผลบวกที่ Epithelioid cell ◀ (IHC 10x)

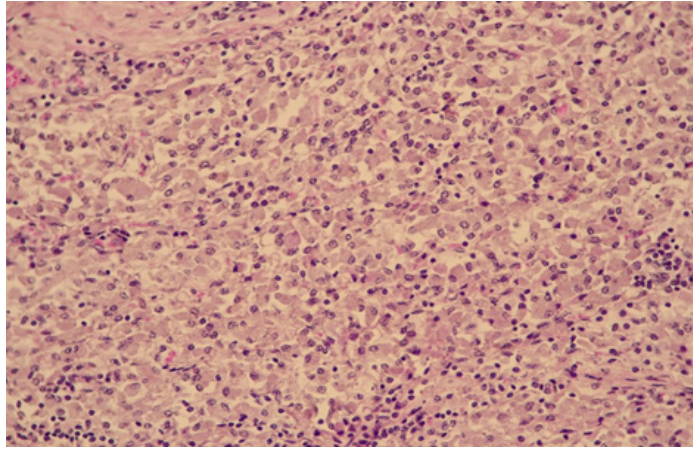
ภาพที่ 118 Intestine, cattle,
paratuberculosis (H&E 40x)



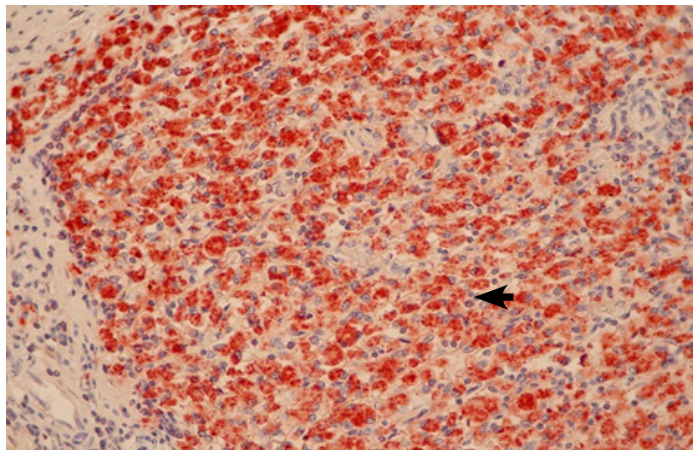
ภาพที่ 119 Intestine, cattle, paratuberculosis
ผลบวกที่ Epithelioid cell ◀ (IHC 40x)



โรคพาราทูเบอร์คิวโลสิส (Paratuberculosis/Johne's disease) (ต่อ)

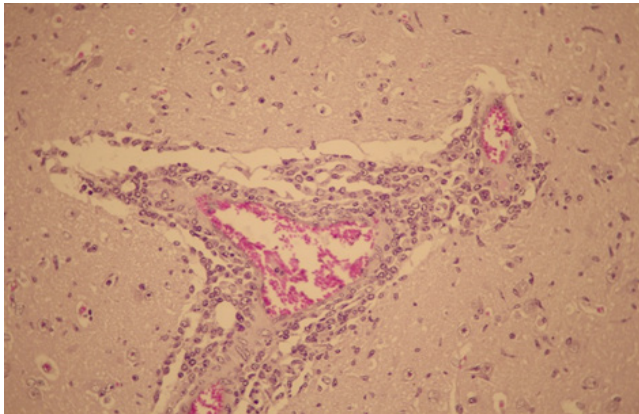


ภาพที่ 120 Intestine, cattle, paratuberculosis (H&E 40x)

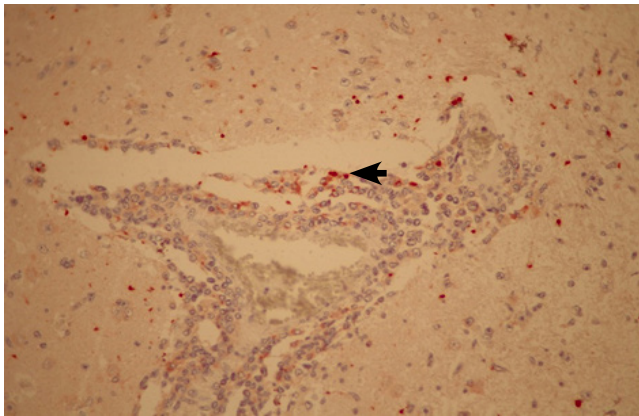


ภาพที่ 121 Intestine, cattle, paratuberculosis ผลบวกที่ Epithelioid cell ◀ (IHC 40x)

โรคทริพาโนโซโมสิส (Trypanosomosis)

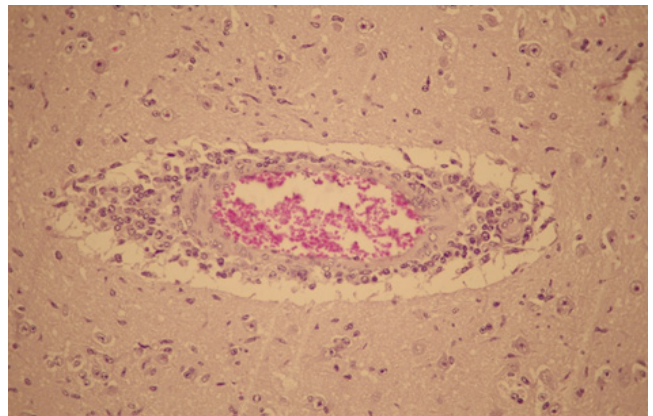


ภาพที่ 122 Brain, cattle, trypanosomosis
(H&E 40x)

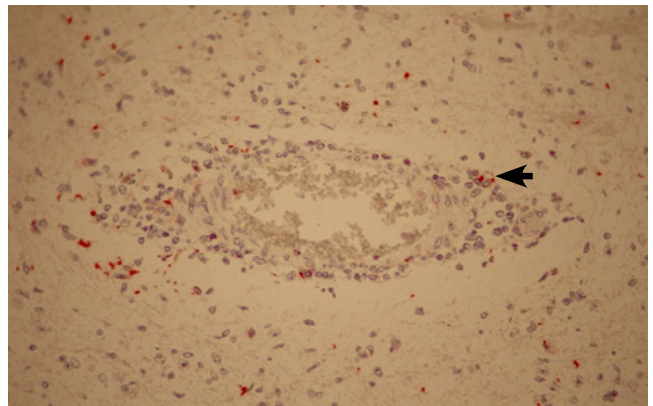


ภาพที่ 123 Brain, cattle, trypanosomosis
ผลบวกที่ *Trypanosoma evansi* ◀
(IHC 40x)

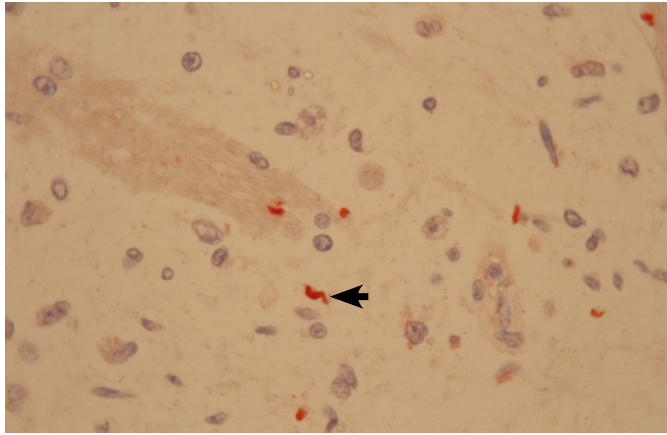
ภาพที่ 124 Brain, cattle, trypanosomosis
(H&E 40x)



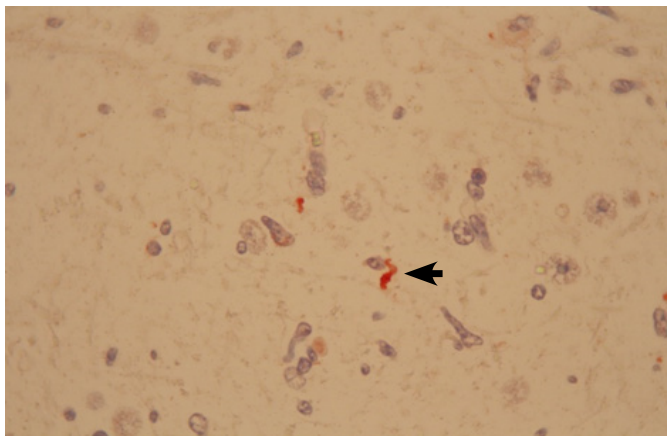
ภาพที่ 125 Brain, cattle, trypanosomosis
ผลบวกที่ *Trypanosoma evansi* ◀
(IHC 40x)



โรคทริพาโนโซไมซิส (Trypanosomosis) (ต่อ)

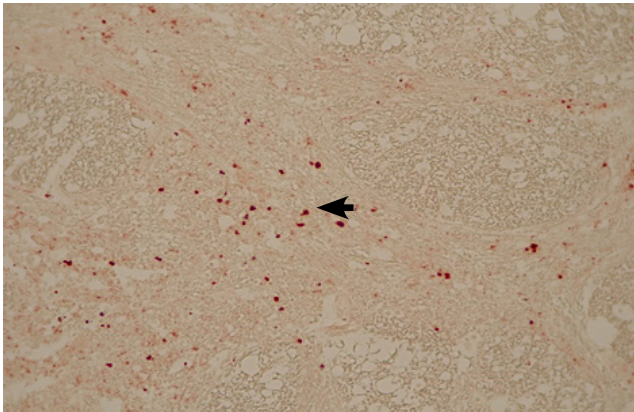


ภาพที่ 126 Brain, cattle, trypanosomosis ผลบวกที่ *Trypanosoma evansi* ◀ (IHC 100x)

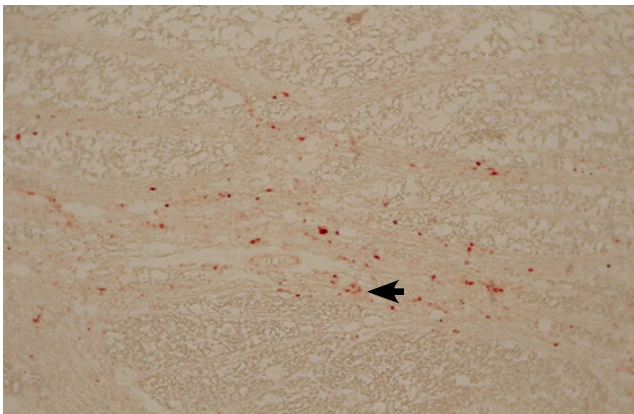


ภาพที่ 127 Brain, cattle, trypanosomosis ผลบวกที่ *Trypanosoma evansi* ◀ (IHC 100x)

โรคควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy, BSE)

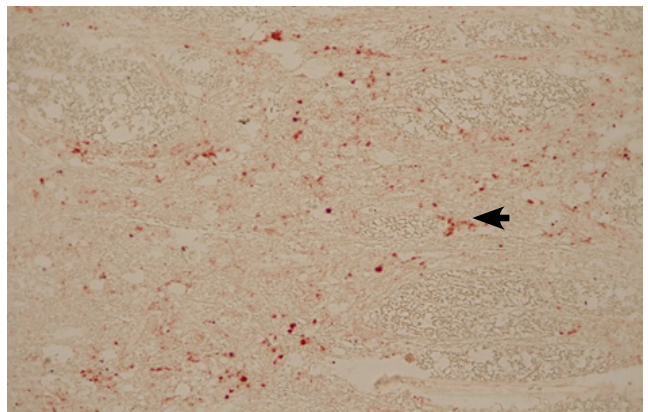


ภาพที่ 128 Pons, cattle, BSE
ผลบวกที่ Prion protein บริเวณ Grey matter
ของ Pons ◀ (IHC 40x)

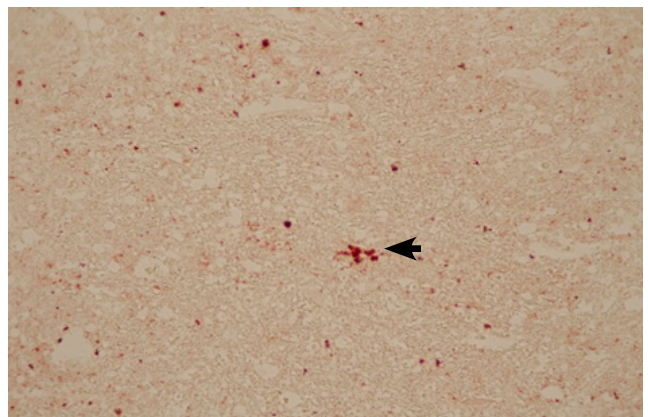


ภาพที่ 129 Pons, cattle, BSE
ผลบวกที่ Prion protein บริเวณ Grey matter
ของ Pons ◀ (IHC 40x)

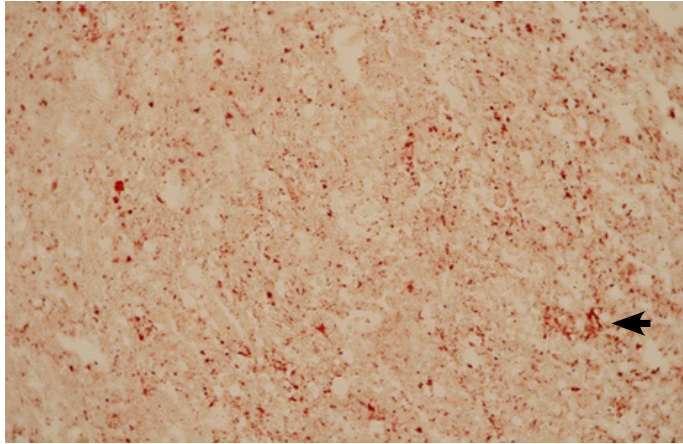
ภาพที่ 130 Pons, cattle, BSE
ผลบวกที่ Prion protein
บริเวณ Grey matter ของ Pons ◀ (IHC 40x)



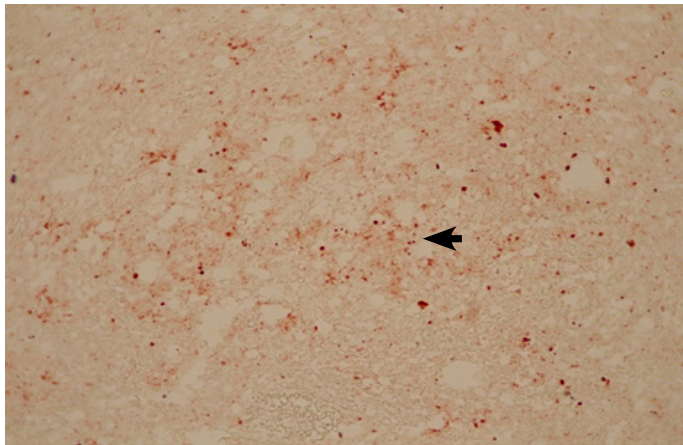
ภาพที่ 131 Pons, cattle, BSE
ผลบวกที่ Prion protein บริเวณ Grey matter
ของ Pons ◀ (IHC 40x)



โรควัวบ้า (Bovine spongiform encephalopathy, BSE) (ต่อ)

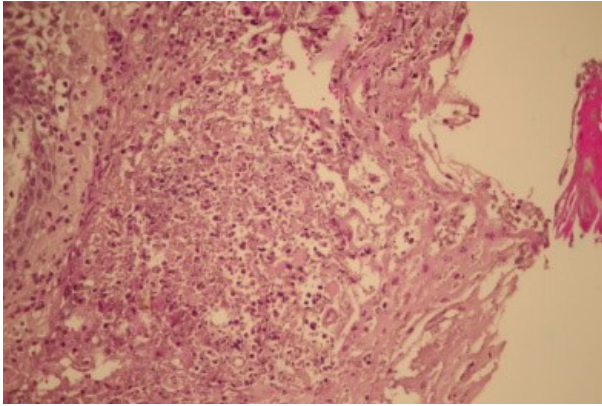


ภาพที่ 132 Pons, cattle, BSE ผลบวกที่ Prion protein บริเวณ Grey matter ของ Pons ◀ (IHC 40x)

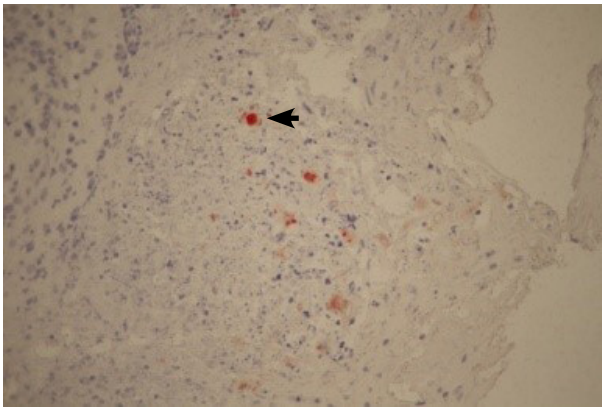


ภาพที่ 133 Pons, cattle, BSE ผลบวกที่ Prion protein บริเวณ Grey matter ของ Pons ◀ (IHC 40x)

โรคปากและเท้าเปื่อย ไทป์โอ (Foot and mouth disease type O, FMD type O)

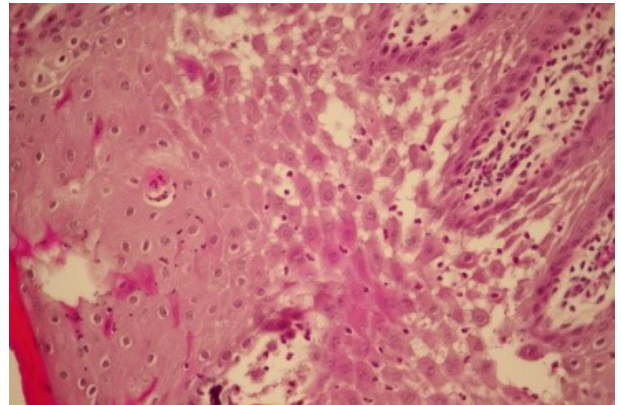


ภาพที่ 134 Tongue, cattle, FMD type O (H&E 40x)

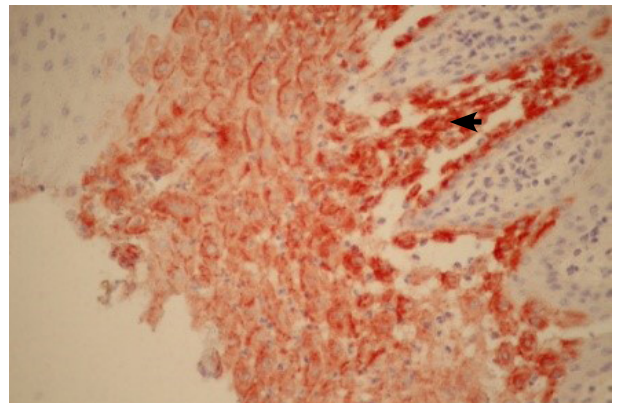


ภาพที่ 135 Tongue, cattle, FMD type O
ผลบวกที่ Necrotic epithelium ◀ (IHC 40x)

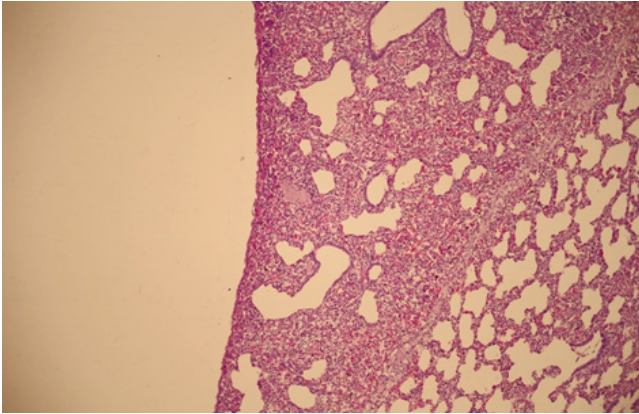
ภาพที่ 136 Interdigital skin, cattle, FMD type O
(H&E 40x)



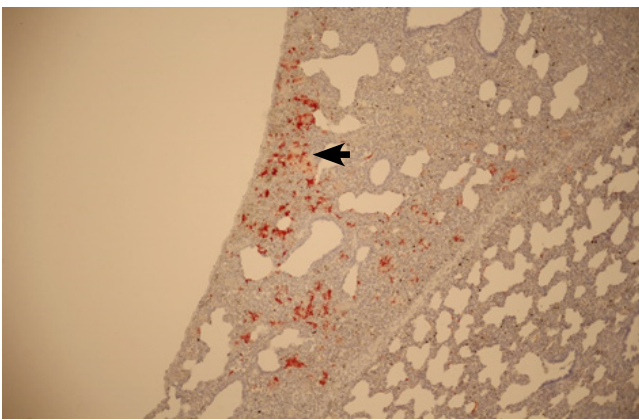
ภาพที่ 137 Interdigital skin, cattle, FMD type O
ผลบวกที่ Necrotic dermis ◀ (IHC 40x)



กลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)

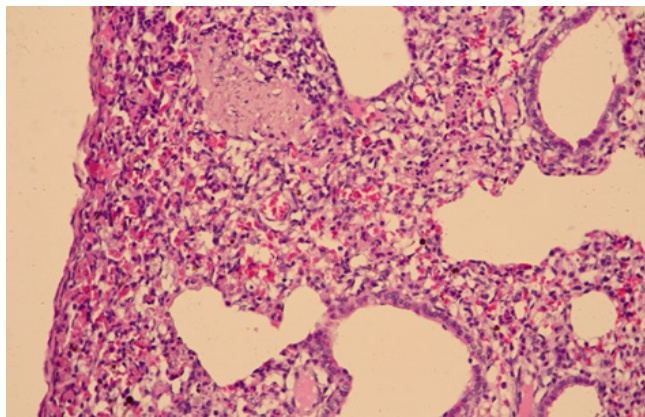


ภาพที่ 138 Lung, pig, PRRS (H&E 10x)

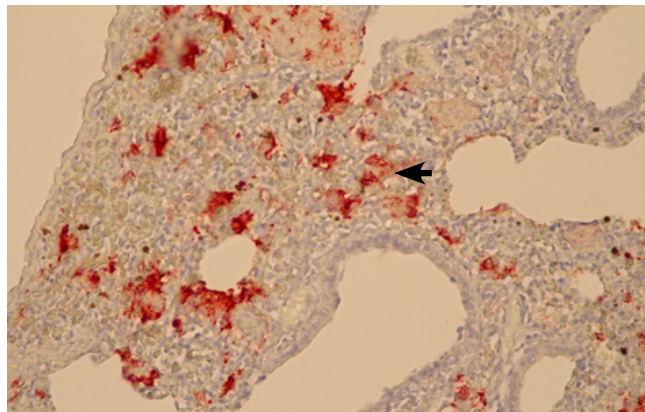


ภาพที่ 139 Lung, pig, PRRS
ผลบวกที่ Macrophage ◀ (IHC 10x)

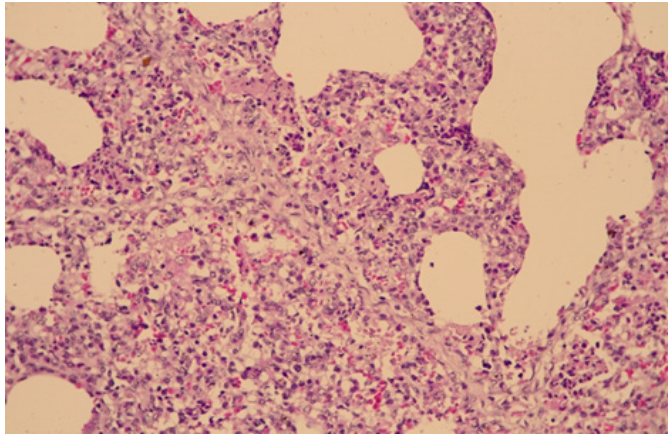
ภาพที่ 140 Lung, pig, PRRS
(H&E 40x)



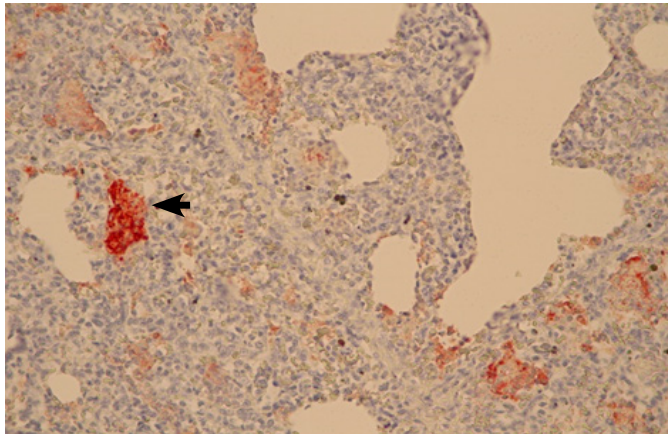
ภาพที่ 141 Lung, pig, PRRS
ผลบวกที่ Macrophage ◀ (IHC 40x)



กลุ่มอาการพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) (ต่อ)

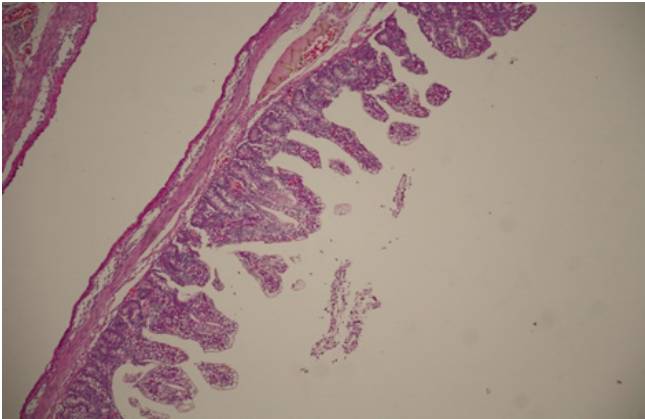


ภาพที่ 142 Lung, pig, PRRS (H&E 40x)

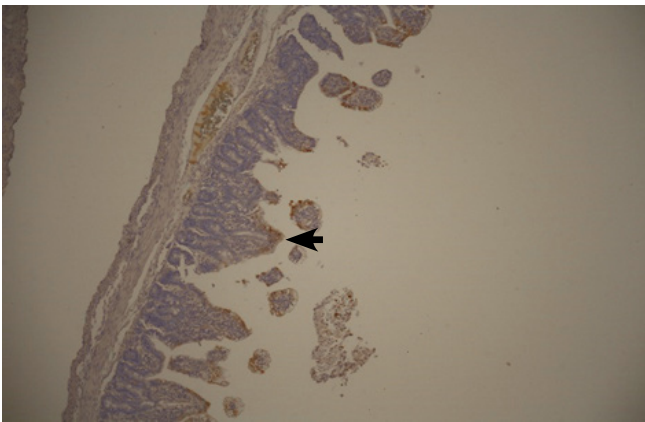


ภาพที่ 143 Lung, pig, PRRS ผลบวกที่ Macrophage ◀ (IHC 40x)

โรคพอร์ซายเอพิเดมิกไดอะเรีย (Porcine epidemic diarrhea, PED)

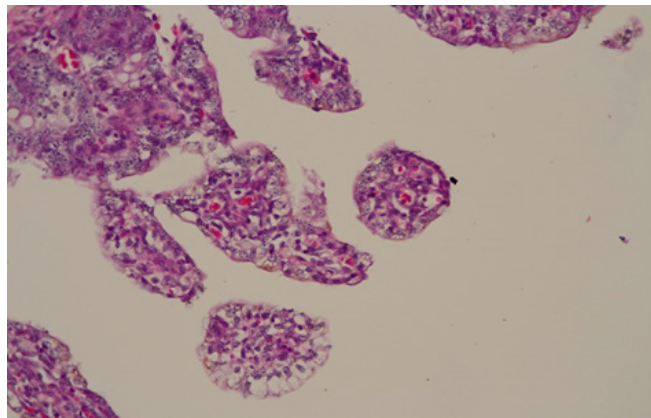


ภาพที่ 144 Small intestine, pig, PED
(H&E 10x)

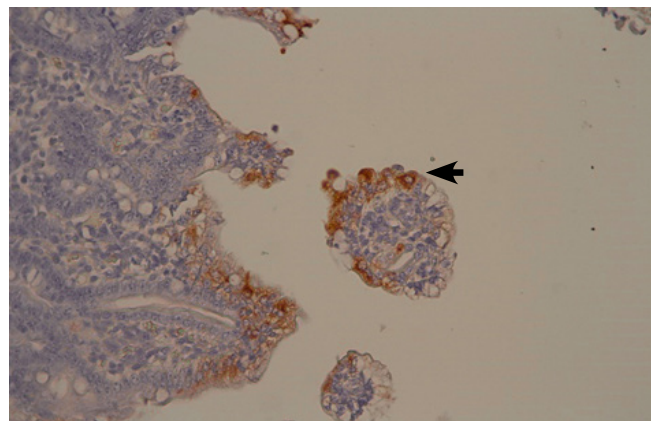


ภาพที่ 145 Small intestine, pig, PED
ผลบวกที่ Enterocyte ◀ (IHC 10x)

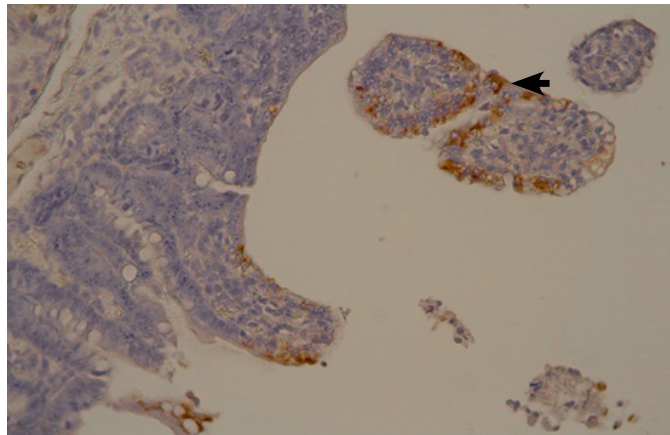
ภาพที่ 146 Small intestine, pig, PED
(H&E 40x)



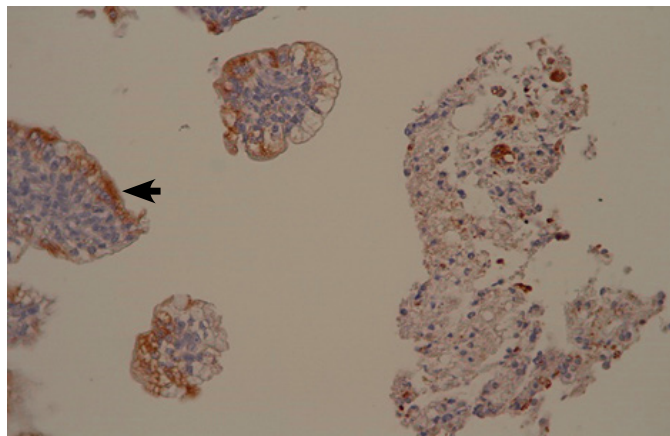
ภาพที่ 147 Small intestine, pig, PED
ผลบวกที่ Enterocyte ◀ (IHC 40x)



โรคพอร์ซายเอพิเดมิกไดอะเรีย (Porcine epidemic diarrhea, PED) (ต่อ)

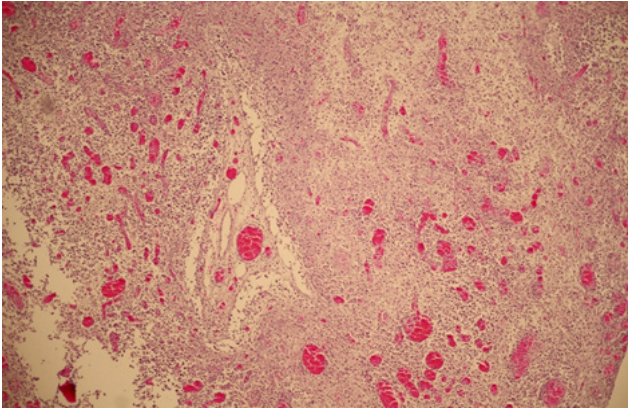


ภาพที่ 148 Small intestine, pig, PED ผลบวกที่ Enterocyte ◀ (IHC 40x)

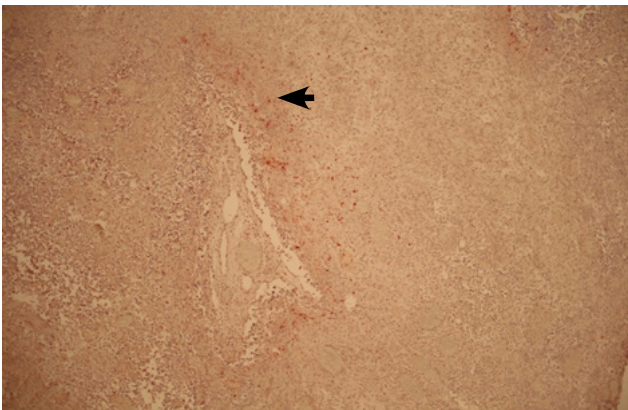


ภาพที่ 149 Small intestine, pig, PED ผลบวกที่ Enterocyte ◀ (IHC 40x)

โรคติดเชื้อพอร์ซายน์เซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus infection, PCV)

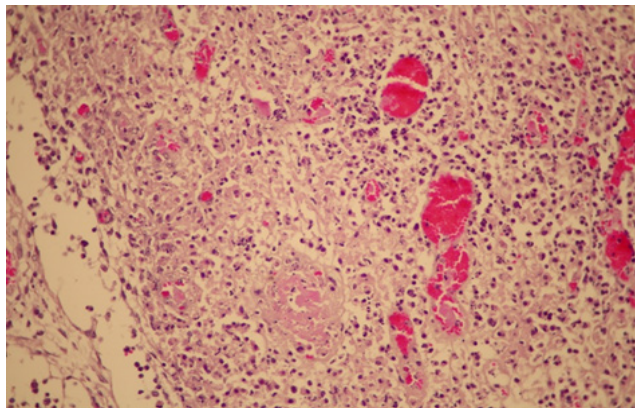


ภาพที่ 150 Lymph node, pig, PCV
(H&E 10x)

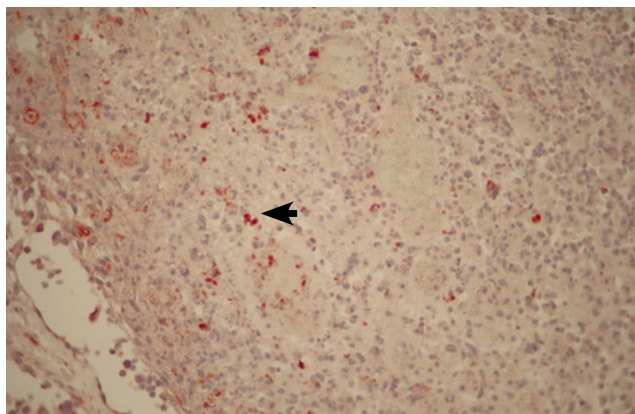


ภาพที่ 151 Lymph node, pig, PCV
ผลบวกที่ Intracytoplasmic
inclusion body ◀ (IHC 10x)

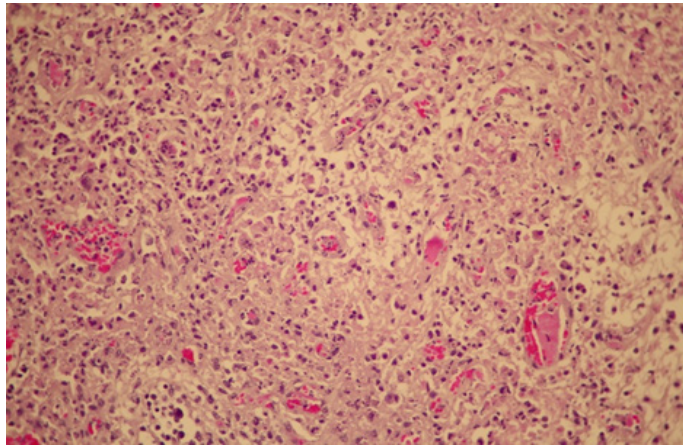
ภาพที่ 152 Lymph node, pig, PCV
(H&E 40x)



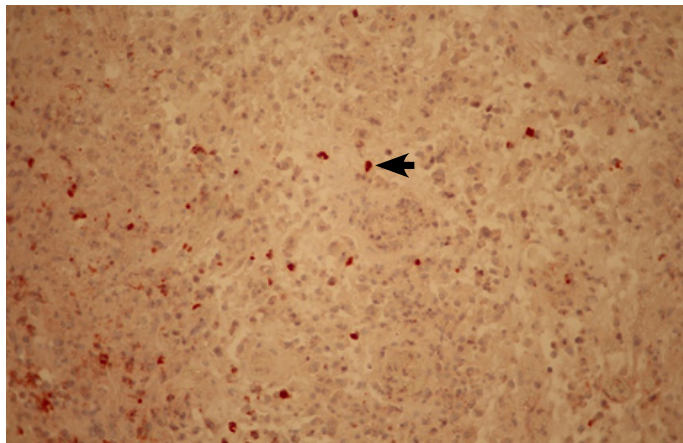
ภาพที่ 153 Lymph node, pig, PCV
ผลบวกที่ Intracytoplasmic
inclusion body ◀ (IHC 40x)



โรคติดเชื้อพอร์ซายน์เซอร์โคไวรัส (Porcine Circovirus infection, PCV) (ต่อ)

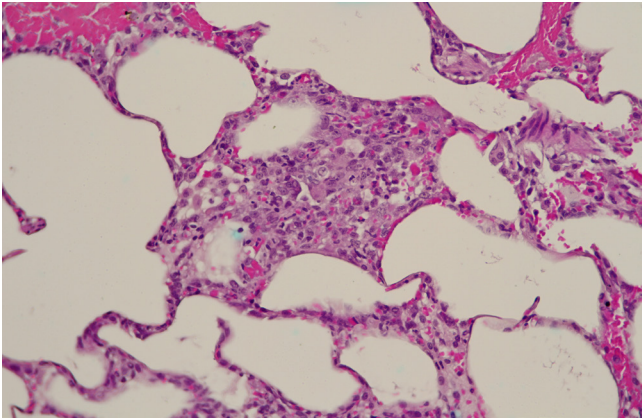


ภาพที่ 154 Lymph node, pig, PCV (H&E 40x)

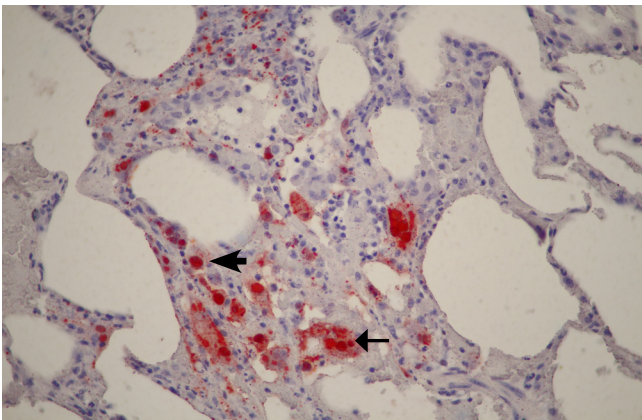


ภาพที่ 155 Lymph node, pig, PCV ผลบวกที่ Intracytoplasmic inclusion body ◀ (IHC 40x)

โรคใช้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah encephalitis)

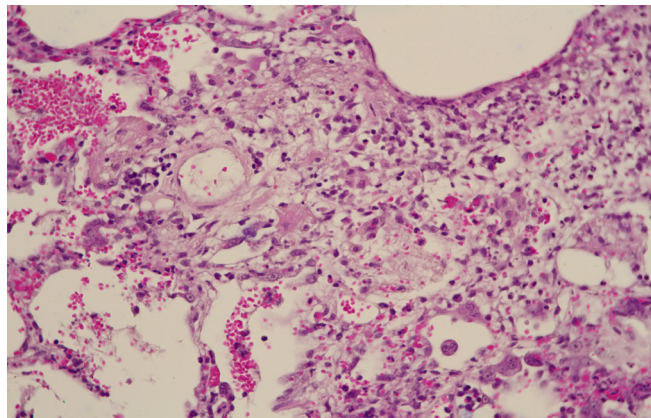


ภาพที่ 156 Lung, pig, Nipah encephalitis
(H&E 40x)

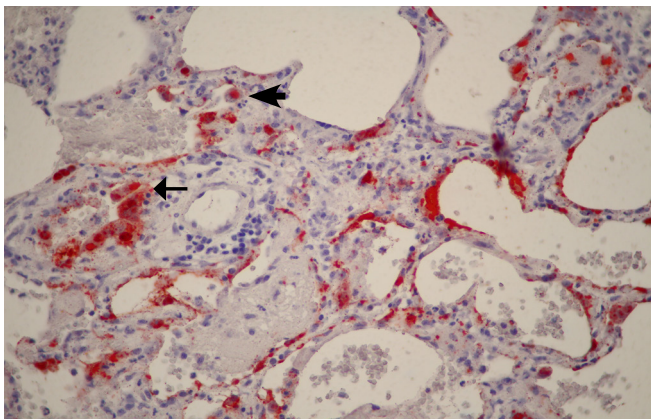


ภาพที่ 157 Lung, pig, Nipah encephalitis
ผลบวกที่ Pneumocyte ← และ
Phagocytic inflammatory cell ←
(IHC 40x)

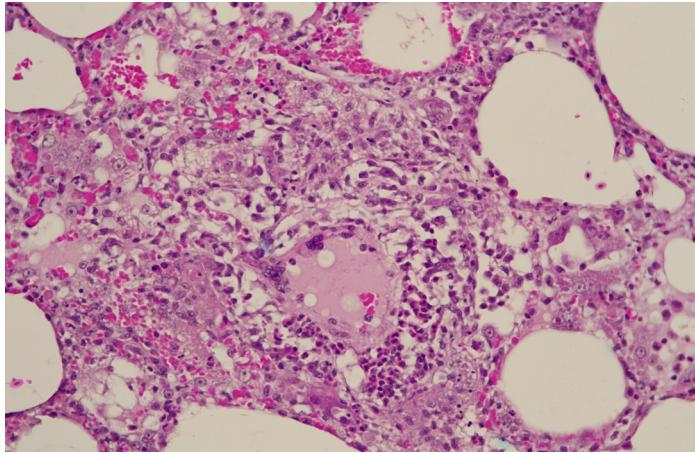
ภาพที่ 158 Lung, pig, Nipah encephalitis
(H&E 40x)



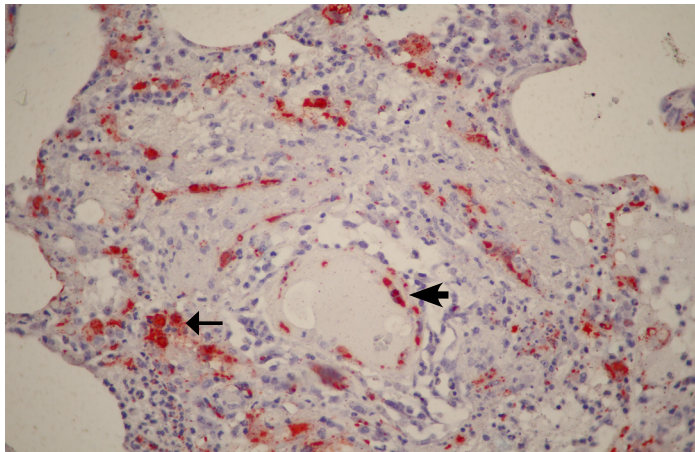
ภาพที่ 159 Lung, pig, Nipah encephalitis
ผลบวกที่ Pneumocyte ← และ
Phagocytic inflammatory cell ←
(IHC 40x)



โรคไข้สมองอักเสบนิปาห์ (Nipah encephalitis) (ต่อ)

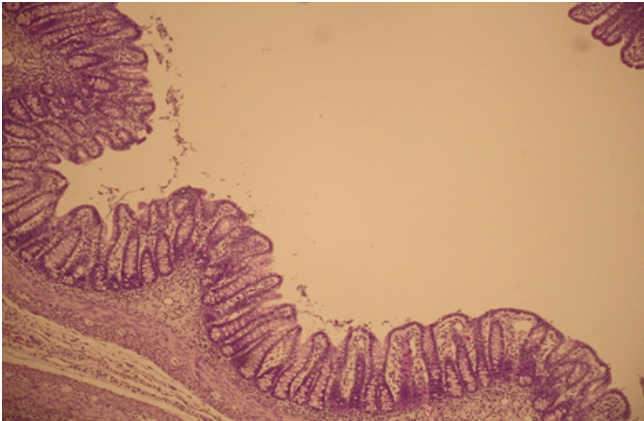


ภาพที่ 160 Lung, pig, Nipah encephalitis (H&E 40x)

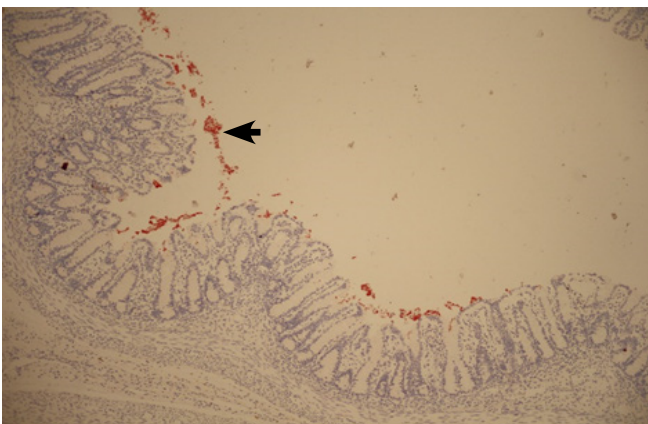


ภาพที่ 161 Lung, pig, Nipah encephalitis
ผลบวกที่ Pneumocyte ← และ
Phagocytic inflammatory cell ← (IHC 40x)

โรค Colibacillosis

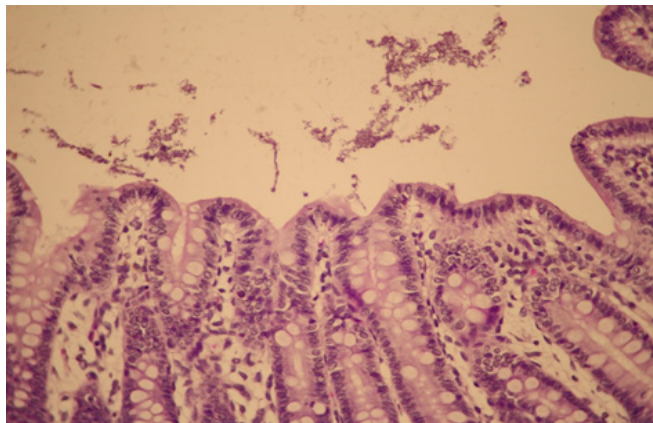


ภาพที่ 162 Large intestine, pig,
colibacillosis (H&E 10x)

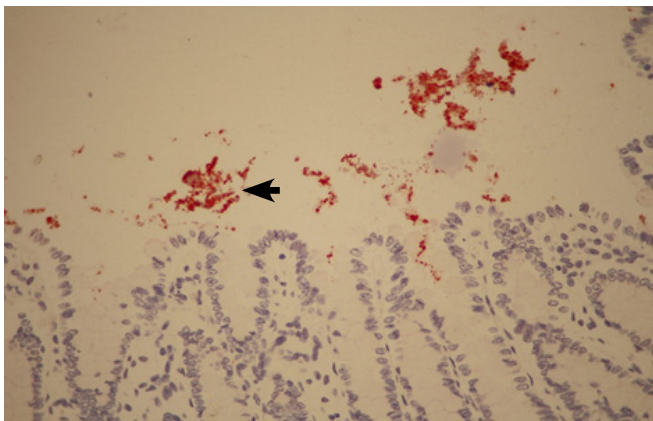


ภาพที่ 163 Large intestine, pig,
colibacillosis ผลบวกที่ *Escherichia coli* ◀
(IHC 10x)

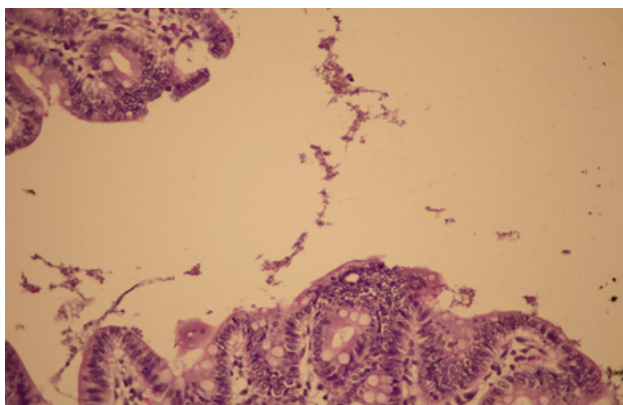
ภาพที่ 164 Large intestine, pig,
colibacillosis (H&E 40x)



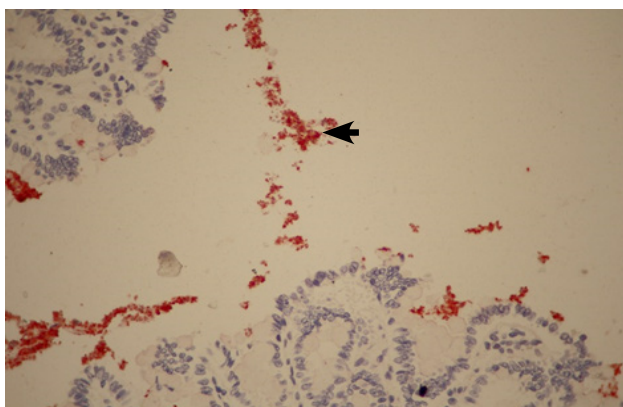
ภาพที่ 165 Large intestine, pig,
colibacillosis ผลบวกที่ *Escherichia coli* ◀
(IHC 40x)



โรค Colibacillosis (ต่อ)



ภาพที่ 166 Large intestine, pig, colibacillosis (H&E 40x)



ภาพที่ 167 Large intestine, pig, colibacillosis ผลบวกที่ *Escherichia coli* ◀ (IHC 40x)

สัตวแพทย์หญิงทองทอง ปังนิมะศิริ

กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

50/2 เกษตรกลาง ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ : 0 2579 8908-14 ต่อ 256 โทรสาร : 0 2579 8918-19

e-mail : tuangthongp@dld.go.th เว็บไซต์ : niah.dld.go.th

