

การทำสไลด์เนื้อเยื่อแบบไม่ใช้เครื่องมือหลักทางจุลพยาธิวิทยา

ธีระ ศรีประสาธ* ลัดดา ตรงวงศา จิรา คงครอง เจษฎา รัตนภาส
ทริกา จันทมณีโชติ รุ่งอรุณ ยอดรัก วิลาสินี ป้อมทอง

เก็บตัวอย่างอวัยวะจากไก่ 5 ตัว สุกร 5 ตัว แบ่งเป็น 3 ชุด นำมาผ่านกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา ชุดที่ 1 เป็นสไลด์เนื้อเยื่อควบคุม เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยา โดยใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor) ในขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อและการแทรกซึมของพาราฟินเข้าในเซลล์รวมทั้งเครื่องเตรียมบล็อกเนื้อเยื่อ (tissue embedding) ในขั้นตอนการทำพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ ตัดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมือหมุน (rotary microtome) และอบสไลด์เนื้อเยื่อในตู้อบ (oven) ก่อนนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ชุดที่ 2 ทำเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ใช้ผู้ปฏิบัติงานดำเนินการแทนเครื่อง tissue processor ใช้ hot plate และ cold plate หรือถาดน้ำแข็งแทน tissue embedding นอกจากนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับชุดที่ 1 ส่วนชุดที่ 3 ทำเช่นเดียวกับชุดที่ 2 แต่ในขั้นตอนอบสไลด์เนื้อเยื่อทำการอบในกล่องสแตนเลสที่วางไว้บน hot plate แทนตู้อบทั้งหมดดำเนินการทำ 3 ซ้ำ ผลการตรวจคุณภาพชิ้นเนื้อในกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อไม่พบความผิดปกติทั้ง 3 ชุด 3 ซ้ำ จากการอ่านสไลด์ไม่พบความผิดปกติของรูปร่างของเซลล์ การติดสีของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม ความคมชัดของเซลล์ตลอดจนความหนาของเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชุด 3 ซ้ำ สรุปว่าสไลด์เนื้อเยื่อจากการดำเนินการโดยไม่ใช้เครื่องมือหลักไม่แตกต่างจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ดำเนินการด้วยวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยาซึ่งเป็นชุดควบคุม การทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแก้ปัญหาในกรณีที่เครื่องมือชำรุด หรือเพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีเครื่องมือหลักทางจุลพยาธิวิทยาสามารถเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อได้อย่างมีคุณภาพโดยใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป

คำสำคัญ: การทำสไลด์เนื้อเยื่อ เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ เครื่องเตรียมบล็อกเนื้อเยื่อ

บทนำ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติเป็นหน่วยงานทางวิชาการของกรมปศุสัตว์ มีหน้าที่รับผิดชอบใน

กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง

จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14

โทรสาร 0-2579-8919 E-mail: th_2522@hotmail.com

การชันสูตรโรคสัตว์ให้แก่เกษตรกรและเจ้าของฟาร์ม รวมทั้งเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงให้หน่วยงานอื่นๆ ทั้งนี้มีจุดประสงค์ในการหาสาเหตุของโรค เพื่อทำการรักษา ควบคุม ป้องกันและกำจัดโรค กลุ่มพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ มีหน้าที่ในการชันสูตรโรคโดยการผ่าซากและนำชิ้นส่วนอวัยวะมาทำสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับตรวจทางจุลพยาธิวิทยา นำมา

ประกอบการชันสูตรโรคร่วมกับการเพาะแยกเชื้อ หรือบางครั้งสามารถระบุโรคได้ถ้าพบรอยโรคเฉพาะ เช่น โรคอหิวาต์และโรคพิษอีเอ็มดับเบิลยูเอสในสุกรที่เกิดจาก circovirus type II โรคกาฬโรคเปิดและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถตรวจทางอิมมูโนพยาธิวิทยาซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติเจนจากสไลด์เนื้อเยื่อ ทำให้สามารถระบุสาเหตุของโรคต่างๆได้ การทำสไลด์เนื้อเยื่อดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการมาตรฐานทางพยาธิวิทยา ได้แก่ การนำชิ้นเนื้อตัวอย่างจากการผ่าซากมาผ่านกระบวนการต่างๆ ดังนี้ คือ การดองเนื้อเยื่อ (fixation) ด้วย aldehyde groups เช่น formalin, mercurials, alcohols, oxidizing agents หรือ picrates เพื่อให้เนื้อเยื่อแข็งตัวและไม่เน่า (Luna, 1968; Mercer University School of Medicine, 2010) จากนั้นผ่านเข้าสู่การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) โดยใช้สาร dehydrant ได้แก่ alcohols, acetone, dioxane หรือ tetrahydrofuran (ศุภลักษณ์, 2540; Luna, 1968) จากนั้นจะเป็นการทำให้เซลล์แข็งตัวโดยการให้ paraffin แทรกซึมเข้าไปในเซลล์ (infiltration) แทนที่สาร dehydrant แต่เนื่องจากคุณสมบัติของ paraffin ไม่สามารถเข้ากันได้กับสาร dehydrant จึงต้องมีสารตัวกลางเข้าไปแทนที่สาร dehydrant และเตรียมพร้อมที่จะให้ paraffin เข้ามาแทรกซึม เรียกกระบวนการนี้ว่า clearing โดยใช้ xylene, chloroform, toluidine, benzene หรือ carbon tetrachloride (ศุภลักษณ์, 2540; Luna, 1968; Talukder, 2007) ซึ่งกระบวนการตั้งแต่ dehydration, clearing และ infiltration อาจจะทำให้การเคลื่อนย้ายตัวอย่างลงในน้ำยาต่างๆโดยผู้ปฏิบัติงานหรืออาจจะใช้เครื่องมือที่สามารถเคลื่อนย้ายตัวอย่างลงในสารต่างๆ โดยอัตโนมัติ เรียกว่าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor)

(Talukder, 2007) จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปฝังใน paraffin (embedding) เพื่อทำเป็นพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ (tissue paraffin block) โดยใช้เครื่องเตรียมบล็อกเนื้อเยื่อ (tissue embedding) ต่อมานำ block ดังกล่าวมาตัดด้วยเครื่อง microtome (sectioning) ขนาดหนาประมาณ 2-5 ไมครอน แล้วนำสไลด์แก้วมาซ้อนเนื้อเยื่อทำเป็นสไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปอบให้แห้งใน oven แล้วนำมาย้อมสี (staining) ด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์ (ศุภลักษณ์, 2540; วีกิพีเดีย, 2553; Luna, 1968; Mercer University School of Medicine, 2010) กระบวนการดังกล่าวใช้เวลา 2-3 วัน ส่วนการชันสูตรโรคโดยวิธีทาง อิมมูโนพยาธิวิทยานั้น ใช้สไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการทำสไลด์เนื้อเยื่อเหมือนกันแต่นำไปย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (Marc, 2006) แทนการย้อมด้วยสี H&E

การดำเนินการดังกล่าวอาจจะประสบกับปัญหาเรื่องเครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ และ/หรือเครื่องเตรียมบล็อกเนื้อเยื่อใช้งานไม่ได้เนื่องจากเครื่องมือชำรุด หรือบางหน่วยงานไม่มีงบประมาณในการจัดซื้อครุภัณฑ์ซึ่งมีราคาแพงเป็นต้น ทำให้การทำสไลด์เนื้อเยื่อล่าช้าหรือหยุดชะงัก ส่งผลกระทบทำให้การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาล่าช้า การทดลองครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแก้ปัญหาในกรณีที่เครื่องมือชำรุดหรือเพื่อให้ห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีเครื่องมือหลักทางจุลพยาธิวิทยาสามารถเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อได้อย่างมีคุณภาพโดยใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue processor) ประกอบด้วยโถแก้วสำหรับบรรจุ ethanol จำนวน 7 โถ xylene จำนวน 3 โถ และโถหลอม paraffin ซึ่งตั้งอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 2 โถ

2. เครื่องเตรียมบล็อกเนื้อเยื่อ (tissue embedding) ประกอบด้วยอ่างหลอม paraffin อ่างอุ่นตับชิ้นเนื้อ อ่างอุ่น base mold แท่นร้อน และแท่นเย็น
3. เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมือหมุน (rotary microtome)
4. อ่างลอยเนื้อเยื่อ (floating bath)
5. ตู้อบ (oven)

วิธีการ

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจาก ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ สมอง ตับอ่อน กระเพาะแท้ กระเพาะบิด และลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum, colon และ caecum ของไก่จำนวน 5 ตัว รวมทั้งหมด 70 ตัวอย่าง และตัวอย่างจาก ปอด ตับ ม้าม ไต หัวใจ ต่อม้ำเหลือง ตับอ่อน สมอง ลำไส้ส่วน duodenum, jejunum, ileum, colon และ caecum ของสุกร 5 ตัว รวมทั้งหมด 65 ตัวอย่าง มาแช่ใน 10% neutral buffered formalin อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาตัดแต่งให้มีความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร แบ่งเป็น 3 ชุด แล้วบรรจุในตลับใส่ชิ้นเนื้อ แต่ละตัวอย่างดำเนินการ 3 ซ้ำโดย ผู้ปฏิบัติคนเดียว โดยดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

ชุดที่ 1 โดยใช้เครื่อง tissue processor, เครื่อง tissue embedding และ oven

เป็นชุดมาตรฐานทางพยาธิวิทยาและใช้เป็น

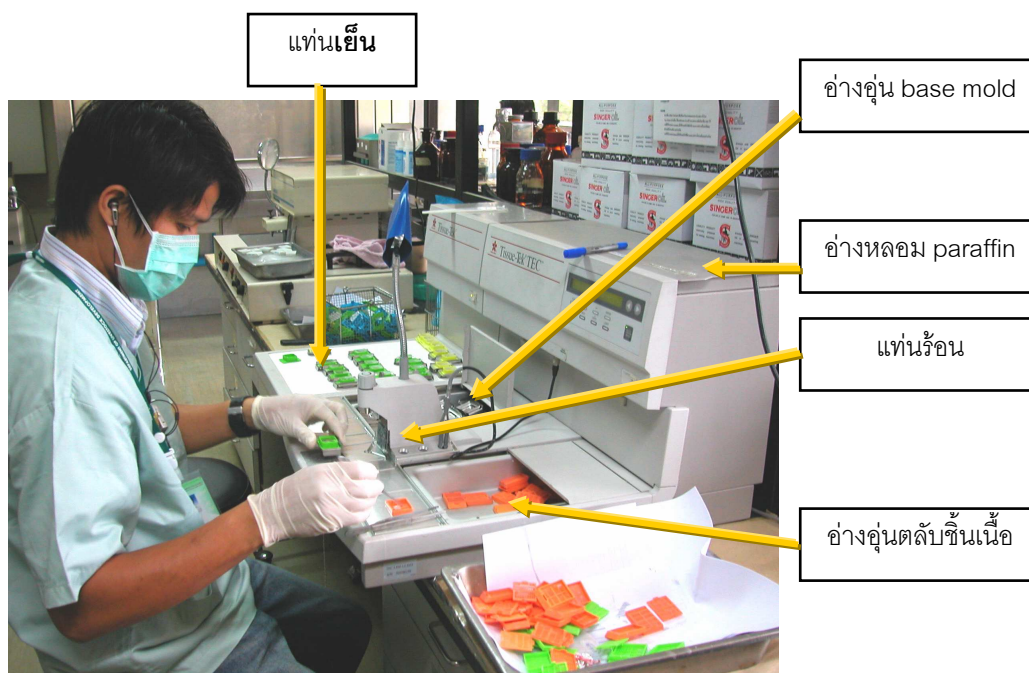
ชุดควบคุม

1.1 กระบวนการ dehydration, clearing และ infiltration

นำตลับชิ้นเนื้อมาใส่ตะกร้าบรรจุตลับชิ้นเนื้อ แล้วล้างด้วยน้ำก๊อกไหลผ่าน 30 นาที จากนั้นนำไปแขวนในเครื่อง tissue processor (ภาพที่ 1) เครื่องจะทำงานอัตโนมัติในการยกตะกร้าชิ้นเนื้อขึ้นลงในถังที่บรรจุน้ำยาต่างๆ ตามเวลาที่ตั้งไว้และเมื่อครบกำหนดเวลาจะยกเปลี่ยนลงในถังถัดไปได้แก่ ethanol ตามความเข้มข้น 70%, 80%, 95%, 95%, 100%, 100% และ 100% เป็นเวลา 1.30, 1.00, 1.00, 1.00, 1.30, 1.00 และ 1.00 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นเคลื่อนลงในถัง xylene 3 ถัง เป็นเวลา 1.30, 1.00 และ 1.00 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วเคลื่อนลงในถังหลอม paraffin อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 ถัง เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมงเท่ากัน



ภาพที่ 1 เครื่อง tissue processor



ภาพที่ 2 เครื่อง tissue embedding

1.2 กระบวนการ embedding

เริ่มจากนำดัดขึ้นเนื้อออกจากตะแกรงบรรจุดัดขึ้นเนื้อของเครื่อง tissue processor มาวางในอ่างอุ่นดัดขึ้นเนื้อของเครื่อง tissue embedding (ภาพที่ 2) จากนั้นหยิบดัดขึ้นเนื้อที่ละดัด และ base mold มาวางบนแท่นร้อน กด paraffin จากหัวจ่ายของอ่างหลอม paraffin ลงใน base mold จนเกือบเต็มเบ้า แล้วย้าย base mold ไปวางบนแท่นเย็นให้ paraffin แข็งตัวเล็กน้อย หยิบขึ้นเนื้อจากดัดนำมาฝังใน base mold จากนั้นนำ embedding ring มาวางบน base mold แล้วเติม paraffin ให้เต็มเบ้า นำ base mold ดังกล่าวกลับไปวางบนแท่นเย็น รอจน paraffin แข็งตัวแล้วจึงแกะ tissue paraffin block ออกจาก base mold

1.3 กระบวนการ sectioning และ staining

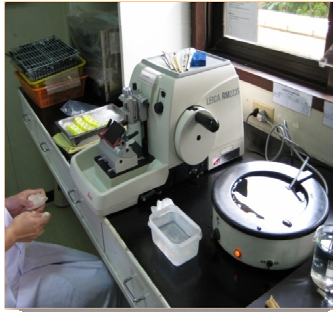
นำ tissue paraffin block ไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome หนา 3 ไมครอน (ภาพที่ 3) แล้วคีบลงใน floating bath เพื่อให้เนื้อเยื่อยึดตัว นำสไลด์แก้วชนิดริมฝามาซ้อนเนื้อเยื่อ แล้วนำไปอบใน oven

(ภาพที่ 4) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยสี H&E แล้วปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์

ชุดที่ 2 ปฏิบัติการโดยไม่ใช้เครื่อง tissue processor และเครื่อง tissue embedding

2.1 กระบวนการ dehydration, clearing และ infiltration

ดำเนินการโดยให้ผู้ปฏิบัติงานเคลื่อนย้ายตะแกรงดัดขึ้นเนื้อลงในโถบรรจุน้ำยาต่างๆ ตามลำดับแท่นเครื่อง tissue processor และตามเวลาเหมือนชุดที่ 1 ยกเว้นโถที่ 3 ซึ่งบรรจุ 100% ethanol จะแช่ข้ามคืน (over night) ทั้งนี้นำโถซึ่งบรรจุ ethanol และ xylene ไปวางบนเครื่อง hot plate stirrer เปิด สวิตช์ stirrer โดยไม่ตั้งอุณหภูมิเพื่อให้สารเคมีแทรกซึมเข้าเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น (ภาพที่ 5) ส่วนการ infiltration นำตะแกรงดัดขึ้นเนื้อใส่โถที่บรรจุ paraffin ที่วางบน hot plate เพื่อให้ paraffin หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แทนโถหลอม paraffin ของเครื่อง tissue processor (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 3 เครื่อง rotary microtome



ภาพที่ 4 ตู้อบ (oven)



ภาพที่ 5 แสดงการเคลื่อนย้ายตะกร้าบรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อตามกระบวนการ dehydration และ clearing



ภาพที่ 6 แสดงการเคลื่อนย้ายตะกร้าบรรจุตัวอย่างชิ้นเนื้อตามกระบวนการ infiltration



ภาพที่ 7: แสดงขั้นตอนการ embedding

ภาพที่ 7.1 แสดงการเตรียมเครื่องมือ

ภาพที่ 7.2 - 7.7 แสดงการ embedding

2.2 กระบวนการ embedding

ทำเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ใช้ hot plate 2 เครื่อง ตั้งอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส โดย hot plate เครื่องที่ 1 แทนแท่นร้อนของเครื่อง tissue embedding และ hot plate เครื่องที่ 2 แทนอ่างอุ่น base mold และอ่างอุ่นเนื้อเยื่อโดยนำตลับขึ้นเนื้อและ base mold ใส่ในกล่องสแตนเลสมาวางบน hot plate จากนั้นนำโถสแตนเลสที่บรรจุ paraffin มาวางบน hot plate เครื่องที่ 3 เพื่อให้ paraffin หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แทนอ่างหลอม paraffin ของเครื่อง tissue embedding นอกจากนี้ใช้ cold plate หรือถาดน้ำแข็ง แทนแท่นเย็น (ภาพที่ 7)

2.3 กระบวนการ sectioning และ staining

ดำเนินการเช่นเดียวกับชุดที่ 1

ชุดที่ 3 ปฏิบัติการโดยไม่ใช้เครื่อง tissue processor, tissue embedding และ oven

ปฏิบัติการเช่นเดียวกับชุดที่ 2 แต่ขั้นตอนการอบสไลด์ใช้ hot plate แทน oven โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อมาวางในกล่องสแตนเลส ที่วางบน hot plate ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ 60 องศาเซลเซียสแล้วปิดฝา (ภาพที่ 8)

การตรวจคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อ

ดำเนินการโดยผู้ปฏิบัติงานทำสไลด์เนื้อเยื่อ และผู้อ่านสไลด์ ผู้ปฏิบัติงานทำสไลด์เนื้อเยื่อ ทำการตรวจชิ้นเนื้อในกระบวนการ dehydration, clearing, infiltration และ embedding โดยตรวจดูว่าชิ้นเนื้อปกติ เปราะ หักง่าย นิ่มเกินไป หรือหดตัว จากนั้นบันทึกความผิดปกติเป็นจำนวนร้อยละ ส่วนกระบวนการ sectioning ตรวจดูการตัดสไลด์เนื้อเยื่อว่าสามารถตัดได้ดี หรือมีความผิดปกติ เช่น ยุ่ย เป็นขุย หรือย่น บันทึกความผิดปกติเป็นจำนวนร้อยละเช่นกัน ผู้อ่านสไลด์เนื้อเยื่อ โดยนายสัตวแพทย์ผู้มีประสบการณ์ในการอ่านสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาไม่น้อยกว่า 5 ปี 3 คน อ่านสไลด์ทั้งหมด ดูความหนาของเนื้อเยื่อ รูปร่างเซลล์

การติดสีของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมและความคมชัดของเซลล์ บันทึก ความผิดปกติเป็นจำนวนร้อยละและหาค่าเฉลี่ยจากผู้อ่าน 3 คน

ผล

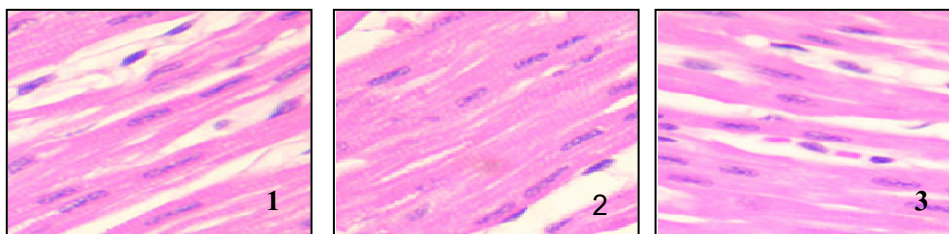
จากการตรวจชิ้นเนื้อของไก่ 70 ตัวอย่าง และสุกร 65 ตัวอย่าง ในกระบวนการ dehydration, clearing, infiltration และ embedding พบว่าชิ้นเนื้อปกติร้อยละ 100 ทั้ง 3 ชุด และทั้ง 3 ซ้ำ ไม่พบการเปราะ หักง่าย นิ่มหรือหดตัว ส่วนในกระบวนการ sectioning พบว่าเนื้อเยื่อสามารถตัดได้ดี ไม่ยุ่ย ไม่เป็นขุย และไม่ย่นร้อยละ 100 ทั้ง 3 ชุด 3 ซ้ำ และสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมสี H&E แล้วจากทั้งเนื้อเยื่อไก่และสุกร พบว่าไม่มีความผิดปกติของรูปร่างเซลล์ รูปร่างเซลล์ปกติมีความคมชัด เนื้อเยื่อไม่หนาเกินไป ส่วนนิวเคลียสติดสีม่วงน้ำเงิน และไซโตพลาสซึมติดสีแดงปกติร้อยละ 100 ทั้ง 3 ชุด และทั้ง 3 ซ้ำ เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 9)

วิจารณ์

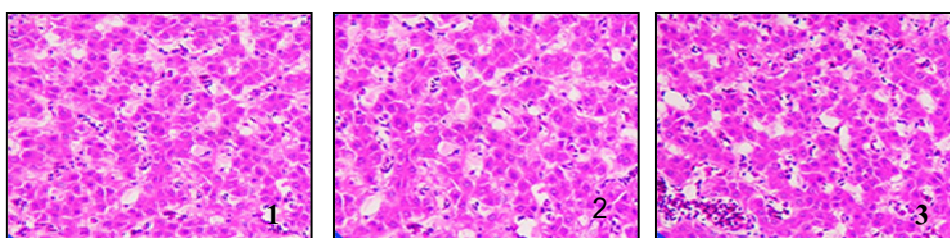
การรายงานครั้งนี้ เป็นการทำสไลด์เนื้อเยื่อแบบไม่ใช้เครื่องมือหลัก โดยเริ่มตั้งแต่การ fixation โดยใช้ 10% neutral buffered formalin ซึ่งเป็น fixative ที่แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อได้ดี แม้ว่าการแทรกซึมจะเป็นไปอย่างช้าๆ แต่เป็นที่นิยมเนื่องจากไม่ทำลายเนื้อเยื่อโปรตีน จึงเหมาะกับการทำเป็นงานประจำ โดยเฉพาะกับตัวอย่างที่ย้อมสี H&E (Mercer University School of Medicine, 2010) ส่วนกระบวนการต่อไปคือ การ dehydration โดยใช้ ethanol เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูง ซึ่งจะทำให้เนื้อเยื่อไม่แข็งจนเปราะดีกว่าการใช้ acetone (เวคิน, 2524) ในการทดลองครั้งนี้ใช้ผู้ปฏิบัติงานเป็นผู้เคลื่อนย้ายโถบรรจุ ethanol แทนการทำงานของเครื่อง tissue processor และหยุดแช่ค้างคืนที่ 100% ethanol โถที่ 3 ซึ่งไม่มีผลกระทบกับความเปราะ หรือ



ภาพที่ 8 แสดงการอบสไลด์เนื้อเยื่อในกล่องสแตนเลส



ภาพที่ 9.1 แสดงภาพกล้องเนื้อหัวใจของสุกรทางจุลพยาธิวิทยา (H&E, x 40) ของชุดที่ 1, 2 และ 3



ภาพ 9.2 แสดงภาพตับของไก่ทางจุลพยาธิวิทยา (H&E, x 20) ของชุดที่ 1, 2 และ 3

การหัตถ์ของเนื้อเยื่อ ตรงกับรายงานของ Luna (1968) แต่วิธีของ Luna จะหยุดแช่ค้างคืนที่ 100% alcohol โทที่ 1 ส่วนกระบวนการ clearing โดย xylene ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง และมีความปลอดภัยกับ ผู้ปฏิบัติงานมากกว่าการใช้ chloroform แต่ถ้าแช่นานเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อแข็ง และควรมีการตรวจสอบ xylene ที่ใช้ ถ้าเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่นขาวหมายความว่า มีน้ำปนอยู่แสดงว่าการ dehydration ไม่สมบูรณ์ จะทำให้เนื้อเยื่อหดตัวและเหี่ยว (ศุภลักษณ์, 2540) การใช้วิธีทำด้วยผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการจะเสียเวลาเพิ่มขึ้น

จากการใช้เครื่อง tissue processor เนื่องจากการใช้ เครื่องจะสามารถตั้งให้ทำงานในตอนเย็น พอเช้า วันรุ่งขึ้นสามารถดำเนินการ embedding ได้เลย แต่เรื่องนี้สามารถแก้ไขได้โดยอาจจะใช้แรงงานเจ้าหน้าที่รักษาความปลอดภัยเป็นผู้เคลื่อนย้ายตะกร้าบรรจุตัวขึ้นเนื้อ จากโถหนึ่งไปยังอีกโถหนึ่งในช่วงเย็นเช่นเดียวกับเครื่อง สำหรับการ infiltration มีรายงานของศุภลักษณ์ (2540) ใช้ oven แทนโถหลอม paraffin ของเครื่อง tissue processor ส่วนการทดลองครั้งนี้ใช้ hot plate แทน เพื่อลดปัญหาในกรณีที่ห้องปฏิบัติการขาดแคลน oven สิ่งที

ควรระวังในขั้นตอนนี้คืออุณหภูมิของ paraffin ไม่ควรสูงเกินจุดหลอมเหลว 5 องศาเซลเซียส มิฉะนั้นจะทำให้เนื้อเยื่อแข็งและหดตัว (ศุภลักษณ์, 2540; Luna, 1968) ส่วนการ embedding โดยใช้ผู้ปฏิบัติงาน Luna (1968) ได้รายงานวิธีการ embedding หลายๆ เนื้อเยื่อรวมกันในภาชนะขนาดใหญ่ โดยใช้ตะเกียง Bunsen ลนกันภาชนะหรือดวงไฟ infrared ขนาด 115 – 120 โวลต์ สองอยู่เหนือภาชนะเพื่อทดแทนแทนความร้อนของเครื่อง tissue embedding และใช้ก้อนน้ำแข็งถูภาชนะแทนเย็น แต่การปฏิบัติงานมีความยุ่งยาก นอกจากนี้มีรายงานของศุภลักษณ์ (2540) จะใช้ภาชนะบรรจุ paraffin แล้วนำไปหลอมใน oven แทนอ่างหลอม paraffin ของเครื่อง tissue embedding แต่ต้องเปิด-ปิด oven บ่อยๆ เมื่อ embed แล้วทำให้ base mold เย็นลงโดยการจุ่มด้านล่างของ base mold ลงในอ่างน้ำเย็นพร้อมกับการเป่าด้านบนของ base mold ซึ่งไม่สะดวก แต่การทดลองครั้งนี้ใช้ hot plate แทนแทนร้อนและให้ความร้อนแก่อ่างหลอม paraffin และใช้แผ่น cold plate หรือภาชนะน้ำแข็งแทนแทนเย็น ซึ่งสะดวกในการปฏิบัติและไม่ต้องใช้ oven เพื่อลดปัญหาการขาดแคลนครุภัณฑ์ ข้อควรระวังในขั้นตอนนี้คือ จะต้องมีการอุ่นเนื้อเยื่ออย่าให้ paraffin รอบๆ เนื้อเยื่อแข็งตัว มิฉะนั้นจะเกิดรอยแยกระหว่างชิ้นเนื้อกับ paraffin ทำให้ section ไม่ได้ (Luna, 1968) การ section ด้วย microtome เป็นกระบวนการเดียวในการทดลองนี้ที่ต้องใช้เครื่องมือ เพราะผู้ปฏิบัติงานไม่สามารถตัดให้บางขนาด 3 ไมครอน ในการทดลองชุดที่ 3 ทำการอบสไลด์ก่อนการย้อมสีด้วย hot plate เพื่อแก้ไขการขาดแคลนครุภัณฑ์ oven เช่นเดียวกับกระบวนการอื่นๆที่ได้กล่าวมาแล้ว ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าคุณภาพเนื้อเยื่อในกระบวนการต่างๆ และคุณภาพสไลด์เนื้อเยื่อไม่มีความผิดปกติ

รวมทั้งไม่มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐานทางพยาธิวิทยาที่ใช้เครื่องมือหลัก จึงสามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกในกรณีที่เครื่องมือชำรุดหรือไม่มีงบประมาณในการจัดซื้อครุภัณฑ์ อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือที่มีงานไม่มากและไม่เร่งด่วน นอกจากนี้การใช้ผู้ปฏิบัติงานแทนเครื่องมือมีความยุ่งยากซึ่งอาจจะมีปัญหาการผิดพลาดจากผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมการปฏิบัติงานอย่างเคร่งครัด

เอกสารอ้างอิง

วิกิพีเดีย. 2553. มิถุนวิทยา. แหล่งที่มา:

<http://th.wikipedia.org/wiki/>. 2 มิถุนายน 2553.

เวดิน นพินิตย์. 2524. เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา. สำนักพิมพ์ห้างขายยาตรา. กรุงเทพฯ. 168 หน้า

ศุภลักษณ์ โรมนันท์. 2540. ขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อจนเป็นบล็อกพาราฟิน. แอนนิมอลไมโครเทคนิค.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 37 – 58.

Mercer university school of medicine. 2010.

Histotechniques.Available :

<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html>, May 20, 2010.

Luna, L.G.1968. Manual of histologic staining method of Arm Forces Institute of pathology. 3rd ed., McGraw - Hill Book company, New York, USA. p. 1 – 38.

Marc, K. 2006. Immunohistochemistry staining method. In: Immunohistochemistry staining method. 4th ed., Dako, Carpinteria, California, USA. p. 47 – 53.

Talukder, S.I. 2007. Histopathology techniques : Tissue processing and staining. Available : <http://www.tatukderbd.com> , May 8, 2010.

Tissue slide preparation without major histopathological equipments

Theera Sriprasat* Ladda Trongwongsa Chira Kongkrong Jetsada Ratthanophart
Tharika Chantamaneechote Roongaroon Yodrak Vilasinee Pomtong

Pathology section, National Institute of Animal Health, Kaset Klang, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author Tel. 0-2579-8908-14 Fax. 0-2579-8919 E-mail: th_2522@hotmail.com

Three sets of organs from five chickens and five pigs were collected as samples for tissue slide preparation by pathological method. First set was processed by standard pathological technique as tissue slide controls. The step of dehydration until infiltration were processed by tissue processor, paraffin embedding step for making tissue paraffin block by tissue embedding, sectioning by rotary microtome, drying tissue slide by an oven and staining by hematoxylin and eosin (H&E) stain. Second set, the samples were treated the same steps as the first set but hand processing replacing the tissue processor. Moreover, hot plates and a cold plate or an ice pack were used in place of the tissue embedding. Third set, the samples were managed as the second set but using a stainless box placing on hot plate in stead of the oven for drying tissue slides. All three sets were repeat 3 times. The results of all the tissue slides show no difference of tissue paraffin block quality. For microscopic examination, all the tissue slides were normal in term of cell morphology, stained nucleous and cytoplasm, cell clearness, and thickness of tissue. This experiment demonstrates that the tissue slide preparation without using major laboratory equipments but using laboratory conventional equipments can be used to make tissue slides in case of those equipments occasionally malfunction or laking them.

Keywords: tissue slide preparation, tissue processor, tissue embedding