โครงการ R2R

งานอิมมูโนฮิสโตเคมี กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ

ชื่อเรื่อง ไข่ขาวลดการหลุดลอกในการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

ผู้ดำเนินการและคณะ

1. นางสาวประภาพรรณ เสณีตันติกุล ผู้จัดทำโครงการ
2. นางเสริมทรัพย์ วรรธกะวิกรานต์ ผู้ร่วมโครงการ/หัวหน้างาน
3. นายโกศล อินทรสูต ผู้ร่วมโครงการ/ที่ปรึกษาโครงการ
4. นางสาวสุวรรณดี ปานรักษา ผู้ร่วมโครงการ
5. นางสาวจุฑามาศ สังวร ผู้ร่วมโครงการ
6. นายวุฒิพงษ์ จินะคำ ผู้ร่วมโครงการ
7. นางสาวกุลชา วังทะพันธุ์ ผู้ร่วมโครงการ

วัตถุประสงค์

เปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว)

สมมติฐาน

การย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) สามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว)

หลักการและเหตุผล หรือแนวคิดในการพัฒนาคุณภาพงาน

<u>ความเป็นมา</u>

การย้อมพิเศษด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) เป็นการศึกษาคุณลักษณะของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยอาศัยคุณสมบัติทางระบบอิมมูนร่วมกับคุณสมบัติทางเคมี คือ การจับตัวระหว่างแอนติบอดี้ (Antibody) กับแอนติเจน (Antigen) ที่ต้องการศึกษาและทำให้เกิดสีตรงตำแหน่งที่ทำปฏิกิริยา ในระหว่างการย้อมมีขั้นตอนการคืนสภาพแอนติเจน (Antigen Retrieval Technique) โดยใช้ความร้อนสูง เครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัติจะทำการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนนี้ส่งผลให้เนื้อเยื่อบนสไลด์แก้ว เกิดการหลุดลอกหลังจากย้อมเสร็จ จากการวิเคราะห์ปัญหาอาจจะเกิดมาจาก 2 สาเหตุคือ ชนิดของเนื้อ ซึ่งเกิดจากกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue Processing) และชนิดของสไลด์แก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการยึดตรึงเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสไลด์แก้วประจุบวกทั้งหมด 4 ยี่ห้อ พบว่าสไลด์แก้วประจุบวกที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพมากที่สุดคือยี่ห้อ Thermo รุ่น Shandon Limited[7] ต่อมาได้ถูกนำไปปรับใช้ในห้องปฏิบัติการอิมมูโนฮิสโตเคมี สถาบันพยาธิวิทยา แต่ยังคงพบปัญหาการหลุดลอกของเนื้อเยื่ออยู่

Tissue adhesion เป็นการช่วยทำให้เนื้อเยื่อยึดติดกับสไลด์ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น โดยการเคลือบสไลด์ (Slide coat) ด้วย poly-L-lysine หรือ aminopropyltriethoxysilane สารพวกนี้จะไม่มีผลรบกวนกับปฏิกิริยาต่างๆในการย้อม รวมทั้งการใช้สไลด์เคลือบสารเคมีสำเร็จรูปและการใช้สไลด์พิเศษเช่น Positive charged microscope slide หรือ Hydrophilic plus microscope slide[1-4] นอกจากนี้ยังมีสาเหตุจากปัจจัยอื่นอีกที่ทำให้เนื้อเยื่อหลุดในระหว่างการย้อม ได้แก่ ชนิดของเนื้อเยื่อที่ไม่ค่อยยึดติดสไลด์ เช่น Breast, Cervix, Intestine, Gall-bladder, Urinary bladder เป็นต้น[5] ชิ้นเนื้อที่ผ่านการ fixative และกระบวน process ที่ไม่ดียังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการหลุดของเนื้อเยื่อในระหว่างการย้อมได้อีก การย้อม IHC ในงานประจำยังพบการหลุดของเนื้อเยื่อระหว่างการย้อมอยู่เสมอ และได้มีความพยายามในการแก้ไขปัญหาด้วยวิธีต่าง ๆ ทั้งเลือกใช้สไลด์ที่มีคุณภาพ และประสิทธิภาพมากขึ้น

จากปัญหาดังกล่าวผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับไข่ขาวเพื่อนำมาเป็นตัวที่ช่วยในการป้องกันและลดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วประจุบวกที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ในแง่ปริมาณการหลุดของเนื้อเยื่อบนสไลด์ ได้ศึกษาการพัฒนาลดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย Egg Albumin จากการเก็บบันทึกข้อมูล ในปี 2561 พบสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 1,644 สไลด์ จาก 79,213 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 2 ส่วนปี 2562 ที่ใช้สไลด์ประจุบวกเคลือบ egg albumin พบว่ามีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเพียง 310 สไลด์ จาก 97,665 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 0.3 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) [9] แต่คณะผู้วิจัยให้ความเห็นว่าข้อมูลยังไม่เพียงพอ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย ต่อมาจึงได้พัฒนางานวิจัยอีกครั้งเพื่อศึกษาเรื่องไข่ขาวลดการหลุดลอกในการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ในแง่การหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ เพื่อเปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) ทำให้ทราบประสิทธิภาพของไข่ขาว และการแก้ปัญหาป้องกันการหลุดซ้ำของเนื้อเยื่อที่หลุดระหว่างการย้อมในงานประจำของหน่วยงาน ทำให้เกิดการย้อมซ้ำน้อยลง หรือไม่มีการหลุดของเนื้อเยื่อ ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการย้อมซ้ำ และทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องรอผลการย้อมนานขึ้น นอกจากนี้ยังมีการเผยแพร่ให้กับหน่วยงานอื่น ๆ ที่ประสบปัญหาดังกล่าวด้วยเช่นกัน

วัตถุและวิธีการ

เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ศึกษาเปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) จากบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อผู้ป่วยซึ่งส่งตรวจที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2548 ชนิดของชิ้นเนื้อได้แก่ เต้านม มดลูก กระดูก อย่างละ 10 ราย และบล็อกเนื้อเยื่อตัวอย่างที่หน่วยงานภายนอกส่งตรวจที่สถาบันอีก 100 ราย รวมบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อทั้งหมด 130 ราย

ขั้นตอนการศึกษา

1. คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างจากบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อผู้ป่วยซึ่งส่งตรวจที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ปีพ.ศ. 2548 ชนิดของชิ้นเนื้อ ได้แก่ เต้านม มดลูก กระดูก อย่างละ 10 ราย และบล็อกเนื้อเยื่อตัวอย่างที่หน่วยงานภายนอกส่งตรวจที่สถาบันอีก 100 ราย รวมบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อทั้งหมด 130 ราย
2. ในขั้นตอนการเตรียมสไลด์ก่อนนำบล็อกไปตัด บล็อก 1 ราย เตรียมสไลด์ 2 แผ่น 1 แผ่น ไม่เคลือบไข่ขาว อีก 1 แผ่นเคลือบไข่ขาว
3. นำบล็อกชิ้นเนื้อตัวอย่างมาตัดให้บาง ความหนา 3 ไมครอน ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้ออัตโนมัติ นำชิ้นเนื้อวางบนสไลด์ที่เตรียมไว้
4. ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยผ่านกระบวนการ Antigen retrieval ด้วยเครื่องย้อมอัตโนมัติ Leica Bond-max ย้อมเป็น Negative Stain โดยใช้ buffer แทน Antibody
5. ตรวจสอบคุณภาพสไลด์ย้อมชิ้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ พร้อมวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Paired-Samples T-Test เปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว)

ขั้นตอนการเตรียมไข่ขาว

1. ใช้ไข่ไก่ 2 ฟอง ทำการแยกไข่ขาวออกจากไข่แดง ใส่ลงในบีกเกอร์ที่ 1
2. นำ Glycerin เทใส่บีกเกอร์ที่ 2 ปริมาณเท่ากับไข่ขาว (ประมาณ 125 มิลลิลิตร)
3. ใส่ Thymol 2-3 เกร็ดลงไปรวมกับ Glycerin ในบีกเกอร์ที่ 2 จากนั้นนำเข้า Hot air oven ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารทั้ง 2 ชนิดละลายเข้าด้วยกัน
4. นำสารละลาย Glycerin กับ Thymol ที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง
5. นำไข่ขาวและสารละลาย Glycerin เทกรองรวมกันด้วยผ้าก็อซประมาณ 3 รอบ
6. เทไข่ขาวที่ได้ใส่ขวดสีชา เขียนระบุวันที่เตรียม ชื่อผู้เตรียมไว้ที่ข้างขวด จากนั้นเก็บไว้ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการใช้งานไข่ขาว

ใช้หลอดหยดสารพลาสติก (Dropper) ดูดไข่ขาวหยดลงบนสไลด์แก้วประจุบวก 1 หยดและทาเคลือบให้ทั่วแผ่นสไลด์ประจุบวก

ผลการดำเนินงาน

ผู้วิจัยได้ศึกษาบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อผู้ป่วยในปี พ.ศ.2548 ชนิดของชิ้นเนื้อได้แก่ เต้านม มดลูก กระดูก อย่างละ 10 ราย และบล็อกเนื้อเยื่อตัวอย่างที่หน่วยงานภายนอกส่งตรวจที่สถาบันอีก 100 ราย รวมบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อทั้งหมด 130 ราย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Paired-Samples T-Test เปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ผลการตรวจย้อม เปรียบเทียบผลการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) จำนวนชิ้นเนื้อ 130 ราย 260 สไลด์ โดยเป็นการให้คะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลคะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว)

จำนวนราย	ตัวอย่าง	คะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวก	
		วิธีเดิม(ไม่เคลือบไข่ขาว)	วิธีใหม่(เคลือบไข่ขาว)
1	เต้านม1	4	0
2	เต้านม2	2	0
3	เต้านม3	1	0
4	เต้านม4	4	0
5	เต้านม5	1	0
6	เต้านม6	1	0
7	เต้านม7	1	0
8	เต้านม8	4	1
9	เต้านม9	0	0
10	เต้านม10	1	0
11	มดลูก1	1	0
12	มดลูก2	1	0
13	มดลูก3	2	0
14	มดลูก4	3	0
15	มดลูก5	4	0
16	มดลูก6	2	0
17	มดลูก7	4	0

18	มดลูก8	3	0
19	มดลูก9	1	0
20	มดลูก10	4	1
21	กระดูก1	3	1
22	กระดูก2	0	0
23	กระดูก3	0	0
24	กระดูก4	3	0
25	กระดูก5	3	1
26	กระดูก6	3	1
27	กระดูก7	1	0
28	กระดูก8	4	3
29	กระดูก9	4	0
30	กระดูก10	1	0
31	เนื้อเยื่อตัวอย่าง1	0	0
32	เนื้อเยื่อตัวอย่าง2	0	0
33	เนื้อเยื่อตัวอย่าง3	0	0
34	เนื้อเยื่อตัวอย่าง4	4	0
35	เนื้อเยื่อตัวอย่าง5	0	0
36	เนื้อเยื่อตัวอย่าง6	0	0
37	เนื้อเยื่อตัวอย่าง7	1	0
38	เนื้อเยื่อตัวอย่าง8	2	0
39	เนื้อเยื่อตัวอย่าง9	0	0
40	เนื้อเยื่อตัวอย่าง10	1	0
41	เนื้อเยื่อตัวอย่าง11	0	0
42	เนื้อเยื่อตัวอย่าง12	4	0
43	เนื้อเยื่อตัวอย่าง13	0	0
44	เนื้อเยื่อตัวอย่าง14	4	0
45	เนื้อเยื่อตัวอย่าง15	0	0
46	เนื้อเยื่อตัวอย่าง16	0	0

47	เนื้อเยื่อตัวอย่าง17	4	0
48	เนื้อเยื่อตัวอย่าง18	1	0
49	เนื้อเยื่อตัวอย่าง19	1	0
50	เนื้อเยื่อตัวอย่าง20	1	0
51	เนื้อเยื่อตัวอย่าง21	1	0
52	เนื้อเยื่อตัวอย่าง22	1	0
53	เนื้อเยื่อตัวอย่าง23	0	0
54	เนื้อเยื่อตัวอย่าง24	1	0
55	เนื้อเยื่อตัวอย่าง25	0	0
56	เนื้อเยื่อตัวอย่าง26	0	0
57	เนื้อเยื่อตัวอย่าง27	0	0
58	เนื้อเยื่อตัวอย่าง28	2	0
59	เนื้อเยื่อตัวอย่าง29	1	0
60	เนื้อเยื่อตัวอย่าง30	1	0
61	เนื้อเยื่อตัวอย่าง31	0	0
62	เนื้อเยื่อตัวอย่าง32	0	0
63	เนื้อเยื่อตัวอย่าง33	0	0
64	เนื้อเยื่อตัวอย่าง34	0	0
65	เนื้อเยื่อตัวอย่าง35	0	0
66	เนื้อเยื่อตัวอย่าง36	0	0
67	เนื้อเยื่อตัวอย่าง37	2	0
68	เนื้อเยื่อตัวอย่าง38	3	0
69	เนื้อเยื่อตัวอย่าง39	1	0
70	เนื้อเยื่อตัวอย่าง40	3	0
71	เนื้อเยื่อตัวอย่าง41	2	0
72	เนื้อเยื่อตัวอย่าง42	1	0
73	เนื้อเยื่อตัวอย่าง43	0	0
74	เนื้อเยื่อตัวอย่าง44	0	0
75	เนื้อเยื่อตัวอย่าง45	1	0

76	เนื้อเยื่อตัวอย่าง46	1	0
77	เนื้อเยื่อตัวอย่าง47	2	0
78	เนื้อเยื่อตัวอย่าง48	0	0
79	เนื้อเยื่อตัวอย่าง49	0	0
80	เนื้อเยื่อตัวอย่าง50	4	0
81	เนื้อเยื่อตัวอย่าง51	1	0
82	เนื้อเยื่อตัวอย่าง52	1	0
83	เนื้อเยื่อตัวอย่าง53	0	0
84	เนื้อเยื่อตัวอย่าง54	2	0
85	เนื้อเยื่อตัวอย่าง55	1	0
86	เนื้อเยื่อตัวอย่าง56	0	0
87	เนื้อเยื่อตัวอย่าง57	1	0
88	เนื้อเยื่อตัวอย่าง58	0	0
89	เนื้อเยื่อตัวอย่าง59	0	0
90	เนื้อเยื่อตัวอย่าง60	0	0
91	เนื้อเยื่อตัวอย่าง61	4	1
92	เนื้อเยื่อตัวอย่าง62	4	2
93	เนื้อเยื่อตัวอย่าง63	4	0
94	เนื้อเยื่อตัวอย่าง64	1	0
95	เนื้อเยื่อตัวอย่าง65	3	0
96	เนื้อเยื่อตัวอย่าง66	4	1
97	เนื้อเยื่อตัวอย่าง67	1	0
98	เนื้อเยื่อตัวอย่าง68	4	2
99	เนื้อเยื่อตัวอย่าง69	0	0
100	เนื้อเยื่อตัวอย่าง70	0	0
101	เนื้อเยื่อตัวอย่าง71	0	0
102	เนื้อเยื่อตัวอย่าง72	4	0
103	เนื้อเยื่อตัวอย่าง73	1	0
104	เนื้อเยื่อตัวอย่าง74	1	0

105	เนื้อเยื่อตัวอย่าง75	1	0
106	เนื้อเยื่อตัวอย่าง76	2	0
107	เนื้อเยื่อตัวอย่าง77	2	0
108	เนื้อเยื่อตัวอย่าง78	1	0
109	เนื้อเยื่อตัวอย่าง79	0	0
110	เนื้อเยื่อตัวอย่าง80	0	0
111	เนื้อเยื่อตัวอย่าง81	1	0
112	เนื้อเยื่อตัวอย่าง82	0	0
113	เนื้อเยื่อตัวอย่าง83	0	0
114	เนื้อเยื่อตัวอย่าง84	1	0
115	เนื้อเยื่อตัวอย่าง85	2	0
116	เนื้อเยื่อตัวอย่าง86	2	0
117	เนื้อเยื่อตัวอย่าง87	2	0
118	เนื้อเยื่อตัวอย่าง88	2	0
119	เนื้อเยื่อตัวอย่าง89	3	0
120	เนื้อเยื่อตัวอย่าง90	0	0
121	เนื้อเยื่อตัวอย่าง91	0	0
122	เนื้อเยื่อตัวอย่าง92	1	0
123	เนื้อเยื่อตัวอย่าง93	0	0
124	เนื้อเยื่อตัวอย่าง94	3	0
125	เนื้อเยื่อตัวอย่าง95	0	0
126	เนื้อเยื่อตัวอย่าง96	4	3
127	เนื้อเยื่อตัวอย่าง97	1	0
128	เนื้อเยื่อตัวอย่าง98	0	0
129	เนื้อเยื่อตัวอย่าง99	0	0
130	เนื้อเยื่อตัวอย่าง100	4	0
รวม	**130 ตัวอย่าง**	**185**	**17**

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อในระดับคะแนนต่างๆ ในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว)

คะแนน	**การหลุดลอก (%)**	**จำนวนสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อในระดับคะแนนต่างๆ**			
		วิธีเดิม(ไม่เคลือบไข่ขาว)		**วิธีใหม่(เคลือบไข่ขาว)**	
0	0-10%	คะแนนการหลุดลอกเท่ากับ 185	45 สไลด์	คะแนนการหลุดลอกเท่ากับ 17	119 สไลด์
1	10-20%		38 สไลด์		7 สไลด์
2	20-30%		15 สไลด์		2 สไลด์
3	30-40%		11 สไลด์		2 สไลด์
4	>40%		21 สไลด์		0 สไลด์

คะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ :

0 = สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 0-10% หรือไม่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์

1 = สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 10-20%

2 = สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 20-30%

3 = สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 30-40%

4 = สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อมากกว่า 40% หรือไม่มีเนื้อเยื่อเหลืออยู่บนสไลด์

จากตารางที่ 1 และ 2 ผลการเปรียบเทียบคะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) กับการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) จำนวนชิ้นเนื้อ 130 ราย 260 สไลด์

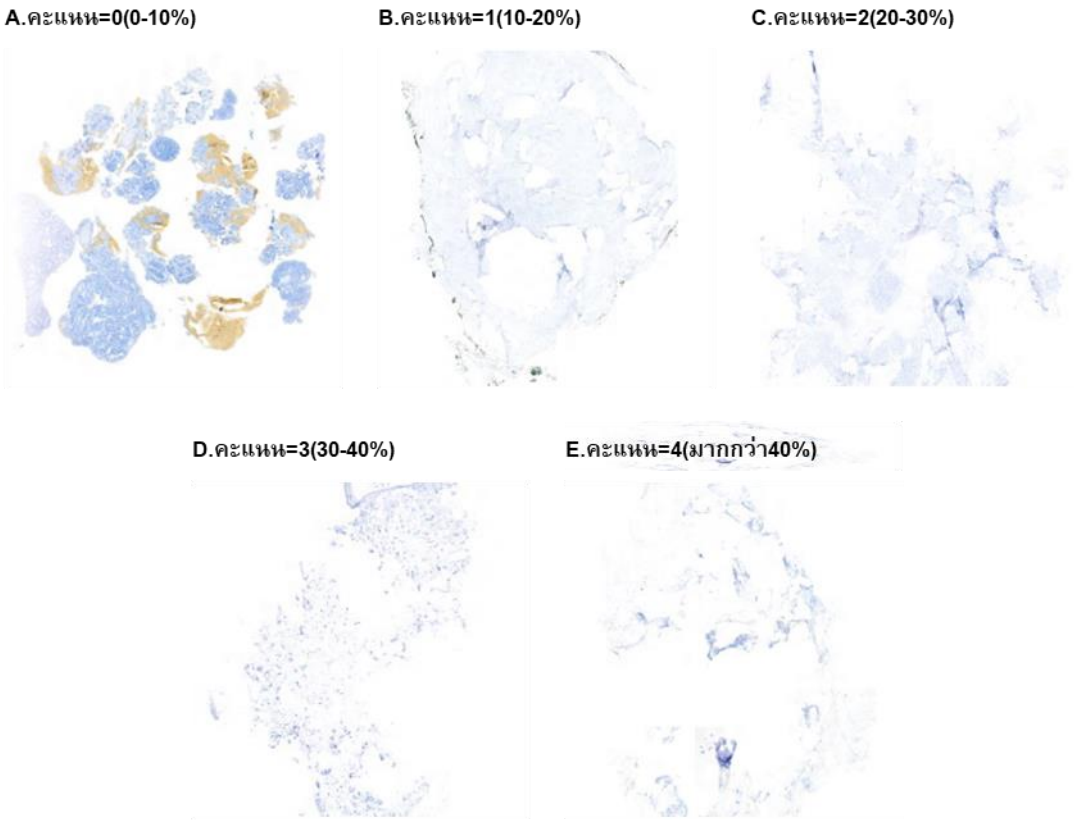
สไลด์ประจุบวกที่ไม่เคลือบไข่ขาว มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อมากกว่า 40% หรือไม่มีเนื้อเยื่อเหลืออยู่บนสไลด์ (คะแนน=4) พบว่ามี 21 สไลด์ การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 30-40% (คะแนน=3) มี 11 สไลด์ การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 20-30% (คะแนน=2) มี 15 สไลด์ การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 10-20% (คะแนน=1) มี 38 สไลด์ และการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 0-10% หรือไม่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ (คะแนน=0) มี 45 สไลด์ ผลรวมคะแนนการหลุดลอกเท่ากับ 185

สไลด์ประจุบวกที่เคลือบไข่ขาว ไม่มีสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อมากกว่า 40% การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 30-40% (คะแนน=3) มี 2 สไลด์ การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 20-30% (คะแนน=2) มี 2 สไลด์ การหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 10-20% (คะแนน=1) มี 7 สไลด์ และการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 0-10% หรือไม่มีการหลุดของเนื้อเยื่อบนสไลด์ (คะแนน=0) มี 119 สไลด์ ผลรวมคะแนนการหลุดลอกเท่ากับ 17

ทดสอบสมมติฐานการทดลองด้วยสถิติ Paired-Samples T-Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้ผลการทดลองสรุปได้ว่า การย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) สามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้ดีกว่าการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) (p-value = 0.00) อย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดลองพบว่า ในการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) มีคะแนนรวมการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเท่ากับ 185 คะแนน มากกว่าการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) ที่มีคะแนนรวมการหลุดลอกเท่ากับ 17 คะแนน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของชิ้นเนื้อตัวอย่าง เต้านม มดลูก และกระดูก การย้อมสไลด์อิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) มีคะแนนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเท่ากับ 19, 25 และ 22 คะแนน มากกว่าการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) ที่มีคะแนนการหลุดลอกเท่ากับ 1, 1 และ 6 คะแนน ตามลำดับ เมื่อทดสอบสมมติฐานการทดลองด้วยสถิติ Paired-Samples T-Test แบ่งตามชนิดของชิ้นเนื้อ ยังคงให้ผลการทดลองเหมือนเดิม คือการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) สามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้ดีกว่ากว่าวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) ตามสมมติฐาน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างการให้คะแนนของสไลด์ โดยพิจารณาจากการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกหลังการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีกับชิ้นเนื้อในพาราฟินบล็อก **A.** สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 0-10% (คะแนน=0) **B.** สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 10-20% (คะแนน=1) **C.** สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 20-30% (คะแนน=2) **D.** สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 30-40% (คะแนน=3) **E.** สไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อมากกว่า 40% (คะแนน=4)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ในปัจจุบันได้มีการนำการตรวจด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีมาใช้ในการวินิจฉัยโรคอย่างแพร่หลาย ช่วยพยาธิแพทย์ในการบ่งชี้เนื้อเยื่อที่ไม่สามารถวินิจฉัยได้แน่นอน เช่น ในโรคติดเชื้อ และมะเร็งหลายชนิด การย้อมด้วยเทคนิคนี้ต้องผ่านขั้นตอนการย้อมหลายขั้นตอนโดยเฉพาะกระบวนการฟื้นคืนสภาพแอนติเจน (Antigen Retrieval) ซึ่งต้องใช้ความร้อนสูงมีผลทำให้เนื้อเยื่ออาจหลุดออกจากสไลด์ในระหว่างการย้อมได้

ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาการยึดตรึงเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้วประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสไลด์แก้วประจุบวกทั้งหมด 4 ยี่ห้อ พบว่าสไลด์แก้วประจุบวกที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพมากที่สุดคือยี่ห้อ Thermo รุ่น Shandon Limited[7] ต่อมาได้ถูกนำไปปรับใช้ในห้องปฏิบัติการอิมมูโนฮิสโตเคมี สถาบันพยาธิวิทยา แต่ยังคงพบปัญหาการหลุดลอกของเนื้อเยื่ออยู่

อีกผลงานวิจัยเรื่องการพัฒนาลดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย Egg Albumin เก็บบันทึกข้อมูล ในปี 2561 พบสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 1,644 สไลด์ จาก 79,213 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 2 ส่วนปี 2562 ที่ใช้สไลด์ประจุบวกเคลือบ egg albumin พบว่ามีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเพียง 310 สไลด์ จาก 97,665 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 0.3 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) [9] แต่คณะผู้วิจัยให้ความเห็นว่าข้อมูลยังไม่เพียงพอ จึงได้พัฒนางานวิจัยอีกครั้ง

จากนั้นจึงได้ศึกษาเรื่องไข่ขาวลดการหลุดลอกในการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา เปรียบเทียบความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ระหว่างสไลด์ประจุบวกที่ไม่เคลือบ และเคลือบไข่ขาว ศึกษาบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อผู้ป่วยในปี พ.ศ.2548 ชนิดของชิ้นเนื้อได้แก่ เต้านม มดลูก กระดูก อย่างละ 10 ราย และบล็อกเนื้อเยื่อตัวอย่างที่หน่วยงานภายนอกส่งตรวจที่สถาบันอีก 100 ราย รวมบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อทั้งหมด 130 ราย ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Paired-Samples T-Test

จากผลการศึกษาไข่ขาวลดการหลุดลอกในการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยศึกษาจากตัวอย่างบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อทั้งหมด 130 ราย 260 สไลด์ ผลการย้อมพบว่าในการย้อมสไลด์อิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) มีคะแนนรวมการหลุดลอกของเนื้อเยื่อเท่ากับ 185 คะแนน มากกว่าการย้อมวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) ที่มีคะแนนรวมการหลุดลอกเท่ากับ 17 คะแนน สรุปว่าการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) สามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้ดีกว่ากว่าวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) ตามสมมติฐาน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อทดสอบสมมติฐานการทดลองด้วยสถิติ Paired-Samples T-Test แบ่งตามชนิดของชิ้นเนื้อ เต้านม มดลูก และกระดูก ยังคงให้ผลการทดลองเหมือนเดิม คือการย้อมสไลด์ประจุบวกด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีวิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) สามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้ดีกว่ากว่าวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) ตามสมมติฐาน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ในการอ่านผลของพยาธิแพทย์นั้น หากเนื้อเยื่อมีการหลุดลอกประมาณ 30% ขึ้นไป ระดับคะแนนการหลุดลอก 3-4 คะแนน อาจต้องย้อมใหม่อีกครั้ง หากเนื้อเยื่อมีการหลุดลอกประมาณ 1-30% พยาธิแพทย์ยังพอที่จะสามารถอ่านผลได้ ไม่จำเป็นต้องย้อมใหม่ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของเนื้อเยื่อ หากเป็นเนื้อเล็กมากๆ อาจต้องย้อมใหม่

จากตารางที่ 2 ในระดับคะแนนการหลุดลอก 1-4 การย้อมสไลด์วิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) มีจำนวนสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อลดลงจากการย้อมวิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) แต่ที่ระดับคะแนนการหลุดลอก 0 การย้อมสไลด์วิธีใหม่ (เคลือบไข่ขาว) มีจำนวนสไลด์ที่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อ 0-10% หรือไม่มีการหลุดลอกของเนื้อเยื่อบนสไลด์ เพิ่มขึ้นจากการย้อมสไลด์วิธีเดิม (ไม่เคลือบไข่ขาว) จาก 45 สไลด์ เป็น 119 สไลด์ แสดงว่าการใช้ไข่ขาวสามารถลดสัดส่วนการหลุดลอกของเนื้อเยื่อได้

บล็อกเนื้อเยื่อตัวอย่างที่หน่วยงานภายนอกส่งตรวจที่สถาบันอีก 100 ราย มีความหลากหลายของชนิดชิ้นเนื้อ จึงไม่สามารถระบุได้ว่าเนื้อเยื่อที่มีการหลุดลอกเป็นเนื้อเยื่อชนิดใด

จากการศึกษาการเตรียมไข่ขาว 1 ครั้ง เวลา 1 ชั่วโมง ใช้ไข่ขาว 2 ฟอง ได้ปริมาตร 250 ml ใช้ได้ประมาณ 2 เดือน ต่ อ 20,000 สไลด์

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ไข่ขาวสามารถลดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อที่อยู่บนสไลด์ประจุบวกในระหว่างการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี เนื่องจากการผ่านกระบวนการ Antigen retrieval ทำให้ลดการทำสไลด์ใหม่ รวมถึงช่วยลดงบประมาณประจำปี ลดค่าใช้จ่ายในการทำสไลด์ใหม่ได้ถึง 151,140 บาทต่อปี และยังช่วยลดเวลาในการทำสไลด์ใหม่ได้ถึง 4,128 ชั่วโมงต่อปี แต่ระมัดระวังปริมาณการหยดของไข่ขาวไม่ให้มากเกินไป เพราะอาจจะทำให้สไลด์เกิดคราบได้หลังการย้อมเสร็จ

การเคลือบไข่ขาวบนสไลด์ประจุบวก ทำให้ชิ้นเนื้อติดกับ สไลด์ได้ดีขึ้น แต่ก็ยังพบการหลุดลอกของเนื้อเยื่ออยู่อีกจำนวนหนึ่ง โดยอาจจะเป็นผลจากปัจจัยอื่นๆ ได้แก่การเตรียมชิ้นเนื้อที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือชนิดของชิ้นเนื้อบางชนิดที่หลุดลอกง่าย จึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ด้วย

การวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางสำหรับหน่วยงานต่างๆ ที่ย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยผ่านกระบวนการ Antigen retrieval ที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้เนื้อเยื่อหลุดระหว่างการย้อมนำมาใช้ในการย้อมเพื่อแก้ปัญหาและป้องกันการหลุดของเนื้อเยื่อที่ย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีในงานประจำของหน่วยงานได้อย่างเหมาะสม ทำให้ลดจำนวนการย้อมซ้ำ หรือไม่มีการหลุดของเนื้อเยื่อ เพื่อเป็นการพัฒนาการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีให้มีคุณภาพมากดีขึ้นอย่างต่อเนื่องนอกจากนี้แล้วยังทำให้ผู้รับบริการ โรงพยาบาล หรือหน่วยงานต่างๆ ไม่ต้องรอสไลด์ย้อมนาน ผู้ป่วยได้รับการรักษาตามแผนการรักษาตามเวลา

เอกสารอ้างอิง

1. จารุพรรณ ปิ่นทอง. เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical technique) คู่มือการปฏิบัติงาน กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์; 2550.
2. Alfonso Heras and Andre Sanchez. Surface modified slides let IHC laboratories do more with less. September 2013.
3. Adhesive/Positively Charged Slides. แหล่งที่มา : http://www.leicabiosystems.com/specimen-preparation/consumables/slides/adhesivepositively-charged-slides.December 2014.
4. Microscope Slides. แหล่งที่มา : http://www.biosb.com/microscope-slides. December 2014.
5. Christina Thurby, M. Randy White, Frank Simutis, Susan Gillham, and David Slinker. An improved method of tissue adhesion on glass microslides for immunohistochemical evaluation by the use of selected tissues from the dog and monkey. The Journal of Histotechnology/Vol.32, No.4/December 2009: 198-201.
6. Strategies for preventing detachment of sections from glass slides. แหล่งที่มา : http://www.ihcworld.com/_technical_tips/prevent_section_fall.htm.February 2015.
7. สุวรรณดี ปานรักษา. การศึกษาการยึดตรึงเนื้อเยื่อบนสไลด์ประจุบวกในการย้อมอิมมูโนฮีสโตเคมี (Study of Tissue Adhesion on Positive Charged Microscopeslides for Immunohistochemistry Staining) รายงานการวิจัย กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์; 2558.
8. ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย, สมาคมเซลล์วิทยาแห่งประเทศไทย. แนวทางการปฏิบัติสำหรับงานเซลล์วิทยา (Practical Guideline for Cytology) พ.ศ.2550. พิมพ์ครั้งที่ 1; 2550.
9. ประภาพรรณ เสณีตันติกุล, จุฑามาศ สังวร. การพัฒนาลดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย (Egg Albumin Egg albumin reduce peeling in the slide positive charge staining with Immunohistochemical techniques) รายงานการวิจัย กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์; 2563