ผลงานที่ใช้ในการประเมิน

เรื่อง

การเปรียบเทียบคุณภาพชุดสีย้อมสำเร็จรูปสำหรับการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยวิธีพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin)

(The comparison of the quality of hematoxylin and eosin staining kit for routine tissue staining.)

โดย

นางสาวลิขิต ปักเหนือ
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
ตำแหน่งเลขที่ ๘๗๑๗

กลุ่มงานจุลพยาธิ ภารกิจด้านวิชาการและการแพทย์
สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์

บทคัดย่อ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ส่งมาตรวจด้านพยาธิวิทยา จะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Tissue processing) แล้วนำไปตัดด้วยเครื่อง Microtome ให้ชิ้นเนื้อมีความบาง 3-5 ไมครอน และนำไปย้อมสี Hematoxylin and Eosin เพื่อให้มองเห็นรายละอียดของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ช่วยให้พยาธิแพทย์สามารถจำแนกชนิดของเซลล์ และองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ได้ รวมทั้งความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเซลล์แต่ละชนิด ดังนั้นการเลือกใช้สีย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อที่มีคุณภาพจึงมีความสำคัญในงานด้านพยาธิวิทยา

การทดลองนี้เป็นการทดลองคุณภาพของสีย้อมสำเร็จรูปจำนวน 4 ชุด ได้แก่ มีชุดสีสำเร็จรูป Dako, Bio-Optica,Thermo, CV science ต่อการติดสีของสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ มดลูก เต้านม ลำไส้ ไทรอยด์ ไส้ติ่ง จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง โดยย้อมสีด้วยเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิล์มอัตโนมัติ จากนั้นนำไปตรวจดูการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการประเมินการติดสี Hematoxylin และสี Eosin กำหนดค่าคะแนนแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ จางที่สุด (คะแนน=1), จาง (คะแนน=2), ปานกลาง (คะแนน=3), เข้ม (คะแนน=4), เข้มมาก (คะแนน=5) และประเมินคุณภาพการตัดกันทั้ง 2 สี (Contrasting) กำหนดค่าคะแนนซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ควรปรับปรุง (คะแนน=1), พอใช้ (คะแนน=2), ปานกลาง(คะแนน=3), ดี (คะแนน=4), ดีที่สุด (คะแนน=5) และใช้ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako เป็นชุดสีสำเร็จรูปที่ใช้งานปัจจุบันเป็นชุดสีย้อมเปรียบเทียบกับชุดสีสำเร็จรูปชนิดอื่นที่นำมาทดลอง

ผลการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako เป็นชุดสีเปรียบเทียบ ติดสี Hematoxylin ,Eosin และ Contrast ที่ระดับดีที่สุด (คะแนน=5) จำนวน 43 สไลด์ ,ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Bio-Optica จำนวน 30 สไลด์,ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Thermo จำนวน 29 สไลด์,ชุดสีสำเร็จรูป CV science จำนวน 46 สไลด์ นำผลการย้อมเปรียบเทียบกับชุดสีสำเร็จรูป Dako โดยใช้สถิติ Pair Simple T-Test พบว่าคุณภาพการติดสีของสีย้อมสำเร็จรูป CV science มีคุณภาพการติดสีย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างได้ดี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.083) สามารถใช้ในงานย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างในงานประจำได้ไม่แตกต่างจากชุดสีสำเร็จรูป Dako

คำสำคัญ : Hematoxylin and Eosin, Contrast

Abstract

The specimen which be sent to pathological diagnosis must be processed under tissue processing, and then be sectioned by the microtome for 3–5 microns thick. After that the specimen is stained by Hematoxylin and Eosin method in order to view the cellular details under the light microscope and enable the pathologists to classify the type of the cells, cellular components and cellular abnormalities. Therefore, the selection of the dyes which be used in Hematoxylin and Eosin method is very important in specimen quality for pathological laboratory.

This experimental objective is finding the qualify dye that will be used in Hematoxylin and Eosin method. The dye which be selected in the experiment is ready to use and include four brands; Dako, Bio-Optica, Thermo and CV science. The selected specimens compose of tissues from uterus, breast, intestine, thyroid and appendix. Each organ consists of 10 samples and total number are 50 samples. The tissues are stained with the automatic slide stainer and automatic cover slipper. The tissues will be observed and evaluated the quality of staining under the microscope. The evaluation of staining quality is done by evaluation of adherence and contrast of the hematoxylin and eosin dyes. The adherence will be graded in 5 score; more paleness (score = 1), pale (score = 2), moderate (score = 3), dark (score = 4) and more darkness (score = 5). The contrast will be also graded in 5 scores; the lowest contrast (score = 1), low contrast (score = 2), moderate contrast (score = 3), high contrast (score = 4) and the highest contrast (score = 5). The Dako dye set which routinely use in our laboratory is used as the standard staining dye and the others three will be compared with it.

The results of the study when compare the others 3 brands with the Dako staining set review that the Dako staining slides compose of 43 slides with the highest contrast between hematoxylin and eosin (score = 5). The Bio-Optica staining slides compose of 30 slides which show contrast score =5, the Thermo staining slides compose of 29 slides and the CV science staining slides compose of 46 slides, respectively. So, when comparing the staining result with the Dako dye set by using the pair simple t-test, it was found that the adherence of the CV science dye set was high and not significantly different (0.083). It could be used for staining the slides similarly to the Dako dye set.

Keywords: Hematoxylin and Eosin, Contrast

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์	2
บทที่ 2 แนวความคิดและผลงานที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	
กลุ่มตัวอย่าง	5
ระยะเวลาการดำเนินการ	5
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	5
วิธีดำเนินการวิจัย	5
การเก็บรวบรวมข้อมูล	7
การวิเคราะห์ข้อมูล	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	8
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเพื่อการวินิจฉัยโรคของพยาธิแพทย์ โดยทั่วไปชิ้นเนื้อของผู้ป่วยจะต้องผ่านกระบวนการรักษาสภาพของเซลล์ ให้อยู่ในสภาพเสมือนปกติภายในร่างกาย (Fixation) จากนั้นต้องดำเนินการตรวจตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยตาเปล่า (Gross examination) แล้วนำไปเข้ากระบวนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (Processing) เพื่อให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อมีความเหมาะสมที่จะสามารถนำไปตัดให้เป็นแผ่นบางๆที่มีความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน แล้วจึงนำไปย้อมด้วยสีย้อมเคมีที่เป็นพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin) ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา โดยสี Hematoxylin จะย้อมนิวเคลียส (Nucleus) ให้ติดสีน้ำเงิน ส่วนสี Eosin จะย้อมซัยโตพลาสซึม (Cytoplasm) ให้ติดสีแดง การย้อมสีของสไลด์ชิ้นนื้อตัวอย่างที่มีคุณภาพ จะทำให้พยาธิแพทย์สามารถมองเห็นรอยโรคได้ชัดเจน วินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง

การเตรียมสีย้อม Hematoxylin and Eosin เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา[15] มีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกัน แต่จะมีส่วนผสมของสารเคมีเหมือนกัน ซึ่งได้แก่ Hematoxylin, Potassium or Aluminum ammonium sulphate, Citric acid, Chloral hydrate, Sodium iodine ขั้นตอนการเตรียมสีให้มีคุณภาพต้องอาศัยการสังเกตุปฏิกิริยาของสารเคมีขณะใช้ความร้อน สีย้อมที่ได้จากการเตรียมดังกล่าวจะมีคุณภาพในการติดสีไม่เท่ากัน โดยต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำหน้าที่เตรียมสี นอกจากนั้นขณะเตรียมจะมีกลิ่นเหม็นของสารเคมีอย่างรุนแรง ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุจมูกได้ และสารเคมีหลายชนิดเป็นสารเคมีควบคุม ทำให้บริษัทตัวแทนจำหน่ายสารเคมี จึงได้ปรับเปลี่ยนมาจำหน่ายเป็นชุดสีย้อม Hematoxylin and Eosin สำเร็จรูปแทน

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา ได้ดำเนินการเตรียมและย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อ จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป ทำให้คุณภาพการติดสีดีขึ้น แต่ต้นทุนการเตรียมสไลด์ชิ้นเนื้อก็มีราคาสูงมากขึ้นด้วย เนื่องจากชุดสีย้อมสำเร็จรูปมีราคาแพง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการติดสีของชุดสีย้อม Hematoxylin and Eosin สำเร็จรูปจากตัวแทนจำหน่ายต่างๆ ในแง่คุณภาพการติดสีของนิวเคลียส (Nucleus) และซัยโตพลาสซึม (Cytoplasm) และ Contrast เพื่อให้มีชุดสีย้อม Hematoxylin and Eosin ที่มีคุณภาพดี ไม่แตกต่างจากชุดสีย้อมเดิมที่ใช้อยู่ แต่มีความปลอดภัยจากกลิ่นของสารเคมี และราคาต้นทุนลดลง เพื่อประหยัดต้นทุนการเตรียมเตรียมสไลด์ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ของสถาบันพยาธิวทยา กรมการแพทย์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพการติดสีของนิวเคลียส (Nucleus) และซัยโตพลาสซึม (Cytoplasm) และ Contrast ของชุดสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin ที่ใช้ในงานพยาธิวิทยา

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพการติดสีของนิวเคลียส (Nucleus) และซัยโตพลาสซึม (Cytoplasm) และ Contrast ของชุดสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin ที่ใช้ในงานด้านพยาธิวิทยาจำนวน 4 บริษัท ได้แก่ ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako, Bio-Optica,Thermo, CV science จากตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2554 โดยคัดเลือกชิ้นเนื้อจากอวัยวะส่วนที่ส่งมาวินิจฉัย 5 อันดับแรก ได้แก่ ลำไส้ เต้านม มดลูก ไทรอยด์ และไส้ติ่ง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ได้ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin ที่มีคุณภาพไม่แตกต่างจากชุดเดิม
2. ทำให้ประหยัดต้นทุนการเตรียมสไลด์ชิ้นเนื้อเพื่อตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา
3. เพื่อให้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการมีความปลอดภัยจากกลิ่นสารเคมี

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์
2. หน่วยงานของภาครัฐและเอกชนที่ปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยากายวิภาค

บทที่ 2

แนวความคิดและผลงานที่เกี่ยวข้อง

การตรวจชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา โดยทั่วไปอาศัยการย้อมสีชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยสีพื้นฐาน Hematoxylin and Eosin (H&E) พยาธิแพทย์สามารถตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาองค์ประกอบและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ชัดเจน และสามารถทำการวินิจฉัยผลชิ้นเนื้อในรายที่ไม่จำเป็นต้องย้อมสีด้วยวิธีอื่นๆเพิ่มเติมได้ ดังนั้นการย้อมสีชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยสีพื้นฐานจึงมีความสำคัญอย่างมาก ในการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา

วิธีการย้อมสี Hematoxylin and Eosin ที่ใช้ในงานพยาธิวิทยา เป็นการย้อมสีองค์ประกอบของเซลล์ โดย นิวเคลียส (Nucleus) จะติดสีน้ำเงินของสี Hematoxylin และไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) จะติดสีแดงของสี Eosin สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ตามเทคนิคการติดสีของชิ้นเนื้อตัวอย่าง[15] ได้แก่

1. Regressive staining เป็นเทคนิคการย้อมสีตัวอย่างติดสี Hematoxylin ให้ติดนิวเคลียสเข้มเกินไปมากๆ แล้วทำการล้างสีส่วนเกินออกด้วย 1% acid Alcohol เรียกว่ากระบวนการ Differentiation และย้อมสี Eosin ให้ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ติดสีแดง การย้อมเทคนิคนี้ใช้สีวิธีสีเตรียมแบบ Harris Hematoxylin ซึ่งนิยมใช้ในงานเซลล์วิทยา

2. Progressive staining เทคนิคการติดสีแบบนี้เป็นการย้อมสีสี Hematoxylin ให้ติดนิวเคลียสให้ติดสีพอดี ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาในการติดสีของส่วนประกอบต่างๆของชิ้นเนื้อตัวอย่าง ที่มีคุณสมบัติในการติดสีแตกต่างกัน ทำให้เป็นสีน้ำเงินชัดเจนขึ้นด้วยกระบวนการ Bluing และย้อมสี Eosin ให้ไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ติดสีแดง การย้อมเทคนิคนี้ใช้สีวิธีเตรียมสีแบบ Mayer's Hematoxylin ซึ่งนิยมใช้ในการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อ

ขั้นตอนในการย้อมสีด้วยวิธี Hematoxylin and Eosin (H&E)[15]

1. Deparaffinization เป็นขั้นตอนการล้าง Paraffin ที่แทรกอยู่ในตัวอย่างชิ้นเนื้อออกโดยใช้น้ำยา Xylene
2. Hydration เป็นการล้าง Xylene ออก และให้น้ำแทรกซึมเข้าไปในตัวอย่างชิ้นเนื้อแทน โดยใช้น้ำยา Alcohol จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ
3. Staining เป็นขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin and Eosin (H&E) เพื่อให้นิวเคลียสของเซลล์ในตัวอย่างชิ้นเนื้อติดสีน้ำเงินของน้ำยา Hematoxylin และไซโตพลาสซึมของเซลล์ติดสีแดงของน้ำยา Eosin
4. Dehydration เป็นการดึงน้ำออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยใช้น้ำยา Alcohol จากความเข้มข้นต่ำไปสูง

5. Clearing เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อปราศจากน้ำและ Alcohol อย่างสมบูรณ์ โดยใช้ Xylene และยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่เข้ากันได้ดีกับน้ำยาที่ใช้ทำการ Mounting ในขั้นตอนต่อไป
6. Mounting เป็นขั้นตอนการทำให้สไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างเป็นสไลด์ถาวร (Permanent slide) โดยใช้น้ำยาเคมี (mounting media) เป็นตัวช่วยรักษาสภาพของตัวอย่าง นอกจากนั้นน้ำยานี้ยังเป็นตัวกลางให้แสงของกล้องจุลทรรศน์ส่องผ่าน ทำให้มองเห็นเซลล์ได้ชัดเจน

จากสถิติตั้งแต่ปี พ.ศ. 2560-2564 พบว่า ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ส่งมาตรวจ และวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้มีการใช้งบประมาณในการซื้อสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin เพื่อนำมาใช้กับเครื่องย้อมสีสไลด์อัตโนมัติเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสไลด์และเงินงบประมาณที่ใช้ในการย้อมสี Hematoxylin and Eosin (H&E)

ปีงบประมาณ	จำนวนสไลด์	จำนวนชุดสีย้อม	จำนวนเงิน(บาท)	หมายเหตุ
2560	71,833	24	1,463,760	**ชุดสีย้อมประกอบด้วย** 1. สี Hematoxylin 1 ขวด 2. สี Eosin 1 ขวด 3. น้ำยา Bluing 1 ขวด ราคา 60,990 บาท/ชุด ย้อมได้ 3,000 สไลด์ คิดเป็นราคาค่าย้อมสไลด์ละ 21 บาท
2561	87,641	30	1,829,700	
2562	124,642	42	2,561,580	
2563	149,729	50	3,049,500	
2564	158,298	53	3,232,470	

ปัจจุบัน งานจุลพยาธิ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ มีเครื่องย้อมสีสไลด์อัตโนมัติ 2 แบบ คือ เครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นกระจกอัตโนมัติ เครื่องย้อมสีสไลด์ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin (H&E) ที่มีความจำเพาะจากตัวแทนจำหน่าย จึงจะทำให้การติดสีมีคุณภาพแต่มีราคาค่อนข้างสูง[5-6] ในขณะเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิลม์อัตโนมัติ สามารถใช้ชุดสีย้อมได้จากทุกตัวแทนจำหน่าย[2]

จากข้อดีดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดจะนำชุดสีย้อมสำเร็จรูปจากตัวแทนจำหน่ายอื่นๆ มาทดลองย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิลม์อัตโนมัติ เพื่อลดต้นทุน โดยสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างมีคุณภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin (H&E) และ Contrast ไม่แตกต่างกัน

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาได้แก่ ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ส่งมาตรวจที่สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี พ.ศ 2554 และได้รับการวินิจฉัยจากพยาธิแพทย์เรียบร้อยแล้ว โดยเลือกชิ้นเนื้อจากตัวอย่าง ลำไส้ เต้านม มดลูก ไทรอยด์ และไส้ติ่ง ตัวอย่างละ 10 ราย รวมเป็น 50 ราย และมีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้งหมดในการทำการทดลองย้อมสีด้วยชุดสีย้อมสำเร็จรูป 200 สไลด์

ระยะเวลาในการดำเนินการ

- ระยะเวลาในการวิจัย 7 เดือน (มกราคม-กรกฎาคม พ.ศ. 2565)

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome)
2. ตู้อบความร้อน (Hot air oven)
3. อ่างลอยชิ้นเนื้อ (Water bath)
4. เครื่องย้อมสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิลม์อัตโนมัติ (Automatic tissue staining with SUKURA รุ่น Priama@Plus)
5. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
6. เครื่องสแกนสไลด์ (Automatic slide scanner)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. หาข้อมูลตัวแทนจำหน่ายชุดสีย้อมสำเร็จรูป Hematoxylin and Eosin(H&E)
2. เตรียมความพร้อมวัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ
3. คัดเลือกบล็อกพาราฟินชิ้นเนื้อจากตัวอย่างลำไส้ เต้านม มดลูก ไทรอยด์ และไส้ติ่ง ตัวอย่างละ 10 ราย
4. ตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) ที่ความหนา 3-5 ไมครอน วางบนแผ่นสไลด์ตัวอย่างละ 4 ชุดๆละ 50 แผ่น (รวมเป็น 200 แผ่น)
5. นำสไลด์ใส่ในตู้อบความร้อน (Hot air oven) ที่อุณภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. นำสไลด์มาย้อมด้วยเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิลม์อัตโนมัติ โดยตั้งโปรแกรมการย้อมตามโปรแกรมที่ 1 ย้อมด้วยชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako[6] (ชุดน้ำยาที่ใช้ปัจจุบัน) โปรแกรมที่ 2 ย้อมด้วยชุดสี

ย้อมสำเร็จรูป Bio-Optica[9,12] โปรแกรมที่ 3 ย้อมด้วยชุดสีย้อมสำเร็จรูป Thermo[17] โปรแกรมที่ 4 ย้อมด้วยชุดสีย้อมสำเร็จรูป CV science[4] (ตารางที่ 2)

7. ตรวจสอบคุณภาพการติดสี Hematoxylin and Eosin ของชุดสีย้อม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Microscope) และสแกนสไลด์ด้วยเครื่องสแกนสไลด์
8. ส่งสไลด์ให้พยาธิแพทย์ประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยพยาธิแพทย์ไม่ทราบว่าสไลด์ย้อมจากชุดสีย้อมสำเร็จรูปชนิดไหน เพื่อเปรียบเทียบการติดสีน้ำเงินของสี Hematoxylin ตรงตำแหน่งนิวเคลียส และการติดสีแดงของสี Eosin ตรงตำแหน่งไซโตพลาสซึม โดยใช้แบบประเมินคะแนนระดับการติดสีทั้ง 2 สี ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ จางที่สุด (1), จาง (2), ปานกลาง (3), เข้ม (4), เข้มมาก (5) และประเมินคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrasting) และให้คะแนน ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ควรปรับปรุง(1), พอใช้ (2), ปานกลาง(3), ดี (4), ดีที่สุด (5)
9. รวบรวมแบบประเมิน วิเคราะห์ สรุปผล และเขียนรายงานการวิจัย

ตารางที่ 2 โปรแกรมการย้อมสีด้วยเครื่องย้อมสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิลม์อัตโนมัติ

น้ำยา	โปรแกรมที่ 1 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 2 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 3 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 4 เวลา (นาที)	หมายเหตุ
1. Xylene	3	1	2	5	
2. Xylene	3	1	2	4	
3. Xylene	3	-	1 วินาที	-	
4. IPA	2	1	30 วินาที	1	
5. IPA	2	1	30 วินาที	1	
6. 95% alc	2	1	30 วินาที	1	
7. 95% alc	2	1	30 วินาที	1	
8. Running water	1	3	1	2	
9. . Mayer's Hematoxylin	5	2	2	5	
10 DW.	1	-	-	-	
11. Running water	1	5	5	5	
12. Bluing agent	1	-	-	-	

น้ำยา	โปรแกรมที่ 1 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 2 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 3 เวลา (นาที)	โปรแกรมที่ 4 เวลา (นาที)	หมายเหตุ
13. Running water	5	5	5	5	
14. 95% alc	30 วินาที	-	30 วินาที	30 วินาที	
15. Eosin	5	4	10 วินาที	3	
16. 95% alc	1	30 วินาที	30 วินาที	1	
17. 95% alc	1	30 วินาที	30 วินาที	1	
18. IPA	1	1	30 วินาที	1	
19. IPA	1	1	10 วินาที	1	
20. Xylene	1	1	1	1	
21. Xylene	1	1	1	2	
22. Xylene	2	1	1	2	
รวมเวลาย้อมทั้งสิ้น	**45**	**31**	**25**	**43**	

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลผลการย้อมสีที่ได้ลงในคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปโดยใช้โปรแกรม SPSS

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดสีย้อมสำเร็จรูป Bio-Optica, Thermo และ CV science เทียบกับชุดสีสำเร็จรูปชุด Dako ที่ใช้ย้อมสีสไลด์ปัจจุบันเป็นชุดสีเปรียบเทียบ โดยใช้สถิต Pair Simple T-Test

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการทดลองย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako, Bio-Optica, Thermo และ CV science ด้วยเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิมล์อัตโนมัติ โดยตั้งโปรแกรมการย้อมตามเทคนิคของแต่ละชุดสี จากชิ้นเนื้อตัวอย่าง ลำไส้ เต้านม มดลูก ไทรอยด์ และไส้ติ่ง ตัวอย่างละ 10 ราย ตัวอย่างละ 4 ชุด ๆละ 50 แผ่น (รวมเป็น 200 แผ่น) ส่งสไลด์ให้พยาธิแพทย์ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อเปรียบเทียบการติดสีน้ำเงินของน้ำยา Hematoxylin ที่ตำแหน่งนิวเคลียส และการติดสีแดงของน้ำยา Eosin ที่ตำแหน่งไซโตพลาสซึม โดยใช้แบบประเมินคะแนนระดับการติดสีทั้ง 2 สี แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ จางที่สุด (คะแนน = 1), จาง (คะแนน = 2), ปานกลาง (คะแนน = 3), เข้ม (คะแนน = 4), เข้มมาก (คะแนน = 5) และประเมินคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrasting) และให้คะแนน ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ควรปรับปรุง (คะแนน = 1), พอใช้ (คะแนน = 2), ปานกลาง (คะแนน = 3), ดี (คะแนน = 4), ดีที่สุด (คะแนน = 5) รวบรวมแบบประเมินวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Pair Simple T-Test (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลคะแนนการติดสี Hematoxylin and Eosin และการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast)

ตัวอย่าง	ชุดสี Dako			ชุดสี Bio-Optica			ชุดสี Thermo			ชุดสี CV science		
	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast
1. ลำไส้ 1	5	5	5	4	5	3	5	5	4	5	5	5
2. ลำไส้ 2	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
3. ลำไส้ 3	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
4. ลำไส้ 4	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
5. ลำไส้ 5	5	5	4	5	5	5	5	5	4	5	5	5
6. ลำไส้ 6	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
7. ลำไส้ 7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
8. ลำไส้ 8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
9. ลำไส้ 9	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5	4
10. ลำไส้ 10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
11. เต้านม 1	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5	5	4

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ตัวอย่าง	ชุดสี Dako			ชุดสี Bio-Optica			ชุดสี Thermo			ชุดสี CV science		
	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast
12. เต้านม 2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
13. เต้านม 3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
14. เต้านม 4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
15. เต้านม 5	4	5	4	4	5	4	4	4	4	4	5	4
16. เต้านม 6	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
17. เต้านม 7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
18. เต้านม 8	5	5	5	4	5	4	5	5	4	5	5	5
19. เต้านม 9	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
20. เต้านม10	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
21. มดลูก 1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
22. มดลูก 2	5	5	5	5	5	4	5	4	4	5	5	5
23. มดลูก 3	5	5	4	5	5	4	5	4	4	5	5	5
24. มดลูก 4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25. มดลูก 5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5
26. มดลูก 6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
27. มดลูก 7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
28. มดลูก 8	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
29. มดลูก 9	5	5	4	5	5	4	5	5	4	5	5	4
30. มดลูก 10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
31. ไทรอยด์ 1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
32. ไทรอยด์ 2	5	5	5	5	5	4	5	5	4	5	5	5
33. ไทรอยด์ 3	5	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
34. ไทรอยด์ 4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
35. ไทรอยด์ 5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
36. ไทรอยด์ 6	5	5	4	5	5	4	5	5	4	5	5	5

ตารางที่ 3 (ต่อ)

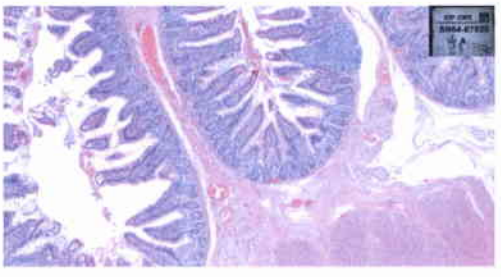
ตัวอย่าง	ชุดสี Dako			ชุดสี Bio-Optica			ชุดสี Thermo			ชุดสี CV science		
	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast	H	E	contrast
37. ไทรอยด์ 7	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5
38. ไทรอยด์ 8	5	5	5	5	4	4	5	5	4	5	5	5
39. ไทรอยด์ 9	5	5	5	5	4	4	5	5	4	5	5	5
40. ไทรอยด์ 10	5	5	5	5	4	4	5	5	4	5	5	5
41. ไส้ติ่ง 1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
42. ไส้ติ่ง 2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
43. ไส้ติ่ง 3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
44. ไส้ติ่ง 4	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
45. ไส้ติ่ง 5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
46. ไส้ติ่ง 6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
47. ไส้ติ่ง 7	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
48. ไส้ติ่ง 8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
49. ไส้ติ่ง 9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
50. ไส้ติ่ง 10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
รวม	**43**			**30**			**29**			**46**		

เกณฑ์การให้คะแนน

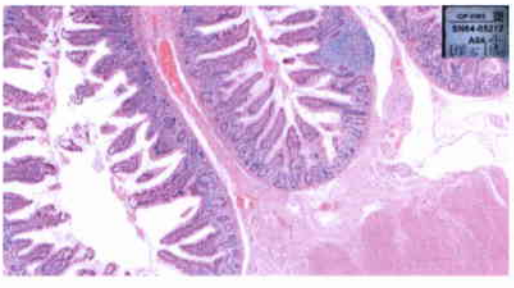
1 = จางที่สุด

2 = จาง

3 = ปานกลาง



4 = เข้ม



5 = เข้มมาก

การติดสี Hematoxylin(H) and Eosin (E)

1 = จางที่สุด

2 = จาง

3 = ปานกลาง

4 = เข้ม

5 = เข้มมาก

การตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast)

1 = ควรปรับปรุง

2 = พอใช้

3 = ปานกลาง

4 = ดีมาก

5 = ดีที่สุด

จากตารางที่ 3 แสดงผลคะแนนระดับการติดสี และคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) จำนวน 50 ราย 200 สไลด์ พบว่า

ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูป Dako จำนวน 50 ราย 50 สไลด์ พบว่าให้ผลการย้อมติดสี Hematoxylin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 1 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 49 สไลด์ การติดสี Eosin ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 50 สไลด์ และคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) ติดสีระดับดีมาก (คะแนน = 4) จำนวน 7 สไลด์ ระดับดีที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 43 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 86

ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูป Bio-Optica จำนวน 50 ราย 50 สไลด์ พบว่าให้ผลการย้อมติดสี Hematoxylin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 4 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 46 สไลด์ การติดสี Eosin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 3 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 47 สไลด์ และคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) ติดสี ระดับปานกลาง (คะแนน = 3) จำนวน 1 สไลด์ ระดับดีมาก (คะแนน = 4) จำนวน 19 สไลด์ ระดับดีที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 30 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 60

ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูป Thermo จำนวน 50 ราย 50 สไลด์ พบว่าให้ผลการย้อมติดสี Hematoxylin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 1 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 49 สไลด์ การติดสี Eosin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 7 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 43 สไลด์ และคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) ติดสีระดับดีมาก (คะแนน = 4) จำนวน 21 สไลด์ ระดับดีที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 29 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 58

ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูป CV science จำนวน 50 ราย 50 สไลด์ พบว่าให้ผลการย้อมติดสี Hematoxylin เข้ม (คะแนน = 4) จำนวน 1 สไลด์ ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 49 สไลด์ การติดสี Eosin ติดเข้มที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 50 สไลด์ และคุณภาพการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) ติดสีระดับดีมาก (คะแนน = 4) จำนวน 4 สไลด์ ระดับดีที่สุด (คะแนน = 5) จำนวน 46 สไลด์ คิดเป็นร้อยละ 92

สรุปผลการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่างจากสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako, Bio-Optica, Thermo, CV science โดยมีสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako เป็นชุดเปรียบเทียบ สีย้อมสำเร็จรูปชุด Bio-Optica และ Thermo ให้ผลการติดสีย้อมที่แตกต่างกับกับสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako แต่ในทางกลับกัน สีย้อมสำเร็จรูปชุด CV science ให้ผลการติดสีย้อมไม่แตกต่างกันกับสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sig=0.083)

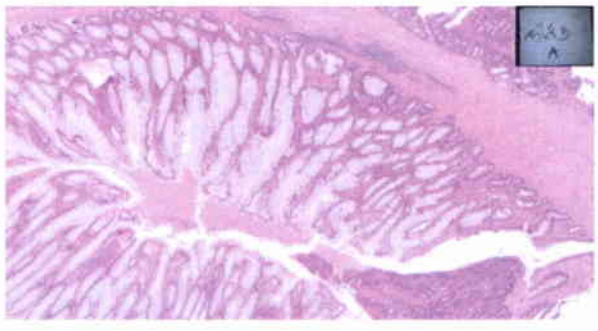
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสีย้อมสำเร็จรูปชุด CV science สามารถย้อมด้วยเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิล์มอัตโนมัติ ใช้ในการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยวิธีพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin) ในห้องปฏิบัติการจุลพยาธิ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ แทนสีย้อมสำเร็จรูปชุดเดิมได้

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบคุณสมบัติอื่นๆ ของชุดสีย้อมสำเร็จรูป

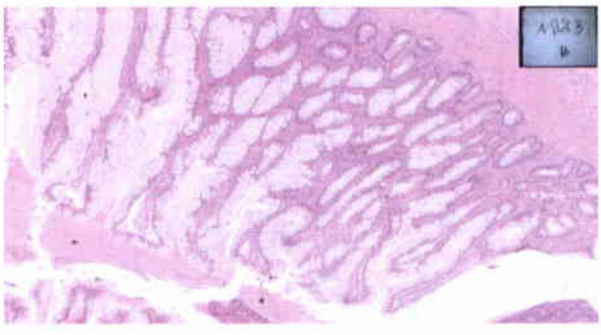
หัวข้อ	**ชุดสี** Dako	**ชุดสี** Bio-Optica	**ชุดสี** Thermo	**ชุดสี** CV science
1. ระยะเวลาการย้อม	45 นาที	31 นาที	25 นาที	43 นาที
2. การกรองสีก่อนใช้งาน	ไม่กรอง	กรอง	ไม่กรอง	ไม่กรอง
3. เติม glacial acetic acid ก่อนย้อม เพื่อให้ติดสีแดง	ไม่เติม	เติม	ไม่เติม	ไม่เติม
4. กลิ่นเหม็นของสารเคมี เช่น glacial acetic acid	ไม่มี	มี	ไม่มี	ไม่มี
5. การใช้ Bluing เพื่อให้ติดสีน้ำเงินชัดเจน	ใช้	ไม่ใช้	ไม่ใช้	ไม่ใช้
6. จำนวนสไลด์ที่สามารถย้อมได้ (สี 1,000 ml.)	3,000 สไลด์	1,400 สไลด์	2,000 สไลด์	2,000 สไลด์
7. ราคา (สี 1,000 ml.)	60,990 บาท	3,800 บาท	3,500 บาท	3,200 บาท
8. ต้นทุนการย้อมต่อสไลด์	21 บาท	2.72 บาท	1.75 บาท	1.6 บาท

ภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป

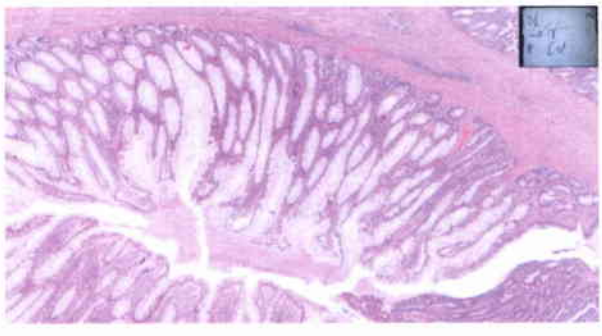
สำไส้



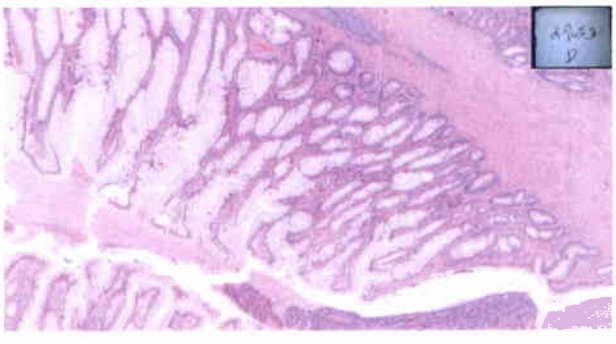
Dako



Bio-Optica



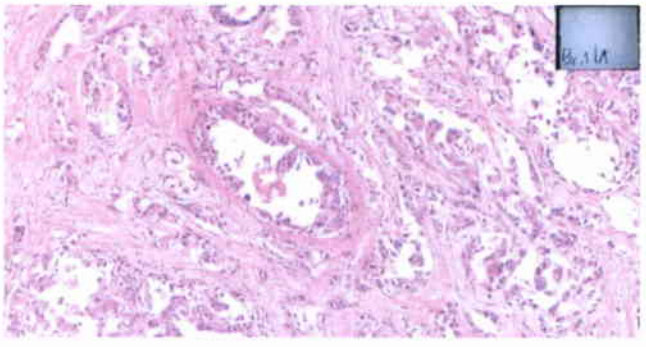
Thermo



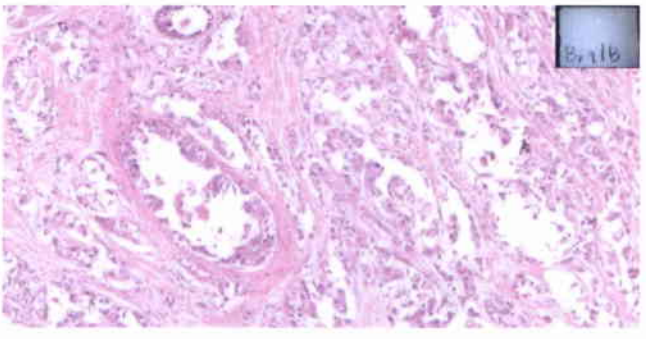
CV science

ภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป

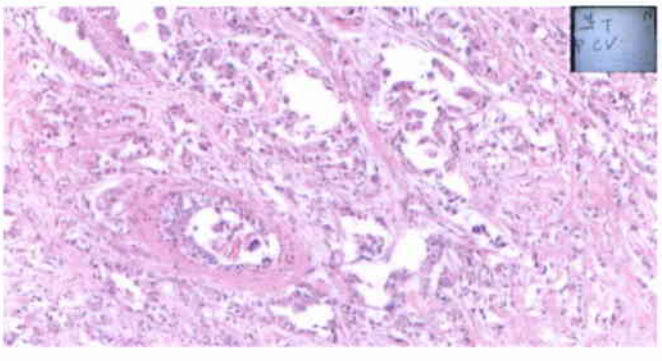
เต้านม



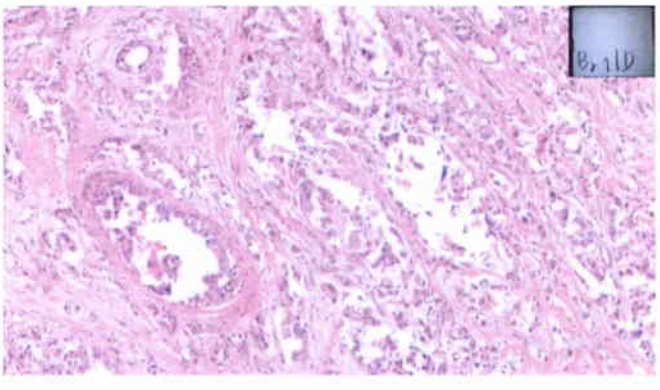
Dako



Bio-Optica



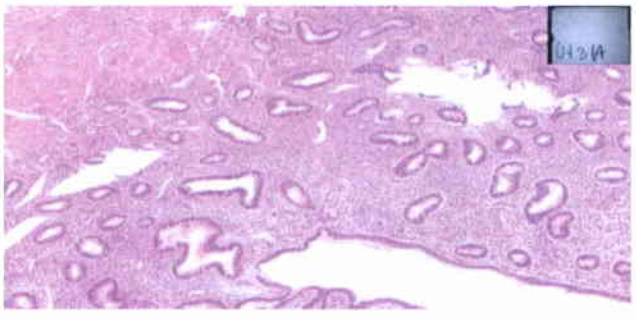
Thermo



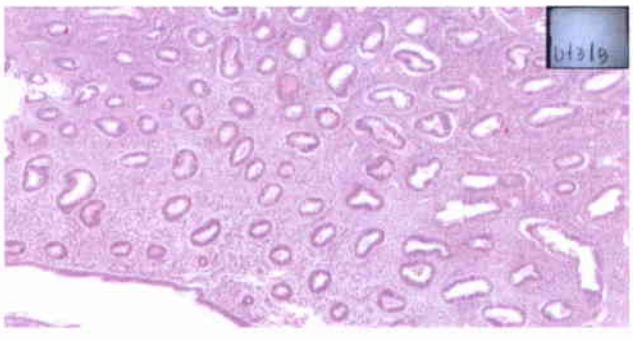
CV science

ภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป

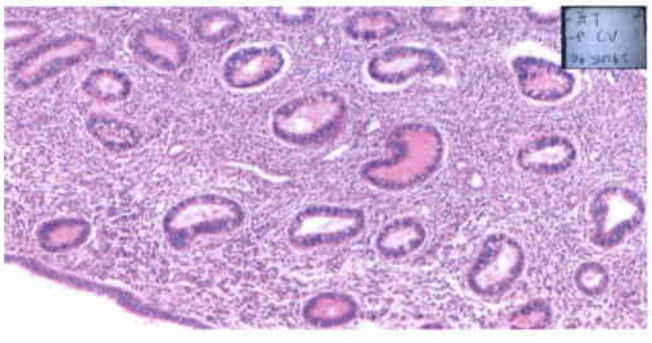
มดลูก



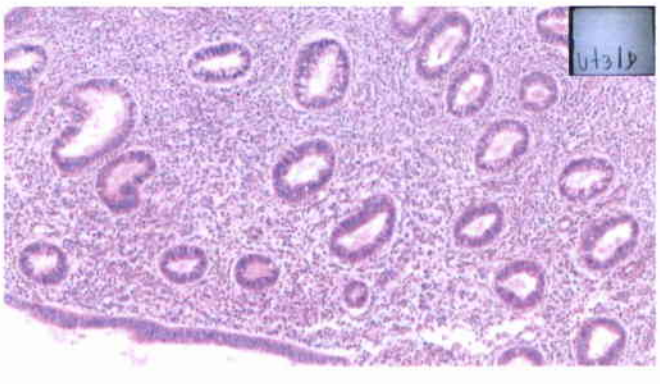
Dako



Bio-Optica



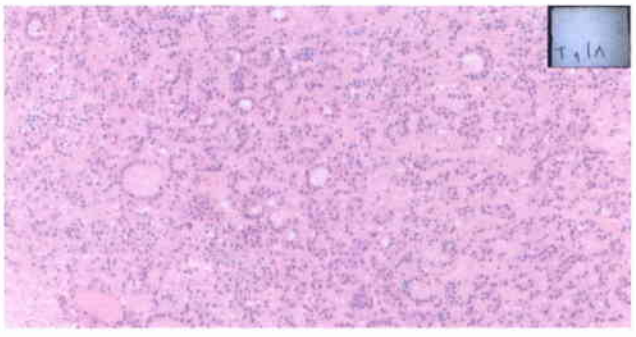
Thermo



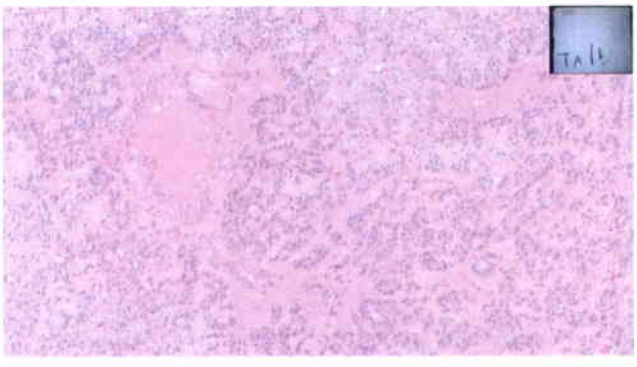
CV science

ภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป

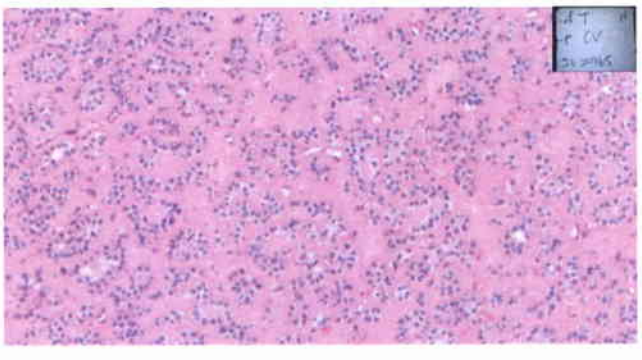
ไทรอยด์



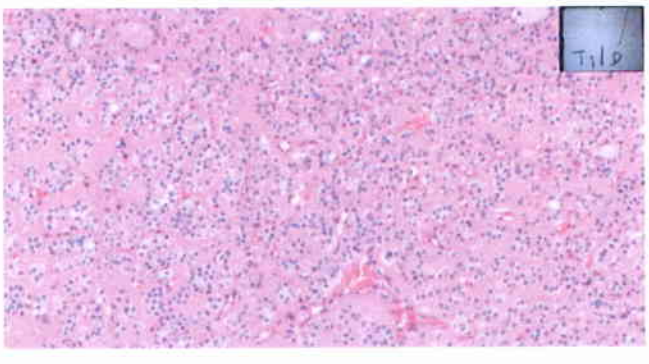
Dako



Bio-Optica



Thermo



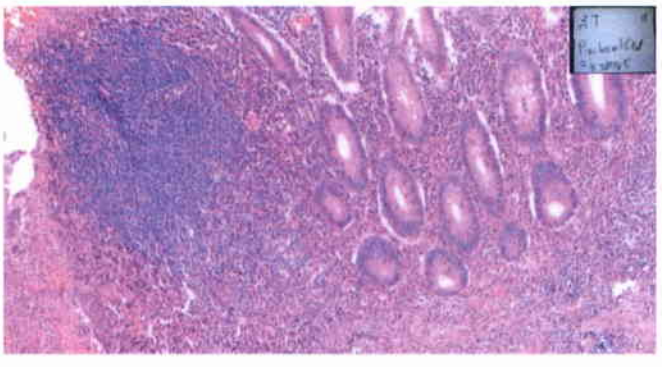
CV science

ภาพการติดสีย้อม Hematoxylin and Eosin จากชุดสีย้อมสำเร็จรูป

ไส้ติ่ง

Dako

Bio-Optica



Thermo

CV science

บทที่ 5

สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยสีพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin) มีการใช้เทคโนโลยีคือเครื่องย้อมสีสไลด์อัตโนมัติเข้ามาช่วยในการปฏิบัติงาน มีการผลิตชุดสีย้อมสำเร็จรูปที่สามารถนำมาใช้กับเครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัตินี้ เพื่อลดภาระการทำงาน ลดการสัมผัสสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น น้ำยา Chloral hydrate ในขบวนการเตรียมสีย้อม ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และผลการย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อจากสีย้อมสำเร็จรูปนี้ มีการติดสีได้มาตรฐานทุกแผ่นสไลด์ชิ้นเนื้อ ทำให้พยาธิแพทย์สามารถวินิจฉัยโรคได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

จากการทดลองสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako, Bio-Optica, Thermo และ CV science จากเครื่องย้อมสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิล์มอัตโนมัติโดยใช้เทคนิคการย้อมสีของแต่ละชุดสีที่กำหนด พบว่าผลการย้อมสีติดสีน้ำเงินของสี Hematoxylin ที่ตำแหน่งนิวเคลียส และติดสีแดงของสี Eosin ที่ตำแหน่งไซโตพลาสซึม และการตัดกันของสีทั้ง 2 สี (Contrast) โดยใช้ชุดสีย้อมสำเร็จรูป Dako เป็นชุดสีเปรียบเทียบ ให้ผลการติดสีย้อมระดับดีที่สุดจำนวน 43 สไลด์ ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูปชุด Bio-Optica จำนวน 30 สไลด์ ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูปชุด Thermo จำนวน 29 สไลด์ ผลการติดสีย้อมสำเร็จรูปชุด CV science จำนวน 46 สไลด์ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ชุดสีย้อมสำเร็จรูปชุด CV science ให้ผลการติดสีย้อมมีคุณภาพไม่แตกต่างจากสีย้อมสำเร็จรูป Dako อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสามารถใช้ย้อมแทนสีย้อมสำเร็จรูปชุดเดิมได้

การพิจารณาเลือกชุดสีย้อมสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยวิธีพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin) จากเครื่องย้อมสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิล์มอัตโนมัติ นอกจากมาตรฐานของการติดสีที่ดีสุดแล้ว ยังต้องคำนวนต้นทุนการย้อมสไลด์ชิ้นเนื้อตัวอย่าง ความยุ่งยาก และระยะเวลาในการย้อม เพื่อความรวดเร็ว (ตารางที่ 4) และจากการศึกษาคุณสมบัติของสีย้อมสำเร็จรูปชุด Dako, Bio-Optica, Thermo และ CV science ยังสามารถปรับเปลี่ยนเทคนิคการย้อมสี โดยการปรับระยะเวลาในการแช่สี และน้ำยา ให้เหมาะสมกับความต้องการของผู้ใช้งานได้ ส่วนความคงทนของการติดสีของสไลด์ชิ้นเนื้อจะได้ศึกษาต่อไปในอนาคต

ดังนั้นสีย้อมสำเร็จรูปชุด CV science มีความเหมาะสมในงานย้อมสีสไลด์ชิ้นเนื้อด้วยวิธีพื้นฐาน (Hematoxylin and Eosin) จากเครื่องย้อมสีสไลด์พร้อมปิดแผ่นฟิล์มอัตโนมัติ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการย้อมสีด้วยเครื่องย้อมอัตโนมัติอื่นๆ ของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาได้

เอกสารอ้างอิง

1. Ann Preece,HT.(ASP). A Manual of Histology Technicians.1972; 88-101.
2. Automatic tissue staining with SUKURA. แหล่งที่มา www.chemoscience.co.th
3. C.E.A Culling, RT. Allison WT. Barr. Cellular Pathology Technique. Hard Tissue.1985; 408-415.
4. CV Laboratories Thailand-CV. แหล่งที่มา https://cvlabthailand.com
5. Dako Pathology Education Guides/Agilent. แหล่งที่มา https:/www.agilent.com
6. Dako Autostainer Plus-Histology Equipment. แหล่งที่มา https://histologyequipment.com
7. David Hopwood. Theory and Practice of Histological Technique. Fixative and secondary Fixative.1977; 78-85.
8. Dezna C. Sheehan, Barbarra B, Hraphak. Theory and Practice of Histotechnology. Fixative secondary Edition.1980; 137-147.
9. Edilab-Bio-optica-Cito-Histopathology. แหล่งที่มา http://edilab.cl/bio-optica-ingles.html
10. John D.Bancroft Alas Steven MBBS, MRCPATH. Theory and Practice of Histological Techniques Edition.1977; 99-106.
11. Jones M lamar,Special Stain and H&E,Mastering the Trichrome Stain Technical Articles.
12. Histiphology and Analytics/Events/Optica. แหล่งที่มา https://www.optica.org/2018
13. Joyce Moore HT/HTL (ASCP) Technical. แหล่งที่มา http://www.ebsciences.com.2556
14. P.J.:Jour. Technical methods,12. (AFIP Modification).1929; 75-90.
15. กัลยา ผลากรกุล. เนื้อเยื่อพื้นฐานของร่างกายและหลักปฏิบัติงานด้านพยาธิวิทยา. 2534; 105-128
16. การย้อมชิ้นเนื้อ (Staining). แหล่งที่มา https.kku.ac.th,routine_lab.
17. เทคนิคการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin. แหล่งที่มา http://www.histocenter.co.th 30 มิ.ย. 2563
18. เทคนคการทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology). แหล่งที่มา http://www.agri.ubu.ac.th 28 มี.ค. 2561