บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **การเพาะเชื้อ** (Culture)

1.1 วัสดุ

1.1.1 specimen : endoscopic biopsy จำนวน 1 ชิ้น จากคนไข้ที่เข้ารับการตรวจในสาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ รพ.จุฬาลงกรณ์ ตามเกณฑ์การเลือกตัวอย่าง

1.1.2 เคมีภัณฑ์ และแหล่งที่มา

1. น้ำเกลือ (sterile normal saline solution) ; รพ.จุฬาลงกรณ์
2. blood agar base ; Difco
3. เลือดแกะ (sheep blood); คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
4. sodium citrate ; Sigma
5. vancomycin ; Sigma
6. polymyxin B ; Sigma
7. trimethoprim ; Sigma
8. amphotericin B ; Sigma
9. crystal violet ; Difco
10. 95% ethyl alcohol ; First Laboratory Co., Ltd.
11. ammonium oxalate ; Difco
12. iodine crystal ; Difco
13. potassium iodide ; Difco
14. sodium bicarbonate ; Sigma
15. acetone ; First Laboratory Co., Ltd.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16. safranin O ; Difco
17. tetramethyl-p-phenylenediamine hydrochloride ; Difco
18. hydrogen peroxide 3% ; องค์การเภสัชกรรม
19. urea agar base ; Difco
20. agar ; Difco
21. น้ำกลั่น (distilled water) ; รพ.จุฬาลงกรณ์
22. mixture gas : Thai Industrial Gases Limited
23. cedar wood oil ; Difco

1.1.3 <u>เครื่องมือและแหล่งที่มา</u>

1. โกร่งบดยา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. ; U & V HOLDING CO.,LTD.
2. ปากคีบชนิดปลายแหลม (fine pointed forceps) ; บ.เอสดี ทันตเวช จำกัด
3. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโรค (autoclave) ; Environmental Tectonic Coporation
4. เครื่องกรองแบคทีเรีย ; Millipore Coporation
5. แผ่นกรอง (filter type AP 25 No.03700 and type GS, membrane poresize 0.22 μ) ; Millipore Corporation
6. กระดาษกรอง (filter paper) ; วิทยาศรม
7. จานแก้วเพาะเชื้อ (petri dish) ; บ.เอสดี ทันตเวช จำกัด
8. platinum loop ; Delta Laboratory Co., Ltd.
9. Pasteur pipette ; U & V HOLDING CO.,LTD.
10. anaerobic jar : Oxoid
11. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ; Memmert
12. สไสด์กระจก (microscopic slide) ; First Laboratory Co., Ltd.
13. กล้องจุลทรรศน์ (biological microscope) ; Olympus
14. เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance) ; บ.ธีระเทรดดิ้ง จำกัด

1.2 ขั้นตอนในการทดลอง

1.2.1 นำ specimen (endoscopic biopsy) ใส่ใน sterile normal saline solution (2 ml.) ทันที

1.2.2 ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทันที หรือภายใน 5 ชม. โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

1.2.3 ใช้ forceps ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วคีบ specimen ใส่ในโกร่งบดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน

1.2.4 ดูด sterile normal saline solution ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วย sterile pipette ใส่ลงในข้อ 1.2.3

1.2.5 ทำการบด specimen ให้ละเอียด

1.2.6 ใช้ sterile pipette ดูด specimen ที่ถูกบดละเอียดใน sterile normal saline solution แล้ว ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว

1.2.7 ทำการ streak plate โดยใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อ

1.2.8 นำ plate (จานอาหารที่เพาะเชื้อ) ใส่ใน anaerobic jar

1.2.9 เติม mixture gas ที่มีส่วนประกอบของ gas ดังต่อไปนี้คือ 5% O_2, 10% CO_2, 10% H_2 และ 75% N_2 ลงใน anaerobic jar

1.2.10 incubate anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37°C

1.2.11 ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้อ (colony) ใน plate ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 หากไม่มีการเจริญของเชื้อให้ทิ้ง plate ในวันที่ 7

1.2.12 ถ้าพบว่ามีการเจริญของเชื้อ ให้นำ colony ที่ได้มาตรวจสอบโดยการย้อมสีกรัม (Gram's stain) เพื่อดูรูปร่างลักษณะ การเรียงตัว และการติดสีของเชื้อ ร่วมกับการทดสอบปฏิกริยาชีวเคมีต่างๆ เพื่อวินิจฉัยเชื้อ

ขั้นตอนในการย้อมสีกรัม (Gram's stain)

1. หยดน้ำกลั่นลงบนกระจกสไลด์เล็กน้อย
2. ใช้ platinum loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคจากเปลวไฟแล้วเขี่ยเชื้อจาก colony ที่ได้ผสมกับน้ำกลั่นที่หยดลงบนกระจกสไลด์ smear ให้ทั่ว แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
3. ทำการ fix slide โดยให้ slide ผ่านเปลวไฟอ่อนๆ 2-3 ครั้ง

4. หยด crystal violet solution ที่เตรียมไว้แล้วลงบนกระจกสไลด์ให้ทั่วบริเวณที่ smear ไว้ จากนั้นทิ้งไว้ 20 วินาที

5. ล้างด้วยน้ำประปาไหล

6. หยด iodine solution ลงบนกระจกสไลด์ทิ้งไว้ 20 วินาที

7. ล้างด้วยน้ำประปาไหล

8. ล้างด้วย alcohol-acetone แล้วล้างต่อด้วยน้ำประปาไหล

9. หยดสารละลาย safranin ลงบน slide ทิ้งไว้ 20 วินาที

10. ล้างด้วยน้ำประปาไหล ทิ้งไว้ให้แห้ง

11. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา (light microscope) ชนิดที่มีกำลังขยายประมาณ 1,000 เท่า โดยใช้เลนส์หัวน้ำมัน (oil immersion lens)

การทดสอบปฏิกริยาชีวเคมี

1. **การทดสอบเอนไซม์ urease** (urease test)

หลักการ

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ urease จะสามารถย่อยสลายยูเรีย ใน urea agar slant ให้เป็นแอมโมเนียได้ ซึ่งจะทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ indicator ที่อยู่ในอาหาร

วิธีการ

1.1 ใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อ เขี่ย colony เดี่ยวๆที่ได้ แล้วลากผ่าน (streak) บน urea agar slant

1.2 ดูการเปลี่ยนสีของ indicator ที่อยู่ในอาหาร

2. **การทดสอบเอนไซม์ oxidase** (oxidase test)

หลักการ

เป็นการทดสอบดูว่าแบคทีเรียมีเอนไซม์ oxidase หรือไม่ โดยที่เอนไซม์ oxidase จะออกซิไดส์น้ำยา tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) ทำให้เกิดสีม่วงขึ้นในเวลา 5-10 วินาที

วิธีการ

2.1 หยดน้ำยา tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) ลงบนกระดาษกรอง แล้วรอให้แห้ง

2.2 ใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อ เขี่ย colony เดี่ยวๆ แล้วลากผ่าน (streak) กระดาษกรองที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 2.1

2.3 ดูการเกิดสีบนกระดาษกรอง

3. **การทดสอบเอนไซม์ catalase** (catalase test)

หลักการ

เป็นการทดสอบดูว่า แบคทีเรียมีเอนไซม์ catalase หรือไม่ โดยเอนไซม์ catalase ในตัวแบคทีเรียจะคาตาไลส์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นออกซิเจน และน้ำ ซึ่งสังเกตได้จากฟองแก๊สที่เกิดขึ้น

วิธีการ

3.1 หยดน้ำยาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3%) ลงบนกระจกสไลด์

3.2 ใช้ loop ที่ปราศจากเชื้อเขี่ยเชื้อจาก colony เดี่ยวๆ จุ่มลงในน้ำยาที่หยดไว้แล้วบนกระจกสไลด์

3.3 สังเกตดูฟองแก๊สที่เกิดขึ้นทันที

การอ่านผลการเพาะเชื้อ

ก. ลักษณะ colony ของเชื้อ H.pylori

- โคโลนีจะใส มีความมัน ขอบของโคโลนี เรียบ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มม. พบมีการสลายเม็ดเลือดแดงรอบๆโคโลนี (slight hemolysis) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1

ข. ผลการย้อมสีกรัม (Gram's stain) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

- ติดสีแดงของ safranin มีรูปร่างโค้งงอ (gram negative curved bacteria) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของ H.pylori

1. การทดสอบเอนไซม์ urease (urease test)

- มีสีชมพูเกิดขึ้นบน urea agar slant : positive urease test ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3

2. การทดสอบเอนไซม์ oxidase (oxidase test)

- เกิดสีม่วงบนกระดาษกรอง : positive oxidase test ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4

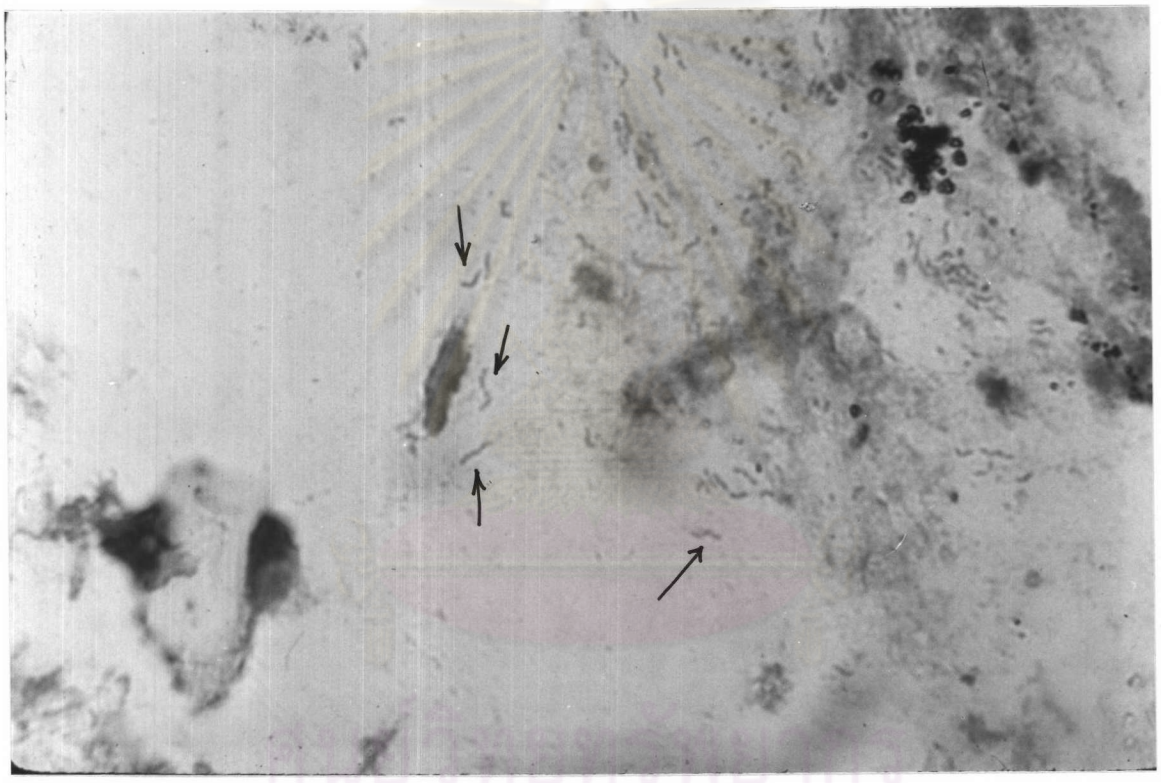
3. การทดสอบเอนไซม์ catalase (catalase test)

- เกิดฟองแก๊สจำนวนมากขึ้นทันที : positive catalase test ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

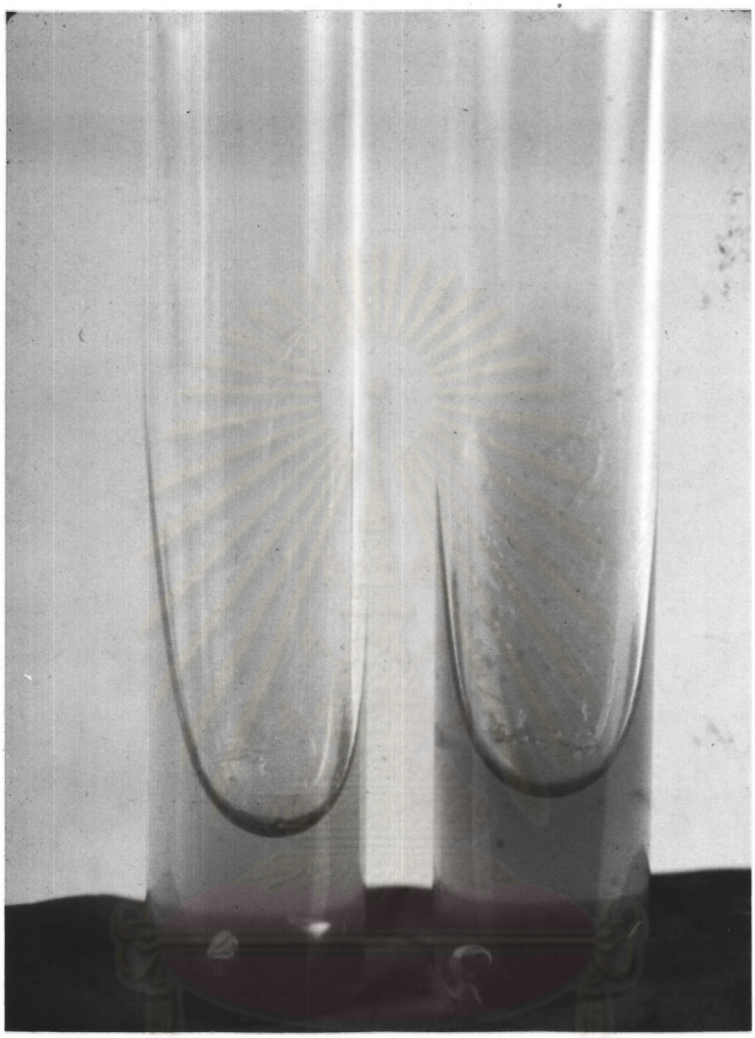
รูปที่ 1 แสดงโคโลนีของเชื้อ H.pylori บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดงรูปร่างและการติดสีย้อมกรัมของเชื้อ H.pylori (Gram's stain x 1000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

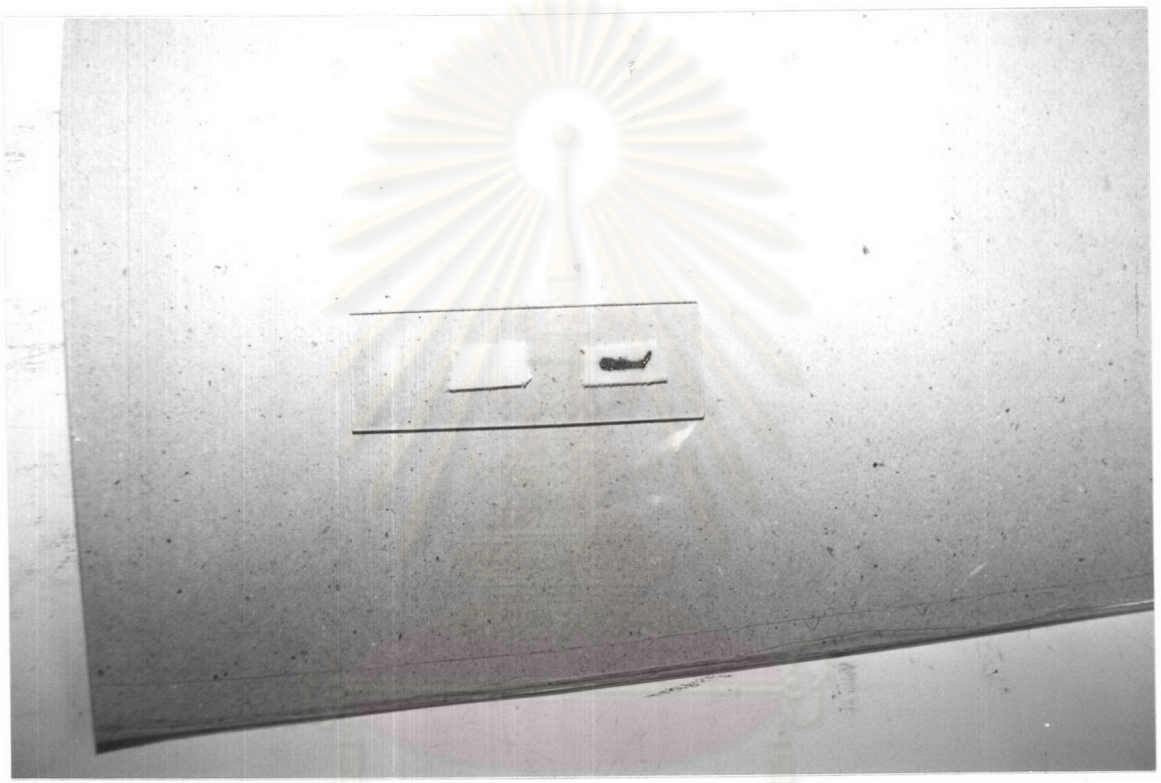


รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ urease ของเชื้อ H.pylori

ภาพขวา แสดงผล positive urease test

ภาพซ้าย แสดงผล negative urease test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ oxidase ของเชื้อ H.pylori

ภาพขวา แสดงผล positive oxidase test

ภาพซ้าย แสดงผล negative oxidase test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบเอนไซม์ catalase ของเชื้อ H.pylori

ภาพขวา แสดงผล positive catalase test

ภาพซ้าย แสดงผล negative catalase test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การย้อมสี modified Giemsa (modified Giemsa stain)

2.1 วัสดุ

2.1.1 specimen : endoscopic biopsy จำนวน 1 ชิ้น จากคนไข้ที่เข้ารับการตรวจในสาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ รพ.จุฬาลงกรณ์ ตามเกณฑ์การเลือกตัวอย่าง

2.1.2 เคมีภัณฑ์ และแหล่งที่มา

1. 40% formaldehyde (100% formalin) ; First Laboratory CO., LTD.
2. น้ำกลั่น (distilled water) ; รพ.จุฬาลงกรณ์
3. sodium phosphate monobasic, monohydrate ; Science Tech CO., LTD.
4. sodium phosphate dibasic, anhydrous ; Science Tech CO., LTD.
5. sodium acetate ; Science Tech CO., LTD.
6. 95% ethyl alcohol ; First Laboratory CO., LTD.
7. isopropyl alcohol ; First Laboratory CO., LTD.
8. xylene ; First Laboratory CO., LTD.
9. paraplast plus (paraplast with dimethyl sulphoxide);Theera Trading CO., LTD.
10. gelatin powder ; Theera Trading CO., LTD.
11. Giemsa stock solution ; Merck Ltd.
12. potassium dichromate, granular ; Merck Ltd.
13. mercuric chloride ; Merck Ltd.
14. acetic acid, glacial ; Merck Ltd.
15. potassium iodide ; Merck Ltd.
16. iodine crystals ; Merck Ltd.
17. sodium thiosulphate ; Merck Ltd.
18. resin (colophonium) ; Merck Ltd.
19. synthetic resins ; Merck Ltd.

2.1.3 เครื่องมือ และแหล่งที่มา

1. ตลับใส่ชิ้นเนื้อ (tissue cassette) ; Rapport CO., LTD.
2. ปากคีบปลายแหลม (fine pointed forceps) ; U & V Holding CO., LTD.

3. กระดาษสา ; ศึกษาภัณฑ์พานิช

4. เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ; Rapport CO., LTD.

5. เครื่องละลายพาราฟิน (paraffin bath) ; K.V. Science CO., LTD.

6. แบบของบล็อกชิ้นเนื้อ (stainless embedding molds or base molds) ; K.V. Science CO., LTD.

7. plastic embedding ring, disposable ; K.V.Science CO.,LTD.

8. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ; K.V.Science CO.,LTD.

9. ใบมีดสำหรับตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (microtome knife) ; Rapport CO.,LTD.

10.อ่างน้ำร้อนสำหรับลอย paraffin section ชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (electric tissue floating bath, thermostatically controlled) ; K.V. Science CO.,LTD.

11.ตู้อบร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (hot air oven, thermostatically controlled) ; United Instrument CO., LTD.

12.แปรงขนอ่อน (soft hair brush) ; ศึกษาภัณฑ์พานิช

13.กระจกสไลด์ (microscopic slide) ; U & V Holding CO.,LTD.

14.ที่ใส่สไลด์สำหรับย้อมสีชิ้นเนื้อพร้อมหูจับ (glass slide rack or staining rack with holder) ; Theera Trading CO.,LTD.

15.โถใส่น้ำยา สี พร้อมฝาปิด (staining dish with cover) ; Theera Trading CO.,LTD.

16.ปากคีบสำหรับจับสไลด์ (slide forceps) ; Theera Trading CO.,LTD.

17.เครื่องแก้วต่างๆที่ใช้ในการเตร
CO.,LTD.

18.ถาดใส่สไลด์ (slide tray) ; Theera Trading CO., LTD.

19.แผ่นกระจกบางๆ (cover galss or cover slip) ; U & V Holding CO.,LTD.

20.กล้องจุลทรรศน์ (biological microscope) ; Olympus

21.เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance) ; Theera Trading CO.,LTD.

2.2 ขั้นตอนในการทดลอง ประกอบด้วย

2.2.1 การเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อการตรวจ (preparation of tissue)

ก. นำชิ้นเนื้อเยื่อ (endoscopic biopsy) ใส่ใน neutral buffered formalin (2 มิลลิลิตร) ทันที

ข. fixed ชิ้นเนื้อเยื่อ ใน neutral buffered formalin ประมาณ 6-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

ค. ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological laboratory)

ง. ใช้ปากคีบปลายแหลม (fine pointed forceps) คีบชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วนำมาห่อด้วยกระดาษสา เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อเยื่อหลุดหาย ขณะเตรียมชิ้นเนื้อ

2.2.2 การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมี (tissue processing)

ก. นำห่อชิ้นเนื้อเยื่อใส่ในตลับชิ้นเนื้อ (tissue cassette) จากนั้นบรรจุลงในตะกร้า (tissue basket) ของเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)

ข. ตลับชิ้นเนื้อจะผ่านน้ำยา (reagent) ต่างๆ ที่บรรจุอยู่ในโถ (reagent beaker) ของเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ทั้งหมด 12 โถ ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอน	น้ำยา (reagent)	เวลาที่ใช้
1.การแช่น้ำยาเพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อเยื่อ (fixation)	- โถที่ 1 : 10% formalin with sodium acetate - โถที่ 2 : เหมือนโถที่ 1	8 ชั่วโมง "
2.การทำชิ้นเนื้อเยื่อให้ปราศจากน้ำและของเหลวต่างๆ (dehydration)	- โถที่ 3 : 95% alcohol - โถที่ 4 : 95% alcohol - โถที่ 5 : 95% alcohol - โถที่ 6 : isopropanol - โถที่ 7 : isopropanol - โถที่ 8 : isopropanol	1/2 ชั่วโมง " " " " "
3.การทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อปราศจาก dehydrant ต่างๆ (clearing)	- โถที่ 9 : xylene - โถที่ 10 : xylene	1 ชั่วโมง "
4.การทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อแข็ง (infiltration or impregnation with wax)	- โถที่ 11 : liquid wax (temperature 60-63°C) - โถที่ 12 : liquid wax (temperature 60-63°C)	1 1/2 ชั่วโมง "

รวมเวลาที่ชิ้นเนื้อเยื่อผ่าน automatic tissue processor ตลอดขบวนการ แยกได้ในแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. fixation ใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง
2. dehydration ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง
3. clearing ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
4. infiltration ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

รวมทั้งสิ้น ใช้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

ค. นำ tissue cassette ออกจากเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ เพื่อเตรียมทำบล็อกชิ้นเนื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3 การทำบล็อกชิ้นเนื้อ (paraffin block or embedding in paraffin)

ก. หยอด liquid wax medium จากเครื่องละลายพาราฟิน ลงในแบบบล็อกชิ้นเนื้อ (stainless base mold) กะประมาณให้ท่วมชิ้นเนื้อเยื่อ

ข. ใช้ปากคีบปลายแหลมจับชิ้นเนื้อเยื่อใน tissue cassette แล้วรีบวางชิ้นเนื้อเยื่อนั้นฝังลงไปใน liquid wax medium นั้น (ควรทำอย่างรวดเร็ว ประมาณ 1-2 นาที มิฉะนั้น liquid wax medium จะแข็งตัวก่อนวางชิ้นเนื้อฝังลงไปได้)

ค. หยอด liquid wax medium จากเครื่องละลายพาราฟิน เติมลงไปอีกให้เต็มแบบที่ทำบล็อกชิ้นเนื้อ

ง. ประกบแบบที่ทำบล็อกชิ้นเนื้อด้วย plastic embedding ring เพื่อยึดเกาะ wax ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อฝังอยู่ให้แน่นแล้วหยอด liquid wax medium จนเต็มขอบบนของ plastic embedding ring

จ. ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วแกะบล็อกชิ้นเนื้อออกจากแบบ ก็จะได้ tissue paraffin block ตามต้องการ

2.2.4 การตัดบล็อกชิ้นเนื้อเยื่อ (paraffin section)

ก. นำ tissue paraffin block ที่ได้มาตัดออกเป็นเนื้อเยื่อแผ่นบางๆ (paraffin section) ขนาด 3-5 ไมครอน ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome)

ข. นำ paraffin section ที่ได้ไปลอยในอ่างน้ำร้อน (electric tissue floating bath) ที่มีส่วนผสมของ gelatin powder (ประมาณ 1/4 ช้อนชาต่อ ปริมาณน้ำเต็มอ่าง) ซึ่งจะเป็นตัวช่วยให้ paraffin section ยึดติดแน่นกับผิวของสไลด์ ไม่หลุดง่ายขณะที่ทำการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ (section adhesive)

ค. เลือก section ที่ต้องการ แล้วช้อนใส่บนสไลด์ก่อนนำไปย้อมสีชิ้นเนื้อ

ง. อบแผ่นสไลด์ที่มี paraffin section อยู่ในตู้อบร้อนชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (hot air oven) โดยปรับอุณหภูมิของตู้สำหรับใช้งานให้อยู่ระหว่าง 58-60°C ประมาณ 30-60 นาที เพื่อช่วยให้ paraffin section ติดแน่นกับผิวของสไลด์

2.2.5 การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue staining)

นำแผ่นสไลด์ใส่ใน glass slide rack ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 นาที จากนั้นทำตามขั้นตอนดังนี้

ก. Deparaffinization

2.2.18 จุ่มลงใน xylene จำนวน 2 โถ (staining dish) โถละ 3-5 นาที เป็นอย่างน้อย เพื่อการละลายและดึงพวก wax medium ออกจากชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ ทั้งนี้เนื่องจาก wax medium จะไปเคลือบเซลล์และส่วนอื่นๆ ของเนื้อเยื่อไม่ให้ติดสีที่ใช้ย้อม

ข. Hydration

2.2.19 ล้าง xylene ให้หมดไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ และเตรียมนำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อลงสู่น้ำ เพื่อการย้อมสี โดยเริ่มจุ่ม glass slide rack ที่มีแผ่นสไลด์เนื้อเยื่อบรรจุอยู่ลงใน absolute (isopropyl) alcohol จำนวน 2 โถๆละ 1-2 นาที และใน 95% alcohol จำนวน 2 โถๆละ 1-2 นาที ตามลำดับ เพื่อประสิทธิภาพในการ hydrate

ค. Staining

1. จากขั้นตอน hydration ให้จุ่ม glass slide rack ลงในน้ำกลั่น

2. ใช้ปากคีบสำหรับจับสไลด์ (slide forceps) คีบแผ่นสไลด์ออกจาก glass slide rack แล้วจุ่มลงใน Zenker's fluid ซึ่งใช้เป็น mordant โดยจะช่วยให้การติดสีถูกต้องครบถ้วนตามที่ควร ให้จุ่มประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือครึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิ 58°C (oven)

3. ล้างตะกอนของ mercuric chloride ที่อยู่ใน Zenker's solution และตกค้างอยู่ในชิ้นเนื้อเยื่อ ออกด้วย Lugol's iodine solution ประมาณ 5-10 นาที แล้วล้างต่อด้วยน้ำประปา

4. จุ่มสไลด์ใน 5% sodium thiosulphate เพื่อล้างตะกอนของ mercuric chloride ออกจากชิ้นเนื้อเยื่ออีกครั้ง ประมาณ 3-5 นาที แล้วล้างต่อด้วยน้ำประปาไหล และน้ำกลั่น ตามลำดับ

5. จุ่มสไลด์ใน Giemsa working solution ที่เตรียมไว้แล้ว ที่อุณหภูมิ 58°C (oven) เป็นเวลา 45 นาที

6. ล้างสีส่วนเกินออกไปจากชิ้นเนื้อเยื่อ (differentiate) โดยจุ่มสไลด์ใน resin working solution จนกระทั่งชิ้นเนื้อเยื่อออกเป็นสีชมพูอมม่วง

ง. Dehydration

จุ่มสไลด์ใน 95% ethyl alcohol 2 โถ และ absolute (isopropyl) alcohol จำนวน 2 โถ โดยจุ่มน้ำยาเร็วๆ ตามลำดับ เพื่อทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจากน้ำ ซึ่งเกิดจากสีที่ใช้ย้อมชิ้นเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จ. Clearing

จุ่มสไลด์ต่อใน xylene 3 โถๆละ 2-3 นาที เพื่อทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ปราศจาก dehydrants ต่างๆ และพร้อมกันนั้นจะเป็นสื่อนำและละลายเข้ากันได้ดีกับ mounting medium ในการ mounting slide ซึ่งต่อจากขั้นตอน clearing นี้

ฉ. Mounting

1. หยด mounting medium ลงบนชิ้นเนื้อเยื่อบนสไลด์ จากนั้นใช้แผ่นกระจกบางๆ (cover glass) ปิดทับลงบนชิ้นเนื้อเยื่อ

2. ออกแรงกดลงบนแผ่น cover glass เล็กน้อย เพื่อให้ติดแน่นยิ่งขึ้น และเป็นการไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นออกไปให้หมด

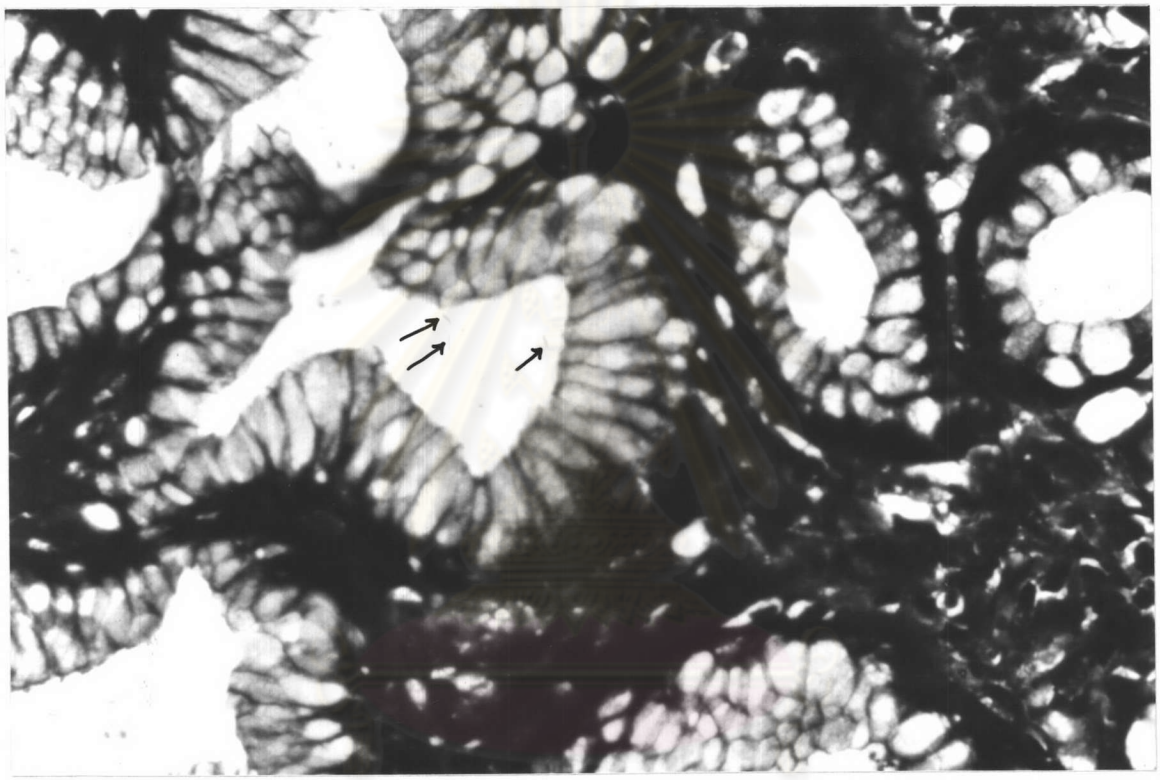
3. เช็ดทำความสะอาดคราบ mounting medium

4. นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผลการตรวจเชื้อ H.pylori โดยวิธีการย้อมสี modified Giemsa

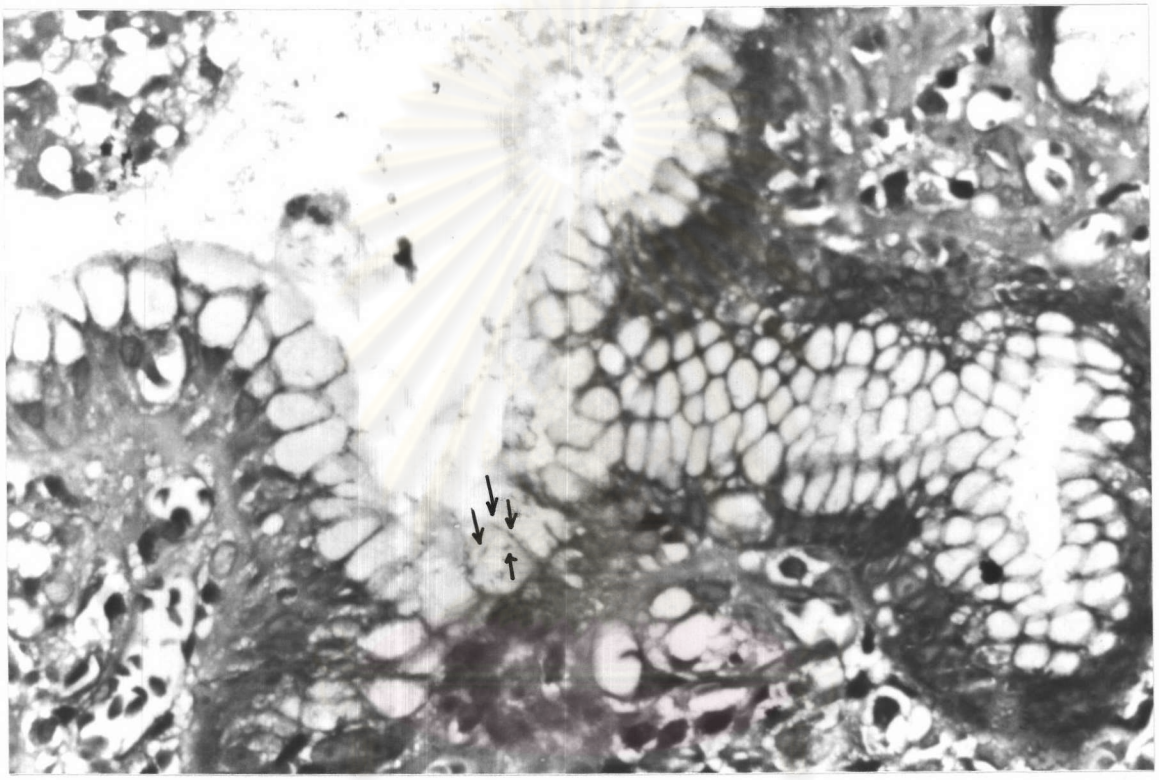
- เชื้อ H.pylori : เห็นเป็น curved or spiral shaped bacteria สีน้ำเงินเข้ม ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6-8

หมายเหตุ การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อโดยวิธี Giemsa นั้น ชิ้นเนื้อเยื่อจะไม่ผ่านการจุ่มลงใน Zenker's fluid แต่จะผ่านใน Giemsa working solution ที่อุณหภูมิ 58°C (oven) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงจะนำไปผ่านในสารละลายเจือจางของ acetic acid (98% acetic acid 3-4 หยดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 2-4 วินาที แล้วล้างสีส่วนเกินด้วย 96% ethanol



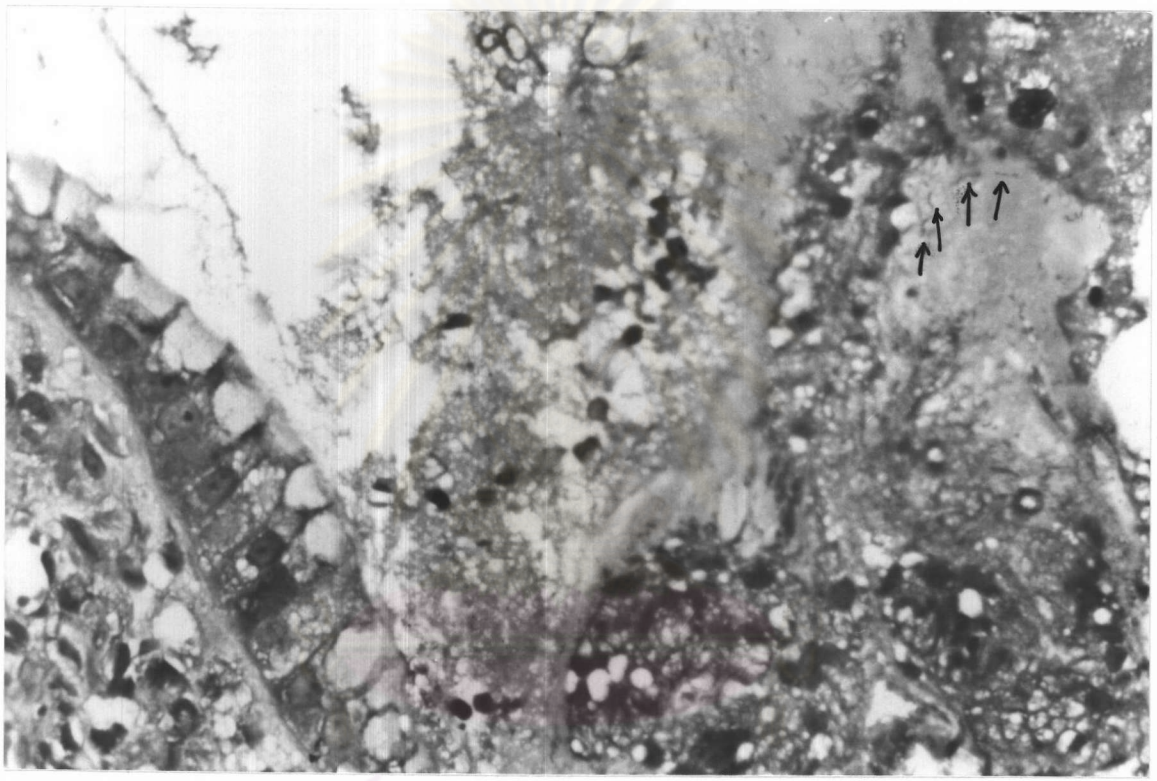
รูปที่ 6 แสดงรูปร่างลักษณะและการติดสีย้อม modified Giemsa ของเชื้อ H.pylori ใน foveolar lumen ของชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหาร (modified Giemsa stain x 400)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงเชื้อ H.pyiori เกาะบน foveolar cellในชั้นเมือกของเยื่อบุกระเพาะอาหาร (modified Giemsa stain x 400)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดงเชื้อ H.pylori อยู่ในบริเวณที่มีเมือกหนาแน่น (modified Giemsa stain x 400)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย