Review Articles

The usage of Immunofluorescent technique or Immunohistochemistry for diagnostic histopathology

Pranom Puchadapirom*

*Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Ratthewee, Bangkok, Thailand 10400

*Corresponding author, E-mail address: pranom.puc@mahidol.ac.th

Abstract

Immunofluorescent and immunohistochemistry are pillars of modern diagnostic techniques, which are Antigen-Antibody complex basis. Both techniques are sensitive and highly specific to particular antigen. However, immunofluorescent differs from immunohistochemistry in many aspects. For example, tissue collection and preparation, chemical reactions, fluorescent microscope and/or confocal laser scanning microscope versus compound microscope. Furthermore, some sensitive tissues such as kidneys need to be collected and preparedly with different methods. The Antigen-Antibody complexes in kidney are destroyed by formalin solution, thus freshly kidneys are suggested. To summarize, pathologists who use Immunofluorescent and Immunohistochemistry for diagnosis should realize that the proper techniques of collecting and preparing specimen could lead to the accurate results.

Keywords: Immunofluorescent, Immunohistochemistry, Antigen-Antibody complex

การเลือกใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์หรือวิธีอิมมูโนฮีสโตเคมี เพื่อการวินิจฉัยเนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา

ปรานอม ภูชฎาภิรมย์*

*ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: pranom.puc@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และอิมมูโนฮีสโตเคมี เป็นเทคนิคการวินิจฉัยสมัยใหม่ที่อาศัยหลักการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี เทคนิคทั้งสองนี้มีความไวและความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตามเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์มีความแตกต่างจากเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีหลายประการด้วยกัน เช่น วิธีการเก็บและเตรียมตัวอย่าง ปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ และ/หรือกล้องคอนโฟคอล กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ เป็นต้น นอกจากนั้น เนื้อเยื่อบางชนิด อาทิ เนื้อเยื่อไตต้องการวิธีการเก็บและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อแตกต่างจากเนื้อเยื่อชนิดอื่น เนื่องจากสารประกอบที่เกิดจากการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในเนื้อเยื่อไตจะถูกทำลายด้วยสารละลายฟอร์มาลิน จึงจำเป็นต้องเลือกใช้เนื้อเยื่อไตสดในการตรวจวินิจฉัย กล่าวโดยสรุป นักพยาธิวิทยาที่ตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และ/หรืออิมมูโนฮีสโตเคมี จะต้องตระหนักอยู่เสมอว่าการเก็บและเตรียมตัวอย่างที่ถูกต้องจะสะท้อนถึงผลตรวจที่ถูกต้องแม่นยำ

คำสำคัญ : อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์, อิมมูโนฮีสโตเคมี, แอนติเจนและแอนติบอดี

บทนำ

Coons และคณะ (Coons et al., 1941) คิดค้นวิธีวินิจฉัยทางพยาธิชีววิทยาในยุคแรก ๆ โดยอาศัยการตรวจแยกชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีที่จำเพาะในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยการติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) จึงเรียกวิธีการตรวจดังกล่าวว่า อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescent) ปัจจุบัน มีสีย้อมหลายชนิดและหลายสีให้เลือก เช่น Fluorescein isothiocyanate (FITC), Arexafluor, Tetramethyl Rhodamine (TRITC), Rhodamine Red-X (RRX), Texas Red (TR), Cyanine (Cy_2), Indocarbocyanine (Cy_3), Indodicarbocyanine (Cy_5) เป็นต้น

เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์เป็นวิธีตรวจหาตำแหน่งของแอนติเจนในเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้อย่างแม่นยำ อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้มีข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัย คือ ต้องทดสอบในเซลล์หรือเนื้อเยื่อสด (fresh tissue) จึงเห็นขอบเขตและรายละเอียดของเซลล์หรือเนื้อเยื่อไม่ชัดเจน เมื่อย้อมแล้วไม่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สีฟลูออเรสซีนจะเสื่อมเมื่อถูกแสงสว่าง ตัวอย่างที่ย้อมแล้วเก็บไว้ศึกษาต่อไม่ได้นาน (van der Loos,1999) ตลอดจนกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้อ่านผลเนื้อเยื่อจะต้องเป็น fluorescent microscopy หรือ confocal laser scanning microscopy (CLSM) เท่านั้น

ต่อมาในปี 1967 ได้มีผู้คิดค้นเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี (immunohistochemistry) หรืออิมมูโนเอนไซม์ (immunoenzyme-histochemistry) โดยประเภทของเอนไซม์ที่นิยมใช้ คือ เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase) จึงนิยมเรียกวิธีนี้ว่า อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส (immunoperoxidase) หลักการของวิธีนี้ คือ เป็นปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีในเนื้อเยื่อ โดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับซับสเตรตที่จำเพาะทำให้เกิดสีขึ้น โดยสีนี้จะมีความคงทนและสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Nakane and Pierce, 1967) อย่างไรก็ตาม สารละลายฟอร์มาลินมีผลกับโปรตีนในเนื้อเยื่อ (Shi et al., 1991; Long and Buggs, 2008) โดยทำให้แอนติเจนบางชนิดเสื่อมสภาพ ความสามารถของแอนติบอดีในการจับแอนติเจน (antigenicity) ลดลง หรือโปรตีนบางตัวอาจจะถูกทำลายทั้งหมด เมื่อเก็บรักษาอยู่ ในฟอร์มาลินเป็นเวลานาน

เนื่องจากมีความเชื่อว่าการเก็บรักษาเนื้อเยื่อในสารละลายฟอร์มาลินมีผลทำให้บดบัง epitope ดังนั้น เนื้อเยื่อที่จะนำมาศึกษา immunohistochemistry จึงไม่ควรอยู่ในสารละลายฟอร์มาลินเป็นเวลานานอนึ่ง มีนักวิจัยพยายามทดลองเปิด epitope โดยเลือกใช้วิธีการต่างๆ อาทิ เอนไซม์ trypsin หรือ protease (Huang et al., 1976; Denk et al., 1977; Qualman et al., 1979; Curran and Gregory, 1997) การใช้ความร้อนเพื่อสลายหรือเปลี่ยนแปลง cross-linked effect โดยใช้เครื่องอบไอน้ำ (autoclave) และหม้ออบไอน้ำ (pressure cooking) ตามลำดับ ปัจจุบันนิยมใช้ไมโครเวฟ (Shin et al., 1991; Shi et al., 1991; Norton, 1994) ซึ่งอธิบายการทำงานโดย Leong (Leong and Leong, 2007)

ปัจจุบัน ทั้งสองเทคนิคได้พัฒนามากขึ้นโดยเฉพาะเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ได้มีผู้พยายามใช้ชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินที่ฝังในบล็อกพาราฟินมาทำการย้อม โดยใช้เอนไซม์ trypsin ช่วยย่อย อาทิ การศึกษาชิ้นเนื้อไตที่ฝังในพาราฟินของ Howie et al. (1990) และ Moline et al. (2005) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ให้ผลการย้อมไม่ดีเท่าชิ้นเนื้อสด นอกจากนี้ยังพบว่า Complement 3 (C_3) ถูกทำลาย (Howie et al., 1990)

ล่าสุดมีการใช้ สี sudan black B (Viegas et al., 2007; Bashong et al., 2001; Sun et. al., 2011) เพื่อแก้ไขการเกิดการติดสีแบบ autofluorescent ซึ่งมักเกิดในเนื้อเยื่อตับตับอ่อน ไต และเส้นเลือดที่ผ่านการเก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลิน โดยย้อมสี 0.1% sudan blackB ในขั้นตอนหลังจากการกู้แอนติเจน (antigen retrieval) อย่างไรก็ตามการแก้ไขด้วยวิธีนี้ต้องอ่านภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (confocal Laser Scanning Microscope; CLSM) ซึ่งก็ให้ผลดี

ส่วนการพัฒนาเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี หรือเทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดสนั้นปกติจะใช้ชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินและฝังในบล็อกพาราฟินมาทำการตัด-ย้อม เทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยมีการนำชิ้นเนื้อตัวอย่างพาราฟินที่เจาะด้วยเข็ม (tissue microarray) มาทำการย้อม ทำให้ประหยัดสารเคมีต่างๆและลดเวลาที่ใช้ในการย้อม ในส่วนของสีย้อมที่จับกับแอนติบอดีได้ถูกพัฒนาจนสามารถตรวจหาแอนติเจนได้หลายตัวและหลายสีบนเนื้อเยื่อเดียวกัน (Van der Loos et al., 1989, 1993, 1999; DiVitoetal., 2004; Robertson et al., 2008) อีกทั้ง

แอนติเจนที่อาจถูกทำลายหรือบดบังไปจากการแช่ในสารละลายฟอร์มาลีน (Shi et al., 1991) น้ำยาที่ใช้กู้แอนติเจนโดยทั่วไปใช้ Citrate buffer pH 6 ปัจจุบันมีผู้ค้นพบสารใหม่ๆ ที่ให้ผลดีกว่าได้แก่ 0.05% Citraconic anhydride pH 7.4 (Namimatsu etal., 2005; Long and Haffajee, 2010)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกเทคนิคในการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ปัจจัยที่มีต่อผลการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และอิมมูโนฮีสโตเคมี ได้แก่ตัวอย่างชิ้นเนื้อ วิธีการเก็บและการเตรียมชิ้นเนื้อ สารเคมีต่างๆ (reagent) ตลอดจนวิธีย้อม (Bosman et al., 1983; Curran and Gregory, 1978; Evers and Uylings, 1994; Shi et al., 1995) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เป็นเทคนิคที่ให้ผลการย้อมดีในตัวอย่างชิ้นเนื้อสด ในเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเซลล์ต้นกำเนิด มีความไว และมีความความจำเพาะในการตรวจสูง เนื่องจากสารต่างๆในเซลล์หรือเนื้อเยื่อไม่ถูกทำลายจากวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างด้วยสารเคมี

- **การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ**โดยปกติจะเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อสดและทำการแช่แข็งทันทีโดยใช้น้ำยาเฉพาะ (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound) หยดก่อนนำชิ้นเนื้อวาง ทั้งนี้จะทำบนน้ำแข็งแห้ง หรือจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว หรือไอโซเพนเทนก็ได้ ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บโดยวิธีนี้จะรักษารูปร่างและยังคงคุณสมบัติของแอนติเจนที่ดี การเก็บเนื้อเยื่อแบบค่อยๆ ทำให้เย็นและแข็งตัวช้าๆ จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเนื้อเยื่อทำให้คุณภาพเนื้อเยื่อด้อยลง เป็นอุปสรรคในการอ่านผล (ศ.สมเนตร บุญพรรคนาวิก, กัลลยานี ดวงฉวี; 2540) ตัวอย่างที่เก็บอยู่ในน้ำยา Tissue-Tek® สามารถเก็บที่อุณหภูมิ -70°C ได้นานหลายเดือน
- **การเตรียมตัวอย่าง** การย้อมด้วยเทคนิคนี้มักเตรียมตัวอย่างจากชิ้นเนื้อสดแช่แข็ง (fresh frozen tissue) โดยจะต้องทำการตัดเป็นแผ่นบางๆ ที่อุณหภูมิ -25°C โดยใช้เครื่องไครโอเซคชั่น (Cryosection) แล้วทำการตรึงเนื้อเยื่อและย้อมในวันเดียวกัน หากไม่สะดวกอาจตัดแล้วเก็บที่ อุณหภูมิ 4°C ได้ไม่เกินยี่สิบสี่ชั่วโมง (ศ.สมเนตร บุญพรรคนาวิก และกัลลยานี ดวงฉวี, 2540)
- **การย้อมวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์** ทำได้ 2 แบบ คือแบบตรง และแบบอ้อม

- Direct immunofluorescent (DF) เป็นการย้อมขั้นตอนเดียวไม่ซับซ้อน โดยแอนติเจนจะเข้าจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่จำเพาะต่อกัน

- Indirect immunofluorescent (IFA) มีสองขั้นตอนเป็นอย่างน้อย กล่าวคือขั้นตอนแรกแอนติเจนเข้าจับกับแอนติบอดีตัวแรก (primary antibody) ที่จำเพาะต่อกันก่อน จากนั้นขั้นตอนที่สองแอนติบอดีตัวที่สอง (second antibody) ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจะเข้าจับกับแอนติบอดีตัวแรก อีกที วิธี IFA นี้นิยมใช้ตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่ม (serum) ผู้ป่วยทั้งในคนและสัตว์ที่ป่วยด้วยโรคต่างๆ และสามารถตรวจระดับ (titer) ของแอนติบอดี เพื่อดูความรุนแรงของโรคได้ นอกจากนี้ยังสามารถดัดแปลงการทดสอบให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยใช้ตัวกลางระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เพื่อเพิ่มความไวในการทดสอบ เช่น protein A bridge, biotin-avidin bridge เป็นต้น

การอ่านผล ต้องอ่านผลในห้องมืด โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนต์ หรือกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วย เลเซอร์ (CLSM)

ข้อดีของเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

1. การย้อมแบบ DF ใช้ตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะในชิ้นเนื้ออวัยวะคนหรือสัตว์ป่วย โดยสามารถจำแนกชนิดของโรคและติดตามความรุนแรงของโรคได้ เช่น โรคไต (Howie et al., 1990) โรคมาเลเรีย (Wilairatana etal., 2000) เป็นต้น

2. ในการตรวจทางซีรั่มวิทยา (serology) ด้วยการย้อมแบบ IFA สามารถใช้ประกอบการตรวจแยกชนิดของโรคที่เกี่ยวกับออโต้อิมมูน (autoimmune) โดยอาศัยรูปแบบ (pattern หรือ type) ของการติดสีที่จำเพาะ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรค ได้แก่ การตรวจหา antinuclear antibody (ANA) หรือ antinuclear factor (ANF) การตรวจหา antinutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)ในผู้ป่วยโรค systemiclupus erythematosus (SLE) โรคข้อ (rheumatoid arthritis) และการตรวจหา anti-GBM (Anti-glomerular basement membrane antibody) เพื่อพิสูจน์โรค Rapidly Progressive glomerulonephritis (RPGN) (นภารัตน์ แก้วเกื้อกูล และศิวดี เหลืองสุวรรณ, 2553) ทั้งนี้จะพบรูปแบบการติดสีที่จำเพาะและสัมพันธ์กับโรค เช่น การตรวจANCA จะมีรูปแบบการติดสีสารเรืองแสง 2 รูปแบบ ได้แก่ Cytoplasmic-ANCA (c-ANCA) และ Perinuclear-ANCA (p-ANCA) เป็นต้น

(Boonpucknavig and Vittiviroja, 1976; Kemmett et al., 1991; Segelmark et al., 1994)

- c-ANCA คือ ANCA ที่ให้ผลการติดสีสารเรืองแสงของ fluorescein ทั่วไปในบริเวณ cytoplasm

- p-ANCA คือ ANCA ที่ให้ผลการติดสีสารเรืองแสงของ fluorescein ใน cytoplasm บริเวณรอบๆ นิวเคลียส

ในกลุ่มโรคหลอดเลือดอักเสบขนาดเล็ก Wegener's granulomatous (WG) ซึ่งตรวจพบ ANCA สูงถึงร้อยละ 90 ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง และร้อยละ 80-95 ของ ANCA ที่ตรวจพบใน WG จะเป็นชนิด c-ANCA (Hauschild et al, 1993)

3. นอกจากนี้ด้วยวิธี IFA ยังสามารถใช้ตรวจหาปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธีเจือจาง (dilution) ที่ระดับต่างๆ เพื่อดูความรุนแรงของโรค และใช้ติดตามการรักษาโรคได้อีกด้วย

ข้อเสียของเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

1. การย้อมโดยใช้เทคนิคนี้มีความยุ่งยากในการเก็บและเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ เนื่องจากต้องเตรียมจากชิ้นเนื้อสด หรือชิ้นเนื้อแช่แข็ง (snap frozen) ซึ่งนอกจากจะต้องทำด้วยความรวดเร็วแล้ว การตัดชิ้นเนื้อสดด้วยเครื่องไครโอเซคชั่นต้องอาศัยความชำนาญ โดยเฉพาะเนื้อสดที่มีไขมันมากจะตัดยาก เช่น ตัวอย่างชิ้นเนื้อจากเต้านม กระดูกกระดูกอ่อน (Bataille et al., 2006)

2. การย้อมโดยใช้เทคนิคนี้ต้องทำในวันเดียวกันและอ่านผลทันที นอกจากนี้สไลด์ที่ย้อมแล้วไม่สามารถเก็บไว้ได้นานและต้องเก็บไว้ที่ 4°C มิให้ถูกแสง

3. การอ่านผลต้องใช้ความชำนาญ และต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซ็นต์และต้องอ่านผลในห้องมืด หรือกล้องจุลทรรศน์ส่องกราดด้วยเลเซอร์ (CLSM)

เทคนิคอิมมูโนอีสโตเคมี โดยวิธีอิมมูโนเปอร์-ออกซิเดสสามารถใช้ได้ทั้งตัวอย่างชิ้นเนื้อสด ชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาในฟอร์มาลิน และชิ้นเนื้อเรซิน (rasin embedded-block)

- **การเก็บตัวอย่าง** การนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลิน ทำให้ง่ายและสะดวกในการเก็บและส่งต่อตัวอย่างชิ้นเนื้อ

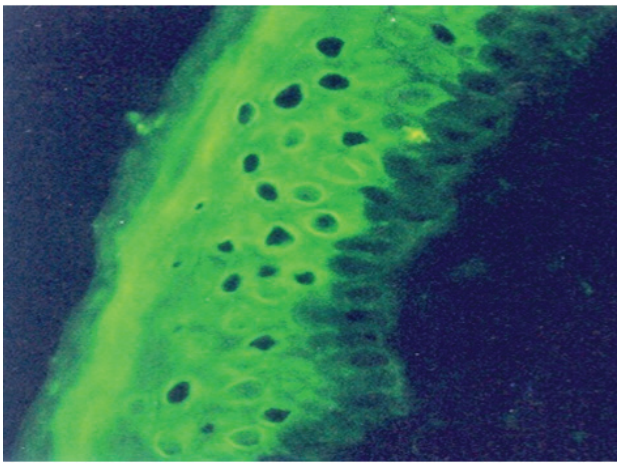
- **การเตรียมตัวอย่าง** สามารถใช้ชิ้นเนื้อที่เก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินและฝังในบล็อกพาราฟิน (paraffin embedded tissue) มาตัดเป็นแผ่นบางๆ (section) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เครื่องไมโครโตม (microtome) ชิ้นเนื้อที่ตัดเป็นแผ่นบางแล้ว หากไม่นำไปย้อมสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ประมาณหนึ่งปี ส่วนตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟินสามารถเก็บไว้ได้นานนับ 10 ปี อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับ tissue microarray ต้องเก็บที่ 4°C (DiVito et al., 2004)

- การย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดสเป็นวิธีการหนึ่งของเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี เทคนิคนี้ใช้สำหรับการแยกชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยอาศัยหลักการปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (antigen-antibody interactions) โดยมีเอนไซม์ และ chromogen ที่เหมาะสมมาทำปฏิกิริยาให้เกิดสีขึ้นจนสามารถมองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ในทางพยาธิวิทยาจึงนิยมนำมาย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อวินิจฉัยแยกโรคใช้ตรวจหาชนิดของเนื้องอก (tumor markers) ตัวรับฮอร์โมน โปรตีน แบคทีเรีย และไวรัส

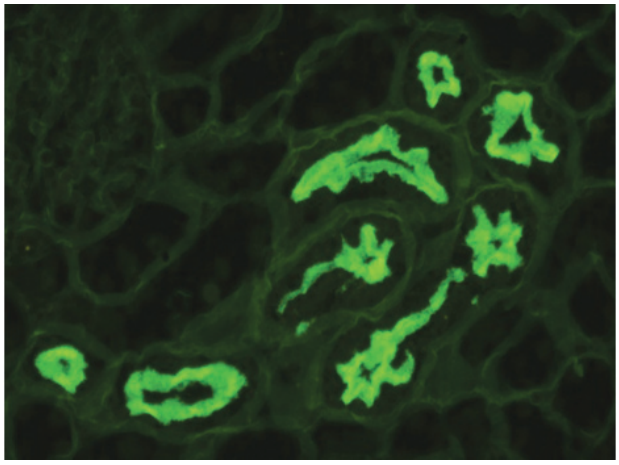
ตัวอย่างเอนไซม์ที่นิยมใช้ ได้แก่ Horse radish peroxidase (HRP) โดยสามารถใช้ร่วมกับ chromogen ได้หลายชนิด เช่น 3, 3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ให้สีน้ำตาลเข้ม ส่วน 3-amino-9-ethylcabazole (AEC) ให้สีแดงเข้มเอนไซม์ตัวอื่นๆ ซึ่งนิยมใช้รองจาก Horse radish peroxidase ได้แก่ alkaline phosphatase (ALP) โดยทำปฏิกิริยากับ fast red (TR) และ fast blue (BB)

เนื่องจาก Chromogen ซับสเตรตเป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะของเอ็นไซม์ เช่น DAB ซับสเตรต และ AEC ซับสเตรตจะทำปฏิกิริยากับ Horse radish peroxidase (HRP) จึงไม่สามารถนำไปใช้กับปฏิกิริยา alkaline phosphatase (ALP) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้สามารถใช้เทคนิคการย้อมหลายสีบนเนื้อเยื่อเดียวกัน เช่น ในการย้อมสองสี (double stain) เพื่อตรวจหาแอนติเจนสองชนิดบนเนื้อเยื่อเดียวกันทำได้โดยย้อมแอนติบอดีตัวแรกด้วยเอนไซม์ HRP และใช้ DAB ซับสเตรต ซึ่งให้สีน้ำตาลเข้มส่วนแอนติบอดีอีกตัวย้อมด้วยเอนไซม์ ALP และใช้ TR ซับสเตรตให้สีแดง เป็นต้น

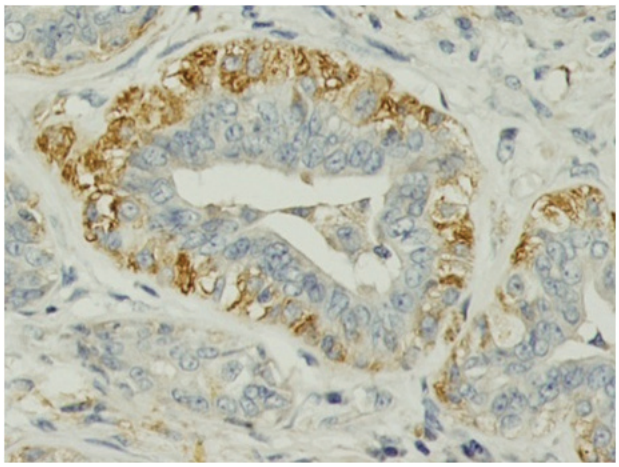
การอ่านผล เทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีสามารถอ่านผลการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Light microscope (LM))



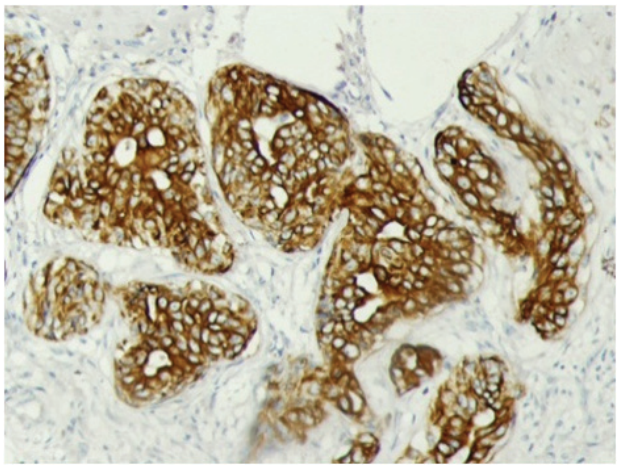
รูปที่ 1 ชิ้นเนื้อสดแช่แข็ง (frozen section) ผิวหนังผู้ป่วยมาเลเรีย (biopsy) ย้อมด้วยวิธี Direct Immunofluorescent แสดงการติด TNF α



รูปที่ 2 เนื้อเยื่อไตหนู (paraffin section) ย้อมด้วยวิธี Direct Immunofluorescent แสดงผลการย้อมเชื้อไข้ฉี่หนู (Leptospiral) บริเวณ renal tubules



รูปที่ 3 เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมสุนัข (paraffin section) ย้อมด้วยเทคนิค Immunoperoxidase แสดงการติดสีของเอสโตรเจนรีเซปเตอร์ (Estrogen receptor, ER)



รูปที่ 4 เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมสุนัข (paraffin section) ย้อมด้วยเทคนิค Immunoperoxidase แสดงการติดสีของ AE1/AE3

ข้อดีของเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี

1. เทคนิคนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อสด นักพยาธิวิทยาสามารถใช้ชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ผ่านการเก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินมาใช้ในการย้อม ทำให้เห็นรายละเอียดของเซลล์เนื้อเยื่อชัดเจนกว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อสด นอกจากนี้ยังง่ายและสะดวกในการเก็บและส่งต่อตัวอย่างชิ้นเนื้อ โดยเฉพาะในงานวิจัยที่ต้องเก็บอวัยวะครั้งละมากๆ

2. การที่ตัวอย่างชิ้นเนื้อฝังอยู่ในบล็อกพาราฟินทำให้สะดวกในการเก็บรักษา และสามารถเก็บได้นาน

3. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ย้อมแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน และสามารถตรวจดูได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่ห่างไกล ไม่สะดวกในการเตรียมชิ้นเนื้อแช่แข็ง หรือไม่มีกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ข้อเสียของเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี

1. ขั้นตอนการย้อมยุ่งยากและกินเวลานานกว่าการใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมีต้องเริ่มตั้งแต่การเก็บรักษาเนื้อ แล้วจึงนำมาฝังลงบล็อกพาราฟินจากนั้นนำมาตัด-ย้อม อีกทั้งต้องผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์เปอร์เซนต์ต่างๆ เพื่อให้เนื้อเยื่อเก็บได้นาน

2. การเก็บรักษาตัวอย่างชิ้นเนื้อในสารละลายฟอร์มาลินทำให้โปรตีนหรือแอนติเจนถูกทำลายหรือบดบังไปบางส่วนหรือทั้งหมด (Shi et al., 1991) จึงทำให้ผลการย้อมไม่ดีเท่าเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์อย่างไรก็ตามแอนติเจนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ฮอร์โมน อาทิ เชื้อเลปโตสไปร่า เชื้อไวรัสพิษสุนัขบ้า (Umoh and Blenden, 1981) เชื้อ Coxsackie B (Riggs and Brown, 1960) ฮอร์โมนจำพวก polypeptide hormone เช่น growth hormone ของต่อมพิทูอิตารี (Leznoff et al., 1960) สามารถใช้เนื้อเยื่อที่เก็บรักษาในฟอร์มาลินได้ แต่ต้องผ่านขบวนการ antigen retrieval ก่อนนำไปย้อม

สรุป

เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และเทคนิคอิมมูโน-ฮีสโตเคมี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ย้อมชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเซลล์ต้นกำเนิด ทั้งสองเทคนิคสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยได้ทั้งตัวอย่างเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ นอกจากนี้ทั้งสองเทคนิคยังนิยมใช้ในงานวิจัยอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อในสัตว์ทดลอง หรือการศึกษาเซลล์ต้นกำเนิด

การวินิจฉัยและจำแนกโรคบางอย่างอาจอาศัยการซักประวัติ สังเกตอาการ ก็สามารถวินิจฉัยโรคได้ แต่โรคบางชนิดไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้โดยอาศัยวิธีการดังกล่าว โดยเฉพาะการจำแนกโรคมะเร็งชนิดต่างๆ โรคไต โรคที่เกี่ยวกับออโต้อิมมูน ซึ่งโรคดังกล่าวจะต้องใช้ผลการย้อมทางจุลกายวิภาคหรือด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ และ/หรือเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเคมี เพื่อประกอบการวินิจฉัย หรือจำแนกโรค ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการวางแผนการรักษาและการพยากรณ์โรค โดยเฉพาะโรคไต เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์สามารถช่วยจำแนกชนิดของโรคโดยอาศัยรูปแบบของการติดสีที่จำเพาะ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรค (Howie et al., 1990; นภารัตน์ แก้วเกื้อ และศิวดี เหลืองสุวรรณ, 2553) ส่วนการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยา (serology) ด้วยเทคนิค IFA ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเกี่ยวกับออโต้อิมมูน หรือโรคไตชนิด lupus nephritis จะตรวจหา Antinuclear antibody (ANA), Antinutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) หรือ anti-GBM (Anti-glomerular basement membrane antibody)

การย้อมโดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดสใช้ในงานวิจัยและงานประจำในการวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็งเพื่อการรักษา โดยตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะของเนื้องอก (tumor markers) ซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็น monoclonal antibody และ Polyclonal antibody ในเนื้อเยื่อผู้ป่วย นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดสในการศึกษาวิจัยสัตว์ทดลอง เช่น การตรวจหา AE1/AE3 เพื่อแยกชนิดความรุนแรงของมะเร็งเต้านมในสัตว์ (Toniti et al., 2010) หรือใช้ติดตามการรักษาโรคมะเร็ง ตลอดจนใช้ตรวจแยกชนิดความรุนแรงของมะเร็งเต้านมในสัตว์ (Toniti et al., 1999, 2010) เป็นต้น

การเลือกย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคอิมมูโน-ฟลูออเรสเซนต์หรือเทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดส เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติเจน นอกจากจะพิจารณาจากเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่แล้วควรจะพิจารณาถึงความสะดวกรวดเร็ว ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างจำนวนมาก และอวัยวะหลายชนิด โดยเฉพาะในงานวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลองจำนวนมาก นอกจากนี้ยังจะต้องพิจารณาเลือกเทคนิคที่

เหมาะสมโดยคำนึงถึงชนิดของแอนติเจนในเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจหา หากเป็นแอนติเจนหรือโปรตีนที่ไม่ถูกทำลายหรือสลายตัวเมื่อผ่านการเก็บรักษาในสารละลายฟอร์มาลินและขบวนการต่างๆ ก็สามารถเลือกใช้เทคนิคเทคนิคอิมมูโนเปอร์ออกซิเดสถึงแม้จะใช้ระยะเวลาการทำงานที่ยาวนานกว่า แต่สามารถเก็บรักษาตัวอย่างทั้งที่อยู่ในรูปบล็อกพาราฟิน และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ย้อมแล้วได้ง่ายและนานกว่า อีกทั้งโครงสร้างของเซลล์ก็ยังเห็นชัดเจนทั้งที่ติดสีบวกและลบ แต่ถ้าหากเป็นแอนติเจนที่ถูกทำลายได้ง่ายหรือเป็นแอนติเจนที่ถูกทำลายด้วยสารละลายฟอร์มาลินก็ควรเลือกย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

Reference

นภารัตน์ แก้วเกื้อกูล,ศิวดี เหลืองสุวรรณ. การตรวจหา anti-body GBM antibody ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์. เวชศาสตร์บันทึกศิริราช 2553; 3(3).

สมเนตร บุญพรรคนาวิก, กัลลยานี ดวงฉวี. อิมมูโน-ฟลูออเรสเซนต์ ฉบับปรับปรุง. หจก.บี.เจ เพลท โปรเซสเซอร์; 2540.

Bashong W., Suetterliw R., Laeng R.H. Control of autofluorescent of archival formaldehyde- fix, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). J. Histochem. Cytochem. 2001; 49(12): 1556-1572.

Bataille F., Troppmann S., Klebl F., Rogler G., Stoelcker B., Hofstadter F. Bosserhoff A.K., Rummele P. Multiparameter immunofluorescence on paraffin-embedded tissue section. App. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2006; 14(2): 225-228.

Boonpucknavig S. & Vuttivirojana O. Correlation of betweenimmunological parameters and disease activity of Systemic Lupus Erythematosus. Mod. Med. Asia. 1976b; 12: 13-15.

Bosman F.T., Cramer-Knijnenburg G. and Bergen Henegou W.J. Efficiency and sensitivity of indirect immunoperoxidase methods. Histochemistry. 1983; 77: 185-194.

Curran R.C., Gregory J. The unmasking of antigens in paraffin section of tissue by trypsin. Esperientia. 1997; 33: 1400-1.

Curran R.C., Gregory J. Demonstration of immuno-globulin in cryostat and paraffin sections of human tonsil by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. Effects of processing on immuno-histochemical performance of tissue and on the use of proteolytic enzymes to unmask antigens in section. J. Clin.Pathol. 1978; 31: 974-983.

Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.). 1941; 47: 200-202.

Denk H., Radaszkiewicz T. and Weirich E. Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabeled antibody-enzyme (PAP) technique. J. Immunol.Meth. 1977; 15: 163-167.

DiVito K.A., Charette L.A., RimmD.L.,CampR.L. Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. Lab. Invest. 2004; 84(8): 1071-1078.

Evers P. and Uylings H.B. Microwave-stimulated antigen retrieval is PH and Temperature dependent. J. Histochem. Cytochem.1994; 42: 1555-1563.

Hauschild S., Schmitt W.H., Csernok E., Flesch B.K.,Rautmann A., Gross W.L. ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular disease, rheumatic disorders and inflammatory bowel disease. Adv. Exp. Med. Biol.1993;336:245-251

Huang S., Minassian H., More J.D. Application of immunofluorescent staining in paraffin section improved by trypsin digestion. Lab. Inves. 1976; 35: 383-391.

Howie A.J., Gregory J., Thomson M.A., Adkins M.A., Niblett A.J. Technical improvements in the immunoperoxidase study of renal biopsy specimens. J. Clin. Patho. 1990; 40: 257-259.

Kemmett D., Harrison D.J., Hunter J.A.A. Antibodies to neutrophil cytoplasmic antigen (ANCA): A serological maker for sweetís syndrome. J Am Acad Dermatol. 1991; 24(6) June: 967-969.

Leznoff A., Fishman J., Goodfriend L., Mc Garry E., Beck J. and Rose B. Localization of fluorescent antibodies to human growth hormone in human anterior pituitary glands. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.). 1960; 104: 232-235.

Leong A.S., Haffajee Z. Citraconic anhydride: a new antigen retrieval solution. J Pathol. 2010 Jan; 42(1): 77-81.

Leong T.Y., Leong A.S. How dose antigen retrieval work? Adv. Anat. Pathol. 2007 Mar; 14(2): 129-31.

Long D.J. and Buggs C. Microwave oven-based technique for immunofluorescent staining of paraffin-embedded tissues. J. Mol. Hist. 2008 Feb; 39(1): 1-4.

Moline J., BreimerM.E., Svalander C.T. Immuno-peroxidase versus immunofluorescent is the assessment of human renal biopsies. Am. J. Kidney Dis. 2005; 45(4): 674-83.

Nakane P.K., Pierce G.B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. 1967; 16: 557-559.

Namimatsu S., Ghazizadeh M., Sugisaki Y. Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. J. Histochem. Cytochem. 2005 Jan; 53(1): 3-11.

Norton A.J., Jordan S., Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissue. J. Pathol. 1994; 173: 371-379.

Qualman S.J., Keren D.F. Immunofluorescence of deparaffinized, trypsin-treated renal tissue. Preservation of antigens as an adjunct to diagnosis of disease. Lab. Invest. 1979; 41: 483-9.

Rasmussen N. and Wiik S. Indirect immunofluorescence examination for IgG-ANCA in sera. APMIS. 1989; 96: 16-20.

Riggs J.L. & Brown G.C. Demonstration of virus antigen in human post mortem tissue by fluorescent antibody technique. Fed. Proc. 1960; 19: 402.

Robertson D., Savage K., Reis-filho J.S. and Isacke C.M. Multiple immunofluorescence labeling of formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. BMC Cell Biology. 2008; 9: 13.

Segelmark M., Baslund B. and Wiseslander J. Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. Clin. Exp. Immunal. 1994; 96: 458-465.

Shi S.R., KeyM.E., Kalra K.L. Antigen retrieval in formalin-fix, paraffin-embedded tissue: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. J Histochem. Cytochem. 1991; 39(6): 741-8.

Shi S-R., Imam A., Young L., Cote R.J., and Taylor C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of PH using monoclonal antibodies. J. Histochem.Cytochem. 1995; 43: 193 -201.

Shin R.W., Iwaki T., Kitamoto T., Tateishi J. Hydrate autoclave pretreatment enhances TAU immuno-reactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissue. Lab. Invest. 1991; 64: 693-702.

Sun Y., Yu H., Zheng D., Cao&Wang Y.,Harriss D., Wang Y. Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. Arch. Pathol. Lab. Med. 2011 Oct; 135(10): 1335-42.

Toniti W., Buranasinsup S., Kongcharoen A., Charoonrut P., Puchadapirom P., Kasorndorkbua C. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors. Asian Pacific J Cancer Prev. 2009; 10: 907-911.

Toniti W., Sirivisoot S., Jandee P., Srimontri P., Puchadapirom P., Doungchawee G., Kasorndorkbua C. AE1/AE3, Vimentin and p63 immunolocalization in canine mammary gland tumors: roles in differentiation between luminal epithelial and myoepithelial lineages. Asian Pacific J Cancer Prev. 2010; 11: 227-230.

Umoh J.U. and Blenden D.C. Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin fixed tissue after treatment with trypsin. Bull World Health Organ. 1981; 59(5): 737-744.

Van der Loos C.M. Microscopy handbooks 45. Immunoenzyme multiple staining methods. BIOSS Scientific Publishers Limited. 1999.

Van der Loos C.M., Becker A.E. and van den OordJ.J. Practical suggestions for successful immunoenzyme double staining experiments. Histochem.J.1993; 25: 1-13.

Van der Loos C.M., Das P.K., vandenOord J.J., Houthoff H.J. Multiple immunoenzyme staining techniques. Use of fluoresceinated, biotinylated and unlabelled monoclonal and unlabelled monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods. 1989; 117: 45-52.

Viegas M.S., Martin T.C., Seco F., do Carino A. An improved and cost-effective methodology for the reduction of autofluorescence in direct immunofluorescence studies on formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Eur. J. Histochem. 2007; 51(1): 59-66.

Wilairatana P., Riganti M., Puchadapirom P.,Punpoowong B., Vannaphan S., Udomsangpatch R., Krudood S., Brittenham M.G., Looareesuwan S. Prognotic significance of skin and subcutaneous fat sequestration in severe Falciparum malaria. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 2000; 31(2): 203-212.