

# การย้อมเชื้อสไปโรชีตด้วยวิธี Warthin-Starry โดยใช้เตาไมโครเวฟ

## Demonstration of Spirochetes by Warthin-Starry Method Using the Microwave Oven

ทริกา จันทมนะโชติ จิรา คงครอง และ สมจิตร รุจิขวัญ

Tharika Chantamaneechote, Chira Kongkrong and Somchit Ruchikuan

---

### Abstract

Histo slides of colon, being diagnosed swine dysentery, were stained by Werthin-Starry method for spirochete. In the staining process of silver impregnation and developer steps, microwave oven is used instead of incubater or water bath. The good result is by using microwave oven at 150 watt 5 minutes in the silver impregnation and at 150 watt 3 minutes in developer steps. The spirochetes staining are distinctly black and background are pale yellow to light brown. In addition, the staining time is 30 minutes less than the conventional staining method.

**Key words:** spirochetes, Warthin-Starry method, microwave oven

### บทคัดย่อ

นำสไลด์เนื้อเยื่อจากลำไส้ใหญ่ของสุกรที่เป็นโรคบิดมูกเลือด มาย้อมสีเพื่อหาเชื้อสไปโรชีต ด้วยวิธี Warthin-Starry โดยใช้เตาไมโครเวฟในขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อแทนการทำในตู้อบหรืออ่างควบคุมอุณหภูมิ ผลการทดลองพบว่า กำลังไฟฟ้าและเวลาที่ใช้ในการย้อมที่เหมาะสมในการดูดซับโลหะเงิน คือ 150 วัตต์ 5 นาทีและในขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อคือ 150 วัตต์ 3 นาที โดยเชื้อสไปโรชีตติดสีดำแยกจากส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งติดสีเหลืองอมน้ำตาลอย่างเด่นชัด การทดลองให้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถลดเวลาจากการย้อมแบบเดิมลงได้ประมาณ 30 นาที

**คำสำคัญ:** เชื้อสไปโรชีต , วิธี Warthin-Starry, เตาไมโครเวฟ

## บทนำ

เตาไมโครเวฟเป็นอุปกรณ์ที่ให้ความร้อนโดยแมคนิตรอนในเตาผลิตรกระจายคลื่นไมโครเวฟความถี่ 2,450 เมกกะเฮิร์ต มีลักษณะคล้ายกับคลื่นวิทยุและโทรทัศน์ แต่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าและความถี่สูงกว่า เมื่อสารละลายดูดซับพลังงานไมโครเวฟเข้าไป จะทำให้โมเลกุลสั่นสะเทือนโดยมีอัตราเร็วเท่ากับความเร็วของคลื่นไมโครเวฟ และเกิดการเสียดสีกันของโมเลกุล เป็นผลให้สารละลายมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าแหล่งให้ความร้อนทั่วไป (Login and Dvorak, 1994) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว เตาไมโครเวฟจึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือหุงต้มอาหารแทนเตา เนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว ต่อมาจึงมีการพัฒนานำเตาไมโครเวฟมาเพื่อช่วยลดเวลา ในการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา โดย Brinn (1983) สามารถลดเวลาย้อมสไลด์เนื้อเยื่อโดยวิธี methenamine silver staining จาก 180 นาที เหลือ 20 นาทีและสามารถลดเวลาในการย้อมวิธี Pascual's modification of Grimelius', Masson-Fontana และ Perls' นอกจากนี้ได้มีการนำเตาไมโครเวฟมาใช้อ้อมสไลด์เนื้อเยื่ออีกหลายวิธี เช่น alcian blue-periodic acid-Schiff stain (Matthews and Kelly,1989), Steiner method (Swischer,1987) , Grocott's methenamine silver nitrate (Loughman,1989), acid and alcohol fast staining(Hafiz et al.,1985), Warthin-Starry method (Churukian and Schenk,1988) และ Leong (1991) ย้อม สไลด์เนื้อเยื่อด้วยวิธี methamine silver stain, PAS stain และสามารถย้อมด้วยวิธี colloid silver nitrate staining for melanin เสร็จในเวลา 45 วินาที

การลดเวลาในการย้อมลงเป็นผลให้การชันสูตรโรคทางจุลพยาธิวิทยารวดเร็วขึ้น ทำให้สามารถรักษา ป้องกัน ควบคุมโรคได้ทันเวลา ซึ่งมีผลในการลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ

โรคที่เกิดจากเชื้อสไปโรซิต ที่ทำความเสียหายให้แก่ปศุสัตว์ เช่น leptospirosis, swine dysentery, porcine intestinal adenomatosis-complex (PIA-complex) มีวิธีการการชันสูตรที่แน่นอนทางจุลพยาธิวิทยา คือ การพบเชื้อบริเวณรอยโรคโดยการย้อมสีพิเศษ ซึ่งในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยามีหลายวิธี ได้แก่ Dieterle, Steiner and Steiner และ Warthin-Starry (Sheehan and Hrapchak, 1980) สำหรับวิธี Warthin-Starry นั้นเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะมีการเตรียมสารเคมีที่ไม่ยุ่งยากและมีขั้นตอนในการย้อมน้อยกว่าวิธีอื่น สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทถูกนำมาใช้ในการย้อมวิธีนี้เนื่องจากเชื้อสไปโรซิตมีคุณสมบัติในการดูดซับโลหะเงินให้มาเกาะบนตัวเชื้อ แต่ทั้งนี้ต้องอาศัยความร้อนและเวลาเพื่อให้โลหะเงินถูกดูดซับโดยสมบูรณ์ ซึ่งปัจจุบันขั้นตอนนี้จะทำในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) หรือตู้อบ (incubator) อุณหภูมิ 43°C รายงานครั้งนี้เป็นการนำเตาไมโครเวฟมาเป็นอุปกรณ์ให้ความร้อนในการย้อมสีแทนอ่างควบคุมอุณหภูมิหรือตู้อบ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการลดเวลาในการย้อมลง และเป็นแนวทางเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาวิธีย้อมสีอื่นๆ ในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

บล็อกเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ของสุกรที่พิสูจน์

แล้วว่าเป็นโรคบิดมูกเลือด (swine dysentery) และตรวจพบเชื้อสไปโรชีตด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยา ทั้งนี้บล็อกเนื้อเยื่อดังกล่าวผ่านการแช่ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน และผ่านกระบวนการทางจุลพยาธิวิทยาตามวิธีของ Luna (1960) แล้วนำมาตัดหนา 2-4 ไมครอน จำนวน 60 แผ่น จากนั้นซ้อนเนื้อเยื่อวางบนแผ่นสไลด์แก้ว แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

### การเตรียมสารละลาย

1. Acetic Acid-Glycine ,stock solution
 

Acetic acid,glacial ; AR grade	
(BDH : Prod.100015N)	0.3 ml
Glycine ; AR grade	
(BDH : Prod.101196X)	2.4 gm
Distilled water	100.0 ml
เก็บ stock solution ในตู้เย็น 3-6°C	
2. Acetic Acid-Glycine ,working solution
 

Acetic acid-glycine,stock solution	5.0 ml
Distilled water	500.0 ml
3. 0.5% Silver Nitrate
 

Silver nitrate ; AR grade	
(M&B : Prod. L810)	0.5 gm
Acetic acid-glycine, working solution	100.0 ml
4. 2% Silver Nitrate
 

Silver nitrate ; AR grade	
(M&B : Prod. L810)	2.0 gm
Acetic acid-glycine, working solution	100.0 ml
5. 4% Gelatin

Gelatin; Molecular biology grade	
(CALBIOCHEM® : Prod.345808)	4.0 gm
Acetic acid-glycine, working solution	100.0 ml
6. 0.15% Hydroquinone	
Hydroquinone ; GPR grade	
(BDH : Prod.300114E)	0.15 gm
Acetic acid-glycine, working solution	100.0 ml
7. Developer Solution	
2% Silver nitrate	10.0 ml
4% Gelatin	25.0 ml
0.15% Hydroquinone	15.0 ml

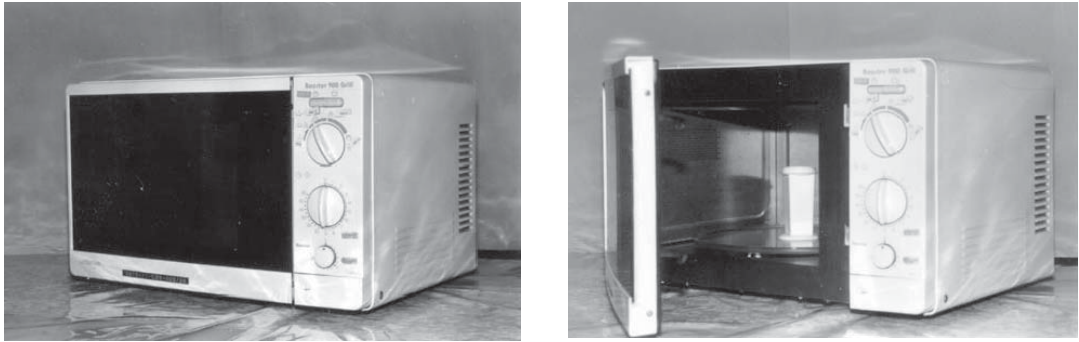
### วิธีการ

สไลด์เนื้อเยื่อจำนวน 60 แผ่น แบ่งเป็น 6 ชุดๆ ละ 10 แผ่น และในแต่ละชุดแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 5 แผ่น โดยแต่ละชุดทำการทดลองแบบซ้ำสองเพื่อหาความแม่นยำของอุณหภูมิและเวลาในการใช้เตาไมโครเวฟ ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

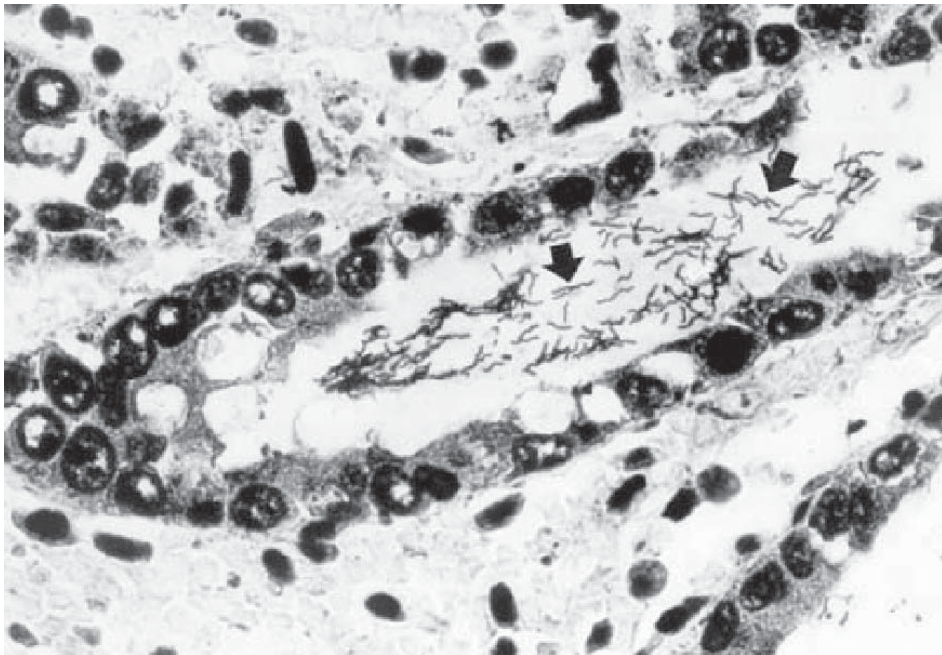
1. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อทั้งหมดใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ตามด้วย absolute ethanol 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที และ 70% ethanol 1 ครั้ง 3 นาที ตามลำดับ

2. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อดังกล่าวใน acetic acid-glycine, working solution 5 นาที

3. นำสไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 1 ผ่านขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในถ้อย้อมพลาสติกขนาด 50 ml ที่มี 0.5% silver nitrate 50 ml แล้วนำไปวางในเตาไมโครเวฟอีตาชิ รุ่น MR-8220 (ภาพที่ 1 - 2) โดยตั้งกำลังไฟฟ้าที่ 150 วัตต์ เวลา 3 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 60°C)



**Figure 1 -2** Using microwave oven (HITACHI MR-8220) in Warthin- Starry method



**Figure 3** Spirochetes in colonic-crypt of pig (arrow), Warthin-Starry staining (X100)

4. นำสไลด์เนื้อเยื่อออกจากไมโครเวฟแล้วนำไปผ่านขบวนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ โดยแช่ในถ้อย้อมพลาสติกที่มี developer solution ที่เตรียมใหม่ๆ แล้วนำไปวางในเตาไมโครเวฟ ตั้งกำลังไฟฟ้าที่ 150 วัตต์ เวลา 3 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 60°C)จนสารละลายและเนื้อเยื่อบนสไลด์เป็นสีเหลืองอมน้ำตาล

5. นำสไลด์เนื้อเยื่อออกจากเตาไมโครเวฟแล้วแช่ในน้ำก็อกอุณหภูมิ 56°C 10 วินาที

6. จุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 10 วินาที

7. นำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ใน 95% ethanol 3 นาที ตามด้วย absolute ethanol 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที และ xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที

8. หยดน้ำยา permount ลงบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

9. นำสไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 2-6 มาผ่านขบวนการเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ตั้งกำลังไฟฟ้าและเวลาของเตาไมโครเวฟต่างกัน ดังนี้

9.1 สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 2 ขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน ตั้งกำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ 5 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 75°C) และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ ตั้งกำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ 3 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 60°C)

9.2 สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 3 ขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน ตั้งกำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ 7 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 85°C) และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ ตั้งกำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ 3 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 60°C)

9.3 สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 4 ขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 1 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 65°C) และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 1 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 65°C)

9.4 สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 5 ขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 1.5 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 75°C) และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 1 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 65°C)

9.5 สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 6 ขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 2 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 85°C) และขั้นตอนการทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ ตั้งกำลังไฟฟ้า 400 วัตต์ 1 นาที (จะให้ความร้อนประมาณ 65°C)

10. นำสไลด์เนื้อเยื่อไปตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

## ผล

พบการติดสีของเชื้อสไปโรซิทที่มีรูปร่างเป็นเกลียวหลวมๆ ประมาณ 1 - 2 เกลียว ติดสีน้ำตาลถึงดำ อยู่ในช่องภายในลำไส้ (lumen) และในสวนคริปท์ (crypt) โดยสวนประกอบอื่น (background) ติดสีเหลืองถึงน้ำตาล แสดงในตารางที่ 1

**Table 1** Demonstration of spirochetes and background by Warthin - Starry method using the microwave oven in different power and time.

Set	Silver impregnation step	Developer step	Spirochetes	Background
1	150 watt, 3 min.	150 watt, 3 min.	brown	pale yellow
2	150 watt, 5 min.	150 watt, 3 min.	black	pale yellow to light brown
3	150 watt, 7 min.	150 watt, 3 min.	black	yellow to light brown
4	400 watt, 1 min.	400 watt, 1 min.	black	pale yellow to light brown
5	400 watt, 1.5 min.	400 watt, 1 min.	black	brown
6	400 watt, 2 min.	400 watt, 1 min.	black	dark brown

## วิจารณ์

จากการทดลองพบว่า ผลการย้อมที่เหมาะสมคือ สไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 2 โดยให้ความร้อนขณะย้อม ในขั้นตอนการดูดซับโลหะเงินด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 150 วัตต์ 5 นาที ซึ่งหลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดสีของเนื้อเยื่อบนสไลด์ที่ 150 วัตต์ 3 นาทีแล้ว เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีความแตกต่างระหว่างเชื้อซึ่งเป็นสีดำ แยกจากส่วนประกอบอื่นๆ ที่เป็นสีเหลืองและน้ำตาลเข้มอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) และสไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 4 ซึ่งให้ความร้อนในขั้นตอนการดูดซับโลหะเงิน 400 วัตต์ 1 นาที และขั้นตอนทำให้เกิดสีบนเนื้อเยื่อ 400 วัตต์ 1 นาที ก็ให้ผลดีใกล้เคียงกัน แต่ชุดที่ 2 ให้ความเข้มของสีบนเนื้อเยื่อสม่ำเสมอกว่า เพราะการใช้กำลังไฟฟ้าที่วัตต์ต่ำๆ แม้จะใช้เวลามากกว่า แต่จะมีการกระจายความร้อนของสารละลายสม่ำเสมอทั่วสไลด์ ในขณะที่การใช้วัตต์สูงจะมีความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิส่วนบนกับส่วนล่างของสไลด์ประมาณ 10°C เป็นผลให้เนื้อเยื่อที่อยู่ด้านบนของสไลด์มีสีเข้มกว่าด้านล่าง ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Churukian and Schenk (1988) ซึ่งใช้ไมโครเวฟ Litton Model 1450 ย้อมเชื้อสไปโรซิทที่วัตต์ต่ำได้ผลดีกว่าการย้อมที่วัตต์สูง

สำหรับสไลด์เนื้อเยื่อชุดที่ 1 เชื้อสไปโรซิทติดสีน้ำตาล เนื่องมาจากอุณหภูมิต่ำและใช้เวลาน้อย ทำให้การดูดซับโลหะเงินไม่สมบูรณ์ Suurmeijer และคณะ (1990) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสารละลายของโลหะอยู่ระหว่าง 75-95°C ส่วนสไลด์ชุดที่ 3, 5, 6 เชื้อติดสีดำ และส่วนประกอบอื่นๆ ติดสีน้ำตาล

เข้ม ทำให้แยกเชื้อจากส่วนประกอบอื่นได้ยาก

Kok และ Boon (1992) ใช้ไมโครเวฟ Energy Beam Science รุ่น H 2500 ย้อมสไปโรซิทด้วยวิธี Warthin - Starry เช่นกัน โดยตั้งกำลังไฟฟ้า 450 วัตต์ นาน 5 นาที เมื่อทดลองใช้กับเตาไมโครเวฟที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่า ความร้อนสูงเกินไปทำให้สารละลายเดือดและกระเด็นออกจากภาชนะ จึงควรลดจำนวนวัตต์หรือลดเวลาลง สำหรับเตาไมโครเวฟอื่นๆ ก็เช่นเดียวกัน สามารถนำมาใช้ย้อมได้ แต่จะต้องทดสอบหาจำนวนวัตต์และเวลาที่เหมาะสมก่อน

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการย้อมเชื้อสไปโรซิทโดยใช้เตาไมโครเวฟเป็นอุปกรณ์ให้ความร้อน แทนการใช้ตู้อบหรืออ่างควบคุมอุณหภูมิ สามารถช่วยลดเวลาในการย้อมโดยวิธี Warthin-Starry แบบเดิมลงได้ประมาณ 30 นาที และให้ผลการทดลองเป็นที่น่าพอใจ เป็นวิธีที่สามารถชันสูตรโรคได้เร็วขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการความรวดเร็วในการวิเคราะห์ และเป็นรายงานเบื้องต้นที่จะนำเตาไมโครเวฟไปพัฒนาวิธีย้อมสีอื่นๆต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ลัดดา ตรวงศา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ที่กรุณาช่วยแก้ไข และตรวจทานต้นฉบับ

## เอกสารอ้างอิง

Brinn, N.T. 1983. Rapid metallic histological staining using the microwave oven. J Histotechnol. 6:125-129.

- Churukian, C.J. and Schenk, E.A. 1988. A Warthin Starry method for spirochetes and bacteria using a microwave oven. *J Histotechnol.* 11:149-151.
- Hafiz, S., Spencer R.C. and Lee, M. 1985. Use of microwave for acid and alcohol fast staining. *J Clin Pathol* 38:1073-1074.
- Kok, L.P. and Boon, M.E. 1992. Microwave cook book for Microscopists. 3<sup>rd</sup> ed., Coulomb Press Layden, Leiden. 189-190.
- Leong, A.S-Y. 1991. Microwave irradiation-appication in tissue fixation, processing and staining for light microscopy and electron microscopy. Proceeding of World Health Organization Bi-regional Training Course on Electron Microscopy in Biomedical Research and Diagnosis of Human Diseases. 28 October-1 November 1991 Faculty of Medicine. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 47-53.
- Login, G.R. and Dvorak, A.M. 1994. The microwave tool book. A practical guide for microscopists. Boston: Beth Israel Hospital : 1-3.
- Loughman, N.T. 1989. *Pneumocystis carinii* : Rapid diagnosis with a microwave oven. *Acta Cytol* 33:416-417.
- Luna, L.G. 1960. Manual of histologic staining method of the Arm Forces Institute of Pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Mc Graw-Hill Book company, New York. 1-28.
- Matthews, K. and Kelly, J.K. 1989. A microwave oven method for the combined alcian blue - periodic acid-Schiff stain. *J Histotechnol.* 12:295-303.
- Sheehan, D.C. and Hrapchak, B.B. 1980. Theory and practice of histotechnology. 2<sup>nd</sup> ed., The C.V. Mosby Company, St. Louis. 239-242.
- Swischer, B.L. 1987. Modified Steiner procedure for microwave staining of spirochetes and filamentous bacteria. *J Histotechnol.* 10:241-243.
- Suurmeijer, A.J.H., Boon, M.E. and Kok, L.P., 1990. Notes on the application of microwave in histopathology. *Histochem J.* 22:341-346.