การประเมินสูตรการย้อมสีปาปานิโคเลาที่ไม่ใช้ไซลีนต่อคุณภาพการติดสีของเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูกที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี: การศึกษานำร่อง

วาทินี อยู่ประยงค์ วท.บ., ณิชาภัทร มะโนแจ่ม วท.บ., พุทธลักษณ์ พุกเจริญ วท.บ., ธรรพ์ชนก อิ่มโอษฐ์ ม.6,
กฤษฎา ศรีสุรักษ์ ป.ว.ส., วินัย ไกรพันธ์ ม.ศ.3
โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี 15000

Abstract: Evaluation of Xylene-Free Method Papanicolaou Stain in the Assessment of Cervical Smears at Lopburi Cancer Hospital: A Pilot Study

Yooprayong W, Manochaem N, Pukcharoen P, Imaod T, Srisuruk K, Kraipan W
Lopburi Cancer Hospital, Mueang Lopburi, Lopburi, 15000
(E-mail: iyawa8@gmail.com)

Use of Xylene-free method Papanicolaou (Pap) stain. Aims: This study was an evaluation of Xylene-free method Papanicolaou stain in the assessment of cervical smears at Lopburi Cancer Hospital as an alternative method to conventional Pap stain : A pilot study. Materials and method : Paired cervical smears were obtained from 259 women. Two sets of cervical smears were prepared, which one was stained with conventional Pap stain and another was stained with Xylene-free method. The smears were examined for cytomorphological parameters and evaluated using a modification of parameters given by Gachie. Results : The quality of the cytomorphological of cytoplasms (Cell/Cytoplasmic borders and Cytoplamic Staining) and brown artifact observation from Xylene-free method are equivalent to conventional Pap stain, but the quality of the cytomorphological of nucleus (Nuclear borders and Chromatin staining) from Xylene-free method was lesser than the conventional Pap stain.

Keywords: Conventional Papanicolaou (PAP) stain, Xylene-free method, Cervical cytology

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาด้วยการย้อมสีปาปานิโคเลานั้นใช้ไซลีนซึ่งเป็นสารเคมีอันตรายในกระบวนการย้อม โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรีต้องการยกเลิกการใช้ไซลีน จึงได้ทำการศึกษาการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรที่ไม่ใช้ไซลีนต่อคุณภาพการติดสีของเซลล์ ที่ป้ายจากปากมดลูกที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี เป็นการศึกษานำร่อง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประเมินสูตรการย้อมสีปาปานิโคเลาที่ไม่ใช้ไซลีน (สูตรไม่มีไซลีน) ต่อคุณภาพการติดสีของเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูกที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี เทียบกับการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรที่ใช้อยู่ปัจจุบัน (สูตรมีไซลีน) ทำการทดลองโดยคัดเลือกตัวอย่างจากผู้หญิงทั้งหมด 259 ราย เตรียมสเมียร์สไลด์รายละ 2 แผ่น แผ่นแรกย้อมด้วยสีสูตรไม่มีไซลีน แผ่นที่ 2 ย้อมด้วยสูตรมีไซลีน วิเคราะห์และให้คะแนนจากการสังเกตคุณภาพการติดสีของเซลล์ตามแนวทางการวิจัยของ Gachie ผลการทดลองพบว่าคุณภาพของเซลล์ด้านการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสม และอัตราการเกิด Brown artifact จากกระบวนการย้อมสูตรไม่มีไซลีนเทียบเท่าสูตรมีไซลีน แต่คุณภาพการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียสของเซลล์จากกระบวนการย้อมสีสูตรไม่มีไซลีนด้อยกว่าสูตรมีไซลีน

คำสำคัญ: การย้อมสีแป๊ปสเมียร์ การย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรไม่มีไซลีน เซลล์วิทยานารีเวช

บทนำ

งานพยาธิวิทยากายวิภาค กลุ่มงานพยาธิวิทยา โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี ให้บริการตรวจเซลล์วิทยาระบบอวัยวะสืบพันธ์สตรีและเซลล์วิทยาระบบอื่นๆ โดยสิ่งส่งตรวจทางเซลล์วิทยานั้นจะถูกเตรียมลงบนแผ่นสไลด์แก้วแล้วนำมาย้อมสีด้วยกระบวนการย้อมสีปาปานิโคเลา จากนั้นจึงส่งต่อให้นักเซลล์วิทยาอ่านแปลผลต่อไป กระบวนการย้อมสีปาปานิโคเลาจะประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญดังนี้ 1.การรักษาสภาพเซลล์ 2.การย้อมสีนิวเคลียส 3.การย้อมสีซัยโตพลาสม 4.การทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใส หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการย้อมสี สเมียร์ที่ได้จะนำไปปิดด้วย cover slip อย่างถาวรด้วยสาร Mounting media เพื่อป้องกันเซลล์มิให้แห้ง เหี่ยวย่น และป้องกันไม่ให้สีจางลง ในขั้นตอนการย้อมสีซัยโตพลาสมนั้นจะใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลาย โดยจะใช้แทรกสลับเพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์รวมทั้งการล้างสีส่วนเกินออก แต่แอลกอฮอล์จะทำปฏิกิริยากับ Mounting media ทำให้เกิดฝ้ามัวบดบังเซลล์ ดังนั้นขั้นตอนสุดท้ายการทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใสจึงนับว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่ง ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้สารเคมีไซลีน (Xylene) มาเป็นตัวเชื่อมระหว่างขั้นตอนการใช้แอลกอฮอล์และ Mounting media แต่ไซลีนเป็นสารเคมีอันตราย มีพิษต่อร่างกาย มีกลิ่นฉุน ทำให้เกิดอาการมึนงง อ่อนเพลีย เวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน[1] แม้ว่าทางหน่วยงานจะปฏิบัติงานย้อมสีภายในตู้ดูดควัน แต่ด้วยโครงสร้างอาคารห้องปฏิบัติการเป็นจุดอับลม กลิ่นของสารเคมีจึงยังคงส่งผลกระทบต่อทั้งผู้ปฏิบัติงานย้อมและเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานภายในอาคารบริเวณใกล้เคียงห้องปฏิบัติการอยู่เสมอ อีกทั้งการกำจัดไซลีนที่ใช้แล้วของห้องปฏิบัติการไม่สามารถกำจัดด้วยกระบวนการบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี เนื่องจากไซลีนที่ทิ้งลงไปในระบบมีความเข้มข้นสูงส่งผลกระทบต่อกระบวนการบำบัดด้วยวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพของทางโรงพยาบาล เมื่อส่งต่อให้หน่วยงานภายนอกกำจัด ต้นทุนการย้อมสเมียร์จึงแพงขึ้นมาก ไม่คุ้มกับการลงทุนและแม้ว่าในปัจจุบันมีการใช้สารทดแทนไซลีนเรียกว่า Xylene Substitute ที่หลากหลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่ก็ยังคงมีราคา

ค่อนข้างแพง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาเพื่อลดหรือตัดกระบวนการใช้ไซลีนในขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อและการย้อมสี Hematoxylin และ eosin (H&E)[2-5] แต่ยังไม่พบว่ามีงานวิจัยใดที่ไม่ใช้ไซลีนหรือ Xylene Substitute ในกระบวนการย้อมแบบปาปานิโคเลาได้

ดังนั้นผู้ศึกษาจึงเกิดแนวคิดในการทดลองใช้สีย้อมปาปานิโคเลาสูตรไม่ใช้ไซลีนและ Xylene Substitute ขึ้น โดยศึกษาประเมินผลเบื้องต้นสูตรการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรใหม่ที่ไม่ใช้ไซลีน (สูตรไม่มีไซลีน) ต่อคุณภาพการติดสีของเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูกที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี ศึกษาเทียบกับการย้อมสีปาปานิโคเลาที่หน่วยงานใช้อยู่ในปัจจุบัน (สูตรมีไซลีน) แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ 1.การติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสม 2.การติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียสและ 3.การเกิด Pigment สีน้ำตาลเข้มบนเซลล์ (Brown artifact) โดยโรงพยาบาลมีจุดมุ่งหมายในการนำมาใช้ทดแทนการย้อมสูตรมีไซลีนต่อไปหากผลการประเมินพบว่าสเมียร์ที่ย้อมด้วยสูตรไม่มีไซลีนมีคุณภาพดีกว่าหรือเทียบเท่าสูตรมีไซลีน

วัตถุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง แบบตัดขวางใช้แบบแผนการศึกษาแบบเปรียบเทียบกับกลุ่ม เกณฑ์ คัดเลือกตัวอย่างการสมัครใจของผู้หญิงที่เข้ามารับการตรวจคัดกรองมะเร็งบริเวณปากมดลูกด้วยวิธี Liquid based preparations ที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี ในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม พ.ศ.2559 และลงลายมือชื่อในใบยินยอม จำนวน 259 รายเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ชุดอุปกรณ์การตรวจสไลด์แก้ว สไลด์สำหรับการตรวจ Liquid based cytology Cover slip เครื่องเตรียมสเมียร์สไลด์อัตโนมัติ Mounting Medium (Permount) ชุดสีย้อมปาปานิโคเลาสูตรมีไซลีน (ตารางที่ 1) ชุดสีย้อมปาปานิโคเลาสูตรมีไซลีน (ตารางที่ 2) แพทย์เก็บตัวอย่างเซลล์บริเวณปากมดลูกโดยใช้ชุดอุปกรณ์การตรวจ Liquid based cytology ใส่เซลล์ตัวอย่างที่เก็บมาได้ทั้งหมดลงในกระปุกน้ำยาเพื่อรักษาสภาพเซลล์ กระปุกสิ่งส่งตรวจจะถูกนำมาเข้าเครื่องอัตโนมัติในการเตรียมเซลล์บนสไลด์แก้วโดยเขียนข้อมูลที่จำเป็นลงบนสไลด์ก่อนนำเข้าเครื่องรายละ 2 แผ่น จากนั้นทำการ Fixed ลงใน 95% alcohol เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที ก่อนย้อม สไลด์แผ่นแรกนำไปย้อมสีด้วยกระบวนการย้อมสีสูตรไม่มีไซลีนตามขั้นตอน (ตารางที่ 1) สไลด์อีกแผ่นนำไปย้อมสีด้วยกระบวนการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรมีไซลีนตามขั้นตอนดัง (ตารางที่ 2) สีที่ใช้ย้อมเป็นสีที่ซื้อสำเร็จรูปจากบริษัทเอกชนแห่งเดียวทั้งสองสูตร จากนั้นผู้ย้อมให้รหัสสไลด์แต่ละแผ่น

สเมียร์ที่ผ่านการย้อมจะถูกส่งไปให้พยาธิแพทย์ จำนวน 1 ท่าน และนักเซลล์วิทยาอาวุโส จำนวน 2 ท่าน ซึ่งเป็นผู้ที่ปฏิบัติงานภายนอกโรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี วิเคราะห์และให้คะแนนการตรวจสอบคุณภาพและการติดสีของเซลล์ ผู้วิเคราะห์จะไม่ทราบข้อมูลกระบวนการย้อมเพื่อลดอคติระหว่างการรายงานผล ผู้วิเคราะห์ให้คะแนนจากการสังเกตคุณภาพการติดสีของเซลล์บนสเมียร์สไลด์ ตามแนวทางการวิจัยของ Gachie[6] โดยพิจารณาจาก

1. การติดสีแสดงขอบเขตของเซลล์ (Cell/Cytoplasmic borders) คลุมเครือ=1,ชัดเจน=2
2. การติดสีของซัยโตพลาสม (Cytoplasmic staining) ไม่พึงพอใจ=1, พึงพอใจ=2 และยอดเยี่ยม=3
3. การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียส (Nuclear borders) คลุมเครือ=1, ชัดเจน=2
4. การติดสีของโครมาติน (Chromatin staining) พร่ามัว=1, ชัดเจน=2
5. สังเกตการเกิด Brown artifact 0%=1, 1-49%=2, 50-74%=3 และ 75-100%=4

หลังจากการรายงานผลและการตรวจสอบคุณภาพเซลล์เสร็จสิ้น ผู้ย้อมจะแจ้งรหัสให้ทราบ สเมียร์สไลด์แต่ละคู่จะถูกนำมาเปรียบเทียบเป็นรายบุคคลและกระบวนการย้อมเพื่อประเมินผลการย้อมของทั้งสองด้วยวิธีทางสถิติไคสแคว์ (Chi-Square Test)

ตารางที่ 1 สูตรที่ศึกษา (สูตรไม่มีไซลีน)

ความมุ่งหมาย	ขั้นตอนการย้อมสี	เวลาที่ใช้
เซลล์จะดูดน้ำ	1. Distilled water	10 dips
ย้อมนิวเคลียส	2. Harris Hematoxylin-R	2 mins
ล้างสีส่วนเกินออกและทำให้นิวเคลียสติดสีฟ้า/ม่วง	3. Distilled water	10 dips
ทำให้การติดสี Hematoxylin อ่อนลง	4. Acid buffer solution	10 dips
ลดภาวะเป็นกรด เตรียมสำหรับการย้อมสีซัยโตพลาสม	5. Dehydrated solution	10 dips
และดึงน้ำออกจากเซลล์ขั้นแรก		
ย้อมซัยโตพลาสม	6. Polychrom OEG-R (OG and EA)	2 mins
ล้างสีส่วนเกิน	7. Dehydrated solution II	10 dips
ทำให้แห้งขั้นสุดท้าย	8. Dehydrated solution III	10 dips
	9. ใช้ไดร์เป่าลมร้อนให้สไลด์แห้ง แล้วจึง mount	

ตารางที่ 2 สูตรที่ใช้อยู่ปัจจุบัน (สูตรมีไซลีน)

ความมุ่งหมาย	ขั้นตอนการย้อมสี	เวลาที่ใช้
เซลล์จะดูดน้ำ	1. Distilled water	10 dips
ย้อมนิวเคลียส	2. Hematoxylin	3 mins
ล้างสีส่วนเกินออก	3. Running water	10 dips
ทำให้การติดสี Hematoxylin อ่อนลง	4. 1% acid alcohol	1 dips
ลดภาวะเป็นกรดและทำให้ติดสีฟ้า/ม่วง	5. Running water	5 mins
เตรียมสำหรับการย้อมสีซัยโตพลาสมและดึงน้ำออกจากเซลล์ขั้นแรก	6. 95% ethyl alcohol	15 dips
	7. 95% ethyl alcohol	10 dips
	8. 95% ethyl alcohol	10 dips
	9. 95% ethyl alcohol	10 dips
สีย้อมซัยโตพลาสมครั้งที่ 1 (first counter stain)	10. OG-6	2 mins
ล้างสีส่วนเกิน เตรียมสำหรับการย้อมสีซัยโตพลาสม ครั้งที่ 2	11. 95% ethyl alcohol	15 dips
	12. 95% ethyl alcohol	10 dips
	13. 95% ethyl alcohol	10 dips
สีย้อมซัยโตพลาสมครั้งที่ 2 (second counter stain)	14. E.A.-50	3 mins
ล้างสีส่วนเกิน	15. 95% ethyl alcohol	15 dips
	16. 95% ethyl alcohol	10 dips
	17. 95% ethyl alcohol	10 dips
ดึงน้ำออกจากเซลล์ขั้นสุดท้ายและเตรียมสำหรับ Clearing solution	18. Absolute alcohol	10 dips
	19. Absolute alcohol	10 dips
	20. Absolute alcohol	10 dips
Clearing solution	21. Xylene	10 dips
	22. Xylene	10 dips
	23. Xylene	10 dips
	24. แช่ใน Xylene จนพร้อมที่จะ mount	

ผล

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 259 ราย เตรียมสเมียร์รายละ 2 แผ่น ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยประเมินผลการติดสีของทั้งสองสูตรด้วยวิธีทางสถิติไคสแคว์ ได้ผลการศึกษาดังนี้

การศึกษาความสอดคล้องของการติดสีแสดงขอบเขตของเซลล์ ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และ 2 พบว่าการย้อมทั้ง 2 สูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผู้วิเคราะห์คนที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสูตรไม่มีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของเซลล์ชัดเจนดีทุกแผ่น (ร้อยละ100) สูตรมีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของเซลล์ชัดเจนดี 254 แผ่น (ร้อยละ 98.1) ไม่ชัดเจน 5 แผ่น (ร้อยละ1.9) (ตารางที่ 3)

ผลของการติดสีของซัยโตพลาสม จากการย้อมทั้ง 2 สูตร ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และ 3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 สำหรับผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสูตรไม่มีไซลีนความพึงพอใจ ต่อการติดสีของซัยโตพลาสม 250 แผ่น (ร้อยละ96.5) ดีเยี่ยม 9 แผ่น (ร้อยละ 3.5) สำหรับสูตรมีไซลีนไม่พึงพอใจ การติดสีของซัยโตพลาสม 4 แผ่น (ร้อยละ 1.5) มีความพึงพอใจการติดสีของซัยโตพลาสม 228 แผ่น (ร้อยละ 88.0) ดีเยี่ยม 27 แผ่น (ร้อยละ 10.4) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์การติดสีของซัยโตพลาสม

Parameter	Conventional Pap stain		Xylene-free method		P-Value
	n	%	n	%	
1. Cell / Cytoplasmic borders					
Screener 1					
- Indistinct	11	4.2	5	1.9	χ^2 (2.322), P=0.13
- Distinct	248	95.8	254	98.1	
Screener 2					
- Indistinct	7	2.7	3	1.2	χ^2 (1.631), P=0.20
- Distinct	252	97.3	256	98.8	
Screener 3					
- Indistinct	5	1.9	0	-	χ^2 (5.049), P=0.03
- Distinct	254	98.1	259	100.0	
2. Cytoplasmic staning					
Screener 1					
- Unsatisfactory	11	4.2	3	1.2	χ^2 (5.144), P=0.08
- Satisfactory	245	94.6	251	96.9	
- Excellent	3	1.2	5	1.9	
Screener 2					
- Unsatisfactory	4	1.5	0	-	χ^2 (14.013), P<0.01
- Satisfactory	228	88.0	250	96.5	
- Excellent	27	10.4	9	3.5	
Screener 3					
- Unsatisfactory	2	0.8	0	-	χ^2 (2.961), P=0.23
- Satisfactory	11	4.2	7	2.7	
- Excellent	246	95.0	252	97.3	

ผลของการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียส ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 พบว่า การย้อมทั้ง 2 สูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนี้ สูตรไม่มีไซลีนให้การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดี 191 แผ่น (ร้อยละ 73.7) ไม่ชัดเจน 68 แผ่น (ร้อยละ 26.3) สูตรมีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดี 239 แผ่น (ร้อยละ 92.3) ไม่ชัดเจน 20 แผ่น (ร้อยละ 7.7) และผู้วิเคราะห์คนที่ 3 พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนี้ สูตรไม่มีไซลีนให้การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดีทุกแผ่น (ร้อยละ 100) สูตรมีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดี 253 แผ่น (ร้อยละ 97.7) ไม่ชัดเจน 5 แผ่น (ร้อยละ 1.9) (ตารางที่ 4)

การติดสีของโครมาติน ผู้วิเคราะห์คนที่ 3 พบว่า การย้อมทั้ง 2 สูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และ 2 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนี้ ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 ให้สูตรไม่มีไซลีนการติดสีของโครมาติน ชัดเจนดี 160 แผ่น (ร้อยละ 61.8) พร่ามัว 99 แผ่น (ร้อยละ 38.2) สูตรมีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดี 219 แผ่น (ร้อยละ 84.6) พร่ามัว 40 แผ่น (ร้อยละ 15.4) ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 ให้สูตรไม่มีไซลีนการติดสีของโครมาติน ชัดเจนดี 64 แผ่น (ร้อยละ 24.7) พร่ามัว 195 แผ่น (ร้อยละ 75.3) สูตรมีไซลีนการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสชัดเจนดี 227 แผ่น (ร้อยละ 87.6) พร่ามัว 32 แผ่น (ร้อยละ 12.4) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์การติดสีของนิวเคลียส

Parameter	Conventional Pap stain		Xylene-free method		P-Value
	n	%	n	%	
1. Nuclear borders					
Screener 1					
- Indistinct	17	6.6	9	3.5	χ^2 (2.592), P=0.11
- Distinct	242	93.4	250	96.5	
Screener 2					
- Indistinct	20	7.7	68	26.3	χ^2 (31.540), P<0.01
- Distinct	239	92.3	191	73.7	
Screener 3					
- Indistinct	5	1.9	0	-	χ^2 (5.049), P=0.03
- Distinct	253	97.7	259	100.0	

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์การติดสีของนิวเคลียส (ต่อ)

Parameter	Conventional Pap stain		Xylene-free method		P-Value
	n	%	n	%	
2. Chromatin staining					
Screener 1					
- Hazy	40	15.4	99	38.2	χ^2 (34.228),P<0.01
- Distinct	219	84.6	160	61.8	
Screener 2					
- Hazy	32	12.4	195	75.3	χ^2 (208.346),P<0.01
- Distinct	227	87.6	64	24.7	
Screener 3					
- Hazy	73	28.2	88	34.0	χ^2 (2.028), P=0.15
- Distinct	186	71.8	171	66.0	

ผลของการพบ Brown artifact จากการย้อมทั้ง 2 สูตร ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 และ 3 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 สำหรับผู้วิเคราะห์คนที่ 1 ผลของการพบ Brown artifact ในการย้อมทั้ง 2 สูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสูตรไม่มีไซลีนไม่พบ Brown artifact 181 แผ่น (ร้อยละ 69.9) พบอยู่ระหว่าง ร้อยละ 1 - 49 ของเซลล์ทั้งหมดบนสไลด์ 78 แผ่น (ร้อยละ 30.1) สูตรมีไซลีนไม่พบ Brown artifact 141 แผ่น (ร้อยละ 54) พบอยู่ระหว่าง ร้อยละ 1 - 49 ของเซลล์ทั้งหมดบนสไลด์ 118 แผ่น (ร้อยละ 45.6) (ตารางที่ 5)

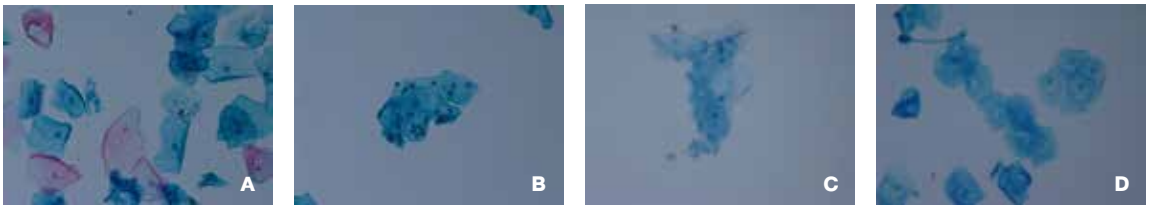
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์การพบ Brown artifact

Parameter	Conventional Pap stain		Xylene-free method		P-Value
	n	%	n	%	
Brown artifact (Cornflaking)					
Screener 1					
- Absent 0%	141	54.0	181	69.9	χ^2 (13.132), P<0.01
- Present 1%-49%	118	45.6	78	30.1	
- Present 50%-75%	0	-	0	-	
- Present 76%-100%	0	-	0	-	
Screener 2					
- Absent 0%	252	97.3	257	99.2	χ^2 (2.827), P=0.09
- Present 1%-49%	7	2.7	2	0.8	
- Present 50%-75%	0	-	0	-	
- Present 76%-100%	0	-	0	-	
Screener 3					
- Absent 0%	254	98.1	257	99.2	χ^2 (1.303), P=0.25
- Present 1%-49%	5	1.9	2	0.8	
- Present 50%-75%	0	-	0	-	
- Present 76%-100%	0	-	0	-	

วิจารณ์

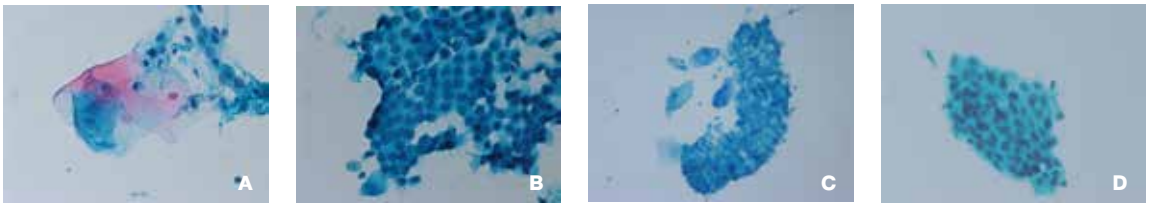
จากการประเมินสูตรการย้อมสีปาปานิโคเลาที่ไม่ใช้ไซลีนต่อคุณภาพการติดสีของเซลล์ที่ป้ายจากปากมดลูกที่โรงพยาบาลมะเร็งลพบุรี ได้แบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ 1.การติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสม 2.การติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียส และ 3.การเกิด Pigment สีน้ำตาลเข้มบนเซลล์หรือ Brown artifact

จากการศึกษาการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสม (รูปที่ 1) พบว่าการติดสีแสดงขอบเขตของเซลล์และการติดสีของซัยโตพลาสมของสเมียร์สไลด์จากกระบวนการย้อมทั้ง 2 สูตรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และ 1 ใน 3 ของผู้วิเคราะห์มีความเห็นว่าการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสมจากกระบวนการย้อมสีสูตรไม่มีไซลีนดีกว่าสูตรมีไซลีน



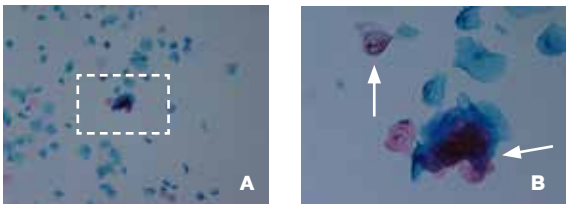
รูปที่ 1 การติดสีซัยโตพลาสมที่ดีที่ผู้วิเคราะห์เห็นตรงกัน (A), เห็นไม่ตรงกัน (B) และการติดสีซัยโตพลาสมที่ดีที่ไม่ดีที่ผู้วิเคราะห์เห็นตรงกัน (C), เห็นไม่ตรงกัน (D)

การศึกษาการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียส (รูปที่ 2) แบ่งออกเป็นการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสและการติดสีของโครมาติน ผลการสังเกตการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสจากผู้วิเคราะห์ทั้ง 3 ท่าน มีความแตกต่างกันดังนี้ ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 พบว่า การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสจากการย้อมทั้งสองสูตรไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผู้วิเคราะห์คนที่ 2 พบว่า การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสที่ใช้สูตรมีไซลีนชัดเจนกว่าการย้อมโดยใช้สูตรไม่มีไซลีน ผู้วิเคราะห์คนที่ 3 พบว่าการติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียสที่ใช้สูตรไม่มีไซลีนชัดเจนกว่าสูตรมีไซลีน สำหรับผลของการติดสีโครมาติน ผู้วิเคราะห์คนที่ 1 และ 2 พบว่าการติดสีโครมาตินสูตรมีไซลีนชัดเจนกว่าสูตรไม่มีไซลีน ในขณะที่ผู้วิเคราะห์คนที่ 3 พบว่าไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากในขั้นตอนการทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใสของสูตรไม่มีไซลีนใช้ลมร้อนในการช่วยไล่น้ำหรือแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์ก่อนใช้ Mounting media (ตารางที่ 1) ระยะเวลาที่ใช้ไม่ได้กำหนดไว้ เพียงแต่ให้ผู้ปฏิบัติงานมองดูด้วยตาเปล่าว่าเซลล์แห้งจึงค่อยใช้ Mounting media ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาในการใช้ลมร้อนช่วยไล่น้ำหรือแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์ในงานวิจัยนี้ยังไม่เพียงพอในการดึงน้ำหรือแอลกอฮอล์ออกจากนิวเคลียสที่อยู่ในซัยโตพลาสม ทำให้การติดสีโครมาตินพร่ามัวได้ สอดคล้องกับ ภัทริตา[1] พบว่าการดูดน้ำออกเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะน้ำที่ติดไซลีนอยู่จะทำให้เกิดลักษณะเป็นฝ้ามัว สอดคล้องกับ Bales[7] พบว่าน้ำที่ผสมอยู่ในไซลีนจะทำให้สารละลายมีลักษณะขุ่นคล้ายมีน้ำนมจางๆ และอาจทำให้เกิดลักษณะหยดน้ำบน สเมียร์สไลด์ ดังนั้นก่อนการใช้ไซลีนในการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรมีไซลีนจึงต้องใช้ Absolute alcohol ในการช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ก่อนใช้ไซลีน ตามขั้นตอนที่ 21-24 (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 การติดสีนิวเคลียสที่ดีที่ผู้วิเคราะห์เห็นตรงกัน (A), เห็นไม่ตรงกัน (B) และการติดสีนิวเคลียสที่ดีที่ไม่ดีที่ผู้วิเคราะห์เห็นตรงกัน (C), เห็นไม่ตรงกัน (D)

กระบวนการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรมีไซลีนจำเป็นต้องใช้ไซลีนที่มีคุณสมบัติในการทำละลาย Mounting media สามารถดึงน้ำหรือแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์ เพื่อเชื่อมต่อระหว่างขั้นตอนการใช้ Absolute alcohol และ Mounting media เนื่องจากสารทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถเข้ากันได้ทำให้เกิดเป็นฝ้ามัวบนสเมียร์ด้วยเช่นกัน ไซลีนเป็นสารเคมีที่ใสไม่มีสีและมีดัชนีการหักเหของแสงใกล้เคียงกับแผ่นสไลด์ เนื้อเยื่อและ Mounting media สามารถใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติคล้ายกันเช่นโทลูอีนทดแทนไซลีนได้ ขั้นตอนการMounting ใช้ Mounting media เติมเต็มช่องว่างระหว่างเซลล์และยึดระหว่างสไลด์กับ Cover slip อย่างถาวร Mounting media ที่ดีควรมีดัชนีการหักเหของแสงใกล้กับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจและแผ่นสไลด์จึงทำให้เป็นภาพที่โปร่งใสและในกรณีที่ไซลีนระเหยไปจากผิวเซลล์ก่อนใส่ Mounting media จะทำให้เกิด pigment สีน้ำตาลเข้ม (Brown artifact) เกิดขึ้นบนเซลล์ในสเมียร์ จึงควรป้องกันโดยการรีบใส่ mounting media แล้วปิดสไลด์โดยเร็ว[1] สำหรับสูตรไม่มีไซลีนนั้นใช้ไดร์เป่าผมให้ลมร้อนช่วยไล่น้ำหรือแอลกอฮอล์ออกจากเซลล์ก่อนใส่ Mounting media จึงสันนิษฐานว่าอาจเกิด Brown artifact ได้ จากการศึกษากลับพบว่าผู้วิเคราะห์ 2 ใน 3 ท่าน มีความเห็นว่าการย้อมทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยผู้วิเคราะห์อีก 1 ท่าน มีความเห็นว่าแตกต่างโดยการย้อมสูตรมีไซลีนเกิด Brown artifact ในสเมียร์สไลด์มากกว่าสูตรมีไซลีน (รูปที่ 3) นั่นแสดงว่าสูตรไม่มีไซลีนไม่ส่งผลต่อการเกิด Brown artifact สอดคล้องกับ Gill[8] พบว่าบางครั้งมีการเข้าใจผิดในขั้นตอนการทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใส โดยธรรมชาติของเซลล์มีความโปร่งใสและติดสีเพียงเล็กน้อยเท่านั้นไม่ต้องการการทำให้ลักษณะเซลล์โปร่งใส ยกเว้นพื้นที่ว่างระหว่างหรือรอบๆ เซลล์ที่ทำให้เกิดการหักเหของแสงขึ้น ซึ่งเซลล์ที่แห้งจะมีการเลี้ยวเบนของแสงทำให้ไม่เกิดความโปร่งใส Brown artifact หากเกิดขึ้นในรายที่มีเซลล์ที่ผิดปกติจะบดบังเซลล์รบกวนการตรวจวินิจฉัยได้ จะพบได้บ่อยบนเซลล์ชนิด Superficial squamous cells ที่ซ้อนทับกันหนาๆ โดยวิธีการเตรียมสไลด์แบบ Conventional Pap smear สำหรับวิธีการเตรียมสไลด์แบบ Liquid-based preparations เกิด Brown artifact ขึ้นได้บ้างเหมือนกันแต่น้อยกว่าวิธีการเตรียมสไลด์แบบ Conventional Pap smear



รูปที่ 3 การเกิด Brown artifact ที่ผู้วิเคราะห์ท่านหนึ่งเห็นแต่กรรมการอีก 2 ท่าน ไม่ระบุ A (10X), B (20X)

การประเมินผลการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาได้ถูกต้องนั้นต้องอาศัยทั้งการตรึงเซลล์และการย้อมสีที่ดี ซึ่งการย้อมสีที่ดีนั้นจะต้องทำให้มองเห็นนิวเคลียสที่ติดสีน้ำเงิน/ม่วง มีขอบเขตชัดเจนไม่กลืนไปกับซัยโตพลาสมสีไม่ซีดจาง ซัยโตพลาสมควรจะต้องติดสีที่แสดงความแตกต่างของเซลล์ตั้งแต่การติดสีส้มในเซลล์ที่มีเคราตินสูง ติดสีส้ม/ชมพูในเซลล์แก่ หรือติดสีเขียว/ฟ้าในเซลล์ intermediate และเซลล์ parabasal เป็นต้น พื้นผิวของสเมียร์สไลด์ต้องไม่ติดสียกเว้นการติดสีสารคัดหลั่ง จากปากมดลูก การย้อมที่ไม่ดีนั้นจะทำให้ไม่สามารถบ่งบอกระดับความรุนแรงเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติหรืออาจทำให้พลาดเซลล์ที่ผิดปกตินั้นไปเกิดเป็น False negative ได้[9] จากผลการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียส พบว่ามีเพียงการติดสีของโครมาตินเท่านั้นที่ผู้วิเคราะห์ 2 ใน 3 ท่านเห็นว่าสูตรมีไซลีนดีกว่า แต่ในขณะที่การติดสีแสดงขอบเขตของนิวเคลียส 2 ใน 3 ท่านเห็นว่าสูตรที่ไม่มีไซลีนดีกว่าและเทียบเท่าสูตรมีไซลีน (ตารางที่ 4) การติดสีของเซลล์โดยการย้อมด้วยสูตรไม่มีไซลีนยังคงเห็นความผิดปกติของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ขนาด รูปร่างและอัตราส่วนของนิวเคลียสต่อซัยโตพลาสมได้ชัดเจนเพียงพอต่อการอ่านแปลผลทางเซลล์วิทยาในเบื้องต้น ทางหน่วยงานจึงมีความเห็นว่าสูตรที่ไม่มีไซลีนนั้นสามารถนำมาใช้ทดแทนสูตรที่มีไซลีนได้ โดยอาจเพิ่มระยะเวลาในขั้นตอนการเป่าลมร้อนให้มากขึ้นก่อนการ Mounting อาจจะช่วยให้มองเห็นการติดสีของโครมาตินดีขึ้นเทียบเท่าสูตรมีไซลีนก็เป็นได้ จึงต้องมีการศึกษาต่อไป

กระบวนการย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรไม่มีไซลีนใช้เวลาในการย้อมน้อยกว่าสูตรมีไซลีน โดยลดขั้นตอนการย้อมลงจาก 24 ขั้นตอนเหลือเพียง 8 ขั้นตอน (ตารางที่ 1) การใช้ไดร์เป่าผมในการให้ลมร้อนก่อนขั้นตอน Mounting ได้ออกแบบกล่องพลาสติกแข็งเพื่อวางสไลด์และวางไดร์เป่าผมโดยเฉพาะ เจาะรูด้านบนและด้านข้างให้ลมระบายได้ ผู้ปฏิบัติงานจึงไม่ต้องถือไดร์เป่าผมเอง ลดความยุ่งยากลงไปได้

สรุป

คุณภาพของเซลล์ด้านการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของซัยโตพลาสมและอัตราการเกิด Brown artifact จากสูตรไม่มีไซลีนเทียบเท่าสูตรมีไซลีน แต่การติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียสคุณภาพของเซลล์จากสูตรไม่มีไซลีนด้อยกว่าสูตรมีไซลีน ข้อเสนอแนะสูตรไม่มีไซลีนในขั้นตอนการเป่าลมร้อนสไลด์แห้ง หากเพิ่มระยะเวลาในการเป่าลมร้อนให้มากขึ้นก่อน Mounting อาจทำให้คุณภาพของเซลล์ด้านการติดสีแสดงลักษณะเฉพาะของนิวเคลียสดีขึ้นเทียบเท่าสูตรมีไซลีนจึงควรพัฒนาต่อไป การย้อมสีปาปานิโคเลาสูตรไม่มีไซลีนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการย้อมสีสเมียร์สไลด์ในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกสำหรับห้องปฏิบัติการที่ไม่ต้องการใช้ไซลีน อย่างไรก็ดี ยังต้องมีการศึกษาข้อดีข้อเสียในด้านอื่นๆ ซึ่งอาจมีความสำคัญมากกว่า เช่น ค่าใช้จ่าย การกำจัดของเสีย การพิสูจน์ผลต่อสิ่งแวดล้อมที่ดีขึ้น ความพึงพอใจและการสอดรับกับแนวทางปฏิบัติของผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมการแพทย์ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการศึกษาวิจัยรวมถึงผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบคุณ นายแพทย์สมภพ แสงกิตติไพบูลย์และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลมะเร็งทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการเก็บข้อมูลเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ คุณชาญชัย ศรีสำอางค์และอาจารย์ภัทริตา เวณุนันทน์ ที่ได้ให้คำแนะนำที่มีคุณค่าและเป็นประโยชน์ทำให้การศึกษานี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

References

1. ภัทริตา เวณุนันทน์, ศิวาลัย ธนภัทร์. หลักการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเซลล์วิทยา. ใน: ศิวาลัยธนภัทร์, บรรณาธิการ. เซลล์วิทยา-นรีเวช. กรุงเทพฯ: รวิกานต์ (1988): 2534. หน้า 311-33.
2. อาริษา แสงศรี, เสาวลักษณ์ จงประกิจพงศ์, อำไพ นุสสติ. การเตรียมชิ้นเนื้อด้วยน้ำยาเคมีเพื่อการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยปราศจากไซลีน [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: สถาบันพยาธิวิทยา; 2557 [เข้าถึงเมื่อ 1 ธ.ค. 2558]. เข้าถึงได้จาก : http://www.iop.or.th/Download/Research/ Xylenefree%20Tissue%20Processing%20in%20Pathology%20Laboratory.pdf.
3. Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Möller E. Xylene-free method for histological preparation: a multicentre evaluation. Laboratory Investigation 2001; 28: 1213-21.
4. Ankle MR, Joshi PS. A study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study. J Oral Maxillofac Pathol 2011; 15:161-7.
5. Ramulu S, Koneru A, Ravikumar S, Sharma P, Ramesh D, Ramesh P. Liquid dish washing soap: An excellent substitute for xylene and alcohol in hematoxylin and eosin staining procedure. Journal of Orofacial Sciences 2012; 4: 37-42.
6. Gachie RN, Muchiri LW, Ndungu JR. A comparison of modified and standard Papanicolaou staining methods in the assessment of cervical smears at Kenyatta national hospital. East African Medical Journal. 2011; 88:244-50.
7. Bales CE. Laboratory techniques. In: Koss LG, editor. Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases. 2 vols. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & wilkins; 2006.
8. Gill GW. Cytopreparation: Principles & Practice. New York: Springer Science; 2013.
9. Lou J. Dyeing to get it right [internet]. Carlton South: Victorian Cytology Service; - [cited 2017 Jan 29]. Available from: http://www.Oralpath.org.in/notes/lectures /articles/PAPstainingposter.pdf