บทฟื้นฟูวิชาการ

การย้อมหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีย์ โดยใช้อิมมูโนเปอร์ออกซิเดส และการประยุกต์ใช้ทางคลินิก

สุรนันท์ ตีระวัฒนพงษ์*

Tirawatnpong S. Immunoperoxidase staining techniques for antigens and antibodies detection, and their clinical application. Chula Med J 1988 Dec; 32(12): 1105-1119

The immunoenzymatic methods are now commonly used in laboratory diagnosis and researches. Several immunoperoxidase staining procedures have been described. The basic principles using conjugated and unlabelled peroxidase antibody methods have proved to be quite satisfactory in localizing sites of antibody-antigen reaction. The use of hapten, protein A and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) can also contribute significantly to the staining methods. The sensitivity and specificity of several immunohistochemical methods are compared. In general, the ABC method is found to be highly sensitive, easy to perform and produced the most intense and least background staining. The unlabelled antibody (peroxidase-antiperoxidase : PAP) method also yields satisfactory results, but is less intense than the ABC method. The applications of immunoperoxidase techniques represent an advance in clinical diagnosis and routine work, but additional evaluation, development and standatdization are required.

Reprint request : Tirawatnpong S, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. September 9, 1988.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการย้อมหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีย์โดยใช้ enzyme peroxidase เข้ามาช่วยให้เห็นปฏิกิริยา เป็นวิธีที่ง่าย ย้อมได้สะดวก ปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายเป็นชุด การแปลผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นชัดเจน รวมทั้งสามารถย้อมได้ทั้งบนเซลล์ และเนื้อเยื่อที่แช่ฟอร์มาลีนหรือแช่แข็ง และยังมีความไวสูงอีกด้วย จากประสบการณ์การย้อมโดยวิธีนี้เห็นว่ามีประโยชน์ในการช่วยการวินิจฉัยโรคมากมาย และน่าจะพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการทั่วไป

Nakane และ Pierce[1] ในปี 2509 เป็นผู้ริเริ่มการติดฉลากแอนติบอดีย์ด้วยเอ็นซัยม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ย้อมหาตำแหน่งของแอนติเจนบนเนื้อเยื่อ เอ็นซัยม์ที่ใช้มากคือ horseradish peroxidase (PX) ซึ่งสามารถย่อย substrate hydrogen peroxide (H_2O_2) และเมื่อเติมสารที่ทำให้เกิดสี (chromogen) ลงไป ก็สามารถดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา ในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะมากยิ่งขึ้นจนใช้กันอย่างกว้างขวาง แบ่งเป็น 4 วิธีการใหญ่[2,3,4] คือ

1. Basic Immunoperoxidase methods
2. Protein A Peroxidase methods
3. Hapten-Coupled Antibodies methods
4. Avidin-Biotin Peroxidase methods

วิธีการย้อมหลักเป็นขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมแอนติเจนให้ติดบนสไลด์
2. ใส่ primary antibody เช่น IgG (อาจเป็น monoclonal antibodies)
3. ใส่ secondary antibody (เป็นแอนติบอดีย์ต่ออิมมูโนโกลบูลิน species เดียวกันกับที่สร้าง primary antibody) เช่น Anti IgG
4. ใส่สารหรือ complex ที่ช่วยให้ความไวของการทดสอบสูงขึ้น เช่น Peroxidase-antiperoxidase, Protein A, Avidin-biotin
5. เติม substrate-chromogen ให้เกิดสี
6. Counterstain, mount ด้วย mounting media

วิธีการใหญ่ ๆ ทั้ง 4 วิธี ยังได้แบ่งย่อยออกเป็นหลายวิธี ซึ่งหลักการ, ข้อดี, ข้อเสีย และข้อจำเพาะในการใช้ตรวจสอบ พอสรุปได้ดังนี้

1. Basic Immunoperoxidase Methods

1.1 *Direct method* การย้อมมีขั้นตอนเดียวโดยใช้แอนติบอดีย์จำเพาะติดฉลากด้วย PX (labelled primary antibody) ย้อมหาแอนติเจนบนตัวอย่าง[5] วิธีนี้ทำได้ผลเร็วกว่าวิธีอื่น แต่มีความไวน้อย แอนติบอดีย์ที่ใช้ติดฉลากต้องบริสุทธิ์และใช้ปริมาณค่อนข้างมาก (รูปที่ 1A)

1.2 *Indirect method (Sandwich)* มี 2 ขั้นตอนโดยใช้แอนติบอดีย์ (unlabelled primary antibody) ย้อมบนแอนติเจนที่ต้องการหาก่อน แล้วย้อมทับด้วย secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย PX[6] ซึ่ง secondary antibody นี้ต้องเป็นแอนติบอดีย์ต่ออิมมูโนโกลบูลิน species เดียวกันกับที่สร้าง primary antibody เช่น ถ้า primary antibody ถูกสร้างในกระต่าย secondary antibody ที่ใช้ต้องเป็น goat or swine antirabbit immunoglobulin labelled PX เป็นต้น วิธีนี้มีความไว และมีที่ใช้ได้กว้างขวางกว่าวิธี direct เพราะ labelled secondary antibody สามารถใช้กับ primary antibody ที่สร้างจาก species เดียวกันได้หลายชนิด จึงใช้ทดสอบหาแอนติเจนได้มากมาย (รูปที่ 1B)

1.3 *Labelled antigen method* ใช้แอนติบอดีย์จำเพาะย้อมบนแอนติเจนที่ต้องการทดสอบหา แล้วย้อมทับอีกครั้งด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันที่ติดฉลากด้วย PX[7] วิธีนี้มีความจำเพาะสูง แต่ไม่เหมาะกับงานประจำ เพราะต้องใช้แอนติเจนบริสุทธิ์ปริมาณมากเพื่อติดฉลากกับ PX (รูปที่ 1C)

1.4 *Enzyme bridge method (Triple sandwich)* ใช้ primary, secondary และ anti PX antibodies ย้อมบนแอนติเจนที่ต้องการทดสอบตามลำดับ แล้วย้อมทับอีกครั้งด้วย free PX[8] วิธีนี้ใช้เวลาค่อนข้างมากเพราะมีการย้อมและล้างหลายขั้นตอน แต่สามารถดัดแปลงใช้ย้อมหาแอนติเจนหลายชนิดบนชิ้นเนื้อเดียวกันได้ (รูปที่ 1D)

1.5 *Peroxidase-antiperoxidase method (PAP)* ใช้ primary และ secondary antibodies ย้อมบนแอนติเจนก่อนตามลำดับ แล้วย้อมทับด้วย PAP complex[9] secondary antibody จะเป็นตัวเชื่อมโยงระหว่าง primary antibody กับ PAP complex (รูปที่ 1E) anti PX ต้องเตรียมจากสัตว์ species เดียวกันกับ primary antibody วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้ primary antibody ที่เตรียมจากคน เพราะ anti PX เตรียมจากคนไม่ได้ วิธีนี้มีความไวมาก เหมาะที่จะใช้ย้อมหาแอนติเจนบนชิ้นเนื้อที่แช่ฟอร์มาลีนซึ่งทำให้ antigenicity ลดลง

2. Protein A Peroxidase Methods

Protein A เป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์ของ *Staphylococcus aureus* (Cowan strain) สามารถจับกับส่วน Fc ของ IgG ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลาย species และยังสามารถติด

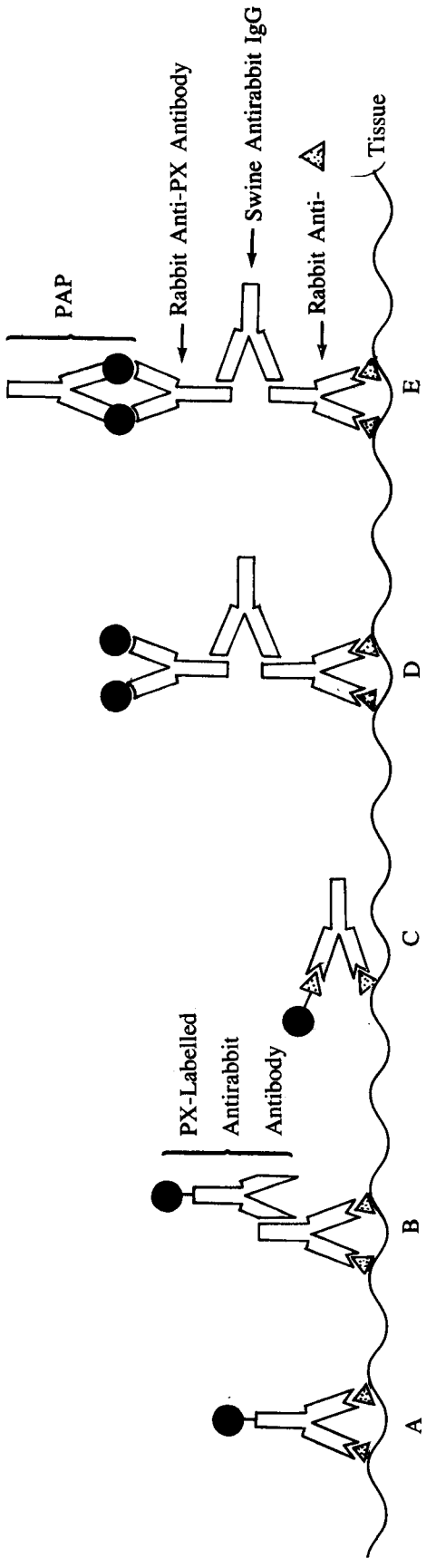

Figure 1 : Basic Immunoperoxidase methods.
A. direct ; B. indirect ; C. labelled antigen method ; D. enzyme bridge method ; and
E. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) method
(= antigen, = antibody, = peroxidase)

ฉลากกับ PX ได้โดยไม่ทำให้คุณสมบัติเสียไป[10]

2.1 *Two-stage protein A-peroxidase method* ใช้ primary antibody ที่เป็น IgG ย้อมบนแอนติเจนก่อน แล้วย้อมทับด้วย protein A ที่ติดฉลากด้วย PX[11,12] วิธีนี้สามารถทดสอบหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีย์ (รูปที่ 2A)

2.2 *Three-stage protein A method* ใช้ unlabelled protein A เป็นตัวเชื่อมจับระหว่าง IgG ของ primary antibody ที่จับบนแอนติเจน และ IgG ของ anti-PX ที่ติดกับ PAP complex[13] (รูปที่ 2B)

วิธี protein A-PX นี้มีประโยชน์และการนำเอาไปใช้ได้มาก รวมทั้งมีความไวสูงและมีความจำเพาะมาก เพราะสามารถใช้ primary antibodies ได้หลายตัว และจากสัตว์ species ต่าง ๆ ได้ไม่เจาะจง จึงพัฒนาใช้ร่วมกับวิธี PAP (ตามวิธีที่ 2.2) โดยให้ protein A เป็นตัวเชื่อมระหว่าง primary antibodies จากสัตว์ species หนึ่ง กับ PAP complex จากสัตว์อีก species หนึ่ง วิธีนี้จึงมีประโยชน์มากเมื่อ primary antibodies ได้จากคน หรือ monoclonal antibodies ที่เตรียมจากหนู

นอกจากนี้ยังทำได้ค่อนข้างรวดเร็ว และ background ของการย้อมต่ำพอใช้ได้ ไม่ค่อยพบ non specific staining เพราะใช้ protein A ที่เจือจางมาก เพื่อให้มี affinity สูง ในการจับกับส่วนของ Fc ของ IgG แต่ไม่เหมาะสมจะใช้ย้อมบนชิ้นเนื้อหรือเซลล์ที่มี intrinsic IgG เช่น interstitium และ plasma cells

3. Hapten-Coupled Antibodies Methods

Hapten เป็นสารที่มีโมเลกุลเล็ก มีคุณสมบัติคือลำพังตัวมันเองไม่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีย์ได้ ต้องรวมกับ carrier ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าก่อน เราสามารถทำให้ hapten ติดกับโมเลกุลของ แอนติบอดีย์ได้โดยวิธีการ amidination[14]

3.1 *Indirect hapten-labelled antibody method* ใช้ primary antibody ที่ติดฉลากด้วย hapten ย้อมบนแอนติเจนก่อน แล้วย้อมทับด้วย antihapten antibody ที่ติดฉลากด้วย PX[15] (รูปที่ 3A)

3.2 *Three-stage hapten-labelled antibody method* ให้ antihapten antibody เพื่อเป็นตัวเชื่อมโยงระหว่าง haptenated primary antibody กับ haptenated anti PX-PAP complex[16] (รูปที่ 3B)

วิธีนี้มีความไวเนื่องจากการที่ hapten ติดกับโมเลกุลของแอนติบอดีย์ โดยวิธี amidination นั้น จะใช้ hapten 20 โมเลกุล ต่ออิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล ทำให้แต่ละกรุ๊ปของ hapten เป็น antigenic site เพื่อจับกับ anti-hapten antibody จึงเป็นผลให้ปฏิกิริยาของการย้อมเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถตรวจสอบหาแอนติเจนที่จำนวนน้อย ๆ ได้ และ hapten-labelled antibodies ยังสามารถใช้ในการย้อมแบบ double immunoenzymatic staining ได้ วิธีนี้อาจเกิด non specific binding กับส่วนประกอบของเนื้อเยื่อและเซลล์ได้

4. Avidin-Biotin Peroxidase Methods

Avidin เป็น glycoprotein ในไข่ขาว น้ำหนักโมเลกุล 68,000 และมีถึง 4 binding sites avidin มี affinity สูงในการจับกับ biotin ซึ่งคือ vitamin H และเป็น coenzyme ที่มีโมเลกุลเล็กกว่าได้อย่างหนาแน่น (dissociation constant 10^{-15} M) ด้วย nonimmunologically-noncovalent bond ได้ถึง 4 โมเลกุล และติดกับ enzyme PX ได้โดยอาศัย glutaraldehyde ส่วน biotin สามารถจับกับอิมมูโนโกลบูลิน และ PX ได้โดยอาศัย covalent bond

4.1 *Labelled avidin-biotin method (LAB)* ใช้ primary antibody ที่ติดฉลากกับ biotin (biotinylated antibody) ย้อมบนแอนติเจน แล้วย้อมทับด้วย PX-labelled avidin[17] (รูปที่ 4A)

4.2 *Bridged avidin-biotin method (BRAB)* ใช้ primary antibody ที่ติดฉลากด้วย biotin (biotinylated antibody) ย้อมบนแอนติเจน แล้วใส่ unlabelled avidin ลงไป จากนั้นย้อมทับด้วย biotinylated PX avidin จะเป็นตัวเชื่อมระหว่าง biotinylated antibody และ biotinylated PX[17] (รูปที่ 4B)

จากการที่ avidin จับกับ biotin ได้อย่างเหนียวแน่นนั้น ทำให้วิธีนี้มีความไวสูงกว่าวิธีต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นที่ติดฉลากแอนติบอดีย์ด้วย PX โดยตรง หรือด้วยสารอย่างอื่น

ในปี พ.ศ. 2523 Hsu และคณะ[18] ได้ปรับปรุงวิธีทดสอบให้มีความไว และสะดวกขึ้นอีก คือ Indirect bridged avidin-biotin technique (IBRAB) หรือ Avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC) โดยใช้ unlabelled primary antibody ย้อมลงบนแอนติเจน แล้วย้อมตามด้วย biotinylated secondary antibody และ avidin-biotinylated PX หรือ avidin-biotin-PX complex (ABC) (รูปที่ 4C) เขาพบว่าวิธีนี้เพิ่มความไวของการทดสอบมาก

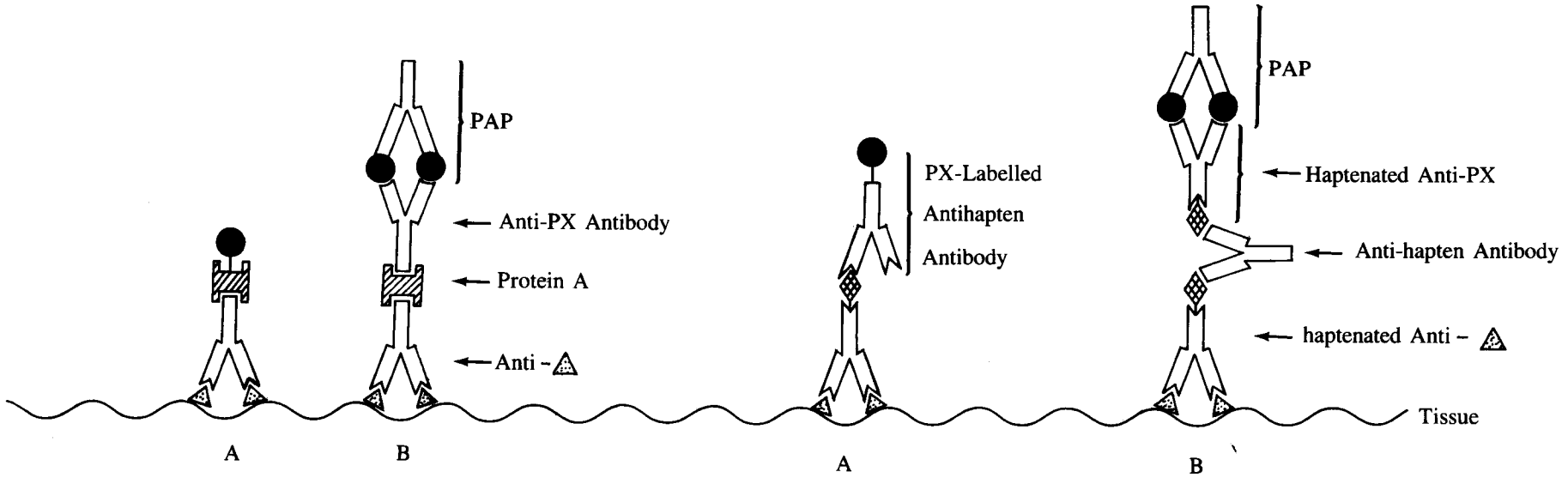

Figure 2 : Protein A Peroxidase methods. A. two-stage ; B. three-stage
(▲ = antigen, ⊓ = antibody,
● = peroxidase, ▬ = protein A)

Figure 3 : Hapten-Coupled Antibodies methods A. indirect ; B. three-stage
(▲ = antigen, ⊓ = antibody,
● = peroxidase, ◆ = hapten)

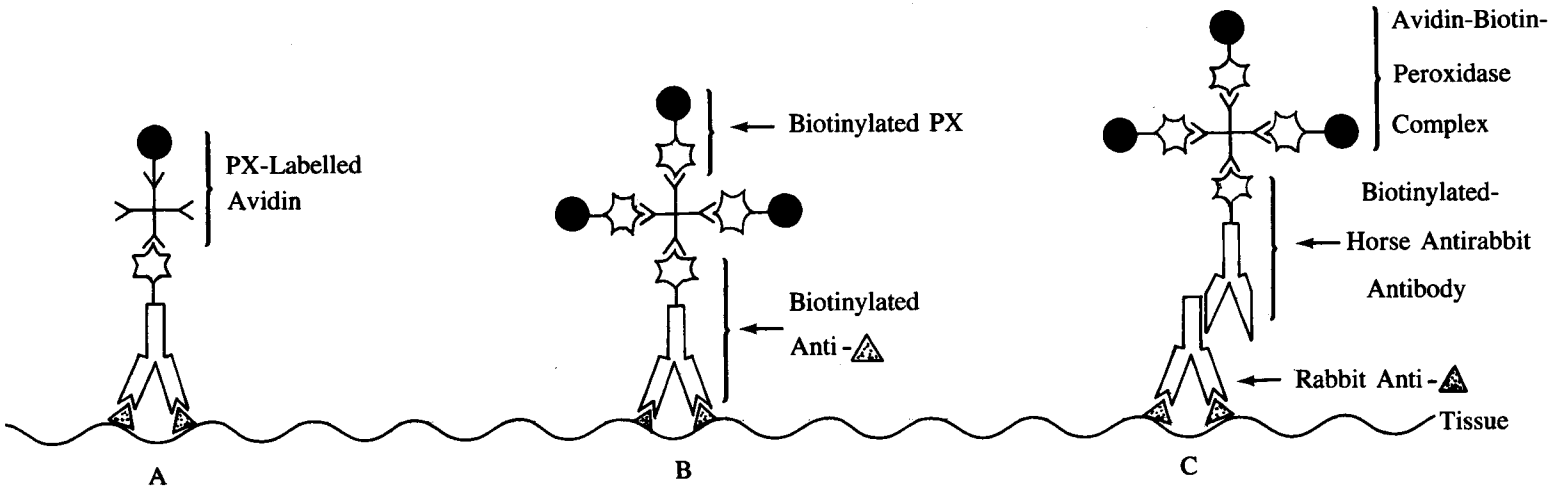

Figure 4 : Avidin-biotin Peroxidase methods
A. labelled avidin-biotin method (LAB) ; B. bridge avidin-biotin method (BRAB) ; C. avidin-biotin-peroxidase complex method (ABC)
(= antigen, = antibody, = peroxidase, = avidin, = biotin)

ขึ้น สามารถใช้ primary antibody เพียงจำนวนน้อย ให้ความเข้มชัด และ background ต่ำ นอกจากวิธีนี้จะเหมาะในการทดสอบหาแอนติเจนบนเซลล์หรือเนื้อเยื่อแล้ว ยังใช้ทดสอบหาแอนติบอดีย์ในน้ำเหลืองผู้ป่วยด้วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีย์ต่อเซลล์หรือส่วนประกอบส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ตนเอง (autoantibodies) เป็นต้น

การย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase ทั้ง 4 วิธีนี้ ต่างกันตรงที่ความสะดวกในการย้อม, ชนิดของแอนติบอดีย์และสารต่าง ๆ ที่ใช้, ขั้นตอน รวมทั้งเวลาในการทำ และความเข้มชัดของสี Hsu และคณะ[18],[42] ในปี 2524 จึงได้ทดลองเปรียบเทียบผลของการย้อมด้วยวิธีต่าง ๆ คือ Indirect method, PAP method, Protein A Peroxidase method, Indirect BRAB (IBRAB) method และ ABC method พบว่าวิธี Indirect และ PAP ผลต่างกันเล็กน้อย ความไวสูงพอใช้ ส่วน PAP และ IBRAB ให้ผลพอ ๆ กัน วิธี ABC ให้ผลดีที่สุด คือให้ความไวของการทดสอบสูงกว่า PAP ถึง 8 เท่า

โดยสรุปวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันคือ ABC เพราะ

1. ให้ความไวสูงมาก
2. เห็นผลชัดเจนและ background น้อย
3. วิธีการย้อมง่าย
4. มีน้ำยาเป็นชุดสำเร็จรูปจำหน่าย

ส่วนการย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase ทั้ง 4 วิธีนี้มีประโยชน์ทางคลินิก โดยมีที่นำไปใช้ดังแสดงตามตารางที่ 1-3

Table 1 Clinical applications of **Basic Immunoperoxidase methods.**

Identification of polyclonal cytoplasmic immunoglobulins : kappa and lambda light chains in lymphomas[5] and multiple myeloma[19],

Identification of Ig classes[20], complement components, other protein components[21-23] membrane bound antigens eg. ß-2 microglobulin, lymphocytes subsets[24] in skin disease, renal disease[25], autoimmune and others

Diagnostic in tumor pathology

acid phosphatase for identification of prostatic carcinoma metastases[26]

human chorionic gonadotropin for differentiation of ovarian and testicular germ cell[27]

alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma[28]

Identification of viral antigens

hepatitis B Ag[29], herpes simplex virus Ag[30], rabies virus Ag[31]

Detection of autoantibodies and Ab to infectious diseases in serum etc.

Table 2 Clinical applications of **Protein A Peroxidase Methods**

Detection of autoantibodies of various IgG subclasses in immune neutropenias[32], immune thrombocytopenia[33], systemic lupus erythematosus[34], pemphigus and bullous pemphigoid[35] etc.

Table 3 Clinical applications of **Avidin-Biotin Peroxidase methods**

Detection of Ig and other proteins containing cells or tissues eg. in thyroid disease[18]

Detection of leucocyte-population antigens including T & B cells, macrophage, HLA-DR+ cells and inflammatory cells with monoclonal antibodies in tissues of many other diseases[36-38]

Identification of viral antigens

Japanese encephalitis[38], HIV antigen in AIDS[39], Rabies Ag

Study of autoantibodies

antinuclear antibodies in SLE[40], anti-Purkinji cell antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration[41] etc.

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ Immunoperoxidase staining ในงานวิจัย

1. การศึกษาถึงอุบัติการณ์พบ Herpes simplex virus (HSV) type II

ในการประชุมวิชาการของคณะแพทยศาสตร์ เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2529 ผู้เขียนและคณะได้เสนอผลงานการศึกษาถึงอุบัติการณ์พบ Herpes simplex virus (HSV) type II จากตัวอย่าง cervical swabs ของสตรีที่มีอาการแสดงและไม่มีอาการแสดงของการติดเชื้อในช่องคลอด และ/หรือปากมดลูกที่มารับการตรวจรักษาโรคนรีที่หน่วยผู้ป่วยนอกสูตินรี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2527 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2529 จำนวน 577 ตัวอย่าง จากการย้อมหาไวรัสด้วยวิธี direct method โดยใช้ peroxidase labelled rabbit anti-HSV type II แล้วทำให้เกิดสีด้วย H_2O_2 และ 3,4,3′-4′-tetraaminobiphenyl hydrochloride จะเห็นติดสีน้ำตาลใน cytoplasm ของ epithelial cells (รูปที่ 5) ผลดังแสดงในตารางที่ 4

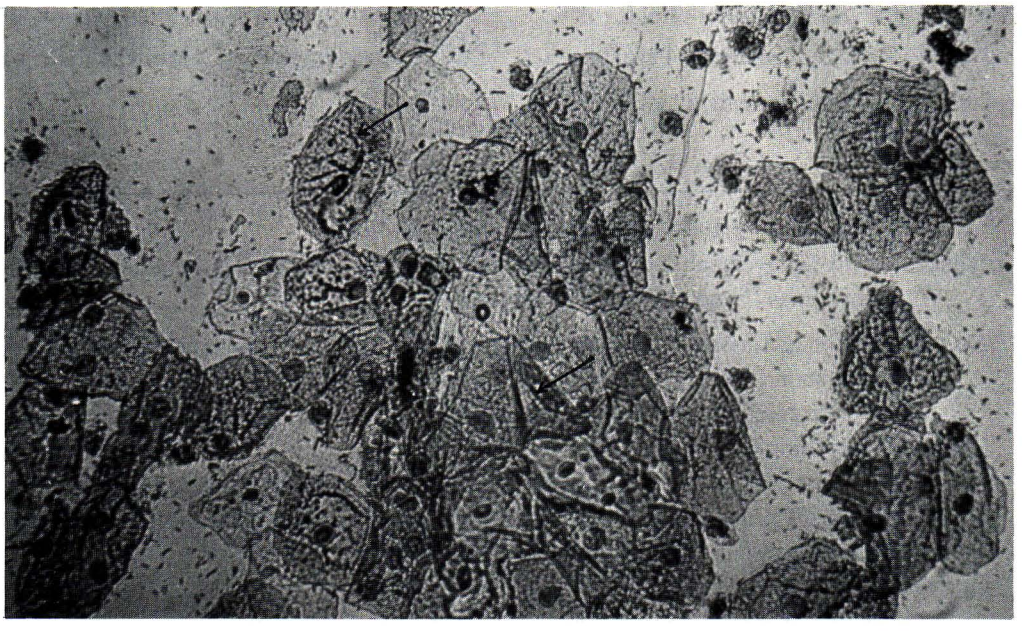

Figure 5 : Herpes simplex virus type II antigen in cytoplasm of epithelial cells from cervical smear (× 400)

Table 4 Incidence of Herpes simplex virus type II of women with symptomatic, and asymptomatic vaginitis and/or cervicitis from cervical swabs by direct immunoperoxidase staining method

patient	n	positive for HSV	
		n	%
Non-symptomatic	141	25	17.73
Symptomatic vaginitis/cervicitis	436	58	13.3
Total	577	83	14.4

จากผลนี้สรุปว่าพบ HSV type II ในคนไข้ที่ไม่แสดงอาการของการติดเชื้อในช่องคลอดและ/หรือปากมดลูก ซึ่งรวมทั้งสตรีที่มารับการตรวจภายในประจำปี, สตรีที่ป่วยเป็นโรคอื่น หรือเคยติดเชื้อ HSV type II มาแล้ว แต่อยู่ในระยะพัก (latent) ซึ่งพบ HSV type II จากตัวอย่าง cervical swabs 17.73% ส่วนในคนไข้ที่แสดงอาการช่องคลอดและ/หรือปากมดลูกอักเสบนั้น สามารถตรวจพบ HSV type II ได้ 13.3% ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดจากการติดเชื้อด้วยจุลชีพอื่น เช่น *Neisseria gonorrhea, Candida albicans* จะเห็นว่าการ detect หา HSV type II ด้วยวิธีนี้ทำง่าย

ได้ผลรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะดี เหมาะที่จะทำเป็นงานประจำ ซึ่งมีความสำคัญมากในการช่วยวินิจฉัยโรค

2. การกระจายของไวรัสพิษสุนัขบ้าในระบบประสาทส่วนกลางของผู้ป่วย Encephalitic และ Paralytic Rabies[43]

ในระหว่างปี 2530-2531 ได้เก็บตัวอย่างสมองและไขสันหลังผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้าจากโรงพยาบาลบำราศนราดูร กองควบคุมโรคติดต่อ จำนวน 7 ราย มีอาการแบบ encephalitic 4 ราย และ paralytic 3 ราย เมื่อนำสมองและไขสันหลังแช่ใน 10% ฟอร์มาลีน 7 วัน มาตัดเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ ของ brain regions นำไป embed ในพาราฟิน ตัด section หนา 6 ไมครอน แล้วย้อมเพื่อตรวจหาไวรัสแอนติเจน ด้วยวิธี Avidin-Biotin Peroxidase Complex ตามขั้นตอนคร่าว ๆ ดังนี้

1. deparaffinized section ด้วย xylene และ ethyl alcohol

2. แช่ใน 0.1% trypsin in PBS pH 7.8 ที่ 37°C 6 นาที (เพื่อย่อย aldehyde linkage ที่เกิดจากการแช่ฟอร์มาลีนนานเกินไป), ล้างใน PBS pH 7.4

3. block non-specific background ด้วย 2% normal goat serum 20 นาที

4. ย้อมด้วย primary antibody (horse anti-rabies Ig) เจือจาง 1 : 500 ใน 2% goat serum 45 นาที, ล้างใน PBS pH 7.4 และย้อมด้วย normal horse serum เจือจาง 1 : 500 เพื่อเป็น control

5. ย้อมด้วย secondary antibody (biotinylated goat antihorse IgG) เจือจาง 1 : 300 ใน 2% goat serum 30 นาที, ล้างใน PBS pH 7.4

6. แช่ใน 0.3% H_2O_2 in methanol 30 นาที (เพื่อ block endogenous peroxidase activity), ล้างใน PBS pH 7.4

7. ย้อมด้วย avidin-biotinylated peroxidase complex (เตรียมไว้ก่อนใช้ 30 นาที) นาน 30 นาที, ล้างใน PBS pH 7.4

8. หยด 0.5 mg/ml Diaminobenzidine ใน PBS ที่ผสมด้วย 0.01% H_2O_2 พอมีสีน้ำตาลเรื่อ ๆ รีบล้างด้วยน้ำกลั่น

9. แช่ใน 0.5% $CuSO_4$ ใน 0.15 M NaCl 5 นาที, ล้างน้ำกลั่น

10. counterstain ด้วย Gill's Hematoxylin 1-2 นาที

11. แช่ใน tap water substitute 2-3 นาที, ล้างน้ำกลั่น

12. dehydrate ด้วย ethyl alcohol และ xylene, mount และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x

13. Control ของการทดสอบนี้ ใช้เนื้อสมองของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้า ย้อมด้วยแอนติบอดีย์ต่อไวรัสตัวอื่น เช่น anti-Herpes simplex virus และใช้เนื้อสมองของคนปกติย้อมด้วย horse anti-rabies Ig ไปพร้อมกันด้วย เพื่อดูความจำเพาะของการทดสอบ

ผลของการย้อมเห็นเซลล์ประสาท (neurons) ที่มีไวรัสติดเป็นจุด (inclusion bodies) สีน้ำตาลเข้มใน cytoplasm, บางเซลล์เห็นเป็น diffusion staining เห็นได้ชัดเจนมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีไวรัสซึ่งติดสีม่วงของ hematoxylin (รูปที่ 6)

จากการย้อมโดยใช้วิธี ABC นี้ พบว่ามีความจำเพาะและความไวมาก เนื่องจากพบไวรัสพิษสุนัขบ้าในเซลล์ประสาทในทุกส่วน ของสมองและไขสันหลังอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ control วิธีนี้จึงสามารถนำมาดัดแปลงใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบหาไวรัสตัวอื่น ๆ บนเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้

3. ตำแหน่งของเซลล์ในสมองและไขสันหลังของผู้ป่วยโรคพิษสุนัขบ้าที่มีไวรัสอยู่

งานวิจัยอีกชิ้นซึ่งเริ่มเมื่อปี พ.ศ. 2530 และยังกำลังดำเนินการอยู่ โดยเก็บตัวอย่างสมองผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคพิษสุนัขบ้า จากโรงพยาบาลบำราศนราดูร กองควบคุมโรคติดต่อ นำชิ้นส่วนต่าง ๆ ของสมองเก็บแช่แข็งที่ -70 °C ตัดด้วย Cryostat หนาประมาณ 6 ไมครอน และทำตามกรรมวิธีเหมือนที่กล่าวข้างบน ต่างกันที่ใช้ primary antibodies เป็น monoclonal antibodies ต่อ membrane antigens ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เช่น Leu 4 (pan T cells), T4 (T helper cells), T8 (T suppressor cells), Leu 7 (NK cells), Leu 12 (B cells) และ HLA-DR

ผลของการย้อมเห็นเซลล์ติดสีน้ำตาลเข้มที่ขอบชัดเจน ส่วนนิวเคลียสติดสีม่วงของ Hematoxylin เซลล์ที่มี membrane antigens ไม่จำเพาะกับ monoclonal antibodies ชนิดที่ใช้ย้อมจะยังคงติดสีของ Hematoxylin ตามเดิม (รูปที่ 7)

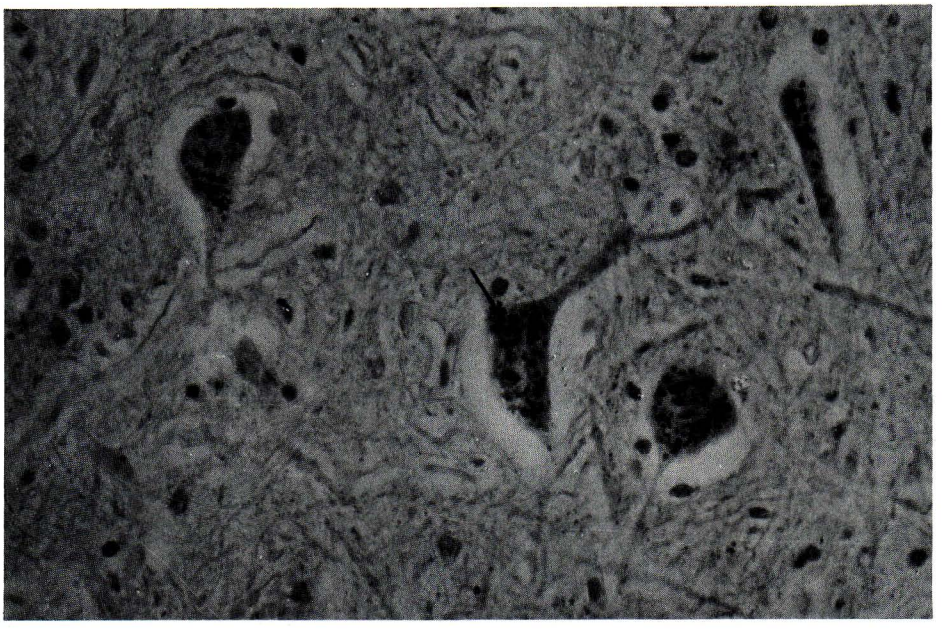

Figure 6 : Rabies viral antigen in neurons in the cervical cord enlargement of a rabies patient. Dense peroxidase reaction in the form of inclusions, is present in the cytoplasm (× 400)

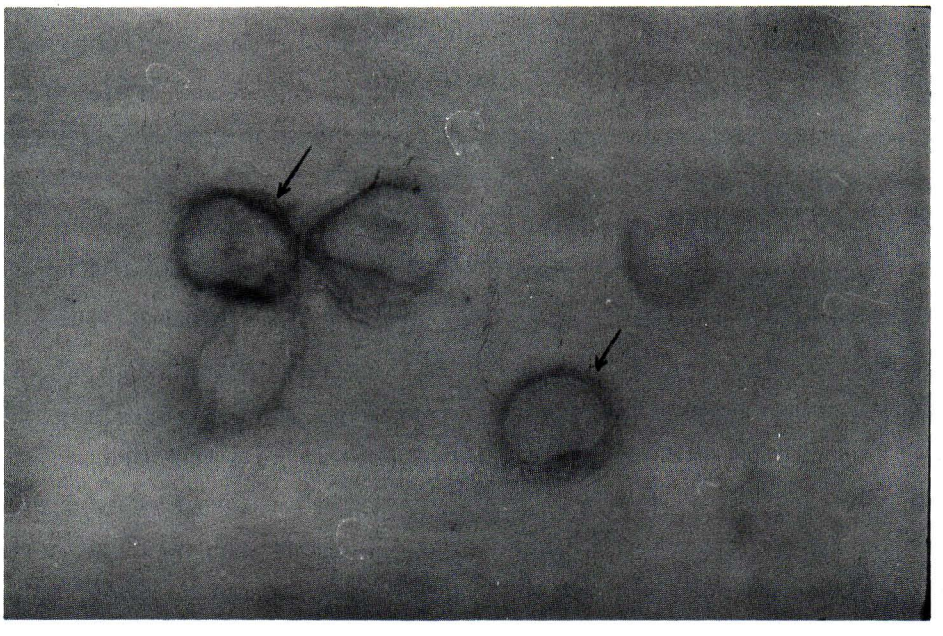

Figure 7 : T8 (suppressor T lymphocytes) : Stain for membrane antigen of lymphocytes in brain tissue (× 1,000)

วิธีนี้พบว่ามีความจำเพาะและความไวมาก เห็นผลชัดเจน จึงสามารถนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีได้อย่างชัดเจน

4. Autoantibody ต่อเซลล์ประสาทของสมองส่วนกลางในผู้ป่วย Opsoclonus

การศึกษานี้ได้เสนอเป็นแผ่นภาพในงานประชุมวิชาการประจำปี 2531 ของสมาคมประสาทวิทยา เมื่อเดือนกุมภาพันธ์ โดยนำน้ำเกลือของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีอาการ Opsoclonus มาย้อมบนชิ้นส่วนต่าง ๆ ของสมองส่วนกลางของคนปกติ (ที่แช่ฟอร์มาลีน และ embed ด้วยพาราฟีน) เป็นแอนติเจนตามขั้นตอนดังกล่าวแล้ว

ผลการย้อมเห็นสีน้ำตาลติดเฉพาะ cytoplasm ของ

neurons ในสมองส่วนต่าง ๆ (รูปที่8) วิธีนี้ความไวมาก สามารถใช้ศึกษา autoantibodies ชนิดอื่น ๆ โดยใช้หลักการและขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกัน

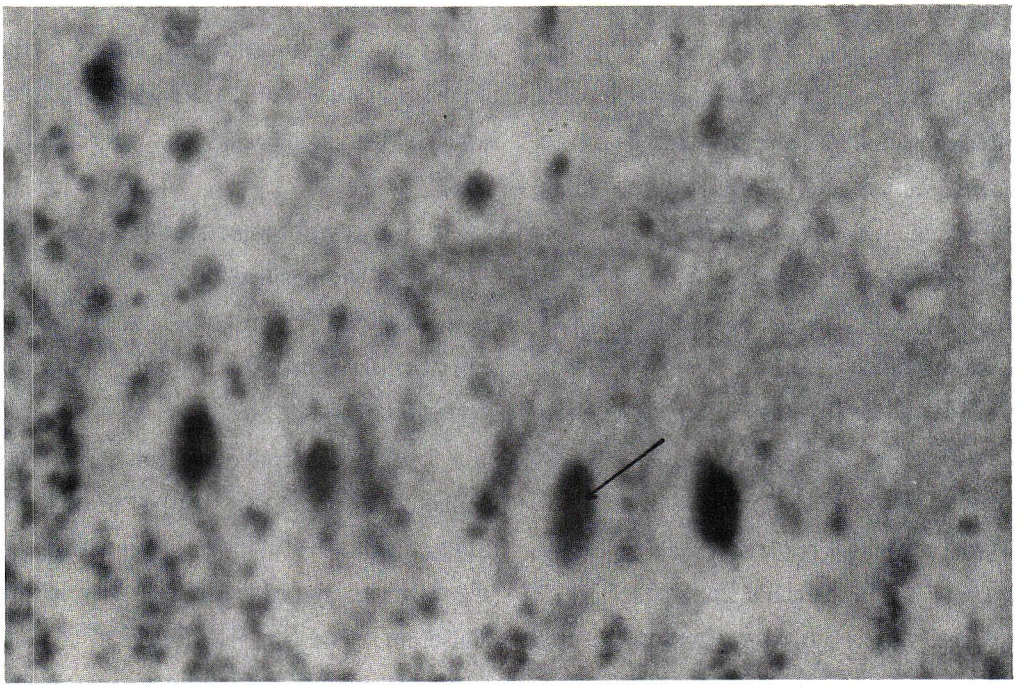

Figure 8 : Anti-Purkinje cell antibody of an opsoclonus patient, brown staining in the cytoplasm of brainstem neurons (× 400)

ข้อเสนอแนะและวิจารณ์

Immunoperoxidase staining เหมาะที่สุดในการทดสอบหาแอนติเจนได้หลายชนิดทั้งที่เป็นจุลชีพต่าง ๆ เช่น ไวรัส, บักเตรี และเชื้อรา ยังมีประโยชน์ในการหาชนิดของเซลล์ต่าง ๆ โดยใช้ monoclonal antibody นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น อิมมูโนโกลบูลิน รวมทั้งฮอร์โมนและเอ็นซัยม์ และยังใช้ศึกษา autoantibodies ต่าง ๆ ได้ ทำได้ทั้งตัวอย่างที่แช่ฟอร์มาลีนและแช่แข็ง เนื่องจากวิธีนี้มีความไวของการทดสอบสูงมาก สามารถมองเห็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน, สามารถตรวจสอบหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีย์จำนวนน้อย ๆ ได้ นอกจากนี้ขั้นตอนของการย้อมก็ง่าย และน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ก็มีจำหน่ายสำเร็จรูป รวมทั้งไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษที่มีราคาแพง และสไลด์ที่ย้อมแล้วก็สามารถเก็บไว้ศึกษาได้ตลอดไป ด้วยเหตุนี้การย้อมโดยวิธีนี้จึงมีประโยชน์มากและใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในห้องปฏิบัติการทางคลินิกและพยาธิวิทยา ทั้งงานประจำและงานวิจัย

ดังกล่าวแล้ว Avidin-biotin peroxidase complex เป็นวิธีที่นิยมกันมากที่สุด ปัจจุบันได้มีผู้ดัดแปลงวิธีการย้อมให้ใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น โดยใช้เอ็นซัยม์ 2 ชนิด เพื่อตรวจหาแอนติเจน 2-3 ชนิด (double staining) ได้บนชิ้นเนื้อหรือเซลล์ที่ติดบนสไลด์แผ่นเดียวกัน[44] จากการใช้ substrate ต่างกันจึงทำให้เห็นความแตกต่างของแอนติเจนเป็นสีต่างกันได้ในเวลาเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2530 Van der Loos และคณะ[45] ก็ได้ปรับปรุงวิธีการทดสอบโดยการรวมเทคนิค direct, indirect และ ABC เข้าด้วยกัน และใช้ทั้ง polyclonal และ monoclonal antibodies เพื่อตรวจสอบหาแอนติเจน 3 ชนิด (triple-staining) ได้ในขณะเดียวกัน เช่น อิมมูโนโกลบูลิน G, A, M, membrane antigens ของเม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocytes, granulocytes และ monocytes และ cytoskeleton protein 3 ชนิด เช่น vimentin, desmin และ keratin โดยใช้เอ็นซัยม์ 3 ชนิดคือ ß-galactosidase ให้สีเขียว, alkaline phosphatase ให้สีน้ำเงิน และ horseradish peroxidase ให้สีน้ำตาลแดง ซึ่งวิธีนี้

สามารถดัดแปลงใช้เป็น qualitative studies ดูการกระจายของเซลล์หลาย ๆ ชนิดบนชิ้นเนื้อชิ้นเดียวกันและในเวลาเดียวกันได้

การย้อมด้วยวิธีนี้มีข้อควรระวังและเทคนิคซึ่งจะทำให้เห็นผลดีขึ้นดังนี้

1. การเตรียมชิ้นเนื้อควรแช่ใน 10% ฟอร์มาลีน หรือ 10% bufferred neutral formalin อย่างน้อย 7 วัน เมื่อตัดเป็น paraffin section แล้วก่อนนำมาย้อมควรอบในอุณหภูมิไม่เกิน 60 °C เป็นเวลา 10 นาที

2. สไลด์ที่ใช้สำหรับ paraffin และ cryostat section เคลือบด้วย gelatin (Bloom 300) 0.1-0.25% เพื่อให้ชิ้นเนื้อติดแน่นบนสไลด์

3. น้ำที่ใช้ในการเตรียม PBS และการล้างมีความสำคัญมาก ควรเป็น deionized water และ PBS pH 7.4 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ย้อม

4. Block endogenous peroxidase activity โดยแช่ section ใน 0.3% H_2O_2 in methanol 30 นาที เนื่องจากปกติจะมี peroxidase อยู่แล้วในเนื้อเยื่อ, เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว ซึ่งอาจให้ผลบวกเทียมได้

5. บางครั้งการแช่ชิ้นเนื้อในฟอร์มาลีนนานเกินไปอาจทำให้ย้อมหาแอนติเจนไม่ติด เพราะเกิดการ form aldehyde linkage ไปบังแอนติเจนไว้ จึงต้องย่อย aldehyde bonds เหล่านี้ออกก่อนด้วย proteolytic enzymes โดยการแช่ใน 0.1% trypsin ใน PBS ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6-10 นาที แต่มีข้อเสียตรงที่มักจะทำให้ชิ้นเนื้อหลุดจากสไลด์ได้ จึงควรทำ duplicate slide ไปพร้อมกัน

6. สาเหตุของ non-specific background staining ที่สำคัญคือ charged collagen และสารต่าง ๆ ใน connective tissue ที่สามารถจับกับโปรตีนได้ จึงต้องใส่โปรตีนลงไปจับกับสารเหล่านี้ก่อนที่จะย้อมด้วย primary antibodies โดยใช้ non-immune serum ของสัตว์ species เดียวกันกับที่เตรียม secondary antibodies ในความเข้มข้น 2-5% ใน PBS pH 7.4 เป็นเวลา 20 นาที

7. primary antibodies ที่ใช้ควรเลือกชนิดที่มีความบริสุทธิ์และความจำเพาะเพียงพอ อาจเตรียมขึ้นเองเป็น polyclonal หรือ monoclonal antibodies ส่วน secondary antibodies ส่วนใหญ่มีจำหน่ายเป็นน้ำยาสำเร็จรูป ต้องเลือกใช้ species ให้ถูกต้องทั้ง primary และ secondary antibodies และที่สำคัญต้องนำมาทำ checkerboard titration ก่อนเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม รวมทั้ง incubation time ที่จะทำให้ผลการย้อมเห็นชัดเจนและ background น้อยที่สุด

8. substrate solutions ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง และให้หยดลงบนชิ้นเนื้อหรือเซลล์เพียง 1-2 หยด ในช่วงเวลา 1-20 นาที เพียงแค่เกิดสีน้ำตาลเรื่อ ๆ เท่านั้น แล้วรีบล้างด้วยน้ำกลั่น ข้อควรระวังในการชั่งเพราะ substrate ส่วนใหญ่เป็น carcinogenic จึงควรใส่ถุงมือและทำใน fume hood

9. การย้อมแต่ละครั้งต้องมี control ควบคู่ไปด้วย

9.1 positive control - ใช้ primary antibody ย้อมบนแอนติเจนที่ทราบความจำเพาะกัน เพื่อตรวจดูความเข้มข้นในอัตราส่วนที่เหมาะสม รวมทั้งน้ำยาที่ใช้และขั้นตอนการย้อมว่าถูกต้อง

9.2 negative control - ในกรณีที่ primary antibody เตรียมขึ้นเอง เพื่อทดสอบความจำเพาะโดยใช้ย้อมลงบนเซลล์หรือเนื้อเยื่อปกติ หรือมีแอนติเจนที่ไม่จำเพาะกัน ถ้าต้องการทดสอบความจำเป็นของแอนติเจนก็ให้ย้อมด้วย antiserum ชนิดต่าง ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกัน

นอกจากนี้ยังต้องทดสอบ non-specific staining และผลบวกเทียมที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยใช้ non immune serum จากสัตว์ species เดียวกัน หรือตัวเดียวกันกับที่ใช้ในการเตรียม primary antibodies เพื่อแสดงว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเกิดขึ้น

จากขั้นตอนวิธีการย้อม รวมทั้งข้อเสนอแนะต่าง ๆ ดังที่ได้เสนอไว้นี้ ผู้เขียนมีความเห็นว่าวิธีนี้ไม่ใช่วิธีที่ยากนัก แม้ว่าเวลาในการย้อมอาจจะหลายขั้นตอน และใช้เวลาค่อนข้างนาน แต่ผลที่เกิดขึ้นเห็นได้ชัดเจนและสามารถแยก positive และ negative cells ได้อย่างแน่นอน รวมทั้งมีการควบคุม (Control) ที่เชื่อถือได้ การย้อมนี้จึงมีประโยชน์มากทั้งในงานประจำและงานวิจัยที่ต้องการความแม่นยำ รวมทั้งความไวและความจำเพาะของการทดสอบก็ดีมากด้วย จึงขอเสนอให้นำมาดัดแปลงใช้ดังที่กล่าวมาแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านและ ผศ.นพ. ธีระวัตน์ เหมะจุฑา หน่วยประสาทวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำในการย้อมจากประสบการณ์ของท่านเป็นอย่างดี ดร.เพชรินทร์ ศรีวัตนกุล สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำในเรื่องการย้อม HSV type II, อจ.นพ.

กำจร ตติยกวี ในการจัดพิมพ์ระบบคอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชคณะแพทยศาสตร์ ประจำปี 2527, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ และกองวิทยาศาสตร์สภากาชาดไทยสถานเสาวภา ที่ให้ทุนสนับสนุนให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

อ้างอิง

1. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme labelled antibodies preparation and application for the localization of tissue antigens. J Histochem Cytochem 1966 Dec ; 14 : 929-931
2. Falini B, Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med 1983 Mar ; 107 (3) : 105-117
3. Heyderman E. Immunoperoxidase technique in histopathology : applications, methods, and controls. J Clin Pathol 1979 Oct; 32(10) : 971-978
4. Holden CA, Mac Donald DM. Immunoperoxidase techniques in dermatopathology. Clin Exp Dermatol 1983 Sep ; 8(5) : 443-457
5. Tubbs RR, Sheibani K, Weiss RA, Sebek BA. Immunohistochemistry of fresh-frozen lymphoid tissue with the direct immunoperoxidase technic. Am J Clin Pathol 1981 Feb ; 75(1) : 172-174
6. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody. a new method of conjugation. J Histochem Cytochem 1974 Dec ; 22 : (12) : 1084-1091
7. Mason DY, Sammons RE. The labelled antigen method of immunoenzymatic staining. J Histochem Cytochem 1979 Apr ; 27(4) : 832-840
8. Mason TE, Phifer R, Spicer SS, Swallow RA, Dreskin RB. An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens. J Histochem Cytochem 1969 Sep ; 17(9) : 563-569
9. Sternberger LA. The unlabelled antibody peroxidase anti-peroxidase (PAP) method. In : Sternberger LA, ed. Immunocytochemistry. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons, 1979. 104-169
10. Dubois-Dalcq M, McFarland H, McFarlin D. Protein A-peroxidase : a valuable tool for the localization of antigens. J Histochem Cytochem 1977 Nov ; 25(11) : 1201-1206
11. Calio MR, Lutz H, Binz H, Fey H. Protein A in immunoperoxidase techniques. J Histochem Cytochem 1979 Feb ; 27(2) : 691-693
12. Notani GW, Parsons JA, Erlandsen SL. Versatility of *Staphylococcus aureus* protein A in immunocytochemistry : use in unlabelled antibody enzyme system and fluorescent methods. J Histochem Cytochem 1979 Nov ; 27 (11) : 1438-1444
13. Falini B, Tabilio A, Zuccaccia M, Martelli MF. Protein A-peroxidase conjugates for two-stage immunoenzyme staining of intracellular antigens in paraffin-embedded tissues. J Immunol Methods 1980 ; 39(1-2) : 111-120
14. Cammisuli S. Hapten-modified antibodies specific for cell surface antigens as a tool in cellular immunology. In : Lefkovits I, Pernis B eds. Immunological Methods. New York : Acadamic Press, 1981. 139-162
15. Farr AG, Nakane PK. Use of anti-hapten in immunohistochemistry and immunoassay, abstracted. J Histochem Cytochem 1981 ; 29 : 831
16. Jasani B, Thomas DW, Williams ED. Use of monoclonal antihapten antibodies for immunolocalization of tissue antigens. J Clin Pathol 1981 Sep ; 34(9) : 1000-1002
17. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 1979 Aug ; 27(8) : 1131-1139
18. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981 Apr ; 29(4) : 577-580
19. Hitzman JL, Li CY, Kyle RA. Immunoperoxidase staining of bone marrow sections. Cancer 1981 Dec 1 ; 48(11) : 2438-2446
20. Holubar K Wolff K, Konrad K, Beutner EH. Ultrastructural localization of immunoglobulin of bullous pemphigoid skin. Employment of a new peroxidase-antiperoxidase multistep method. J Invest Dermatol 1975 Apr ; 64(4) : 220-227
21. Yaoita H, Foidart JM, Katz SI. Localization of the collagenous component in skin basement membrane. J Invest Dermatol 1978 Apr ; 70(4) : 191-193
22. Breathnach SM, Bhogal B, Dyck RF, De Beer FC, Black MM, Pepys MB. Immunohistochemical demonstration of amyloid P component in skin of normal subjects and patients with cutaneous

amyloidosis. Br J Dermatol 1981 Aug ; 105 (2) : 115-124

23. Kerdel FA, Morgan EW, Holden CA, MacDonald DM. Demonstratation of alpha 1-antitrypsin and alpha 1-antichymotrypsin in cutaneous histiocytic infiltrates and a comparison with intracellular lysozyme. J Am Acad Dermatol 1982 Aug ; 7(2) : 177-182
24. Chu AC, Mac Donald DM. Identification in situ of T lymphocytes in the dermal and epidermal infiltrates of mycosis fungoides. Br J Dermatol 1979 Feb ; 100(2) : 177-182
25. Sinclair RA, Burns J, Dunnill MS. Immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded, human renal biopsies with a comparison of the peroxidase-antiperoxidase (PAP) and indirect methods. J Clin Pathol 1981 Aug ; 34(8) : 859-865
26. Jobsis AC, De Vries GP, Anholt RR, Sanders JT. Demonstration of the prostatic origin of metastases : An immunohistochemical method for formalin-fixed paraffin embedded tissue. Cancer 1978 May ; 41(5) : 1788-1793
27. Kurman RJ, Scardino PT, McIntire KR, Waldmann TA, Javadpour N. Cellular localization of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in germ cell tumors of the testis using and indirect immunoperoxidase technique : a new approach to classification utilizing tumor markers. Cancer 1977 Nov ; 40(5) : 2136-2151
28. Palmer PE, Wolfe HJ. Immunocytochemical localization of onco-developmental proteins in human germ cell and hepatic tumors. J Histochem Cytochem 1978 Jul ; 26 (7) : 523-531
29. Huang S-N. Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections. Lab Invest 1975 Jul ; 33 (1) : 88-95
30. Adams RL, Springall DR, Levene MM, Bushell TE. The immunocytochemical detection of herpes simplex virus in cervical smears a valuable technique for routine use. J Pathol 1984 Aug ; 143 (4) : 241-247
31. Kotwal S, Narayan KG. Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of rabies-an alternative to fluorescent antibody test. Int J Zoonoses 1985 Mar ; 12 (1) : 80-85
32. McCallister JA, Boxer LA, Bachner RL. The use and limitation of labelled *Staphylococcal* protein A for study of antineutrophil antibodies. Blood 1979 Dec ; 54 (6) : 1330-1337
33. Tate DY, Carlton GT, Nesbit ME, Johnson D, Sorenson RL, Nesbit M, White J, Thompson T. Detection of platelet associated IgG in immune thrombocytopenia : a new assay employing protein A and perodxidase-antiperoxidase (PROA-PAP). Am J Hematol 1980 ; 9(4) : 349-361
34. Trost TH, Weil HP, Pullmann H, Steigleder GK. A new immunoenzyme tracer for immunohistology : peroxidase-labelled protein A. its application for determination of antinuclear antibodies. Klien Wochenschr 1980 May ; 58(9) : 475-478
35. Trost TH, Weil HP, Noack M, Pullmann H, Steigleder GK. A new immunoenzyme tracer for localization of antibodies in immunohistology : peroxidase-labelled protein A. J Cutan Pathol 1980 Aug ; 7(4) : 227-235
36. Warnke R, Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies : a biotin-avidin horseradish peroxidase method. J Histochem Cytochem 1980 Aug ; 28 (8) : 771-776
37. Sobel RA, Blanchette BW, Bhan AK, Colvin RB. The immunopathology of experimental allergic encephalomyelitis. I. Quantitative analysis of inflammatory cells in situ. J Immunol 1984 May ; 132(5) : 2393-2401
38. Johnson RT, Burke DS, Elwell M, Leake CJ, Nisalak A, Hoke CH. Japanese encephalitis : immunocytochemical studies of viral antigen and inflammatory cells in fetal cases. Ann Neurol 1985, Nov; 18(5) : 567-573
39. Pumarola-Sune T, Navia BA, Cordon-Cardo C, Cho E-S, Price RW. HIV antigen in the brains of patients with the AIDS dementia complex. Ann Neurol 1987 May ; 21(5) : 490-496
40. Nalesnik MA, Rabin BS. A comparison of indirect immunofluorescence and the avidin-biotin-peroxidase conjugate technic (ABC) in the performance of the antinuclear antibody test. Am J Clin Pathol 1984 Feb ; 81(2) : 192-197
41. Tsukamoto T, Yoshie O, Tada K, Iwasaki Y. Anti-Purkinje cell antibody producing B-cell lines from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. Arch Neurol 1987 Aug ; 44 : 833-837
42. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 1981 Nov ; 29(11) : 1349-1353
43. Tirawatnpong S, Hemachudha T, Manutsathit S, Shuangshoti S, Phanthumchinda K, Phanuphak P. Regional distribution of rabies viral antigen

in central nervous system of human encephalitic and paralytic rabies. (Submitted for publication)

44. Claassen E, Boorsma DM, Kors N, Van Rooijen N. Double-enzyme conjugates, producing an intermediate color, for simultaneous and direct detection of there different intracellular immunoglobulin determinants with only two enzymes. J Histochem Cytochem 1986 Apr ; 34(4) : 423-428

45. Van der Loos CM, Das PK, Houthoff HJ. An immunoenzyme triple staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique. J Histochem Cytochem 1987 Nov ; 35(11) : 1199-1204