

การศึกษาเปรียบเทียบการทำให้สไลด์แห้งด้วยวิธี air dry กับวิธีใช้แอลกอฮอล์ ในการย้อมสีพิเศษ Mayer's mucicarmine stain และ Periodic acid-Schiff

สว่าง ชัยโส วท.บ., รัชฎา ทิพยดาราพาณิชย์ พ.บ.,

เพลินพิศ ประสพโชค พ.บ., ศรัญญา กันทาสีบ พ.บ., ประรณนา จิรวีรกุล พ.บ.

กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิภาค โรงพยาบาลลำปาง

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: การย้อมสีพิเศษ Periodic acid-Schiff (PAS) และ Mayer's mucicarmine stain (Mucin) เป็นที่นิยมใช้ในงานพยาธิวิทยา ซึ่งในขั้นตอน dehydration นิยมใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวทำให้สไลด์แห้ง แต่การย้อมสีพิเศษ Wade-Fite stain แนะนำให้ใช้วิธี air dry เพื่อรักษาสภาพของผนังเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ทำให้คุณภาพสไลด์ดีขึ้น

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาคุณภาพสไลด์จากการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin ที่ใช้วิธี air dry ในขั้นตอนการทำให้สไลด์แห้ง เปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่ใช้แอลกอฮอล์

วัสดุและวิธีการ: เป็นการศึกษาแบบ experimental study ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ส่งมาตรวจที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิภาค รพ.ลำปาง เพื่อทำการย้อมสีพิเศษ PAS 145 ตัวอย่าง และ Mucin 100 ตัวอย่าง ระหว่าง 1 กุมภาพันธ์ - 30 มิถุนายน 2559 นำบล็อกชิ้นเนื้อมาตัดออกเป็นตัวอย่างละ 2 แผ่นสไลด์ ย้อมสีพิเศษตามขั้นตอนมาตรฐาน ยกเว้นขั้นตอน dehydration กลุ่มทดลองใช้วิธี air dry โดยนำสไลด์มาแผ่วบนถาด ทิ้งไว้ให้แห้งในห้องที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที กลุ่มควบคุมทำให้สไลด์แห้งด้วยแอลกอฮอล์ ประเมินคุณภาพสไลด์ทั้ง 2 กลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยพยาธิแพทย์ 4 คน ให้คะแนนเป็น 3 ระดับคือ ควรปรับปรุง, ดี และดีมาก วิเคราะห์เปรียบเทียบคะแนนระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ McNemar's test และ Chi-square test

ผลการศึกษา: การย้อมสี PAS ที่ใช้วิธี air dry พบว่า คุณภาพดีมาก ร้อยละ 58.6 และดี ร้อยละ 41.4 วิธีที่ใช้แอลกอฮอล์ พบว่า คุณภาพดีมาก ร้อยละ 50.3, ดี ร้อยละ 48.3 และควรปรับปรุง ร้อยละ 1.4 โดยทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=1.000$) ส่วนการย้อมสี Mucin ที่ใช้วิธี air dry พบว่า คุณภาพดีมาก ร้อยละ 25.0, ดี ร้อยละ 72.0 และควรปรับปรุงร้อยละ 3.0 วิธีที่ใช้แอลกอฮอล์ พบว่า คุณภาพดีมาก ร้อยละ 36.0, ดี ร้อยละ 62.0 และควรปรับปรุง ร้อยละ 2.0 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=1.000$)

สรุป: การทำให้สไลด์แห้งด้วยวิธี air dry ให้คุณภาพของสไลด์ที่ดีเทียบเท่ากับการใช้แอลกอฮอล์ ในการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin โดยช่วยลดขั้นตอนในการย้อมและประหยัดค่าใช้จ่าย

คำสำคัญ: การย้อมมิวซิน, การย้อมพีเอเอส, แอร์ดราย, แอลกอฮอล์, การทำให้สไลด์แห้ง

ติดต่อบทความ : สว่าง ชัยโส กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิภาค รพ.ลำปาง 280 ถ.พหลโยธิน ต.หัวเวียง อ.เมือง จ.ลำปาง 52000 โทร. 0-5423-7400 ต่อ 3101 E-mail: sawang358@gmail.com

บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์ที่พบผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี การวินิจฉัยและดูแลรักษามีความซับซ้อน ต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและการทำงานเป็นทีมสหสาขาวิชาชีพ ขั้นตอนที่สำคัญที่สุด (gold standard) ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งคือ การตรวจชิ้นเนื้อทางศัลยพยาธิวิทยา บางกรณีอาจต้องใช้การตรวจพิเศษเพิ่มเติม เช่น อิมมูโนฮิสโตเคมี (immune-histochemistry) อณูพยาธิวิทยา (molecular pathology) และการย้อมสีพิเศษ (special stain) ในการจำแนกชนิดของเซลล์มะเร็ง เพื่อบอกพยากรณ์โรคและประเมินการแพร่กระจายของมะเร็ง ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญและจำเป็นที่ต้องใช้ในการดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป⁽¹⁾

การย้อมสีพิเศษ Periodic acid-Schiff (PAS) และ Mayer's mucicarmine stain (Mucin) เป็นการย้อมที่นิยมใช้ในงานพยาธิวิทยา เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคได้หลายชนิด ที่สำคัญได้แก่ adenocarcinoma และ fungal infection เป็นต้น^(2,3) โดยการตรวจหาสาร polysaccharide จำพวก glycogen และสารกลุ่ม mucosubstance เช่น glycoprotein และ glycolipid กระบวนการย้อม มี 6 ขั้นตอนคือ deparaffinization, hydration, staining, dehydration, clearing และ mounting ซึ่งในขั้นตอน dehydration นิยมใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวการทำให้สไลด์แห้ง อย่างไรก็ตามในการย้อมสีพิเศษบางอย่าง เช่น Wade-Fite stain⁽⁴⁾ สำหรับเชื้อ Mycobacterium leprae แนะนำให้ใช้วิธี air dry เพื่อรักษาสภาพของผนังเซลล์ไม่ให้ถูกทำลาย ทำให้คุณภาพสไลด์ดีขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยมีความสนใจที่นำวิธี air dry มาใช้ในการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณภาพสไลด์จากการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin ที่ใช้วิธี air dry ในขั้นตอน

การทำให้สไลด์แห้ง เปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่ใช้แอลกอฮอล์

วัสดุและวิธีการ

เป็นการศึกษาแบบ experimental study ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ส่งมาตรวจที่กลุ่มงานพยาธิวิทยา กายวิภาค รพ.ลำปาง เพื่อทำการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin ในช่วงระยะเวลา 1 กุมภาพันธ์ - 30 มิถุนายน พ.ศ. 2559 เกณฑ์คัดออก ได้แก่ สไลด์ที่ย้อมแล้วมีการหลุดลอกหรือมีรอยพับ สไลด์ที่เกิดความผิดพลาดระหว่างขั้นตอนการย้อม เช่น ระยะเวลาหรือขั้นตอนไม่ตรงกับมาตรฐานที่กำหนดไว้

การทดลองทำโดยนำบล็อกชิ้นเนื้อมาตัดออกเป็นตัวอย่างละ 2 แผ่นสไลด์ กำหนดรหัสแทนแต่ละสไลด์ ทำการย้อมสีพิเศษตามขั้นตอนมาตรฐาน ยกเว้นขั้นตอน dehydration กลุ่มทดลองใช้วิธี air dry โดยนำสไลด์มาแผ่วบนกระดาษไว้ให้แห้งในห้องที่เปิดเครื่องปรับอากาศอุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการ mounting ส่วนกลุ่มควบคุมทำให้สไลด์แห้งด้วยแอลกอฮอล์ โดยการจุ่มสไลด์ลงในโถน้ำยา 95% alcohol 3 โถ และ isopropyl alcohol 3 โถๆ ละ 20 วินาที จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ clearing และ mounting ตามลำดับ การย้อมสีในแต่ละรอบ สไลด์ทั้ง 2 กลุ่มผ่านการย้อมในสีโถเดียวกัน เพื่อให้ได้คุณภาพเท่ากันและมีการเปลี่ยนน้ำยาทุกวัน

สไลด์ทั้ง 2 กลุ่มได้รับการประเมินคุณภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยพยาธิแพทย์ 4 คนที่ไม่ทราบกระบวนการทำให้แห้งของสไลด์แผ่นนั้นมาก่อน กำหนดเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้คือ 1 คะแนน (ควรปรับปรุง) บริเวณรอยโรคติดสีไม่ชัดเจน พื้นหลังขุ่น มีตะกอนบดบังมาก, 2 คะแนน (ดี) บริเวณรอยโรคติดสีชัดเจน พื้นหลังใส มีตะกอน

เล็กน้อย และ 3 คะแนน (ดีมาก) บริเวณรอยโรคติดสีชัดเจน พื้นหลังสี ไม่มีตะกอน โดยคะแนนระดับ 2 ขึ้นไปถือว่ามีความเหมาะสมต่อการวินิจฉัย เพื่อลดปัญหาในเรื่องมาตรฐานการประเมิน ผู้วิจัยได้ทำสไลด์มาตรฐานขึ้นมา 1 ชุด เพื่อให้พยาธิแพทย์ทุกคนเห็นพ้องร่วมกันในการอ่านค่ามาตรฐานของแต่ละระดับ (consensus) วิเคราะห์เปรียบเทียบคะแนนระหว่างกลุ่ม ด้วยสถิติ McNemar's test และ Chi-square test กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p=0.05$

การคำนวณขนาดตัวอย่างใช้สูตร two sample comparison of proportion (2-sided) โดยอ้างอิงข้อมูลการประเมินคุณภาพสไลด์โดยพยาธิแพทย์ รพ.ลำปาง ใน pilot study ที่ย้อม PAS และ Mucin จำนวน 24 ตัวอย่าง กำหนดกำลังทดสอบที่ร้อยละ 80 และ type 1 error ร้อยละ 5 คำนวณได้จำนวนในกลุ่ม PAS 137 ตัวอย่างและ Mucin 93 ตัวอย่าง

ผู้วิจัยจึงกำหนดขนาดตัวอย่างเป็น 145 และ 100 ตัวอย่างตามลำดับ การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยโรงพยาบาลลำปาง เลขที่ 27/2559

ผลการศึกษา

การย้อมสี PAS ที่ใช้วิธี air dry พบว่าคุณภาพของแผ่นสไลด์อยู่ในระดับดีมาก 85 ตัวอย่าง (ร้อยละ 58.6) ระดับดี 60 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.4) และไม่พบแผ่นสไลด์ที่ควรปรับปรุงเลย ส่วนวิธีที่ทำให้สไลด์แห้งโดยใช้แอลกอฮอล์ พบว่าคุณภาพของแผ่นสไลด์อยู่ระดับดีมาก 73 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50.3) ระดับดี 70 ตัวอย่าง (ร้อยละ 48.3) และควรปรับปรุง 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.4) เนื่องจากมีพื้นหลังขุ่น เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพสไลด์ทั้ง 2 วิธีแล้ว (ตารางที่ 1) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=1.000$)

ตารางที่ 1 คุณภาพสไลด์ที่ย้อมสี PAS ที่ประเมินโดยพยาธิแพทย์ เปรียบเทียบระหว่าง วิธีที่ทำให้สไลด์แห้งโดยใช้แอลกอฮอล์กับวิธี air dry ($n=145$)

คุณลักษณะ	วิธีใช้แอลกอฮอล์		วิธี air dry		ค่า p
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	
คุณภาพสไลด์					
1 คะแนน (ควรปรับปรุง)	2	1.4	0	0.0	1.000
2 คะแนน (ดี)	70	48.3	60	41.4	
3 คะแนน (ดีมาก)	73	50.3	85	58.6	
ลักษณะการติดสี					
บริเวณรอยโรคติดสีชัดเจน	145	100.0	145	100.0	1.000
พื้นหลังใส	143	98.6	145	100.0	0.934
ไม่มีตะกอน	73	50.3	85	58.6	0.195

ตารางที่ 2 คุณภาพสไลด์ที่ย้อมสี Mucin ที่ประเมินโดยพยาธิแพทย์ เปรียบเทียบระหว่าง วิธีที่ทำให้สไลด์แห้งโดยใช้แอลกอฮอล์กับวิธี air dry (n=100)

คุณลักษณะ	วิธีใช้แอลกอฮอล์		วิธี air dry		ค่า p
	จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ	
คุณภาพสไลด์					
1 คะแนน (ควรปรับปรุง)	2	2.0	3	3.0	1.000
2 คะแนน (ดี)	62	62.0	72	72.0	
3 คะแนน (ดีมาก)	36	36.0	25	25.0	
ลักษณะการติดสี					
บริเวณรอยโรคติดสีชัดเจน	98	98.0	97	97.0	1.000
พื้นหลังใส	100	100.0	100	100.0	1.000
ไม่มีตะกอน	36	36.0	25	25.0	0.124

การย้อมสี Mucin ที่ใช้วิธี air dry พบว่าคุณภาพของแผ่นสไลด์อยู่ระดับดีมาก 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.0) ระดับดี 72 ตัวอย่าง (ร้อยละ 72.0) และควรปรับปรุง 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.0) ส่วนวิธีที่ทำให้สไลด์แห้งโดยใช้แอลกอฮอล์ พบว่าคุณภาพของแผ่นสไลด์อยู่ระดับดีมาก 36 ตัวอย่าง (ร้อยละ 36.0) ระดับดี 62 ตัวอย่าง (ร้อยละ 62.0) และควรปรับปรุง 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.0) โดยสไลด์ที่ควรปรับปรุงจากทั้ง 2 กลุ่มนั้น พบว่ามีตะกอนบดบังบริเวณรอยโรค เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพสไลด์ทั้ง 2 วิธีแล้ว (ตารางที่ 2) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p=1.000)

วิจารณ์

การย้อมสี PAS ที่ทำให้สไลด์แห้งโดยใช้แอลกอฮอล์ พบว่า ร้อยละ 1.4 ของแผ่นสไลด์มีคุณภาพไม่เหมาะสมต่อการวินิจฉัย โดยมีสีขาว

ขุ่นซึ่งเกิดจากขั้นตอน dehydration ไม่สามารถดึง 95% alcohol ออกจากชิ้นเนื้อได้หมด ดังนั้นเมื่อผสมกับ xylene จึงเกิดสีขาวขุ่น วิธีการแก้ไขต้องใช้ isopropyl alcohol ที่ใหม่หรือมี 95% alcohol ปนเปื้อนน้อยที่สุด ในขณะที่วิธี air dry ไม่พบแผ่นสไลด์ที่ควรปรับปรุงเลย แสดงให้เห็นว่า วิธี air dry จะช่วยลดการปนเปื้อนของ 95% Alcohol ในขั้นตอน mounting ได้

การย้อมสี Mucin พบแผ่นสไลด์มีคุณภาพไม่เหมาะสมต่อการวินิจฉัย ร้อยละ 3 จากวิธี air dry และร้อยละ 2 จากวิธีใช้แอลกอฮอล์ ซึ่งทั้งหมดพบว่ามีตะกอนสีของ counter stain (Metanil yellow) เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจเกิดจากการล้างสี counter stain ที่เร็วเกินไป วิธีแก้ไขจึงควรเพิ่มเวลาในการล้างให้มากขึ้นและล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งไม่มีสีหลุดออกมาอีกหรือมีน้อยที่สุด โดยอาจใช้น้ำกลั่นขวดใหม่ทุกครั้ง ซึ่งการล้างให้นานขึ้นนี้ไม่มี

ผลกระทบกับการติดสีของ Mucin ในชั้นเนื้อ

การศึกษานี้พบว่า การทำให้สไลด์แห้งด้วยวิธี air dry ให้คุณภาพของสไลด์ที่ดีเทียบเท่ากับการใช้แอลกอฮอล์ สอดคล้องกับวิธี Wade-Fite stain ⁽⁵⁾ และงานวิจัยของรุ่งนภา คงทองสังข์และอำพรณ ไชยพันธ์. ⁽⁶⁾ ที่แนะนำให้ใช้วิธี air dry ในขั้นตอน dehydration และแอลกอฮอล์ก็ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์บริเวณรอยโรค อาจเนื่องมาจากเซลล์ที่ติดสี PAS และ Mucin ส่วนมากมีองค์ประกอบที่เป็น polysaccharides และไม่มี mycolic acid เหมือนกับผนังเซลล์ของ Mycobacterium

การทำให้สไลด์แห้งด้วยวิธี air dry นอกจากทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อ 95% alcohol และ isopropyl alcohol ลงได้อย่างละ 70 ลิตรต่อปี (ราคาลิตรละ 103 บาท) แล้วยังช่วยตัดขั้นตอน clearing ออกไปได้เนื่องจากไม่มีแอลกอฮอล์ในชั้นเนื้อ ทำให้ลดการใช้สาร xylene ที่เป็นอันตรายลงได้อีก 70 ลิตรต่อปี (ราคาลิตรละ 100 บาท) คิดเป็นค่าใช้จ่ายที่ประหยัดได้ 21,420 บาทต่อปี วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนสไลด์

ย้อมพิเศษจำนวนมาก เนื่องจากมีขั้นตอนที่สั้นลงและยังสามารถต่อยอดเป็นแนวทางในการศึกษาการย้อมพิเศษวิธีอื่นๆ ต่อไป

สรุป

การทำให้สไลด์แห้งด้วยวิธี air dry ให้คุณภาพของสไลด์ที่ดีเทียบเท่ากับการใช้แอลกอฮอล์ในการย้อมสีพิเศษ PAS และ Mucin โดยช่วยลดขั้นตอนในการย้อมและประหยัดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีที่อาจเป็นอันตรายได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.นพ.ชยันต์ ฐรปทุมานนท์ ภาควิชาโรคพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ดร.นพ.ธานี นทร์โลกศกระวี กลุ่มงานเวชศาสตร์ฉุกเฉิน, นพ.ปิยพงษ์ อุ้นปัญญา กลุ่มงานพยาธิวิทยาภาควิภาค และคณะกรรมการส่งเสริมงานวิจัยรพ.ลำปางที่สนับสนุนและให้คำแนะนำในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ละออ ชมพักตร์. บทนำสู่พยาธิวิทยา [อินเทอร์เน็ต]. 2551 [เข้าถึงเมื่อ 24 ต.ค. 2560]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.med.nu.ac.th/pathology/405213/book/พยาธิวิทยา.pdf>
2. Kwon AY, Han J, Chu J, Choi YS, Jeong BH, Ahn MJ, et al. Histologic characteristics of thymic adenocarcinomas: Clinicopathologic study of a nine-case series and a review of the literature. *Pathol Res Pract* 2017;213:106-12.
3. Maesaki S, Kohno S, Mashimoto H, Araki J, Asai S, Hara K. Detection of *Cryptococcus neoformans* in bronchial lavage cytology: report of four cases. *Intern Med* 1995;34:54-7.
4. Bortlett JH. Microorganism. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; 1996. p.309.
5. Reja AH, Biswas N, Biswas S, Dasgupta S, Chowdhury IH, Banerjee S, et al. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2013;79:693-700.
6. รุ่งนภา คงทองสังข์, อำพรณ ไชยพันธ์. การเปรียบเทียบการติดสีเซลล์ในสไลด์แป้นเสมียร์ด้วยวิธีการย้อมตามขั้นตอนปกติกับการย้อมแบบใหม่โดยใช้ไคร์เป่า [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 23 ธันวาคม 2559]. เข้าถึงได้จาก: www.mtcouncil.org/site/.../CQI%20Pap%20smear%20รุ่งนภา.pdf

A Comparative Study of Slide Dehydration with Air-dry Method and Alcohol Method in Mayer's Mucicarmine and Periodic Acid-Schiff Stains

Sawang Chaiso B.S., Wichai Tipayadarapanich M.D.,
Phloenphit Prasopchoke M.D., Sarunya Kantasueb M.D.,
Prattana Chiravirakul M.D.

Department of Pathology, Lampang Hospital, Lampang, Thailand

Lampang Med J 2017; 38(2): 69-75

Abstract

Background: Periodic acid-Schiff (PAS) and Mayer's mucicarmine (Mucin) stains are special stains commonly used in surgical pathology. Alcohol is used in the dehydration step for drying the slide. However, in the Wade-Fite stain, air drying is recommended to preserve the cell walls and improve slide quality.

Objective: To compare the quality of slides for PAS and Mucin stains between using the air-dry method and alcohol method in the dehydration step.

Materials and method: An experimental study was conducted on 245 pathological specimens (145 prepared for PAS stain and 100 prepared for Mucin stain) at the Department of Pathology, Lampang Hospital between 1st February and 30th June 2016. From the section of each tissue sample, 2 slides were prepared; one for each of the PAS and Mucin stains. In the study group, the slide was dehydrated by air-drying (leaving the slide in the open air at 25°C for 5 minutes) and mounted without clearing. In the control group, the slide was dehydrated by using alcohol, followed by clearing and mounting. The quality of each stained slide was evaluated by 4 pathologists and categorized using 3 levels: poor (score 1), good (score 2) and very good (score 3). The scores were compared between groups by using McNemar's test and the Chi-square test.

Results: The quality of PAS stained slides using the air-dry method were evaluated as very good 58.6% and good 41.4%. The standard method showed very good quality 50.3%, good 48.3% and poor 1.4%. There was no significant difference between the two drying method ($p=1.000$). For Mucin stained slides, the air-dry method yielded very good quality 25.0%, good 72.0% and poor 3.0%. There was no significant difference between the two drying methods ($p=1.000$).

Conclusion: In the dehydration step for PAS and Mucin stains, air drying can be used instead of alcohol to make cost saving for these special stains.

Keywords: Mucin stain, PAS stain, air-dry, alcohol, slide dehydration