

Specimen Submission in Ophthalmic Pathology: Role of Ophthalmologists

Buravej Assavapongpaiboon, MD, Wasee Tulvatana, MD, MSc

Abstract

Pathological examination has an essential role in disease diagnosis and prognosis. However, pathological interpretation may be difficult or even impossible if cellular morphology or microstructures are distorted due to an artifact, an artificial structure, or tissue alteration caused by the preparation process for a microscopic slide. Ophthalmologists who submit specimens for pathological examination should have knowledge of specimen collection for surgical pathology, cytology, and frozen sections about proper surgical techniques for each organ collection and type/amount of fixative with appropriate container. Importantly, precise communication between a surgeon and a pathologist should be made via an ophthalmic pathology consultation request form. Data should be completely provided for clear-cut understanding of the submitted specimen. This leads to an accurate interpretation of pathological results, which helps guide further patient management.

Key words: specimen submission, specimen collection, ophthalmic pathology, fixation

การส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา สำหรับจักษุแพทย์

การส่งตรวจทางพยาธิวิทยามีบทบาทสำคัญสำหรับการวินิจฉัยแยกโรค การวินิจฉัยโรคขั้นสุดท้าย การบอกการพยากรณ์โรค และอื่น ๆ อย่างไรก็ตามการแปลผลทางพยาธิวิทยาอาจทำได้ยาก สูญเสียความแม่นยำ หรือกระทั่งไม่สามารถทำได้หากชิ้นเนื้อไม่มีลักษณะรูปร่างหรือการจัดวางของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากมี artifact ซึ่งคำว่า artifact นี้ ในทางพยาธิวิทยาหมายถึง สิ่งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการพยาธิวิทยาระหว่างการเตรียมชิ้นเนื้อ (specimen handling) ตั้งแต่เก็บชิ้นเนื้อจนถึงการลงสไลด์โดยไม่ได้เป็นพยาธิสภาพจริงที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย ได้แก่

1. prefixation artifacts (Figure 1)

- crush artifact เวลาชิ้นเนื้อถูกหนีบด้วย forceps เมื่อเกิดขึ้นทำให้รายละเอียดเซลล์เห็นได้ไม่ดี nucleus จะติดสีเข้มขึ้นและมีรูปร่างเปลี่ยนไป ทำให้ยากต่อการวินิจฉัย หรือในบางครั้งไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้เลย

- hemorrhagic artifact การผ่าตัดที่มีเลือดออกเข้าไปในชิ้นเนื้ออาจทำให้แยกยากจากการที่มีเลือดออกจากพยาธิสภาพจริง

- autolysis artifact การที่เนื้อเยื่อไม่ได้ถูกตรึงด้วยน้ำยา fixative ในทันที ทำให้เกิด autolysis เกิดการทำลายโปรตีน RNA และ mitochondria จาก enzyme ที่ถูกปลดปล่อย ลักษณะเซลล์จะติดสีแดง (eosinophilia) มากขึ้นจากการที่ RNA ใน cytoplasm ลดลง รวมถึงมีการเปลี่ยนแปลงของ nucleus ได้แก่ pyknosis (nucleus จับเป็นก้อนติดสีน้ำเงินเข้ม), karyolysis (nucleus ติดสีน้ำเงินจางลงและไม่คมชัด) และ karyorrhexis (nucleus แตกเป็นชิ้นย่อย)

2. fixation artifacts

- ice-crystal artifact จากการแช่ชิ้นเนื้อในช่องแช่แข็งตู้เย็นทั่วไป ทำให้อุณหภูมิติดลบอย่างช้าๆ ทำให้เกิด

ผลึกน้ำแข็งเปิดให้โครงสร้างเนื้อเยื่อผิดรูปไประหว่างการตรึงชิ้นเนื้อ

3. tissue-processing artifacts

- loss of soluble substances จากการใช้ xylene ซึ่งจะละลายไขมันออกไปหมดทำให้ไม่เหลือไขมันในเนื้อเยื่อจึงเห็นเป็นช่องว่างแทน ซึ่งทำให้ไม่สามารถย้อมเพื่อแสดงไขมันในเนื้อเยื่อได้หลังผ่านขั้นตอนนี้

4. artifacts related to microtomy

- displacement of tissue components โดยเฉพาะเนื้อเยื่อแข็งเช่นกระดูกซึ่งเกิดจากการใช้มีดตัดที่ไม่คม

5. artifacts related to floatation and mounting

- folds and wrinkles in section จากการแผ่กางของเนื้อเยื่ออย่างไม่สม่ำเสมอของ paraffin section ที่ถูกตัดออกมาแล้วลอยในอ่างน้ำร้อน

6. staining artifacts

- stain deposit จากการมีผงของสีเช่น hematoxylin ตกในสไลด์ เกิดจากการเตรียม solution ของสีย้อมที่ไม่เหมาะสม

7. mounting artifacts

- air bubbles artifact เกิดฟองอากาศใต้ cover-slip

จะเห็นได้ว่า artifact สามารถเกิดได้ตั้งแต่การเก็บชิ้นเนื้อออกจากคนไข้ก่อนใส่ในน้ำยา fixative (prefixation artifacts) การ fixation ที่ไม่เหมาะสม (fixation artifacts) จนถึงตลอดช่วงของการเตรียมสไลด์ในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยา ซึ่ง artifacts ส่วนใหญ่สามารถป้องกันได้ จักษุแพทย์ผู้ทำการส่งชิ้นเนื้อจึงควรมีความรู้ในการจัดส่งชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิ เพื่อป้องกัน ไม่ให้เกิด artifact เหล่านี้ขึ้นก่อนส่งชิ้นเนื้อให้ห้องปฏิบัติการเตรียมชิ้นเนื้อ เพื่อลดการเกิด artifact อันจะนำไปสู่ความยุ่งยากในการดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป

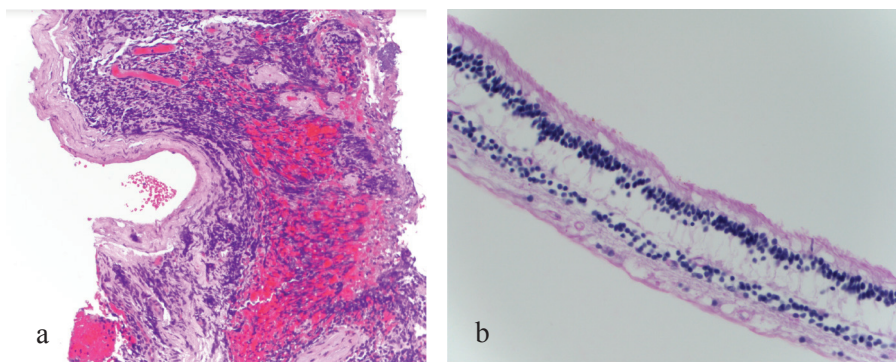


Figure 1 ตัวอย่าง prefixation artifacts

- a ลักษณะภาวะ crush artifact ซึ่งลักษณะ nucleus ติดสีเข้มขึ้นและมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากปกติ
- b ลักษณะภาวะ autolysis ของ photo receptor ของจอตาซึ่งตัวอย่างนี้ได้จาก autopsy

การเก็บชิ้นเนื้อเพื่อส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

การส่งตรวจชิ้นเนื้อศัลยกรรม (surgical pathology)

เป็นการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัด การนำชิ้นเนื้อออกมาตรวจควรใช้มีดตัดแทนการใช้การจี้ตัด (cautery) เพื่อป้องกัน cautery artifact โดยเฉพาะกรณี ต้องการดู surgical margin ของเนื้อเยื่อ ถ้าทำได้ควรตัดให้ครอบคลุมเนื้อเยื่อปกติที่อยู่รอบพยาธิสภาพเพื่อใช้บอกขอบเขตของพยาธิสภาพได้แม่นยำขึ้น ทั้งนี้ควรให้ความสำคัญแก่การระบุตำแหน่งของชิ้นเนื้อโดยเฉพาะเศษเนื้อออกเพื่อให้พยาธิแพทย์สามารถ orientation ชิ้นเนื้อและบอกการลุกลามถึง surgical margin ได้ถูกต้อง การเขียนระบุตำแหน่งในกระดาดกรองควรใช้ดินสอเนื่องจากหมึกในปากกาอาจละลายลงสู่น้ำยาตรึงสภาพได้

คำแนะนำการเก็บชิ้นเนื้อเฉพาะแต่ละอวัยวะ^{2,3}

1. เยื่อตา (conjunctiva)

- วางชิ้นเนื้อบนกระดาดกรองที่แห้ง เพื่อป้องกันการม้วนเข้าหากันเพราะเป็นเนื้อเยื่อที่บาง
- วางด้าน epithelium ขึ้นบน ให้ส่วน stroma ติดกับกระดาด
- ระบุฝั่งตำแหน่งขอบของเยื่อตาลงในกระดาดที่วาง หรือใช้วิธีตัดขอบกระดาดให้มีรูปร่างต่างกัน พร้อมเขียน orientation นั้นลงในใบขอส่งตรวจ

- รอสักครู่จนเนื้อแนบติดกับกระดาดค่อยใส่ในน้ำยา formalin เพื่อป้องกันการม้วนของเยื่อตาขณะที่ถูกตรึง

- ไม่ควรใช้ suture หรือเข็มกลัดปักลงเยื่อตา เพราะทำให้เกิด crush artifact บริเวณนั้น ซึ่งจะทำให้พยาธิสภาพของชิ้นเนื้อผิดเพี้ยนไปได้

- conjunctival map biopsy: เป็นการทำ incisional biopsy ขนาดเล็กจากหลาย ๆ ตำแหน่งของเยื่อตา เพื่อดูขอบเขตของมะเร็ง เช่น sebaceous carcinoma โดยควรแยกส่งชิ้นเนื้อที่ได้แต่ละตำแหน่งลงคนละภาชนะ พร้อมวาดแผนผังระบุตำแหน่งที่มีการเก็บตัวอย่างมา โดยพยาธิแพทย์จะอ่านชิ้นเนื้อที่ได้จากแต่ละว่ามีหรือไม่มีคามผิดปกตินั้น ไม่ควรใส่รวมมาในภาชนะเดียวกัน เพราะอาจทำให้สับสนเรื่องตำแหน่งของพยาธิสภาพได้

- กรณีที่สงสัยภาวะ ocular cicatricial pemphigoid ควรเก็บชิ้นเนื้อจากบริเวณที่เป็น active lesion เลี่ยงบริเวณที่เป็นแผลเป็น โดยแยกเก็บลงในทั้งขวด formalin และ Michel or Zeus medium เพื่อส่งตรวจ direct immunofluorescence ต่อไป

2. กระจกตา (cornea)

- กรณีทำผ่าตัดเปลี่ยนกระจกตาแบบทุกชั้น (penetrating keratoplasty) สามารถใส่ลงใน formalin

ได้เลยทั้งชิ้น

- กรณีทำผ่าตัดกระจกตาเพียงบางชั้น (lamellar keratoplasty) หากจักษุแพทย์ประเมินแล้วว่าชิ้นเนื้อที่บางมากและอาจม้วนเข้าหากันได้ง่าย ควรวางบนกระดาดกรองที่แห้งก่อนตรึงกับน้ำยา

- corneal biopsy สามารถใส่ลงใน formalin ได้เลยทั้งชิ้น หรือ อาจวางบนกระดาดกรองที่แห้งก่อนตรึงกับน้ำยา แล้วใช้ดินสอวางรอบชิ้นเนื้อที่วางบนกระดาดกรองนั้น

- ในกรณีต้องการแบ่งกระจกตาส่งตรวจทางจุลชีววิทยาพร้อมด้วย ควรตัดแบ่งเป็นครึ่งวงกลมสองชิ้นแล้วส่งตรวจทางพยาธิวิทยาครึ่งหนึ่ง โดยขณะแบ่งชิ้นเนื้อไม่ควรวางด้านหลังของกระจกตาลงเพราะอาจครูดเอา Descemet's membrane หลุดออกจากชิ้นอื่นได้ง่าย

- กรณี Descemet's membrane แยกชิ้นหลุดออกมา ควรส่งมาตรวจร่วมด้วยโดยสามารถใส่ในภาชนะเดียวกับเนื้อกระจกตาชิ้นแรกได้

- เขียนระบุวิธีการผ่าตัดกระจกตาเพื่อให้พยาธิแพทย์เข้าใจลักษณะชิ้นเนื้อที่ส่งมามากขึ้น เช่น หากตอนแรกจะทำ deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) แต่ไม่สำเร็จก็ควรระบุว่าเปลี่ยนเป็น penetrating keratoplasty เพื่อจะได้ตรวจสอบชิ้นเนื้อส่งตรวจว่ามี Descemet's membrane ส่งมาด้วยหรือไม่

3. เปลือกตา (eyelid)

- ระบุว่าเป็นเปลือกตาข้างซ้ายหรือขวา บนหรือล่าง และ อาจผูกไหมที่ด้าน nasal หรือ temporal โดยระวังไม่ปักเข็มในบริเวณที่ต้องการทราบ surgical margin พร้อมทั้งวาดระบุรายละเอียดลงในใบขอส่งตรวจ

- กรณี full thickness resection ควรเก็บเส้นขนตาไว้กับชิ้นเนื้อไม่ควรถอนออกเพื่อใช้ช่วยบอกตำแหน่งได้

- การบอกตำแหน่งชิ้นเนื้อมีความสำคัญโดยเฉพาะกรณีเนื้องอกเพื่อให้พยาธิแพทย์บอกถึงการลุกลามถึง surgical margin ได้แม่นยำ

- หากเป็นเคสที่ได้ส่ง frozen section เพื่อดู margin ควรระบุในใบขอส่งตรวจเพื่อให้พยาธิแพทย์ได้

ทราบและรายงานผล margin ได้ถูกต้อง (รายละเอียดการตรวจ frozen section จะกล่าวไว้ในหัวข้อแยกเฉพาะต่อไป)

- ควรแจ้งพยาธิแพทย์กรณีที่มีสงสัย sebaceous carcinoma เนื่องจากชิ้นเนื้อปกติที่ผ่านขั้นตอน tissue processing แล้วจะไม่สามารถย้อมสี Oil red O ได้ เพราะไขมันในเซลล์ถูกชะล้างออกไป ซึ่งการย้อมสีดังกล่าวต้องเตรียมจาก frozen section อย่างไรก็ดีในกรณีที่ชิ้นเนื้อที่ผ่าน tissue processing มาแล้ว การตรวจด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้ adipophilin สามารถช่วยวินิจฉัยโรค sebaceous carcinoma ได้⁴

4. ม่านตา (iris)

- ระบุว่าข้างซ้ายหรือขวา กรณีเนื้องอกควรบอกตำแหน่งของก้อนตาม clock hour โดยเนื้อที่ได้ควรมีม่านตাপกติและด้านที่เป็น pupillary margin มาด้วย พร้อมทั้งวาดระบุรายละเอียดตำแหน่งลงในใบขอส่งตรวจ

- วางชิ้นเนื้อบนกระดาดกรองที่แห้ง ก่อนใส่ในน้ำยาตรึงสภาพ

5. ชิ้นเนื้อจากจอตา (retina) และ choroid

- สามารถทำได้ทั้ง transvitreal approach และ transcleral approach โดยนิยมวิธีแรกมากกว่าเนื่องจากสามารถเห็นพยาธิสภาพได้ดีขณะผ่าตัด ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์สำหรับ vitrectomy เพื่อป้องกันการบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อข้างเคียงและลดโอกาสเกิดเลือดออก

- เนื้อเยื่อที่ได้มักบางและมีขนาดเล็กจึงควรวางบนกระดาดกรอง

- ในกรณีสงสัย intraocular lymphoma ควรส่งในน้ำยา Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium

6. ลูกตา (globe or eyeball)

- การตัดกล้ามเนื้อตาออกจากตาขาว ควรเหลือโคนของกล้ามเนื้อตาบริเวณ insertion ไว้เล็กน้อยเพื่อให้พยาธิแพทย์สามารถ orientation ตำแหน่งของลูกตาได้แม่นยำ

- ควรตัดเส้นประสาทตาให้ยาวที่สุดเท่าที่ทำได้

โดยเฉพาะกรณีเนื้องอกในลูกตา ควรมีความยาวเส้นประสาทตาอย่างน้อย 1 เซนติเมตร

- ระวังในการใช้ clamp หนีบเส้นประสาทตาก่อนตัด เพื่อลด crush artifact

- ระวังไม่ให้ผนังตาฉีกขาด หรือผ่าตาออกดูก่อนที่จะแช่ใน formalin เพื่อลดการเกิด artifacts ในขณะที่เนื้อเยื่อยังไม่ได้ถูกตรึง

- ในกรณีที่มีการทะลุของลูกตาระหว่างการผ่าตัด ควรเขียนแจ้งไว้ในใบขอส่งตรวจด้วย

- ถ้ามีชิ้นเนื้ออื่นส่งพร้อมกันกับลูกตาควรแยกเป็นอีกภาชนะ ไม่ควรใส่รวมกับลูกตา

7. ชิ้นเนื้อจาก exenteration

- จะได้ส่วนที่เป็นลูกตา, orbital soft tissue และ/หรือ กระดูกเบ้าตาข้างเคียง โดยส่วนมากจะได้เปลือกตามาด้วย ยกเว้นการทำ lid sparing procedure

- หากมีเปลือกตาบนและล่างติดมาด้วยการบอกตำแหน่ง (orientation) ด้วยการเย็บไหมมัดไม่ค่อยจำเป็น เนื่องจากพยาธิแพทย์สามารถบอกตำแหน่งและทิศทางของชิ้นเนื้อได้ง่ายอยู่แล้ว ยกเว้นในกรณีที่ชิ้นเนื้อบดบี้ไปมาก

- หากมีชิ้นเนื้ออื่นควรส่งแยกภาชนะ เพราะชิ้นเนื้อ exenteration อาจหลุดปะปนไปกับชิ้นเนื้ออื่นๆ เช่น ชิ้นเนื้อที่ตัดเพื่อดู surgical margin ทำให้สับสนได้

การตรึงชิ้นเนื้อ (fixation)

1. เมื่อได้ชิ้นเนื้อออกมาแล้วควรใส่ลง fixative ให้เร็ว ไม่ควรปล่อยทิ้งไว้ซึ่งจะเกิด dryness artifact ทำให้การย้อมสีติดได้ไม่ดี

2. ควรใช้น้ำยาที่เหมาะสมกับวิธีการส่งตรวจทางพยาธิวิทยาดังแสดงในตารางสรุปชนิดของน้ำยาตรึงชิ้นเนื้อ โดยทั่วไปมักใช้ 10% neutral buffered formalin สำหรับชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัด

3. ปริมาตรของน้ำยาตรึงควรเป็น 10-20 เท่าของปริมาตรชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจ โดยชิ้นเนื้อกระจกตาหรือชิ้นเนื้อขนาดเล็กควรใช้ปริมาณ 5-10 มิลลิเมตร (ml), ลูกตา (eyeball) ควรใช้ปริมาณ 50-100 ml และชิ้นเนื้อจาก

exenteration ควรใช้ปริมาณ 300-600 ml โดยทุกส่วนของชิ้นเนื้อต้องจมอยู่ในน้ำยาเพื่อให้เกิดการตรึงชิ้นเนื้อที่สมบูรณ์

4. ควรใส่ในภาชนะพลาสติกที่สามารถปิดฝาแน่นเพื่อป้องกันการตกแตกและมีปากกว้างพอเพราะหลังการตรึงเนื้อจะแข็งขึ้น หากเป็นภาชนะปากแคบจะนำชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงแล้วออกมาได้ยาก ทั้งนี้ตัวภาชนะกับปริมาตรน้ำยาตรึงต้องเหมาะสมกับขนาดและปริมาตรของชิ้นเนื้อดังกล่าวแล้วข้างต้น

5. ระบุป้ายชื่อ-นามสกุล และเลขที่โรงพยาบาล (hospital number, HN) ผู้ป่วย วันที่เก็บ และตำแหน่งอวัยวะของสิ่งส่งตรวจแยกกันให้ชัดเจนระหว่างภาชนะเพื่อไม่ให้เกิดการสลับหรือสับสน

6. ระยะเวลาในการตรึงชิ้นเนื้อขึ้นกับขนาดและปริมาตรของชิ้นเนื้อโดย formalin จะแทรกซึมชิ้นเนื้อด้วยการ osmosis ด้วยความเร็วประมาณ 1 มิลลิเมตร/ชั่วโมง ตัวอย่างในกรณีลูกตาจะใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ส่วนชิ้นเนื้อจาก exenteration ใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน²

การส่งตรวจทางเซลล์วิทยา (cytology)

เป็นการตรวจเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคซึ่งมีที่ใช้ทางจักษุพยาธิวิทยาไม่แพร่หลายเท่ากับการส่งชิ้นเนื้อทาง surgical pathology โดยการส่งตรวจ cytology นั้น ผู้ส่งสามารถป้ายลงบนสไลด์ (smear) แช่ในน้ำยา 95% ethanol หรือส่งเป็นของเหลวให้ทางห้องปฏิบัติการทำการ smear หรือแปลงเป็นก้อนเซลล์ที่ฝังในแท่งพาราฟิน (cell block) โดยสามารถแบ่งการส่งตรวจออกได้เป็นดังนี้

1. สิ่งส่งตรวจจากเซลล์หลุดลอก (exfoliative cytology)

1.1 conjunctival/corneal impression cytology

- เตรียมกระดาษกรอง cellulose acetate ก่อนเก็บตัวอย่างโดยตัดขอบกระดาษด้าน temporal หรือ nasal เพื่อการ orientation และทำเครื่องหมายระบุด้านหลังไว้เพื่อสามารถแยกด้านที่มี cell ของเยื่อบุตาออกจาก

ด้านกระดาดปลาได้

- เช็ดน้ำตาหรือยาชาส่วนเกินออก และระวังไม่ได้ไปลอกตาสัมผัสกับกระดาดระหว่างตรวจเพื่อลดการระคายเคืองและโอกาสน้ำตาไหลซึ่งจะทำให้ตัวอย่างเซลล์ที่ได้ถูกชะล้างออกไปปริมาณจึงน้อยลง

- ใช้หัว Goldman tonometer เป็นตัวช่วยกดกระดาดกรองให้แนบราบไปกับผิวเยื่อบุตา 5-10 วินาที ก่อนลอกออกด้วย forceps

- ใส่กระดาดกรองที่มี cell ลงภาชนะที่มีน้ำยาตรึงสภาพ 95% ethanol หรือน้ำยาที่มีส่วนผสมของ glacial acetic acid:37% formaldehyde:70% ethyl alcohol ในอัตราส่วนปริมาตร 1:1:20⁵ โดยแยกแต่ละตำแหน่งลงแต่ละกระป๋องพร้อมระบุชื่อผู้ป่วย HN ตำแหน่งที่เก็บทำให้ชัดเจน

1.2 aqueous/vitreous fluid

- ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้ปริมาณมากพอควร ใส่ในภาชนะปราศจากเชื้อและแช่ภาชนะนั้นลงในน้ำแข็งแล้วส่งมาที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาโดยเร็ว เพื่อจะได้ดำเนินการเตรียมเป็น smear กรณีที่นำส่งไม่ทันในวันเดียวกัน ให้เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

- ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ได้ปริมาณน้อยกว่า 0.5 ml (เช่น aqueous humor มักได้ปริมาณไม่เกิน 0.2-0.3 ml) หรือปริมาณน้อยมากแทบมองไม่เห็นได้ด้วยตาเปล่า ผู้ส่งควรเตรียมเป็น smear จำนวน 2 สไลด์และแช่ใน 95% ethanol ทันทีก่อนที่จะแห้ง

- พึงระวังว่า 95% ethanol ที่เหวออกมาเรื่อยๆ หรือใช้ซ้ำนั้น ความเข้มข้นของ 95% ethanol จะลดลงเนื่องจากการระเหยไป โดยปริมาตรที่เหมาะสมของ 95% ethanol จะต้องท่วมอย่างน้อย 3 ใน 4 ของสไลด์ขณะตั้งอยู่ในภาชนะที่ส่งตรวจ⁶

1.3 orbital touch and scrape

- มีที่ใช้ในชิ้นเนื้อ incisional biopsy จากเข้าตาที่ปริมาณชิ้นเนื้อไม่มาก ที่สงสัยภาวะ lymphoma, rhabdomyosarcoma หรือ metastasis

- กรณี excisional biopsy หลังการตัดหมึก

เพื่อระบุ margin แล้ว ตัดแบ่งชิ้นเนื้อออกเป็นสองฝั่งและใช้ forceps คีบเนื้อจากหน้าตัด (cut surface) ป้ายลงสไลด์ กรณีมีหน้าตัดแข็งหรือมีลักษณะเป็นผังผืดสามารถใช้มีดขูดและป้ายลงบนสไลด์ได้

- จากนั้นใช้สไลด์อีกแผ่นวางบนสไลด์ที่ smear แล้ว กดและลากสไลด์ทั้งสองออกจากกัน ซึ่งเรียกว่า squash technique²

2. สิ่งส่งตรวจจากการเจาะดูดด้วยเข็มเล็ก (fine needle aspiration (FNA))

2.1 FNA for intraocular tumor

- มีบทบาทมากขึ้นใน uveal melanoma เพื่อใช้ยืนยันการวินิจฉัยแยกโรคกับ retinal/choroidal mass อื่น ๆ รวมถึงส่งตรวจทาง molecular study หรือ cytogenetics เพื่อบอกพยากรณ์โรค ก่อนเริ่มการรักษาด้วย radiotherapy โดยไม่แนะนำให้ทำในเนื้องอกที่มีโอกาสเกิด vitreous seeding เช่นใน retinoblastoma⁷

- ทำได้ทั้ง transcleral approach ซึ่งใช้ transillumination technique มาช่วยระบุตำแหน่งเนื้องอก และ transvitreal approach ซึ่งใช้อุปกรณ์ vitrectomy ช่วย

- ในกรณีที่ได้ตัวอย่างเป็นของเหลว ให้ใส่ภาชนะปลอดเชื้อ เพื่อความปลอดภัยควรแจ้งการส่งมาทั้งกระบอกฉีดยาและเข็มเจาะ และควรส่งมาที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาโดยเร็ว เพื่อจะได้ดำเนินการเตรียมเป็น smear โดยอาจต้องนำไปปั่นเพื่อให้ได้ตะกอนก่อนที่จะป้ายลงสไลด์ กรณีที่นำส่งไม่ทันในวันเดียวกัน ให้เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

- ในกรณีที่ specimen มีความหนืดพอ ผู้ส่งสามารถทำ direct smear แบบ wet-fixed ได้เอง โดยหยดสิ่งส่งตรวจบนสไลด์กระจกแล้วใช้สไลด์กระจกอีกแผ่นวางประกบ แล้วดึงให้แยกในทิศทางตรงข้ามกันจนสุดสไลด์แล้วแช่ใน 95% ethanol ทันทีก่อนที่จะแห้ง

- หากพบว่ามีความเข้มข้นเนื้อขนาด 1 มิลลิเมตร (mm) ขึ้นไปขณะ smear บนสไลด์ให้นำเศษเนื้อนั้นใส่ในขวดที่มี 10% formalin เพื่อทำการเตรียมเป็น cell block

ต่อไป⁶

2.2 orbital FNA

• ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนเช่น retrobulbar hemorrhage และ globe perforation โดยการนำ orbital FNA มีที่ใช้ใน orbital mass ที่ก้อนมีขนาดใหญ่สามารถคลำก้อนได้ที่ตำแหน่งบริเวณด้านหน้าของเบ้าตาเช่น lacrimal gland tumor โดยสามารถแยกระหว่าง epithelial tumor ออกจาก lymphoma และมีการศึกษาที่ให้การวินิจฉัย pleomorphic adenoma ได้โดยไม่พบการกลับเป็นซ้ำของเนื้องอก⁸

• ไม่ควรใช้วิธีนี้ในกรณีที่มีสงสัย cavernous hemangioma, lymphatic หรือ venous-lymphatic malformations เนื่องจากเสี่ยงต่อภาวะ retrobulbar hemorrhage รวมถึงยังมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยในภาวะ inflammation และ lymphoproliferative disorder เนื่องจากมักต้องใช้เนื้อเยื่อปริมาณที่มากพอเพื่อดู morphology และการส่งย้อม immunohistochemistry ต่อไป

• รายละเอียดวิธีการจัดการกับเนื้อเยื่อที่ได้เช่นเดียวกับในหัวข้อ FNA for intraocular tumor

การส่งตรวจชิ้นเนื้อระหว่างผ่าตัด (frozen section)

การส่ง frozen section เป็นการส่งชิ้นเนื้อให้พยาธิแพทย์วินิจฉัยชิ้นเนื้อและแจ้งผลกลับมายังแพทย์ผู้ผ่าตัดเพื่อประกอบการตัดสินใจระหว่างการผ่าตัด กระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อนั้นจะทำให้ชิ้นเนื้อแข็งตัวอย่างรวดเร็วเพื่อสามารถตัดเป็นแผ่นบางได้ โดยไม่ต้องผ่าน tissue processing และ paraffin embedding ซึ่งลักษณะรูปร่างของเซลล์จะแตกต่างไปจากการเตรียมชิ้นเนื้อตามปกติ จึงต้องอาศัยความชำนาญของพยาธิแพทย์ในการอ่านผล การส่ง frozen section ปกติจะใช้เวลาอย่างน้อย 20 นาทีต่อชิ้นจึงจะรายงานผลกลับมาได้ จักษุแพทย์จึงควรวางแผนการผ่าตัดให้เหมาะสม

วิธีการส่งตรวจ

1. ติดต่อห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาล่วงหน้าเสมอ เพื่อตรวจสอบความพร้อมของห้องปฏิบัติการเพื่อรับชิ้นเนื้อในช่วงเวลาที่เหมาะสมกับการผ่าตัด

2. ห่อชิ้นเนื้อที่จะส่งตรวจ ด้วยผ้าก๊อชชุบ normal saline หมด ๆ (โดยไม่ต้องใส่น้ำยารักษาสภาพ) บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด หรือ ถุงพลาสติกที่รัดปากถุงแน่น โดยสามารถส่งชิ้นเนื้อในอุณหภูมิห้องได้

3. ชิ้นเนื้อควรไปถึงห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาโดยเร็วหลังตัดออกมาจากผู้ป่วย (ไม่ควรเกิน 30 นาที)

ชิ้นเนื้อที่สามารถส่งด้วย frozen section ได้แก่

1. เปลือกตา (eyelid)

• มีที่ใช้ในการดูขอบเขตของเนื้อร้าย ว่าตัดได้เพียงพอหรือไม่โดยไม่ต้องตัดเนื้อออกมาเกินความจำเป็น เช่น basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma

• กรณี full thickness wedge resection ขณะการตรวจชิ้นเนื้อมหภาค (grossing) ในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา จะระบุส่วนที่เป็น surgical margin ด้วยการแต้มสีหมึกที่ต่างกันในแต่ละด้านและตัด margin ทั้ง 3 ด้านออกมาเพื่อทำ frozen section โดยเนื้อใหญ่ตรงกลางส่วนที่เหลือจะทำการ fixation ปกติเพื่อตรวจตาม routine histopathology ต่อไป

2. ต่อมน้ำตา (Lacrimal gland)

• มีที่ใช้ในการดูขอบเขตของเนื้อร้ายเช่น adenoid cystic carcinoma หรือเนื้องอก benign mixed tumor เพื่อป้องกันการตัดชิ้นเนื้อออกไม่หมดซึ่งอาจเกิดการกลับเป็นซ้ำหรือกลายเป็นมะเร็งได้

3. Exenteration specimen

• สามารถส่งชิ้นเนื้อบริเวณ surgical margin ที่สงสัยว่าอาจจะมีเนื้องอกหลงเหลืออยู่ โดยส่งแยกภาชนะกับชิ้นเนื้อ exenteration หลัก

การส่งตรวจชิ้นเนื้อกรณีสงสัยภาวะ lymphoma

1. ชิ้นเนื้อ eyelid, conjunctiva หรือ orbit: วิธี routine formalin fixation สามารถตรวจ morphology

ภายใต้ light microscope ร่วมกับส่งย้อมพิเศษทาง immunohistochemistry เพื่อการวินิจฉัย lymphoma ได้ นอกจากนี้หากมีความจำเป็นอาจส่ง immunoglobulin gene rearrangement เพิ่มเติมซึ่งสามารถตรวจจากชิ้นเนื้อที่ถูกเก็บใน paraffin block ได้

- ในกรณีที่เนื้อเยื่อเยื่อเพียงพอสองสัปดาห์ lymphoma จากลักษณะทางคลินิก ควรส่งชิ้นเนื้อสำหรับ flow cytometry ร่วมด้วยเพื่อได้ข้อมูล immunophenotype ของเซลล์เม็ดเลือด

- กรณีที่ห้องปฏิบัติการสามารถให้บริการ flow cytometry แนะนำให้ติดต่อกับทางห้องปฏิบัติการล่วงหน้าและส่ง fresh specimen ปริมาณอย่างน้อย 3 mm³ ใส่ภาชนะปราศจากเชื้อแช่ภาชนะนั้นลงน้ำแข็ง ส่งไปห้องปฏิบัติการทันที⁹

- กรณีที่ไม่สามารถส่งห้องปฏิบัติการได้ทันที สามารถแช่ใส่ RPMI medium เพื่อรักษาสภาพเซลล์ไว้ก่อนถึงห้องปฏิบัติการ

2. ชิ้นเนื้อจาก vitreous biopsy สามารถส่งสิ่งส่งตรวจได้ 3 รูปแบบ¹⁰

- undiluted vitreous ปกติได้ปริมาณ 1 ml เหมาะกับการส่งตรวจ cytology และ genetic test เช่น B หรือ T cell PCR, myeloid differentiation primary

response 88 (MYD88) และ Epstein-Barr virus (EBV) PCR เนื่องจากมีความหนาแน่นของเซลล์มากที่สุดในขณะที่มีโอกาสถูกปนเปื้อนได้น้อย

- diluted vitreous ปริมาณ 1-2 ml สามารถส่ง flow cytometry โดย fresh specimen หรือแช่ใน RPMI medium โดยเติมน้ำยารักษาสภาพจนมีปริมาตรรวม 2-5 ml¹¹

- vitreous washing ได้จาก balanced salt solution ผสมกับ diluted vitreous ปริมาณ 20-100 ml โดยควรเก็บเป็น fresh specimen และทางห้องปฏิบัติการจะนำไปปั่น centrifuge ก่อนส่งตรวจวิธีอื่นๆ เช่น flow cytometry ต่อไป

การเขียนใบขอส่งตรวจชิ้นเนื้อ

เป็นวิธีการสื่อสารระหว่างจักษุแพทย์ผู้รักษากับพยาธิแพทย์ซึ่งควรระบุข้อมูลต่อไปนี้เป็นอย่างน้อย³

1. ชื่อ สกุล HN ของผู้ป่วย
2. อายุผู้ป่วย เนื่องจากมีความสำคัญในการวินิจฉัยแยกโรค
3. ประวัติอดีตและปัจจุบันที่สำคัญ
4. ข้อมูลตำแหน่งของรอยโรค
 - วาดเป็นแผนผังหรือทำเครื่องหมายบอกตำแหน่ง

ตารางสรุปชนิดของน้ำยาตรึงชิ้นเนื้อ (fixatives)¹²

ชนิดน้ำยาตรึง	สี	การใช้งาน
10% Natural-buffered formalin	ใส	Routine fixation
Cytology fixative (95% ethanol, CytoLyt®)	ใส	Cytology examination (aqueous, vitreous, fine-needle aspiration, conjunctival impression)
3% Glutaraldehyde	ใส	Electron microscopy
Michel or Zeus transport medium	ใส	Immunofluorescence (conjunctival biopsy for mucous membrane pemphigoid)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium	ชมพู	Tissue culture (orbital tumor/lymphoma for cytogenetics or flow cytometry) or transport medium for molecular studies

เช่นผูกไหม เพื่อให้เข้าใจตรงกัน

- กรณีเป็นชิ้นเนื้อใหญ่เช่นลูกตาหรือ exenteration ควรระบุตำแหน่งที่มีพยาธิสภาพ เพื่อความสะดวกในการตัดแบ่งชิ้นเนื้อให้ตรงจุดและสวยงาม

5. ข้อมูลการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาในอดีต และเลขที่ทางพยาธิวิทยาเพื่อใช้ในการอ่านเทียบ

6. วิธีการผ่าตัดหรือเก็บชิ้นเนื้อ เพื่อจะได้ทราบว่าสิ่งส่งตรวจได้มาครบถ้วนสอดคล้องกับการผ่าตัดหรือไม่

7. การวินิจฉัยและวินิจฉัยแยกโรคเบื้องต้น เพื่อใช้ในการตรวจย้อมพิเศษเพิ่มเติม

8. จำนวนภาชนะที่ส่งชิ้นเนื้อ

9. ระบุตำแหน่งของชิ้นเนื้อที่ได้มาในแต่ละภาชนะ ควรแยกภาชนะถ้ามาจากคนละตำแหน่ง

10. จำนวนและขนาดของชิ้นเนื้อที่ส่งต่อภาชนะ

11. ชื่อและหมายเลขโทรศัพท์ติดต่อของแพทย์ผู้ส่ง ในกรณีที่พยาธิแพทย์จำเป็นต้องติดต่อกลับไปโดยตรงและเร่งด่วน

สรุป

การส่งตรวจชิ้นเนื้อทางจุลพยาธิวิทยาที่ถูกต้องและเหมาะสมมีความสำคัญต่อคุณภาพของชิ้นเนื้อ จักษุแพทย์ผู้ทำการส่งชิ้นเนื้อจึงควรมีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับข้อควรระวังขณะเก็บชิ้นเนื้อ การตรึงชิ้นเนื้อ เวลาที่เหมาะสมในการส่ง รวมถึงการสื่อสารกับพยาธิแพทย์ผ่านใบขอตรวจชิ้นเนื้อ เพื่อให้ได้สิ่งส่งตรวจที่มีคุณภาพและการแปลผลทางพยาธิวิทยาที่ถูกต้องแม่นยำ

เอกสารอ้างอิง

1. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, et al. A review of artifacts in histopathology. J Oral Maxillofac Pathol. 2018; 22(2):279.

2. Folberg R, Chévez-Barrios P, Lin A, et al. Pathologic examination of ocular specimens. In: Hornick JL, ed. Tumors of the Eye and Ocular Adnexa. 5th ed. Korea: American Registry of Pathology; 2021:1-20.
3. การเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา. ใน: วลี ตูลวรรธนะ. ตำราจุลพยาธิวิทยา. ภูเก็ต: เวสต์วูดพริ้นท์; 2552. หน้า 25-54.
4. Jakobiec FA, Mendoza PR. Eyelid sebaceous carcinoma: clinicopathologic and multiparametric immunohistochemical analysis that includes adipophilin. Am J Ophthalmol. 2014;157(1):186-208.
5. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. Ophthalmology. 1985;92(6):728-33.
6. ภาควิชา/ฝ่ายพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย. คู่มือการส่งตรวจทางพยาธิวิทยา. 2563.
7. Laver NMV. Ocular cytology: Diagnostic features and ongoing practices. Cancer Cytopathol. 2021;129(6): 419-31.
8. Kopp ED, Sahlin S, Tani E, et al. Fine-needle aspiration biopsy in lacrimal gland pleomorphic adenoma. Eye (Lond). 2010; 24(2): 386.
9. Margo CE. Focal Points: Tumors of the Ocular Adnexa, a Histopathologic Primer. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2018.
10. Folberg R, Chévez-Barrios P, Lin A, et al. Intraocular hematomatous lymphoid neoplasm. In: Hornick JL, ed. Tumors of the Eye and Ocular Adnexa. 5th ed. Korea: American Registry of Pathology; 2021: 247-60.
11. Gonzales JA, Chan CC. Biopsy techniques and yields in diagnosing primary intraocular lymphoma. Int Ophthalmol. 2007;27(4):241-50.
12. Specimen handling. In: Syed N, Berry J, Heegaard S, eds. Ophthalmic pathology and intraocular tumors. China: American Academy of Ophthalmology; 2022: 19-27.

การส่งตรวจทางจักษุพยาธิวิทยาสำหรับแพทย์



Buravej Assavapongpaiboon, MD

บุรเวช อัสวพงศ์ไพบูลย์, พ.บ.



Wasee Tulvatana, MD, MSc

วสี ตูลวรรธนะ, พ.บ., วท.ม.

บทคัดย่อ:

การส่งตรวจทางพยาธิวิทยามีบทบาทสำคัญสำหรับการวินิจฉัยและบอกพยากรณ์โรค อย่างไรก็ตามการแปลผลทางพยาธิวิทยาอาจทำได้ยาก สูญเสียความแม่นยำ หรือกระทั่งไม่สามารถทำได้ หากชิ้นเนื้อไม่ลักษณะรูปร่างหรือการจัดวางของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากมี artifact ซึ่งหมายถึงสิ่งที่เกิดขึ้นจากกระบวนการพยาธิวิทยาระหว่างการเตรียมชิ้นเนื้อ จักษุแพทย์ผู้ทำการส่งชิ้นเนื้อจึงควรมีความรู้ในการจัดส่งชิ้นเนื้อทางจักษุพยาธิ ซึ่งประกอบด้วย การส่งตรวจชนิดชิ้นเนื้อ ศัลยกรรม (surgical pathology) การส่งตรวจทางเซลล์วิทยา (cytology) และการส่งตรวจชิ้นเนื้อระหว่างผ่าตัด (frozen section) ตั้งแต่วิธีการผ่าตัดและเก็บชิ้นเนื้อให้เหมาะสมในแต่ละอวัยวะ การตรึงชิ้นเนื้อโดยคำนึงถึงชนิด ปริมาตรของน้ำยาตรึงสภาพและภาชนะบรรจุ ที่สำคัญการเขียนใบขอส่งตรวจชิ้นเนื้อซึ่งเป็นวิธีการสื่อสารระหว่างจักษุแพทย์ผู้รักษากับพยาธิแพทย์ควรระบุข้อมูลให้ครบถ้วนเพื่อความเข้าใจตรงกันของทั้งสองฝ่าย เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อหรือสิ่งส่งตรวจทางจักษุพยาธิที่มีคุณภาพ ทำให้ได้การแปลผลทางพยาธิที่ถูกต้องแม่นยำซึ่งจะช่วยให้การดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป

คำสำคัญ: การส่งตรวจชิ้นเนื้อ, การเก็บชิ้นเนื้อ, จักษุพยาธิวิทยา, การตรึงชิ้นเนื้อ

ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Footnotes and Financial Disclosures

Originally receive: 10 February 2023

Final revision: 6 October 2023

Accepted: 11 November 2023

Address for correspondence: นพ.บุรเวช อัสวพงศ์ไพบูลย์ ภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระรามที่ 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

Email: buravej@gmail.com

Phone number: 02-256-4000 ต่อ 61637

All authors have no financial conflicts of interest to disclose.