

การเตรียมตะกอนปัสสาวะในการเรียนการสอน

ศิวดี เหลืองสุวรรณ วท.ม. (เภสัชวิทยา)* นภารัตน์ แก้วเกื้อกุล วท.ม. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)**

*ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก, **ภาควิชาอายุรศาสตร์, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์, กรุงเทพมหานคร ๑๐๗๑๐๐.

บทนำ

ตะกอนปัสสาวะหมายถึง สิ่งที่มีรูปร่าง (Formed element) ที่พบอยู่ในปัสสาวะที่ผู้ป่วยถ่ายออกมาสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์^๑ การตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นการตรวจที่มีความสำคัญทางการแพทย์อย่างหนึ่ง ที่จะช่วยบ่งชี้ให้แน่ชัดถึงภาวะที่ผิดปกติ หรือโรคที่สงสัยหลังจากได้ผ่านการตรวจทางฟิสิกส์และทางเคมีมาแล้ว บางครั้งการตรวจทางฟิสิกส์และเคมีของปัสสาวะจะไม่พบสิ่งผิดปกติใด ๆ แต่เมื่อตรวจตะกอนจะพบสิ่งผิดปกติ ก็จะสามารถช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยโรคได้ เช่น พบ RBC cast ในปัสสาวะ บ่งชี้ว่าน่าจะเป็นโรคไตอักเสบเฉียบพลัน^{๑,๒} ซึ่งการตรวจพบความผิดปกติทั้งทางฟิสิกส์และเคมีร่วมกันกับการตรวจตะกอนปัสสาวะจะสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคได้หลายชนิด ได้แก่ โรคไต โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินปัสสาวะ โรคของระบบเมแทบอลิซึม โรคทางกรรมพันธุ์ และโรคอื่น ๆ^{๑,๒} โดยการศึกษาสิ่งต่าง ๆ ที่ออกมาจากทางเดินปัสสาวะ การตรวจตะกอนปัสสาวะถ้าทำอย่างถูกต้อง สามารถบอกตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพของทางเดินปัสสาวะได้อย่างดียิ่ง นอกจากนี้ยังสามารถช่วยในการติดตามอาการของโรคว่าเป็นอย่างไร

การเตรียมตะกอนปัสสาวะโดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นสิ่งที่สำคัญมากในการเรียนการสอนเรื่องการตรวจปัสสาวะ ทำให้นักศึกษามีความเข้าใจและมีทักษะในการฝึกดูลักษณะรูปร่างต่าง ๆ ที่พบใน

ตะกอนปัสสาวะ ในกรณีที่มีนักศึกษาจำนวนมากบางครั้งไม่สามารถเตรียมตะกอนปัสสาวะได้เพียงพอในคราวเดียวกัน รวมทั้งไม่สามารถจัดหาตะกอนปัสสาวะที่ผิดปกติตามพยาธิสภาพของโรคได้ เช่น cell, cast, crystal และ structure ต่าง ๆ ที่ออกมาในปัสสาวะ จึงมีความจำเป็นต้องมีการจัดเตรียมตะกอนปัสสาวะไว้ล่วงหน้าหรือเก็บรักษาสภาพของตะกอนให้อยู่สลายถาวรเหมือนการดูตะกอนปัสสาวะสด ๆ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

๑. หลอดพลาสติกสำหรับปั่น (centrifuge tube)
๒. ๑๐% formalin
๓. Sodium azide (1M NaN₃)
๔. Glycerine
๕. สไลด์กระจก
๖. คอฟเวอร์สลิป กลมเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๘ มม., คอฟเวอร์สลิป ขนาด ๒๒ x ๔๐ มม.
๗. กล้องจุลทรรศน์ ๒ ตา
๘. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
๙. เปอร์เมาท (permount)
๑๐. หลอดหยด (pasture pipette)
๑๑. Rack ใส่ tube
๑๒. กระดาษ label
๑๓. กล้องเก็บสไลด์

วิธีการเตรียมตะกอนปัสสาวะ

๑. เก็บปัสสาวะในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง (random specimen) ซึ่งเมื่อได้ปัสสาวะใหม่ ๆ มาจากผู้ป่วยจะนำใส่ภาชนะที่สะอาดและแห้ง ปิดฝาให้เรียบร้อย ควรรีบดำเนินการต่อภายใน ๑ ชั่วโมง เนื่องจากส่วนประกอบของปัสสาวะจะเปลี่ยนแปลงไป^๒ จากนั้นวัดปริมาตรปัสสาวะที่ได้มา
 ๒. ใส่ ๑๐% formalin ในปัสสาวะ ด้วยอัตราส่วน ๑:๑๐
 ๓. ใส่ 1M NaNO₃ ในปัสสาวะด้วยอัตราส่วน ๑:๒๐๐
 ๔. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน ๓๐ นาที
 ๕. แล้วเทใส่หลอดทดลองเพื่อนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ ๑,๕๐๐ rpm นาน ๕ นาที
 ๖. เทน้ำส่วนใสทิ้ง นำตะกอนปัสสาวะที่ได้ทั้งหมดมาผสม glycerine ในปริมาณที่เท่ากับตะกอนปัสสาวะที่เหลืออยู่
 ๗. ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x๑๐ และ x๔๐ ตามลำดับ ดูว่ายังมีตะกอนปัสสาวะที่ต้องการเก็บเหลืออยู่หรือไม่
 ๘. นำตะกอนที่ได้เก็บที่ ๔°C บันทึกวันที่ และแยกชนิดของตะกอน เมื่อจะสอนนักศึกษา สามารถนำไปใช้ได้เลย
- การเตรียมตะกอนปัสสาวะวิธีนี้ เป็นวิธีที่นิยมทำอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งช่วยให้นักศึกษาได้ศึกษาเรียนรู้อย่างครบถ้วน และยังมีประโยชน์ในการใช้จัดสอบภาคปฏิบัติสำหรับนักศึกษา

การทำสไลด์ถาวร (permanent slide)

- การทำสไลด์ถาวร แบบใช้คอปเวอร์สลิป ๒ แผ่น (double cover slips technique)^๕ มีขั้นตอนดังนี้
๑. นำตะกอนที่เก็บไว้ในข้อ ๘ เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน
 ๒. ใช้ pasture pipette หยดตะกอนปัสสาวะที่ผสมกันแล้ว ๑ หยด ลงบนแผ่นสไลด์กระจก
 ๓. แล้วปิดด้วย คอปเวอร์สลิป กลมเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๘ มม. ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศจากตะกอนปัสสาวะ จากนั้นใช้ pasture pipette หยดเปอร์เม้าท์ ๑ หยดแล้วนำคอปเวอร์สลิป อีกแผ่นหนึ่ง ขนาด ๒๒ x ๔๐ มม. มาประกบปิดทับบนคอปเวอร์สลิปดังกล่าวข้างต้น จากนั้นปล่อยให้เปอร์เม้าท์ แฝ่ไปจนทั่ว

แผ่นคอปเวอร์สลิป โดยไม่ปะปนกับตะกอนของปัสสาวะที่อยู่ใต้คอปเวอร์สลิปทั้ง ๒ แผ่น ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศจากเปอร์เม้าท์ หลังจากทิ้งไว้ประมาณ ๒ สัปดาห์ ตรวจสอบว่าเปอร์เม้าท์แห้งแล้ว จึงนำมาตรวจดูอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x๑๐ และ x๔๐ จากนั้นบันทึกรายละเอียดบนสไลด์ แล้วเก็บรวบรวมเพื่อใช้ในการเรียนการสอนต่อไป

ข้อดี สำหรับการทำสไลด์ถาวร คือสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า ๑ ปี เตรียมได้ง่ายไม่ยุ่งยาก สามารถรักษา cell และ cast บางชนิดได้ เป็นการเตรียมตะกอนปัสสาวะให้นักศึกษาได้เรียนรู้อย่างครบถ้วนและเพียงพอกับจำนวนนักศึกษา

ข้อเสีย คือปัสสาวะผู้ป่วยโรคไตบางราย ที่มีโปรตีนสูง ๆ ๓⁺ - ๔⁺ จะแข็งตัวเมื่อหยด ๑๐% formalin เมื่อเก็บรักษาได้ประมาณปีกว่า ๆ cell, cast จะเริ่มสลายตัว

ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาศึกษาทดลองวิธีการเก็บตะกอนให้ได้นานกว่า ๑ ปี โดยหลังจากวัดปริมาตรปัสสาวะที่ได้มาแล้ว เทใส่หลอดพลาสติกสำหรับปั่นหลอดละ ๑ ml. ปั่นที่ ๑,๕๐๐ rpm. นาน ๕ นาที แล้วเทน้ำส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนที่ได้เทรวมกัน แล้วนำมาล้างด้วยน้ำยา Sorensen's phosphate buffer pH ๕.๕ ที่เย็น จำนวน ๕ ml. ต่อตะกอนปัสสาวะ ๕ ml. ผสมให้เข้ากันจากนั้นปิดด้วย parafilm ให้มิดชิดเก็บที่ ๔°C ทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อเป็นการตรึง (Fix) ตะกอนปัสสาวะ หลังจากนั้นนำมาหยด ๑% Geratin ใน ๕๐% Glycerine with phenol ที่ละลายหยด พร้อมกับเขย่าไปตลอดด้วยความเร็วประมาณ ๓,๔๐๐ rpm. นาน ๕ นาที โดยหยดให้ได้เท่าตัวตะกอนปัสสาวะที่มี นำตะกอนปัสสาวะที่ได้มาใส่ขวดที่มีฝาปิดเก็บที่ ๔°C เมื่อจะสอนนักศึกษา สามารถนำไปใช้ได้เลย หรือนำมาทำสไลด์ถาวร (permanent slide) โดยใช้คอปเวอร์สลิป ๒ แผ่น (double cover slips technique)

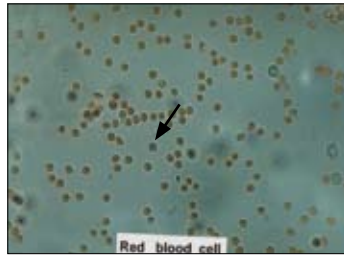
ผลการศึกษาทดลอง

จากการตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้อง

ตัวอย่างภาพตะกอนปัสสาวะที่ได้จากการทำสไลด์ถาวรซึ่งเก็บนานกว่า ๑ ปี ดังนี้



รูปที่ ๑. RBC cast & heme cast x ๑๐๐



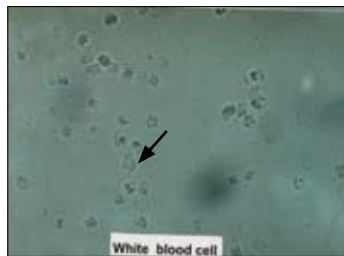
รูปที่ ๒. Red blood cell x ๑๐๐



รูปที่ ๓. Transition cell ๑๐๐



รูปที่ ๔. Uric acid crystal x ๑๐๐



รูปที่ ๕. White blood cell x ๑๐๐



รูปที่ ๖. Calcium oxalate crystal x ๑๐๐

จุลทรรศน์ พบว่าแม้จะเก็บไว้หลังการเตรียมนานถึง ๑ ปี ๖ เดือน ที่ ๔°C ตะกอนปัสสาวะยังสวยดี การกระจายตัวของตะกอนดี และรูปร่างตะกอนไม่เปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตะกอนปัสสาวะในน้ำยา Sorensen's phosphate buffer pH ๕.๕ ที่เย็นจำนวน ๕ ml.ต่อตะกอนปัสสาวะ ๕ ml.ช่วยคงสภาพรูปร่างของตะกอนได้ดี^๒ และสามารถเก็บตะกอนปัสสาวะไว้ได้นานถึง ๑ ปี ๖ เดือน

สำหรับการเตรียมตะกอนปัสสาวะ (urine sediment) ดังกล่าวข้างต้น เป็นการเตรียมแบบไม่ย้อมสี (Microscopy with unstaining) ถือว่าเป็นวิธีการเตรียมที่ใช้กันแพร่หลายในการเรียนการสอนนักศึกษา ที่ยังใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งบางครั้งอาจไม่สามารถจำแนกชนิดของตะกอนปัสสาวะที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันได้ เช่น mononuclear cell ในปัสสาวะ ซึ่งมีหลายชนิด เช่น เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ, renal tubular cell, transitional cell, tumor cell เป็นต้น รวมถึง cellular cast ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ red cell cast, white cell cast เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดการผิดพลาดในการรายงานผล จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการย้อมสี ตะกอนปัสสาวะ (urine sediment)

มาช่วยในการจำแนกชนิดของตะกอนปัสสาวะที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันดังกล่าวข้างต้น แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาวิจัยว่ามีผู้นำวิธีการย้อมสีตะกอนปัสสาวะมาใช้ในการเตรียมตะกอน สำหรับการเรียนการสอนนักศึกษา^๔

การย้อมสีตะกอนปัสสาวะ (Microscopy with Staining) น้ำยามีหลายชนิด ดังนี้

๑. การย้อมด้วยสี Sternheimer-Malbin Stain (SM Stain)^๕

วิธีเตรียม น้ำยา SM Stain ประกอบด้วย

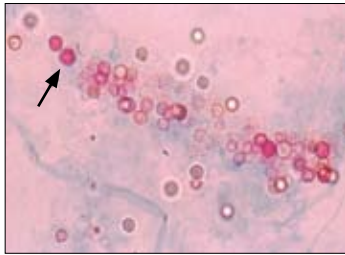
น้ำยา A: (Crystal violet ๓ grams, ๙๕% ethyl alcohol ๒๐ ml., ammonium oxalate ๐.๘ grams, DW ๘๐ ml) ๓ ส่วน

น้ำยา B: (Sofranin ๐.๒๕ grams, ๙๕% ethyl alcohol ๑๐ ml., DW ๙๐ ml) ๙๗ ส่วน

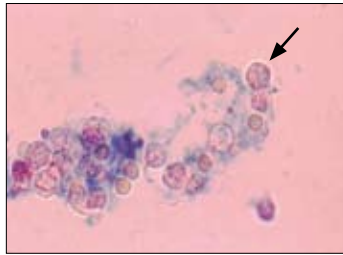
ผสมน้ำยา A และน้ำยา B ในอัตราส่วน ๓:๙๗ กรองก่อนใช้งาน จากนั้นเมื่อต้องการดูตะกอนปัสสาวะ ใช้ ๑ หยดของตะกอนปัสสาวะผสมกับสี SM Stain ในอัตราส่วน ๔:๑ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

๒. การย้อมด้วยสี Sternheimer Stain (S Stain)^๕

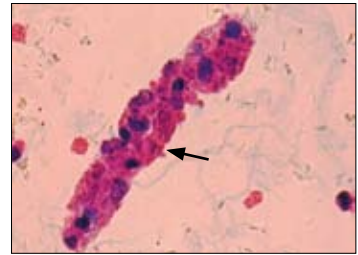
ตัวอย่างภาพ การย้อมสีตะกอนปัสสาวะ



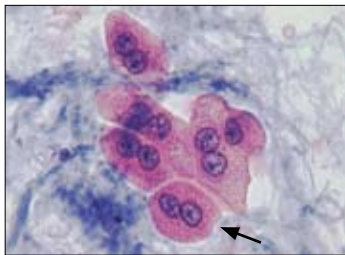
รูปที่ ๗. Red blood cells (Sternheimer stain x ๔๐๐)



รูปที่ ๘. White blood Cells (Sternheimer stain x ๔๐๐)



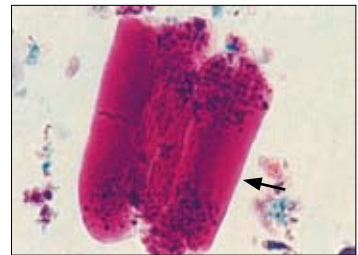
รูปที่ ๙. Epithelial cell cast (Sternheimer stain x ๔๐๐)



รูปที่ ๑๐. Transitional epithelial cells (Sternheimer stain x ๔๐๐)



รูปที่ ๑๑. Hyaline cast (Sternheimer stain x ๔๐๐)



รูปที่ ๑๒. Waxy cast (broad cast) (Sternheimer stain x ๔๐๐)

วิธีเตรียม น้ำยา S Stain ประกอบด้วย

น้ำยา A: ๒% alcian ใน aqueous solution

น้ำยา B: ๐.๕% pyronin B ใน aqueous solution

ผสมน้ำยา A และน้ำยา B ในอัตราส่วน ๒:๑ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๓ เดือน ในที่เย็น และมีด กรองก่อนใช้งาน จากนั้นเมื่อต้องการดูตะกอนปัสสาวะใช้ ๑ หยดของตะกอนปัสสาวะผสมกับสี S Stain ในอัตราส่วน ๔:๑ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

๓. การย้อมด้วยสี Sudan III stain^๔

วิธีเตรียม น้ำยา Sudan III Stain ประกอบด้วย

Sudan III ๑-๒ gm. ละลายใน ๗๐% ethanol แล้วเขย่าให้สารละลายผสมกันได้ดี ปิดภาชนะให้แน่น และ incubate ที่ ๕๖-๖๐°C นาน ๑๒ ชม. นำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เมื่อต้องการดูตะกอนปัสสาวะ ใช้ ๒-๓ หยดของตะกอนปัสสาวะผสมกับสี Sudan III Stain ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (๑๕-๓๐°C) นาน ๑๕-๖๐ นาที แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

๔. การย้อมด้วยสี Prescott-Brodie stain^๕

วิธีเตรียม น้ำยา Prescott-Brodie stain ประกอบด้วย

น้ำยา A: ละลาย ๒, ๗-diaminofluorene ๓๐๐ mg. และ

Phloxin B ๑๓๐ mg. ใน ๙๕% ethanol ๗๐ ml ที่ร้อน
น้ำยา B: ละลาย Sodium acetate ๑๑ g, ๐.๕% acetic acid ๒๐ ml., ๓% hydrogen peroxide solution ๑ ml ให้ผสมเข้ากัน

ผสมน้ำยา A และน้ำยา B ตั้งทิ้งไว้ ๔๘ ชม. เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลดำ นาน ๓ เดือน แล้วจึงกรองก่อนใช้งาน จากนั้น เมื่อต้องการดูตะกอนปัสสาวะ ใช้ ๒-๕ หยดของตะกอนปัสสาวะผสมกับสี Prescott-Brodie Stain ผสมให้เข้ากัน แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ส่วนใหญ่นิยมย้อมด้วยสี Sternheimer-Malbin Stain (SM Stain)^๔ เนื่องจากมีสีที่เตรียมในรูปสำเร็จสะดวกในการใช้เตรียมตะกอนปัสสาวะ แต่เนื่องจากมีต้นทุนในการย้อมด้วยสีดังกล่าวค่อนข้างสูงจึงไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการเรียนการสอนนักศึกษา

เอกสารอ้างอิง

๑. บุญทรง ปรินาธิสสุทธิกุล, อังนุรา สุโกเวช. ปัสสาวะ. กรุงเทพมหานคร: เพชรรุ่งการพิมพ์, ๒๕๔๘.
๒. รัตนา อุทธิมดี. ปัสสาวะ. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดเพิ่มเสริมกิจ, ๒๕๓๑.

๓. ทศนีย์ เส็นนาค. การตรวจปัสสาวะและสารน้ำจากร่างกาย. พิมพ์ครั้งที่ ๒. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สามเจริญพาณิชย์ จำกัด, ๒๕๓๔.
๔. มงคล โชตยาภรณ์, และคณะ. การเตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อใช้เป็นวัสดุการเรียนการสอน. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่, ๒๕๔๔; ๓๔:๓๑-๓.
๕. วิโรจน์ ไชวานิชกิจ. การตรวจปัสสาวะทางห้องปฏิบัติการขั้นพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ ๑. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ๒๕๕๐.
๖. Assawamahsakda W, Riddhimat R, Choopanya K. Preparation of urine microscopic slips technique. J Med Assoc Thai: 1986;69 (1):53-5.
๗. Haber MH. Interference contrast microscopy for identification of urinary sediment. Am J Clin Pathol. 1972;57:316-7.
๘. NCCLS. Urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens; Approved guideline. NCCLS document GP 16-A 1995:15(15).
๙. JCCLS. Urine sediment analysis. JCCLS Guideline GP1-GP2 1995.
๑๐. Brady M, Schumann B. Examination of urine. In: Henry JB, ed. Todd-Sandford-Davidson. Clinical diagnosis and management by laboratory method. 15th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1974:15-81.
๑๑. Bruzel NA. Fundamentals of urine and body fluid analysis. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1994:50-4.
๑๒. Ringsrud KM, Linne JJ. Urinalysis and body fluids: a color text and atlas. St Louis: Mosby, 1994:294.
๑๓. Fogazzi GB, Grinani S, Colucci P. Urine microscopy as seen by nephrologists. Clin. Chm. Lab. Med. 1998;36(12):919-24.