



คำแนะนำ
สำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ Hematopathology



คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

หลักการและเหตุผล

เนื่องด้วยการเตรียมสิ่งส่งตรวจทางพยาธิวิทยาที่เหมาะสมนั้นส่งผลต่อการให้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง และสิ่งส่งตรวจในกลุ่ม hematopathology มีโอกาสต้องตรวจด้วย immunohistochemistry ในสัดส่วนที่สูงกว่าสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ดังนั้นการเตรียมสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ข้อควรปฏิบัติในการจัดการสิ่งส่งตรวจทาง hematopathology ก่อนนำมาตรวจด้วยตาเปล่า

Fixation

- Fixative agent ที่แนะนำ คือ 10% neutral buffered formalin (pH 7)
- Fixation time ที่ดีที่สุด คือ 18-72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม หากมีความจำเป็น อาจ delay fixation time ได้ แต่ไม่ควรเกิน 1 สัปดาห์ เนื่องจาก fixation time ที่นานเกิน 1 สัปดาห์ส่งผลเสียต่อชิ้นเนื้อทำให้ protein และ nucleic acid เสื่อมสภาพ ส่งผลกระทบต่อการย้อมและแปลผล immunohistochemistry และไม่สามารถตรวจเพิ่มเติมด้วย molecular genetic technique ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Torlakovic EE, Brynes RK, Hyjek E, et al. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. Int J Lab Hematol 2015;37:431-49.
2. Sato M, Kojima M, Nagatsuma AK, Nakamura Y, Saito N, Ochiai A. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories: a comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. Pathol Int 2014;64:209-16.
3. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? Arch Pathol Lab Med 2014;138:1520-30.
4. Carithers LJ, Agarwal R, Guan P, et al. The Biospecimen Preanalytical Variables Program: A Multiassay Comparison of Effects of Delay to Fixation and Fixation Duration on Nucleic Acid Quality. Arch Pathol Lab Med 2019;143:1106-18.

แนวทางการตรวจสิ่งส่งตรวจ hematopathology ด้วยตาเปล่าและลงชิ้นเนื้อ

Bone marrow clot จาก aspiration

Description

- บรรยายลักษณะของ clot/tissue
- วัดขนาดของ clot in aggregate 3 มิติ

Sections for histology

- ห่อ clot/tissue ในกระดาษห่อชิ้นเนื้อก่อนนำไปใส่ใน tissue cassette



คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

- สำหรับ clotted marrow ที่เป็นก้อนขนาดใหญ่ ควรผ่านเป็นแว่นหนาไม่เกิน 3 mm ก่อนนำไปห่อในกระดาษห่อชิ้นเนื้อและใส่ใน tissue cassette ทั้งนี้ เพื่อให้หน้ายาต่างๆ ในกระบวนการ tissue process สามารถแทรกซึมได้อย่างทั่วถึง
- นำไป process ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ decalcification
- ตัด section หนา 2-4 microns ในหนึ่งสไลด์ควรมี multiple levels

เอกสารอ้างอิง

Appendix E Guidelines for handling of most common and important surgical specimens ใน Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10th edition (2011)

Bone marrow core/trephine biopsy

Description

- นับจำนวน (number) core ที่ได้รับ
- วัดความยาว (length) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter) ของแต่ละ core
- บรรยาย สี และ consistency

Sections for histology

- ตรวจสอบชิ้นเนื้อว่า fix ดีแล้วหรือไม่ก่อน decalcification โดยสังเกตสีของชิ้นเนื้อ ถ้ายังมีสีแดงปนอยู่ แสดงว่ายัง fix ไม่ดี ให้ตรวจสอบ fixative และแช่ชิ้นเนื้อใน 10% neutral buffered formalin
- ห่อ core tissue ในกระดาษห่อชิ้นเนื้อก่อนนำไปใส่ใน tissue cassette
- Decalcification (ดูการเตรียมสารที่ท้ายบท) ที่แนะนำคือ

1) 10% formic acid 5% formaldehyde เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการ decalcification อาจนำภาชนะที่บรรจุ core tissue ซึ่งแช่ในสารละลายแล้วไปตั้งบนเครื่องเขย่าสาร (shaker) ขณะที่ทำการ decalcification เมื่อครบเวลาให้นำ core tissue ที่นิ่มดีแล้วออกจากสารละลาย 10% formic acid 5% formaldehyde เพื่อนำไป process ต่อได้โดยไม่ต้อง run น้ำ

2) 10% EDTA โดยก่อนดำเนินการให้นำไป run น้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเนื้อที่อยู่ในตลับชิ้นเนื้อไปแช่ในสารละลาย 10% EDTA อย่างน้อย 48 ชั่วโมง จนเนื้อนิ่มเพียงพอ จึงนำไป run น้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไป process ต่อ

หมายเหตุ: การ decalcification ควรหลีกเลี่ยงการใช้ inorganic acid (เช่น nitric หรือ sulfuric acid) เนื่องจากมีผลเสียต่อชิ้นเนื้อทำให้ hematopoietic tissue morphology เปลี่ยนแปลง รบกวนการย้อมและแปลผล immunohistochemistry และทำให้ nucleic acid เสื่อมสภาพ ไม่สามารถนำชิ้นเนื้อไปตรวจเพิ่มเติมด้วย molecular genetic technique ได้

- ตัด section หนา 2-4 microns ในหนึ่งสไลด์ควรมี multiple levels



คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

- ในกรณีที่ไม่มี marrow aspirate smear/imprint ให้ดูประกอบ การย้อม Periodic acid-Schiff (PAS) มีประโยชน์ช่วยในการประเมิน morphology ร่วมกับ H&E ในกรณีต่อไปนี้

- (1) ช่วยในการแยก erythroid precursor, myeloid precursor และ lymphoid cell
- (2) ช่วยให้เห็นจำนวน และ morphology ของ megakaryocyte ได้ดีขึ้น
- (3) ช่วย highlight marrow sinus ชัดขึ้น
- (4) ช่วย highlight tumor cell บางชนิด และ fungi

เอกสารอ้างอิง

1. Naresh KN, Lampert I, Hasserjian R, et al. Optimal processing of bone marrow trephine biopsy: the Hammersmith protocol. J Clin Pathol (2006); 59(9):903-911
2. Appendix E Guidelines for handling of most common and important surgical specimens ใน Rosai and Ackerman s Surgical Pathology, 10th edition (2011)
3. Tissue pathways for lymph node, spleen, and bone marrow trephine biopsy specimens (May 2008) โดย The Royal College of Pathologists
4. Bain BJ, Clark DM, Wilkins BS. Bone marrow pathology, 5th edition (2019)

Lymph node biopsy

Description

- สภาพของชิ้นเนื้อที่ได้รับ (fresh หรือ fixed)
- วัดขนาดชิ้นเนื้อ 3 มิติ
- บรรยายลักษณะของหน้าตัดดังต่อไปนี้: สี nodularity hemorrhage necrosis

Sections for histology

- หาก lymph node ขนาดน้อยกว่า 1 cm. ให้ทำการ bisection โดยลงชิ้นเนื้อทั้งหมด
- หาก lymph node 1-3 cm แนะนำให้ Serial section โดยให้แต่ละ section หนาประมาณ 2-3 mm ตามแนวที่ตั้งฉากกับ long axis ของ lymph node โดยลงชิ้นเนื้อทั้งหมด
- ในกรณีที่ชิ้นเนื้อ lymph node มีขนาดใหญ่ (>3 cm) หรือ มีจำนวนหลายชิ้น หาก submit ทั้งหมดต้องใช้จำนวน block มากกว่า 10 blocks อาจพิจารณาเลือกลงเฉพาะบริเวณที่มีพยาธิสภาพแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับวิจรณ์ญาณของพยาธิแพทย์
- กรณีได้ lymph node ในรูปแบบ fresh ให้ทำ imprint เพื่อย้อม Wright stain ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Appendix E Guidelines for handling of most common and important surgical specimens ใน Rosai and Ackerman s Surgical Pathology, 10th edition (2011)



คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

2. Gratzinger D, Natkunam Y. Processing of the lymph node biopsy specimen. In Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL, Quintanilla-Martinez L (eds). Hematopathology, 2nd ed (2017)

Spleen - splenectomy

Spleen มักมีปัญหาเรื่องเนื้อข้างใน fix ไม่ดี ทำให้เกิด autolysis และแปลผลไม่ได้ เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าวควร ผานตัด spleen โดยเร็วที่สุด

Description

- น้ำหนัก และ ขนาด 3 มิติ
- ลักษณะของ capsule: color, thickness, focal changes, adhesions, lacerations (location, length and depth)
- Hilum: vessels, presence of lymph nodes, presence of accessory spleen
- Cut surface: color, consistency, bulging, malpighian corpuscles, nodules or masses, diffuse infiltration

Sections for histology

- จำนวน block ที่ลงขึ้นกับขนาดของ spleen พยาธิสภาพที่พบตอน grossing และ clinical information — โดยทั่วไปลงอย่างน้อย 4 blocks
- ถ้าพบ hilar lymph node และ/หรือ accessory spleen ให้ลง block มาตรวจด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Appendix E Guidelines for handling of most common and important surgical specimens ใน Rosai and Ackerman s Surgical Pathology, 10th edition (2011)
2. Burke JS. Spleen. In Mills SE (ed). Sternberg's diagnostic surgical pathology, 6th edition (2015)

Review block/slide

เพื่อประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วยและเพื่อให้พยาธิแพทย์ผู้ทบทวนการวินิจฉัยสามารถให้การวินิจฉัยที่เหมาะสมที่สุด ห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจชิ้นเนื้อครั้งแรกควรส่ง paraffin block และสไลด์ทั้งหมด (รวมถึง สไลด์ immunohistochemistry ที่มี) ให้แก่ห้องปฏิบัติการที่จะทำการทบทวนการวินิจฉัย ทั้งนี้การส่งบล็อกและ สไลด์ทั้งหมดยังช่วยลดปัญหาชิ้นเนื้อใน paraffin block เหลือไม่พอตรวจ และยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายผู้ป่วย ได้มาก

ส่วน official pathological report มีความสำคัญสำหรับการยืนยันตัวตนผู้ป่วย ให้ข้อมูลด้าน gross finding นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับพยาธิแพทย์ผู้ทบทวนการวินิจฉัยให้สามารถรายงานผลได้อย่างเหมาะสม



คำแนะนำสำหรับการเตรียมสิ่งส่งตรวจ hematopathology

การเตรียม decalcifying agents

การเตรียม 10% formic acid 5% formaldehyde (ปริมาตร 1000 ml)

- Distilled water 775 ml
- 40% formaldehyde (หรือ 100% formalin) 125 ml
- 100% formic acid 100 ml

- เก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียม 10% EDTA (ปริมาตร 1000 ml)

- ชั่งสาร Tris (hydroxymethyl)-aminomethane ปริมาตร 33 กรัม
- ชั่งสาร Ethylenediaminetetra-actic acid disodium salt (EDTA di-sodium salt) ปริมาตร 100 กรัม
- เทสารที่เตรียมไว้ทั้งหมดใส่ในบีกเกอร์ และค่อย ๆ เติมน้ำกลั่น (Distilled Water) ลงในบีกเกอร์จนคนสารละลาย (ควรเติมน้ำกลั่นไม่เกิน 900-950 ml)
- คนสารละลายเรื่อย ๆ จนสารละลายมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน สีใส ไม่ขุ่น (อาจใช้ magnetic stirrer ช่วยคนสาร)
- เทสารละลายใส่กระบอกตวงวัดปริมาตร และเติมน้ำกลั่น (Distilled Water) ลงไปจนสารละลายครบปริมาตร 1,000 ml
- เทสารละลายในใส่ภาชนะบรรจุที่มีดขีด เก็บที่อุณหภูมิห้อง