

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อใช้เป็นวัสดุการเรียนการสอน

มงคล โชตยาภรณ์* ณัฐจิรา อินตะใส* และประสิทธิ์ ชนะรัตน์*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมตะกอนปัสสาวะในรูปตะกอนแห้งด้วย Cytospin concentrate technic และศึกษาความคงตัวและคงรูปของตะกอนปัสสาวะที่เตรียมได้

วัสดุและวิธีการ: นำปัสสาวะของผู้ป่วยจำนวน 200 ราย จากหน่วยเปลี่ยนถ่ายไตและงานปฏิบัติการกลาง โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่มาปั่นแล้วล้างตะกอนปัสสาวะด้วย 1% Glutaraldehyde ในน้ำเกลือ แล้วปรับให้มีความเข้มข้นของ คาสท์หรือเซลล์หรือผลึกเป็น 200/50 μ L, 200/100 μ L, 200/150 μ L และ 200/200 μ L ก่อนเติม 22% bovine serum albumin 1 หยด แล้วปั่นด้วยเครื่อง Cytospin ด้วยความเร็วรอบ 600 rpm. นาน 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และย้อมตะกอนปัสสาวะด้วยสี Sternheimer-Malbin stain (SMS) ที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 วินาที และตรวจนับตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 7 วัน

ผลการทดลอง: ตะกอนปัสสาวะที่ได้จากการปรับความเข้มข้นของคาสท์หรือเซลล์หรือผลึก 200/200 μ L ย้อมด้วยสี SMS 45 วินาที มีการกระจายตัว รูปร่างพื้นฐานและการติดสีดีที่สุด และพบว่าทั้งคาสท์ เซลล์ และผลึกที่ได้มีความคงตัวมากกว่า 20 สัปดาห์ ยกเว้น Triple phosphate, Fatty cast และ Calcium oxalate มีความคงตัวและคงรูป 2, 3 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง: ตะกอนปัสสาวะที่เตรียมด้วยเทคนิค Cytospin concentrate สามารถนำมาใช้เป็นวัสดุในการเรียนการสอนได้ วารสารเทคนิคการแพทย์ เชียงใหม่ 2544; 34: 31-7.

คำรหัส : ตรวจวิเคราะห์ปัสสาวะ, ตะกอนปัสสาวะ, วัสดุการเรียนการสอน

*ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Preparation of Urine Sediment for Being Learning and Teaching Materials

Chotayaporn M*, Intasai N* and Chanarat P*

Objective: To study the method of preparation and observe the stability of urine sediment after performing the Cytospin concentrate technic.

Materials and Methods: Urine from 200 patients attending Kidney Transplantation Unit and Central Laboratory, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were centrifuged. Urine sediment was treated by 1% glutaraldehyde in normal saline solution (NSS), then various concentrations of cast or cells or crystals were adjusted to 200/50 μ L, 200/100 μ L, 200/150 μ L and 200/ 200 μ L and 1 drop of 22% bovine serum albumin was added. The suspension was centrifuged at 600 rpm. for 2 minutes at room temperature by Cytospin. The urine sediments were stained by Sternheimer-Malbin stain (SMS) for 15, 30, 45 and 60 seconds, and observed under microscope for every 7 days.

Results: The result showed that the optimal concentration of cast or cells or crystals was 200/ 200 μ L and staining by SMS for 45 second provided the best distribution, morphology and staining. Furthermore, it was found that all casts, cells and crystals had been stable not less than 20 weeks. Whereas, triple phosphate crystal, fatty cast and calcium oxalate crystal had been stable for 2, 3 and 4 weeks respectively.

Conclusion: The urine sediment prepared by optimized Cytospin concentration technic could be used as learning and teaching materials. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2001; 34: 31-7.

Key words: Urinalysis, urine sediments, learning and teaching material

*Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University

บทนำ

การตรวจตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Urine sediment examination) มีความสำคัญทางการแพทย์ ซึ่งช่วยแพทย์ในการวินิจฉัยและติดตามผลการรักษาโรคของระบบทางเดินปัสสาวะ เช่น การตรวจพบ Leukocyte แสดงถึง Urinary tract infection, Pyelonephritis ตรวจพบ Red blood cell cast แสดงถึง Glomerulonephritis ตรวจพบ White

blood cell cast แสดงถึง Pyelonephritis ตรวจพบ Renal tubular epithelial cell cast แสดงถึง Tubular damage ตรวจพบ Oval fat bodies แสดงถึง Nephrotic syndrome เป็นต้น¹⁻⁴

นักเทคนิคการแพทย์ ซึ่งเป็นบุคลากรในโรงพยาบาลที่มีหน้าที่เกี่ยวข้อง และรับผิดชอบในการตรวจปัสสาวะจึงต้องมีความรู้ความสามารถในการตรวจและจำแนกชนิดของตะกอนปัสสาวะได้

อย่างถูกต้อง ดังนั้นหน่วยงานหรือสถาบันการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนักเทคนิคการแพทย์ จึงมีส่วนเกี่ยวข้องต่อคุณภาพของการตรวจปัสสาวะโดยตรง กล่าวคือจะต้องฝึกฝนให้นักศึกษาจำแนกชนิดของตะกอนปัสสาวะชนิดต่าง ๆ จากตัวอย่างของจริง มิใช่ดูจากรูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียว¹⁻⁵

แต่อุปสรรคสำหรับการเตรียมตะกอนปัสสาวะสำหรับตั้งสอนแสดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือ ความไม่คงตัวและคงรูปของตะกอนปัสสาวะ โดยเฉพาะตะกอนปัสสาวะที่เรียกว่าคาสท์ (Cast) จะเสื่อมสลายหลังจากผู้ป่วยถ่ายปัสสาวะออกมาเพียง 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และเสื่อมสลายภายใน 4 ชั่วโมงถ้าเก็บไว้ที่ 4 °C ซึ่งต่อมาได้มีการนำ Formalin และ Thymol มาใช้ป้องกันการเสื่อมสลายของตะกอนปัสสาวะ^{6, 7} สารทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถคงสภาพตะกอนปัสสาวะได้นาน 7 วัน แต่อย่างไรก็ตามตะกอนปัสสาวะที่เตรียมได้นี้ก็ยังยากต่อการตั้งแสดงด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากตะกอนปัสสาวะที่อยู่ในรูปของเหลวถึงแม้ว่าจะทาหับขอบของ Coverslip ด้วยสารกันรั่วก็ตาม ของเหลวก็ยังสามารถระเหยได้ทำให้ตะกอนปัสสาวะที่ตั้งแสดงนั้นไหลออกไปนอกบริเวณที่ต้องการตั้งแสดงและทำให้รูปร่างของตะกอนปัสสาวะเปลี่ยนไป ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้มีการนำเอา Cytospin concentrate technic หรือ cytocentrifuge มาช่วยในการเตรียมเซลล์จากของเหลวที่เจาะจากน้ำไขสันหลัง (Cerebrospinal fluid)⁸⁻¹⁴ เซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) เซลล์ที่เตรียมได้นี้จะเป็นเซลล์แห้งเคลือบติดกับแผ่นสไลด์ ซึ่งเป็นการตรึงเซลล์ไม่ให้เคลื่อนที่ ง่ายต่อการตั้งสอนแสดงด้วยกล้องจุลทรรศน์และยังทำให้เซลล์คงรูปอีกด้วย

เครื่อง Cytocentrifuge อาศัยหลักการปั่น

แยกตัวอย่างของเหลวที่ส่งตรวจอย่างช้า ๆ จาก 200 จนถึง 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5-10 นาที และในระหว่างการปั่นนี้ ส่วนที่เป็นน้ำจะดูดซึมเข้าไปยังกระดาษกรอง ทำให้ส่วนที่เป็นเซลล์ในของเหลวเข้มข้นขึ้น และไปพ่นึกอยู่ที่ Microscope slide เป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ต่อจากนั้นนำสไลด์นี้มาย้อมสี เช่น Sternheimer-Malbin Stain และนำไปตรวจนับดูเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป¹¹⁻¹⁴

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการใช้ Cytospin concentrate technic สำหรับเตรียมตะกอนปัสสาวะสำหรับตรวจในงานประจำวัน (Routine urinalysis) รายงานนี้จึงศึกษาวิธีการเตรียมตะกอนปัสสาวะ ความคงตัวและคงรูปของตะกอนปัสสาวะที่เตรียมด้วย Cytospin concentrate technic เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อใช้เป็นวัสดุในการเรียนการสอนต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับตะกอนปัสสาวะที่ใช้ปั่นด้วย Cytospin concentrate technic

เตรียมตะกอนปัสสาวะโดยปั่นล้างตะกอนปัสสาวะด้วย 1 % Glutaraldehyde in NSS 2 ครั้ง ที่ 400 g นาน 5 นาที ตรวจนับความเข้มข้นตะกอนปัสสาวะด้วย FAST-READ 102 NEW GRID® และปรับตะกอนปัสสาวะให้มีความเข้มข้นของ ตะกอนปัสสาวะ 200/50 μ L, 200/100 μ L, 200/150 μ L และ 200/200 μ L ก่อนเติม 22% bovine serum albumin 1 หยด แล้วนำตะกอนปัสสาวะที่เตรียมได้ปั่นด้วยเครื่อง Cytospin ที่อุณหภูมิห้องความเร็วรอบ 600 rpm. นาน 2 นาที ย้อมด้วยสีย้อม Sternheimer-Malbin Stain (SMS)

2. ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับ ย้อมสีตะกอนปัสสาวะด้วย SMS

โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้อม
เปรียบเทียบระยะเวลา 15, 30, 45 และ 60 วินาที

3. ทดสอบหาความคงตัวของตะกอนปัสสาวะ

เตรียมตะกอนปัสสาวะจากผู้ป่วยจำนวน
200 ราย ด้วยเครื่อง Cytospin และย้อมด้วยสีย้อม
SMS (ใช้วิธีการที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้อ 1
และ 2) หยด Permout และปิดทับด้วย Cover-
slip ตรวจนับจำนวนของตะกอนปัสสาวะที่เสื่อม
สลายหลังจากเตรียมด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วทุกๆ
7 วัน

ผลการทดลอง

1. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ Cytospin concentrate technic

การทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมสำหรับ
ตะกอนปัสสาวะที่ใช้ปั่นด้วย Cytospin concentrate
technic โดยใช้เกณฑ์พิจารณา คือ

- ตะกอนปัสสาวะบนสไลด์แห้งภายใน
1 นาที

- ความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของ
เซลล์

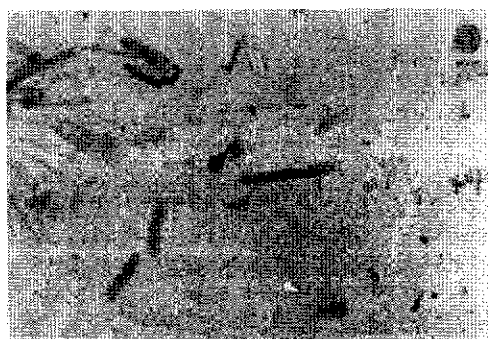
- รูปร่างของเซลล์และคาสท์

พบว่าที่ปริมาณตะกอนปัสสาวะ 200 μ L ซึ่ง
มีความเข้มข้นของเซลล์ ผลึก และคาสท์ 200 ต่อ
ปริมาณ 200 μ L มีการกระจายตัวของเซลล์ และ
คาสท์ดี ตะกอนแห้งภายใน 1 นาที และรูปร่าง
ของตะกอนปัสสาวะไม่เปลี่ยนแปลง ดังตารางที่ 1
และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณปัสสาวะที่เหมาะสมที่ใช้ปั่นด้วย Cytospin concentrate technic

	ปริมาณที่ใช้ (μ L)					
	50	100	150	200	250	300
ตะกอนปัสสาวะแห้งภายใน 1 นาที	G	G	G	G	NG	G
การกระจายตัวของตะกอนดี	NG	NG	G	G	NG	G
รูปร่างของตะกอนไม่เปลี่ยนแปลง	NG	NG	NG	G	G	NG

G = ดี, NG = ไม่ดี



X 100 เท่า



X 400 เท่า

รูปที่ 1 ลักษณะของตะกอนปัสสาวะที่ได้จากการปั่นตะกอนปัสสาวะปริมาณ 200 μ L ซึ่งมีความเข้มข้นของ เซลล์ ผลึก และ
คาสท์ 200 หน่วยต่อปริมาณ 200 μ L

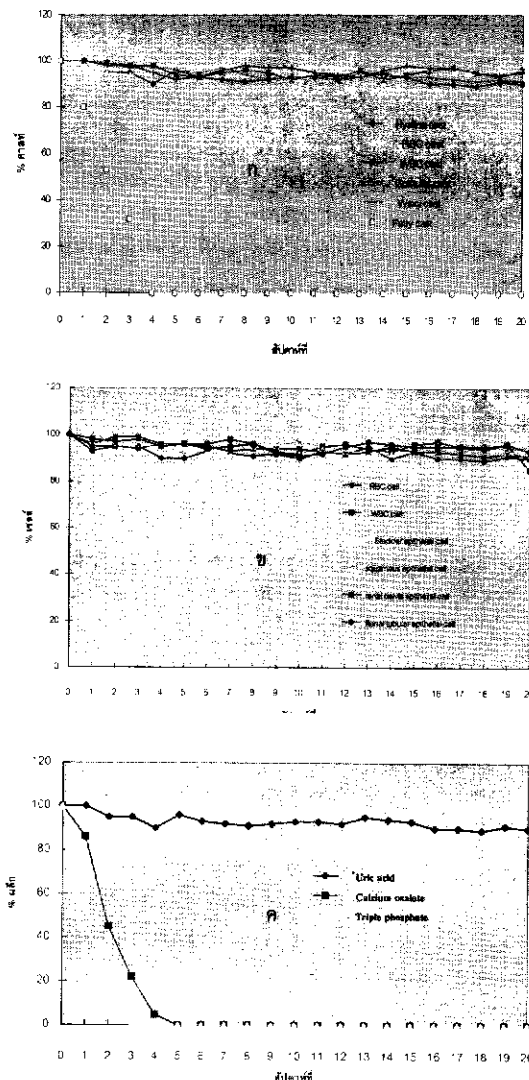
2. ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับย้อมสีตะกอนปัสสาวะด้วย SMS

จากการเตรียมตะกอนโดยปั่นปัสสาวะ ปริมาตร 200 μ L ที่ความเร็วรอบ 600 rpm นาน 2 นาที และใช้ระยะเวลาในการย้อมตะกอนปัสสาวะด้วย SMS นาน 15, 30, 45 และ 60 วินาที พบว่าที่ระยะเวลา 45 วินาที เซลล์และคาสต์ติดสีดีที่สุด โดยนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมติดสีชัดเจน สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์และคาสต์ได้อย่างชัดเจน

3. ผลการหาความคงตัวของตะกอนปัสสาวะที่เตรียมด้วย Cytospin concentrate technic

ชนิดของตะกอนปัสสาวะที่เตรียมได้จากผู้ป่วย จำนวน 200 ราย พบว่าประกอบด้วย Squamous epithelial cell จำนวน 30 ราย, Bladder epithelial cell จำนวน 2 ราย, Renal tubular epithelial cell จำนวน 5 ราย, Renal pelvis epithelial cell จำนวน 3 ราย, White blood cell จำนวน 20 ราย, Red blood cell จำนวน 13 ราย, Hyaline cast จำนวน 36 ราย, White blood cell cast จำนวน 30 ราย, Red blood cells cast จำนวน 2 ราย, Granular cast จำนวน 8 ราย, Waxy cast จำนวน 3 ราย, Fatty cast (oval fat bodies cast) จำนวน 1 ราย, Calcium oxalate crystal จำนวน 15 ราย, Uric acid crystal จำนวน 6 ราย และ Triple phosphate crystal จำนวน 2 ราย

จากการตรวจนับตะกอนปัสสาวะด้วยกล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 7 วัน โดยนับจำนวนตะกอนปัสสาวะแต่ละชนิดจำนวน 10 High power field (HPF) โดยนับเฉพาะตะกอนปัสสาวะที่มีรูปร่างลักษณะที่ชัดเจนเท่านั้น และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับตะกอนปัสสาวะเริ่มต้น แสดงดังรูปที่ 2 พบว่าทั้งคาสต์ เซลล์ และผลึกที่เตรียมได้มีความคงตัวมากกว่า 20 สัปดาห์ ยกเว้น Triple



รูปที่ 2 ความคงตัวของรูปร่างลักษณะของตะกอนปัสสาวะที่ระยะเวลาต่างๆ
ก. คาสต์ ข. เซลล์ และ ค. ผลึก

phosphate, Fatty acid และ Calcium oxalate มีความคงตัวและคงรูป 2, 3 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับ

วิจารย์
สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมตะกอน ปัสสาวะด้วย Cytospin concentrate technic โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 200 μ L (200 sediments/200 μ L) ผสมกับ 22% BSA 1 หยด เพื่อช่วยคงสภาพรูปร่างของตะกอนปัสสาวะ^{9, 10, 14} ปั่นที่ 600 rpm นาน 2 นาที และย้อมด้วยสี SMS นาน 45 วินาที ทาทับด้วย Permunt และปิดด้วย coverslip

ซึ่งจะช่วยให้เห็นรูปร่างของตะกอนปัสสาวะได้อย่างชัดเจน

ตะกอนปัสสาวะที่เตรียมได้มีความคงตัวและคงรูปนานกว่า 20 สัปดาห์ ทั้งคาสท์ (Hyaline cast, White blood cell cast, Red blood cells cast, Granular cast และ Waxy cast) เซลล์ (Squamous epithelial cell, Bladder epithelial cell, Renal tubular epithelial cell, Renal pelvis epithelial cell, White blood cell และ Red blood cell) และผลึก (Uric acid ส่วน Triple phosphate Fatty cast และ Calcium oxalate มีความคงตัวและคงรูป 2, 3 และ 4 สัปดาห์ตามลำดับซึ่งนานพอสำหรับการเรียนการสอนและสามารถนำมาเตรียมตะกอนปัสสาวะเพื่อใช้เป็นวัสดุในการเรียนการสอนได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุมัติทุนวิจัย ในโครงการวิจัยเพื่อพัฒนา นักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2543

บรรณานุกรม

1. กนกนาค ชูปัญญา. คู่มือการตรวจปัสสาวะ. โครงการตำรา-ศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ 2531
2. รัตนา ฤทธิมัติ. ปัสสาวะ. ภาควิชาคลินิกไมโครสโคปี คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ 2531.
3. Bradley M, Schumann GB, Ward PCJ: Examination of urine. In : Henry JB (ed). Todd-Sanford-Davidson's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 16th ed Philadelphia : WB Saunders, 1979.
4. Brody LH, Salladay JR, Armbruster K. Urinalysis and urinary sediment. Med Clin North Am 1971; 55: 243.
5. Routine urinalysis and collection, transportation and preservation of urine specimens, tentative guidelines, Villanova, Pa., Dec. 1992, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 12(26) 16-T.
6. Ben-Ezra J, Bork L, McPherson RA. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. Clin Chem 1998; 44 : 92-5.
7. Ringsrud KM, Linne JJ. Urinalysis and Body Fluids : A Color Text and Atlas. St. Louis: 1995.
8. Evans DIK, O's PourK C, Jones PM. The cerebrospinal fluid in acute leukemia of childhood: studies with the cytocentrifuge. J Clin Pathol 27: 226-30.
9. Barrett DL, King EG. Comparision of cellular recovery rates and morphologic detail obtained using membrane filter and cytocentrifuge technique. Acta Cytol 1976; 20: 174-80.
10. Choitt A, Anderson PJ. Diagnosis cytology of cerebrospinal fluid by the cytocentrifuge method. Am J Clin Pathol 1979; 72: 931-43.
11. Davey DD, Foucar K, Giller R. Millipore filter vs cytocentrifuge for detection of childhood central nervous system leukemia. Arch Pathol Lab Med 1986; 110: 705-8.
12. Hoeltge GA, Furlan A, Hoffman GC. The differential cytology of cerebrospinal fluids

- prepared by cytocentrifugation. *Cleve Clin Q* 1976; 43: 237-46.
13. Nishimura K, Hosoya R, Nakajima K. Sedimentation cytology in central nervous system leukemia with a new simple apparatus. *Br J Haematol* 1978; 40: 583-6.
14. Whitmore E, Hoeherg F, Wolfson K, *et al.* Quantitative cytocentrifugation in the evaluation of cerebrospinal fluid. *Acta Cytol* 1982; 26: 847-50.