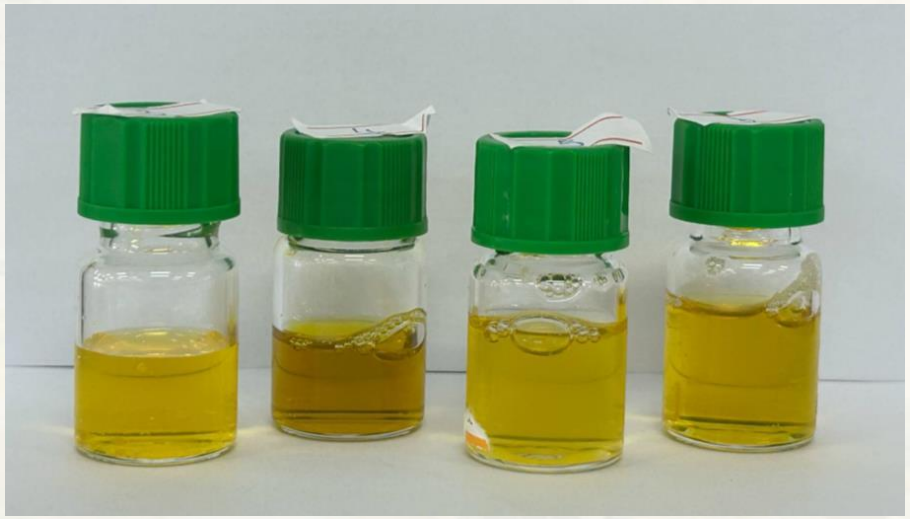
การตรวจสารน้ำในร่างกาย
ผู้จัดทำ
นายภัทรพงษ์ ผลาผล
วันที่ 24 มิถุนายน 2569

Body Fluids

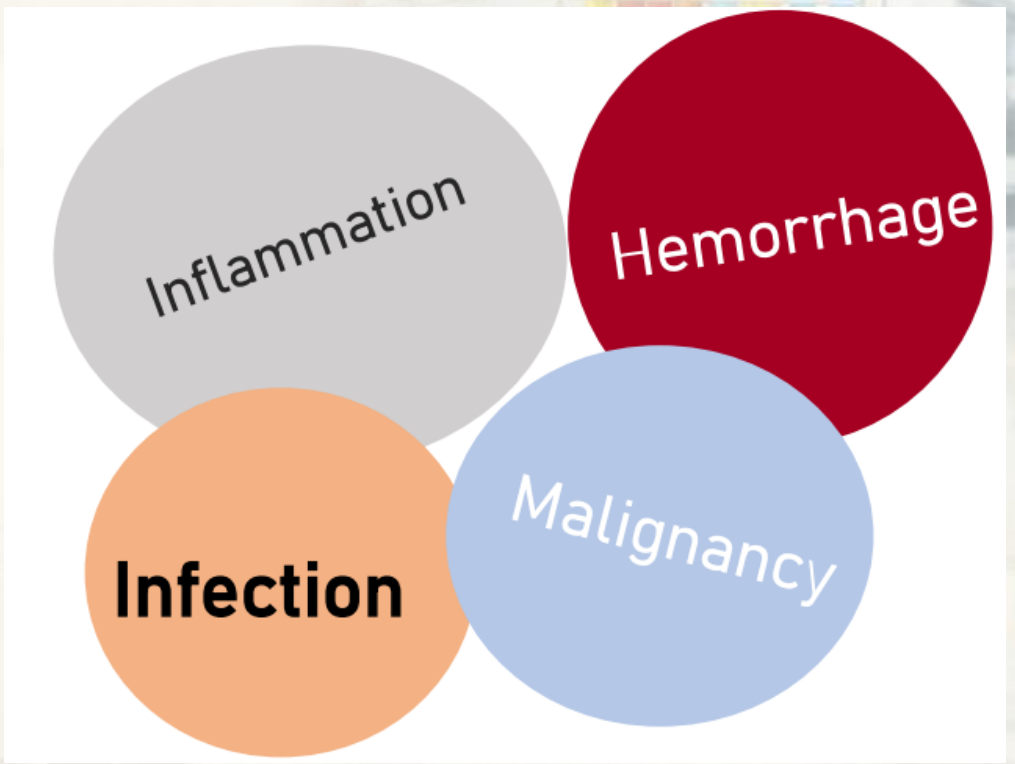
- Cerebrospinal Fluid
- Synovial Fluid
- Serous Fluids
- Bronchoalveolar lavage
- Seminal Fluid
- Vaginal Secretion
- Amniotic Fluid
- Gastric Fluid

วัตถุประสงค์ของการส่งตรวจ



- **Transudate or Exudate**

To determine the etiology of the fluid accumulation



To distinguish between benign and malignant processes

ส่งตรวจอะไรบ้าง

Routine testing

. Gross examination
. Microscopic examination
 - Cell count
 - Differential cell count and smear examination
. Chemical examination
. Microbiological examination

Specialized testing

. Flow cytometry
. Immunohistochemical stains
. Cytogenetics
. Molecular testing

ตัวอย่างคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Body fluid examination

1. **รายการตรวจ :** Body fluid examination
2. **รหัสและราคา :**
   2.1 รหัสโรงพยาบาล : 5230 รหัสกรมบัญชีกลาง : 31301
   2.2 ราคา
   1) ราคากรมบัญชีกลาง 50 บาท
   2) ข้าราชการ/ประกันสังคม/ประกันสุขภาพถ้วนหน้า เบิกจ่ายตามสิทธิ
   3) ราคาอาจมีการเปลี่ยนแปลงตามประกาศของคณะฯ
3. **ข้อบ่งชี้ในการส่งตรวจ :** เพื่อเป็นแนวทางในการวินิจฉัยโรคที่เป็นสาเหตุของการเกิด effusion
4. **การเตรียมผู้ป่วย :** ไม่มี
5. **สิ่งส่งตรวจ/ ปริมาณ และภาชนะที่ใช้เก็บ :**

สิ่งส่งตรวจ	Pleural effusion/ Ascites Peritoneal effusion Pericardial effusion	Cerebrospinal fluid; CSF Peritoneal dialysis fluid; PDF Bronchoalveolar lavage; BAL Synovial fluid (ควรหล่อ syringe ด้วย sodium heparin ขณะทำการเจาะข้อ	Synovial fluid
ภาชนะ			
	EDTA tube	Sterile container	Lithium heparin tube
ปริมาณ	≥ 1 mL	≥ 1 mL	≥ 1 mL

6. **การนำส่งและข้อควรระวังในการส่งสิ่งส่งตรวจ :** นำส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรืออย่างช้าไม่เกิน 1 ชั่วโมง
7. **วันและเวลาที่ให้บริการ :** รับสิ่งส่งตรวจและตรวจวิเคราะห์ ทุกวัน ตลอด 24 ชั่วโมง
8. **ระยะเวลารอคอยผลการตรวจ :**
   8.1 OPD AE/เคสด่วน 60 นาที
   8.2 เคสทั่วไป 90 นาที
9. **ค่าอ้างอิงและค่าวิกฤต :**
   9.1 ค่าอ้างอิง
   1) น้ำไขสันหลัง

พารามิเตอร์	เด็กแรกเกิด	ผู้ใหญ่
จำนวนเม็ดเลือดขาว	0-30 เซลล์/mm^3	0-5 เซลล์/mm^3
ชนิดเม็ดเลือดขาว		
Neutrophils	4 ± 4%	2 ± 4%
Lymphocytes	20 ± 15%	60 ± 20%
Monocytes	70 ± 20%	30 ± 15%

   2) น้ำไขข้อ

พารามิเตอร์	ผู้ใหญ่
จำนวนเม็ดเลือดขาว	0-150 เซลล์/mm^3
ชนิดเม็ดเลือดขาว	
Neutrophils	< 25%
Lymphocytes	< 75%
Monocytes	< 70%

ตัวอย่างคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Body fluid examination

10. วิธีการตรวจวิเคราะห์ :

10.1 การนับจำนวนเซลล์ (cell count) ใช้ 2 วิธี โดยขึ้นกับชนิด ปริมาณและลักษณะของ body fluid ดังนี้

1) ตรวจนับด้วย manual examination โดยใช้ hemocytometer

2) ตรวจนับด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ ด้วยหลักการ Fluorescence flow cytometry method using semi-conductor laser และ Hydrodynamic focusing DC

10.2 การนับแยกชนิดของเซลล์ (cell differential count) โดยการเตรียม slide โดย cytocentrifuge ย้อมด้วย Wright-Giemsa Stain และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

11. สิ่งรบกวนต่อการตรวจวิเคราะห์ :

11.1 specimen มี clot/ partial clot หรือมีเศษเซลล์จำนวนมาก อาจทำให้การนับจำนวนเซลล์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

11.2 specimen ที่มีลักษณะหนืดข้นมากอาจทำให้การนับจำนวนเซลล์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง และอาจไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้

11.3 specimen ที่มีปริมาณน้อยมาก และ/หรือ มีปริมาณเซลล์น้อย อาจไม่สามารถนับแยกชนิดของเซลล์ได้

Presenter Name

ตัวอย่างคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ

คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
ศูนย์บริการพยาธิวิทยา

หน้าแรก | เกี่ยวกับศูนย์ | ห้องปฏิบัติการ | รายการทดสอบ | ดาวน์โหลดแบบฟอร์ม | ติดต่อศูนย์

4. การเก็บน้ำไขสันหลัง (CSF)

เก็บในขวดที่สะอาดปราศจากเชื้อ ปริมาตรเพียงพอต่อการทำการทดสอบ เขียนข้อมูลผู้ป่วย ชนิดของสิ่งส่งตรวจกำกับที่ฉลากสิ่งส่งตรวจให้ครบถ้วนตามข้อกำหนด และนำส่งห้องปฏิบัติการทันที กรณีที่มีการส่งตรวจต่างห้องปฏิบัติการ ให้เก็บแยกขวดส่ง เช่น การส่งตรวจทางเคมีคลินิก, การตรวจทางจุลชีววิทยา, การตรวจนับเซลล์ หรือการตรวจพิเศษอื่น ๆ โดยเรียงลำดับในการใส่น้ำไขสันหลังลงขวดดังนี้

1) ลำดับที่ 1 สำหรับส่งตรวจทางเคมีคลินิกและทางภูมิคุ้มกันวิทยา
2) ลำดับที่ 2 สำหรับการส่งตรวจทางจุลชีววิทยา
3) ลำดับที่ 3 สำหรับการส่งตรวจทางจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกและเซลล์วิทยา

5. การเก็บสารน้ำอื่น ๆ (Effusion)

เก็บในขวดสะอาดปราศจากเชื้อ หากเป็นการส่งตรวจหาลักษณะเซลล์ไม่ต้องใส่สารกันการแข็งตัวของเลือด แต่ถ้าตรวจนับเซลล์ ตรวจทางเคมี ให้ใส่สารกันเลือดแข็งด้วย เช่น Heparin หรือ EDTA เขียนข้อมูลผู้ป่วย ชนิดของสิ่งส่งตรวจกำกับที่ฉลากสิ่งส่งตรวจให้ครบถ้วนตามข้อกำหนดและนำส่งห้องปฏิบัติการทันที

ข้อปฏิบัติและข้อควรระวังในการเก็บสิ่งส่งตรวจ

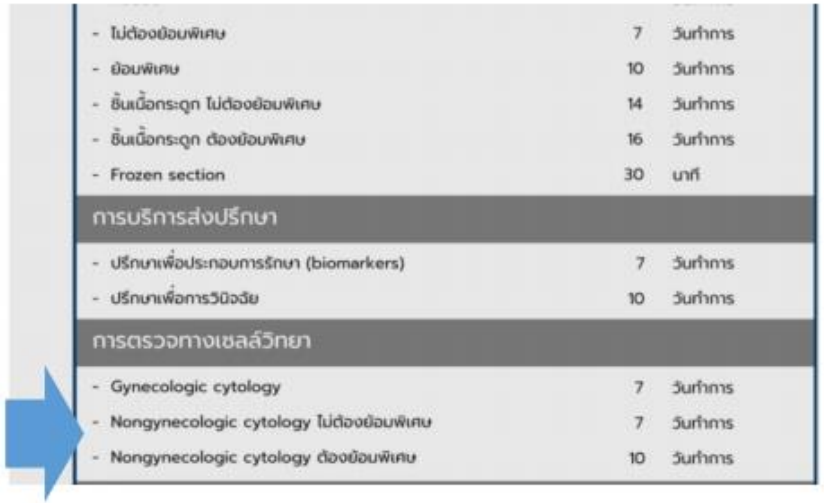
7.3.4.2 **น้ำไขสันหลังและน้ำเจาะจากช่องต่าง ๆ ของร่างกาย** ควรเจาะให้ได้จำนวนไม่น้อยกว่า 2 mL โดยทำความสะอาดบริเวณที่จะเจาะเช่นเดียวกับการเจาะเลือดและเจาะด้วยวิธีปลอดเชื้อเจาะน้ำไขสันหลังใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อ ติดชื่อผู้ป่วยให้เรียบร้อยแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการทันที **ห้าม** เก็บน้ำไขสันหลังเข้าตู้เย็น เพราะจะทำให้เชื้อบางชนิดตาย ถ้าไม่สามารถนำส่งได้ทันทีให้เก็บในตู้ 37 °C หรือเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การตรวจทางจุลทรรศน์

CSF Cell count and Differential

รหัส :	150012
ชื่อการทดสอบ :	CSF Cell count and Differential
วิธีการตรวจวิเคราะห์ :	Manual หรือ วิธี Fluorescence Flowcytometry (Automate)
สิ่งส่งตรวจ/ปริมาตร (ml) Preservative :	น้ำไขสันหลัง 2 - 3 ml
การนำส่งและข้อควรระวัง :	นำส่งทันที
ค่าอ้างอิง sensitivity/Detection Range :	Wbc 0 - 5 Cells/cumm. (Adult) Wbc 0 - 30 Cells/cumm (Neonates)
ราคาของศูนย์บริการพยาธิฯ :	200
วันทำการทดสอบ :	ทำทุกวัน
ข้อบ่งชี้การทดสอบ :	Meningeal infection Subarachnoid hemorrhage CNS malignancy
รายงานผลปกติ :	3.5 ชม.
รายงานตรวจซ้ำ :	-
รายงานผลด่วน :	2 ชม.

ตัวอย่างคู่มือการส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ



- ไม่ต้องย้อมพิเศษ	7	วันทำการ
- ย้อมพิเศษ	10	วันทำการ
- ชิ้นเนื้อกระดูก ไม่ต้องย้อมพิเศษ	14	วันทำการ
- ชิ้นเนื้อกระดูก ต้องย้อมพิเศษ	16	วันทำการ
- Frozen section	30	นาที
การบริการส่งปรึกษา		
- ปรึกษาเพื่อประกอบการรักษา (biomarkers)	7	วันทำการ
- ปรึกษาเพื่อการวินิจฉัย	10	วันทำการ
การตรวจทางเซลล์วิทยา		
- Gynecologic cytology	7	วันทำการ
- Nongynecologic cytology ไม่ต้องย้อมพิเศษ	7	วันทำการ
- Nongynecologic cytology ต้องย้อมพิเศษ	10	วันทำการ

การส่งตรวจของเหลวในร่างกาย (Body fluid)

ของเหลวในร่างกาย ได้แก่ น้ำจากช่องปอด (pleural effusion) ช่องเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardial effusion) น้ำจากช่องท้อง (peritoneal fluid, ascites, peritoneal washing)

ข้อแนะนำการเก็บสิ่งส่งตรวจ

- ควรนำสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ที่เหลือจากการแบ่งไปส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการชนิดอื่น เช่น cell count and differential count, culture, etc.)

ส่งตรวจเซลล์วิทยา

- สิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมควรมีปริมาณเอย่างน้อย 30-50 มิลลิลิตร
(สิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณน้อยกว่า 50 มิลลิลิตร จะทำให้ความแม่นยำในการตรวจหาเซลล์มะเร็งลดน้อยลง)

ข้อแนะนำการเขียนใบส่งตรวจและฉลากติดภาชนะ

- กรอกข้อมูลในใบส่งตรวจให้ครบถ้วนและชัดเจน ด้วยลายมือที่อ่านง่าย (กรุณาอ่านหัวข้อคำแนะนำในการเขียนใบส่งตรวจทางเซลล์วิทยา)

- สิ่งส่งตรวจที่ได้จาก peritoneal washing ขณะทำการผ่าตัด ควรระบุให้ชัดเจนว่าเป็น peritoneal washing หรือสิ่งส่งตรวจจากการผ่าตัด

ไม่ควรระบุแค่ ascites หรือ peritoneal fluid เนื่องจากทำให้สับสนกับสิ่งส่งตรวจที่เก็บได้จากการทำ paracentesis / abdominal tapping

การทดสอบและการเก็บตัวอย่าง CSF

Tube #1	Chemical, immunology, serology	Frozen (–15° C to –30° C)
Tube #2	Microbiological studies	Room temperature (19° C to 26° C)
Tube #3	Cell counts and cytology studies	Refrigerated (2° C to 8° C)

From : Fundamentals of urine and body fluid analysis, 3rd Ed. 2013

การทดสอบและการเก็บตัวอย่าง synovial fluid

Collection Tube Order	Test	Volume	Tube Type
All tubes	**Physical examination** Color, clarity, viscosity	≈1 mL	
#1	**Chemical examination**		
	Lactate, lipids (cholesterol, triglycerides), protein, uric acid	1 to 3 mL	No anticoagulant (red top)
	Glucose	1 to 3 mL	No anticoagulant (red top) or sodium fluoride (gray top)
#2	**Microscopic examination**		
	Total cell count Differential cell count Crystal identification	2 to 5 mL	Sodium heparin* or liquid EDTA
	Cytologic studies (e.g., malignant cells)	5 to 50 mL†	Sodium heparin*
#3	**Microbiological studies**		
	Culture	3 to 10 mL‡	Sterile tube; no anticoagulant (red top), sodium heparin,* or sodium polyanethole sulfonate (yellow top)

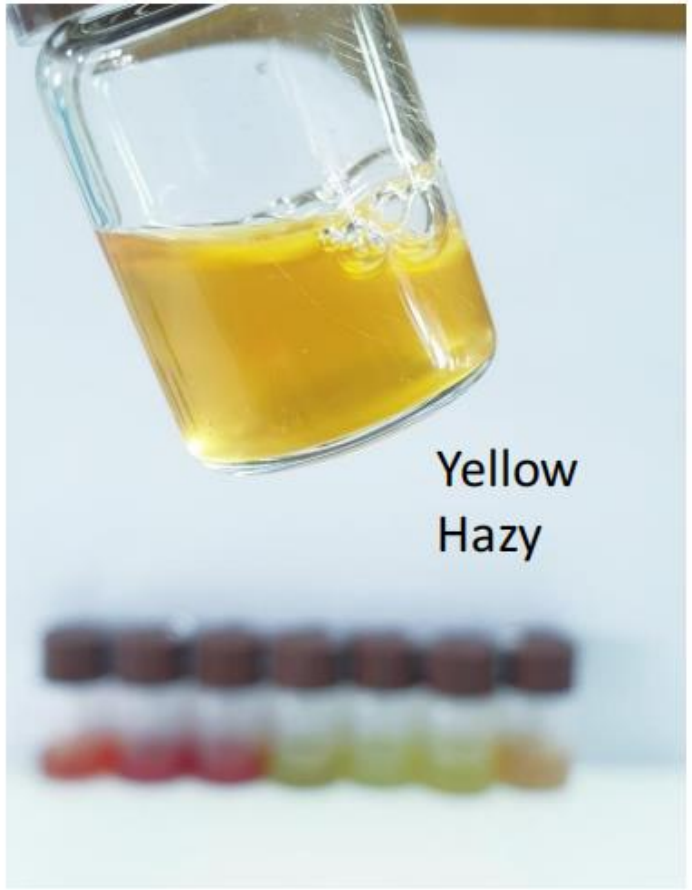
From : Fundamentals of urine and body fluid analysis, 3rd Ed. 2013

การทดสอบและการเก็บตัวอย่าง serous fluid

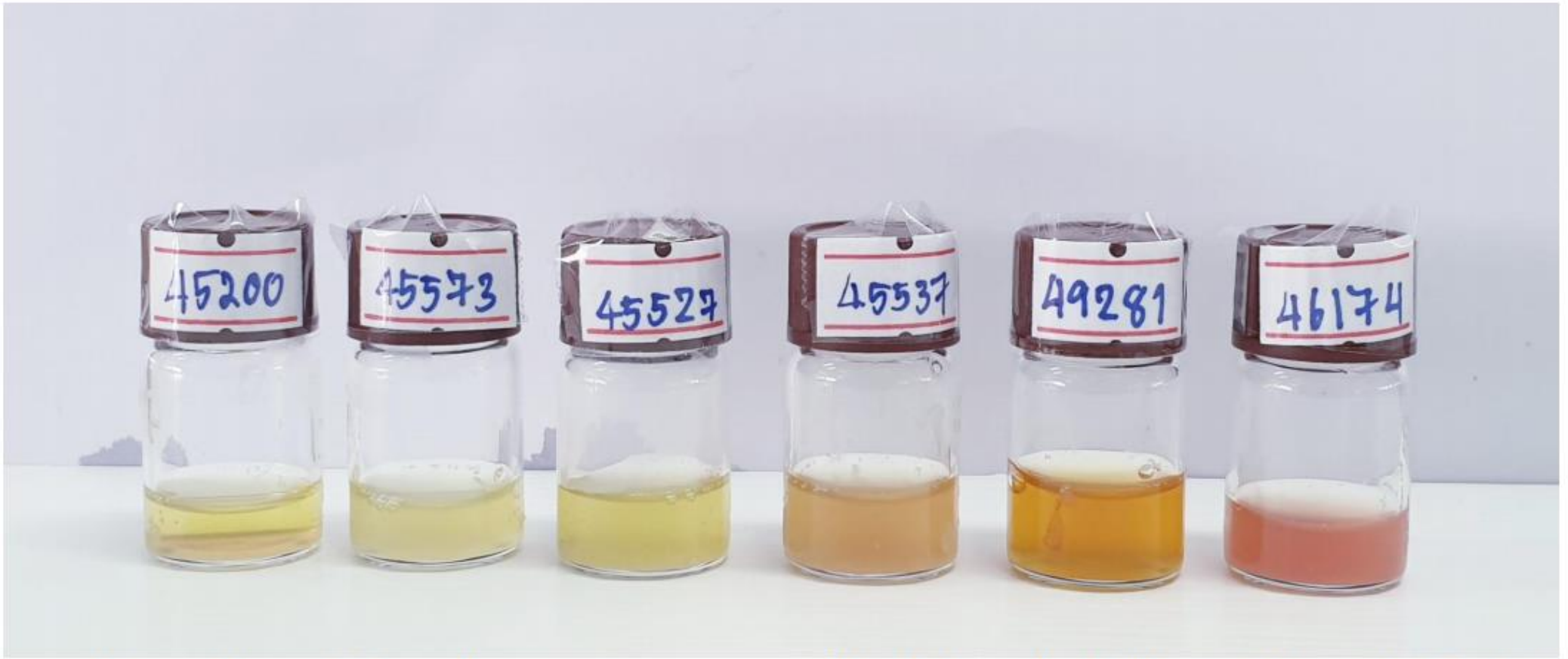
Test	Volume	Acceptable Containers
Microscopic Examination		
- Cell counts, differential	5-8 ml	EDTA
- Cytology study (PAP stain, cell block)	50 ml recommended 25-100 ml	Plain tube/container, sodium heparin, EDTA
Chemical Examination		
- Glucose	3-5 ml	Plain tube, NaF
- Protein, LD, amylase, triglyceride, cholesterol, others	5-10 ml	Plain tube, Na heparin
- pH (pleural fluid)	1-3 ml	Heparinized syringe; anerobically maintained
Microbiological Studies		
- Gram stain, bacterial culture	10-20 ml	Sterile container; SPS,
- Acid-fast stain and culture	15-50 ml	none, sodium heparin

From : Fundamentals of urine and body fluid analysis, 3rd Ed. 2013

ตัวอย่างการรายงาน **appearance**

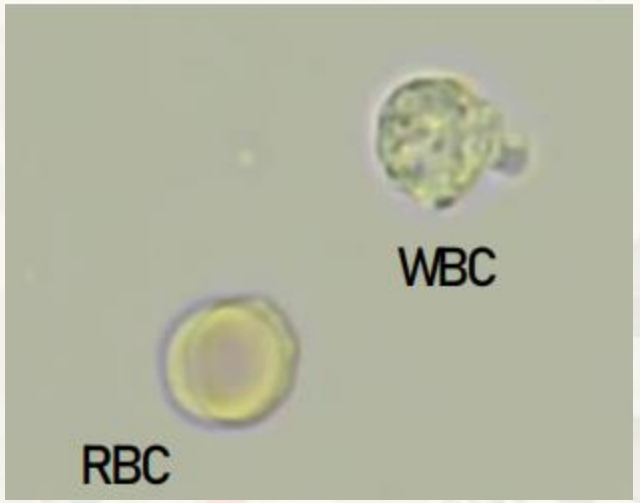


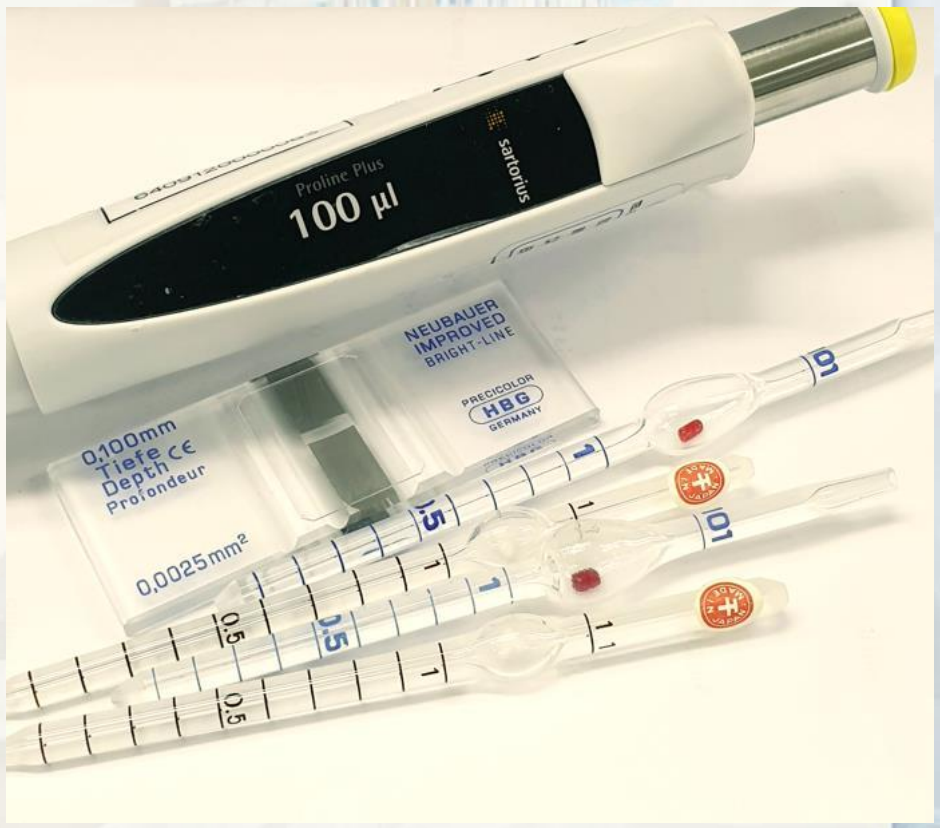
ตัวอย่างการรายงาน **appearance**



Pale yellow Clear | Pale yellow Hazy | Pale yellow Cloudy | Blood-tinged Cloudy | Yellow Hazy | Pink with Blood-tinged Cloudy

การนับจำนวนเซลล์

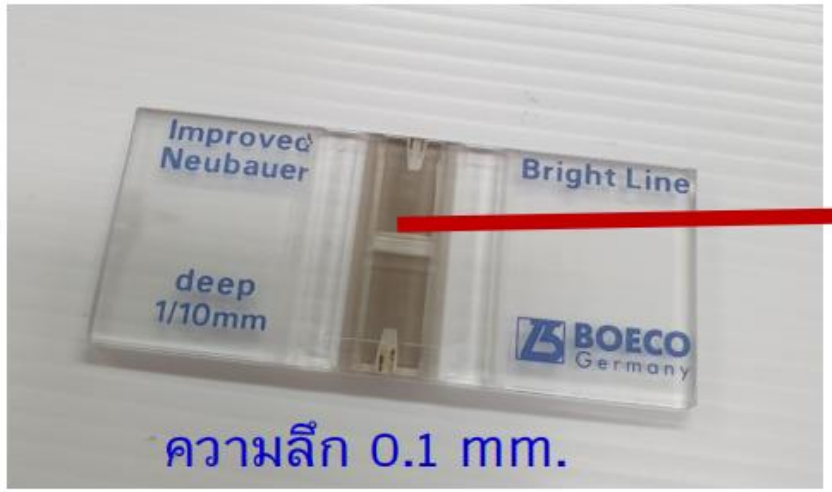


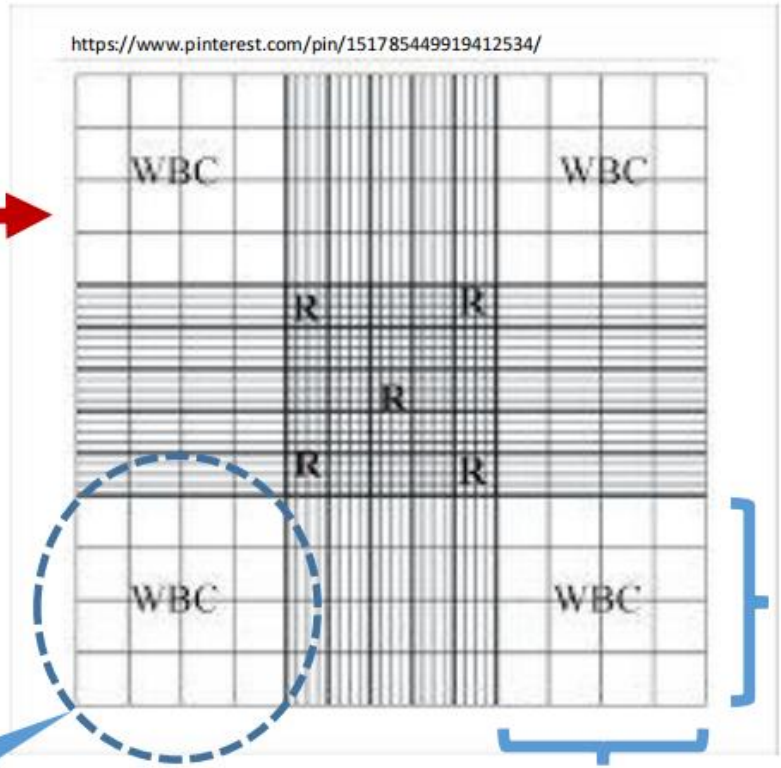


Partial clot

“ Specimen clotted ; results may be inaccurate and must be interpreted with caution.”

การนับจำนวนเซลล์





$1x1x0.1 = 0.1\ mm^3$

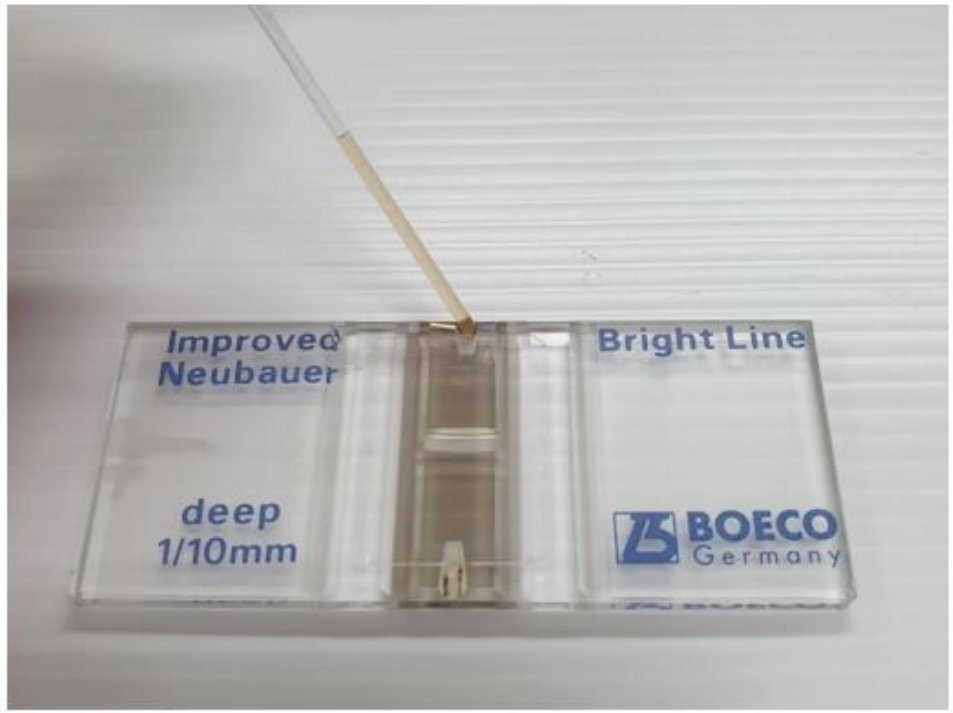
$= 0.1\ ul$

การนับจำนวนเซลล์

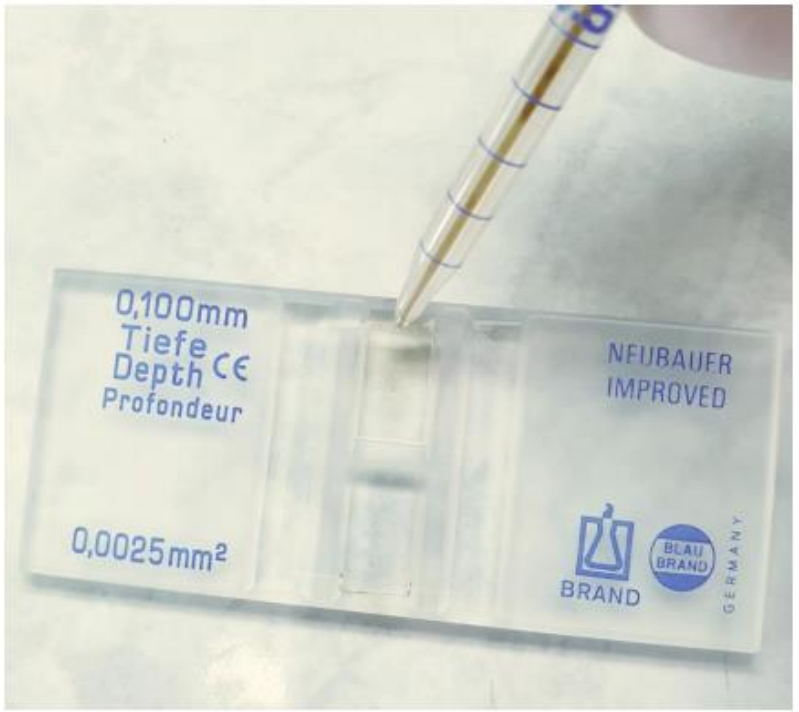
Hemocytometer

The gold-standard method

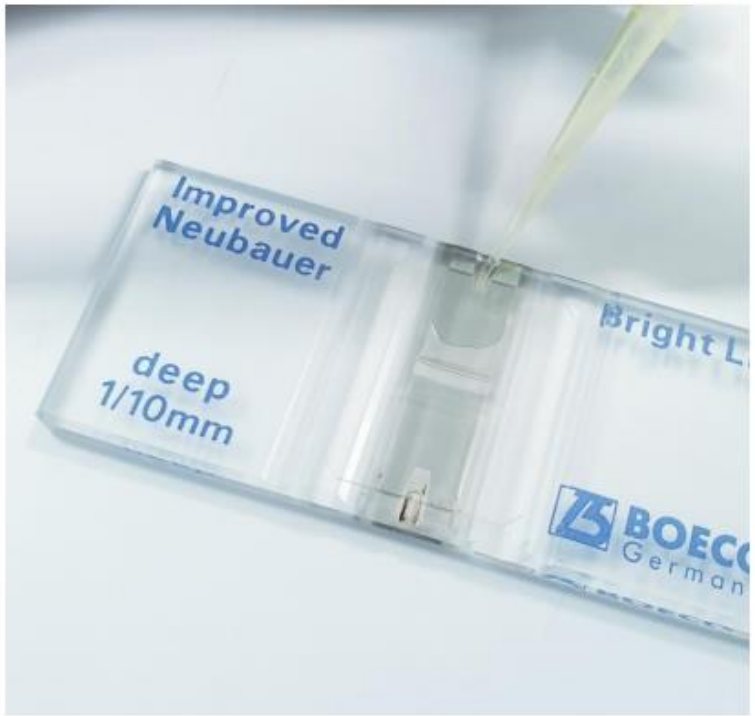
Undiluted sample



Diluted sample

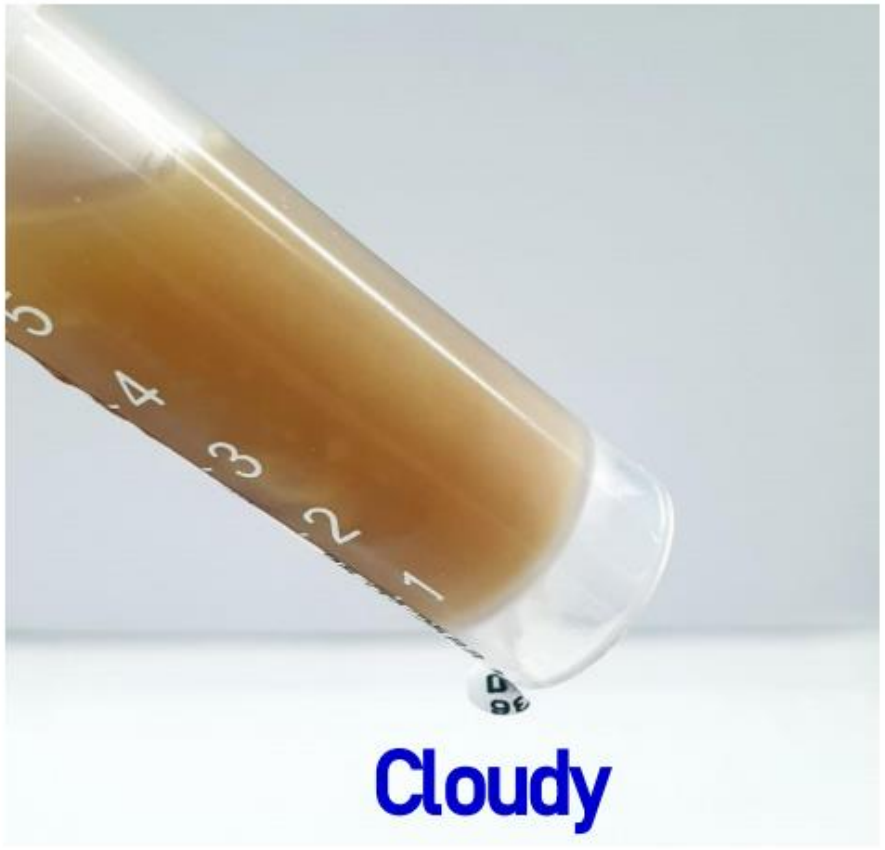


Diluted sample



การนับจำนวนเซลล์

Diluents and Dilutions



การนับจำนวนเซลล์

Body Fluid Dilution Guideline for Cell Counts Based on Visual Appearance

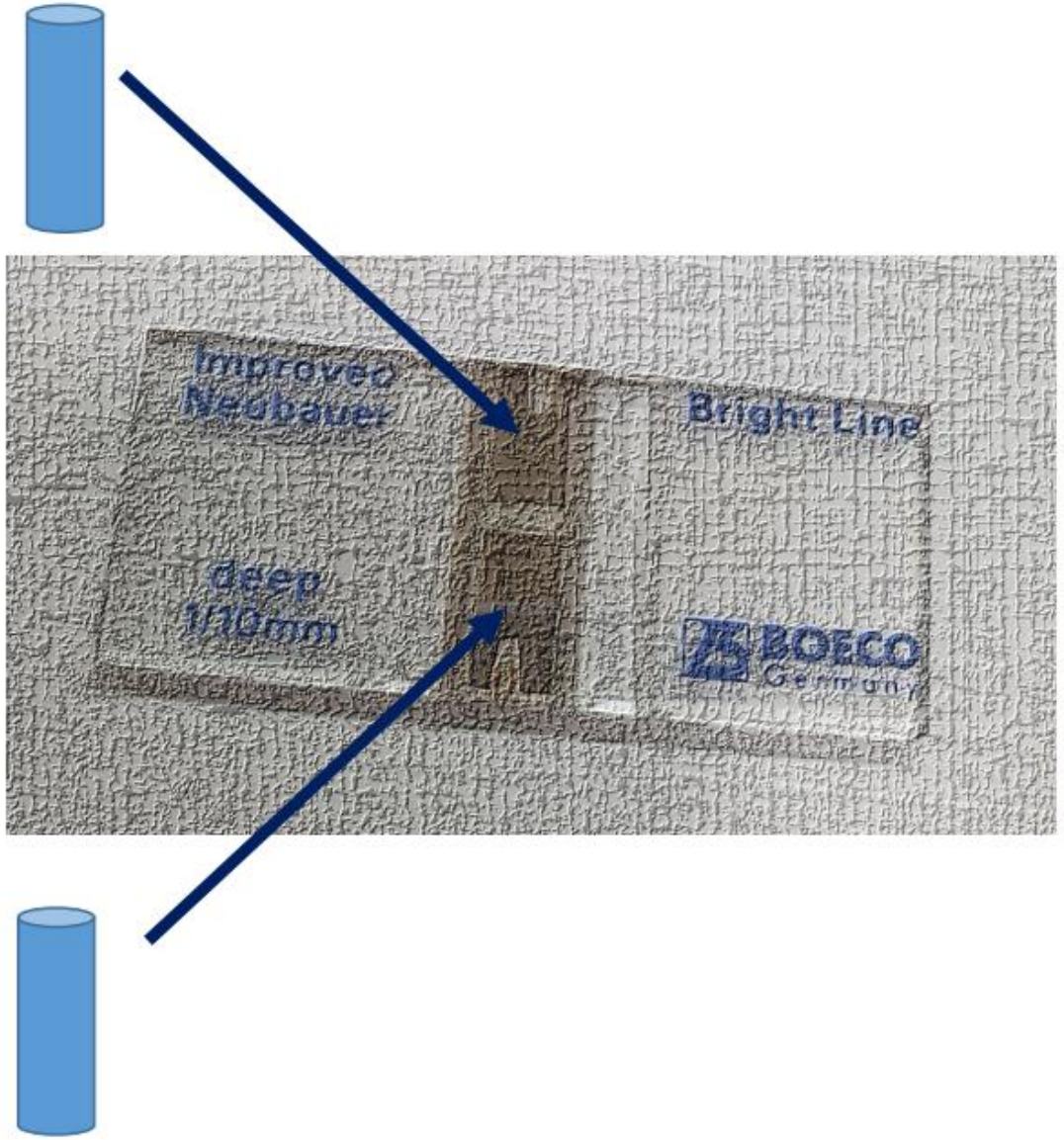
Fluid Appearance	WBC Count	RBC Count
Clear	Undiluted	Undiluted
Hazy (slightly cloudy)	1:2* dilution	Undiluted
Blood-tinged	1:2* dilution	Undiluted
Cloudy	1:20 dilution	Undiluted
Bloody	1:2* or 1:20 dilution	1:200 dilution

From : Fundamentals of urine and body fluid analysis, 3rd Ed. 2013

*Using a diluent that lyses RBCs.

Hypotonic saline (0.30%)
Turk's solution

การนับจำนวนเซลล์



ความแตกต่างใน 2 chamber

< 20%

Acceptable

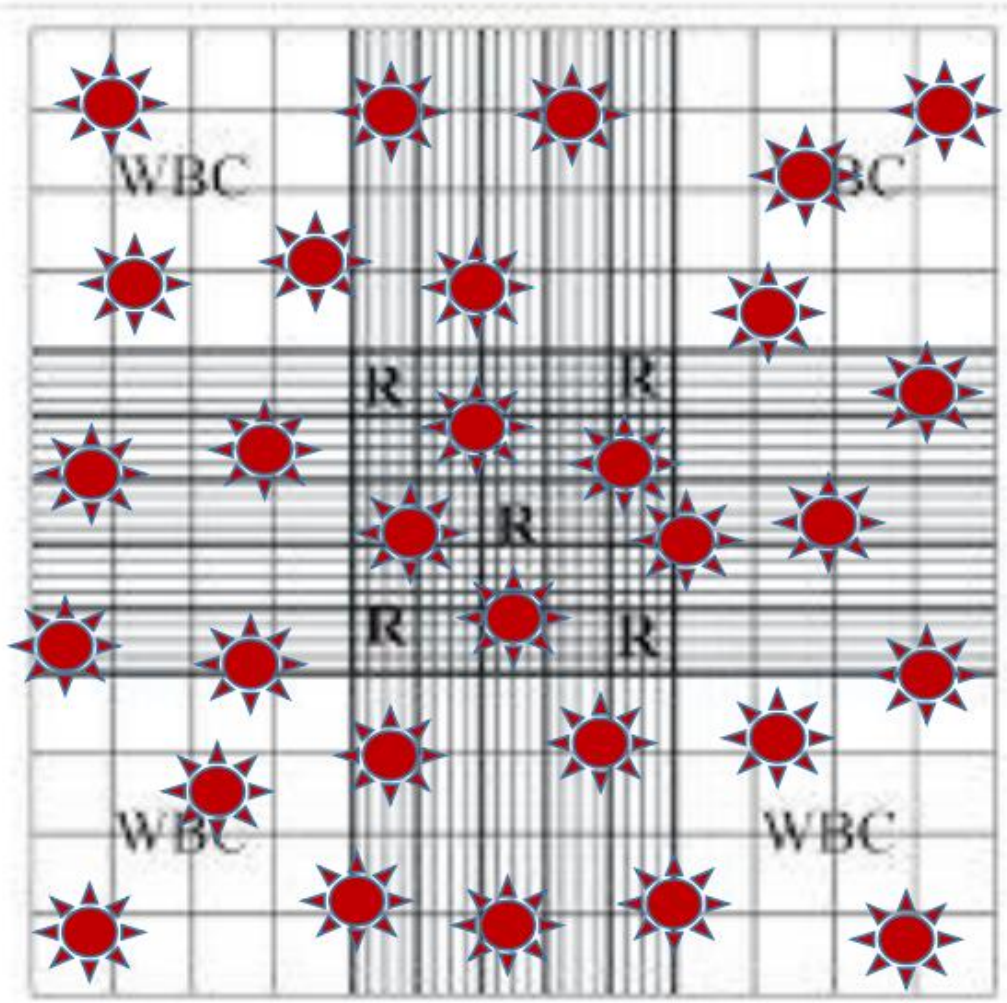
> 20%

Unacceptable

Repeated

การนับจำนวนเซลล์

พบเซลล์จำนวนเท่าไร จึงจะนับได้แบบถูกต้อง ไม่ผิดพลาด



Fluids that have a high cell count, fewer squares can be counted

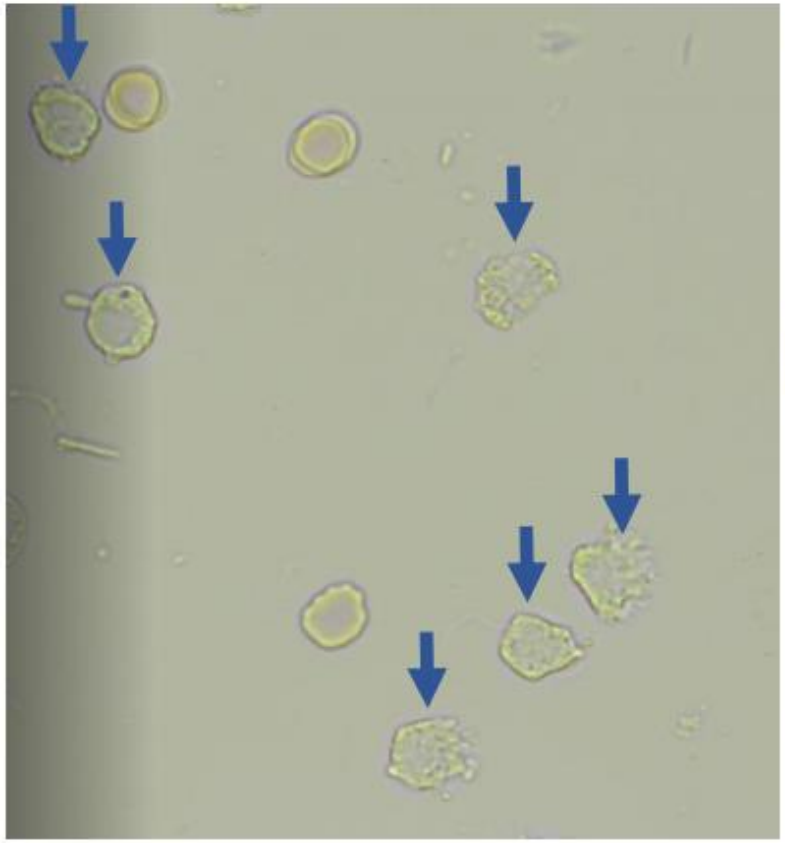
9 W <200 → นับ 9 W ใน 2 ด้าน

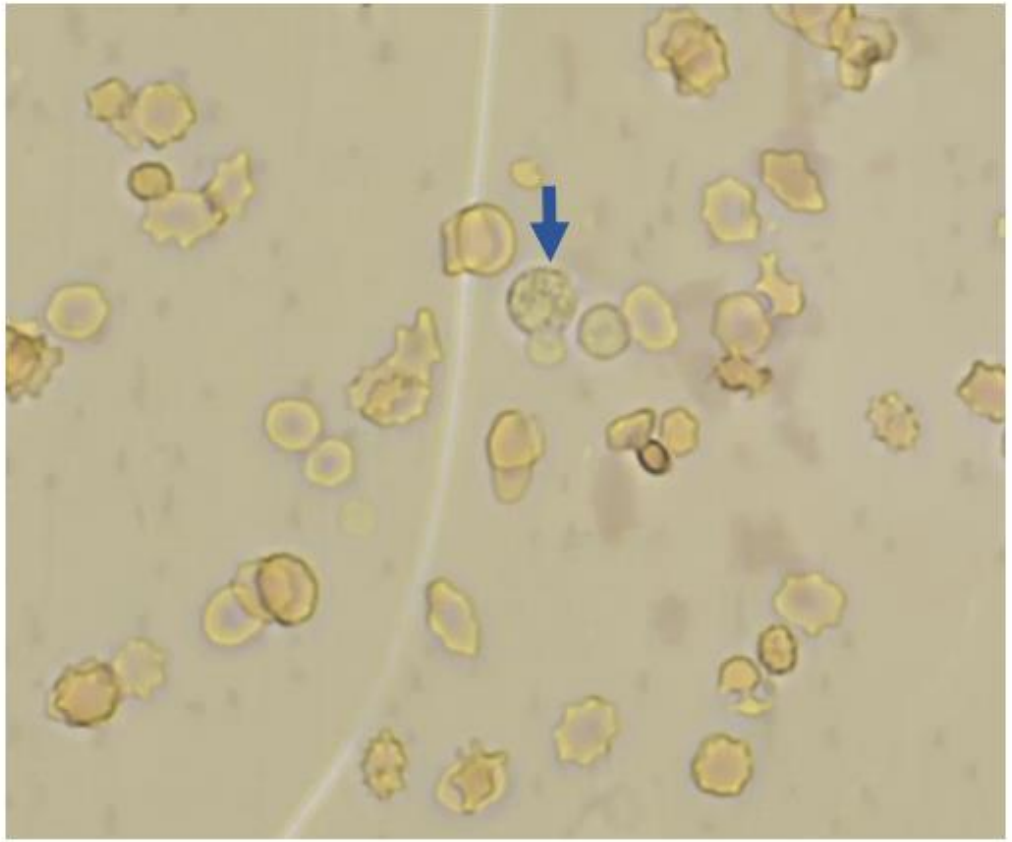
9 W >200 → นับ 4 W ใน 2 ด้าน

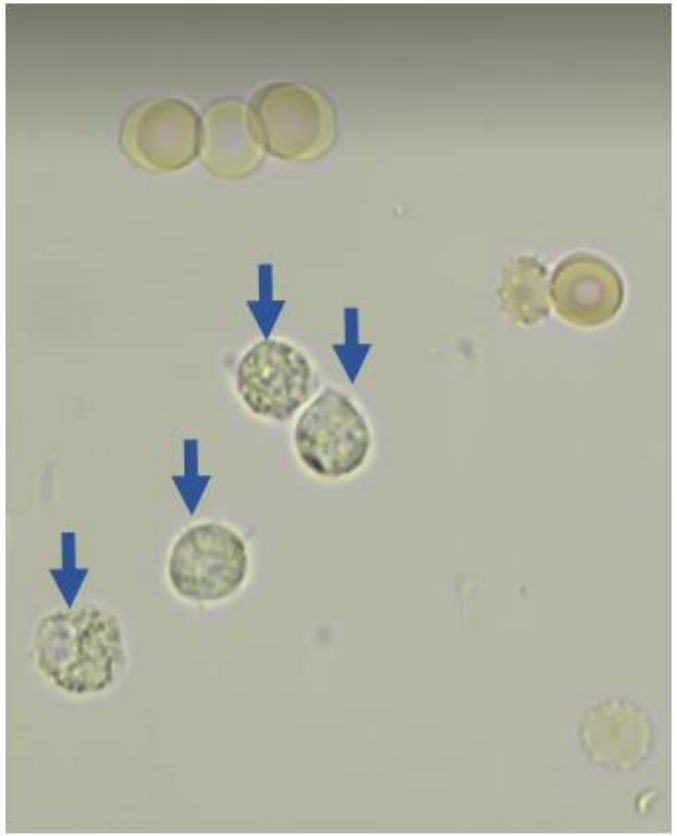
1 W >200 → นับ 5 R ใน 2 ด้าน

การนับจำนวนเซลล์

สามารถแยก WBC RBC จาก hemocytometer



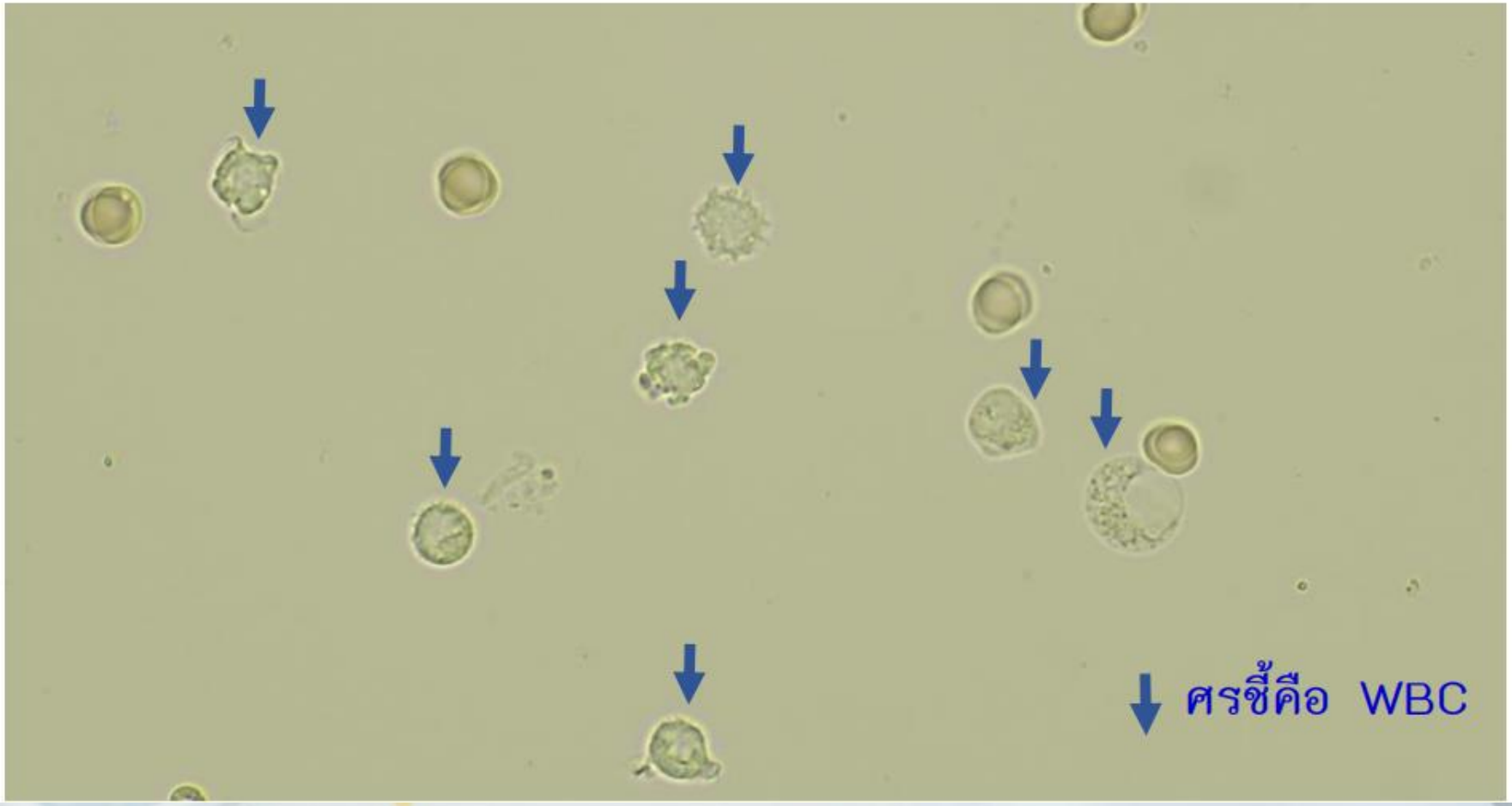




↓ ศรชี้คือ WBC

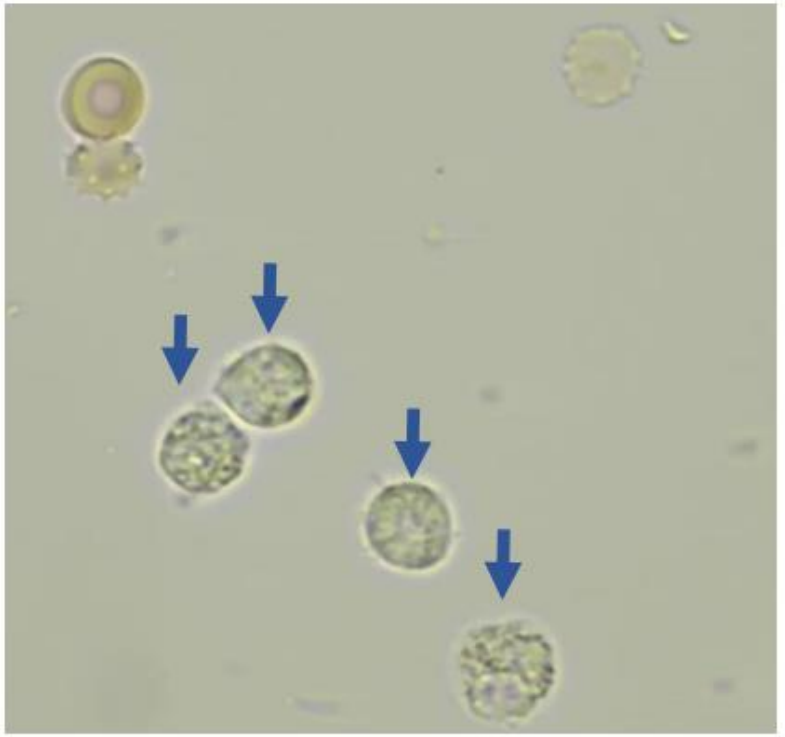
การนับจำนวนเซลล์

สามารถแยก granulocyte หรือ mononuclear cell ได้หรือไม่? จาก hemocytometer

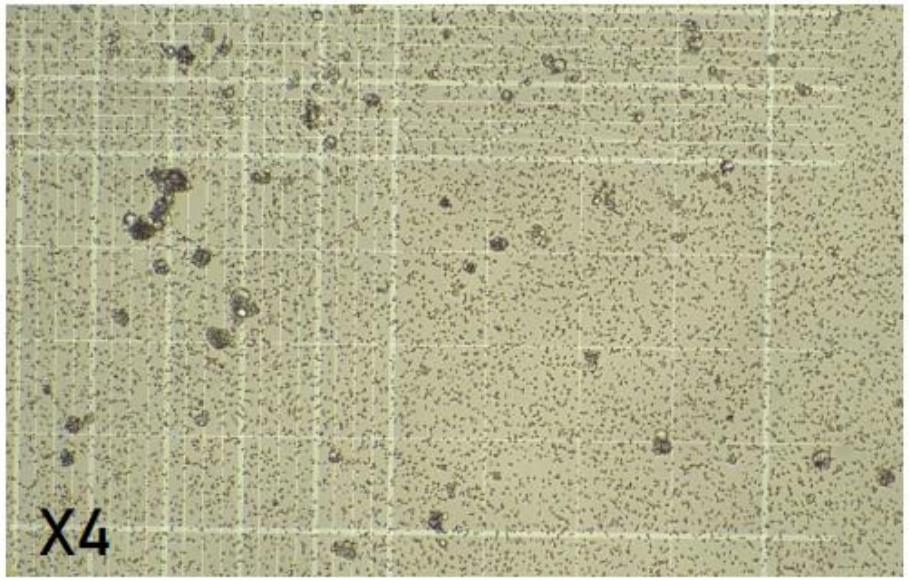


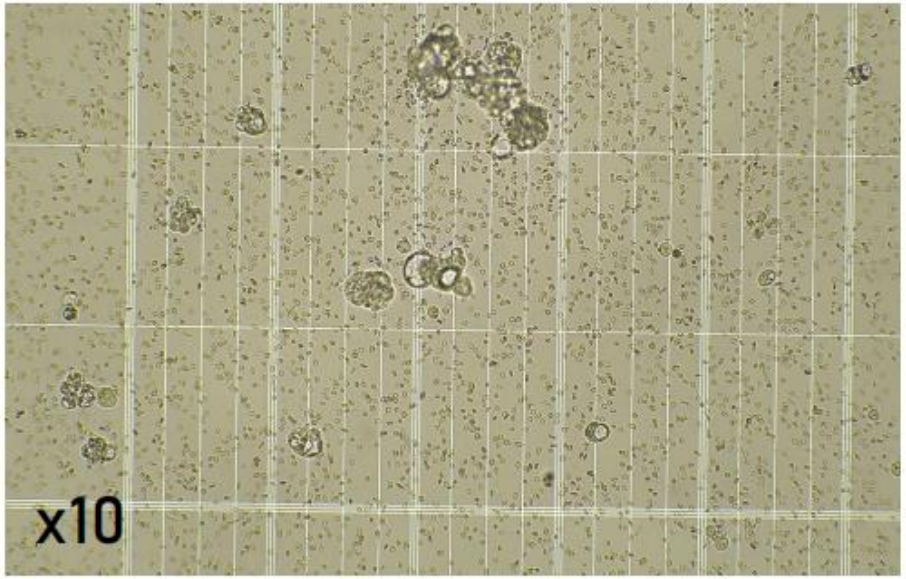
. ไม่แนะนำให้นับแยกชนิดจาก hemocytometer

. แนะนำให้ย้อมด้วยเสมอ



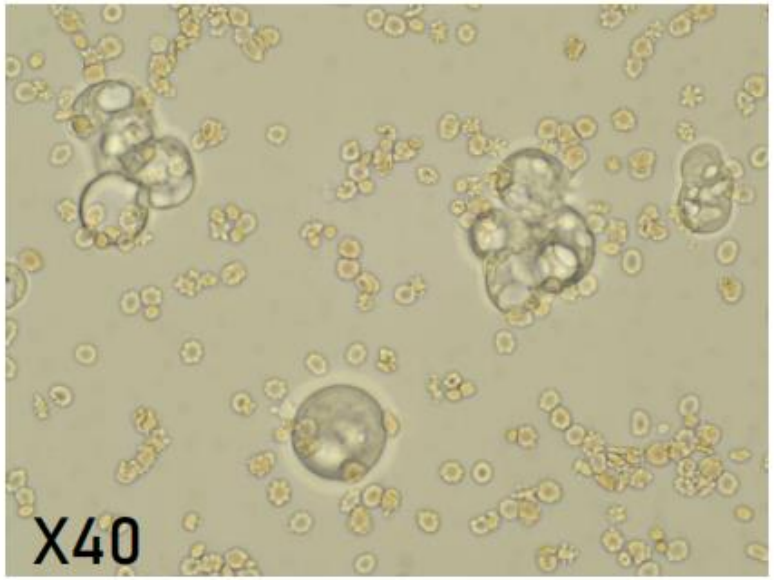
การนับจำนวนเซลล์

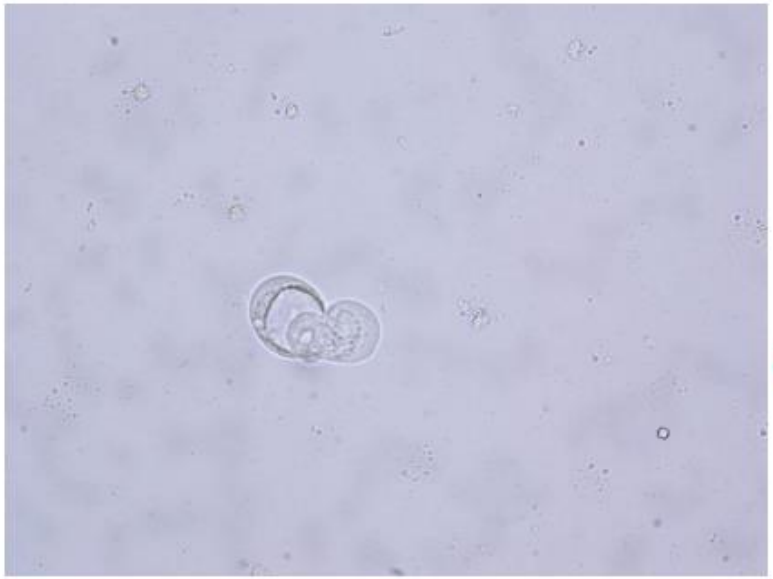




อาจพบ

- WBC
- Mesothelial cells
- Abnormal/malignant cells





Total nucleated cell count (TNC)

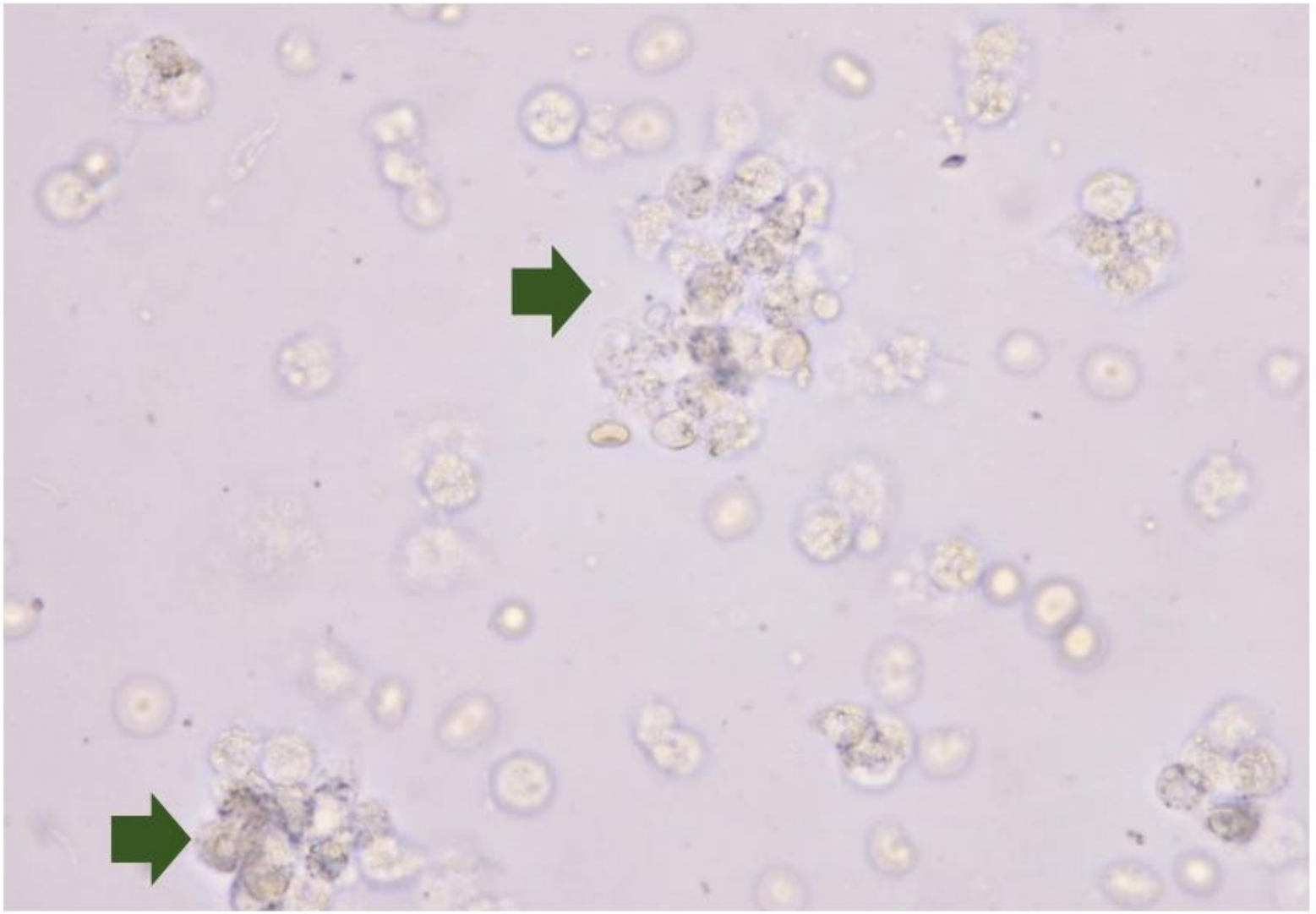
หากพบลักษณะดังภาพให้รายงานเพิ่มเติม

" Clumping of abnormal giant cells were found "

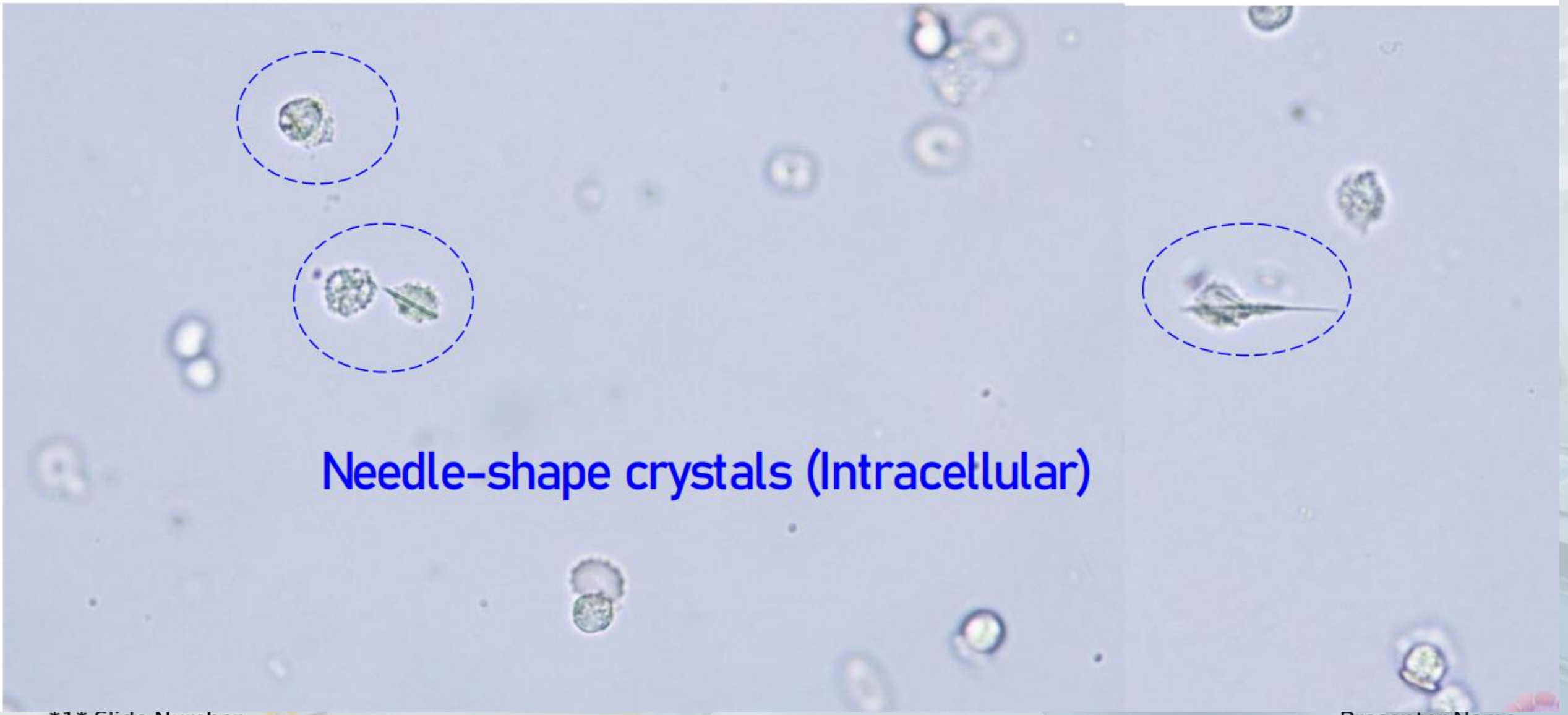
การนับจำนวนเซลล์

หากพบลักษณะดังภาพให้รายงานเพิ่มเติม

"Clumping of WBCs were found"



การนับจำนวนเซลล์



การนับจำนวนเซลล์

โอกาสของความผิดพลาด คลาดเคลื่อน

Mixing

คว่ำหลอดไปมา 10-15 ครั้ง

ผสมน้ำยากับตัวอย่าง 1-2 นาที

Pipetting

Dilution

กรณีใช้ automatic pippette

ควรใช้ตัวอย่าง อย่างน้อย 50 uL

เช่น sample 50 uL + NSS 450 uL

Dilution factor = 10

กรณีใช้ WBC pippette

ดูด sample ถึงขีด 0.5 ดูด NSS ถึงขีด 11

Dilution factor = 20

กรณีใช้ RBC pippette

ดูด sample ถึงขีด 1 ดูด NSS ถึงขีด 101

Dilution factor = 100

การคำนวณ

เซลล์ที่นับได้?
พื้นที่/ปริมาตร ที่ใช้นับ?
เจือจางหรือไม่ กี่เท่า ?

WBC
Other nucleated cells
RBC

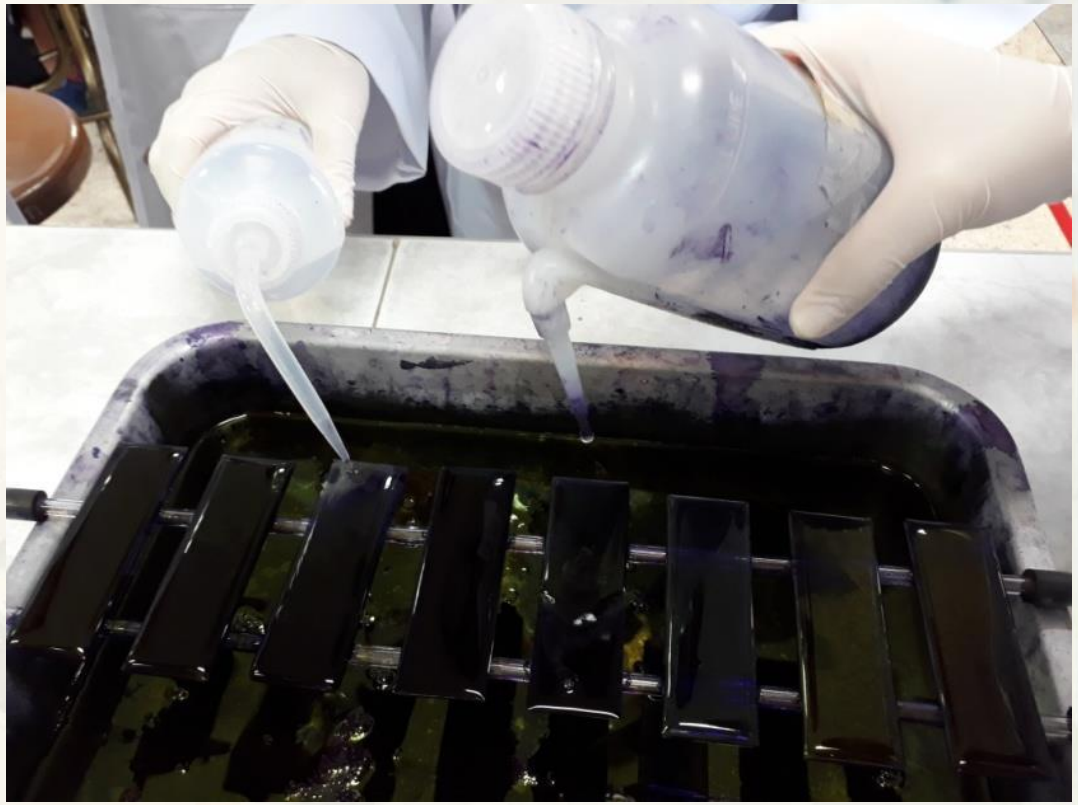
นับในช่อง W หรือ R นับกี่ช่อง
ปริมาตรแต่ละช่องเท่าไร

ดูดตัวอย่างสารน้ำฯเท่าไร
ดูด diluent เท่าไร

สูตร

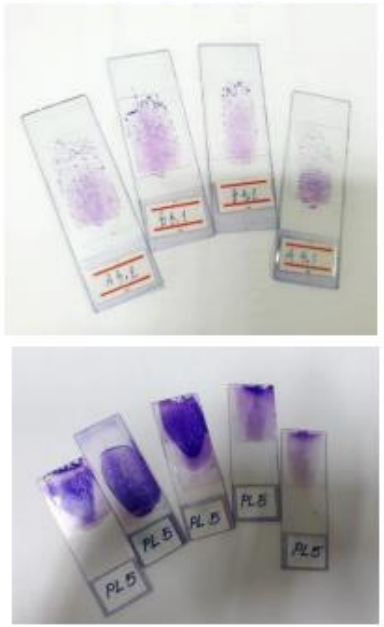
$$\text{จำนวนเซลล์/μL} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ x dilution factor}}{\text{จำนวนช่องที่นับ x ปริมาตรในช่องที่นับ 1 ช่อง}}$$

การเตรียมและการย้อมสเมียร์



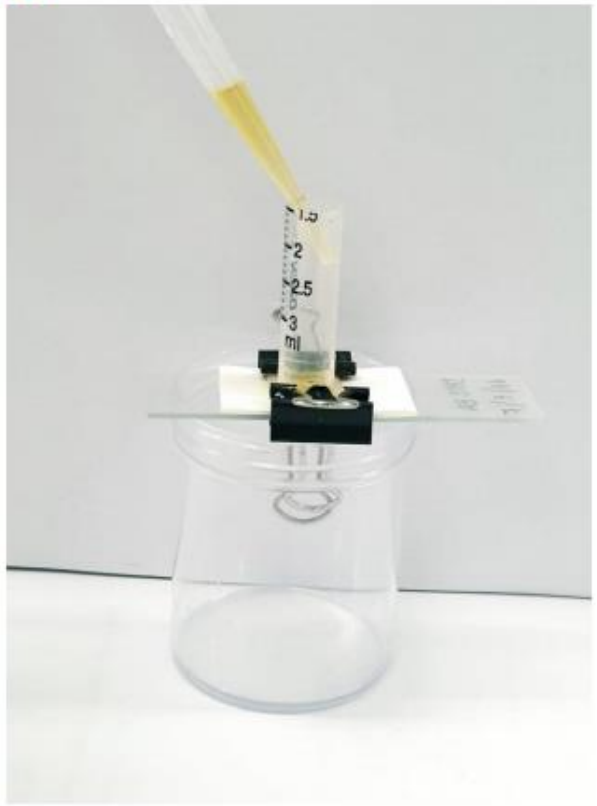
การเตรียมสเมียร์

Direct smear



ใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณเซลล์สูง เช่น Synovial fluid

Simple sedimentation

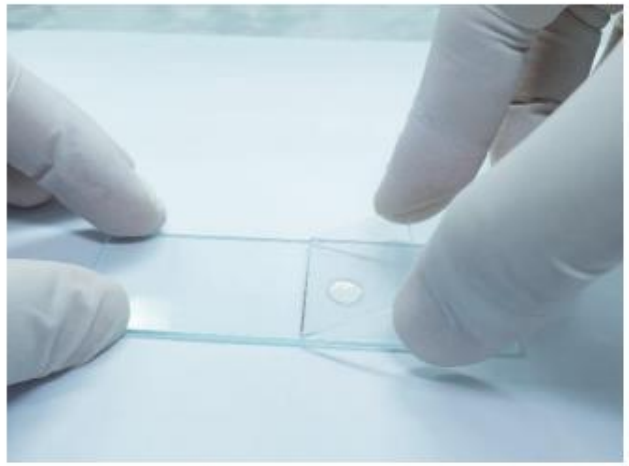


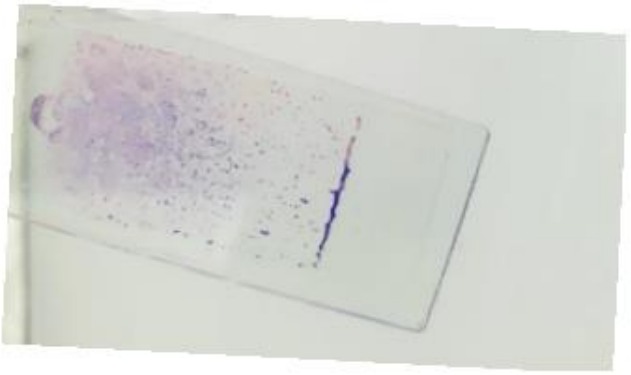
ใช้กับตัวอย่างที่มีเซลล์น้อย

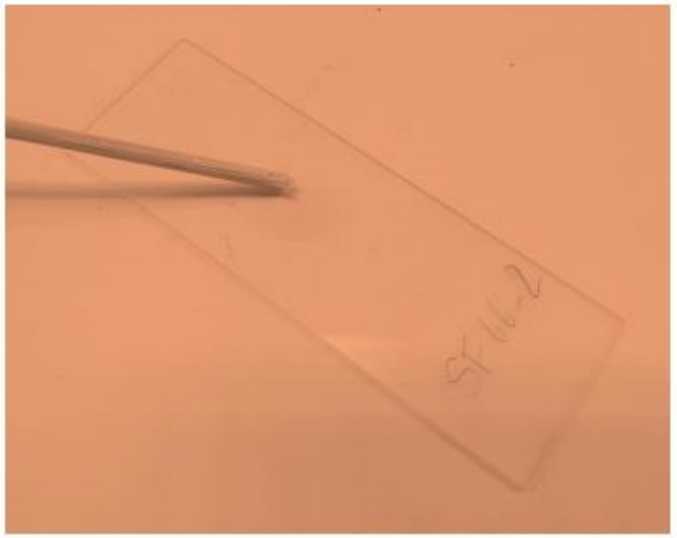
Cytocentrifugation

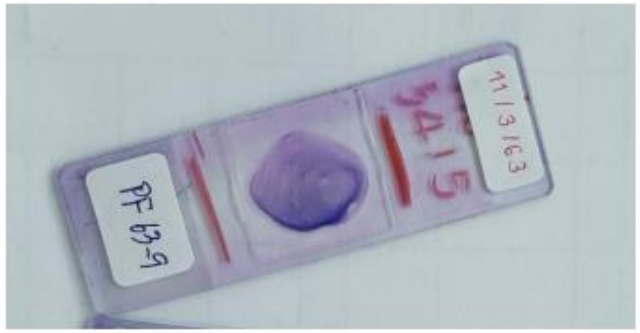
ใช้กับตัวอย่างที่มีเซลล์น้อย ต้องการดูเซลล์ให้ชัดเจน

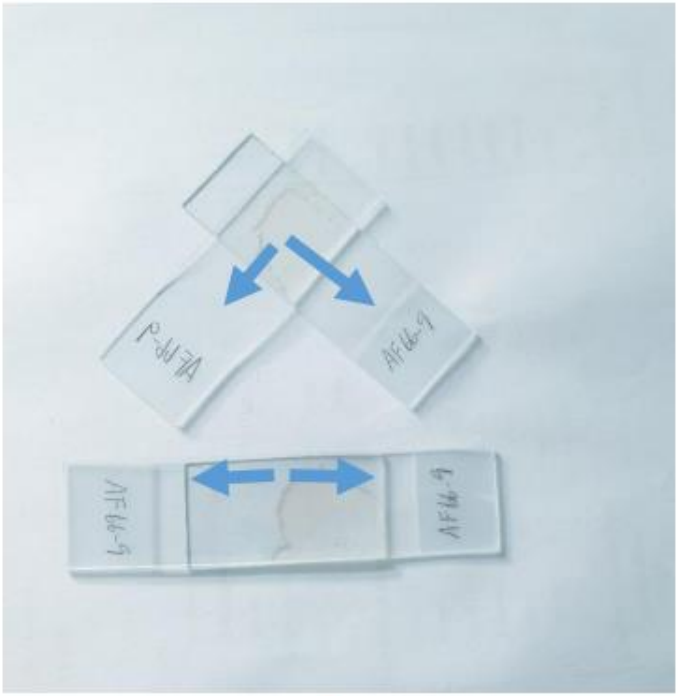
การเตรียมสเมียร์ Direct smear

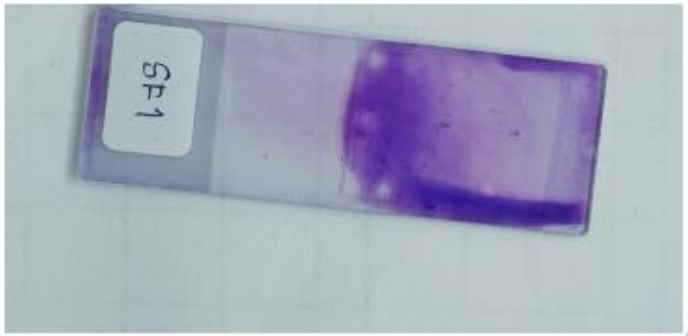












การเตรียมสเมียร์ Simple sedimentation

Syringe ขนาด 3 CC.

Clip หนีบกระดาษ

กระดาษกรอง No.2 (4 ชั้น)

Glass slide

กระป๋องพลาสติก

สามารถใช้ได้

Filter Cards

ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 30-60 นาที

รอให้สารน้ำถูกดูดออกจนหมด

หรือดูดออกด้วย pasteur pipette

ย้อมด้วยสี Wright's Giemsa

(พัฒนาโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์มณเฑียร พันธุเมธากุล)

การเตรียมสเมียร์ Simple sedimentation

ข้อควรระวัง

วงด้านหลังสเมียร์

การเตรียมสเมียร์ Cytocentrifugation

ไม่เหมาะกับ Synovial fluid ที่หนืด

Cellular distortion

- Cytoplasmic vacuoles
- Nuclear clefting
- Prominent nucleoli
- Clumping that resembles malignancy

1,000 rpm

10 นาที

การเตรียมสเมียร์

ปริมาตรที่ใช้ในการทำ smear

(พัฒนาแนวทางโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์มณเฑียร พันธุเมธากุล)

WBC count (cells/µl)	Body fluid ที่ใช้ (ml)
5-100	1.0
101-1,000	0.75
1,001 – 5,000	0.5
> 5,000	Direct smear

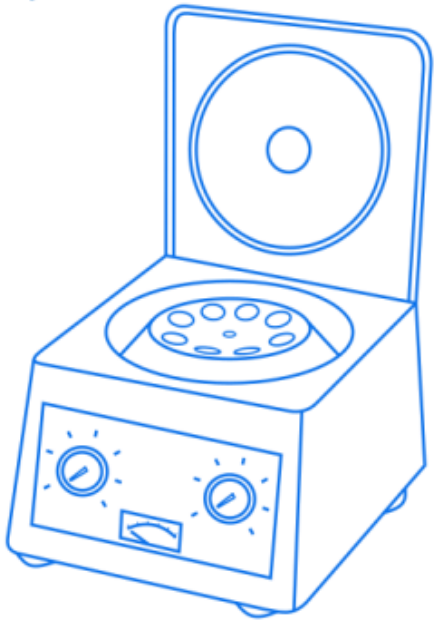
ปริมาตรที่ใช้ในการทำ smear โดย cytocentrifuge

Nucleated count (cells/µl)	Body fluid ที่ใช้
0 -100	10 หยด
100-500	5-6 หยด
500 – 1,000	3-4 หยด
> 1,000	2 หยด

From : Fundamentals of urine and body fluid analysis, 4rthEd. 2018

การเตรียมสเมียร์

การนำตัวอย่างไปปั่นก่อนการนำมาเตรียมสเมียร์ เพื่อเพิ่มโอกาสการได้เซลล์



https://www.labicons.net/equipments/centrifuges/centrifuges/doc/centrifuges-open.html

1,000-1,500 rpm

2-3 นาที / 3-5 นาที

ดูดส่วน supernatant ออกหรือเทออก

ผสมให้เข้ากัน นำไปเตรียมสเมียร์ต่อ

ข้อควรระวัง !!!!

กรณี CSF

อนงค์ เพียรกิจกรรม

Cytodiagnosis of cerebrospinal fluid effusion and lymph node imprint

0.75X6.5 cm.

0.5-1.0 mL CSF

ปั่น 500-1000 g

นาน 2-3 นาที

ค่ำหลอด

ไม้จิ้มฟัน ทำสเมียร์วงรี

Fix โดยใช้ความร้อนแห้ง ไม่ร้อนมาก

การย้อมสีสเมียร์

Wright Giemsa stain

ย้อมเช่นเดียวกับการย้อมสเมียร์เลือด

Wright-Giemsa Cytology of Body Fluids

Criteria for Identification of Malignant Cells

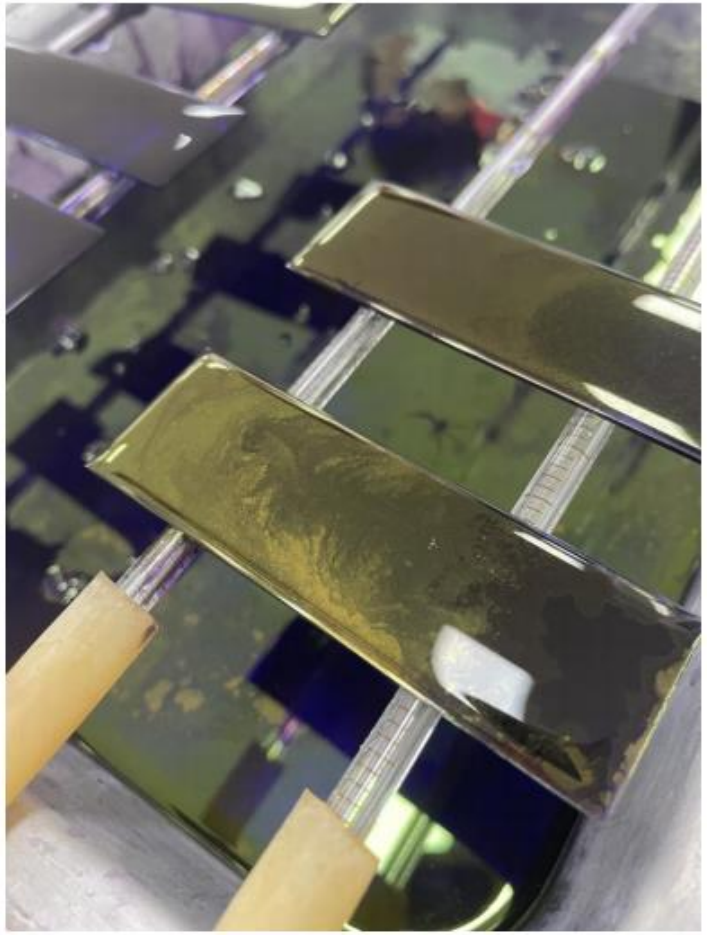
P. Joanne Cornbleet, MD, PhD

JANUARY 1998 VOLUME 29, NUMBER 1 LABORATORY MEDICINE

From Stanford (Calif) University Medical Center, Clinical Laboratories and Department of Pathology.

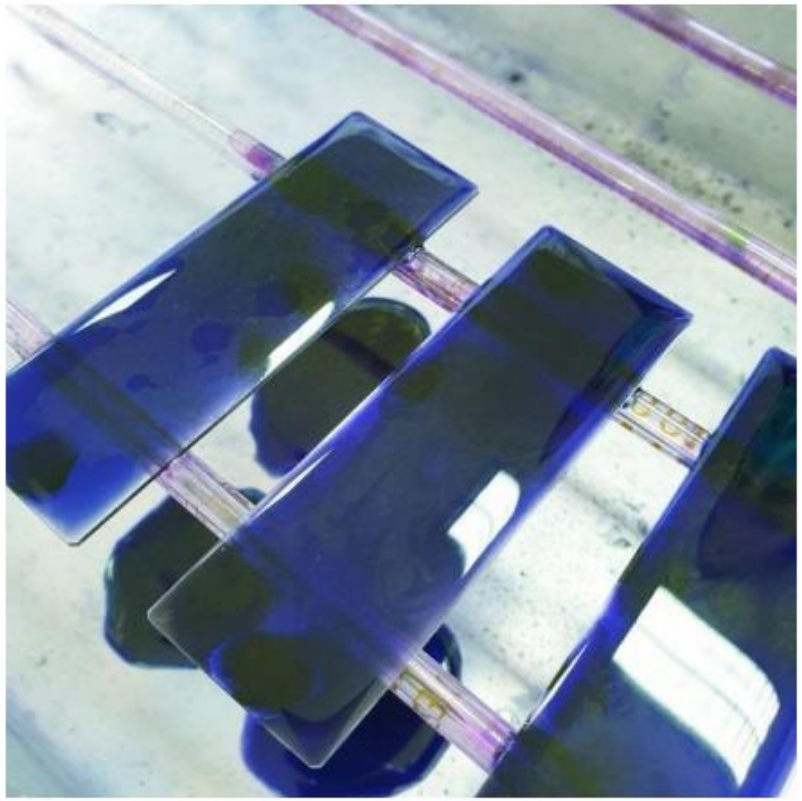
Reprint requests to Dr Cornbleet, Stanford Health Services, Clinical Laboratories, Room H1524, Rt 6, 300 Pasteur Dr, Stanford, CA 94305-5272.

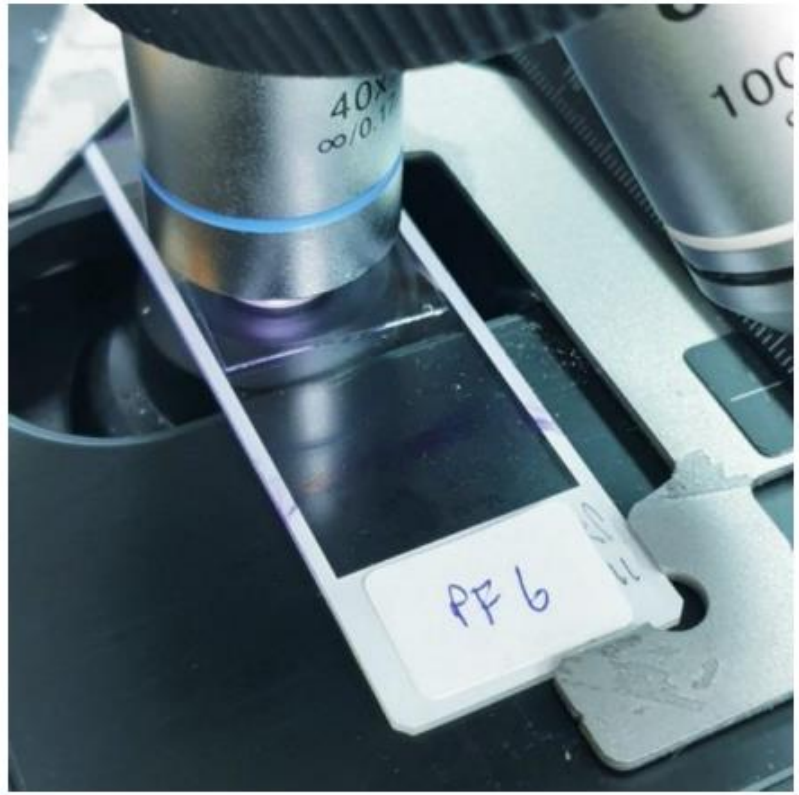
การย้อมสีสเมียร์



ย้อมแบบสเมียร์เลือด สามารถย้อมด้วยเครื่องย้อมอัตโนมัติได้

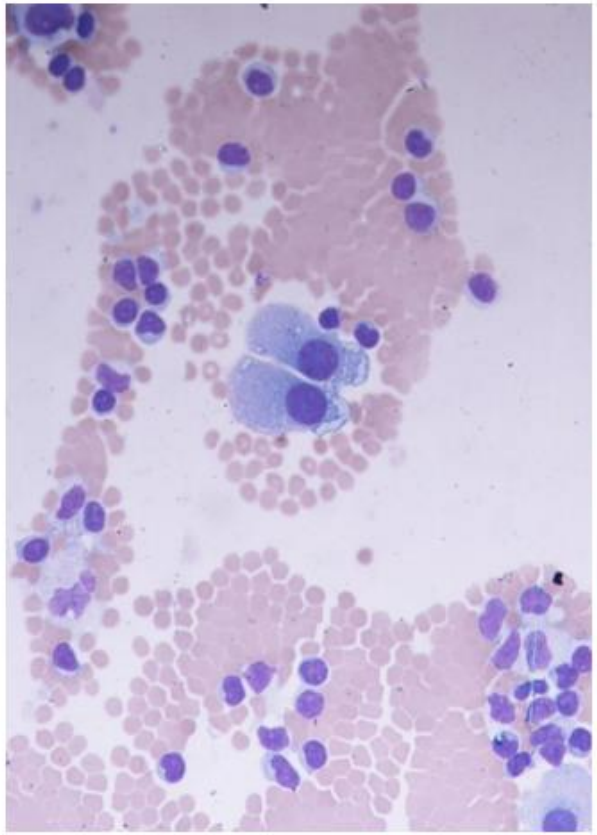
ควรประเมินคุณภาพการย้อมทุกครั้งก่อนการตรวจสเมียร์



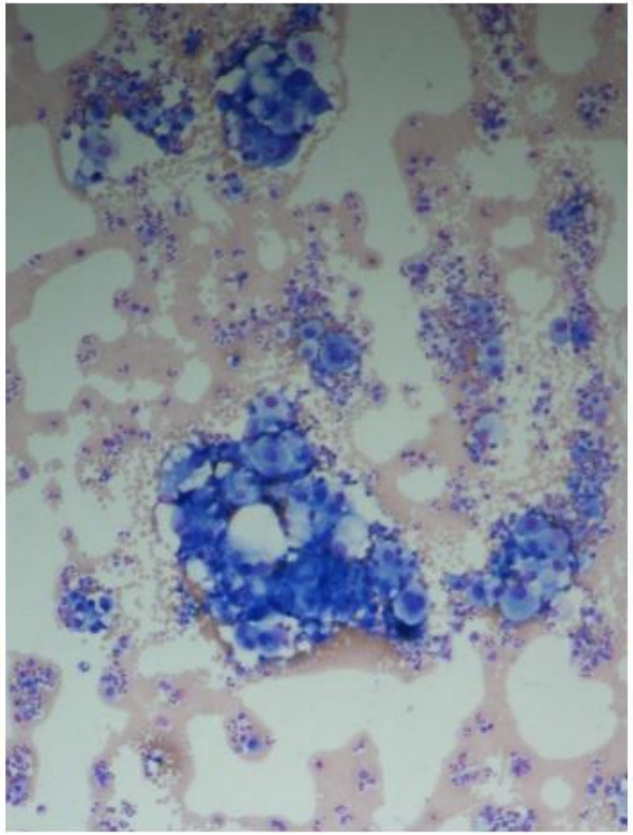


การเตรียมสเมียร์

ได้สเมียร์แบบ monolayer

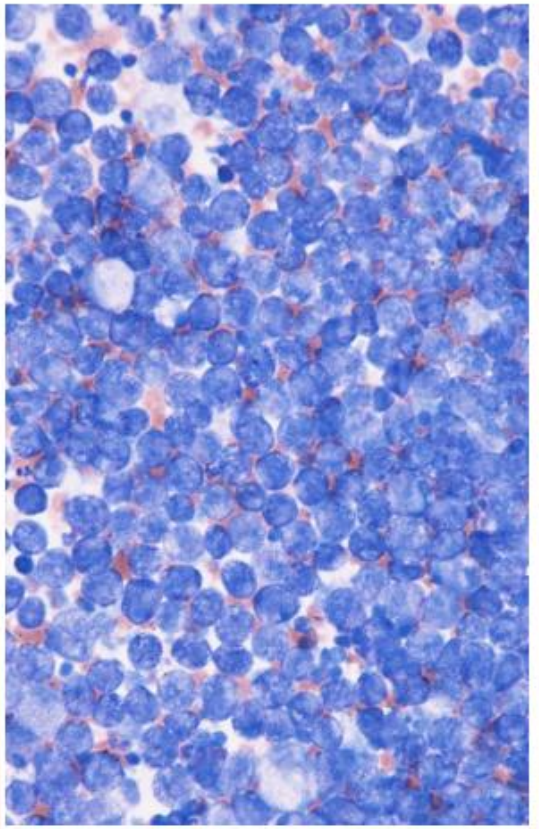


Objective lens x40

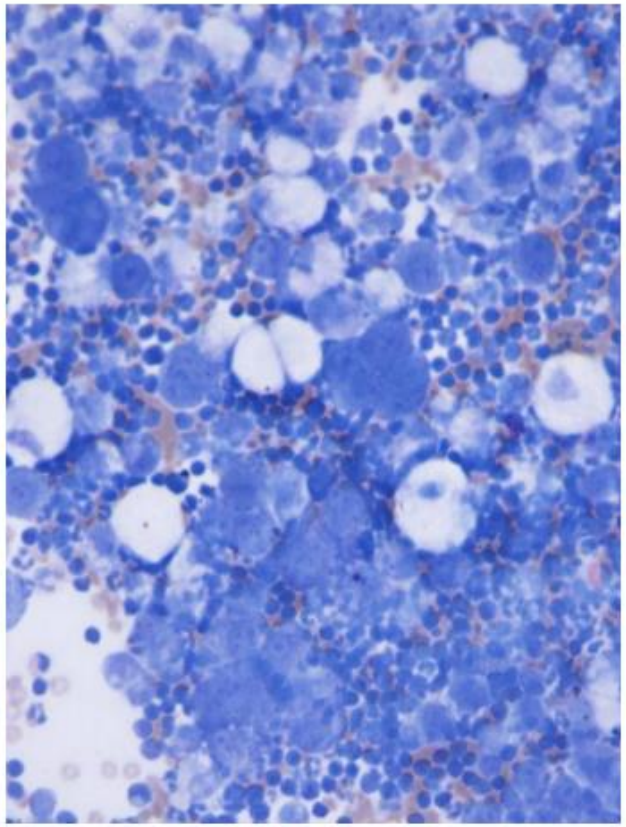


Objective lens x40

สเมียร์บริเวณที่หนาเกินไป



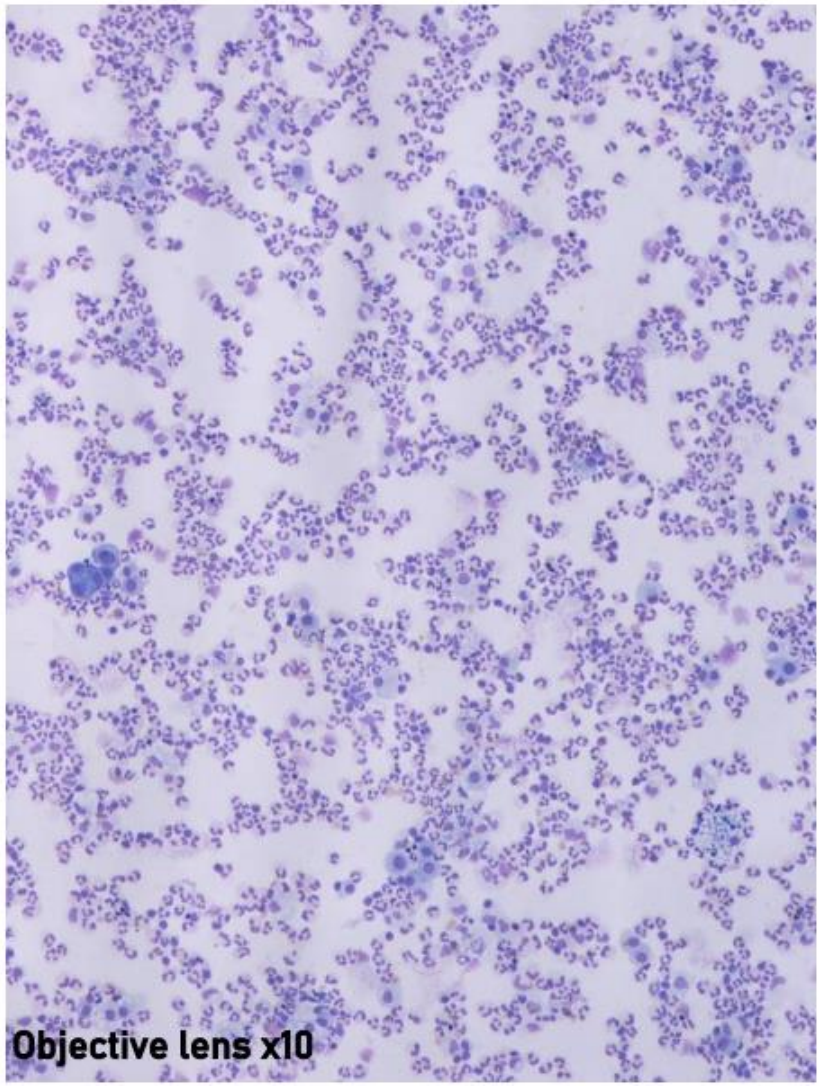
Objective lens x40

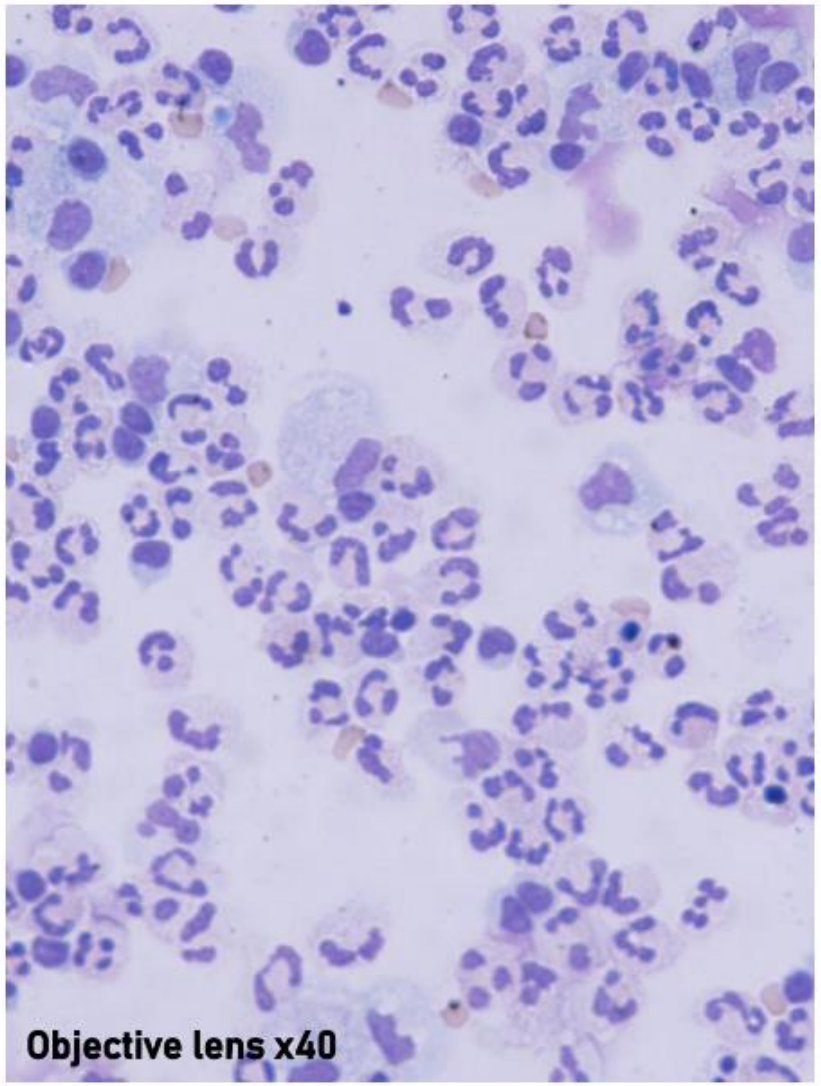


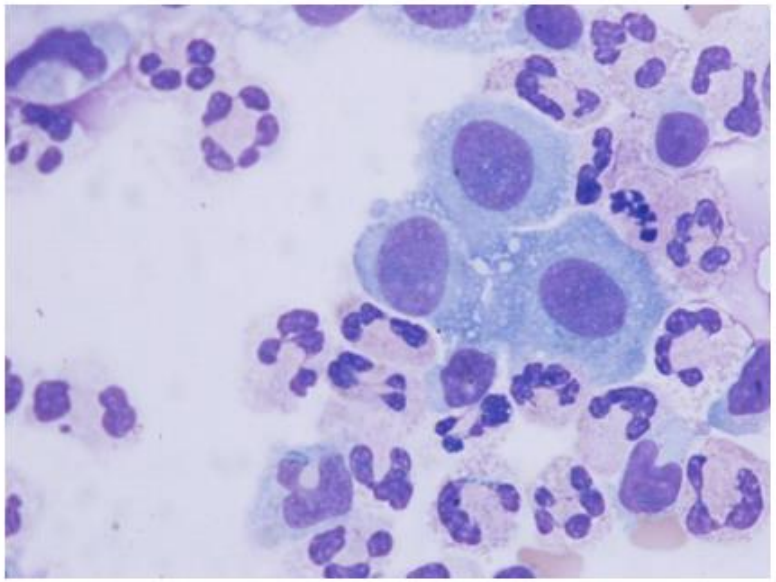
Objective lens x40

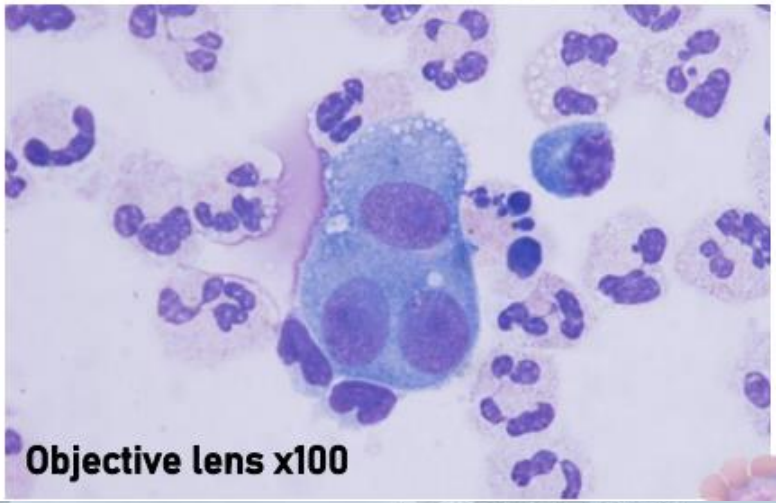
การเตรียมสเมียร์

ได้สเมียร์แบบ monolayer สังเกตที่กำลังขยายต่างๆ



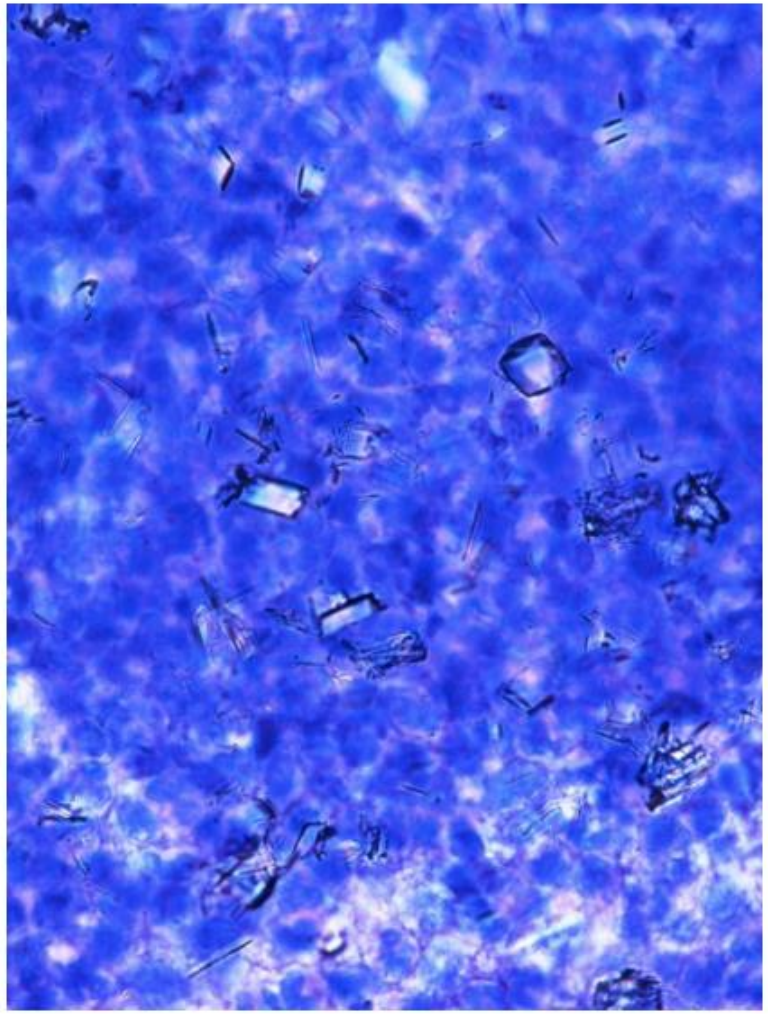




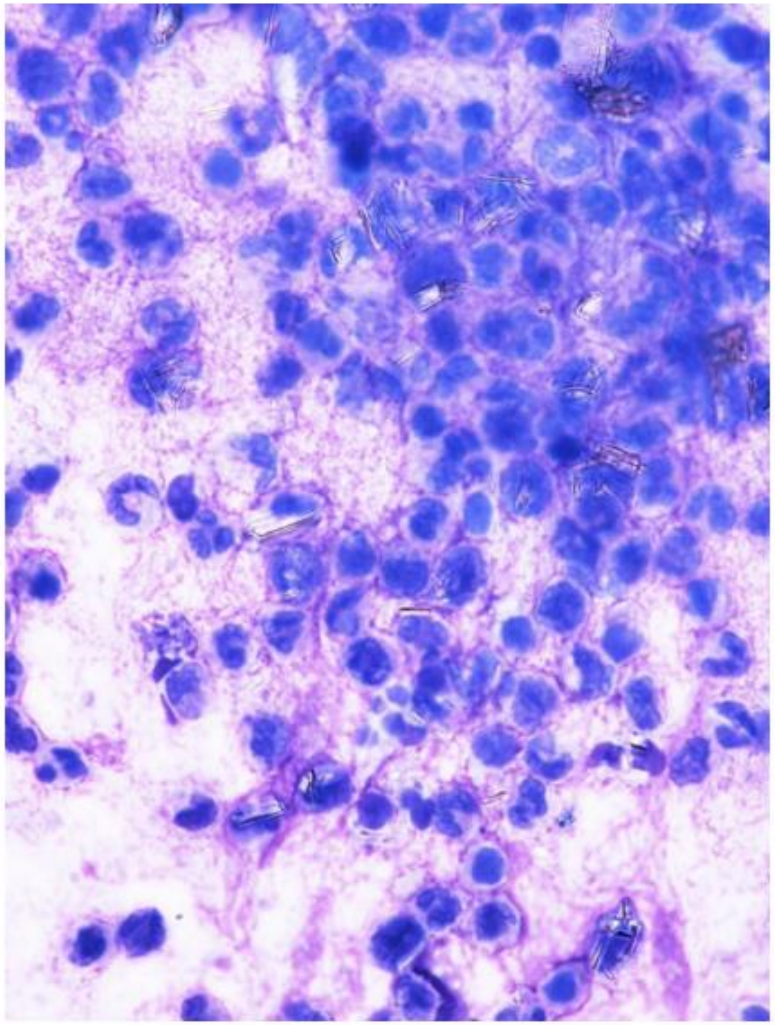


การเตรียมสเมียร์

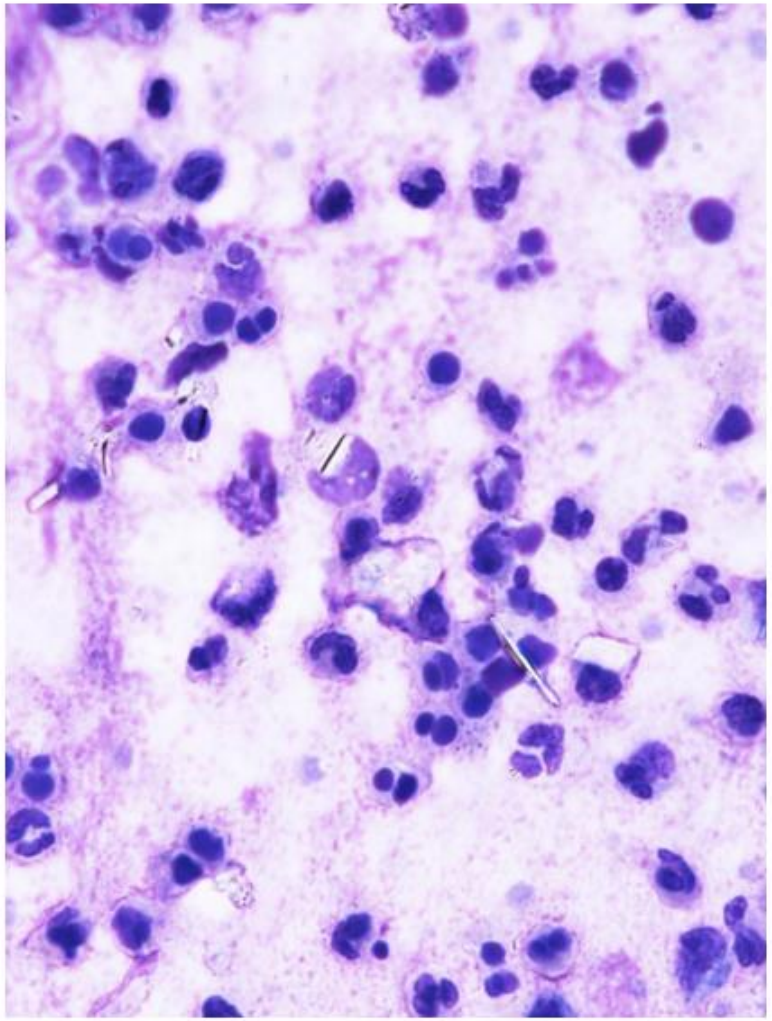
ตัวอย่างน้ำไขข้อเตรียมแบบ squash



Objective lens x10



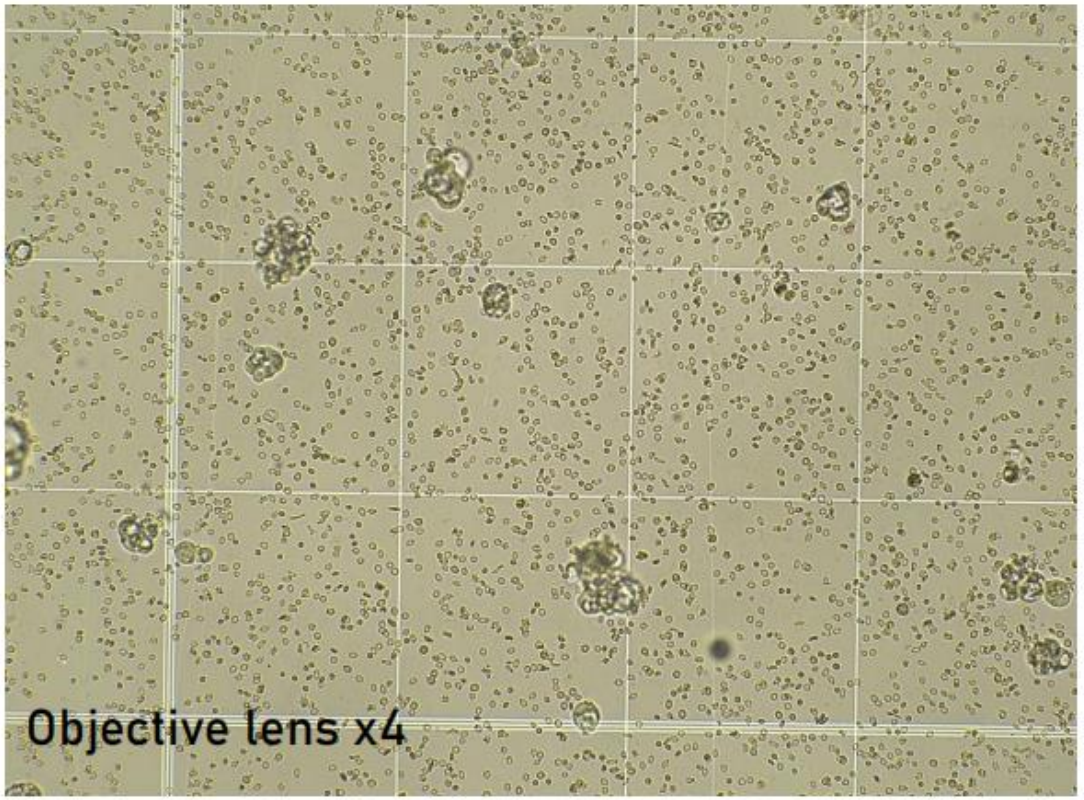
Objective lens x100



Objective lens x100

การนับจำนวนเซลล์และการเตรียมสเมียร์

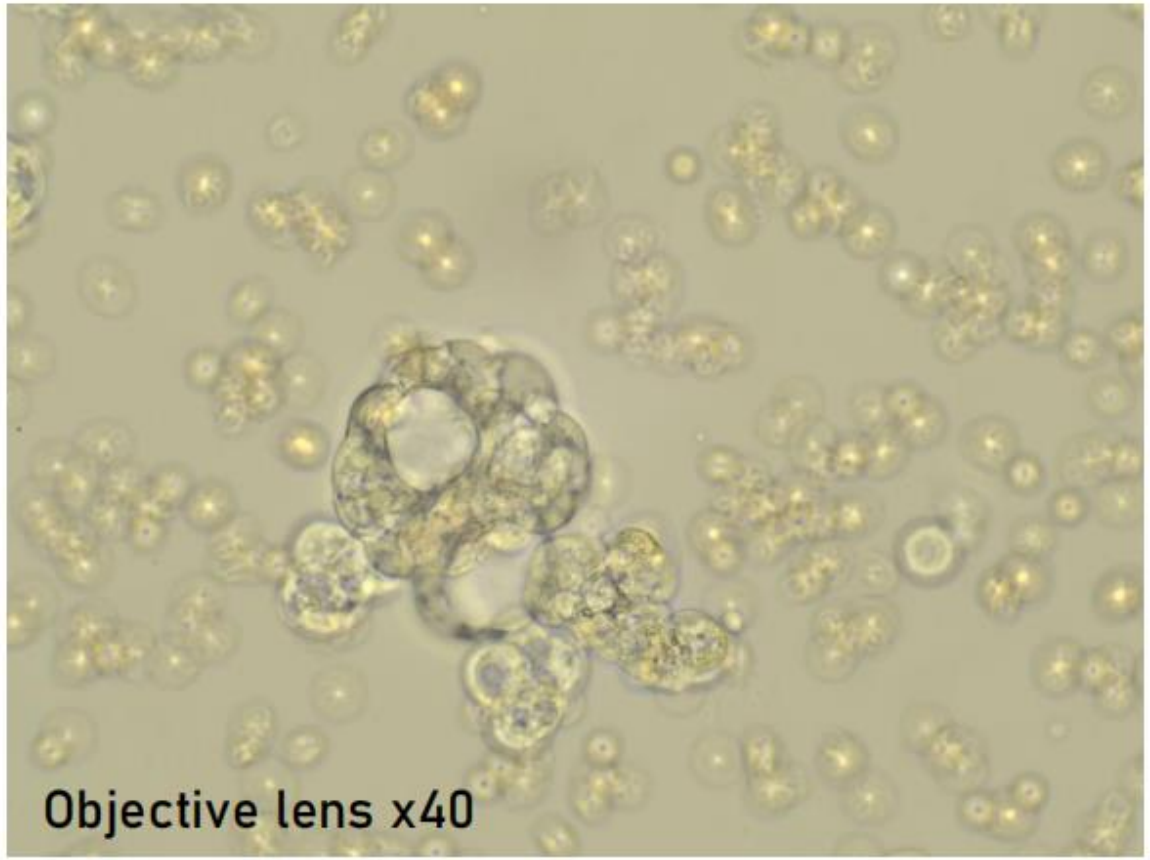
ตัวอย่าง

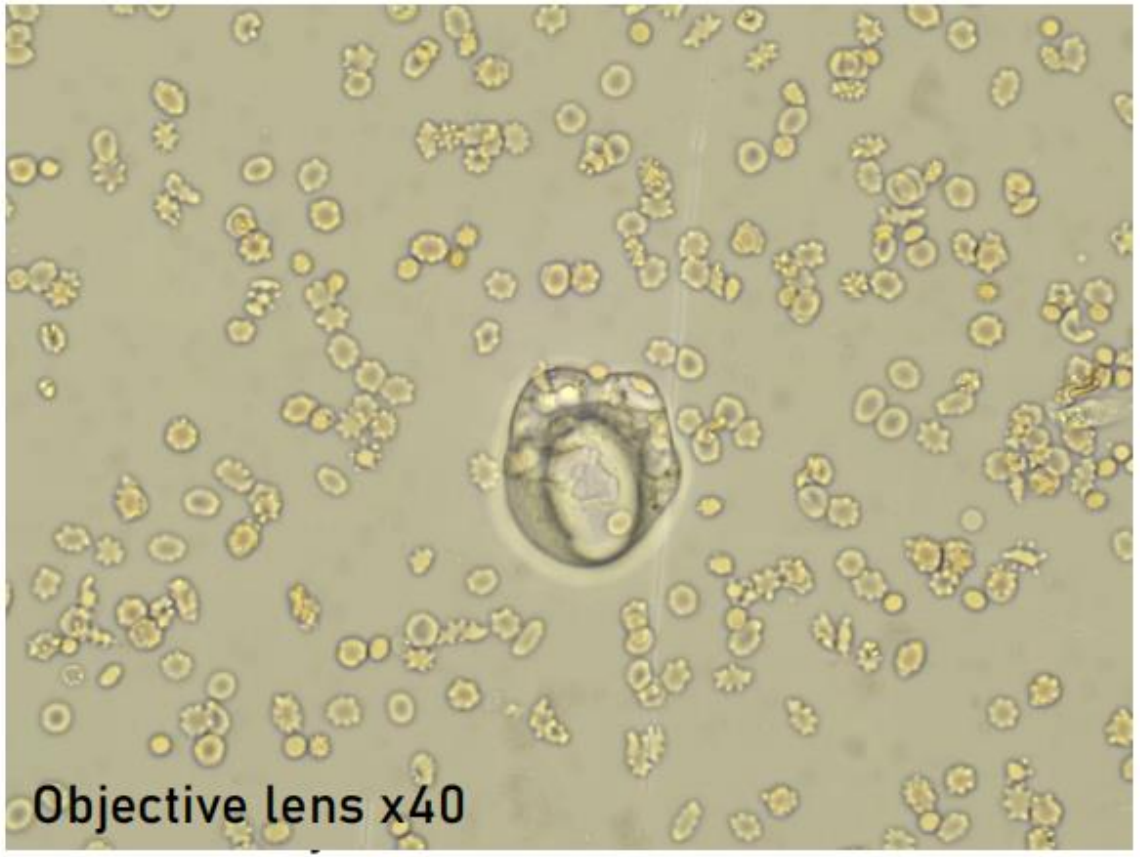


Yelow / Blood-tinged

หยดลงใน chamber พบลักษณะดังภาพ

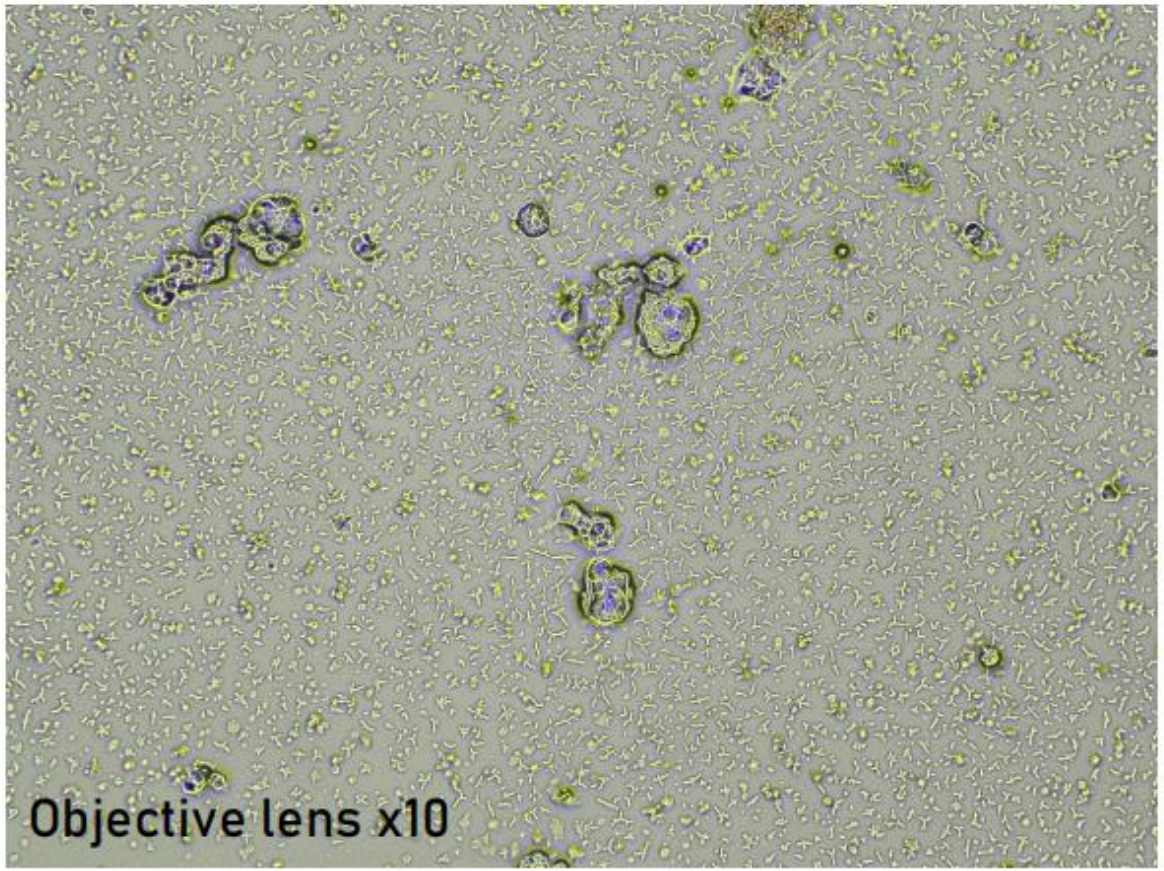
การนับจำนวนเซลล์และการเตรียมสเมียร์

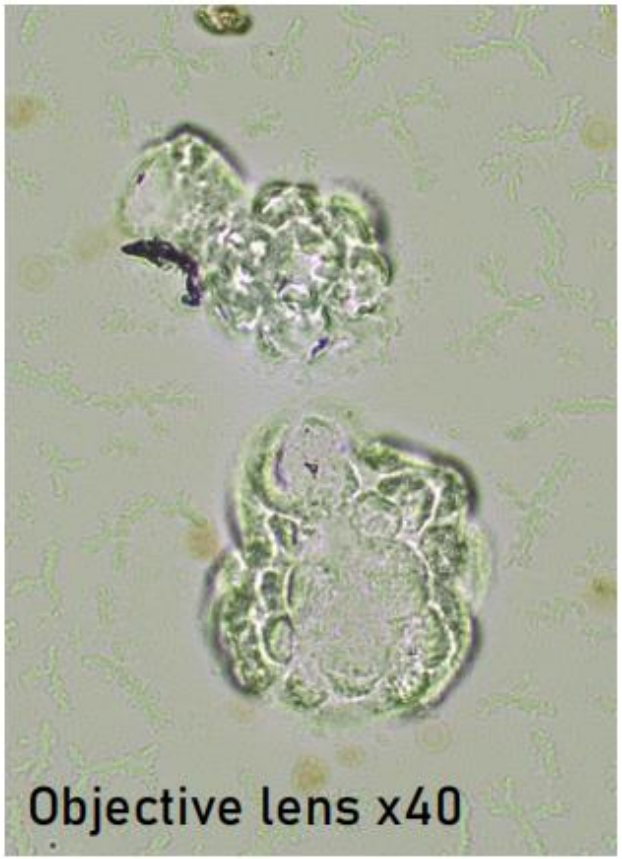




หยดลงใน chamber พบลักษณะดังภาพ

การนับจำนวนเซลล์และการเตรียมสเมียร์

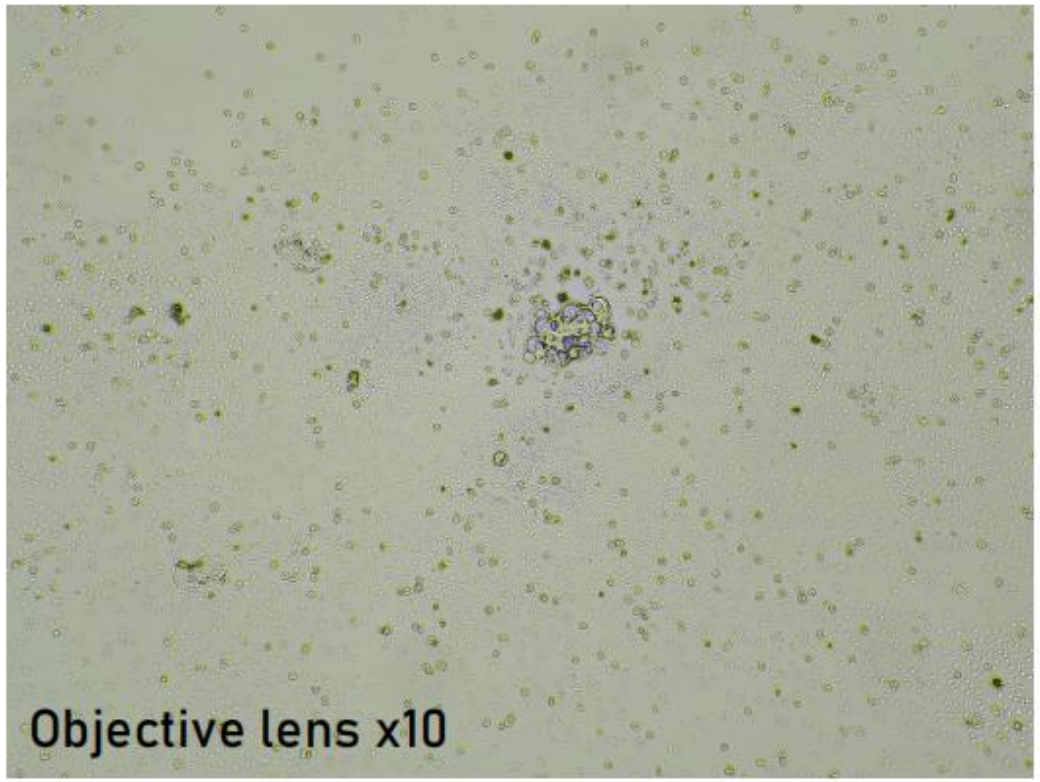


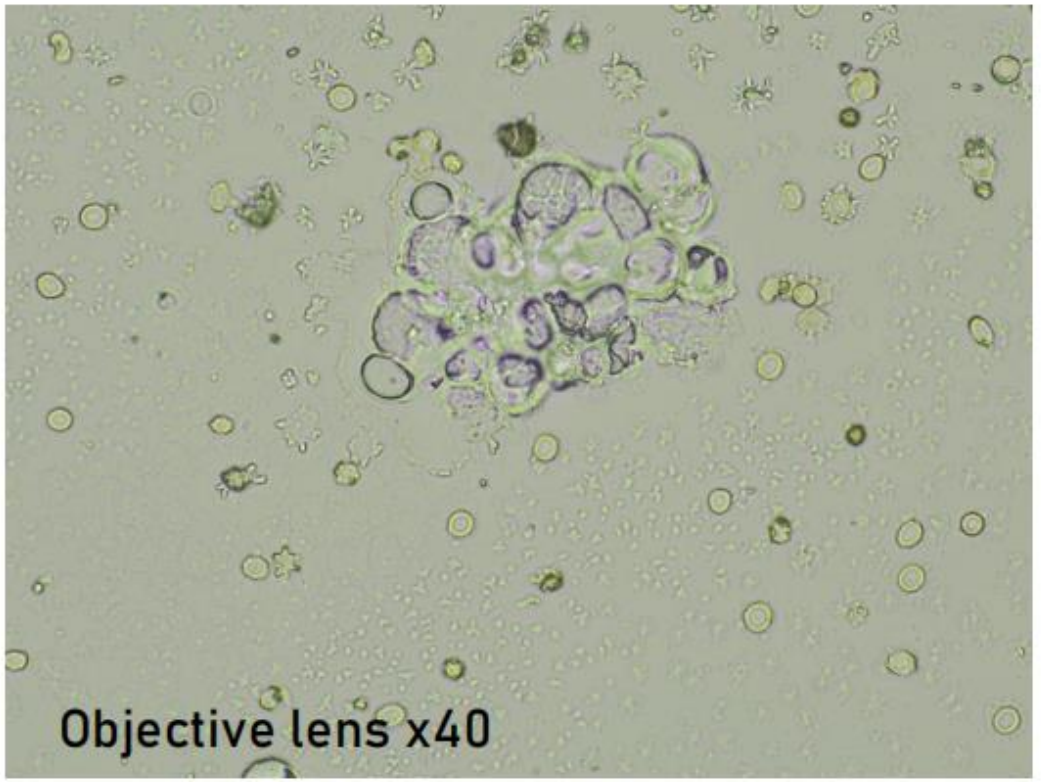


เตรียมสเมียร์แบบทำสเมียร์เป็นวงกลม (Direct smear)

แล้วนำมาส่องดู ก่อนย้อม

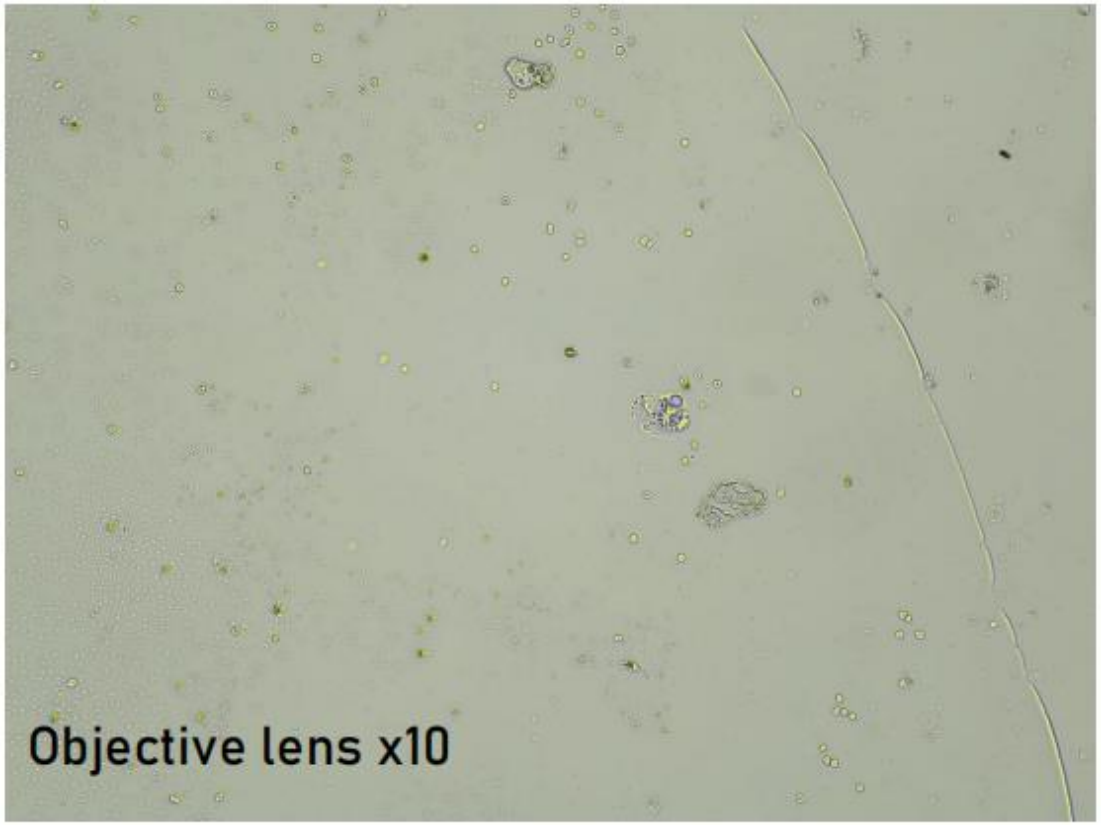
การนับจำนวนเซลล์และการเตรียมสเมียร์

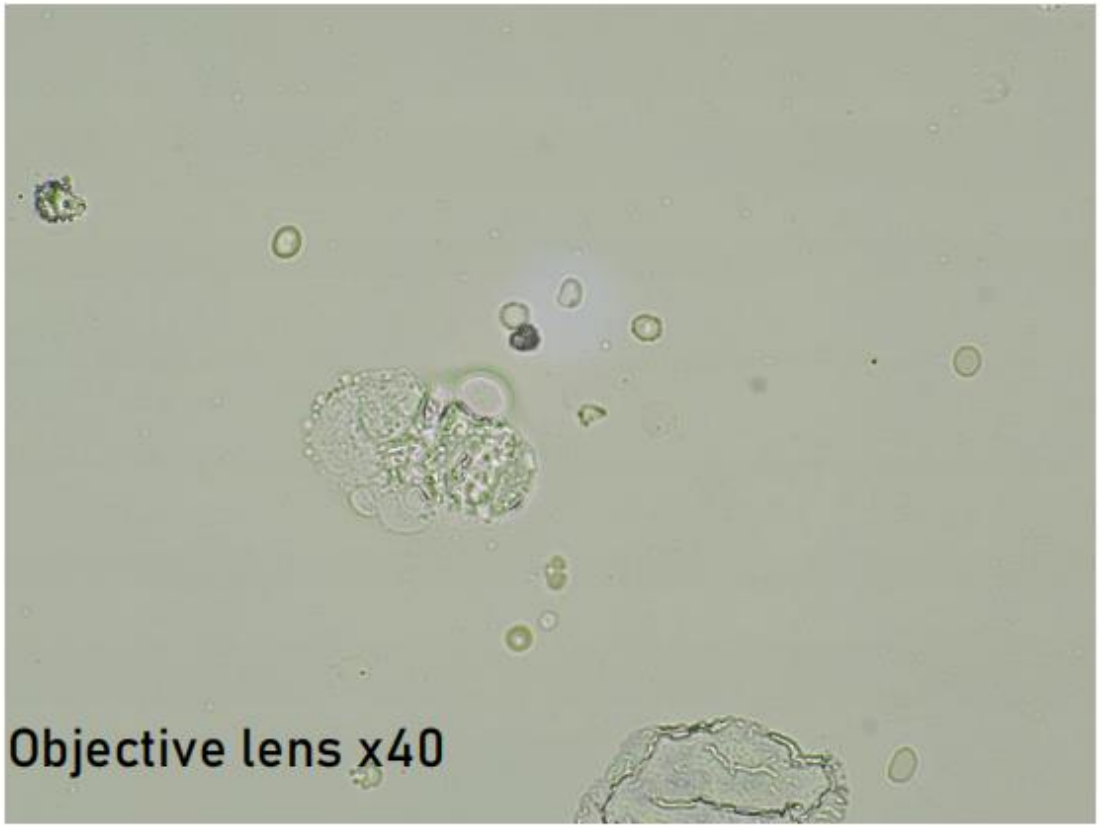




เตรียมสเมียร์แบบไถสเมียร์เลือด แล้วนำมาส่องดู ก่อนย้อม

การนับจำนวนเซลล์และการเตรียมสเมียร์

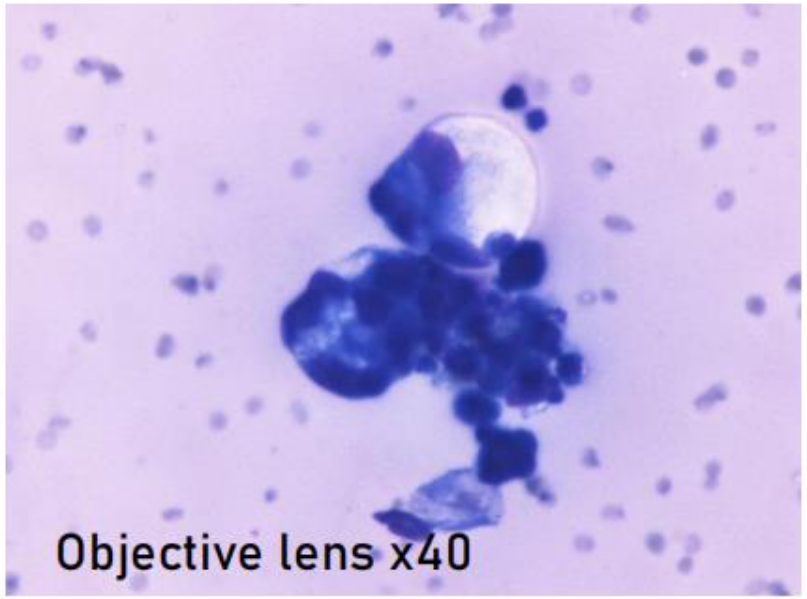


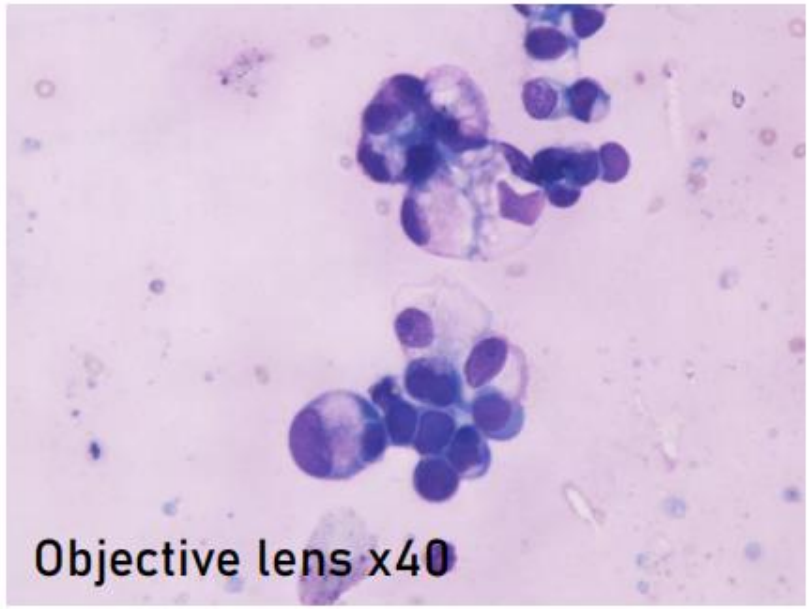


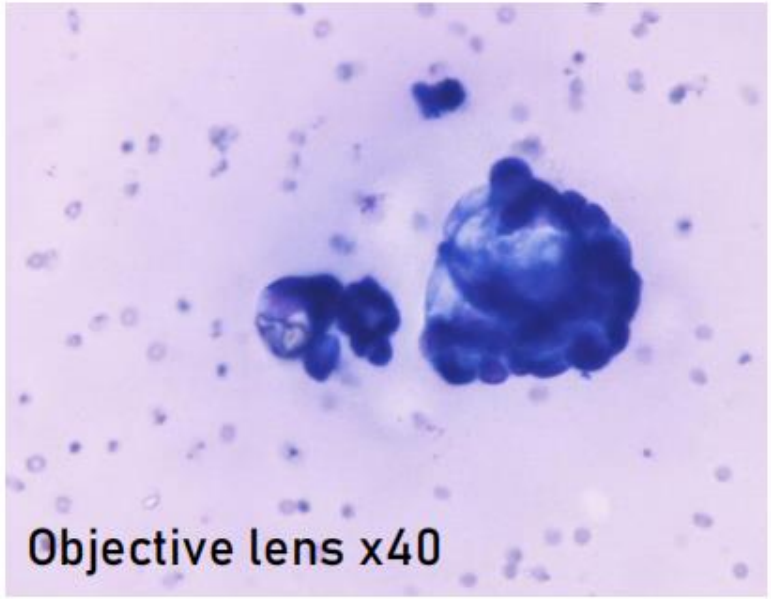
เตรียมสเมียร์แบบ squash

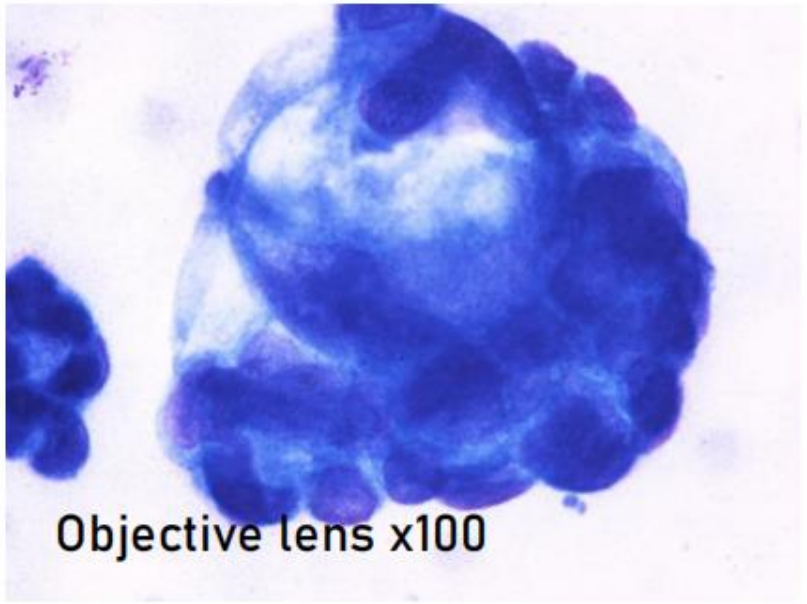
แล้วนำมาส่องดู ก่อนย้อม

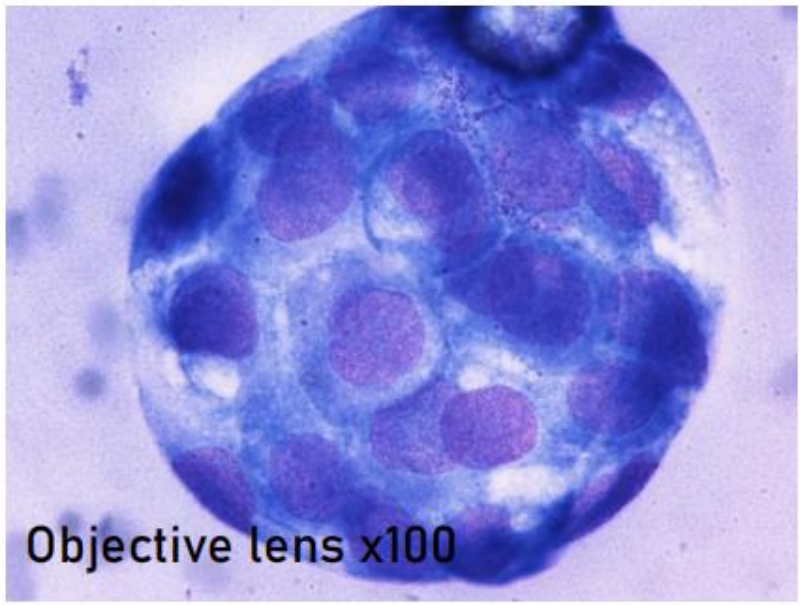
เตรียมแบบ direct smear เป็นวงกลม

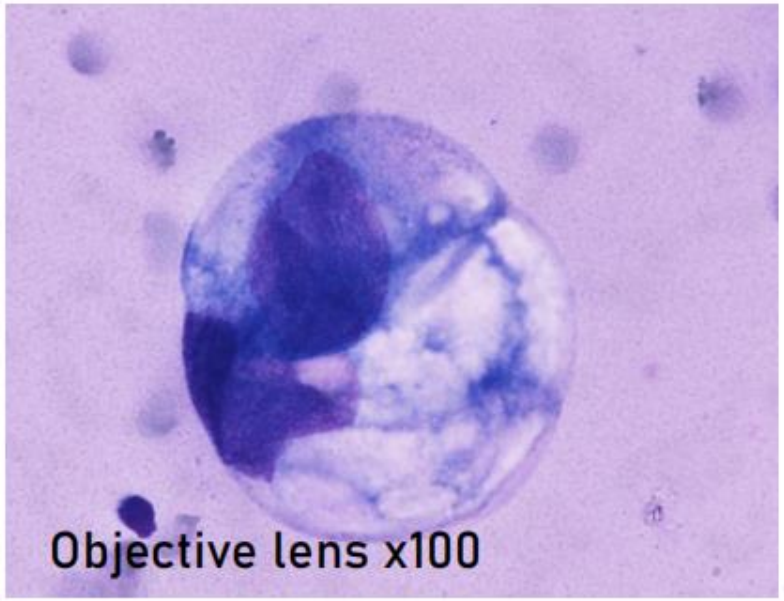




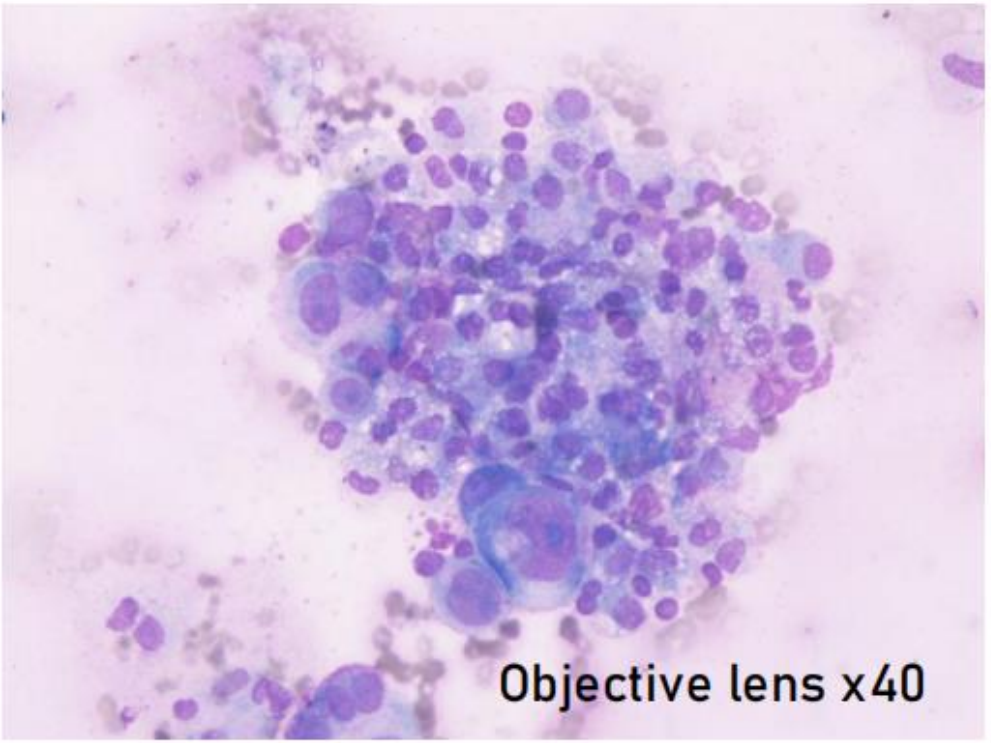


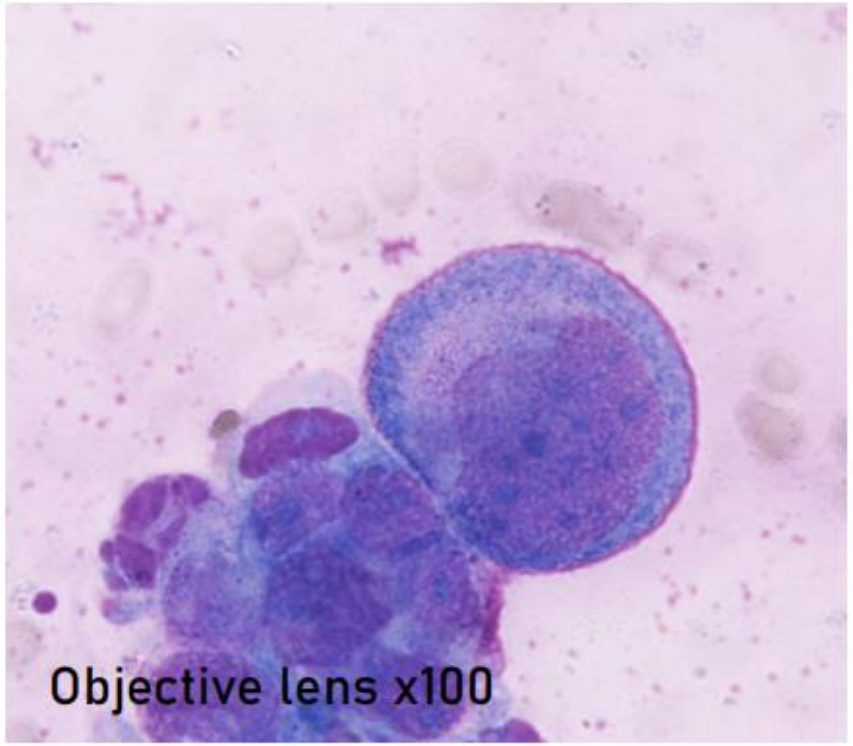


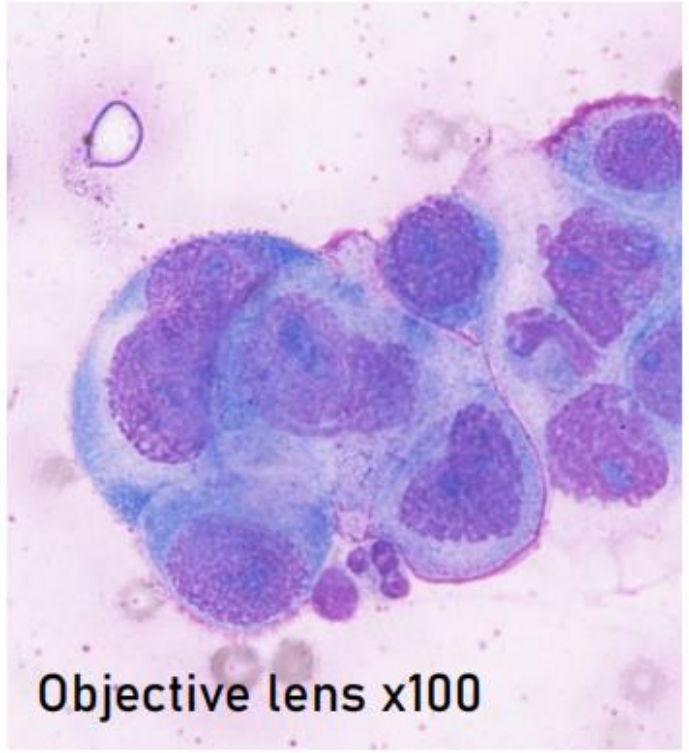




เตรียมแบบ simple sedimentation



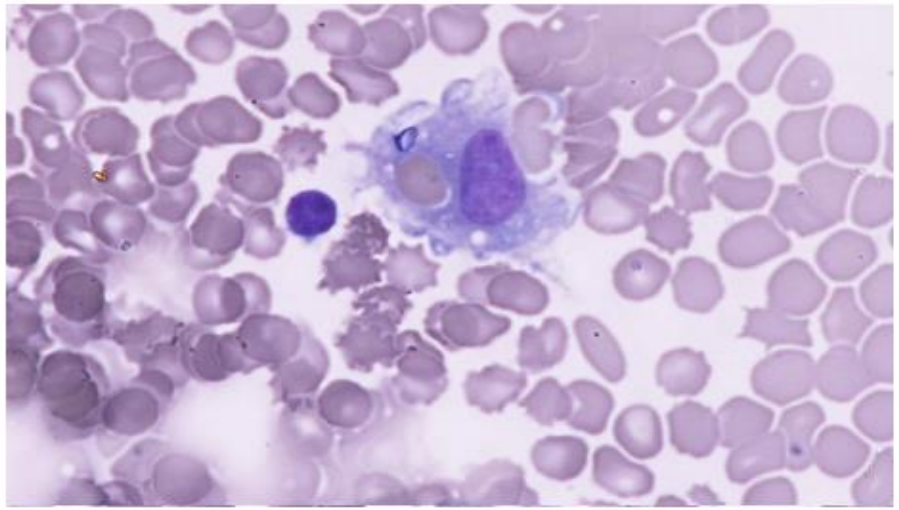


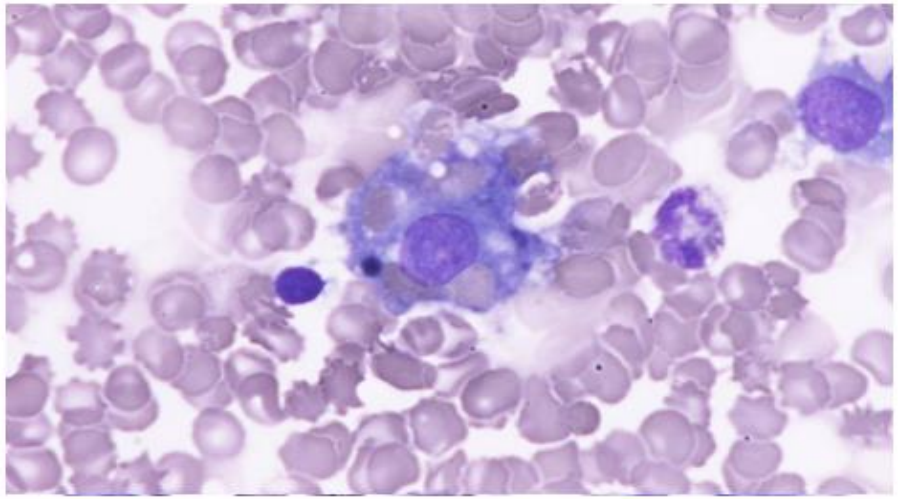


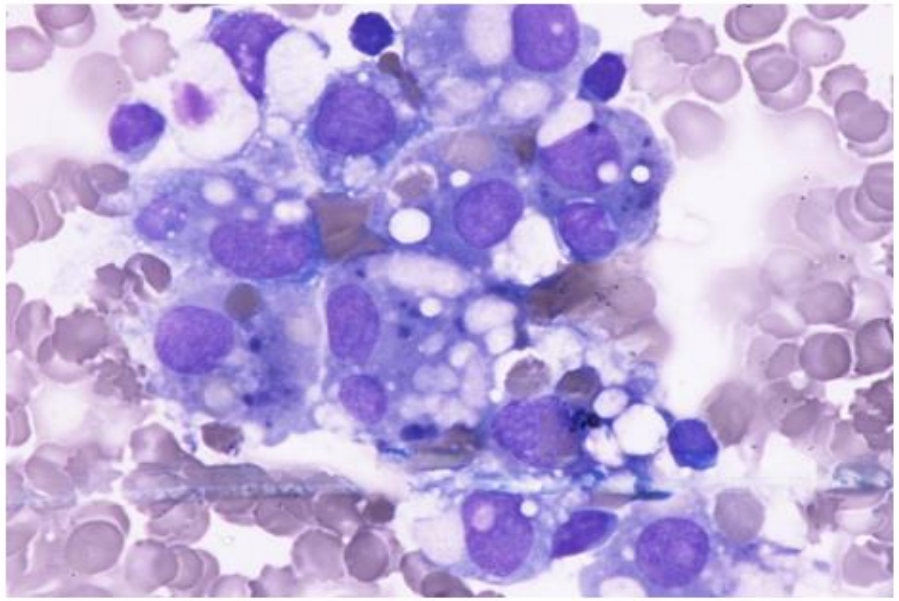
การแผ่ตัวของเซลล์ดีกว่า

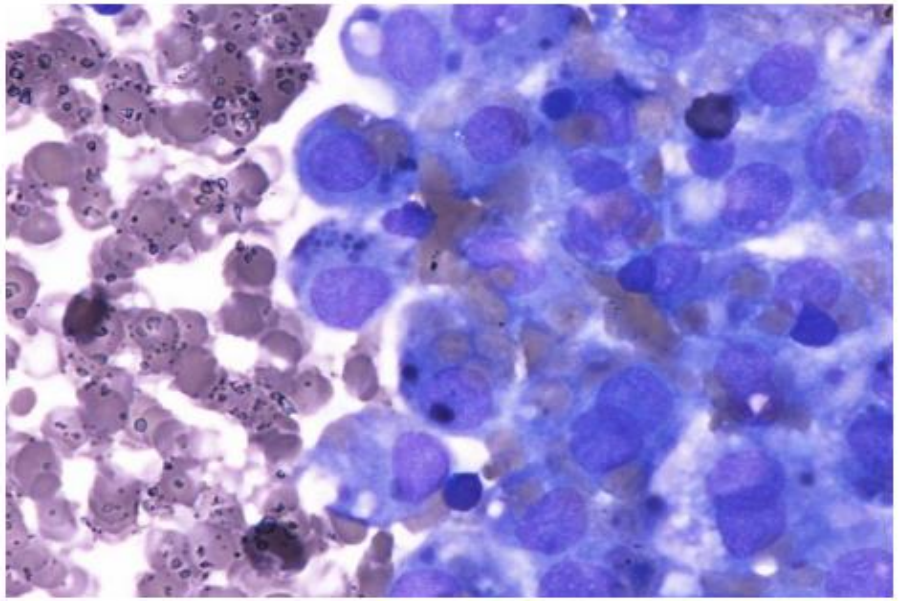
ควรระวัง

Macrophages มีแนวโน้มที่จะเกาะกลุ่มกัน



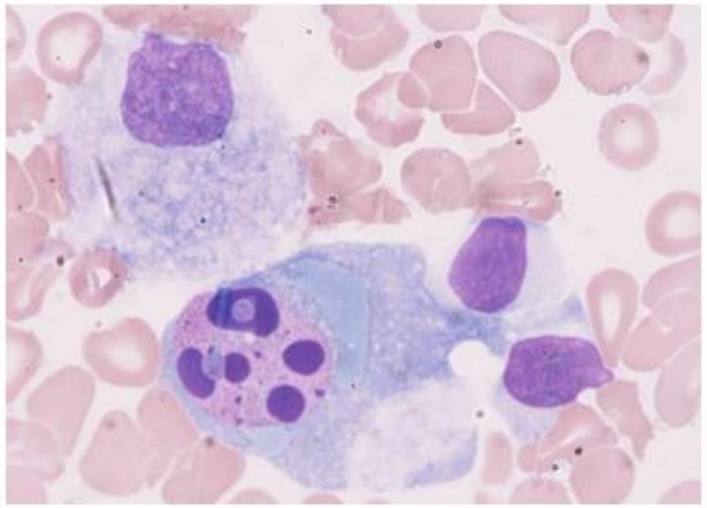


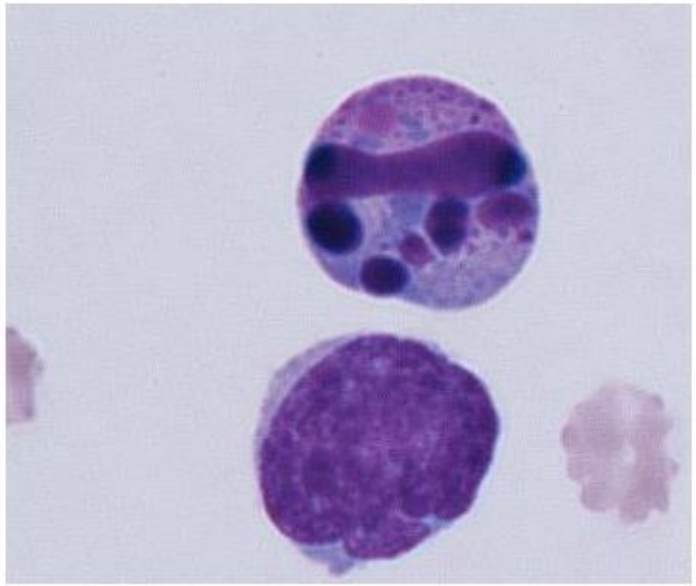


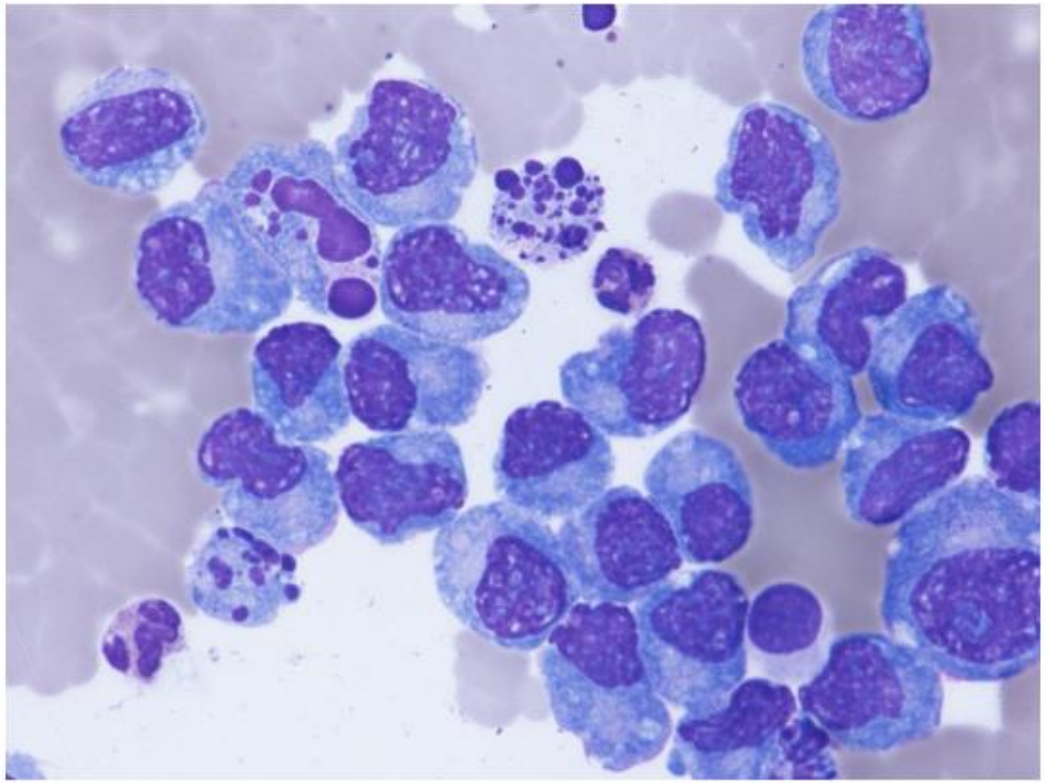


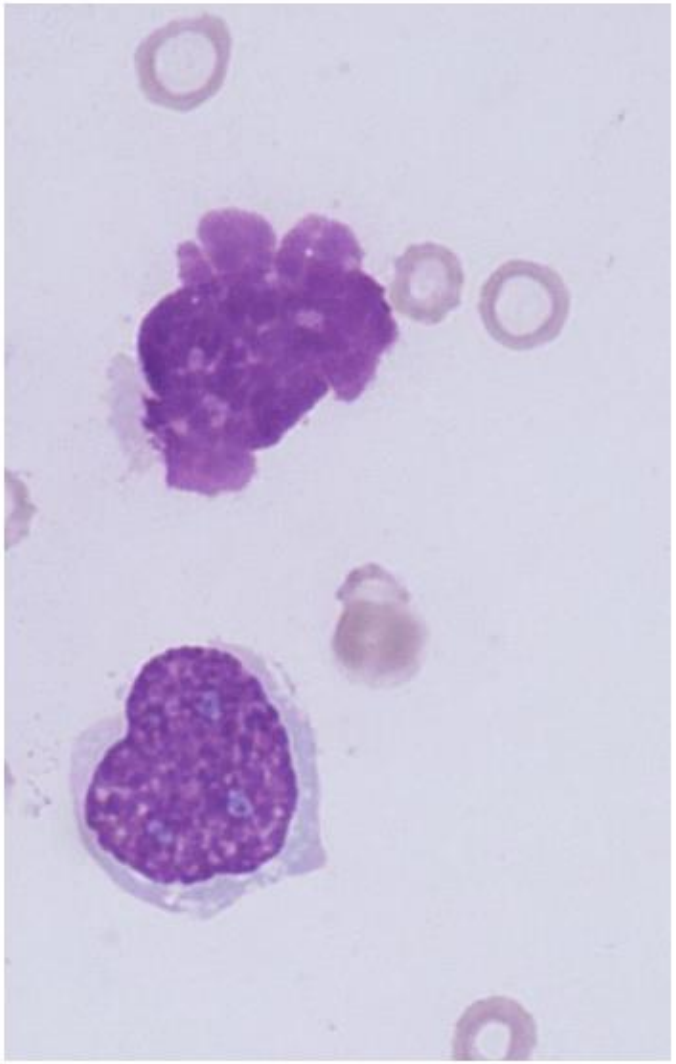
ควรระวัง

ตัวอย่างเก็บไว้นาน อาจพบเซลล์ตาย (necrotic cell) smudge cell/basket cell



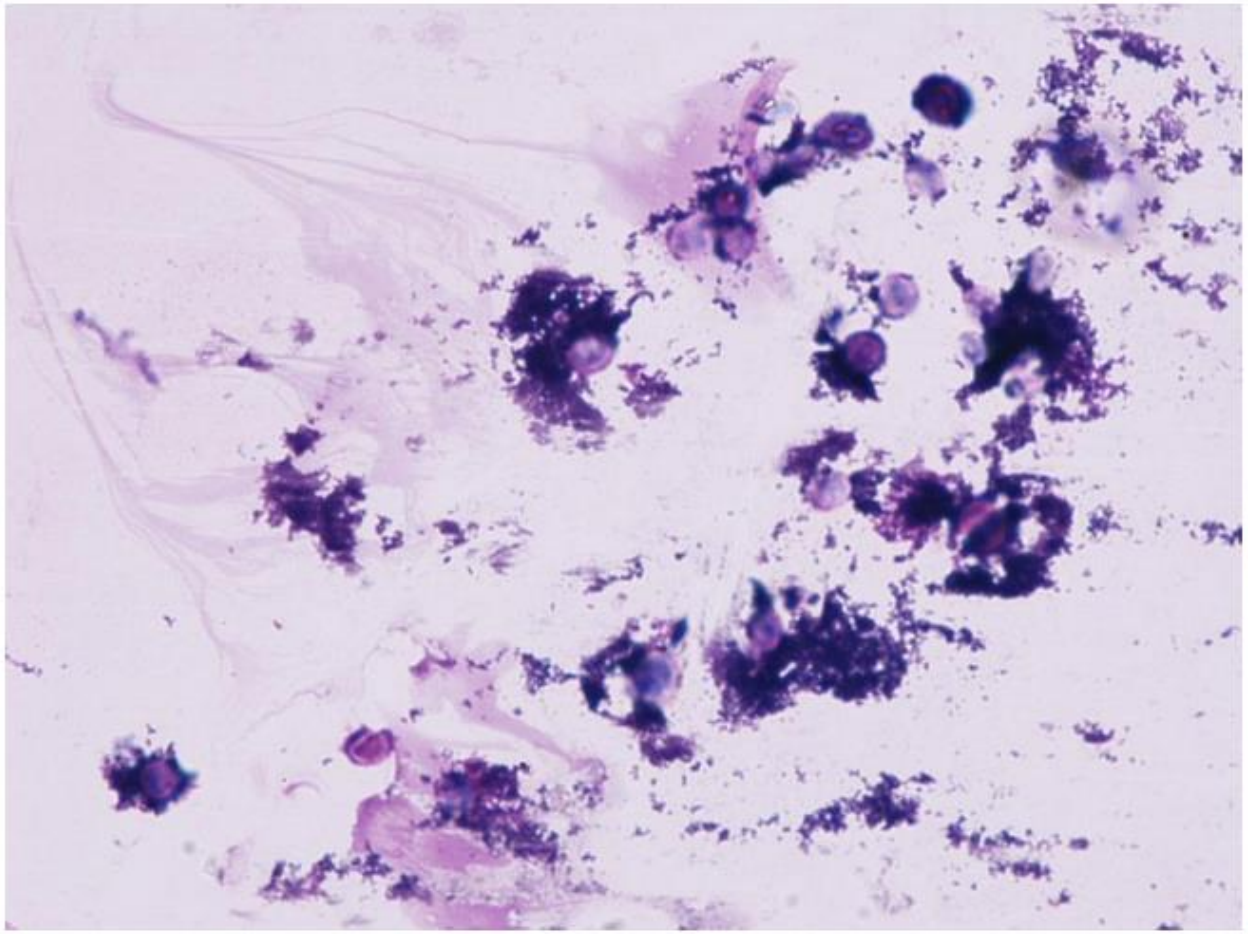




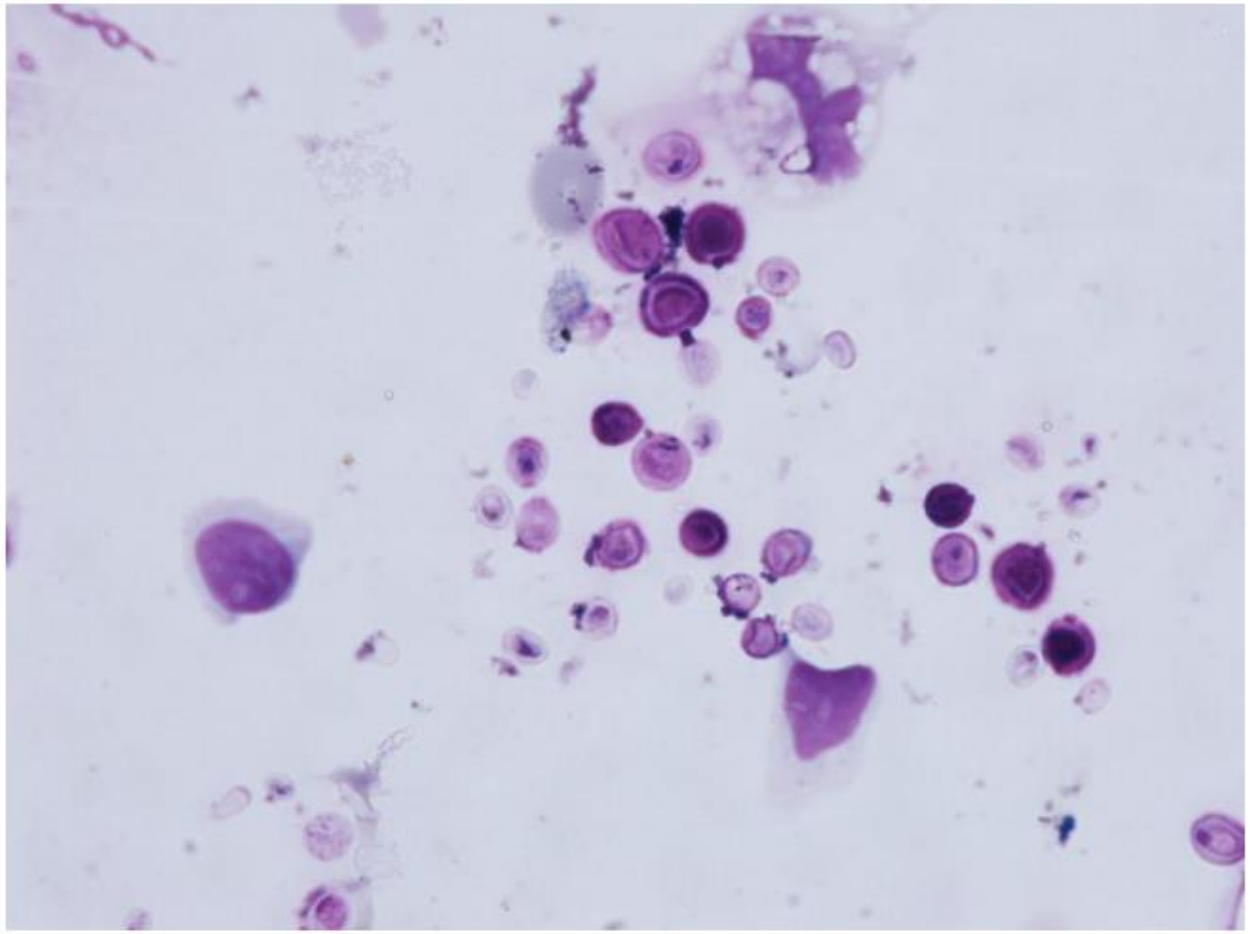


ควรระวัง

ตะกอนสี สไลด์ที่ไม่สะอาด สิ่งแปลกปลอมปนมากับขั้นตอนการเตรียมสเมียร์



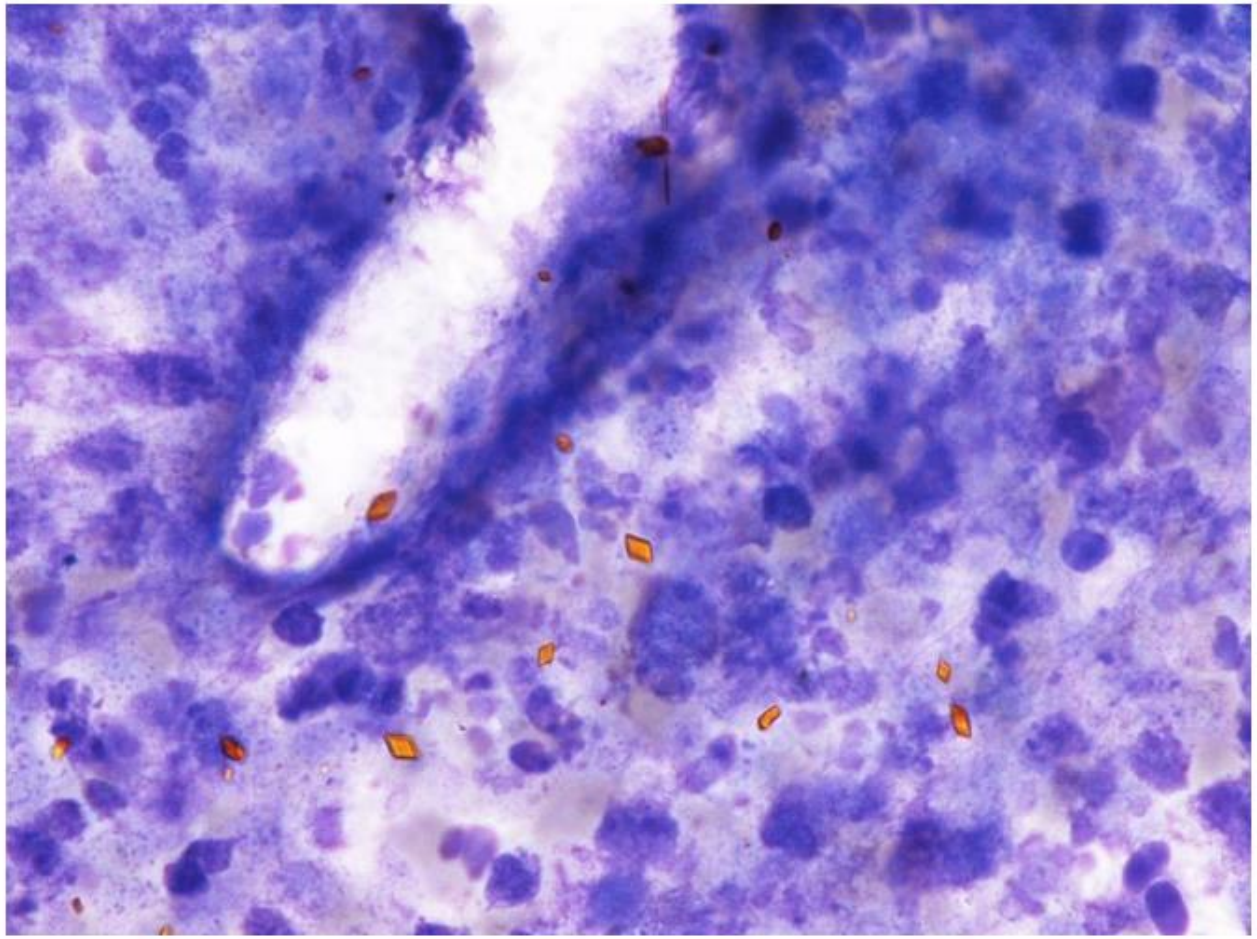
Artifact and yeast cells (encapsulated)



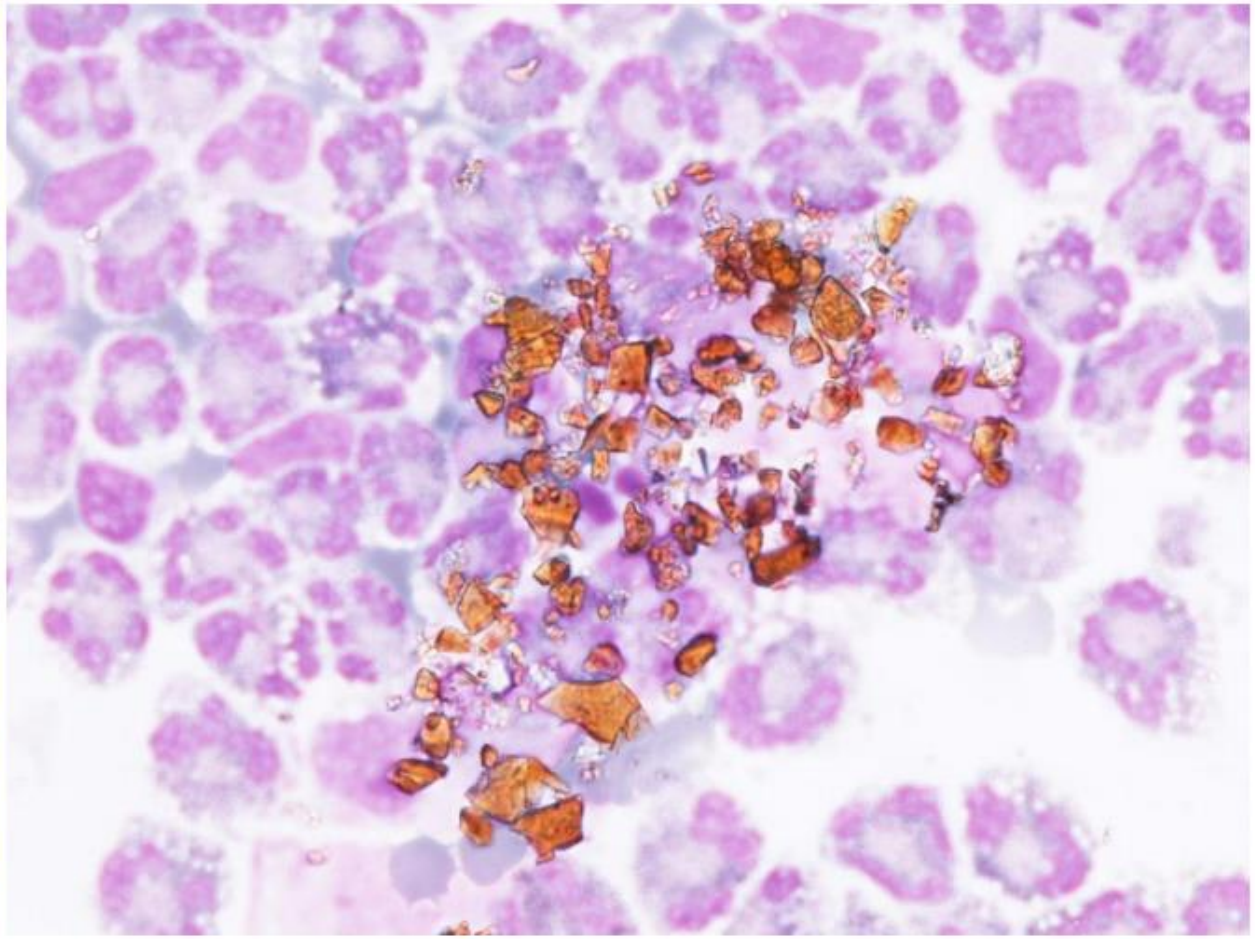
Yeast cells (encapsulated)

ควรระวัง

สิ่งแปลกปลอมบนสเมียร์ อาจทำให้เข้าใจว่าคือสิ่งที่ต้องรายงาน



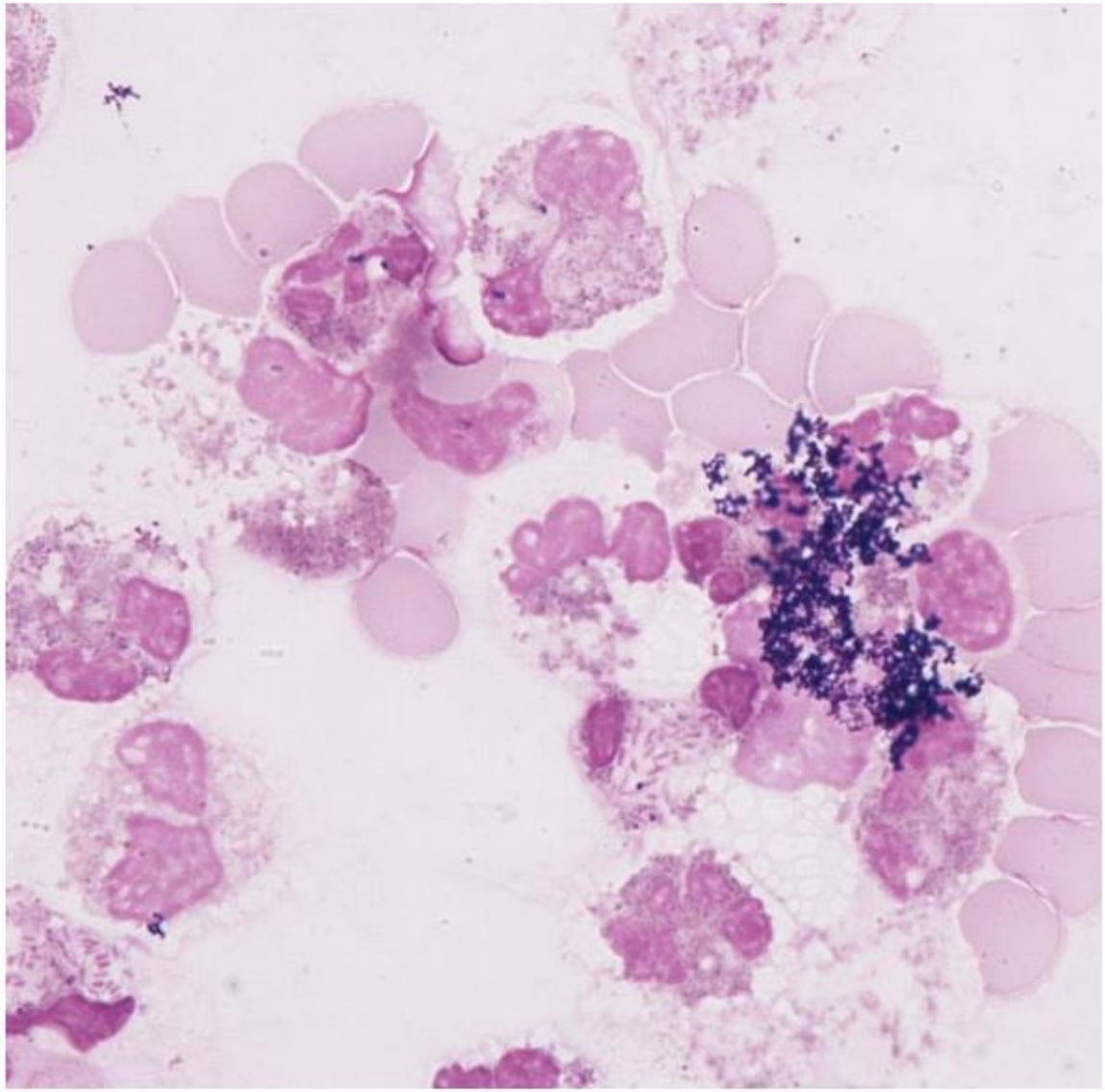
Hemtoidin crystals

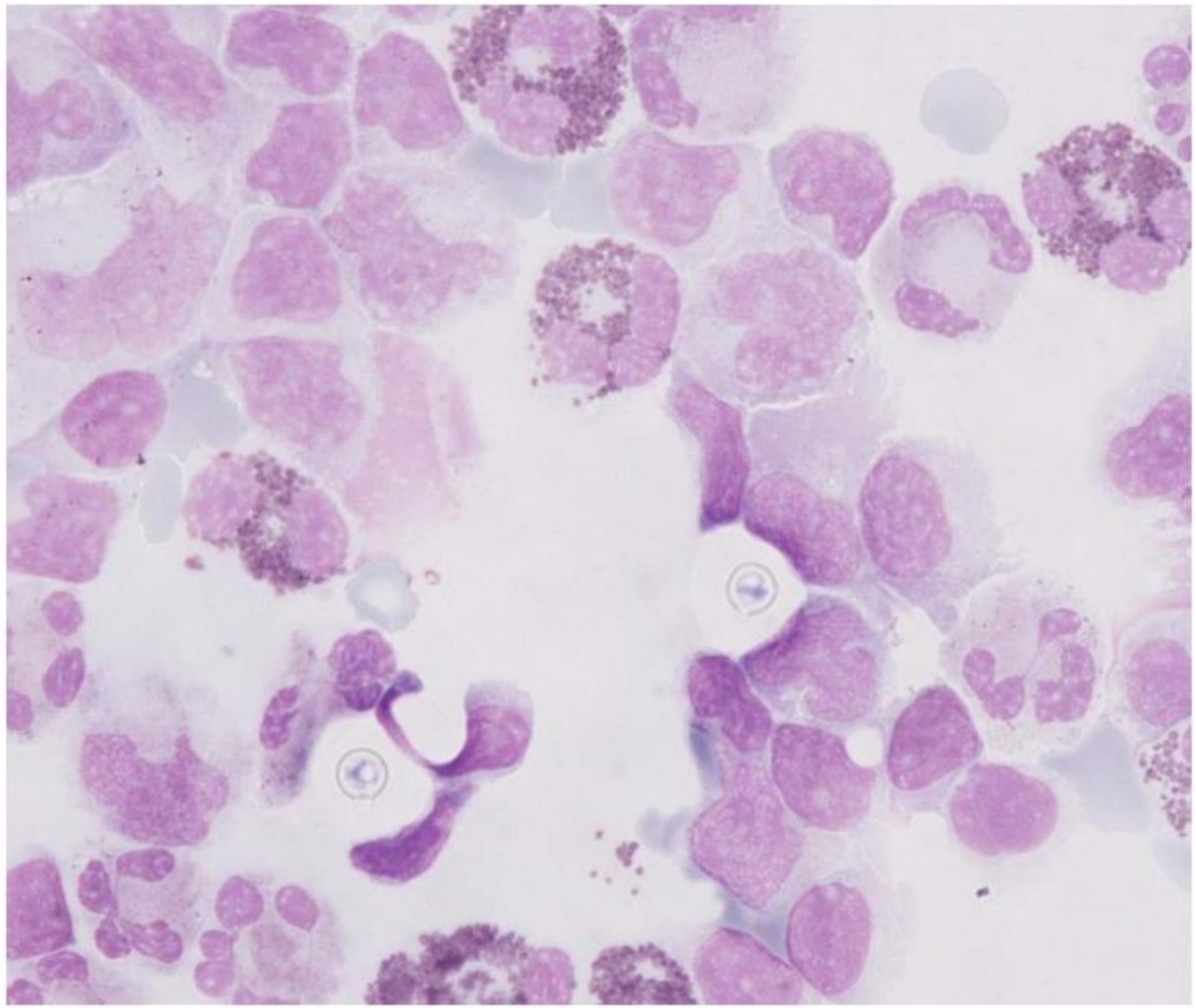


Artifact

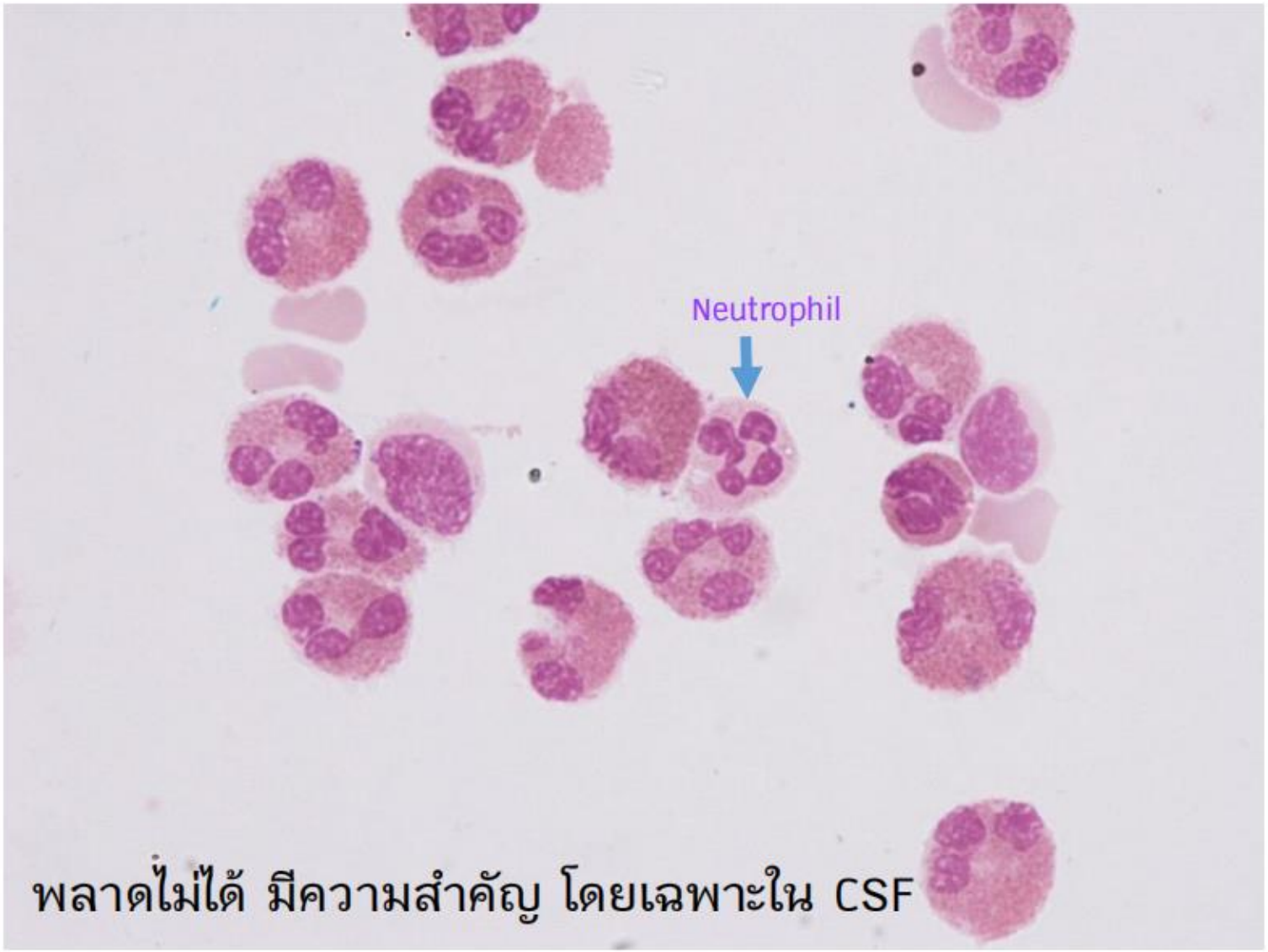
ควรระวัง

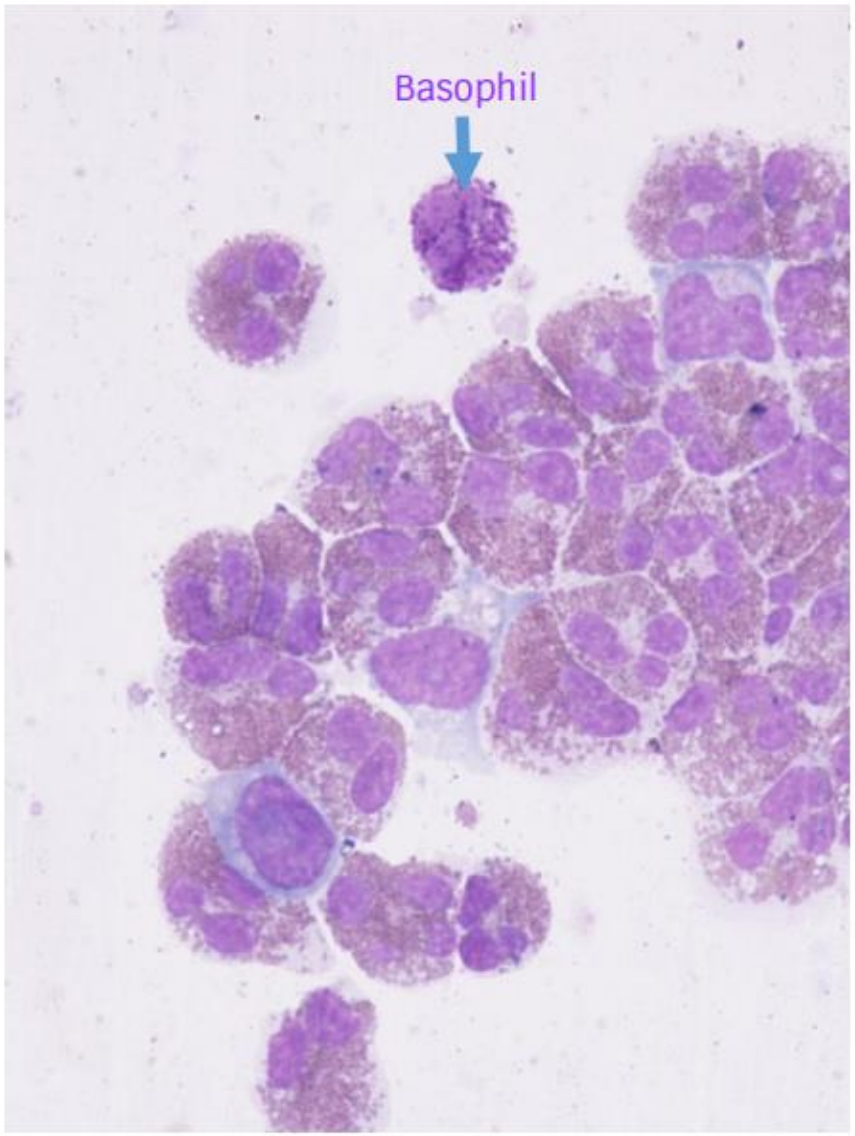
ตะกอนสี อาจบดบังสิ่งที่น่าสนใจ การย้อมสีไม่ดี granules ของ eosinophils ไม่เป็นสีส้ม





ควรระวัง Eosinophils หรือ Neutrophils





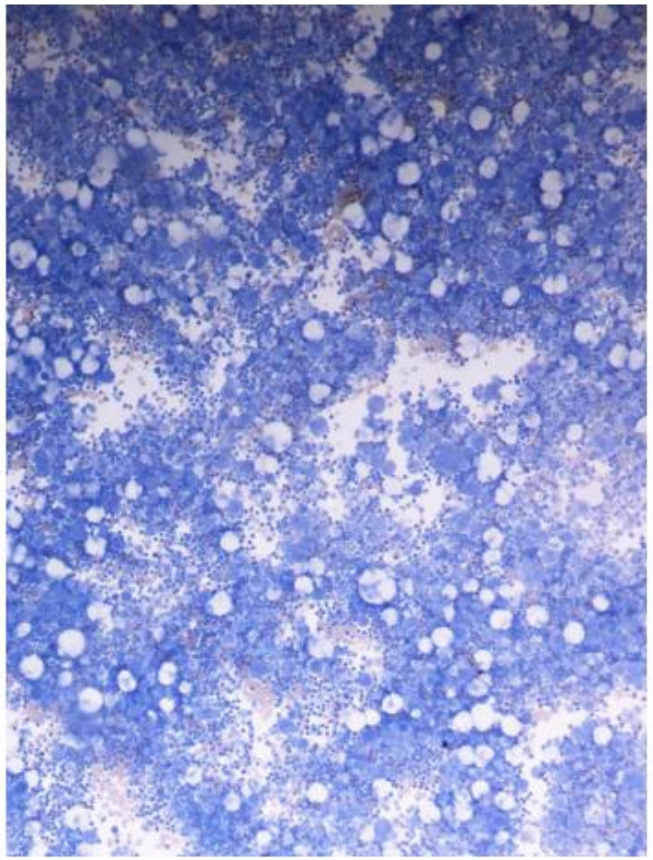
การตรวจสเมียร์ และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

เลี่ยงบริเวณสเมียร์ที่หนา

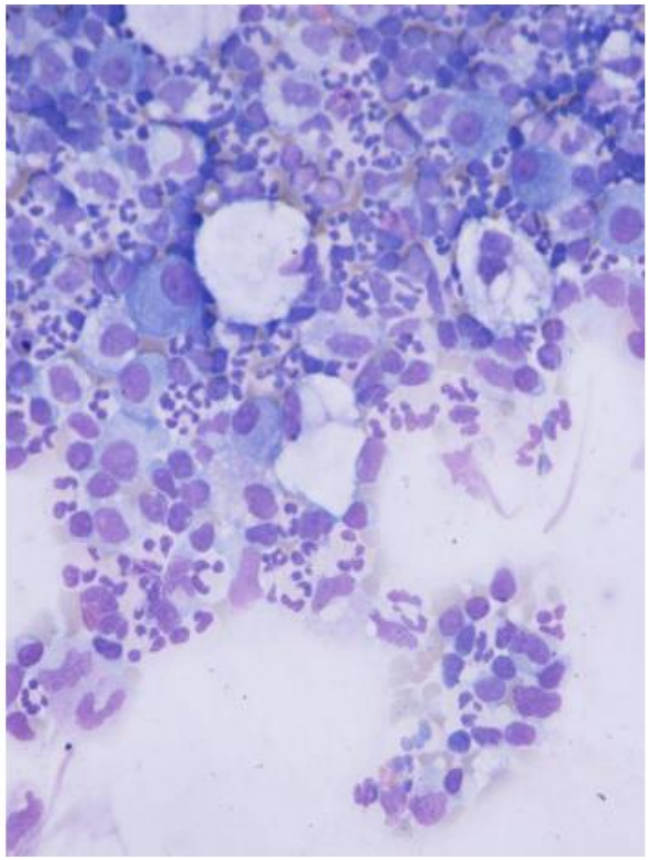
เลื่อนวงกล้องไปอย่างต่อเนื่อง
ไม่ให้นับซ้ำเซลล์เดิม

กรณีพบเซลล์เม็ดเลือดจำนวนน้อย
(น้ำไขสันหลัง) ทำให้ไม่สามารถนับได้ถึง 100 เซลล์

ให้นับเซลล์ทั้งหมดที่พบแล้วรายงาน
และระบุจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่นับลงในใบรายงาน



สเมียร์ที่หนา

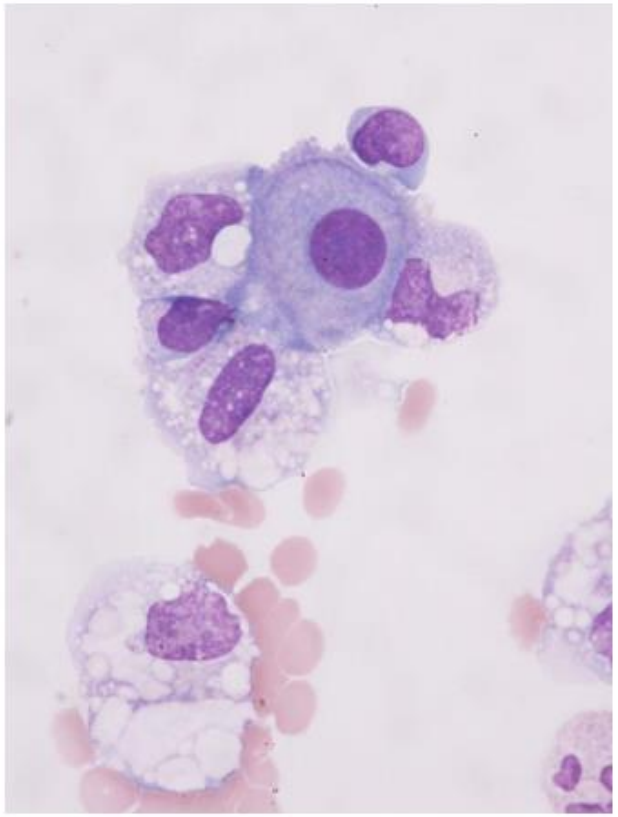


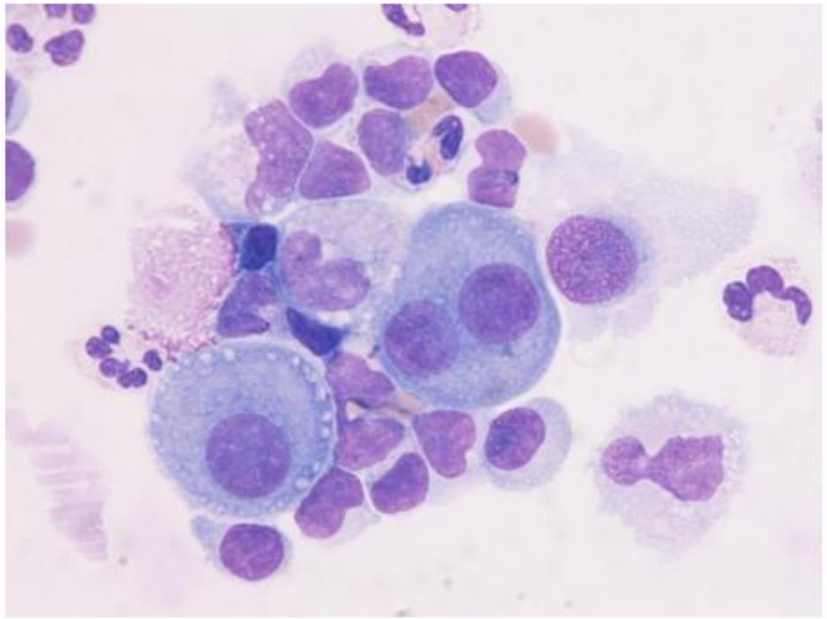
สเมียร์ที่บาง

การตรวจสเมียร์และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

นับ All nucleated cell จำนวน 100-300 เซลล์

Mesothelial cells และ macrophages
จะนับรวมใน 100 เซลล์หรือใม่ ??????





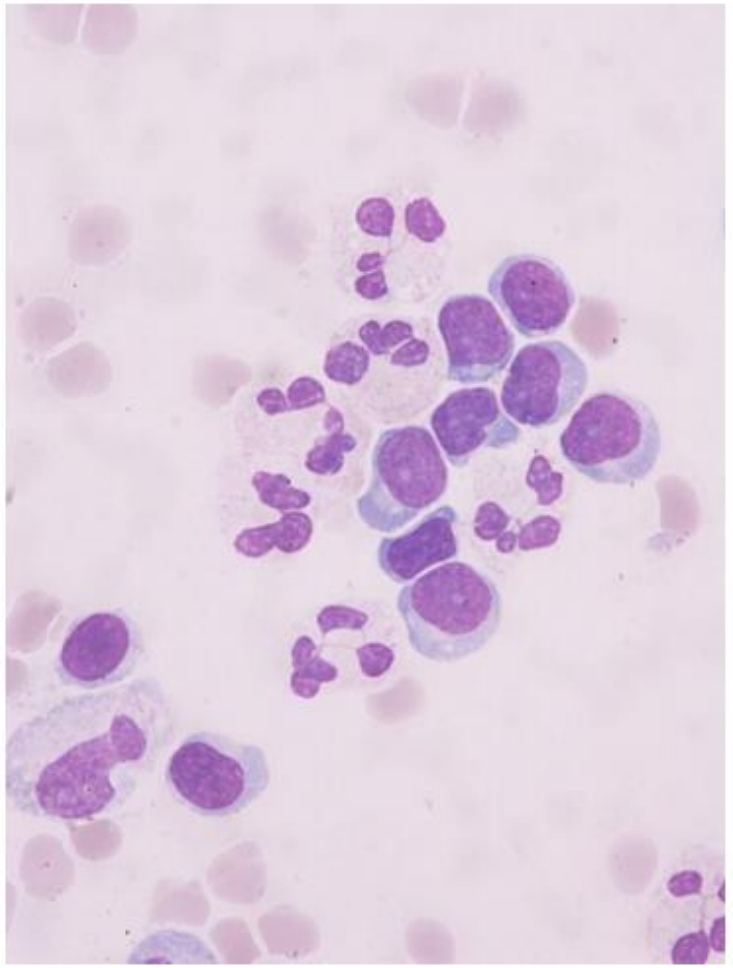
ควรกำหนดแนวปฏิบัติ
ในการรายงานผลของแต่ละห้องปฏิบัติการ

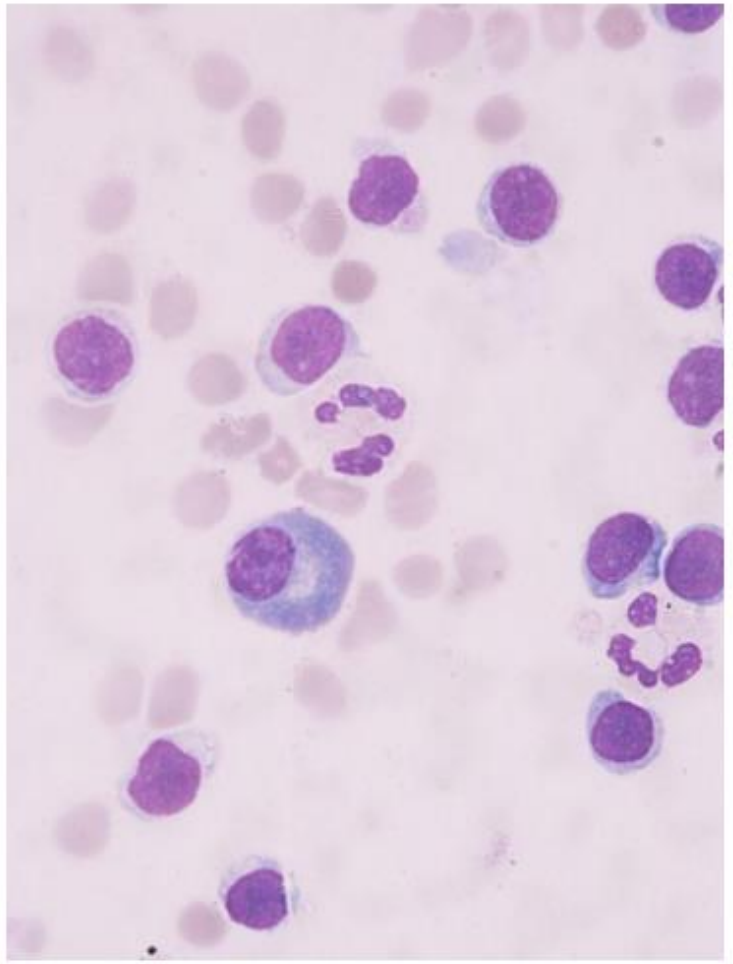
1. นับหรือไม่นับรวมอยู่ในการนับแยกชนิดเซลล์ที่มีนิวเคลียสก็ได้
2. นับรวมให้อยู่ในกลุ่ม “others”
3. รายงานเป็นระดับว่ามีมากน้อยเพียงใด เช่น “few” “moderate” “many”

การตรวจสเมียร์และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

Differential cell count	
Neutrophils	40%
Lymphocytes	55%
Monocytes	2%
Macrophages	-
Eosinophils	-
Basophils	-
Atypical lymphocytes	3%
Mesothelial cells	-
Other	-

ตัวอย่างกรณีพบเฉพาะ WBC

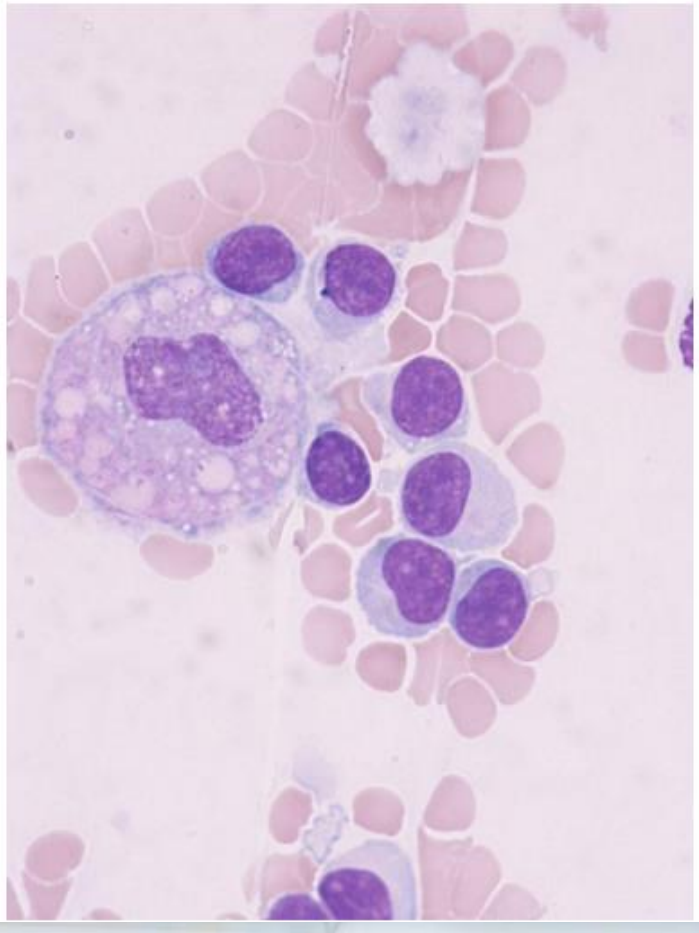


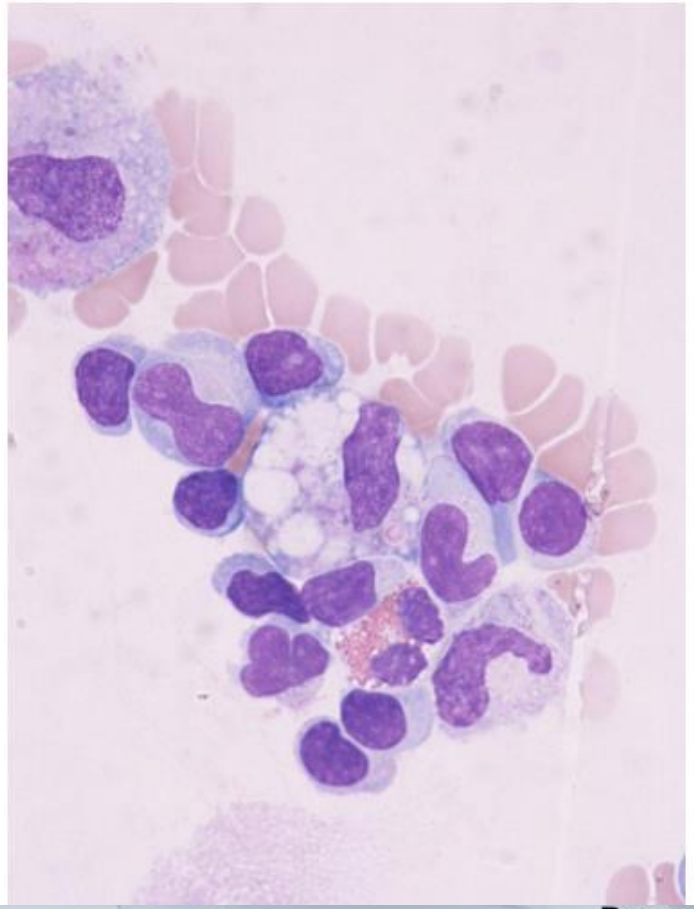


การตรวจสเมียร์และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

Differential cell count	
Neutrophils	5%
Lymphocytes	80%
Monocytes	-
Macrophages	10%
Eosinophils	5%
Basophils	-
Atypical lymphocytes	-
Mesothelial cells	-
Other	-

ตัวอย่างกรณีพบ WBC ที่เป็น macrophages ด้วย

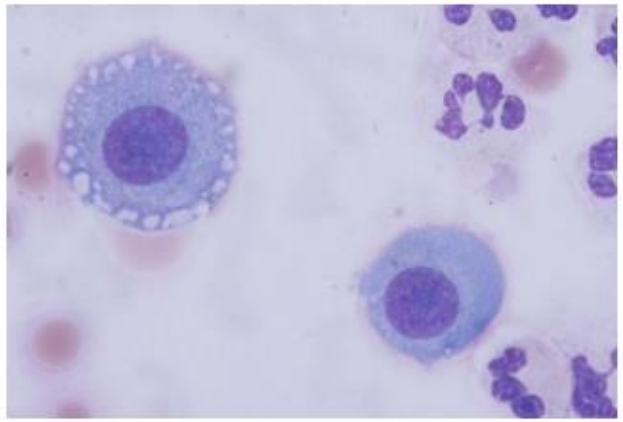


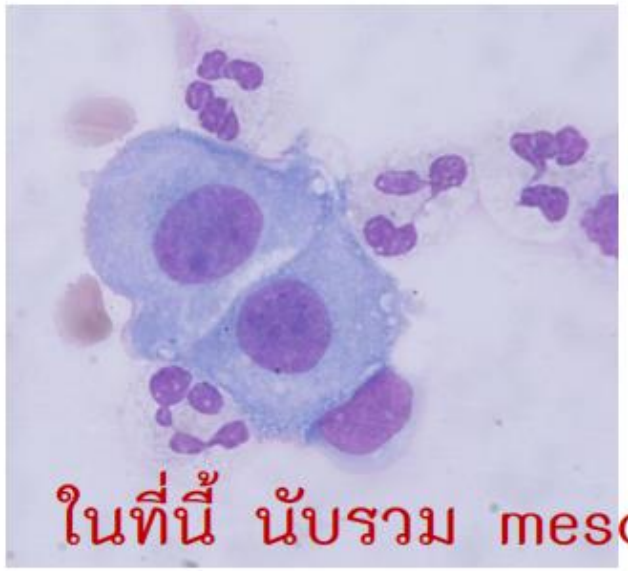


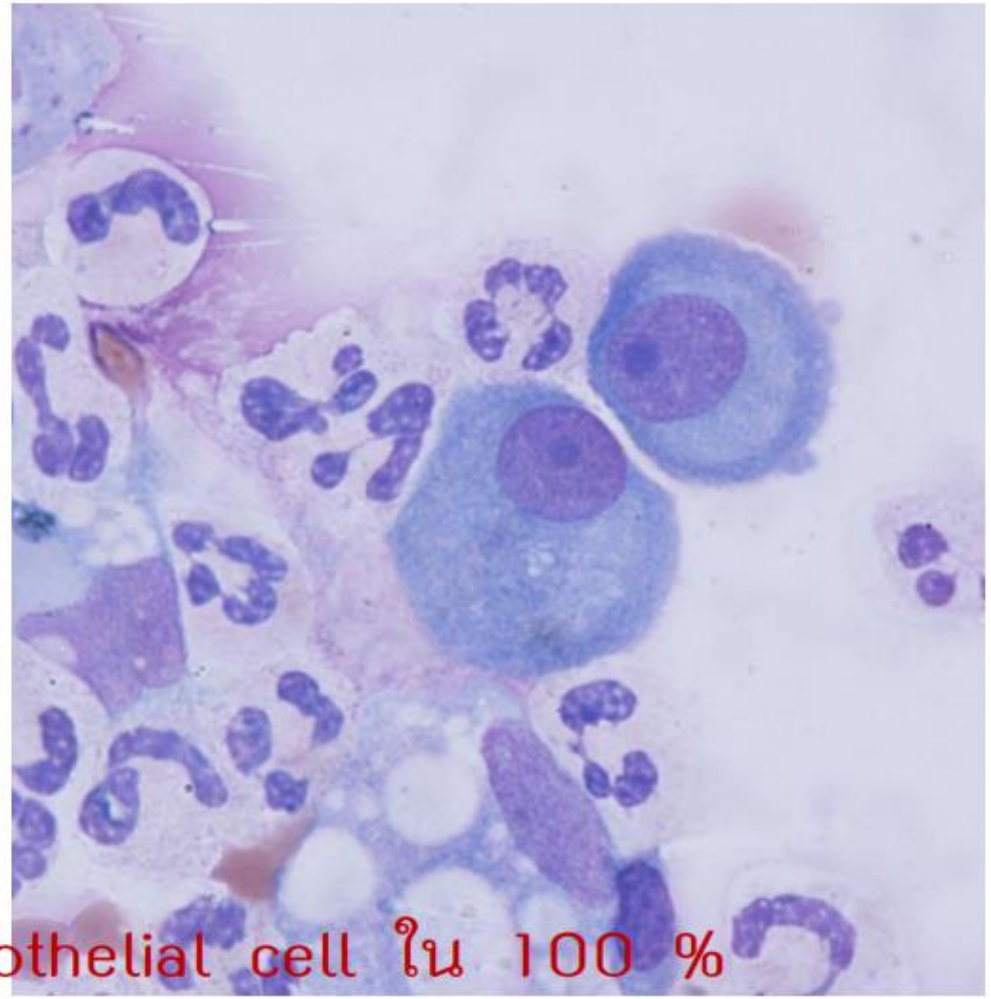
การตรวจสเมียร์และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

Differential cell count	
Neutrophils	80%
Lymphocytes	-
Monocytes	-
Macrophages	10%
Eosinophils	-
Basophils	-
Atypical lymphocytes	-
Mesothelial cells	10%
Other	-

ตัวอย่างกรณีพบ WBC และ mesothelial cell







ในที่นี้ นับรวม mesothelial cell ใน 100 %

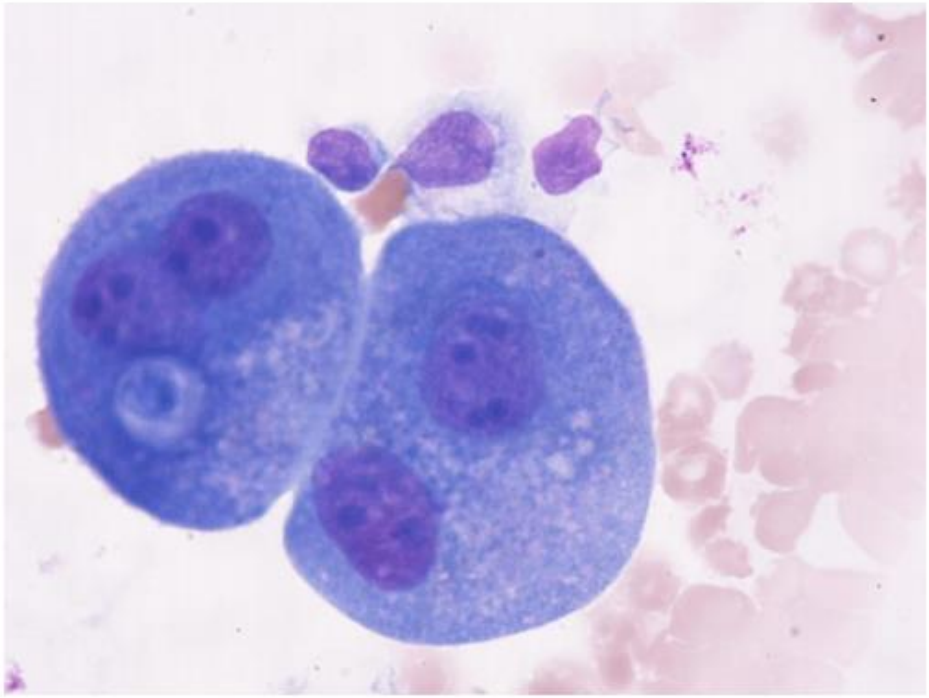
การตรวจสเมียร์และนับแยกชนิดเซลล์ในสารน้ำในร่างกาย

Differential cell count	
Neutrophils	-
Lymphocytes	40%
Monocytes	-
Macrophages	20%
Eosinophils	-
Basophils	-
Atypical lymphocytes	-
Mesothelial cells	-
Abnormal cells Remarked; *abnormal giant cell with nuclear molding and deep blue cytoplasm*	40%

ตัวอย่างกรณีพบ WBC และเซลล์ผิดปกติ

ให้นับเซลล์ผิดปกติรวมใน 100 % และ remark

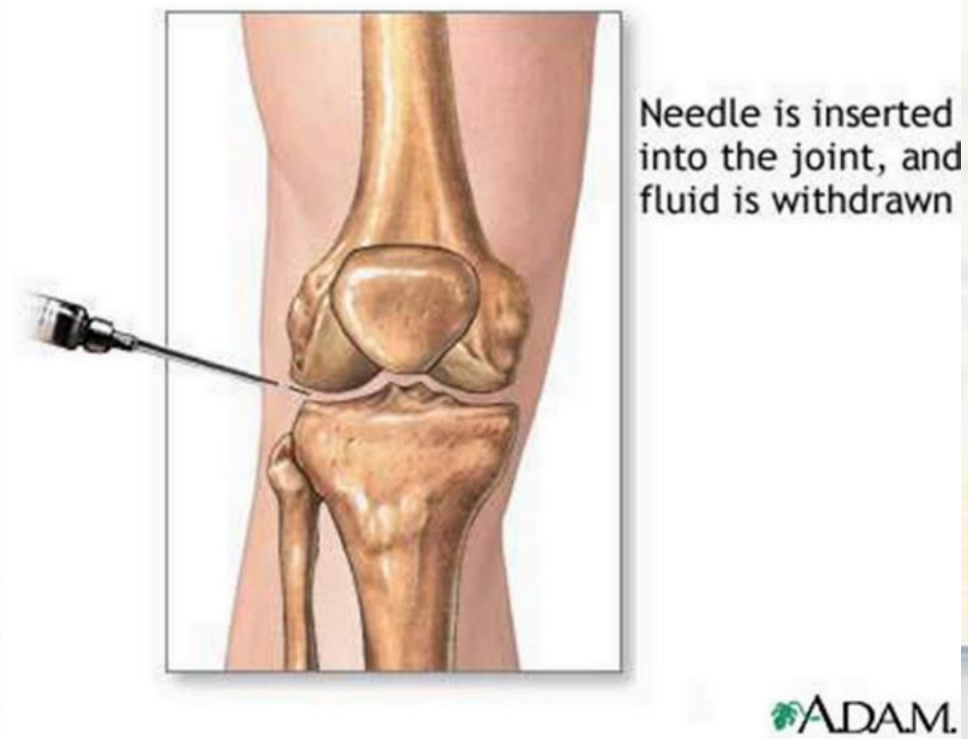
ความผิดปกติให้แพทย์ทราบ (ดังรายละเอียดในหนังสือบทที่ 5)



การตรวจวิเคราะห์น้ำไขข้อ **Synovial fluid**

การเจาะเก็บไขข้อ (Arthrocentesis)

เป็นการเจาะไขข้อโดยการดูดจาก ข้อผ่านผิวหนังโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (percutaneous aspiration)



ข้อบ่งชี้ของการเจาะข้อ

1. วินิจฉัยโรค
2. รักษาและติดตามผลการรักษา
3. ลดหรือบรรเทาอาการปวด หรือทำให้การเคลื่อนไหวของข้อดีขึ้น

ลำดับการเติม synovial fluid ที่เจาะได้ลงในหลอดเก็บชนิดต่าง ๆ

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) recommendation

TABLE 14-3 Synovial Fluid Analysis and Specimen Requirements

Collection Tube Order	Test	Volume	Tube Type
All tubes	**Physical examination** Color, clarity, viscosity	≈1 mL	
#1	**Chemical examination**		
	Lactate, lipids (cholesterol, triglycerides), protein, uric acid	1 to 3 mL	No anticoagulant (red top)
	Glucose	1 to 3 mL	No anticoagulant (red top) or sodium fluoride (gray top)
#2	**Microscopic examination**		
	Total cell count Differential cell count Crystal identification	2 to 5 mL	Sodium heparin* or liquid EDTA
	Cytologic studies (e.g., malignant cells)	5 to 50 mL†	Sodium heparin*
#3	**Microbiological studies**		
	Culture	3 to 10 mL‡	Sterile tube; no anticoagulant (red top), sodium heparin,* or sodium polyanethole sulfonate (yellow top)

หลังจากเจาะเสร็จ นำส่งห้องปฏิบัติการ โดย

- **Cells counts**: a heparinised tube is preferable to ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or other anticoagulants
- **Microbiology testing**: sterile containers
- **Chemistry and immunology testing**: plain tubes are normally used for of synovial fluid

Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

ข้อควรระวังในการเจาะเก็บ นำส่ง และเก็บรักษาน้ำไขข้อ

การเจาะเก็บ

- หากเป็นไปได้ ผู้ป่วยควรงดอาหารอย่างน้อย 4-6 ชั่วโมงก่อนเจาะ เพื่อให้เกิดความสมดุลขององค์ประกอบที่เป็นรเคมีระหว่างในพลาสมากับใน synovial fluid
- ควรเจาะเลือดและ synovial fluid ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน

การนำส่ง

ต้องรีบนำส่งห้องปฏิบัติการทันที โดยนำส่งที.อุณหภูมิห้อง

การเปลี.ยนแปลงที.จะเกิดขึ.นหากนำส่งช้า

- มีการเปลี.ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์
- มีการแตกของเซลล์เม็ดเลือด
- มีปัญหาในการตรวจหาเชื.อจุลชีพ

การเก็บรักษา

เก็บรักษาในตู้เย็นได้ (ยกเว้นการส่งตรวจทางจุลชีววิทยา) แต่ควรนำส่งภายใน 24 ชั.วโมง

การเปลี.ยนแปลงที.จะเกิดขึ.นหากเก็บที.อุณหภูมิห้องแทนที.จะเป็น synovial fluid

- ลดการเจริญของเชื.อจุลชีพ
- *In vitro* crystalline precipitation

การตรวจวิเคราะห์ synovial fluid

Physical examination

- Volume
- Clarity
- Colour
- Viscosity
- Clot formation

Chemical examination

- Glucose
- Total protein
- Uric acid
- Lactate

Microscopic examination

- Total cell count
- Differential cell count
- Crystal identification

Microbiology examination

- Gram stain
- Culture and molecular method

Synovial fluid reference intervals

Physical Examination	
Total volume	0.1 to 3.5 mL
Color	Pale yellow
Clarity	Clear
Viscosity	High; forms "strings" 4 to 6 cm long
Spontaneous clot formation	No
Microscopic Examination	
Erythrocyte count	<2000 cells/mL
Leukocyte count	<200 cells/mL
Differential cell count:	
Monocytes and macrophages	≈60%
Lymphocytes	≈30%
Neutrophils	≈10%
Crystals	None present
Chemical Examination	
Glucose	Equivalent to plasma values†
Glucose: P-SF difference	<10 mg/dL†
Uric acid	Equivalent to plasma values†
Total protein	1 to 3 g/dL
Lactate	9 to 33 mg/dL‡
Hyaluronate	0.3 to 0.4 g/dL

If plasma values are obtained from fasting patients

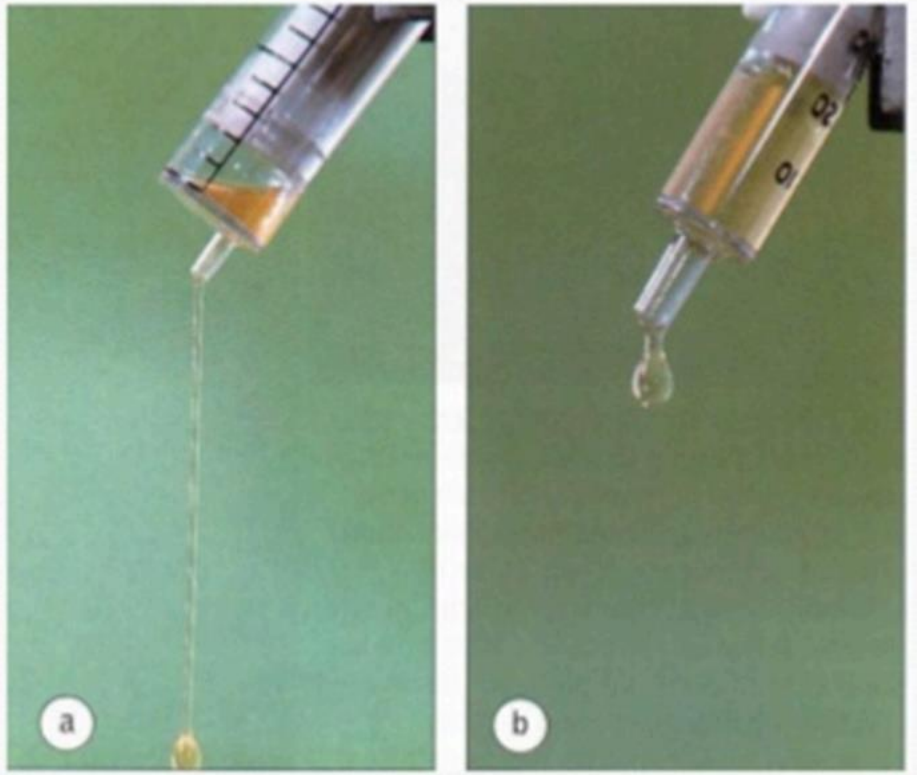
*: values for fluid obtained from knee joint

Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

Macroscopic Analysis: Viscosity

- "Ropes" or "Mucin Clot Test"
- Normal = 4-6 cm

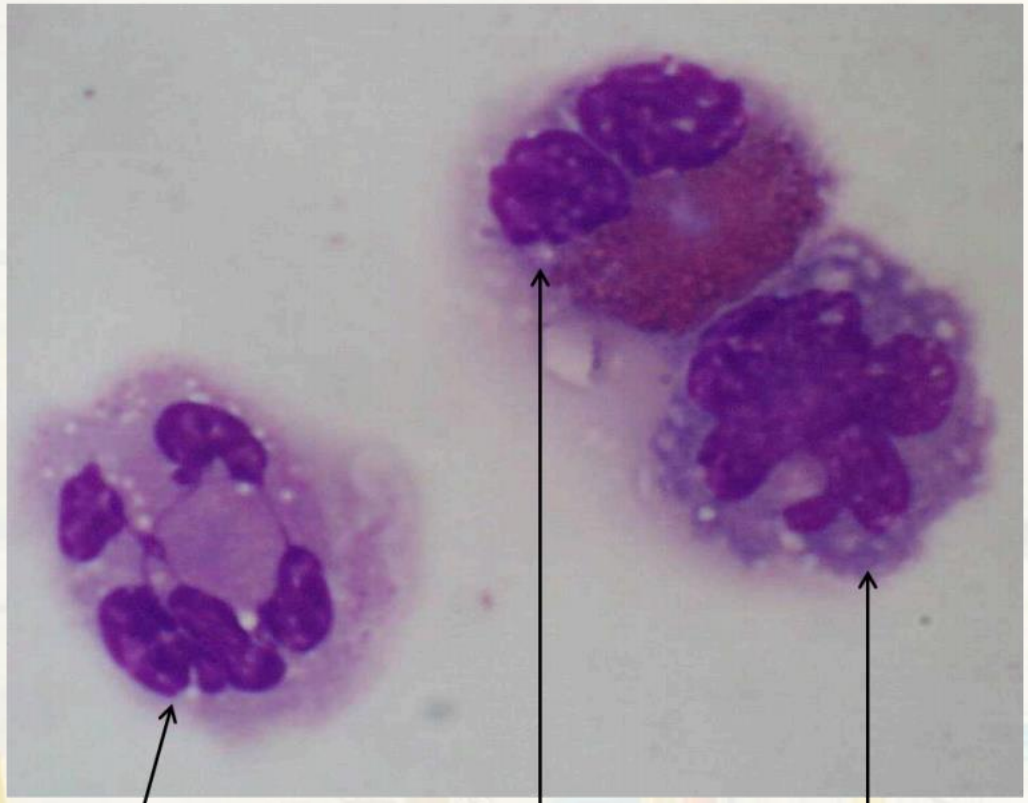
- When 2-5% acetic acid is added, normal synovial fluid will form a clot surrounded by clear fluid

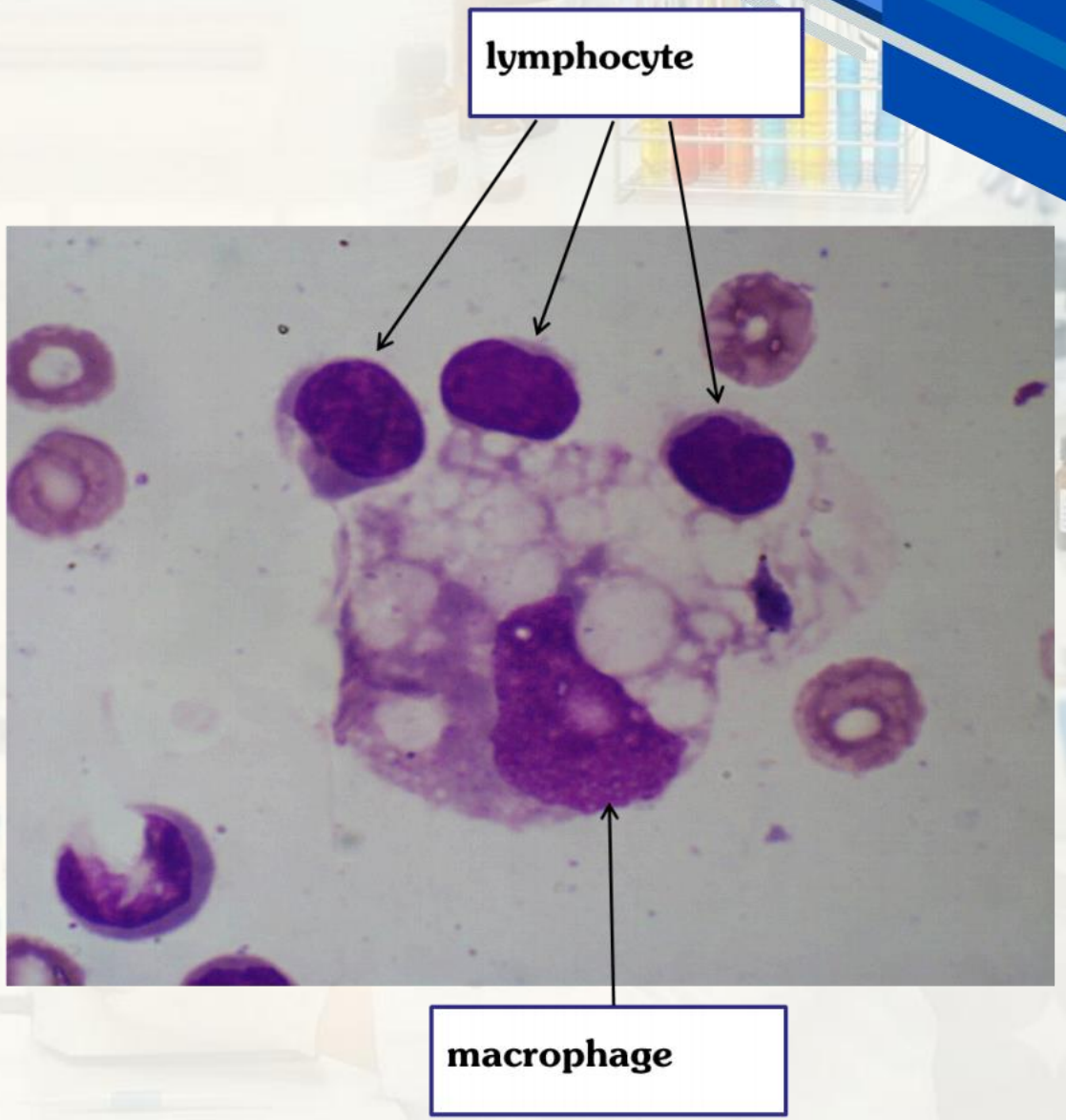


https://www.slideshare.net/raymarthilter/synovial

Differential cell count

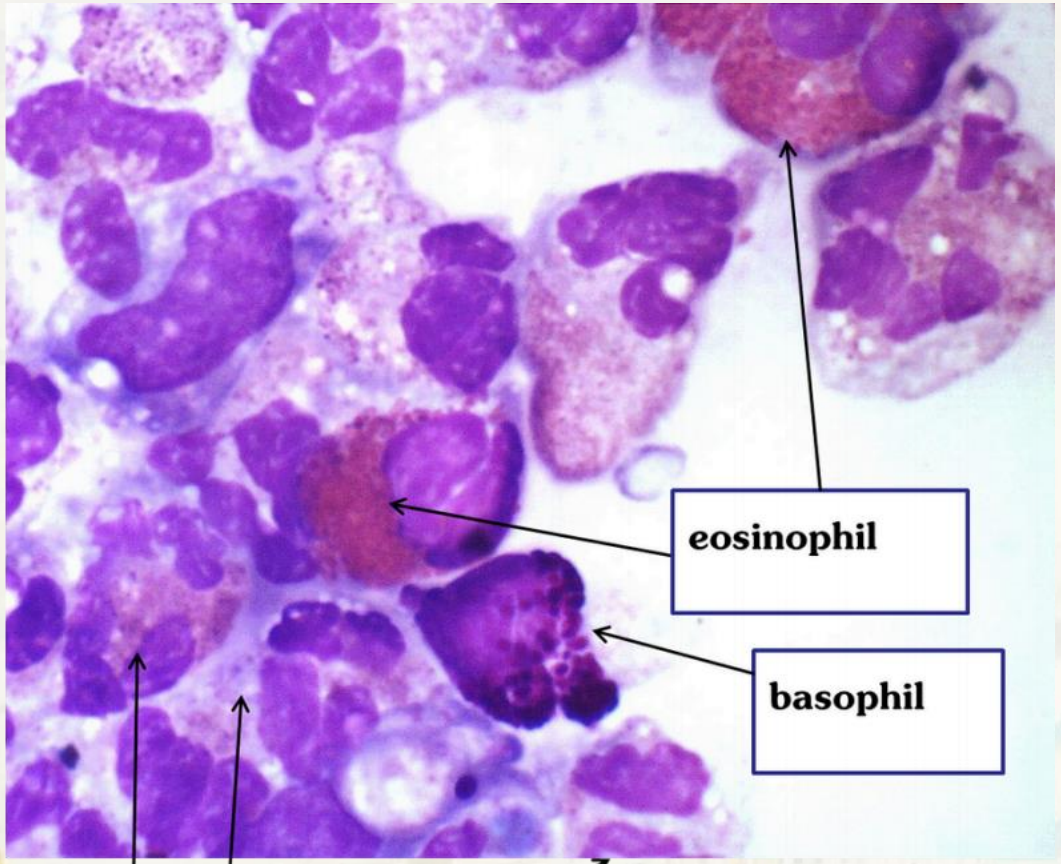
เซลล์ที.พบได้ใน normal synovial fluid

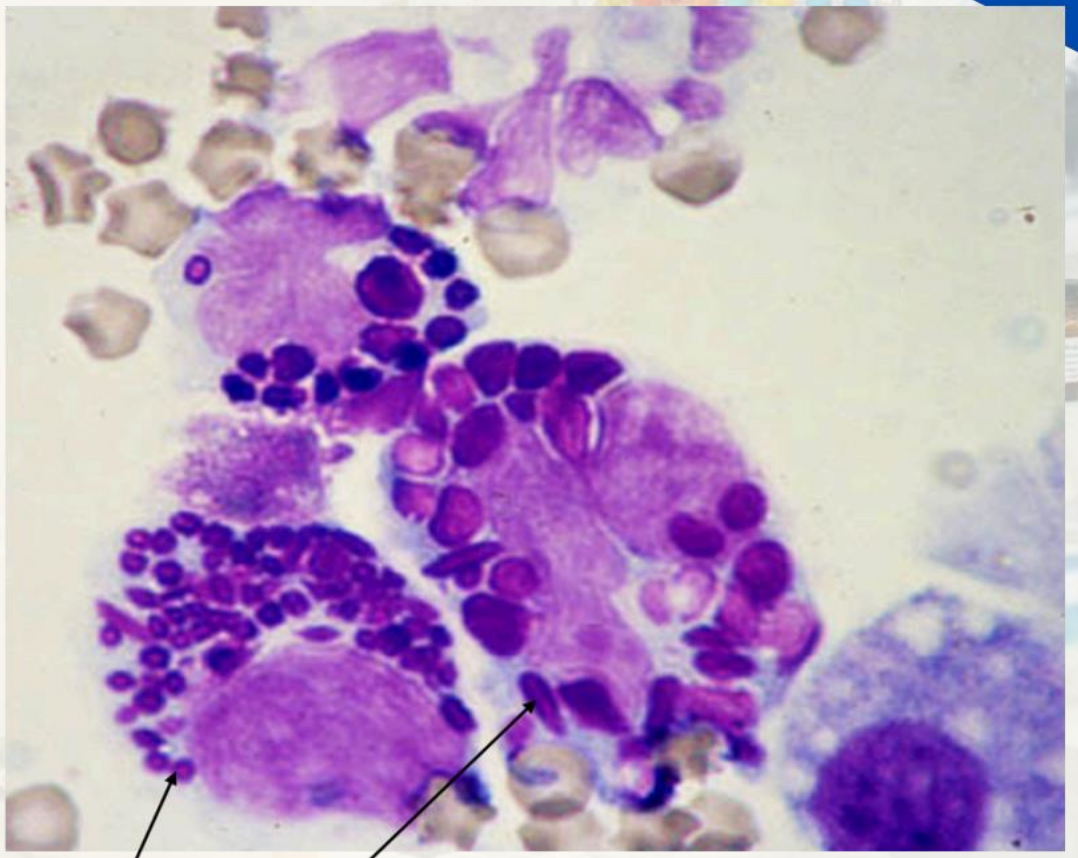




Differential cell count

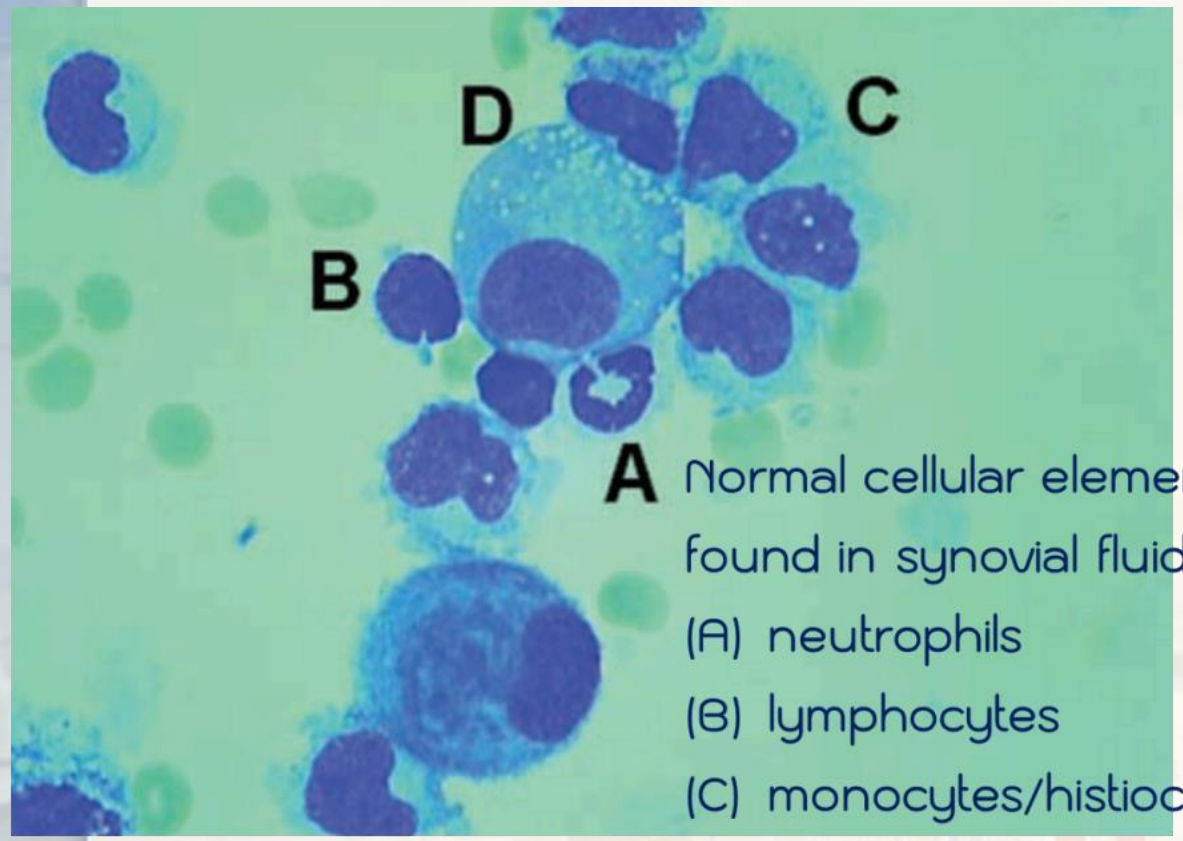
เซลล์ที.พบได้ใน normal synovial fluid





Differential cell count

เซลล์ที.พบได้ใน normal synovial fluid



Normal cellular elements found in synovial fluid

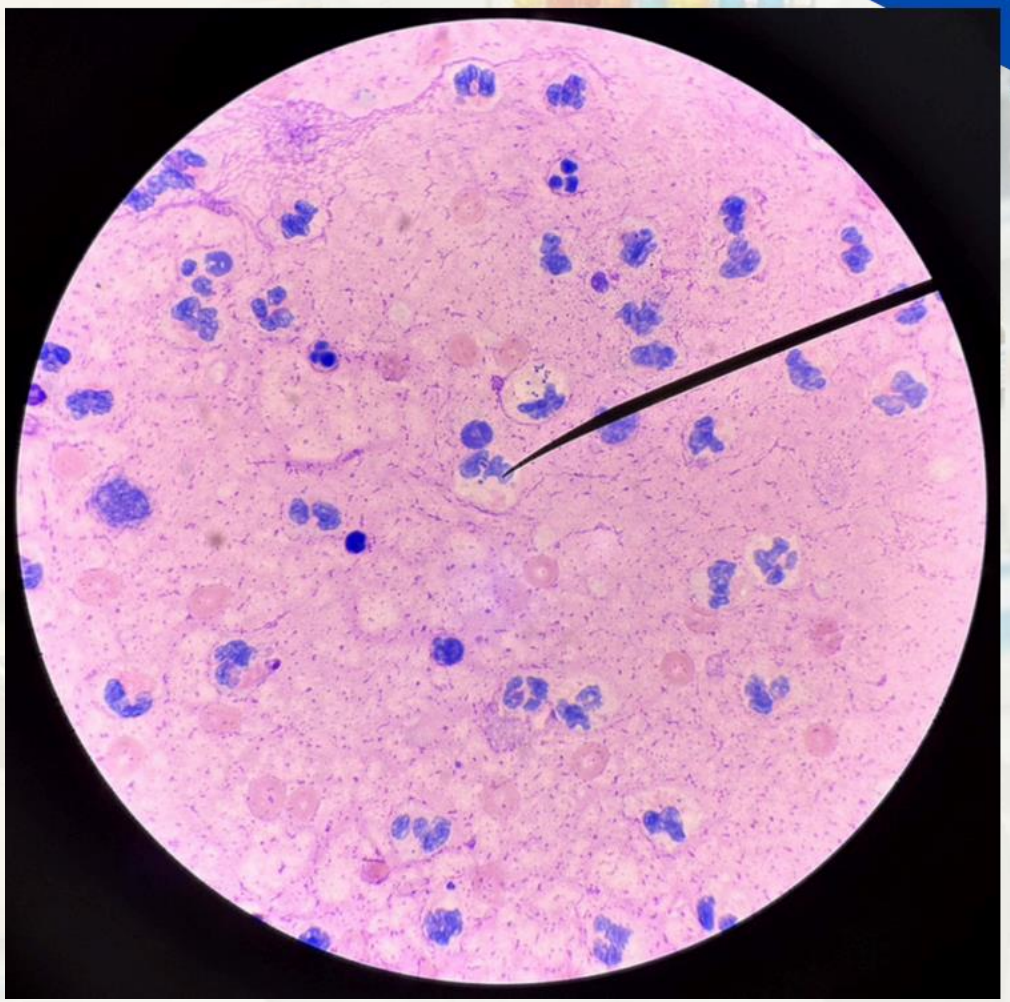
(A) neutrophils

(B) lymphocytes

(C) monocytes/histiocytes

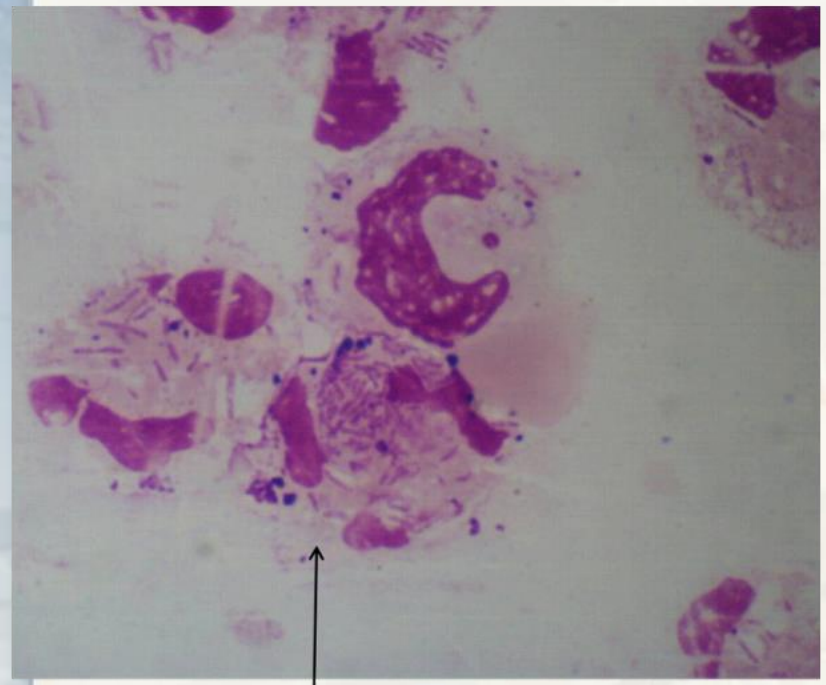
(D) synovial lining cells

A few red blood cells are almost always present in joint effusions

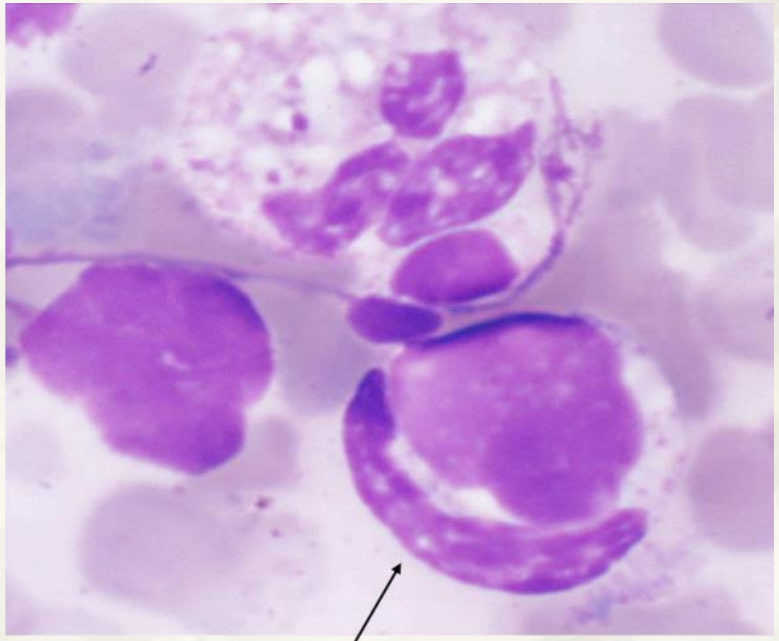


Differential cell count

เซลล์ที.พบได้ใน synovial fluid ที.มีภาวะผิดปกติ



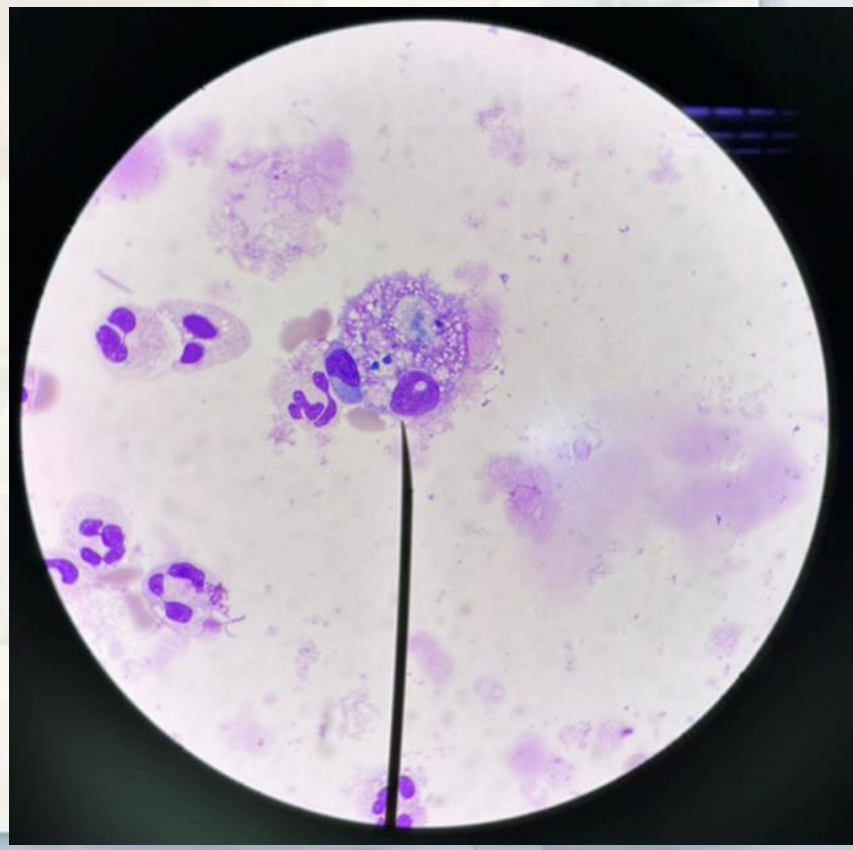
Neutrophil with intracellular bacteria



LE cell

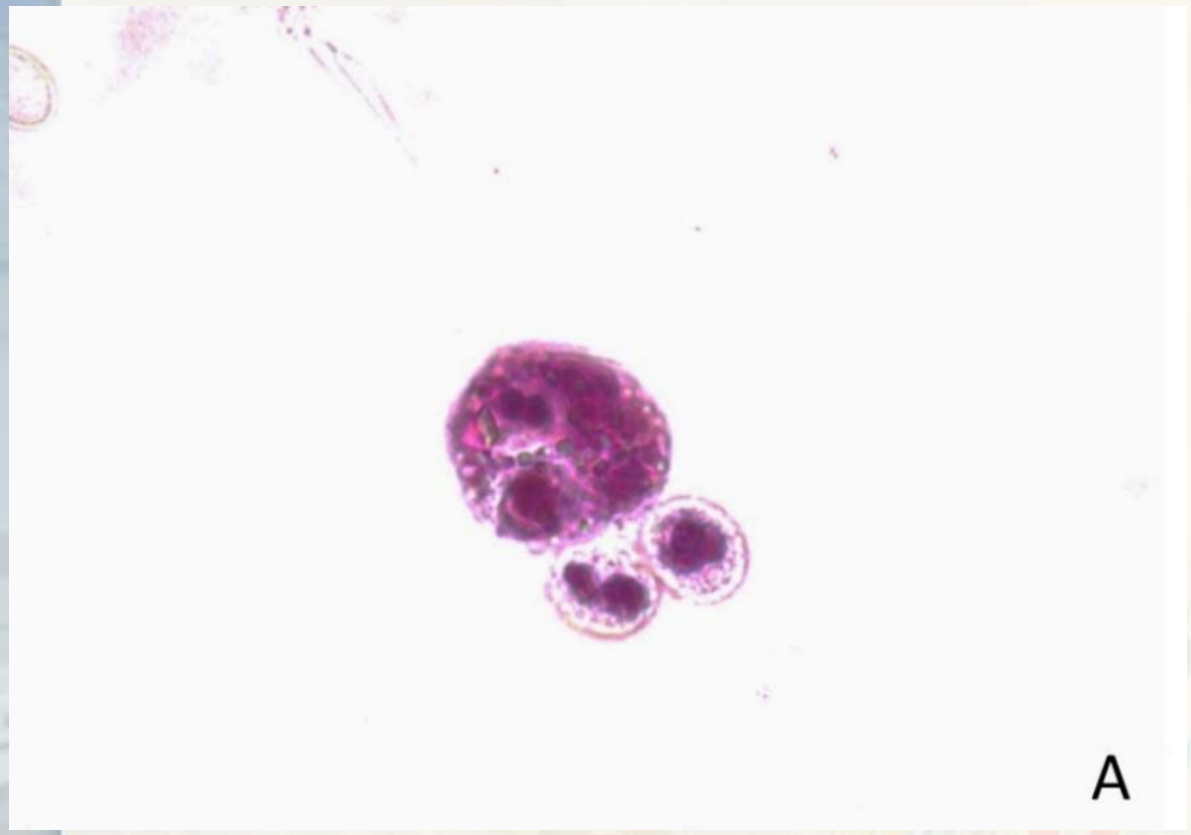
Malignant cells

Leukophage or Reiter cell



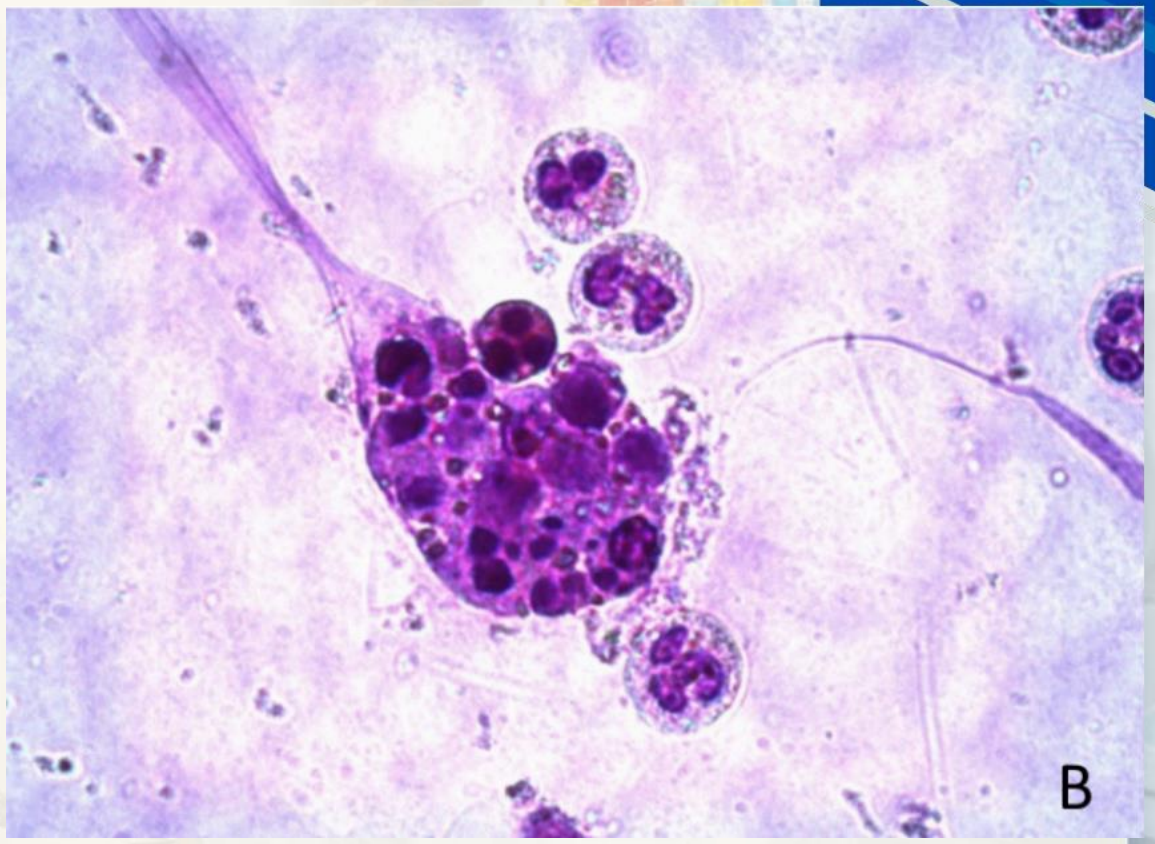
Differential cell count

เซลล์ที.พบได้ใน synovial fluid ที.มีภาวะผิดปกติ



A: Cytophagocytic large mononuclear cells (with numerous ingested pyknotic nuclei from polymorphonuclear cells

Reiter's cell

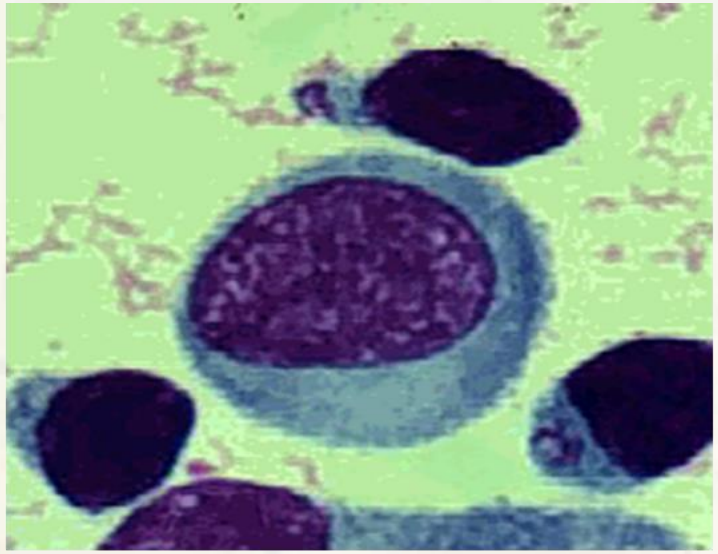


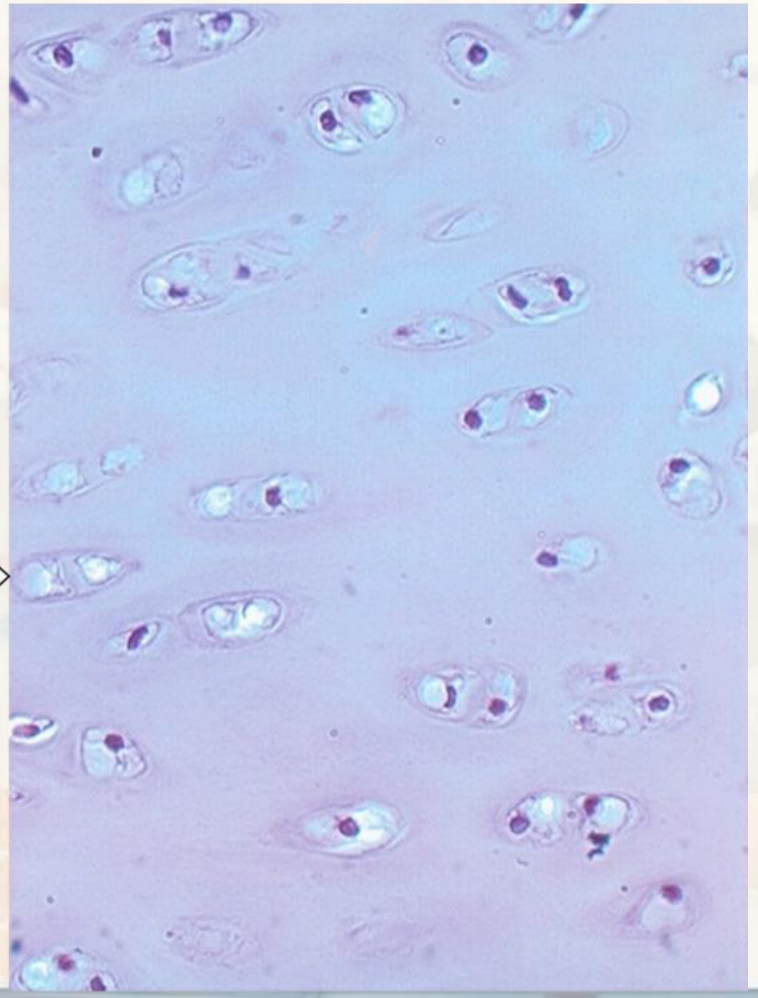
B: Cytophagocytic large mononuclear cells (with numerous ingested pyknotic nuclei from polymorphonuclear cells and crystals

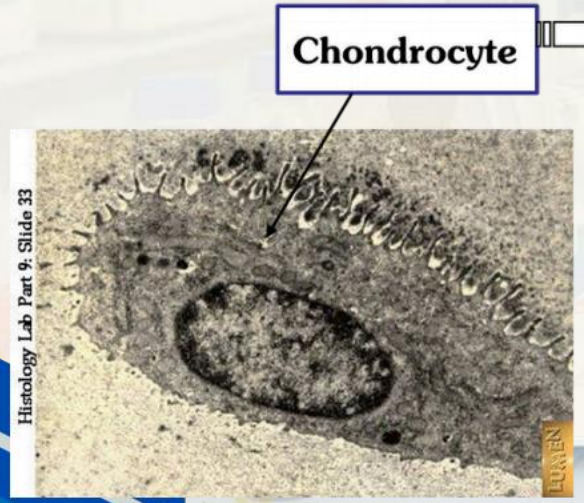
Oliviero et al.Annals of Clinical & Laboratory Science 2017; 47,: 253-9

Differential cell count

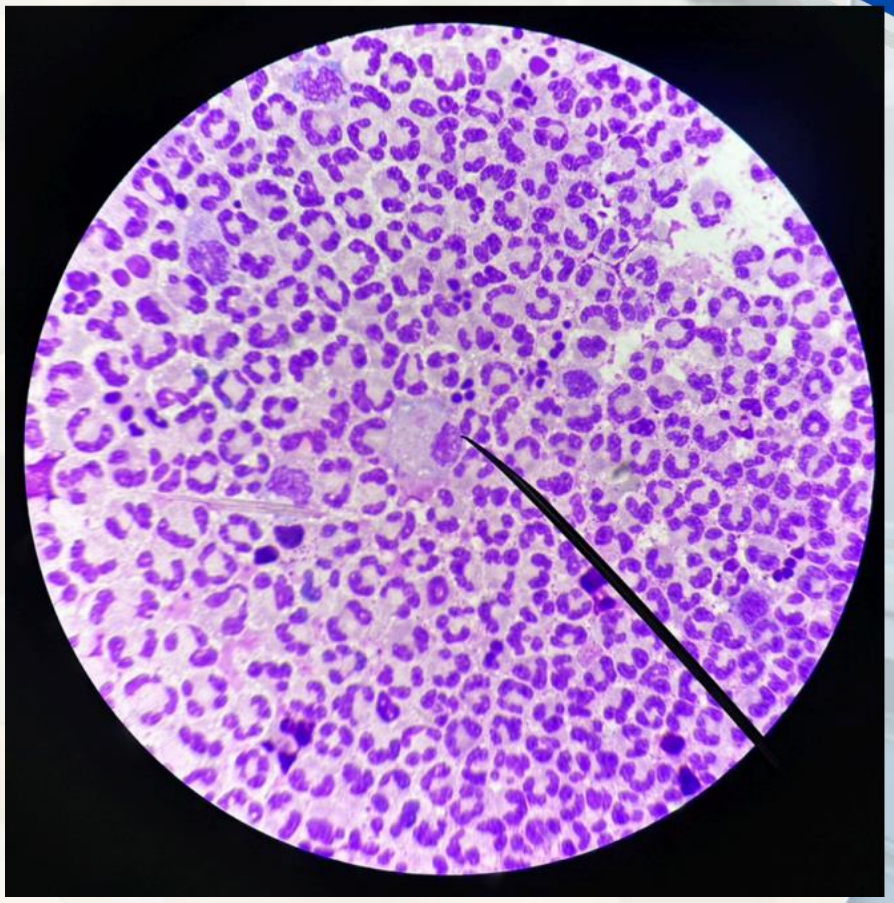
เซลล์ที.พบได้ใน synovial fluid ที.มีภาวะผิดปกติ





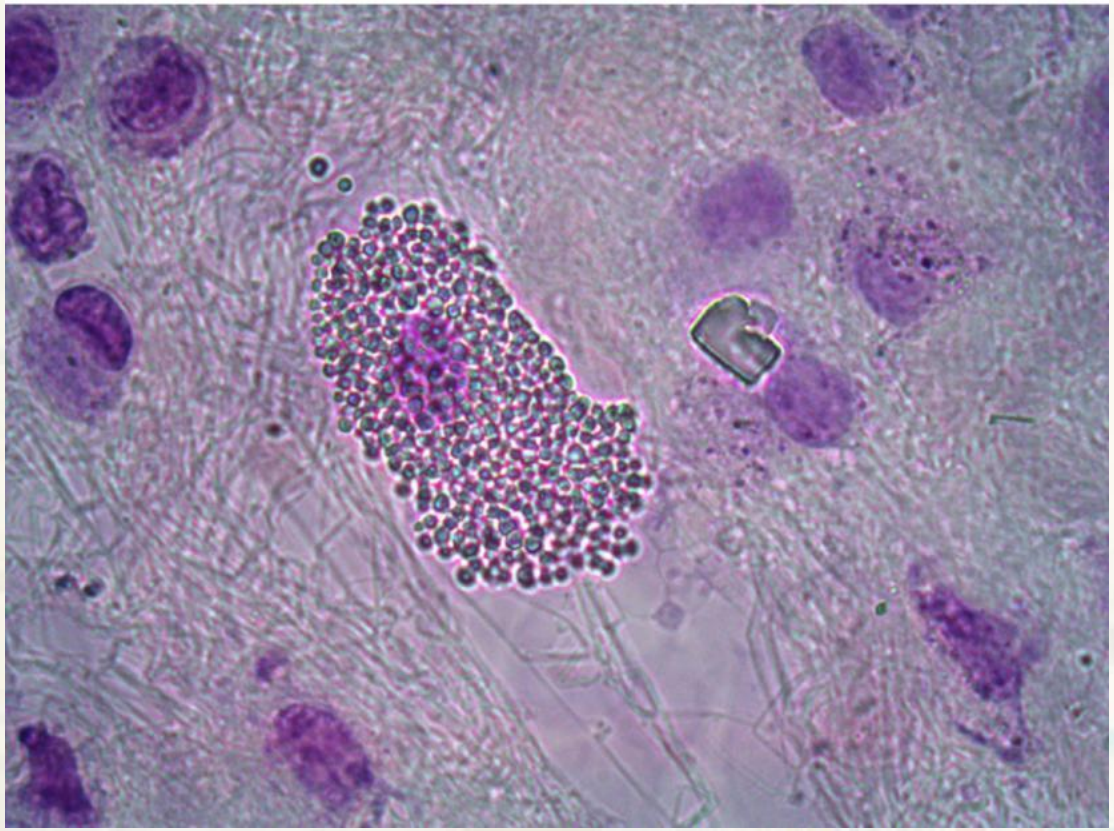


Neutrophilia

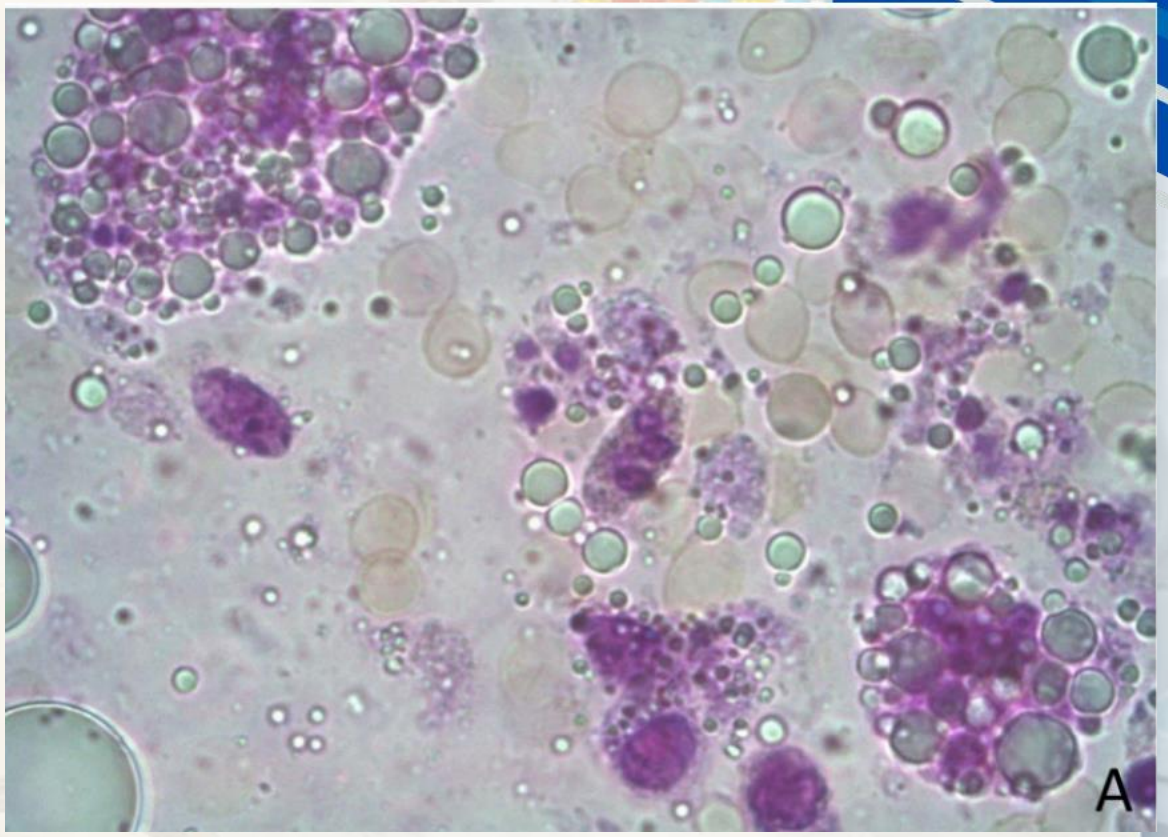


Differential cell count

เซลล์ที.พบได้ใน synovial fluid ที.มีภาวะผิดปกติ



A mast cell observed in a wet preparation of SF collected from a patient with rheumatoid arthritis. Supravital staining, ordinary light, X1000.



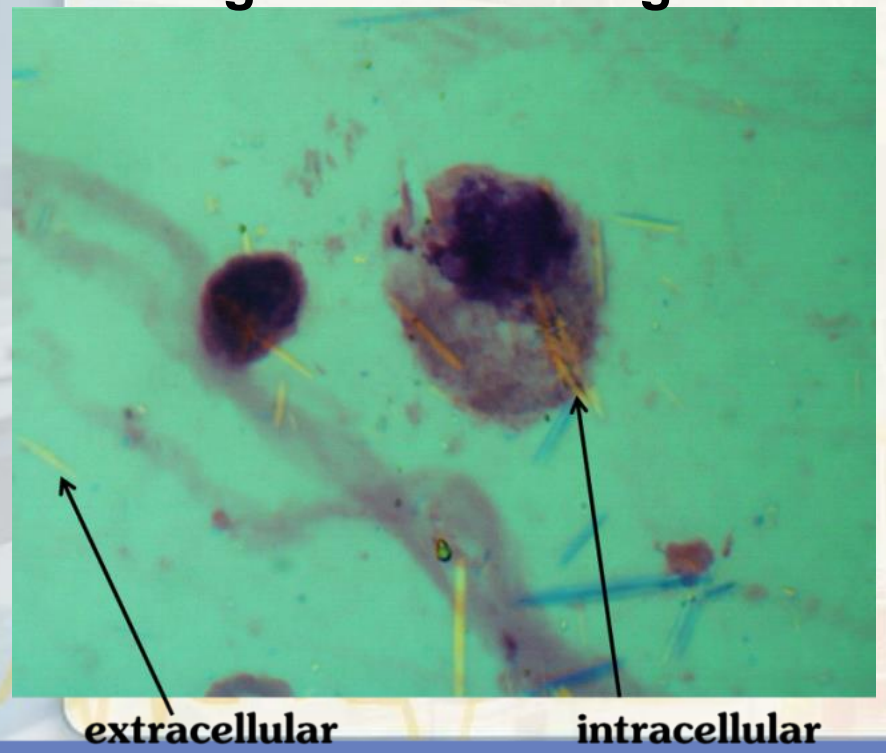
Abundant extracellular neutral fat lipid crystals in synovial effusion from an early-onset knee monoarthritis. Supravital staining, ordinary light, X1000

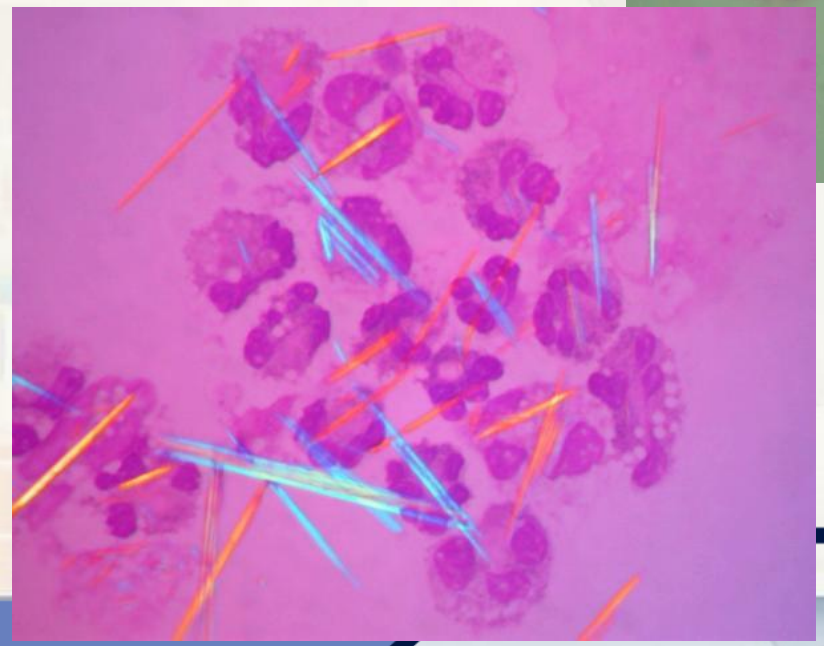
Oliviero et al.Annals of Clinical & Laboratory Science 2017; 47,: 253-9

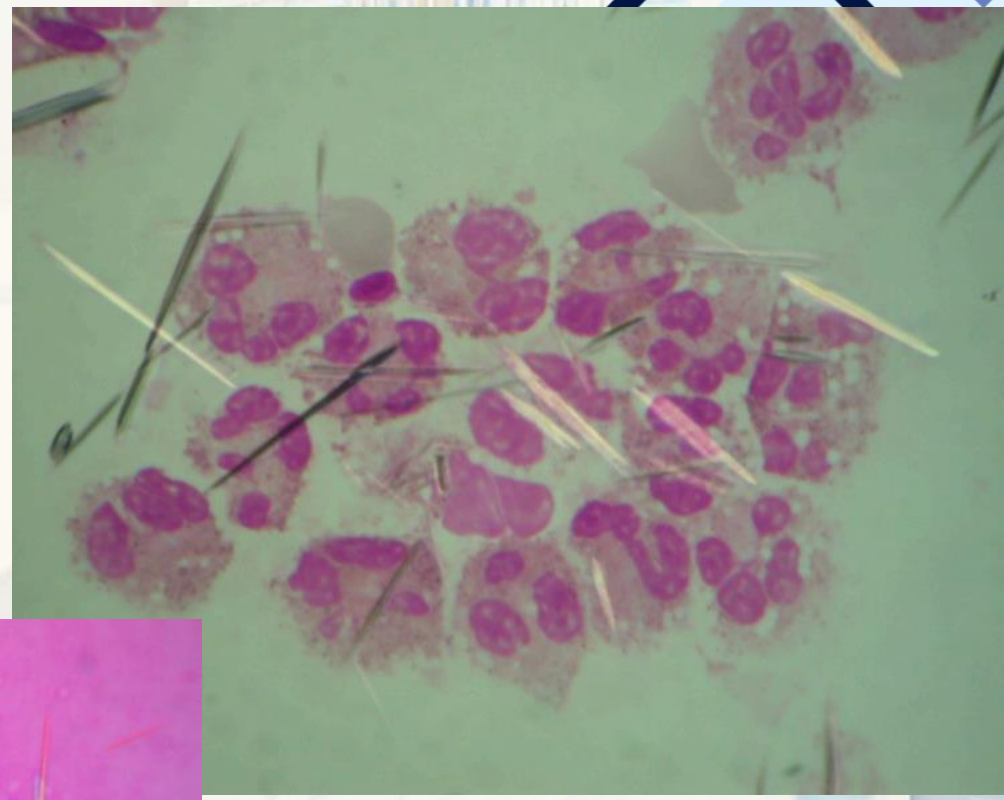
Crystals ที่.พบใน synovial fluid

Monosodium urate (MSU) crystal

. Needle-like crystals with pointed ends
. Free floating: extracellular
. Intracellular: acute stage of the disease
• negative birefringent

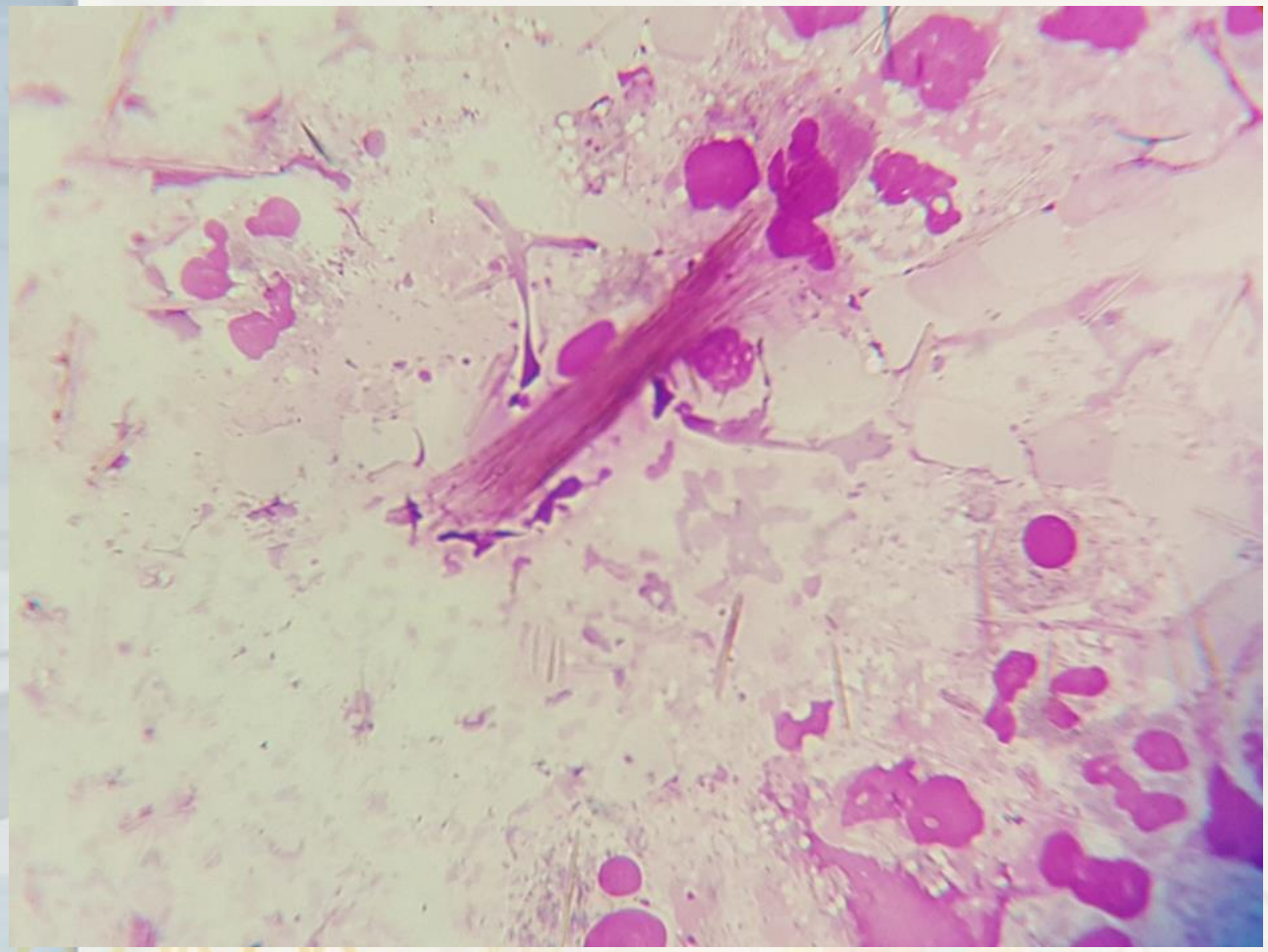


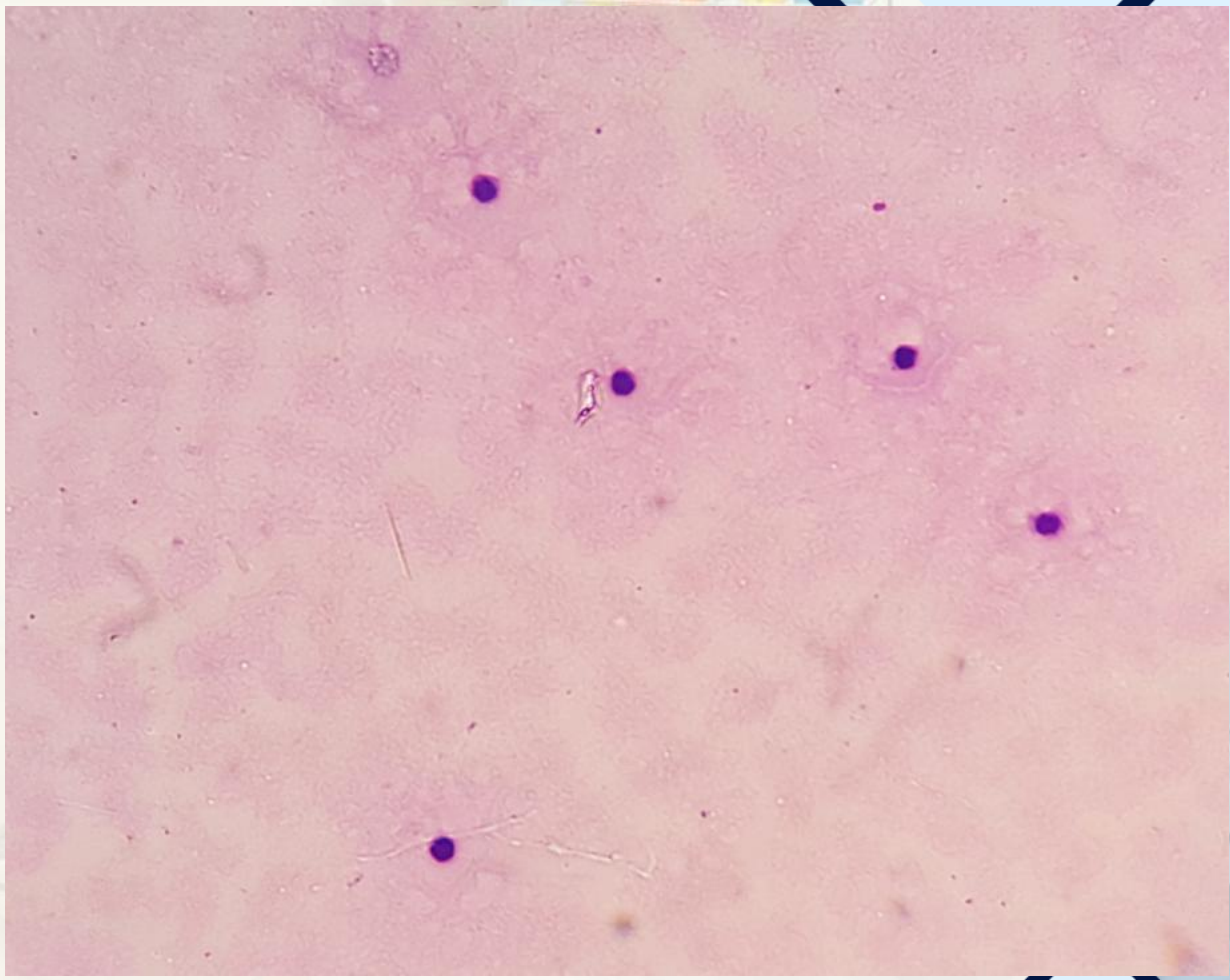




Crystals ที่.พบใน synovial fluid

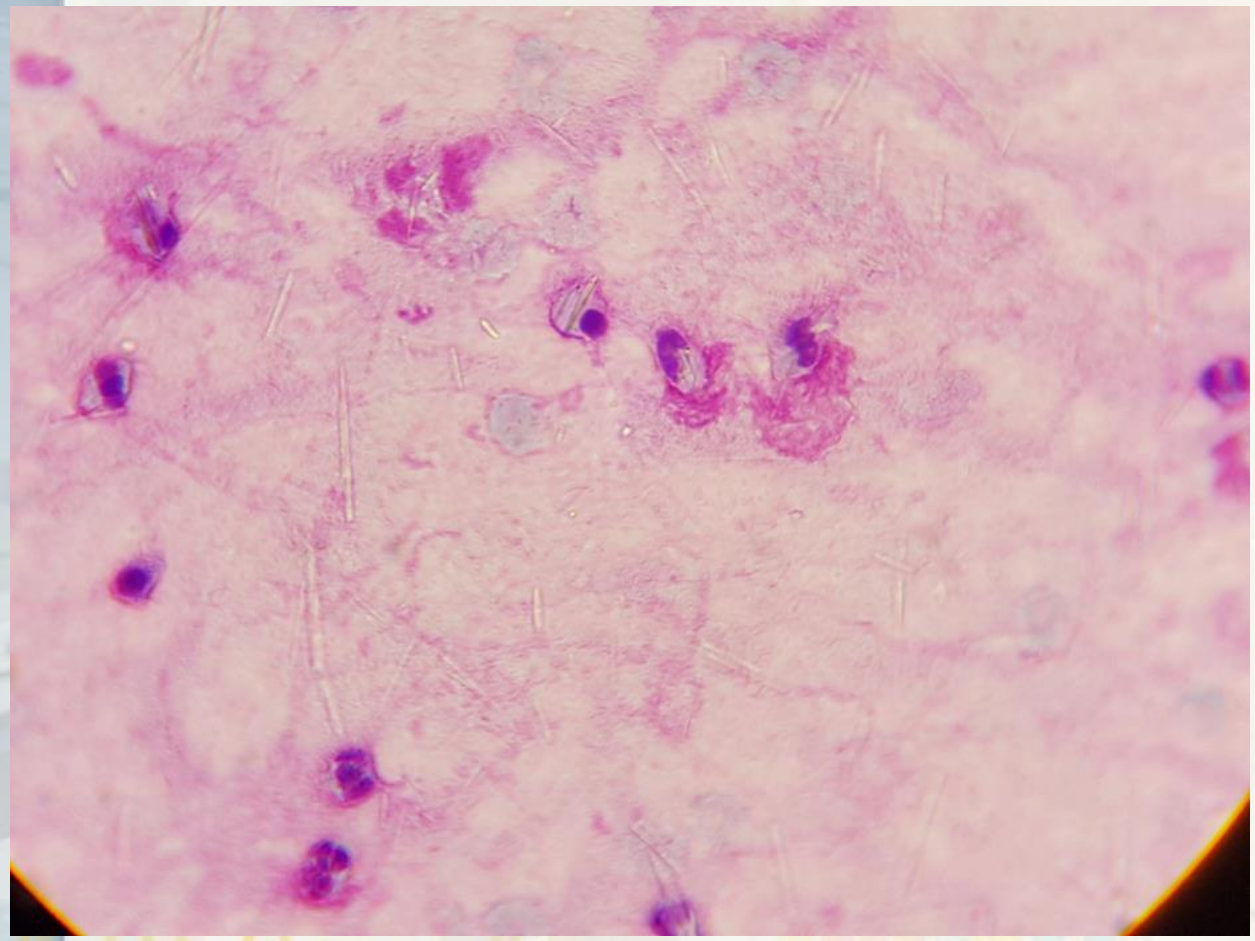
Monosodium urate (MSU) crystal



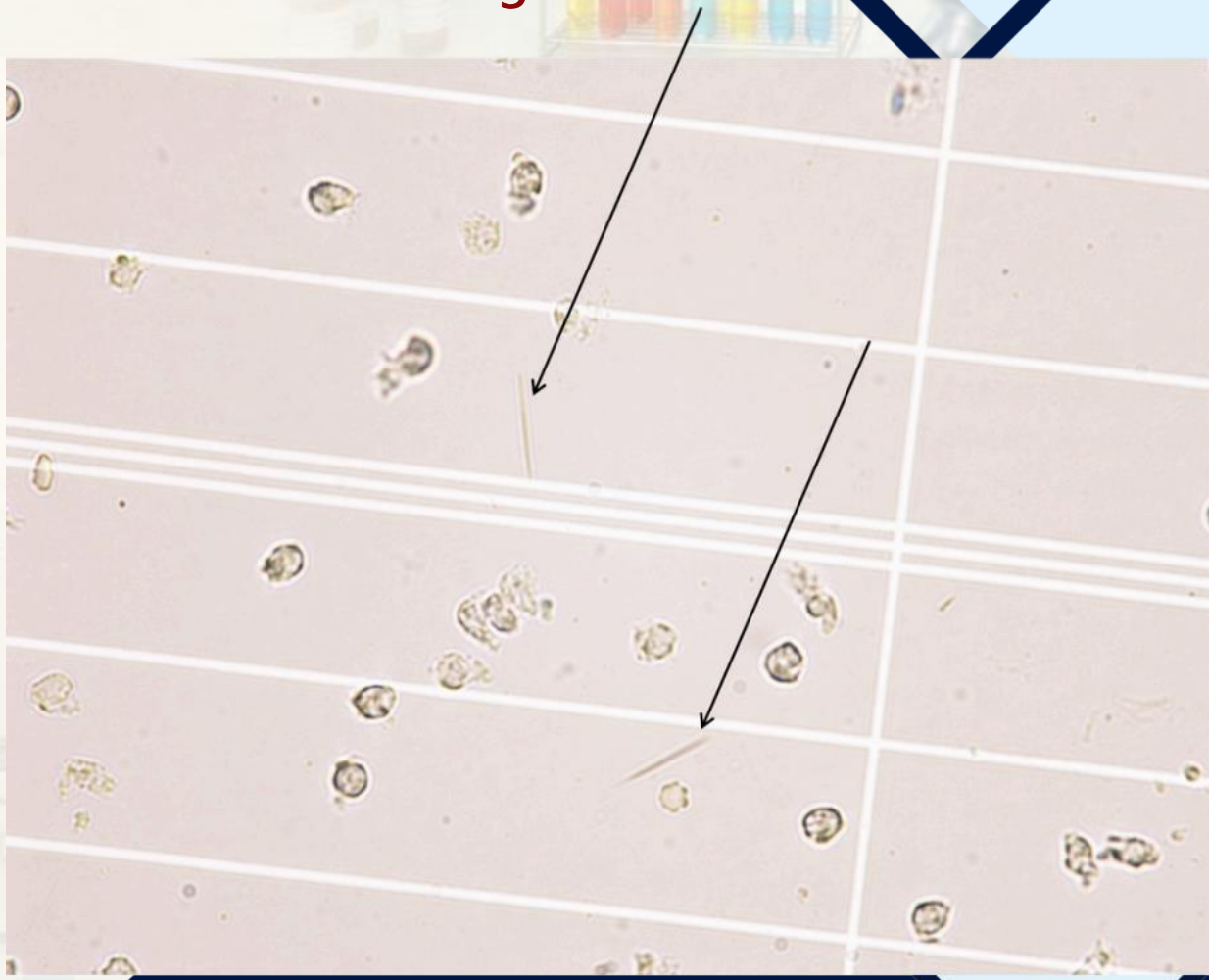


Crystals ที่.พบใน synovial fluid

Monosodium urate (MSU) crystal

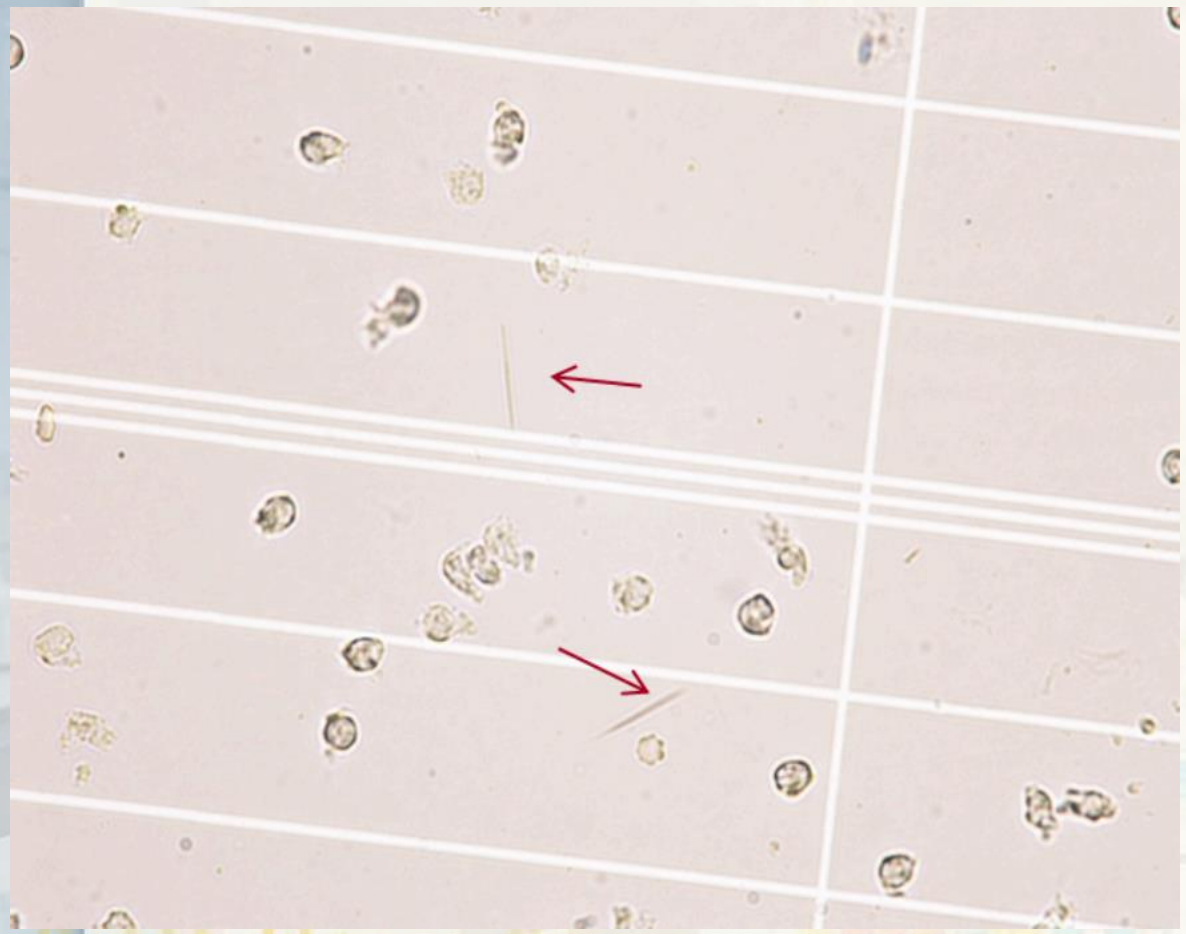


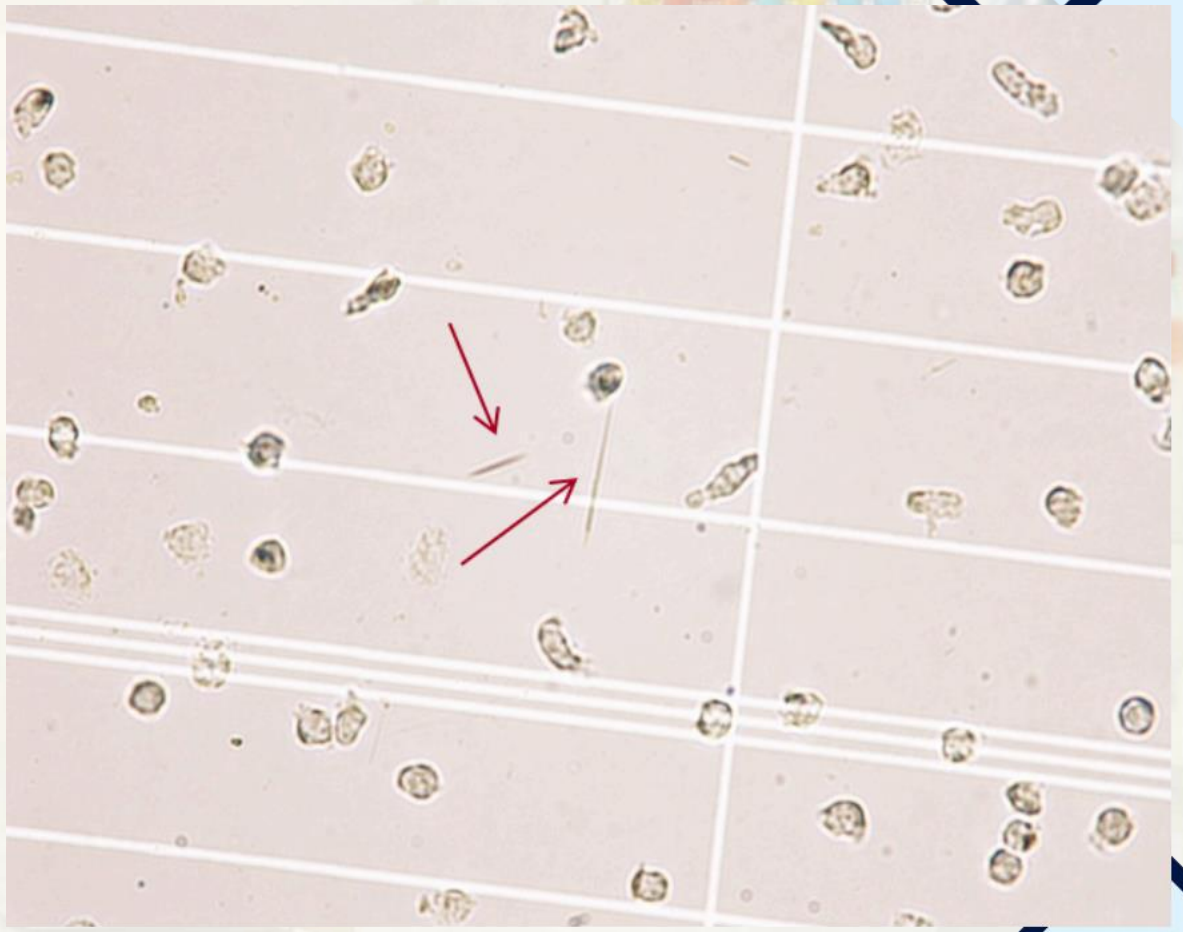
MSU detected during cell count



Crystals ที่.พบใน synovial fluid

- MSU detected during cell count

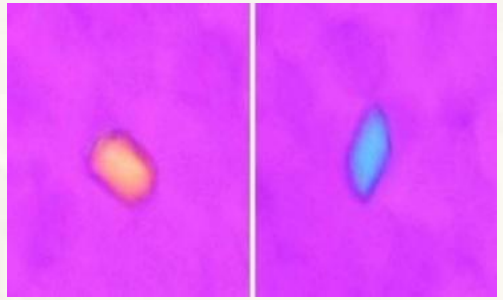


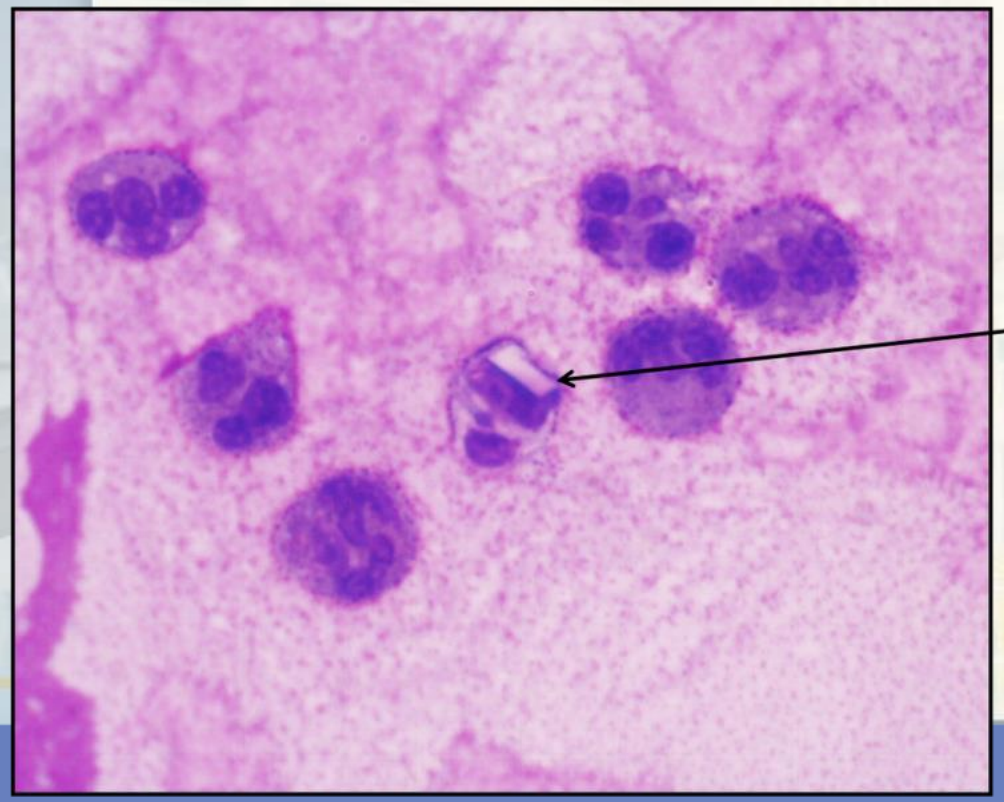


Crystals ที่.พบใน synovial fluid

Calcium pyrophosphate or calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)

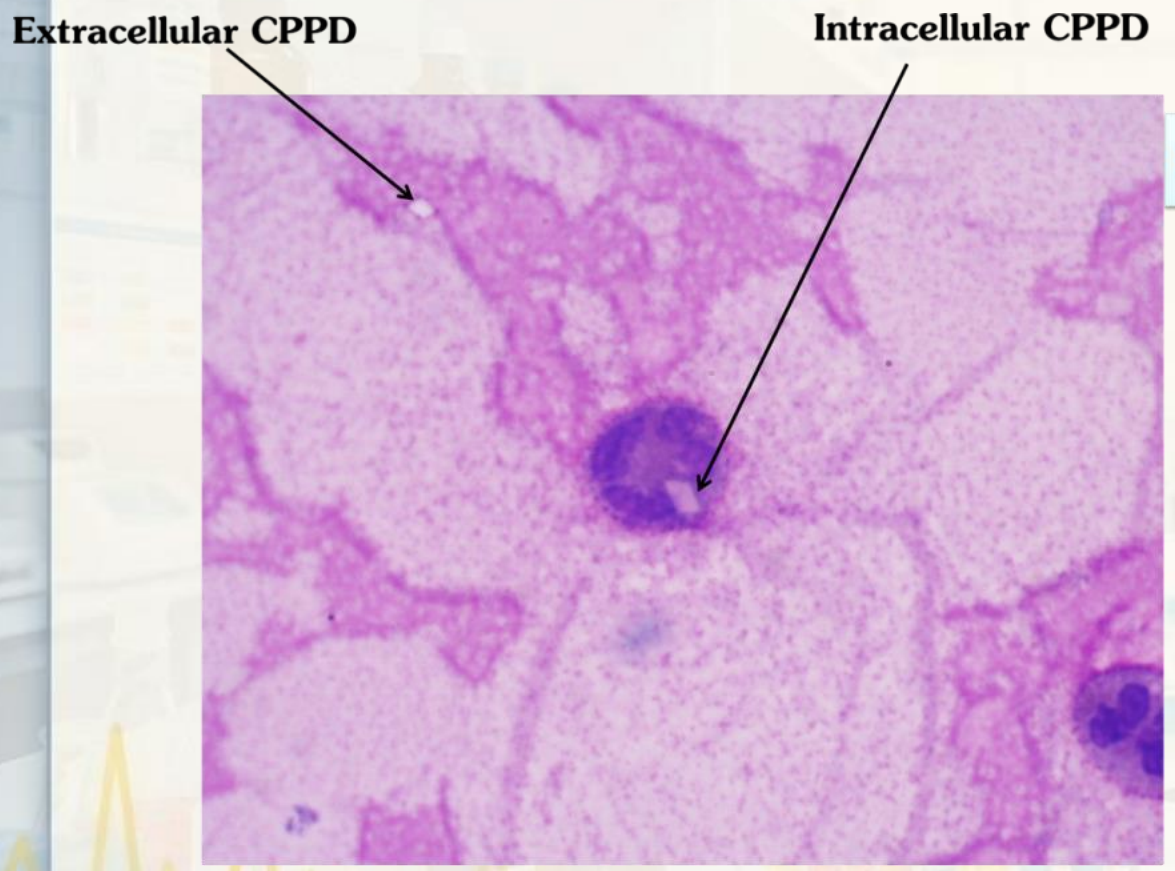
- Small
- Blunt
- Rodlike or rhomboid
- positive birefringent

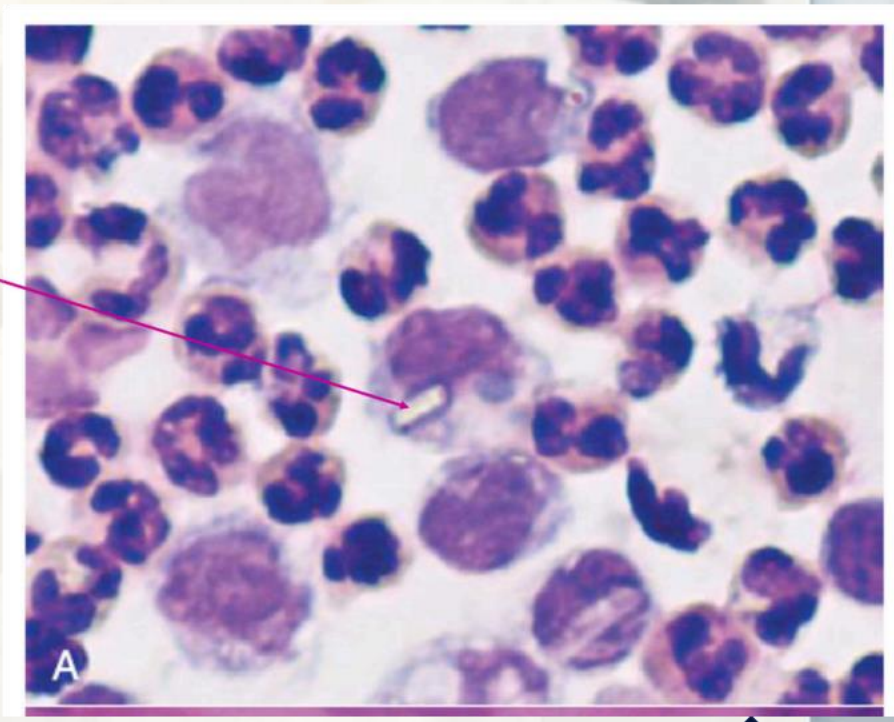




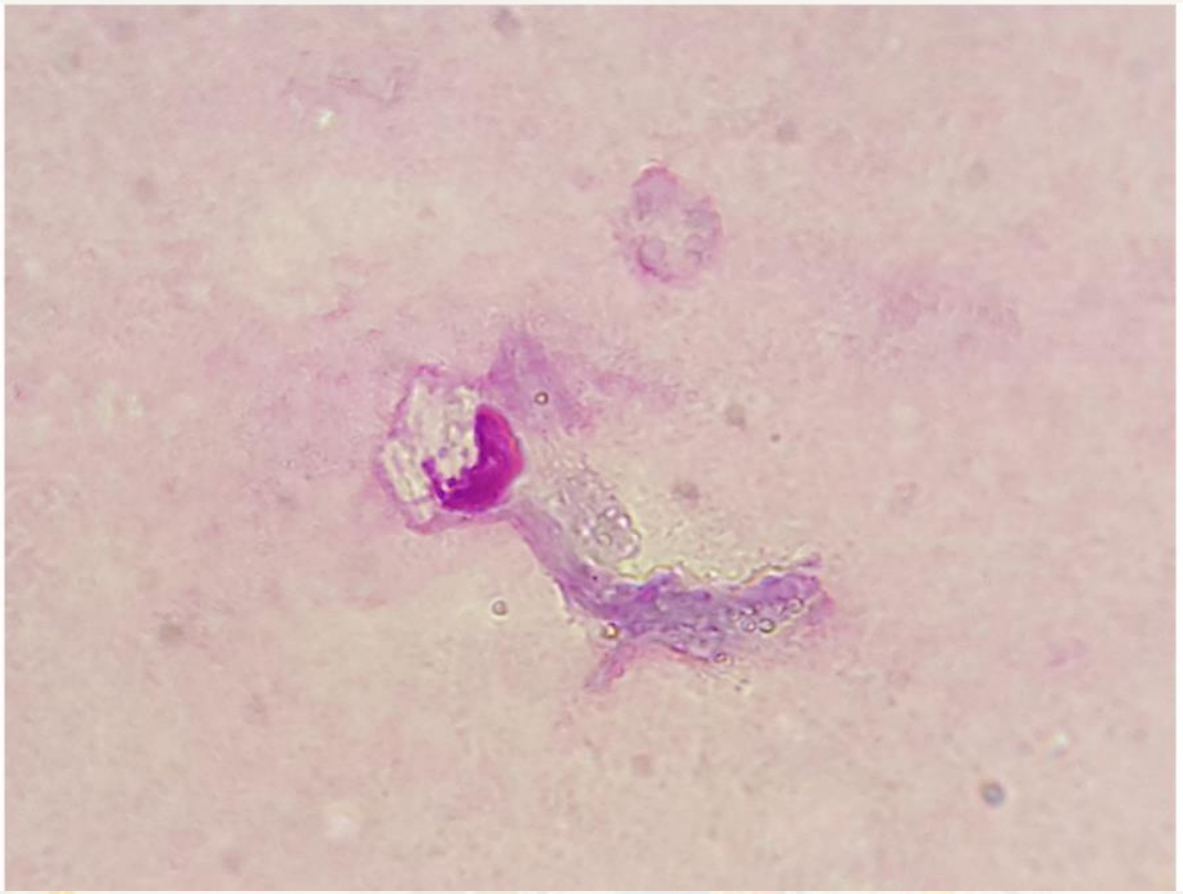
Crystals ที่.พบใน synovial fluid

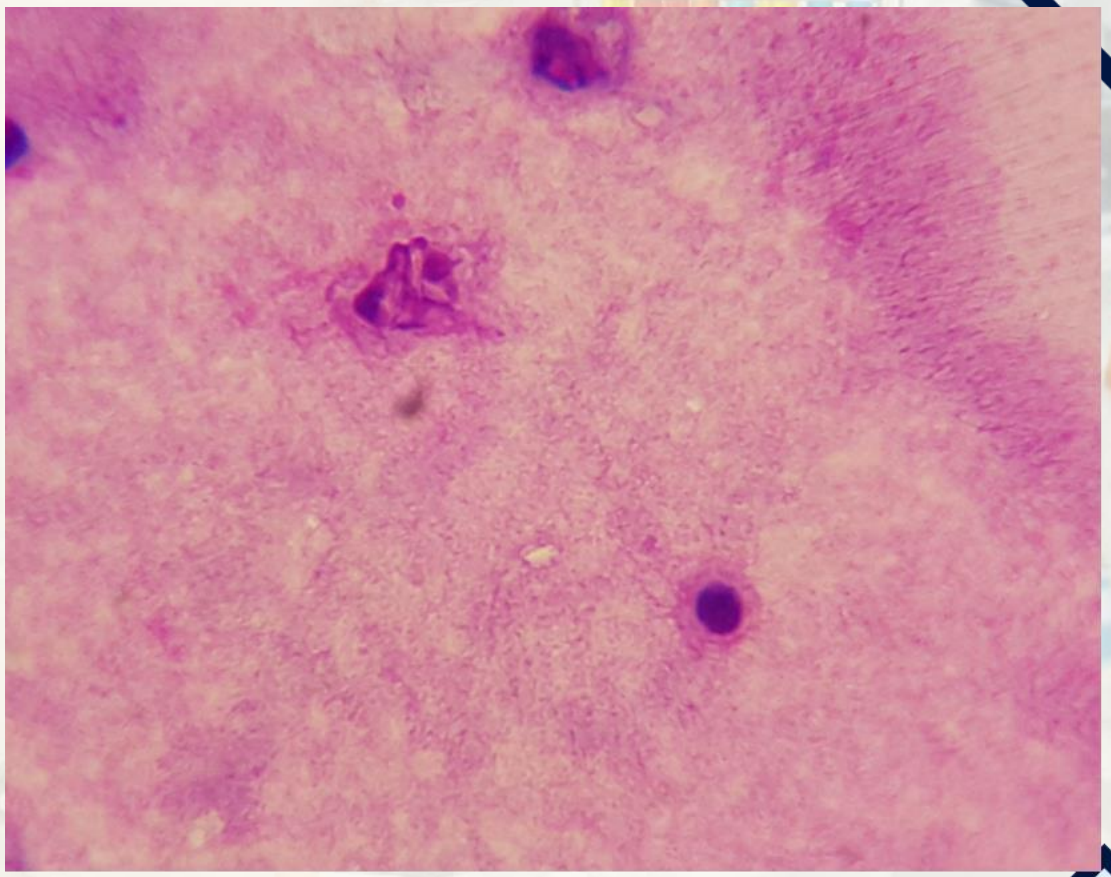
- Calcium pyrophosphate or calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)





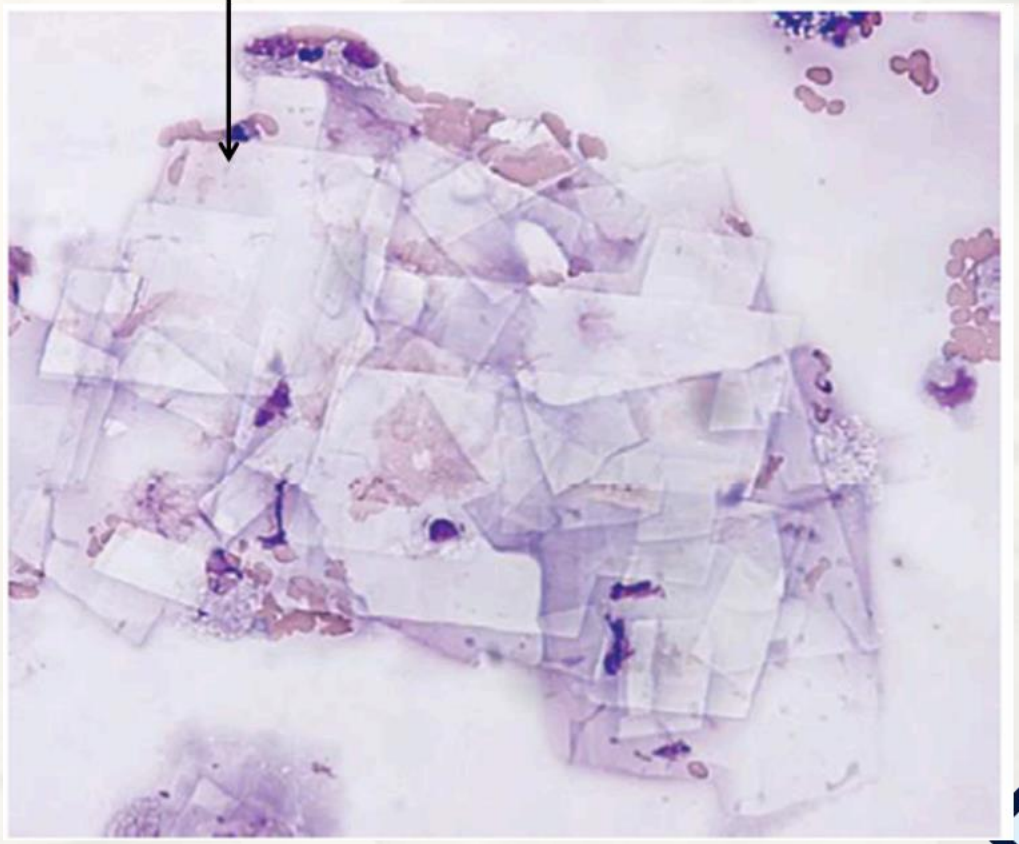
Crystals ที.พบใน synovial fluid





Crystals ที่.พบใน synovial fluid

- Cholesterol crystals in joint fluid; brightfield microscope



Crystals ที่.พบใน synovial fluid

Calcium oxalate

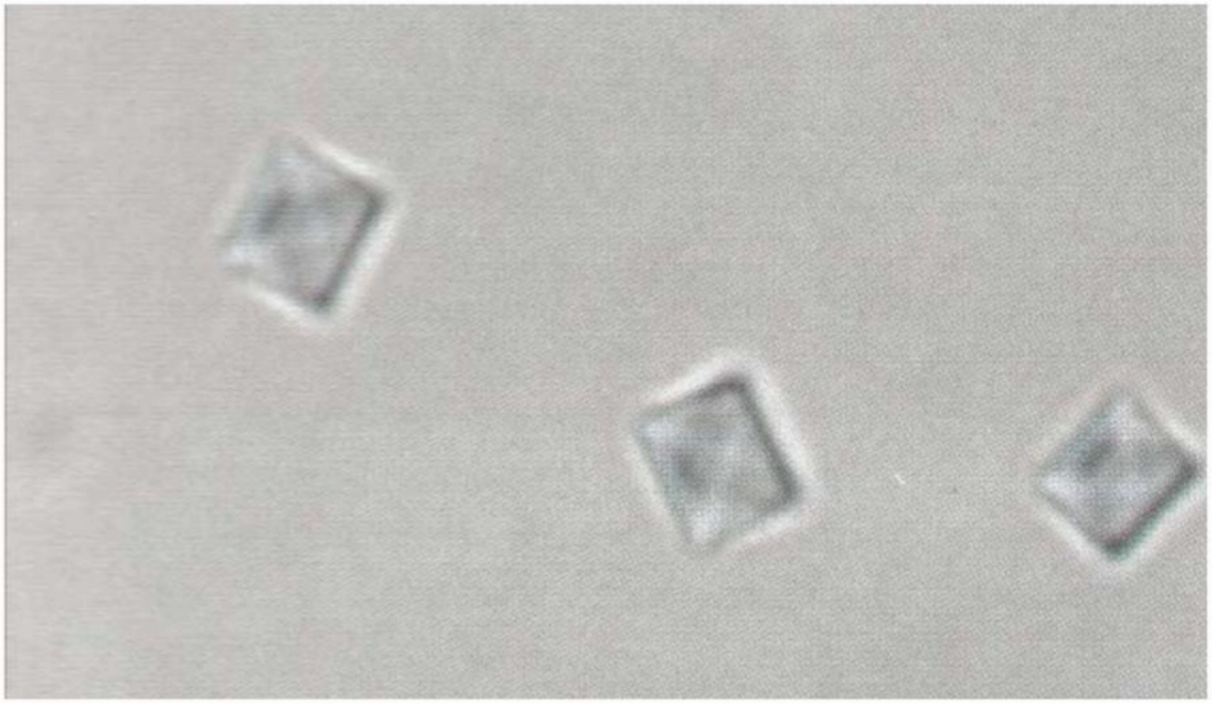
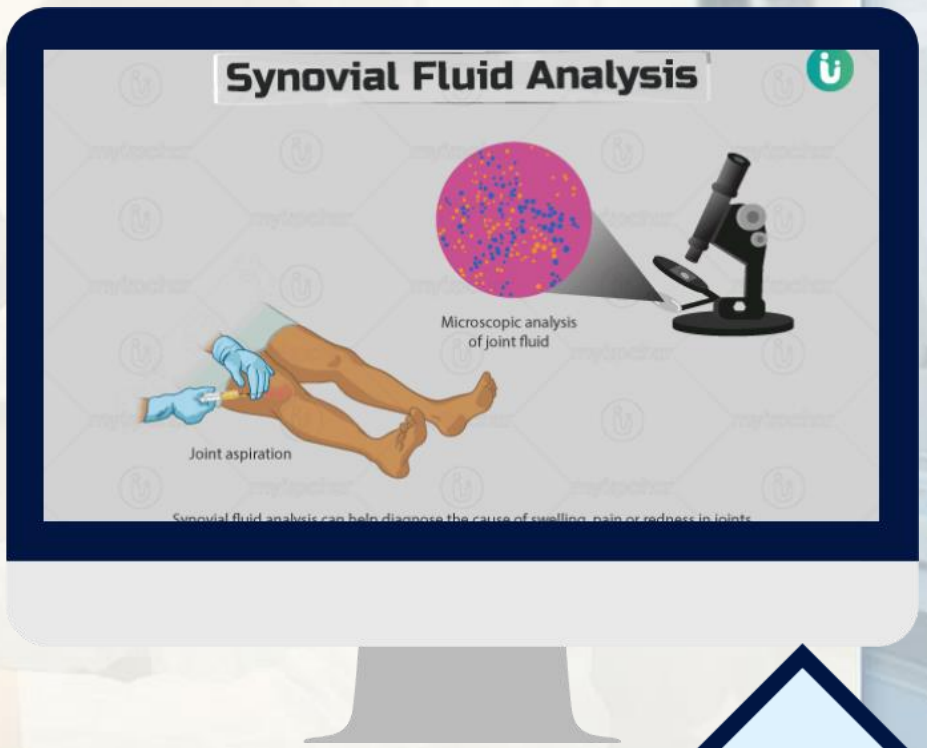


Fig. 4 Typical calcium oxalate (CO) crystals obtained from a synovial fluid effusion in a patient on long-term dialysis (magnification × 1800, original magnification × 400). Reproduced with permission from ref. 94. (Copyright 1992, Ciba-Geigy Corp.)

ข้อควรระวังในแยกชนิดของ crystals ใน synovial fluid

- จำนวนของ crystal ที.จะตรวจพบ ในบางโรคมีจำนวนน้อยและขนาดเล็ก
- Crystals อาจมีลักษณะที.คล้ายกันมาก
- Extracellular crystals อาจจะอยู่ใน fibrin หรือเศษเซลล์ ทำให้ตรวจไม่พบ
- Artifacts หลายอย่างที.มีคุณสมบัติ birefringent อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกชนิดของ crystal ด้วยกล้อง polarise
- ในบางครั้ง infectious arthritis และ crystal synovitis จะให้ผลการตรวจ สเมียร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที.คล้ายกันมาก ต้องแยกกันด้วยการตรวจพบ crystals
- อุณหภูมิ และ pHมีผลต่อการเกิดและการละลายของผลึก



การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

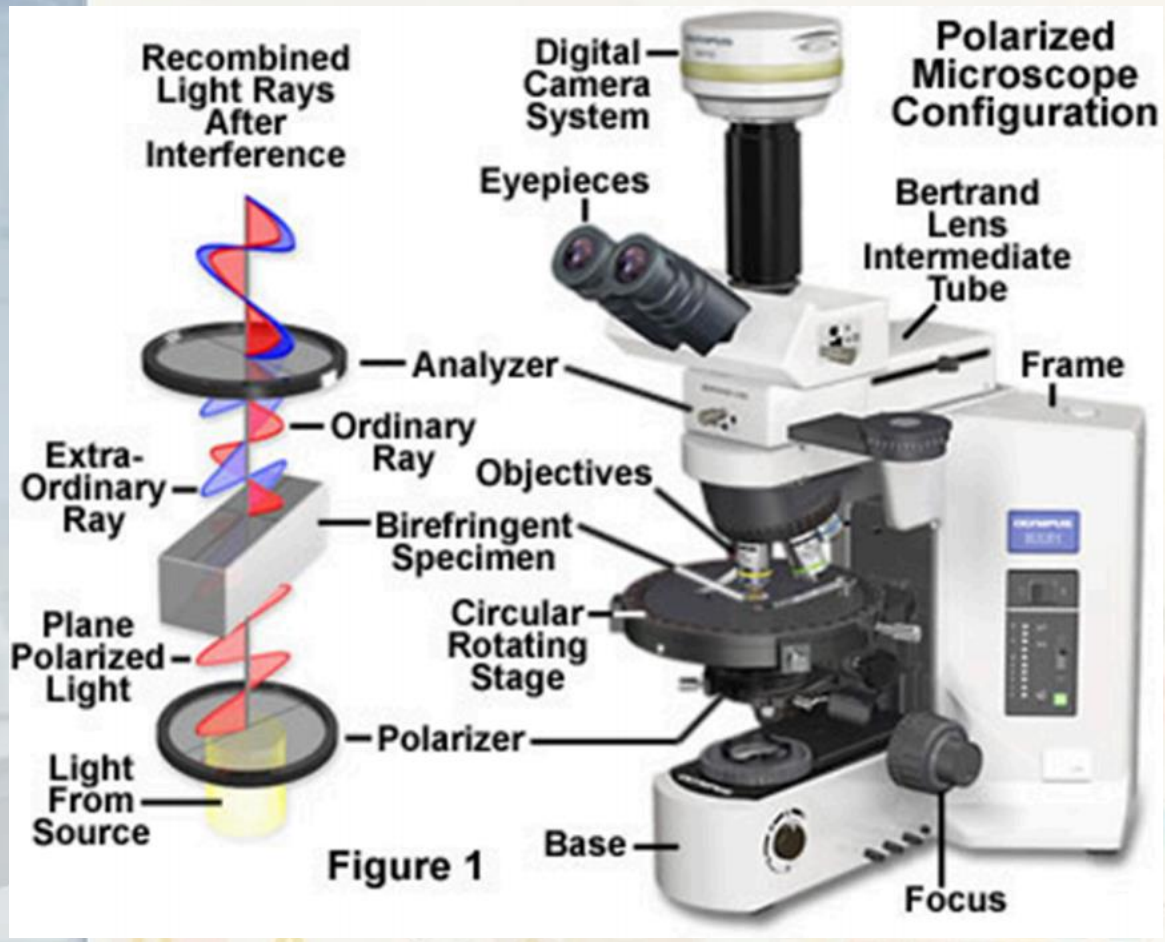
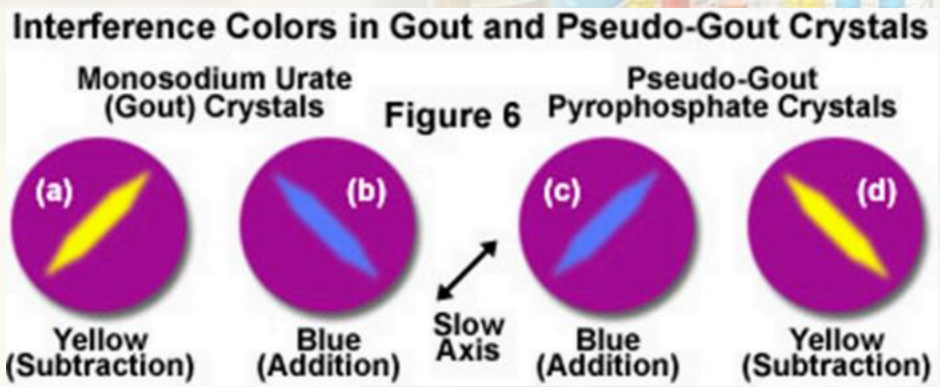
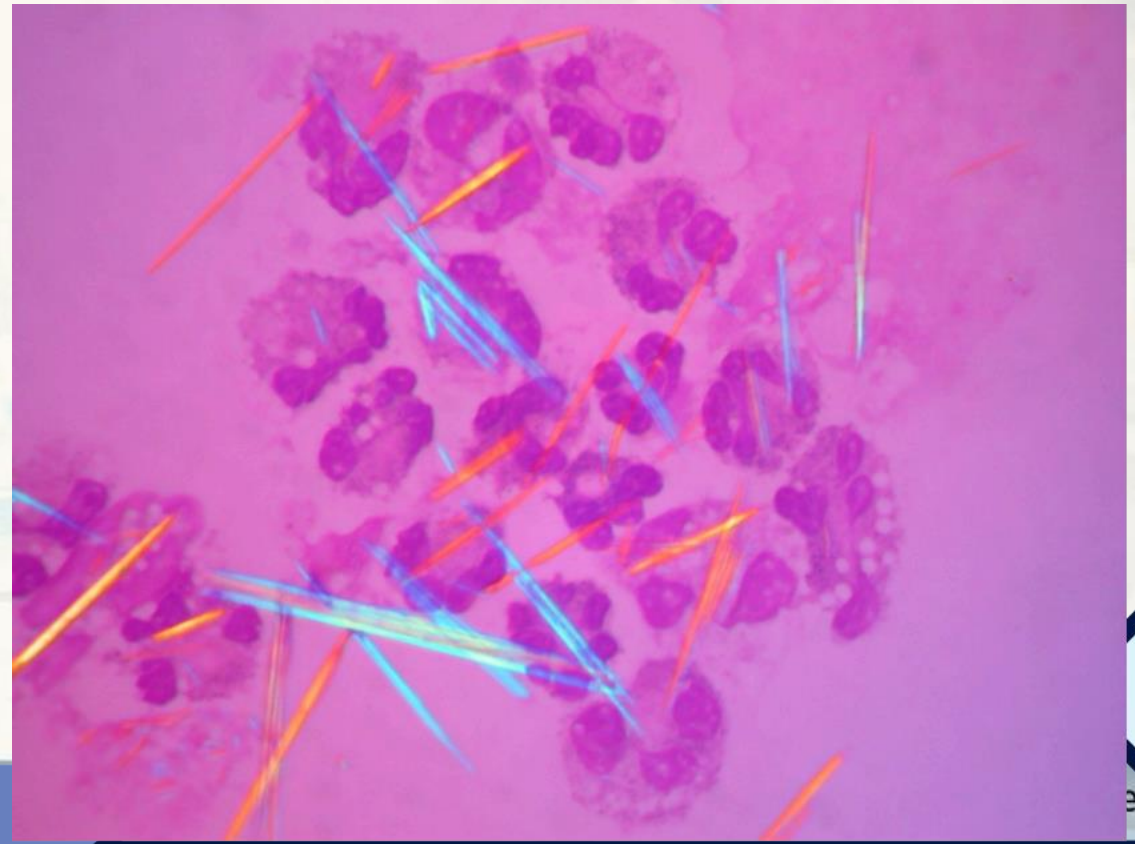
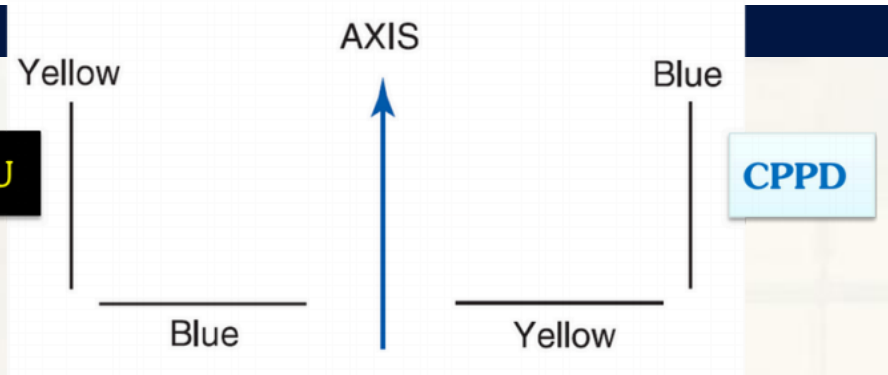


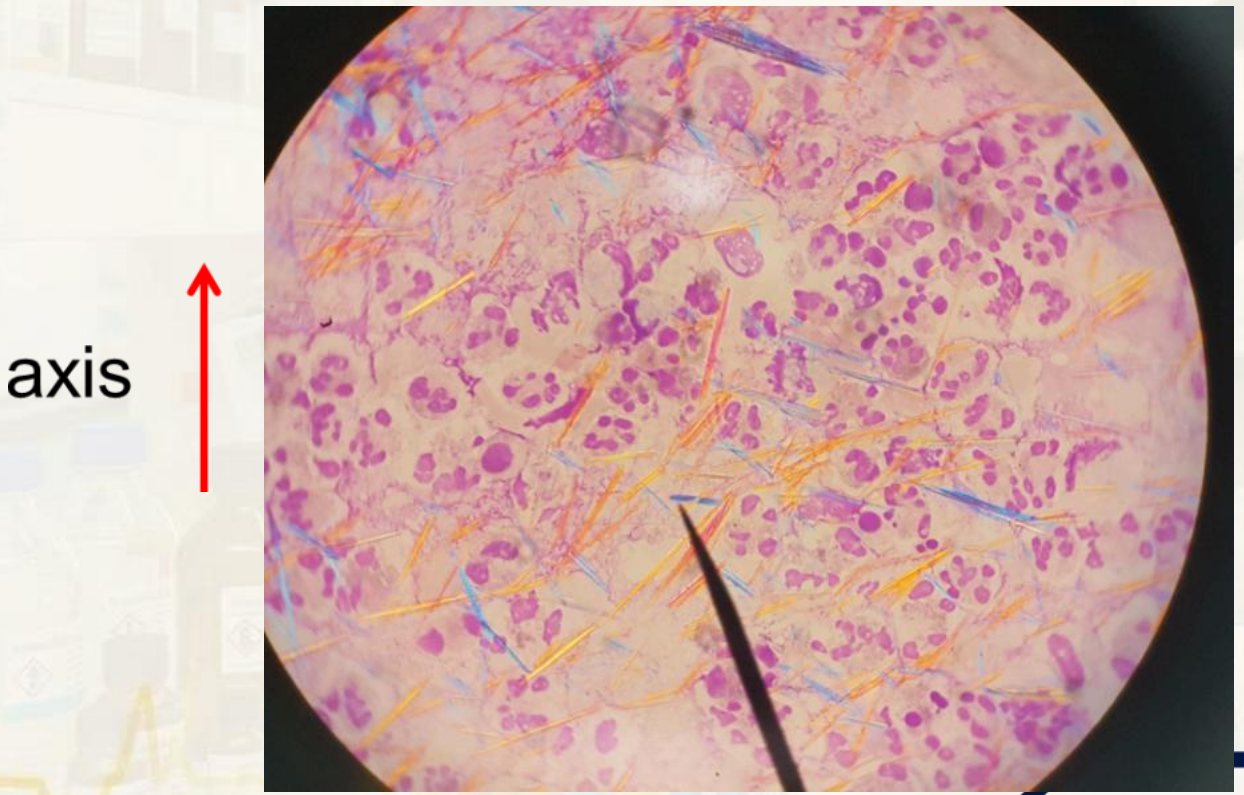
Figure 1





การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

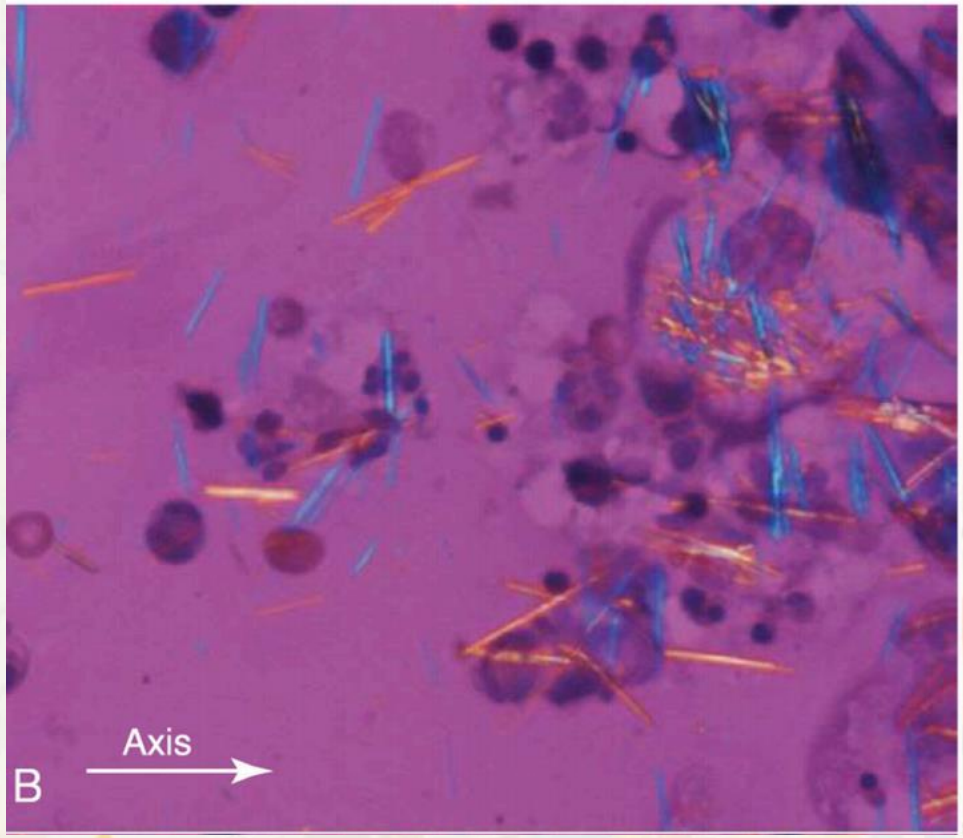


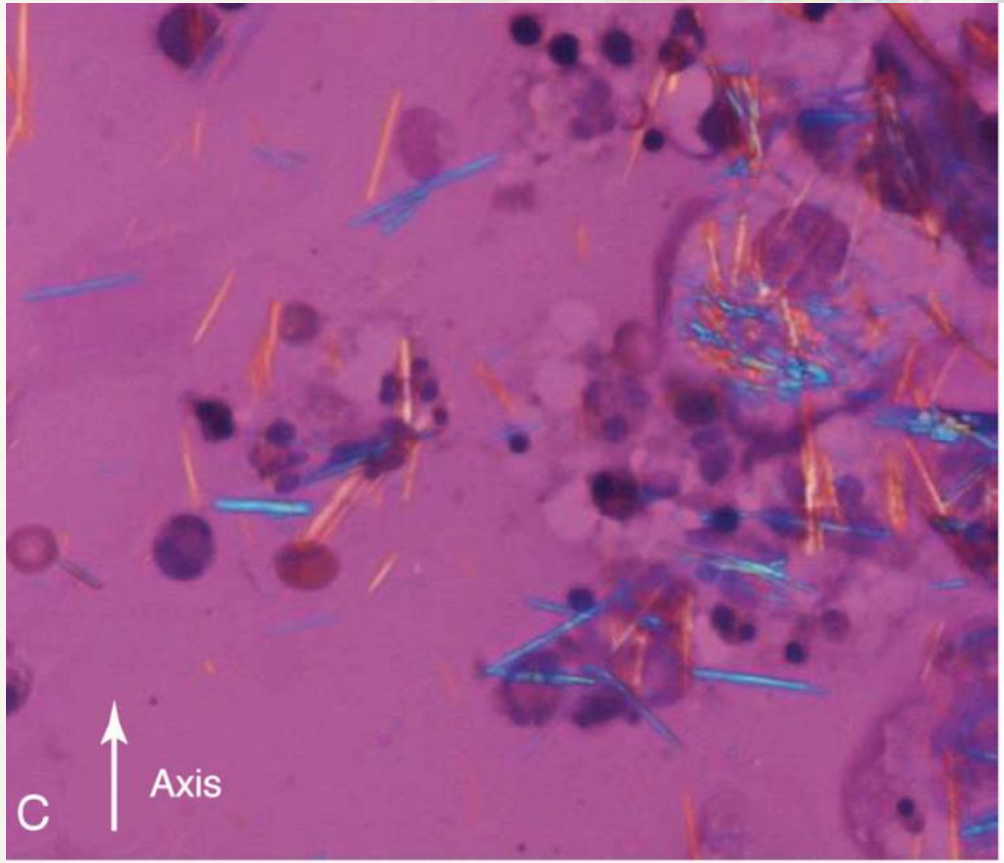


Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

MSU

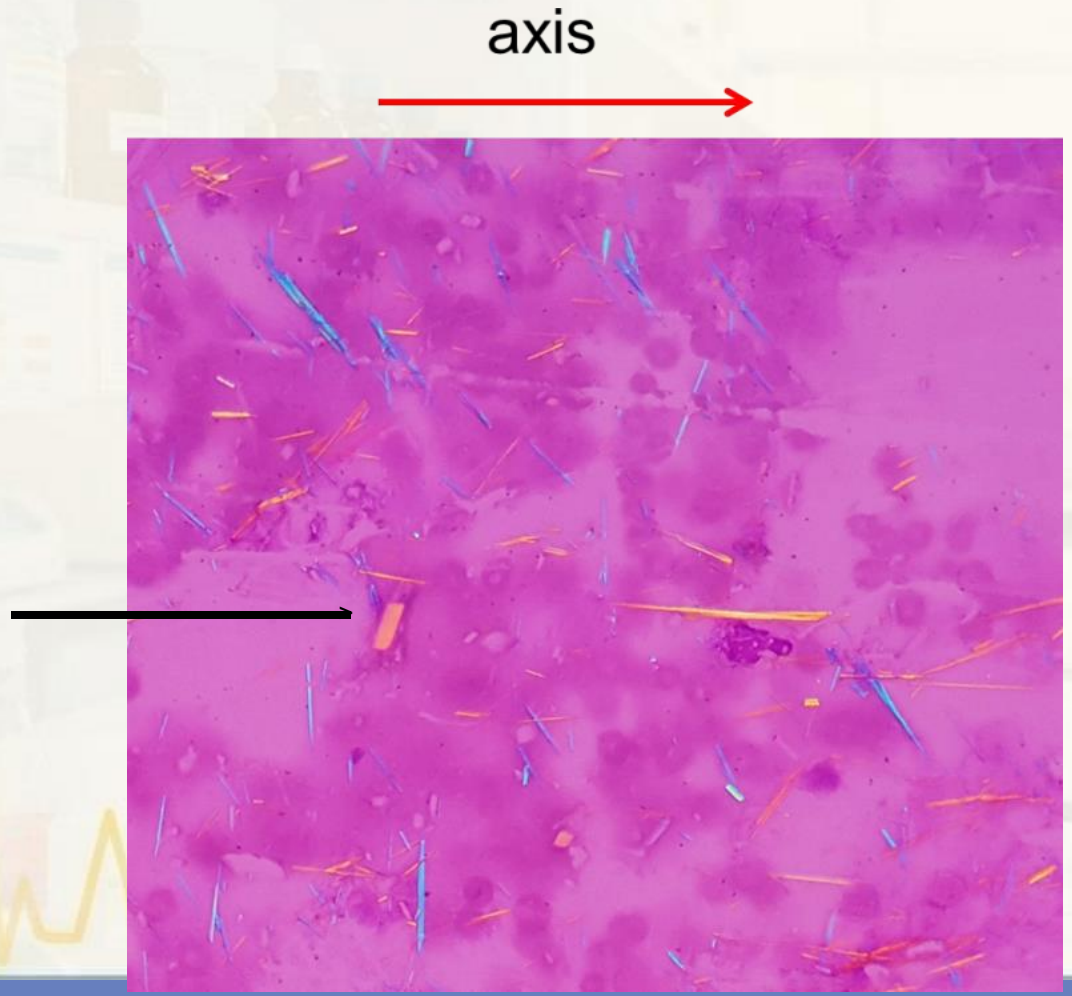


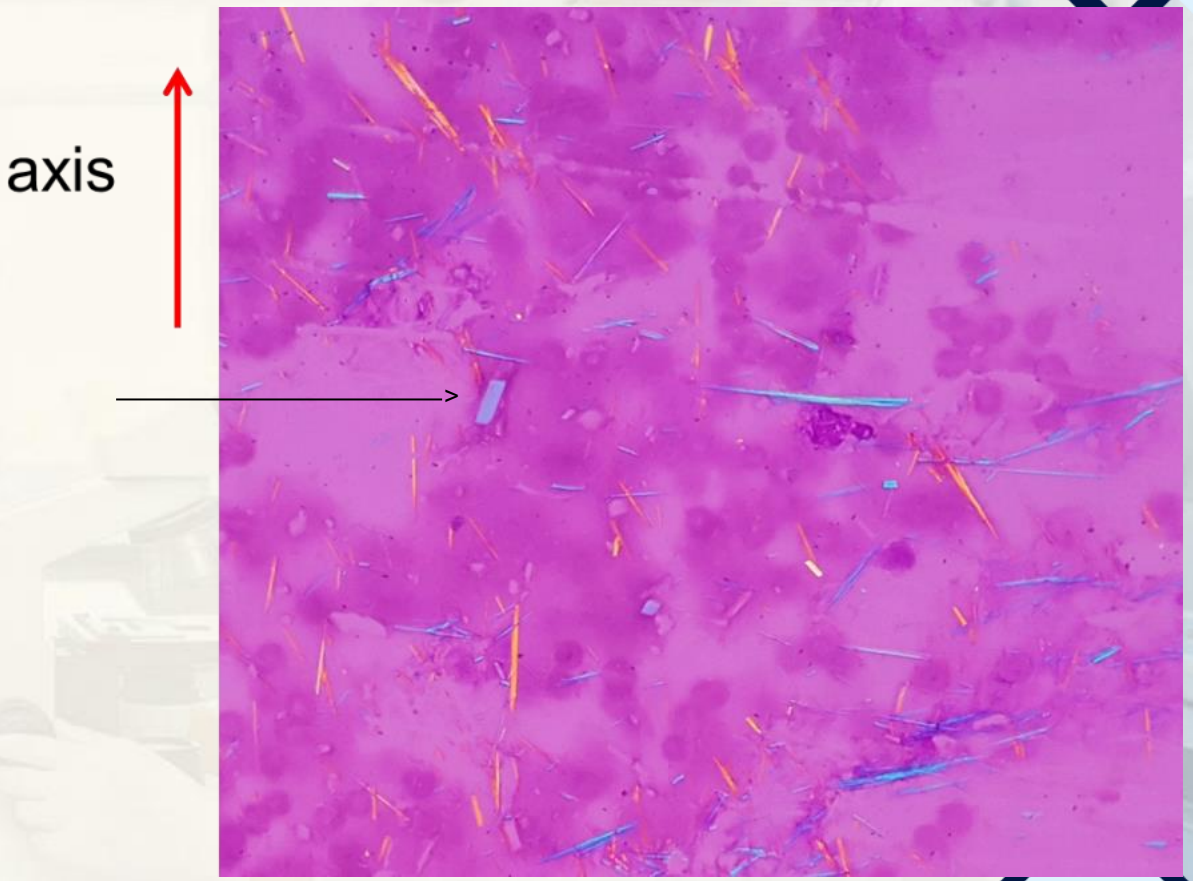


Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

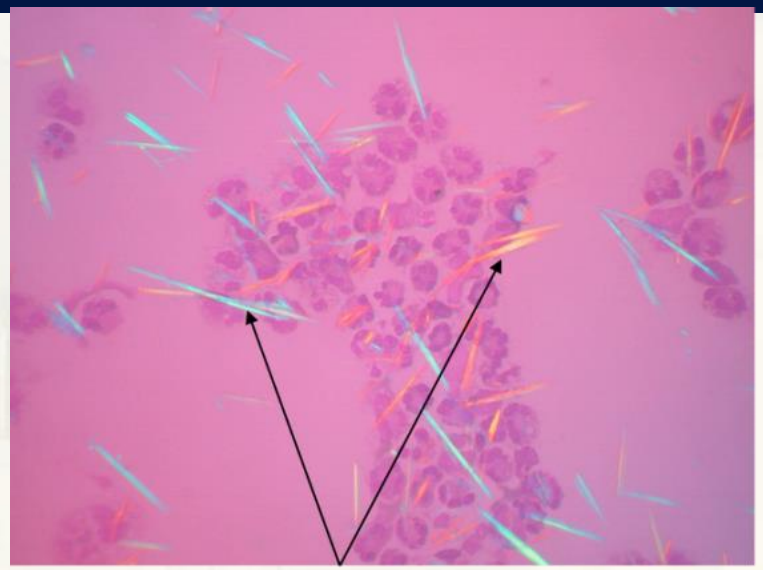
Calcium pyrophosphate



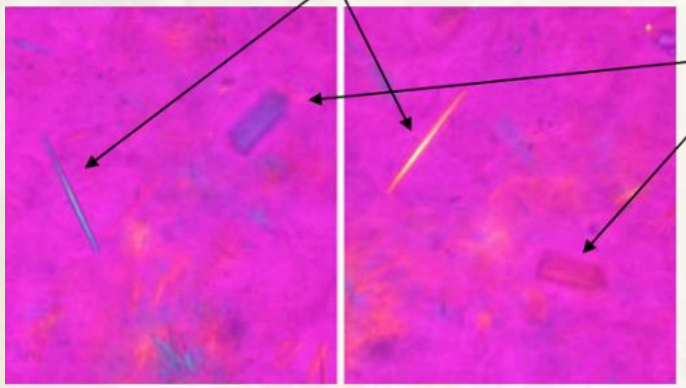


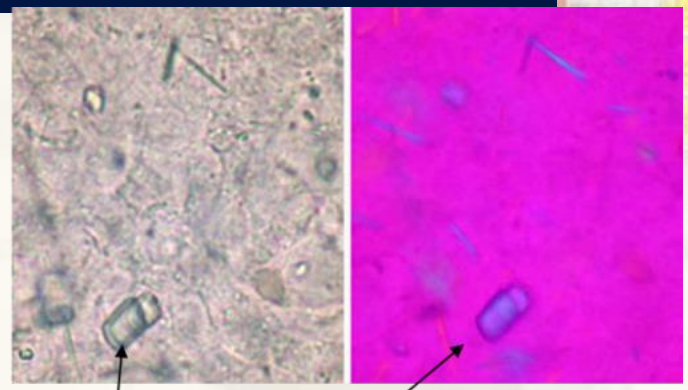
Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

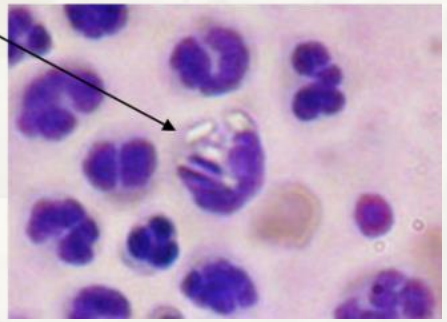


MSU





CPPD



Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

Artifacts from corticosteroid drug

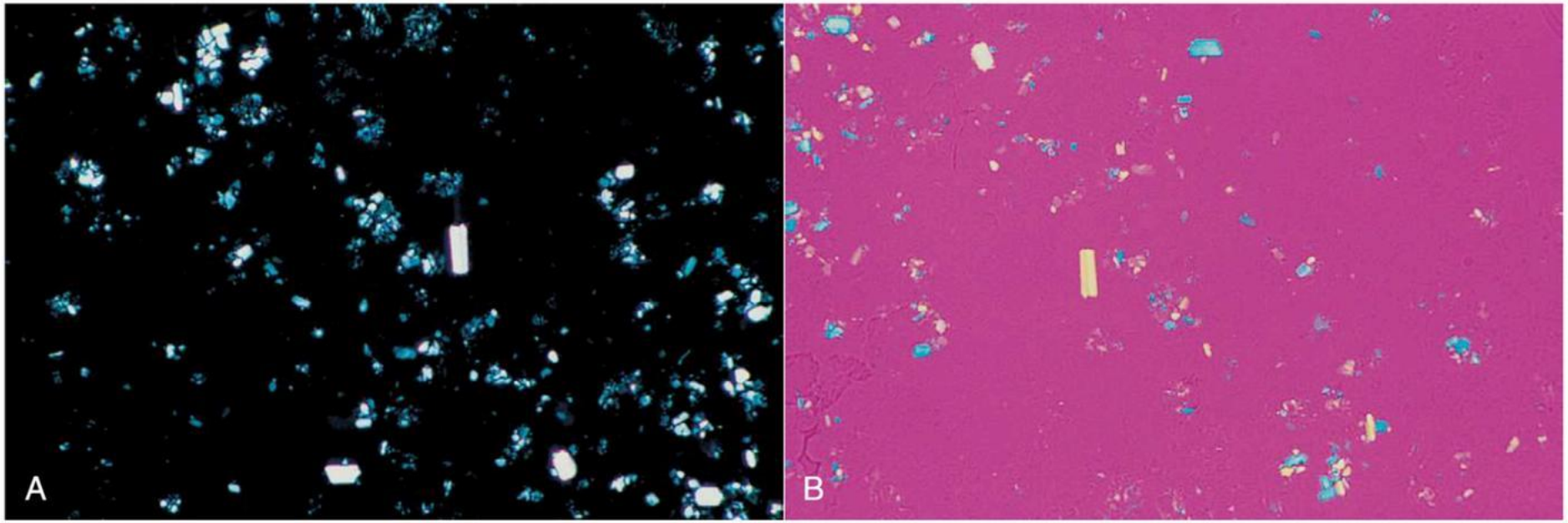


FIGURE 14-6 Synovial fluid with corticosteroid drug (triamcinolone diacetate [Aristocort]) crystals present. Note their conflicting morphology (suggests calcium pyrophosphate dihydrate [CPPD]) and strong negative birefringence (suggests monosodium urate [MSU]). Wet preparation, unstained; polarizing microscopy, 400×. **A,** Many strongly birefringent drug crystals that morphologically resemble CPPD using polarizing microscopy. **B,** Drug crystals with their long axes parallel to that of the red compensator plate are yellow—suggesting MSU crystals. *(From Ringsrud KM, Linne JJ: Urinalysis and body fluids: a color text and atlas, St Louis, 1995, Mosby.)*

Fundamentals of urine & body fluid analysis, 3rd ed., 2013

การแยกชนิดของ crystals ด้วยกล้อง plolarise

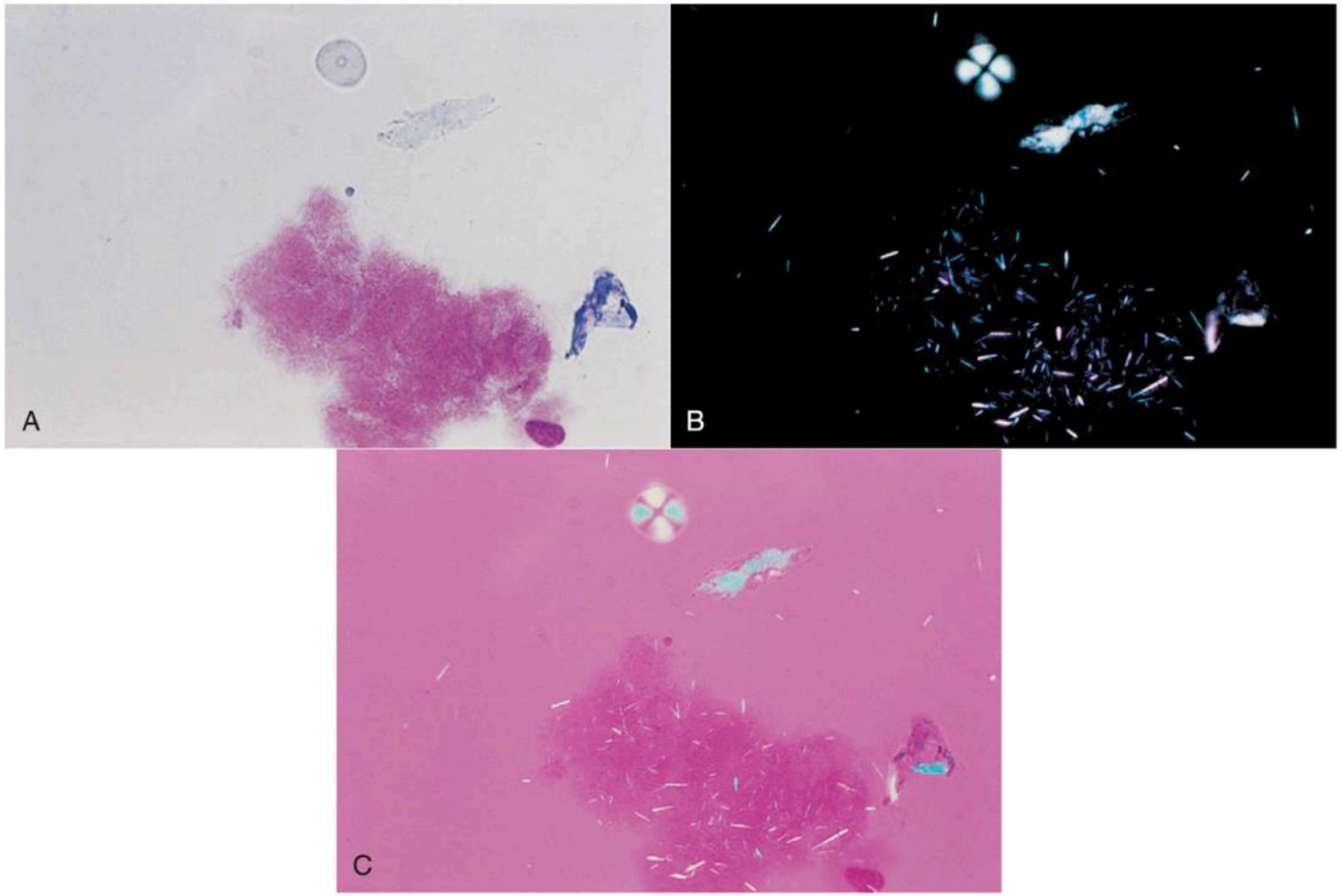


FIGURE 14-7 Synovial fluid with mass of hyaluronate, small monosodium urate (MSU) crystals, starch granule, and fibers. Cytocentrifuged preparation, Wright's stain, 400×. **A,** Brightfield microscopy; starch granule and fiber. Note that no crystals are evident in the pink mass. **B,** Polarizing microscopy; presence of MSU crystals is evident, fibers have strong birefringence, and the starch granule shows a typical Maltese cross-pattern. **C,** Compensated polarizing microscopy; crystals with their long axis perpendicular to the red compensator plate are blue, which indicates that the crystals are MSU. *(From Ringsrud KM, Linne JJ: Urinalysis and body fluids: a color text and atlas, St Louis, 1995, Mosby.)*

การแปลผล

Abnormal colour

Red and brown → trauma during arthrocentesis
joint fracture, tumor, traumatic arthritis

Milky → gout induced inflammation, tuberculous arthritis, SLE

Greenish or purulent → infection

Clarity

Modify by RBC, WBC, synoviocytes, crystals, fat droplets, fibrin, cellular debris, rice bodies

Rice bodies: collagen covered by fibrous tissue

↓

Most commonly is observed in rheumatoid arthritis

A. "Ground pepper" ochronotic shards.
B. "Rice bodies" fibrin-enriched synovium fragments.

การแปลผล

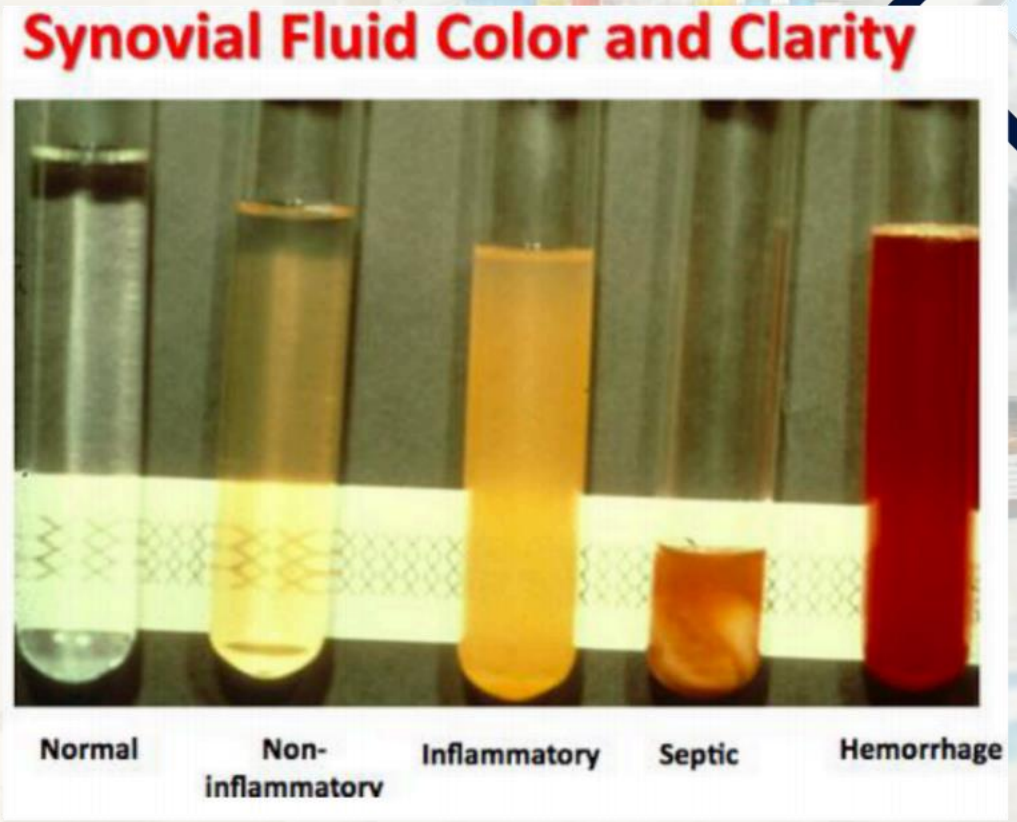
Viscosity

- High hyaluronate → high viscosity
- During inflammation
  hyaluronase enzyme from
  neutrophil or some bacteria

  ↓

  depolymerise hyaluronate
  reduced viscosity

- Some diseases inhibit secretion of hyaluronate



การแปลผล

Microscopic examination

- red cells predominate → haemarthrosis or a traumatic aspiration
- WBC >50,000/ul (mainly neutrophils)

  ↓

  bacterial arthritis, rheumatoid arthritis, rheumatic fever, and crystal arthropathy
- mononuclear cells predominate → viral arthritis
- Crystals

  MSU → Gout

  CPPD → Pseudogout

Correction of WBC count for bloody synovial fluid (SF) sample

SF WBC adjusted = SF WBC observed – [(WBC in blood / RBC in blood) × SF RBC]

ตัวอย่าง
WBC count in SF = 50,000 cells/µl
WBC count in blood = 10,000 cells/µl
RBC count in blood = 4.5x106 cells/µl
SF RBC = 80,000 cells/µl

Corrected SF WBC = observed SF WBC – [(WBC in blood / RBC in blood) × SF RBC]

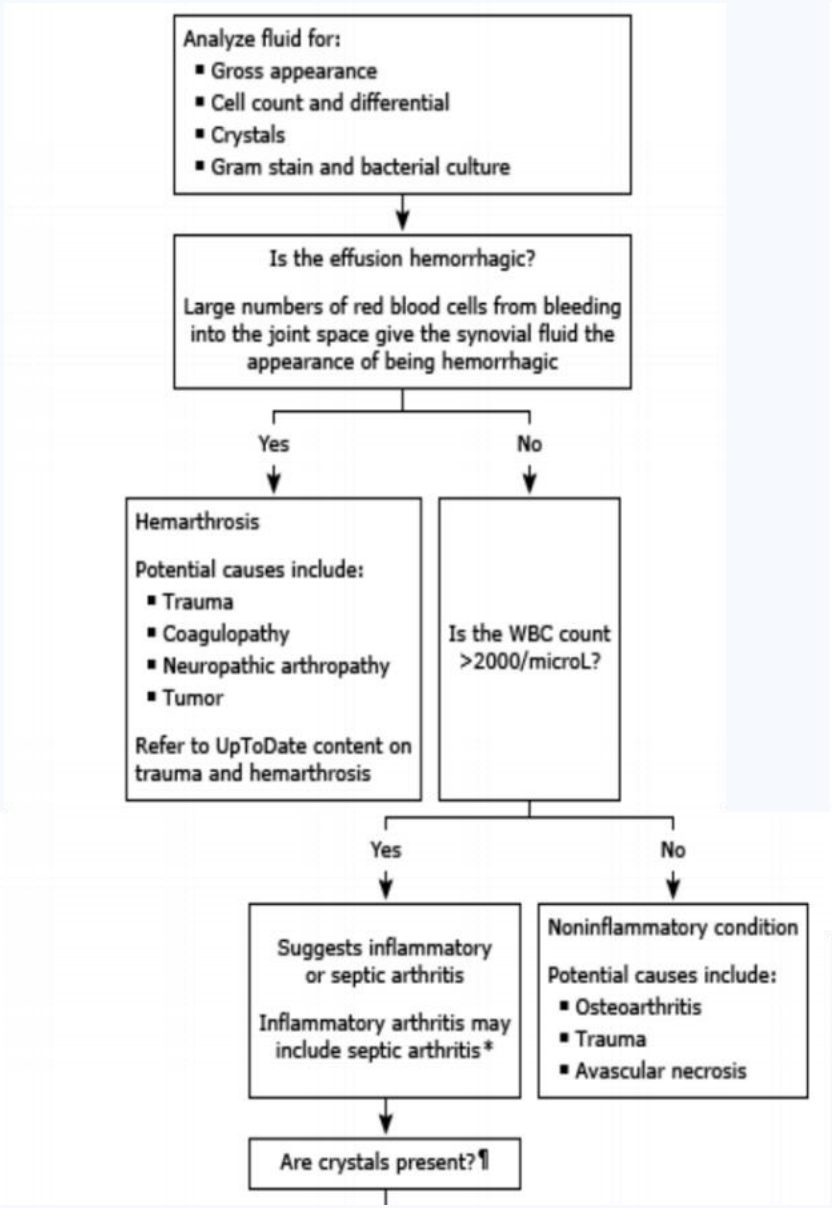
50,000 – [(10,000/ 4.5x106)] x 40,000
49,822.22 cells/µl

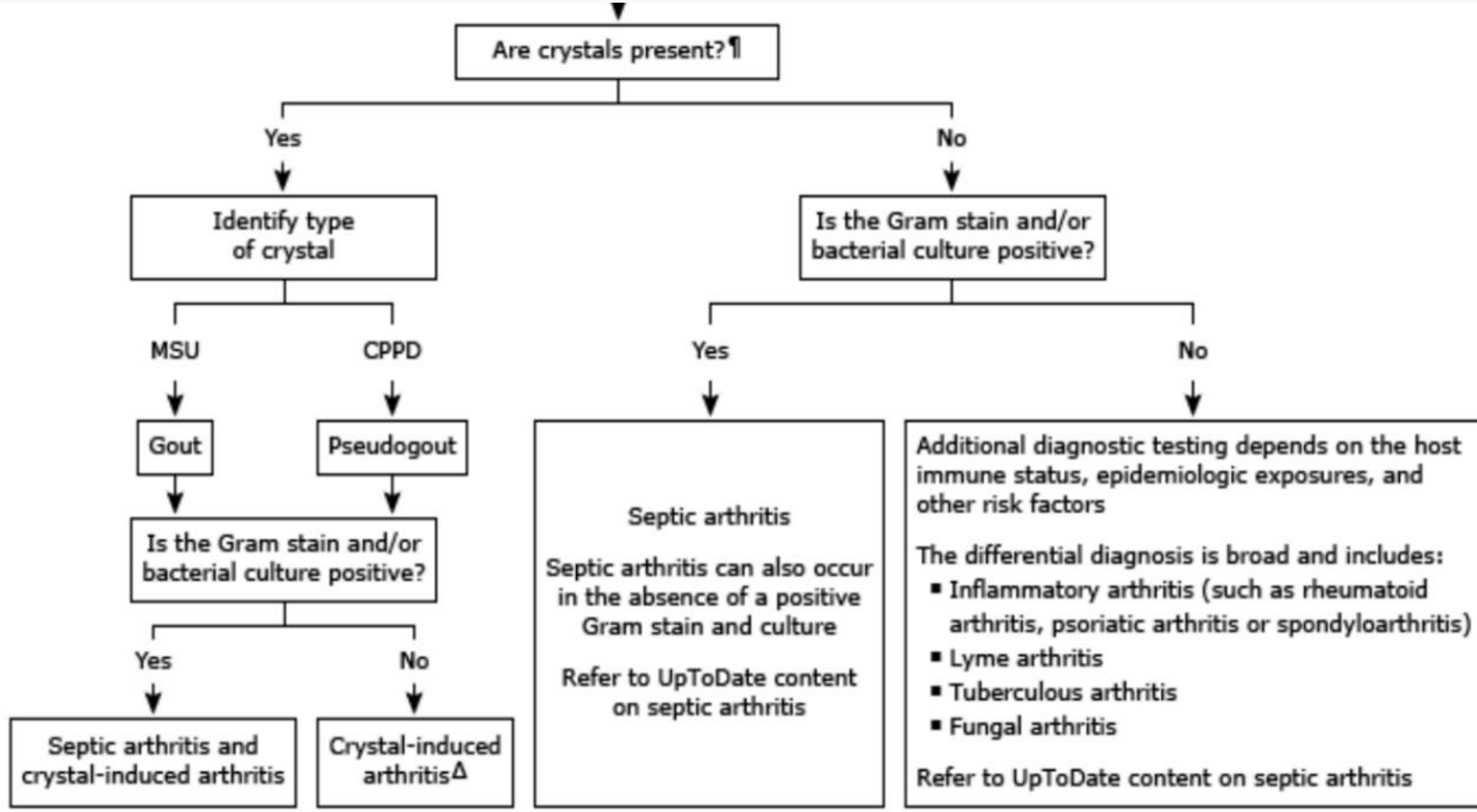
- **the release of blood into synovial fluid may raise the WBC count**

. 1 WBC for every 500 to 1000 RBCs

จากตัวอย่าง ถ้า SF RBC = 80,000 cells/µl จะมี WBC ปนใน SF = 160 cells

Guide to interpretation of synovial fluid analysis





น้ำไขสันหลัง Cerebrospinal Fluid (CSF)

ข้อบ่งชี้ในการเจาะและส่งตรวจน้ำไขสันหลัง

- **Infections**
  - Meningitis
  - Encephalitis
  - Brain abscess
- **Hemorrhage**
  - Subarachnoid
  - Intracerebral
- **Neurologic Disease**
  - Multiple sclerosis
  - Guillain-Barré syndrome
- **Malignancy**
  - Leukemia
  - Lymphoma
  - Metastatic carcinoma
- **Tumor**
  - Brain
  - Spinal cord
- **Treatments**
  - Chemotherapy
  - Anesthetics
  - Radiographic contrast media
  - Antibiotic therapy

การส่งตรวจน้ำไขสันหลัง

- สนับสนุนการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท
- วินิจฉัยแยกโรค
- วางแผนการรักษาผู้ป่วย

จุลทรรศน์ | เคมี | จุลชีววิทยา | การตรวจพิเศษ

ตัวอย่างการส่งตรวจน้ำไขสันหลังเพื่อวินิจฉัยความผิดปกติ

ผู้ป่วยชายไทย อายุ 24 ปี อาชีพธุรกิจส่วนตัว ภูมิลำเนา กรุงเทพมหานคร สิทธิการรักษา ฉุกเฉิน

A Young Aged Man with Recurrent Meningitis

CSF profiles:

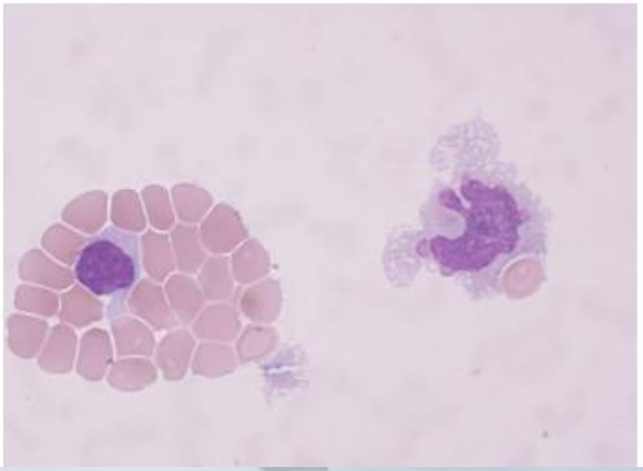
Parameters	Admit	At 48 hours
Open/close pressure	40/22 cmH_2O	35/18 cmH_2O
WBC	548 cells/UL (Mononuclear 98%, PMN 2%)	420 cells/UL (Mononuclear 95%, PMN 5%)
RBC	36 cells/UL	0 cells/UL
Color	Slightly turbid	Slightly turbid
pH	8.0	8.0
Clot formation	absent	absent
Protein	149.0 mg/dL (10-60)	39.0 mg/dL (10-60)
Sugar ratio	48%	62%
Gram's stain	Not found	Not found
AFB staining	Not found	Not found
India ink	Not found	Not found
Cryptococcal Ag	Negative	Negative
VDRL	Non-reactive	Non-reactive
PCR for Herpes Simplex virus (HSV)	Not sent	HSV type 1: negative **HSV type 2: positive**
Aerobic culture	No growth	No growth

การส่งทดสอบและเก็บรักษาน้ำไขสันหลัง

1 Chemical and immunologic testing
(Frozen ; -15 ถึง -30˚ C)

2 Microbiologic studies
(Room tempurature ; 19-26˚ C)

3 Microscopy and cytology
(Refrigerated ; 2-8˚ C)

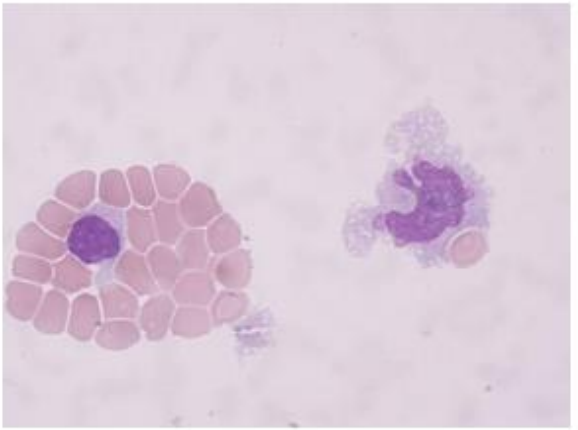


เก็บน้ำไขสันหลังได้น้อย

ทำการทดสอบทางจุลชีววิทยา

นับจำนวนเซลล์

การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว



ตรวจทางเคมีและภูมิคุ้มกัน

การนำส่งน้ำไขสันหลัง

Laboratory

As rapid as possible after the lumbar puncture is performed

น้ำไขสันหลังปกติ

- Physical Clear colorless
- Cell count 0-5 /cu.mm (adult)
  (WBC) 0-30/cu.mm (Neonate;< 1 year)
  0-20 (1-4 years)
  0-10 (5-18 years)
- Glucose 60-70% of plasma glucose
- Protein 15-45 mg/dL

No RBCs should be present in normal CSF

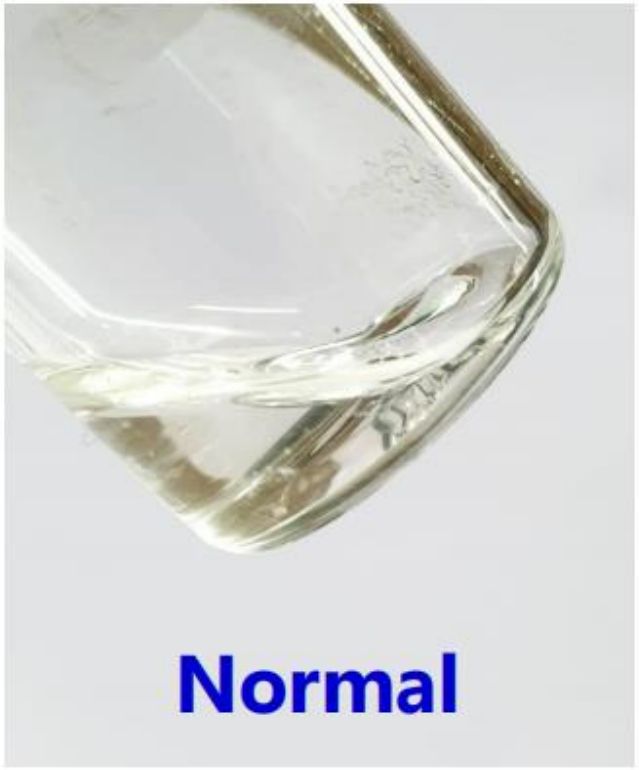
Physical examination (appearance)

Normal CSF : Clear colorless

กรณีขุ่น (cloudy)

- เม็ดเลือดขาวมากกว่า 200/µl
- เม็ดเลือดแดงมากกว่า 400/µl
- จุลชีพ
- โปรตีน

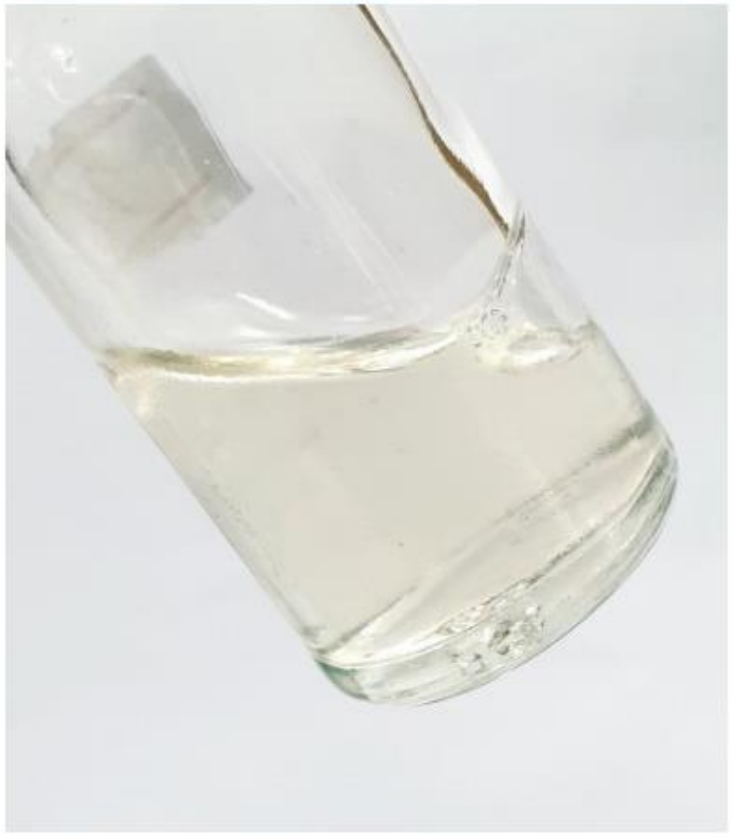
อาจเกรดเป็นระดับต่างๆ จาก 0 (clear) ถึง 4+



Normal

Cloudy

ลักษณะทางกายภาพของน้ำไขสันหลัง



Colorless
Clear

Pale yellow
Hazy

Xanthochromia
Clear

Visual threshold for bloody fluid

มองเห็นว่าขุ่นเมื่อ

- เม็ดเลือดขาว > 200/µL
- เม็ดเลือดแดง >400/µL

Xanthochromia

หมายถึงสี ชมพูอ่อน (pink) ส้ม (orange)

และสีเหลือง (yellow) หลังการปั่น

- **Hemorrhage ; subarachnoid or intracerebral**
  (Present in >90% of patient within 12 Hrs)
- Hyperbilirubunemia; 10-15 mg/dl
- Hypercarotenemia
- Meningeal melanoma
- **Normal neonate**
- Protein levels >150 mg/dL
- **Prevoius traumatic tap**

- RBC lysis begins as early as 1 to 2 hours after a traumatic tap.
- Rapid evaluation is necessary

Traumatic tap

Grossly blood
(RBC count exceeds 6,000/μL)

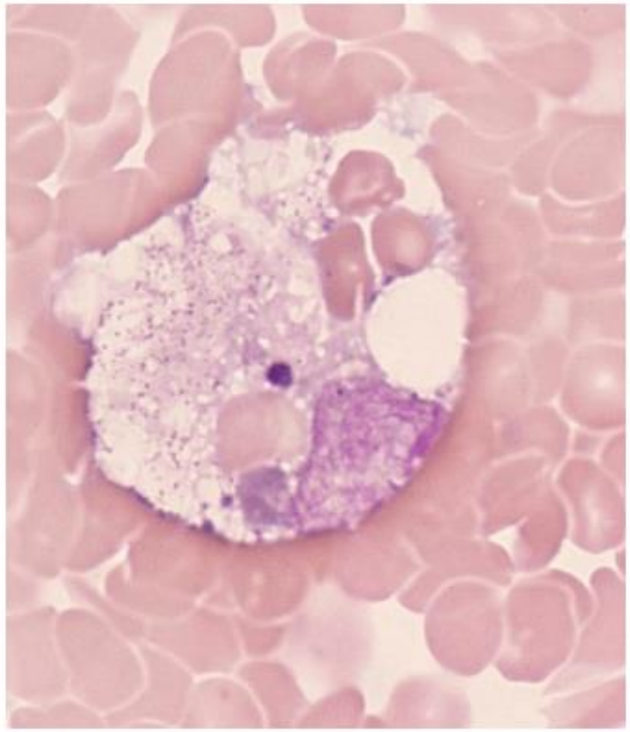
Subarachnoid hemorrhage (SAH)

or

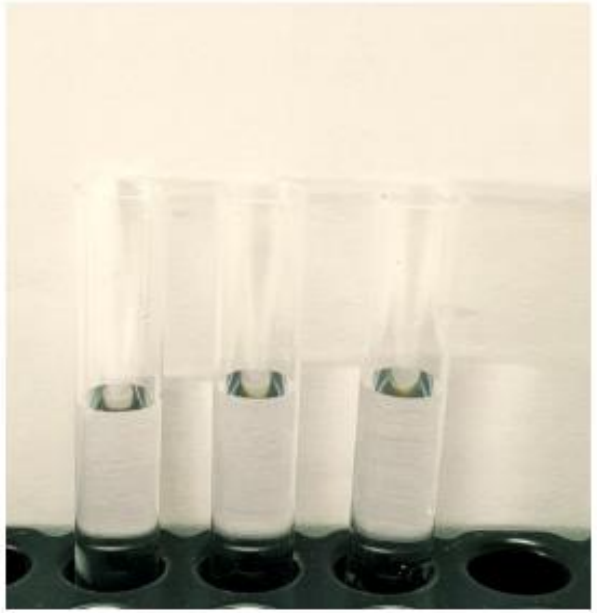
Intracerebral hemorrhage (ICH)

การแยกระหว่างการมีเลือดออกในสมอง/ไขสันหลังและกรณีที่เจาะน้ำไขสันหลังมีเลือดปน **(Traumatic tap)**

	Traumatic tap	Subarachnoid hemorrhage (SAH) or intracerebral hemorrhage (ICH)
Distribution of blood	First tube	All tube
Clot formation	Yes	May be
Xanthochromic supernatant	1-2 Hr of hemolysis	Yes
Microscopic examination	RBC WBC	Erythrophage Siderophage Hematoidin
RBC : WBC in traumatic tap	1,000:1-2	-

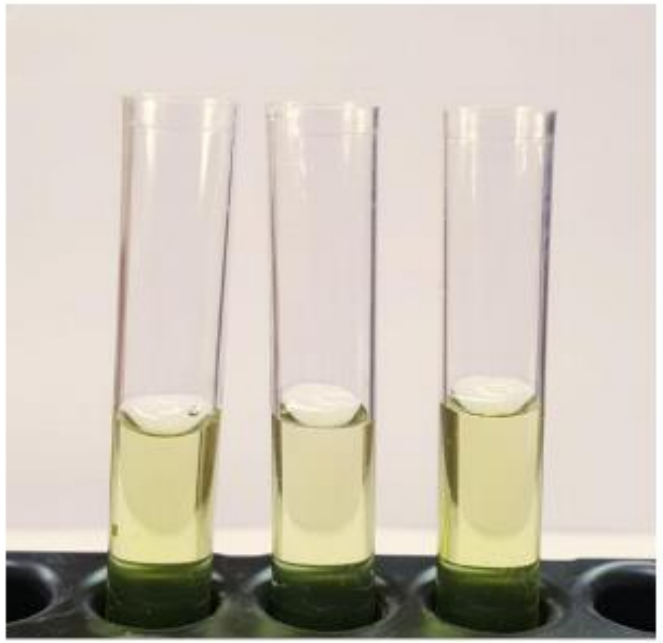


ลักษณะ supernatant หลังการปั่น



Normal CSF

Xathochromic CSF from recent hemorrhage



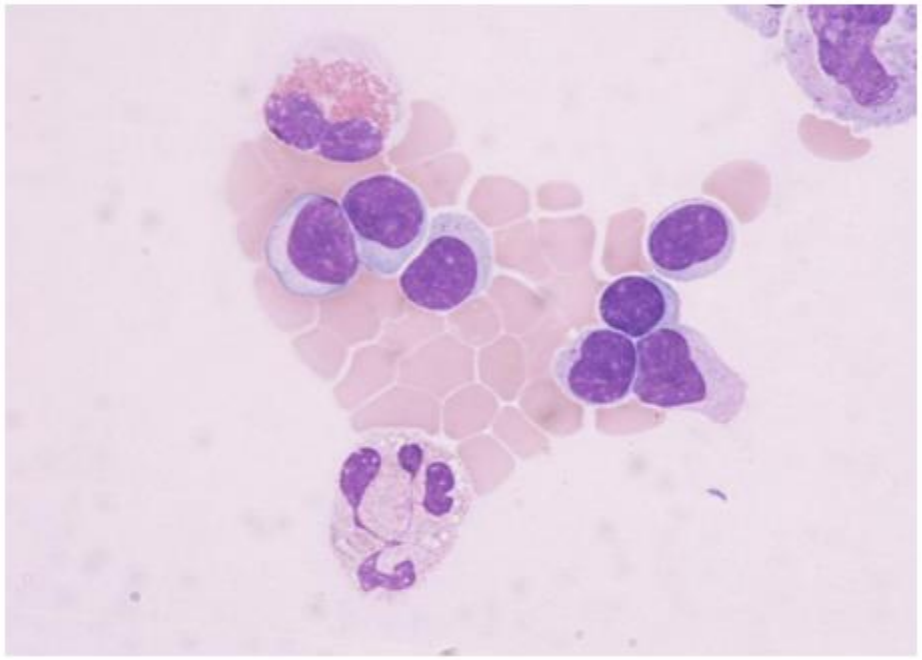
Xathochromic CSF from old hemorrhage

Oxyhemoglobin → **Bilirubin**

การปรับแก้ WBC และ Protein กรณีที่มี traumatic tap

ใช้ในกรณีตรวจเลือดแล้ว RBC count และ serum protein อยู่ในเกณฑ์ปกติ

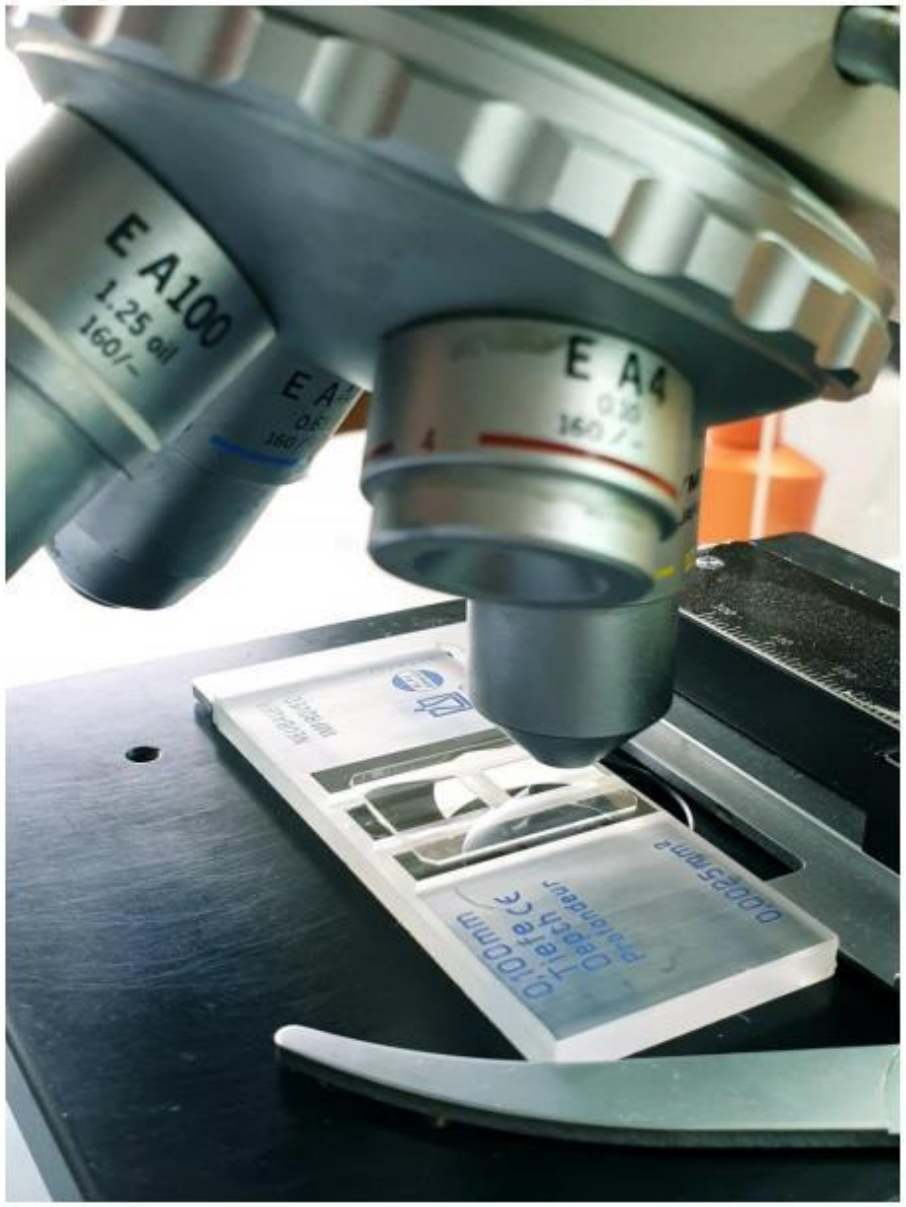
- RBCs 700 เซลล์ คิดเป็น WBC ประมาณ 1 เซลล์
- RBCs 10,000 /µL มีค่าโปรตีนประมาณ 8 mg/dL



CSF WBC = 100 /uL
RBC = 7,000 /uL

ค่า **WBC** ที่แท้จริง **= 90 /uL** สูงกว่าปกติ

Microscopic examination



Microscopic examination

การนับจำนวนเซลล์

RBC

Traumatic tap?

Corrected WBC, Protein

Lysis within 1 Hr.

WBC

Disintegrate after 2 Hr.

นับเซลล์ทันที
ไม่เกิน 1 ชม.

การนับแยกชนิดเซลล์และตรวจสเมียร์

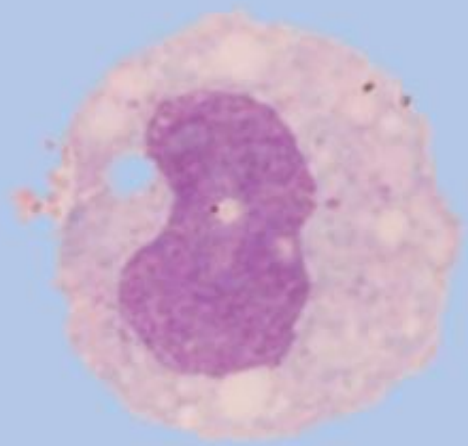
เตรียมสเมียร์

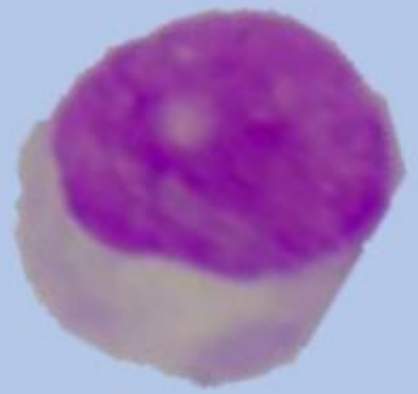
นับแยกชนิดเซลล์

ตรวจสเมียร์

ค่าอ้างอิงของการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวในน้ำไขสันหลัง

Neonates	
Lymphocytes	5%-35%
Monocytes	50%-90%
Neutrophils	0%-8%
Adults	
Lymphocytes	40%-80%
Monocytes	15%-45%
Neutrophils	0%-6%





1

เซลล์ สิ่งที่ตรวจพบได้ในน้ำไขสันหลัง

เซลล์เม็ดเลือด

Neutrophil
Lymphocyte
Atypical lymphocyte
Plasma cell
Eosinophil
Basophil
Monocyte
Macrophage
Erythrophages
(containing red blood cells)
Siderophages
(containing hemosiderin)
Hematoidinophages
(containing hematin crystals)
Lipophages
(containing fat)

เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน
Lymphoblasts, myeloblasts
และ **monoblasts**

เซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือด

Ependymal cells,
choroid plexus cells และ spindle shaped cells
เซลล์มะเร็งชนิดอื่นที่แพร่กระจายมายังระบบประสาทส่วนกลาง

อื่นๆ

Bacteria
Cryptococcus neoforman

Pleocytosis :

การพบจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น

Cell Types and Causes of CSF Pleocytosis

Infectious Causes

Noninfectious Causes

ตัวอย่าง เช่น

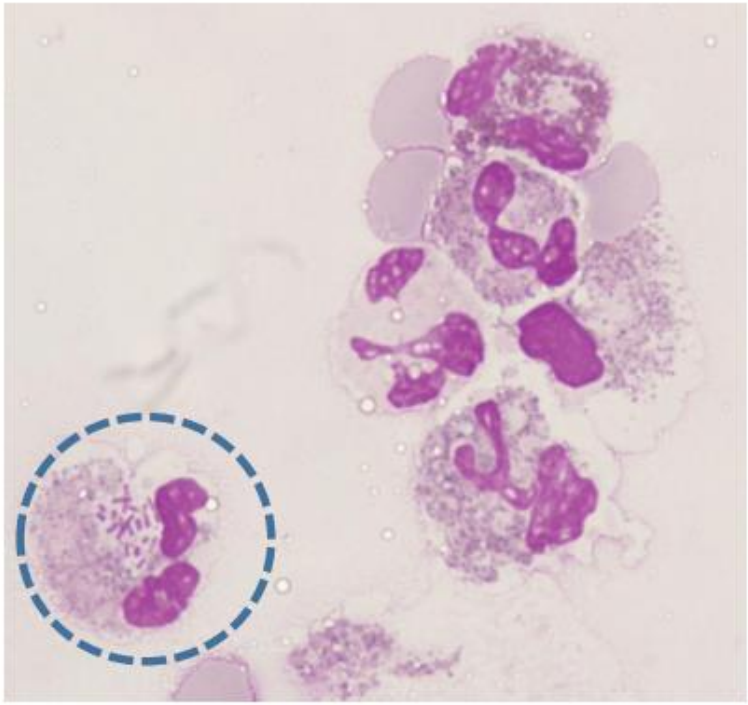
Neutrophils Pleocytosis

Infectious Causes

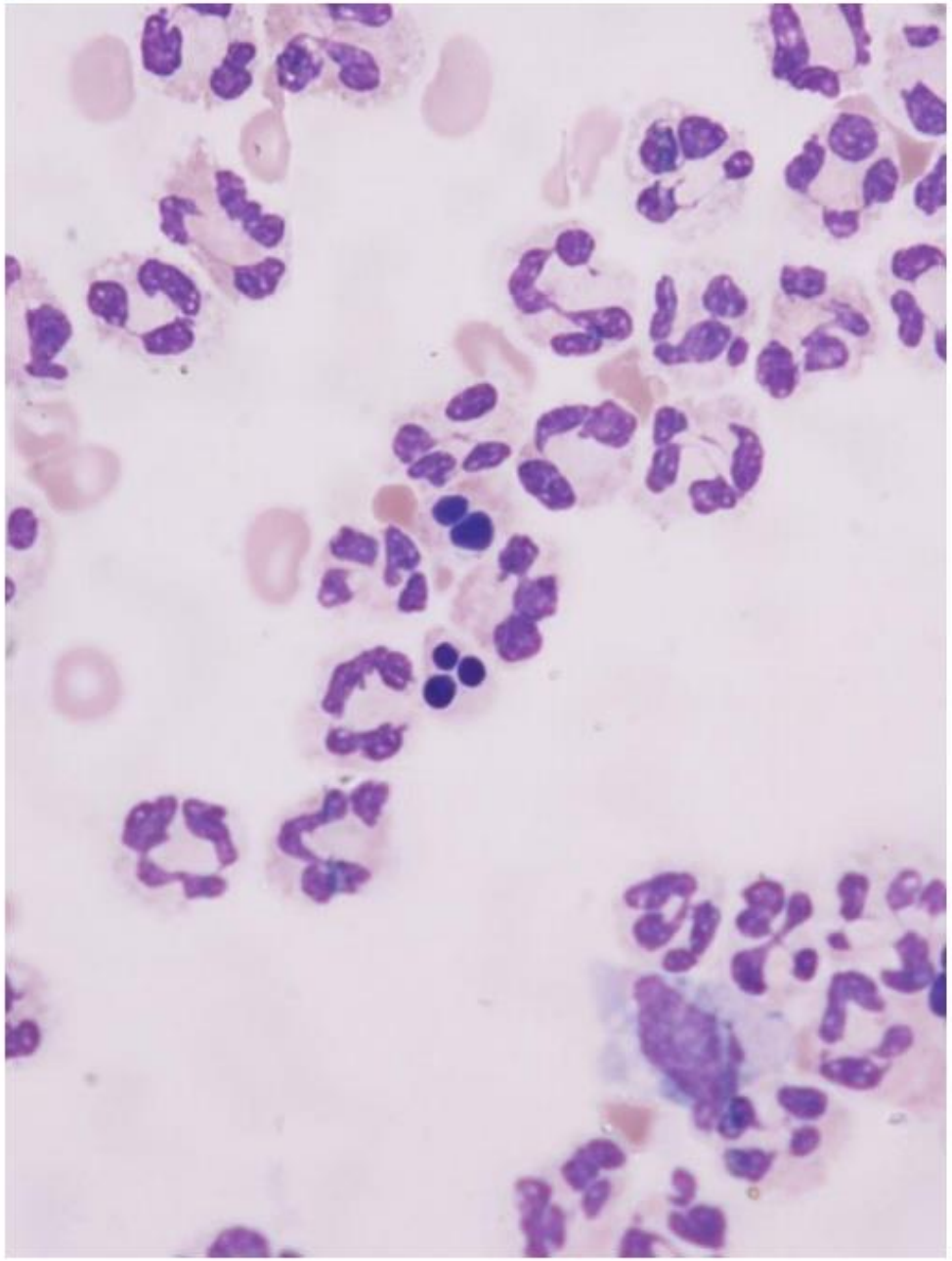
Meningitis
> Bacterial
> Early viral, tuberculous, fungal
> Amebic encephalomyelitis
> Cerebral abscess

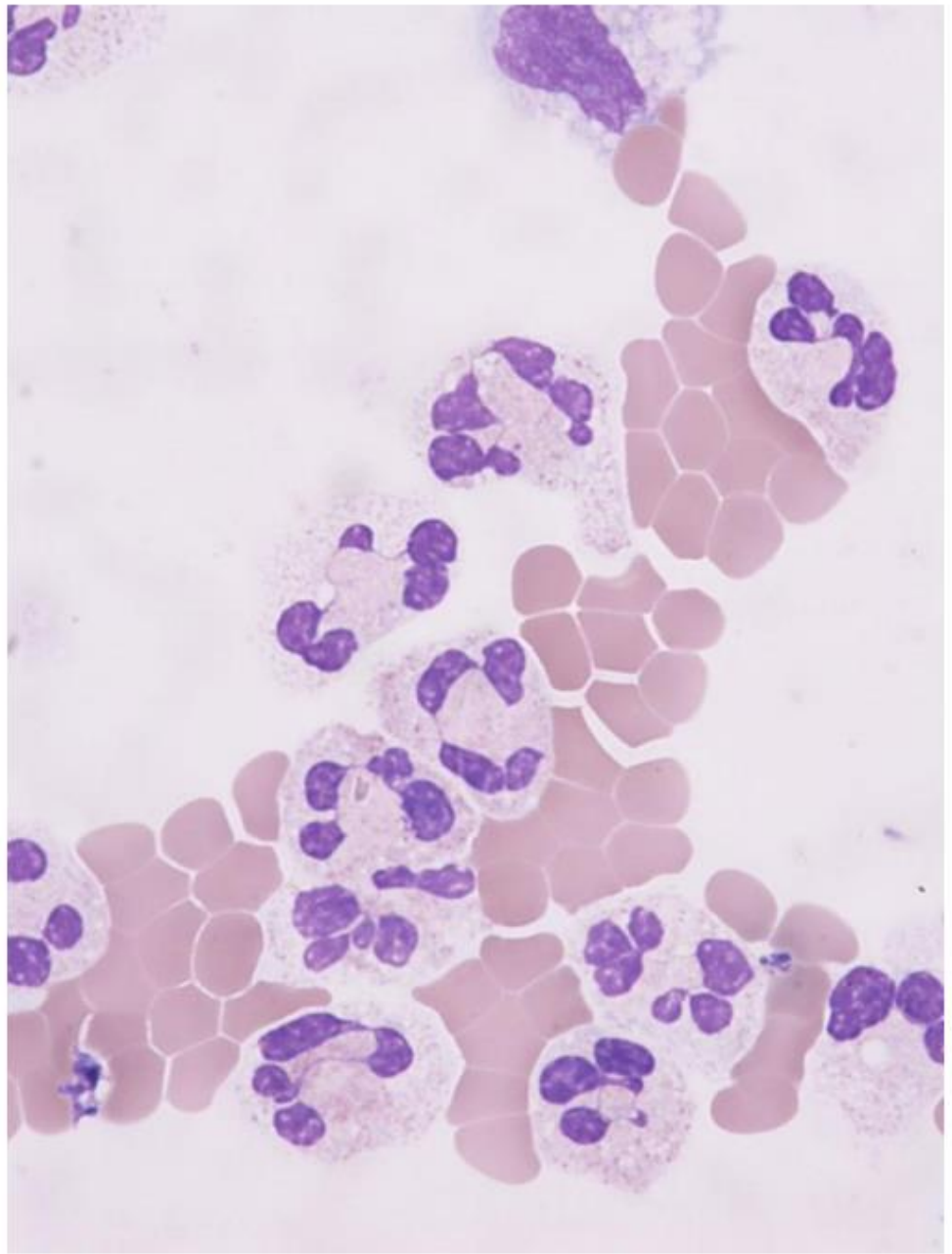
Noninfectious Causes

Hemorrhage
> Subarachnoid
> Intracerebral
> Central nervous system infarct
> Tumor
> Repeated lumbar puncture
> Intrathecal treatment (e.g., drugs, myelography)



Neutrophils Pleocytosis





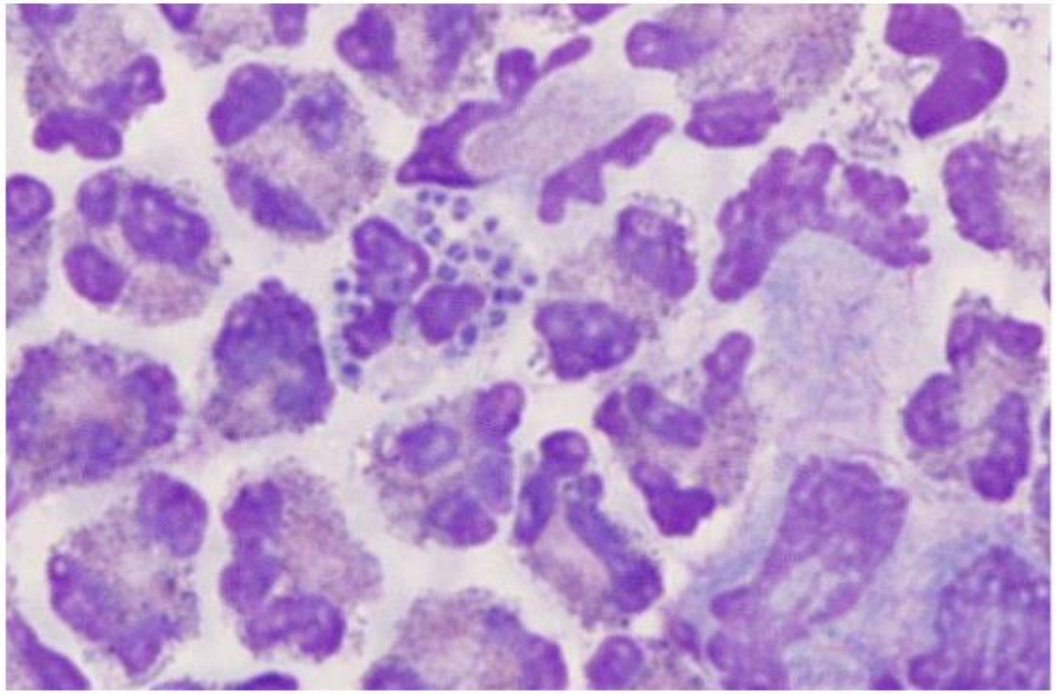
การเปลี่ยนแปลงของน้ำไขสันหลัง ที่พบได้ในโรค/ภาวะต่างๆ

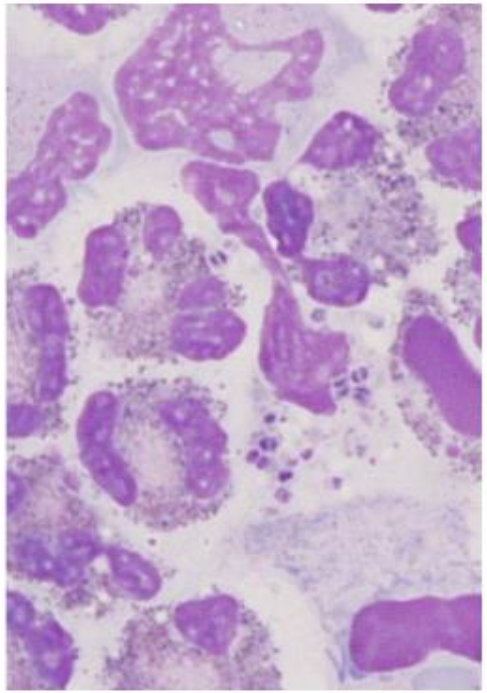
1. Bacterial meningitis
2. Viral meningitis
3. Tuberculous meningitis
4. Cryptococcal meningitis
5. Eosinophilic meningitis

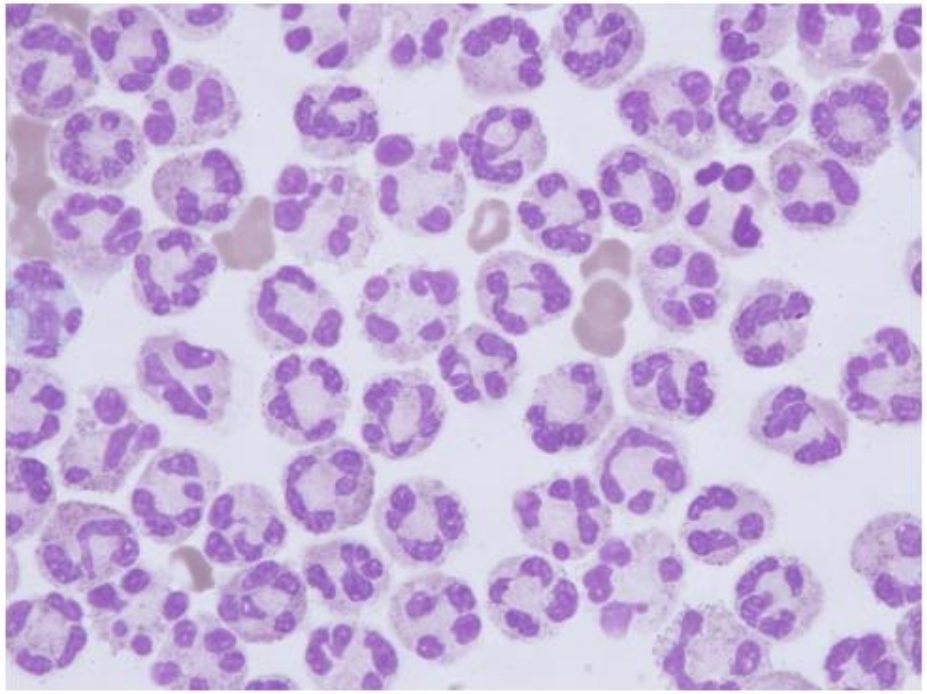
- Cerebrovascular disease, Subarachnoid hemorrhage (SAH) , Intracerebral hemorrhage (ICH)
- Meningeal leukemia “Leukemic involvement to CNS
- Tumor of CNS

Bacterial meningitis หรือ septic meningitis, purulent meningitis เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากแบคทีเรียเป็นหนอง

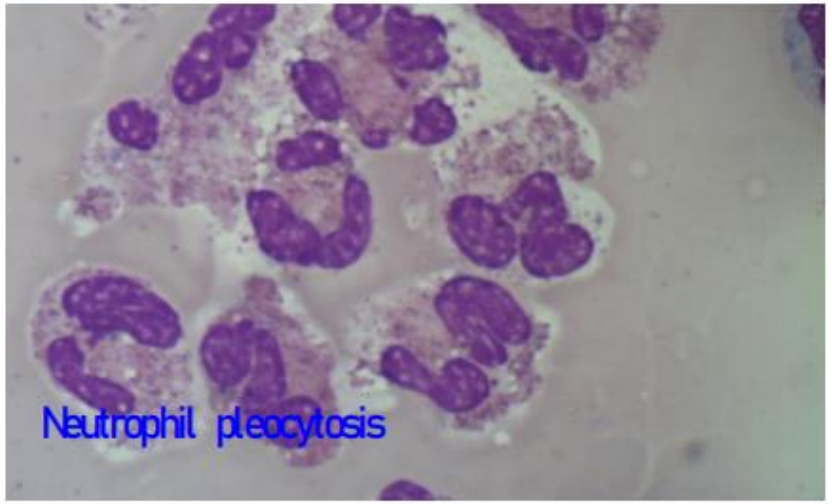
- มีอัตราการตายและความพิการถาวรทางสมองสูง
  เป็นภาวะฉุกเฉินทางระบบประสาทที่ต้องได้รับการรักษาโดยเร็ว

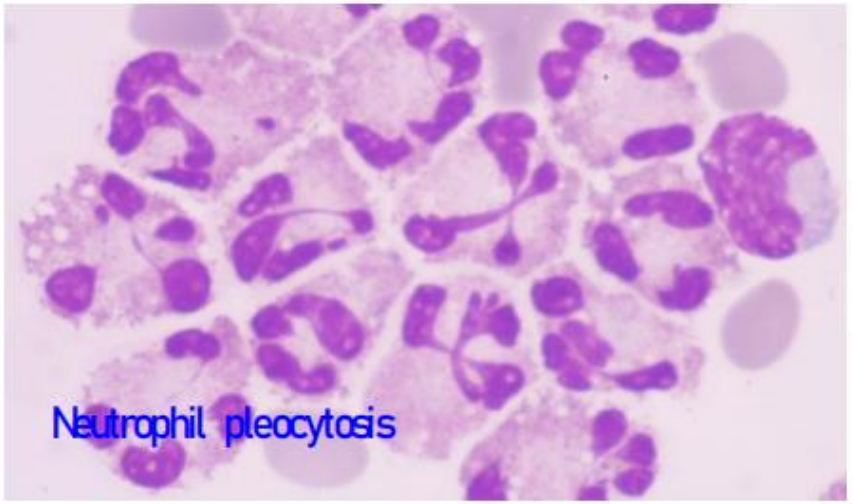


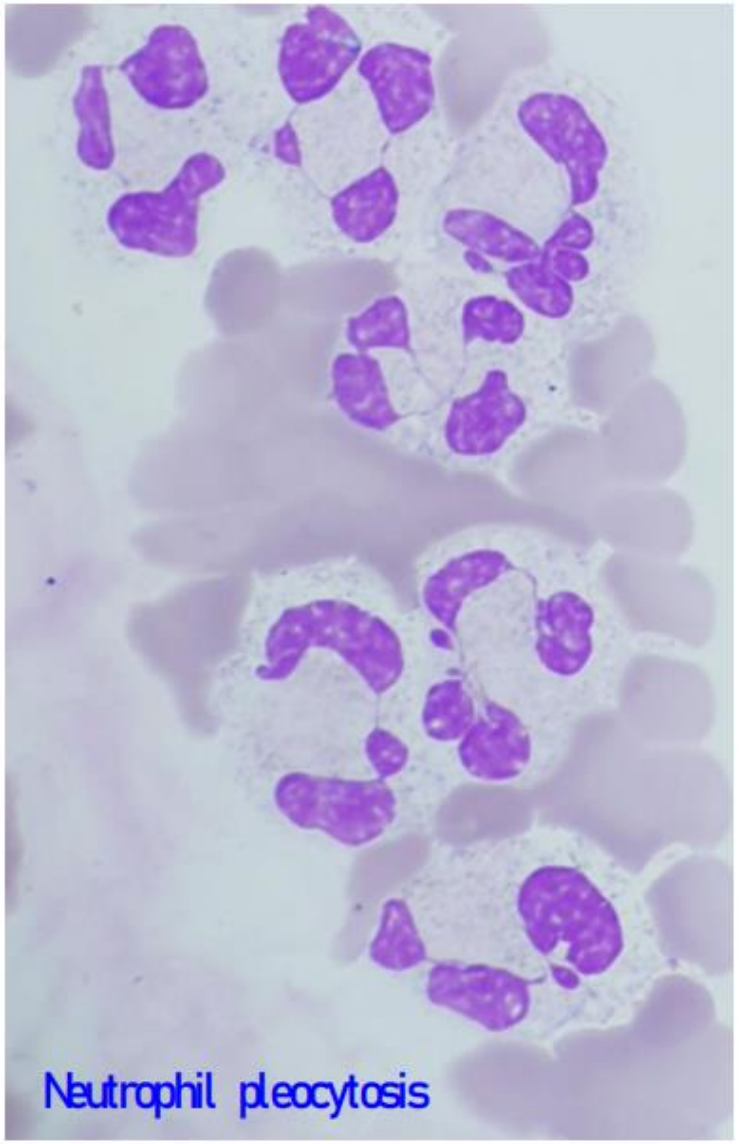


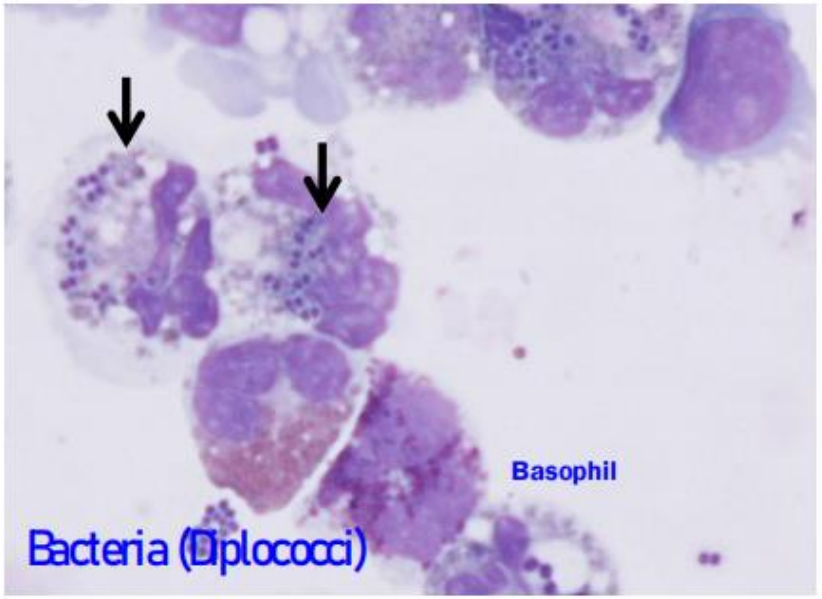


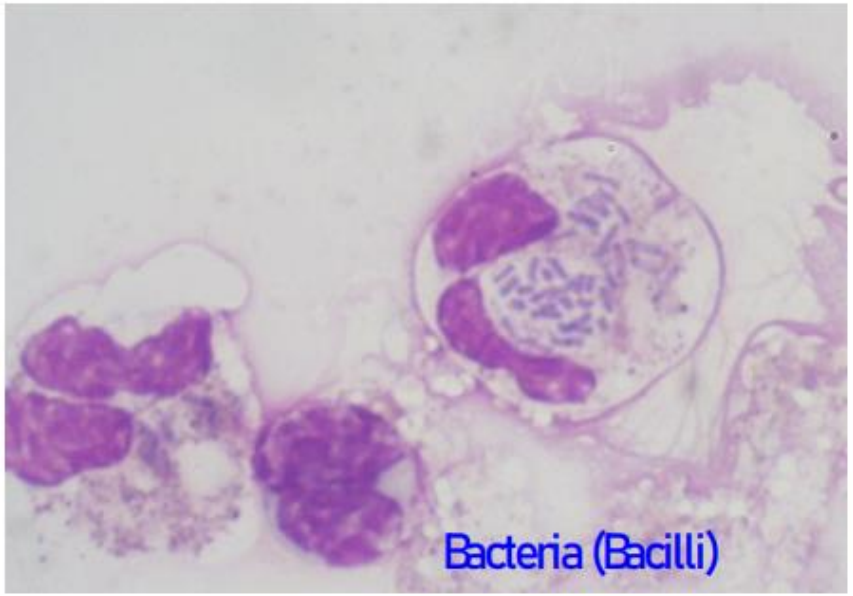
Bacterial meningitis



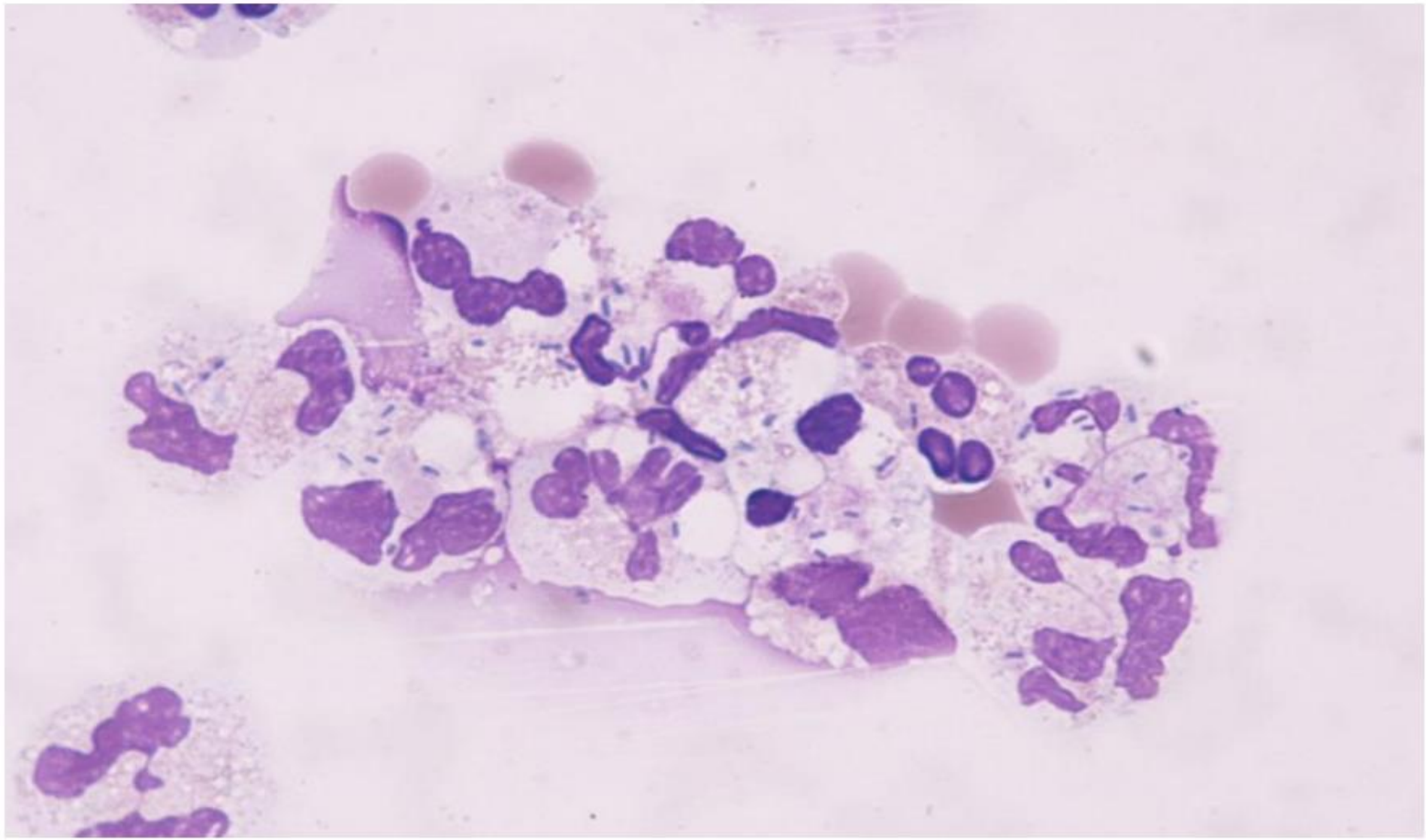




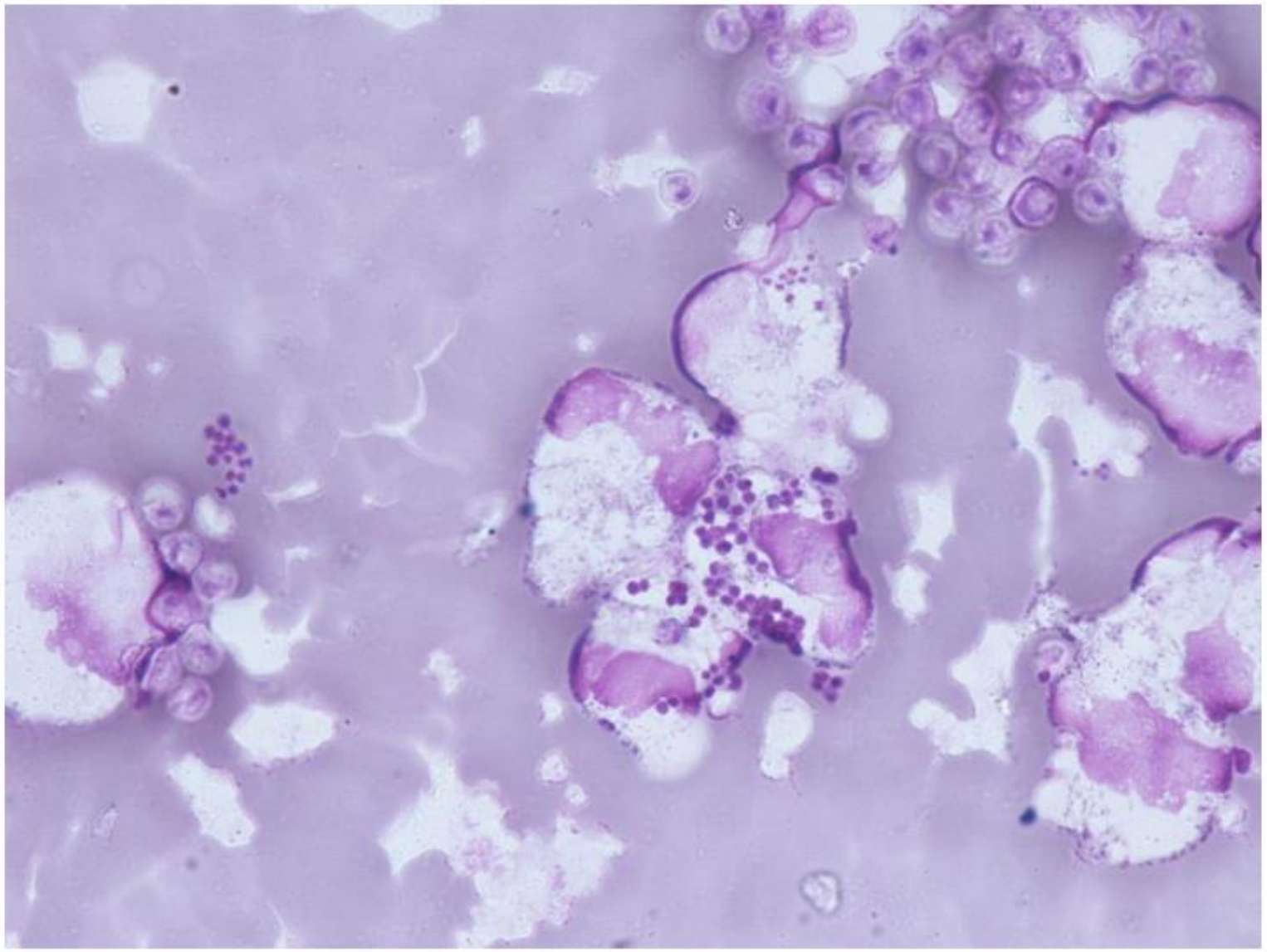


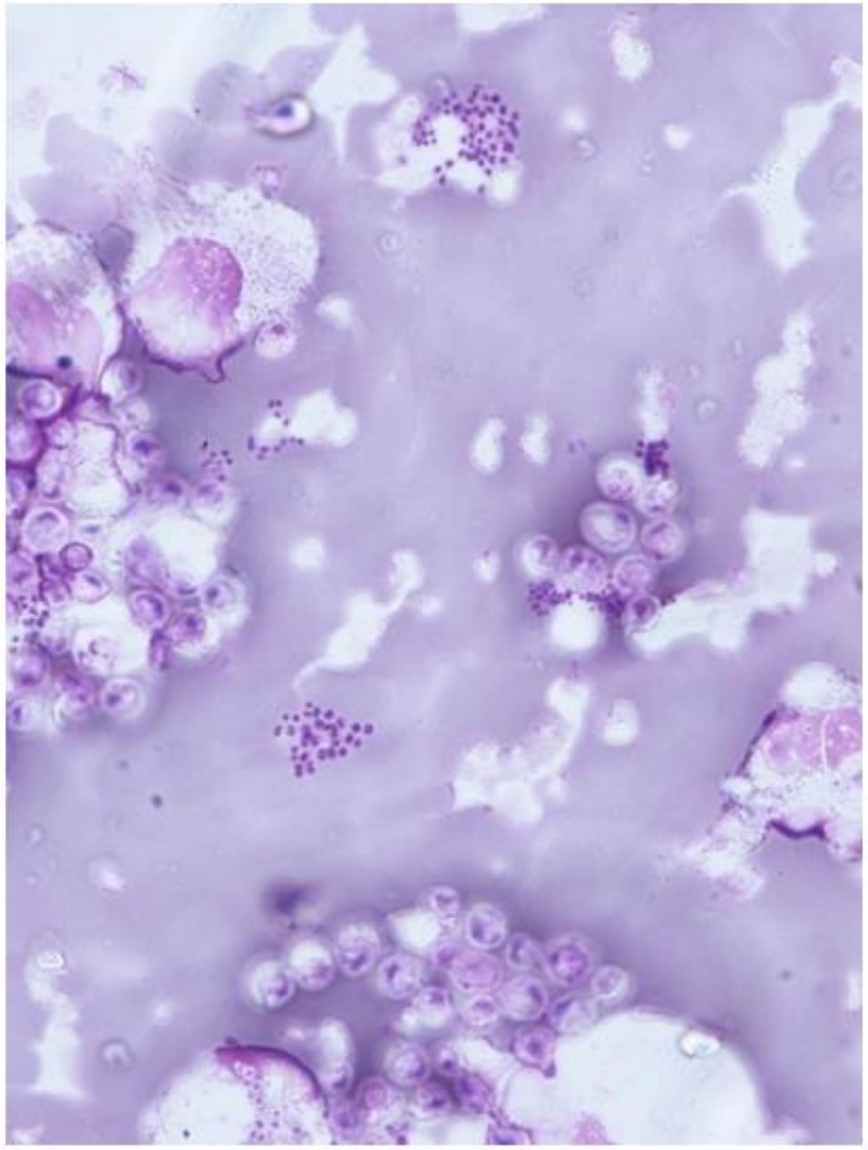


Bacterial meningitis



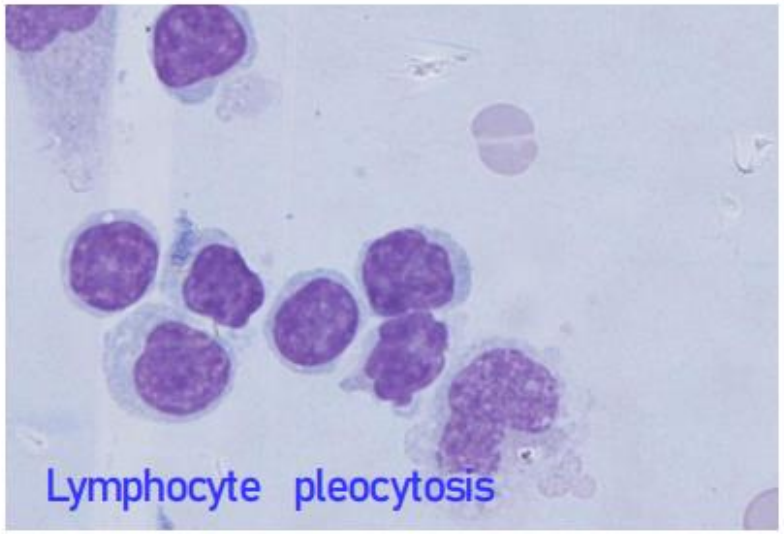
Intracellular bacteria (bacilli)

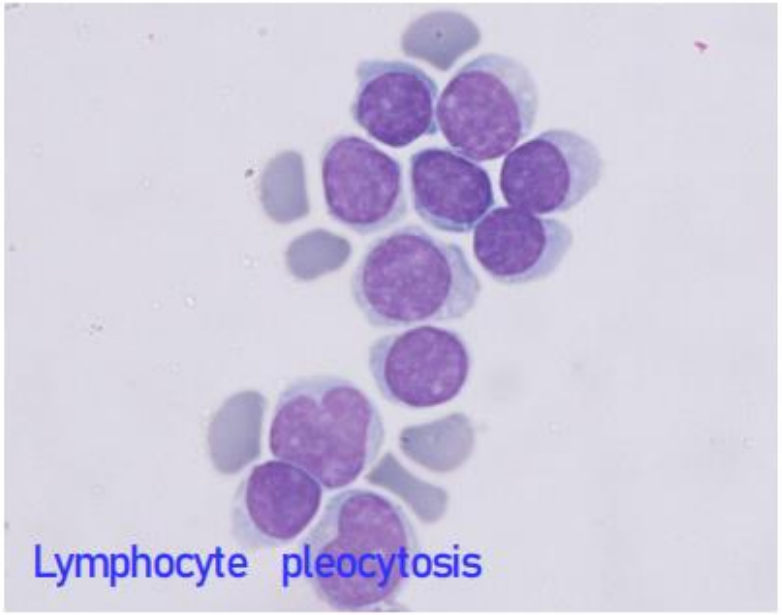


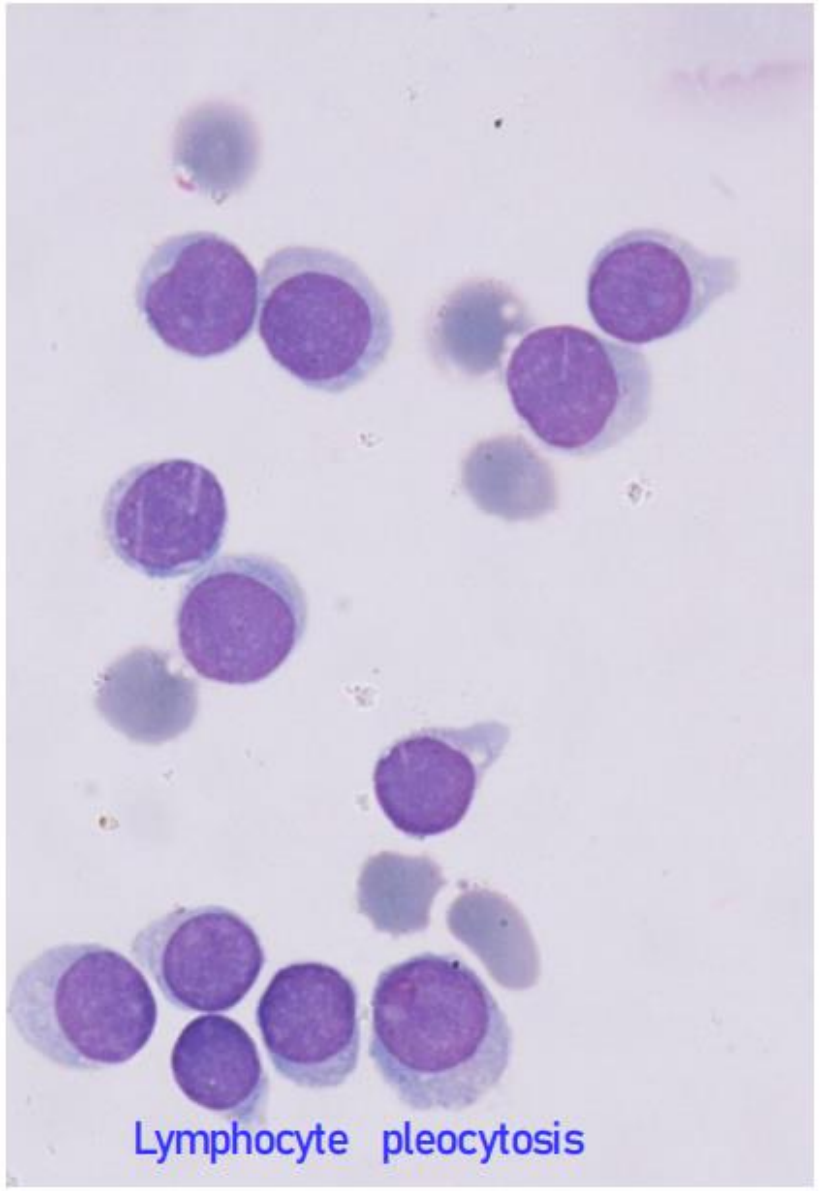


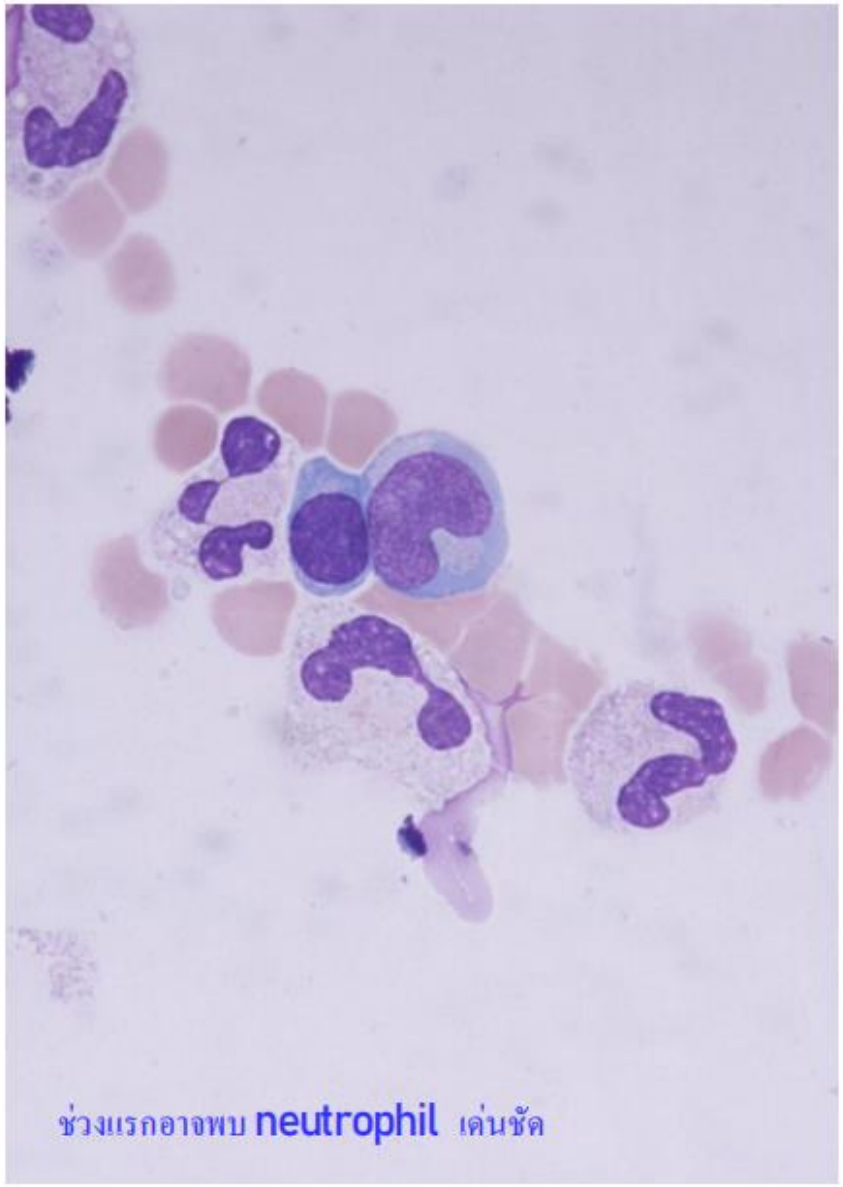
Bacteria (diplococci) and yeast cell

Viral meningitis

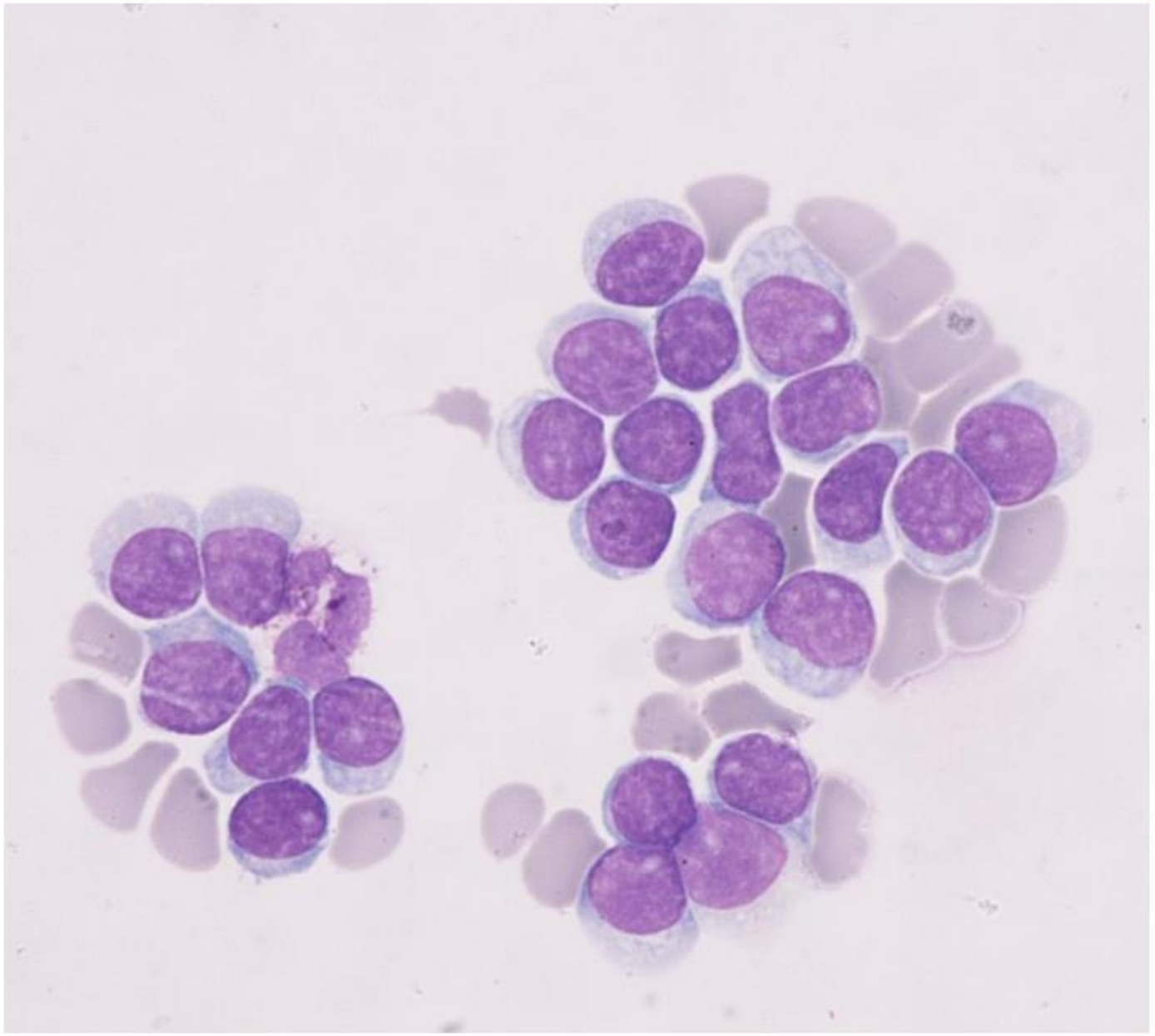

Lymphocyte pleocytosis


Lymphocyte pleocytosis


Lymphocyte pleocytosis

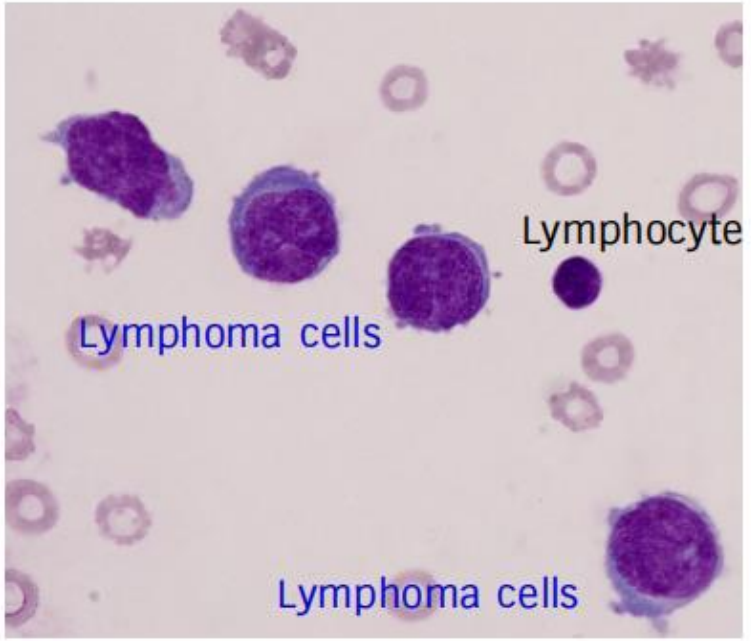

ช่วงแรกอาจพบ neutrophil เด่นชัด

Viral meningitis



แยก lymphocytes กับ blast cell / immature cells / lymphoma cells

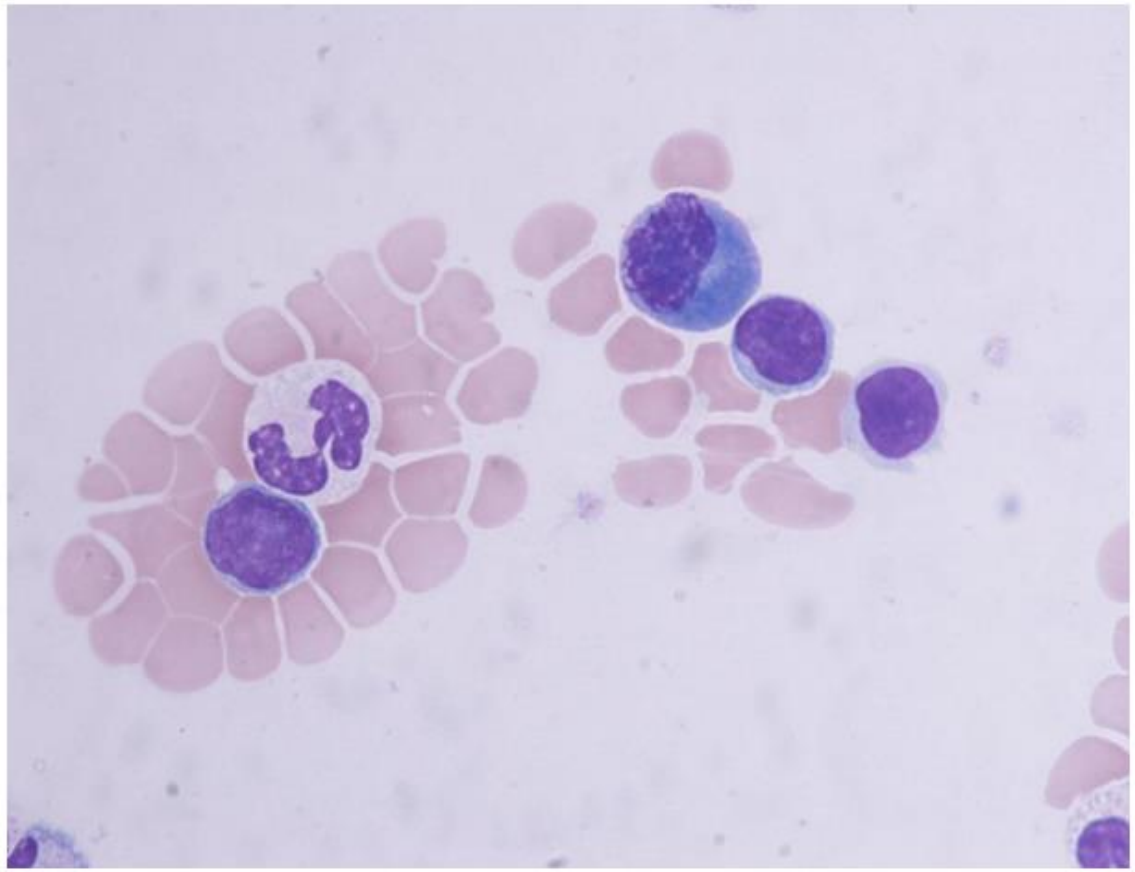
	Lymphoma cell	Lymphocyte
Cell size **N/C ratio** **Chromatin** **Cytoplasm**		



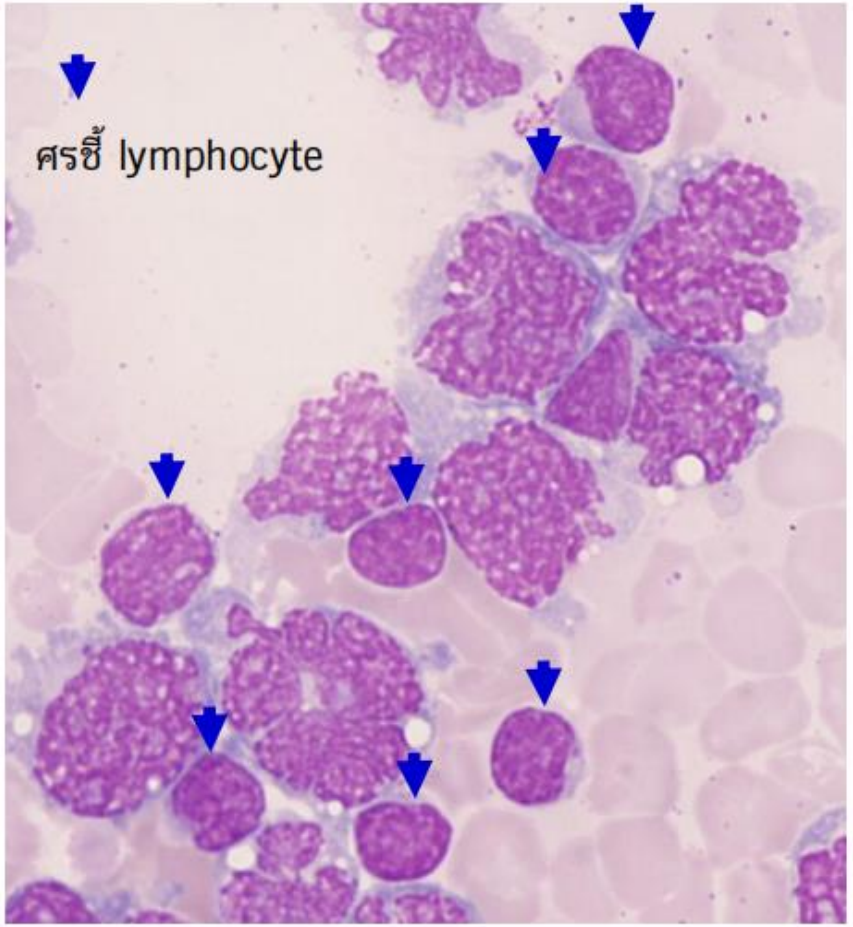
Viral meningitis หรือ aseptic meningitis หรือ lymphocytic meningitis

- จำนวนเซลล์ที่พบแตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 500-1,000 เซลล์ /ลบ.มม. บางรายอาจสูงถึง 10,000 เซลล์/ลบ.มม.
- ผลการตรวจนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวพบว่ามี **lymphocytes อย่างเด่นชัด ทำให้แยกยากจากเชื้อวัณโรค**
- ช่วงแรก (24 ชั่วโมง) ของการดำเนินโรคอาจพบว่ามี **neutrophils เด่นชัด (>50%) ทำให้แยกยากจากการติดเชื้อแบคทีเรีย** หากเจาะน้ำไขสันหลังซ้ำอีกที่ 12 ชั่วโมง ต่อมาจะพบเซลล์พวก lymphocytes ทำให้สามารถวินิจฉัยได้
- ระดับน้ำตาลและโปรตีนมักปกติ

อาจพบ atypical lymphocytes ร่วมด้วย แยกจาก lymphoma อย่างไร



Heterogeneity or pleomorphism



Homogeneity or monotone

Bacterial meningitis score (BMS)

ใช้ในเด็กอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 18 ปีเพื่อช่วยในการแยกระหว่างโรค**เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้อไวรัส และ แบคทีเรีย**

เกณฑ์การพิจารณา	คะแนน
ตรวจย้อมสีกรัมพบเชื้อในน้ำไขสันหลัง	2
เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในน้ำไขสันหลัง ≥ 1,000 เซลล์/µL	1
โปรตีนในน้ำไขสันหลังมากกว่า ≥ 80 มก./ดล.	1
ANC ใน peripheral blood ≥ 10,000 เซลล์/ลบ.มม.	1
มีภาวะชักร่วมด้วย	1

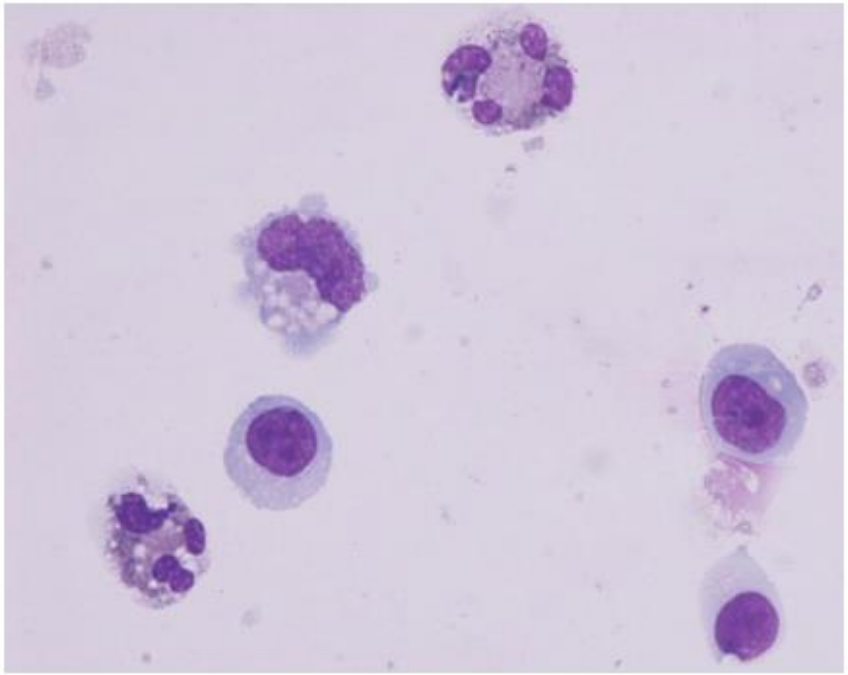
0 คะแนน คือ น่าจะติดเชื้อไวรัส (aseptic meningitis very likely)

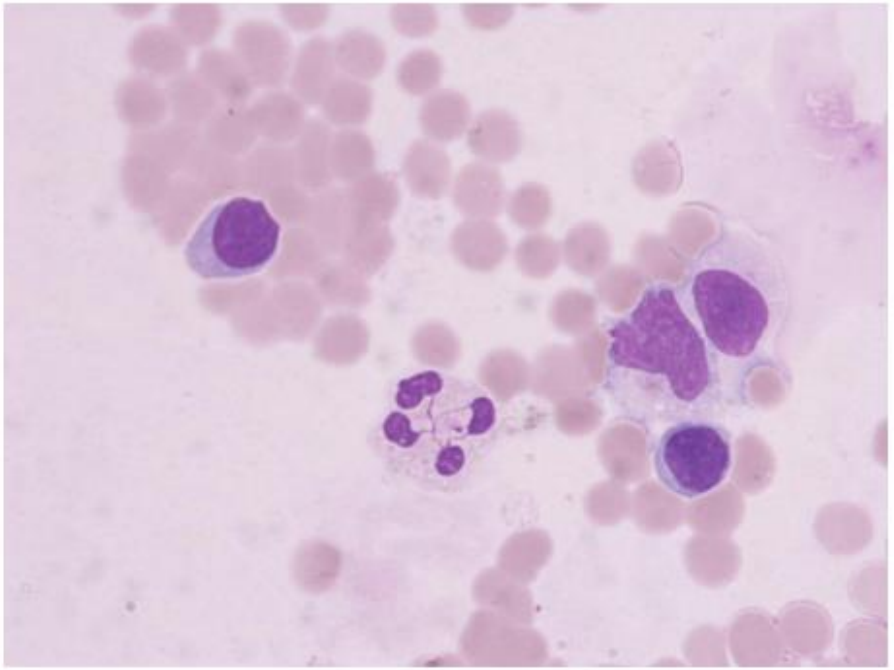
1 คะแนน คือ ไม่น่าจะเกิดจากเชื้อไวรัส (aseptic meningitis less likely)

ตั้งแต่ 2 คะแนนขึ้นไป คือ น่าจะเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (bacterial meningitis more likely)

Tuberculous meningitis

- เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบเป็น *lymphocytes* แต่ในระยะแรกของโรคอาจมี neutrophils สูง จากนั้นจะมี lymphocytes สูงในเวลาหลังจาก 24-48 ชม.
- โปรตีนสูง ส่วนใหญ่ มากกว่า 100 มก./ดล. บางรายอาจสูงถึง 1-2 กรัม/ดล.



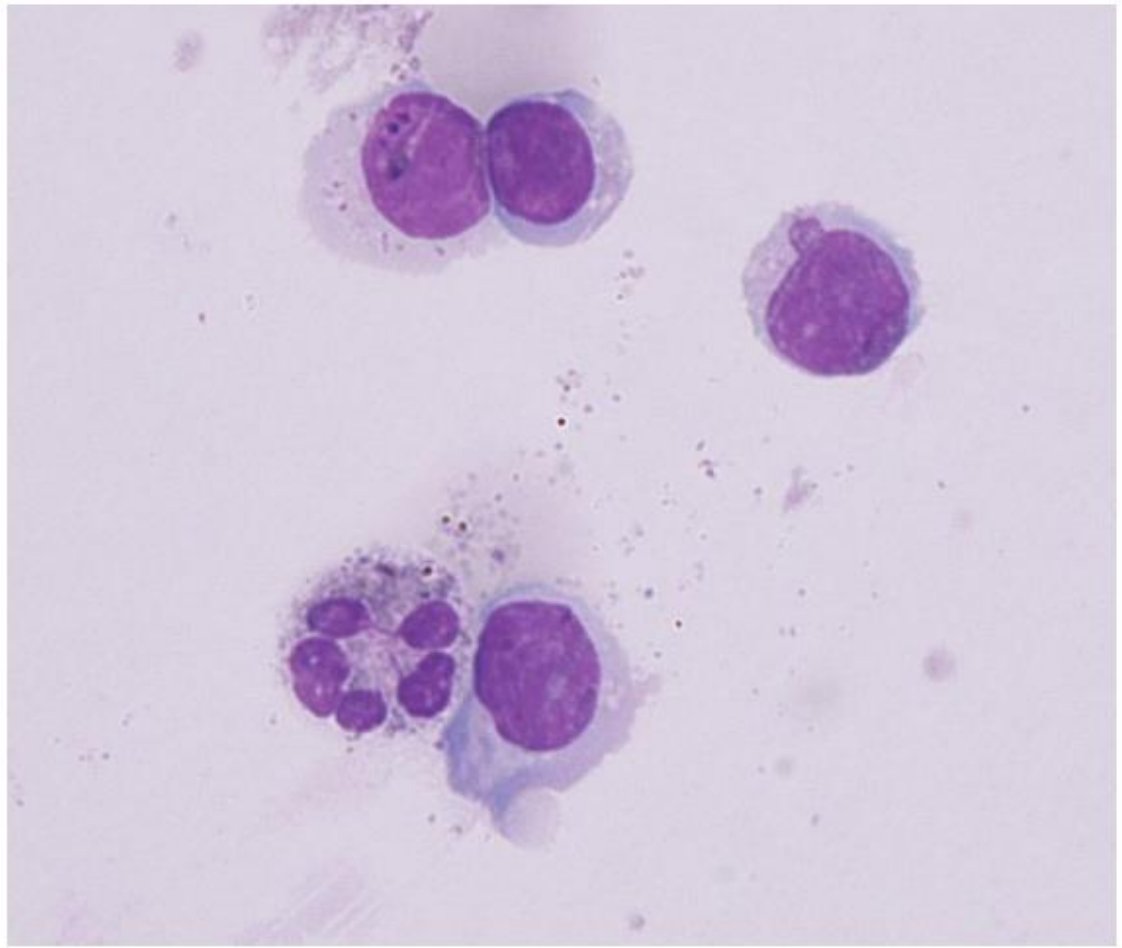


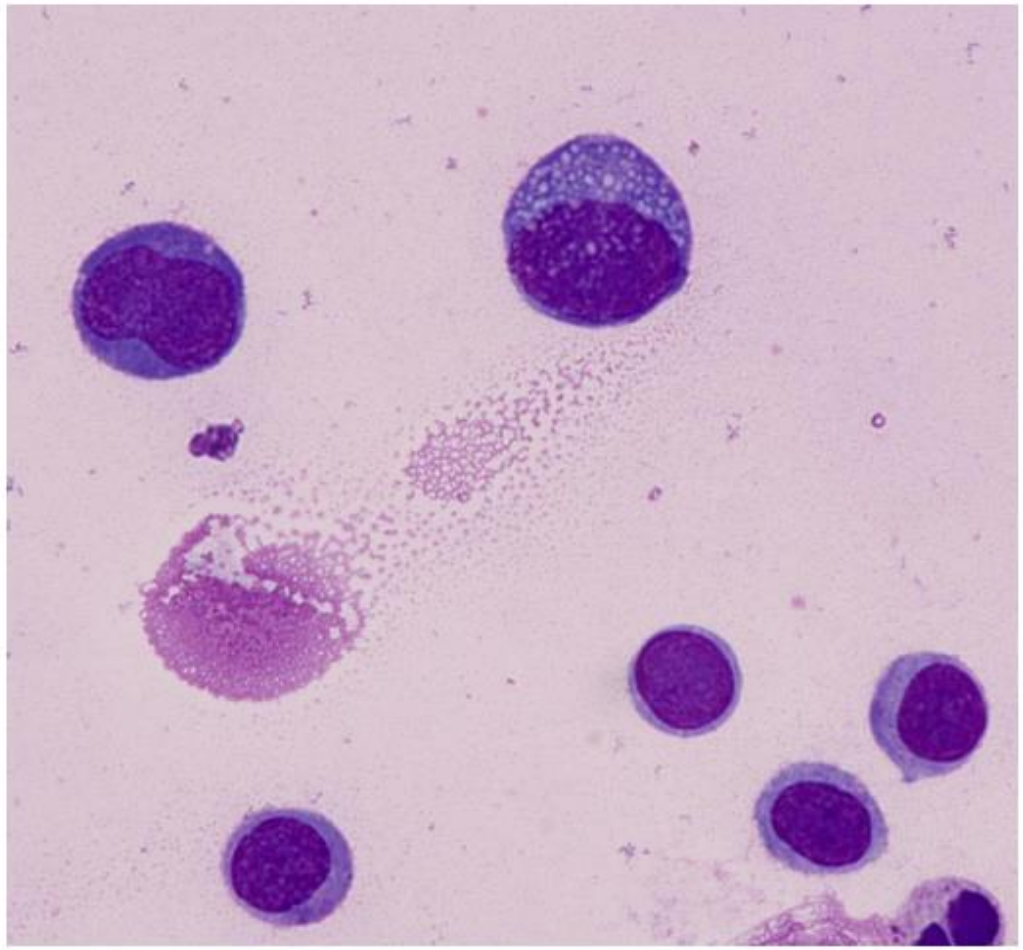
ลักษณะของ tuberculous meningitis ระยะแรกของโรคอาจมี neutrophils สูง

อาจคล้าย bacterial meningitis

Tuberculous meningitis

- จากนั้น lymphocytes สูง





เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบเป็น lymphocytes

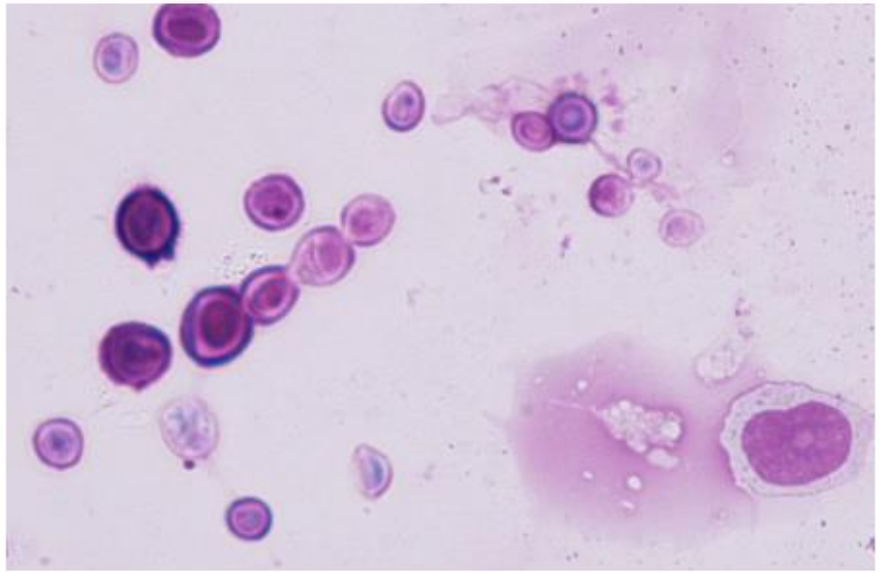
Cryptococcus meningitis

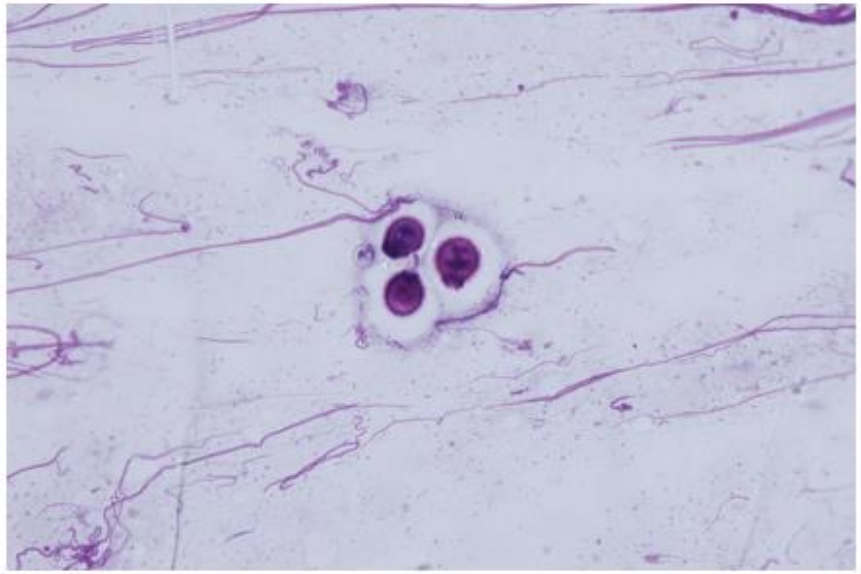
- ส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อ *Crypyococcus neoformans*

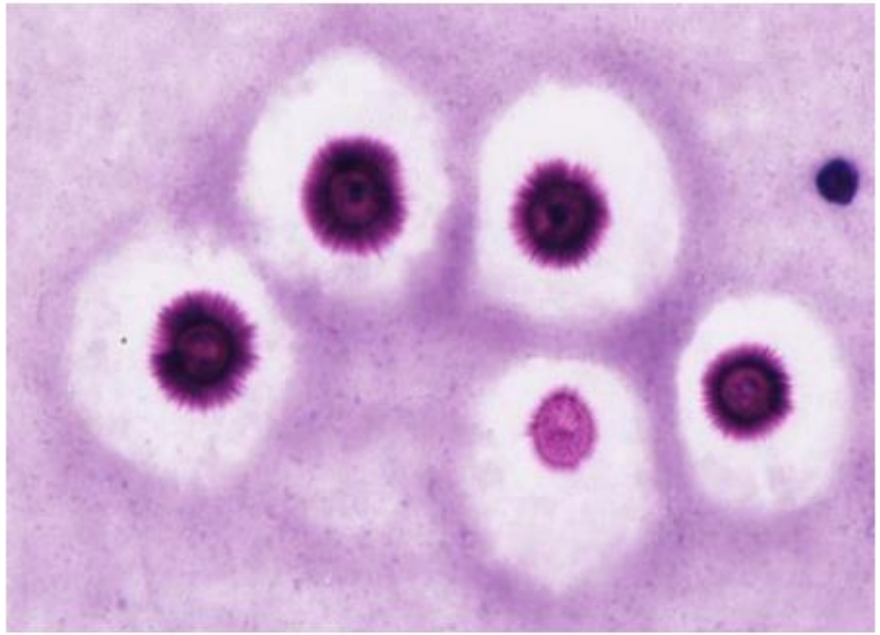
- ในผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคเอดส์
  - จำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 40-400 เซลล์/ ลบ.มม. บางรายอาจมีเซลล์น้อยกว่า 5 เซลล์/uL
  - ส่วนใหญ่เป็น lymphocytes
  - บางรายที่มี eosinophils สูงและถูกวินิจฉัยว่าเป็น eosinophilic meningitis

- ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเอดส์
  - ส่วนใหญ่มีเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 20 เซลล์/uL
  - อาจไม่พบเซลล์เม็ดเลือดในน้ำไขสันหลังเลยได้

Cryptococcal meningitis



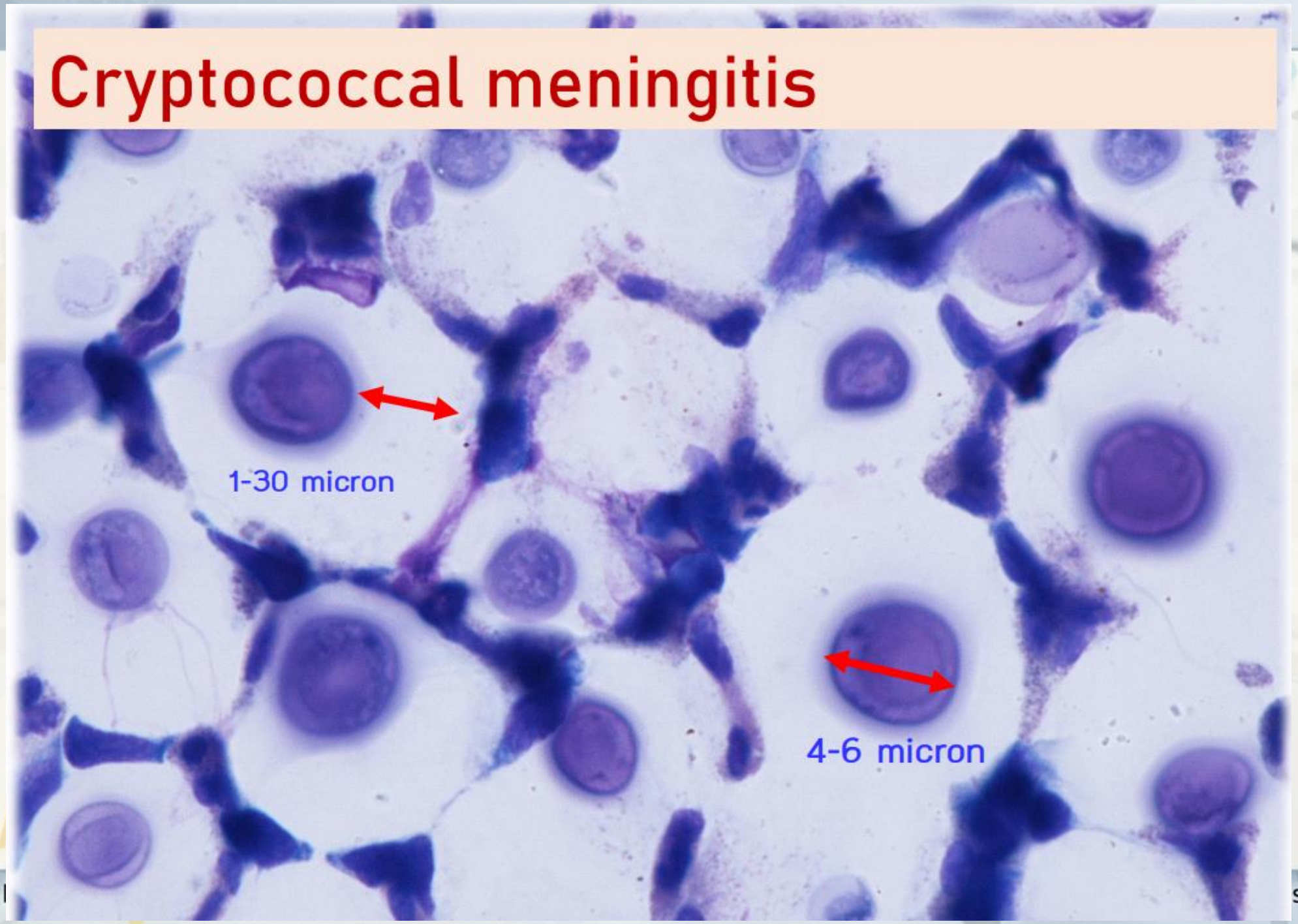




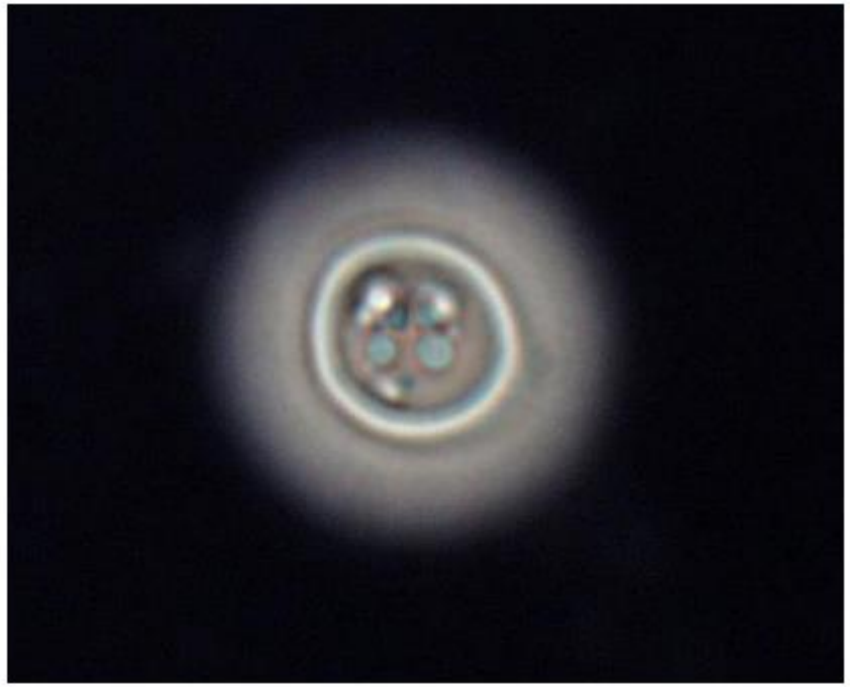
รอบเซลล์มีลักษณะคล้ายรังสีที่แผ่ออกไป
เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า "Sunburst" และเห็น
เป็นบริเวณใส ย้อมไม่ติดสี

"Sunburst liked yeast and budding yeast cell were seen ; consistent with *Cryptococcus neoformans*"

Cryptococcal meningitis



Cryptococcal meningitis

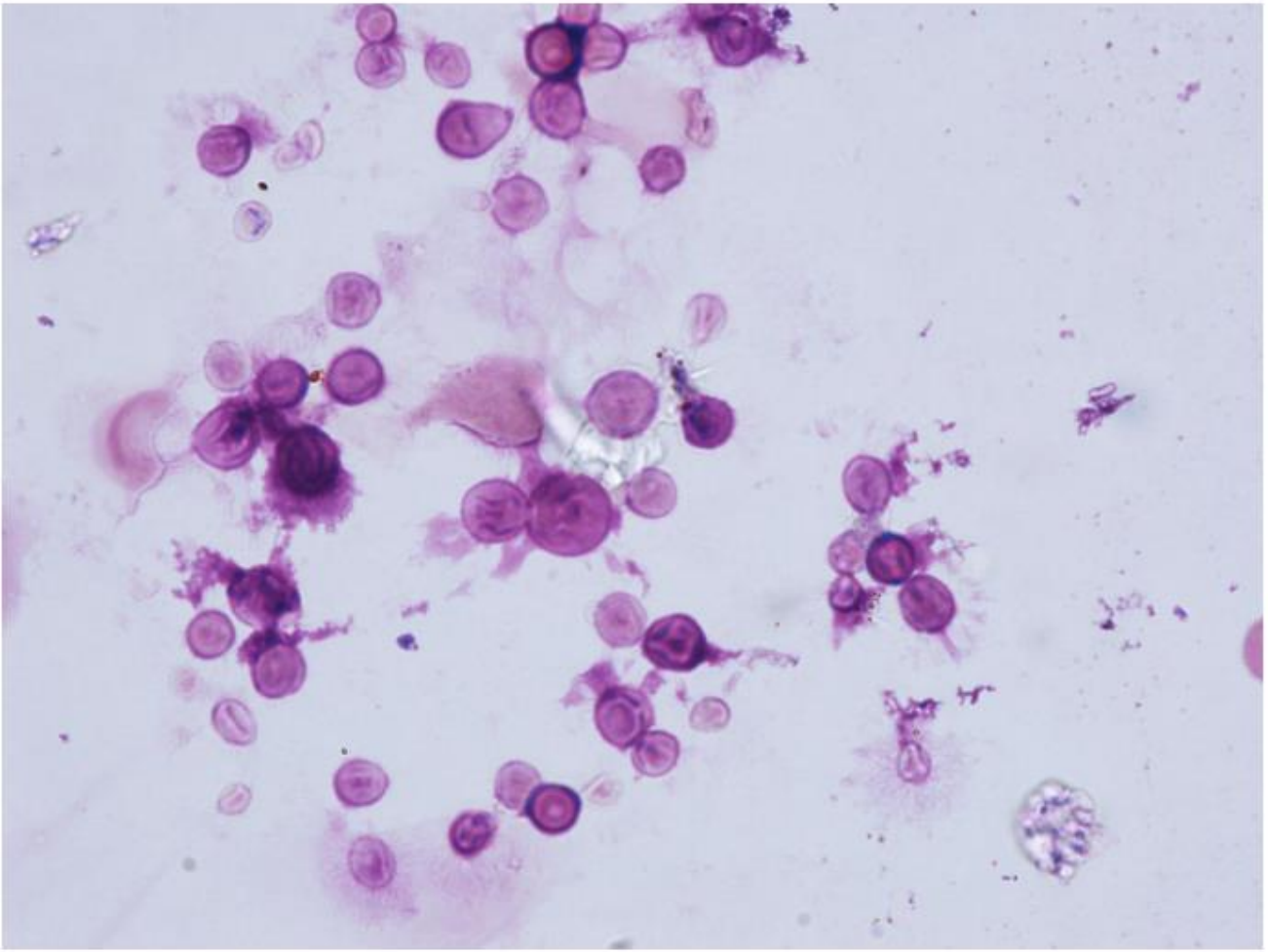


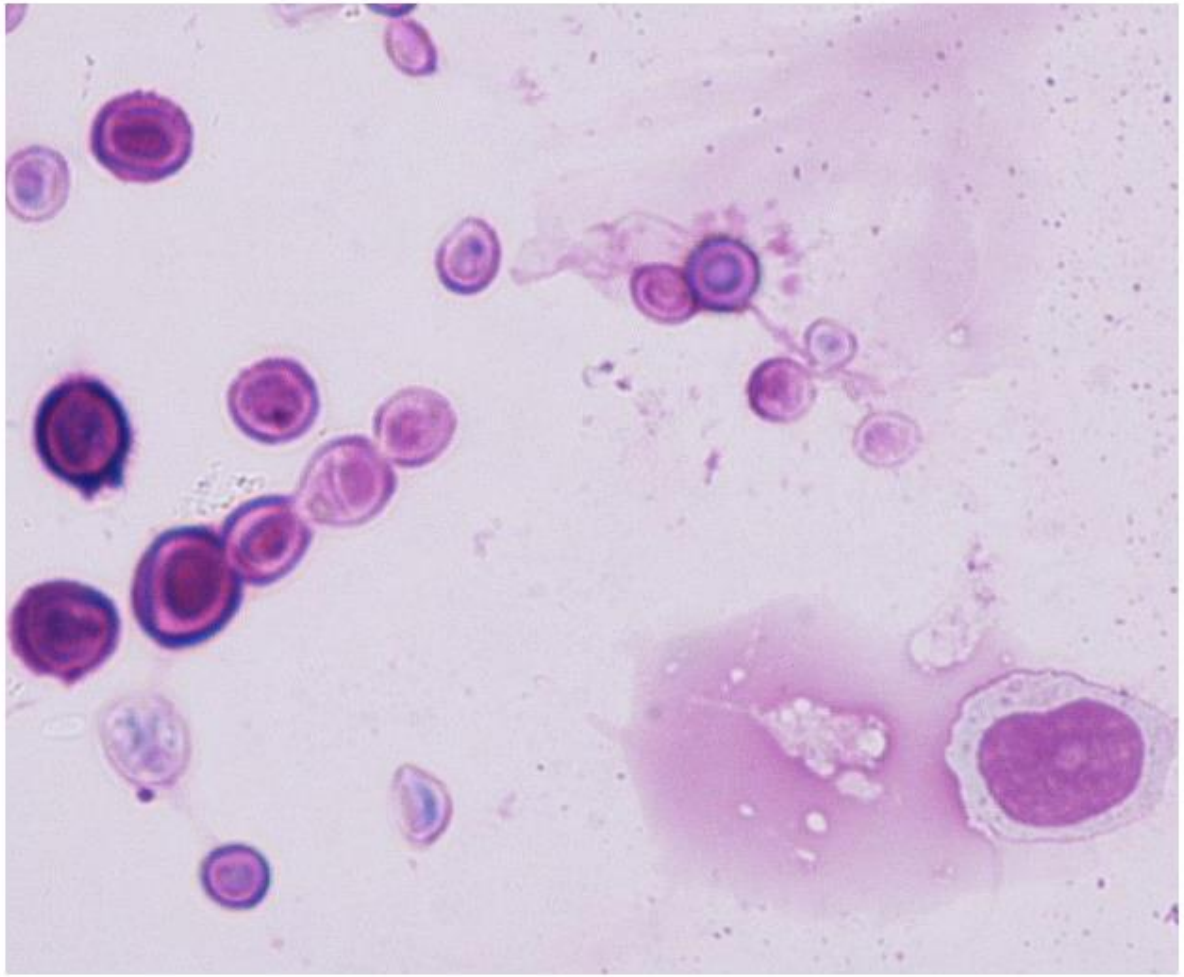
ย้อมด้วย India ink พบลักษณะ yeast และ budding yeast ที่มีแคปซูลหนาซึ่งไม่ติดสี การพบจะรายงานว่า

Indian ink positive, encapsulated yeast and budding yeast cells were found

Sensitivity 25% - 50%

Cryptococcal meningitis



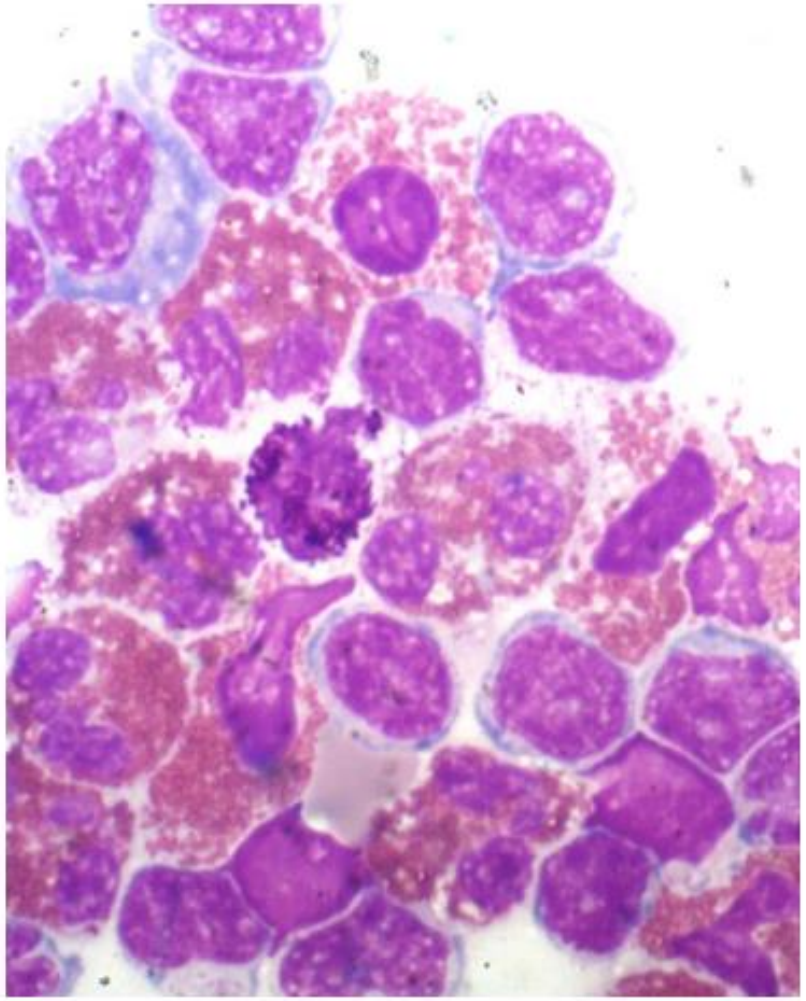


Eosinophilic meningitis

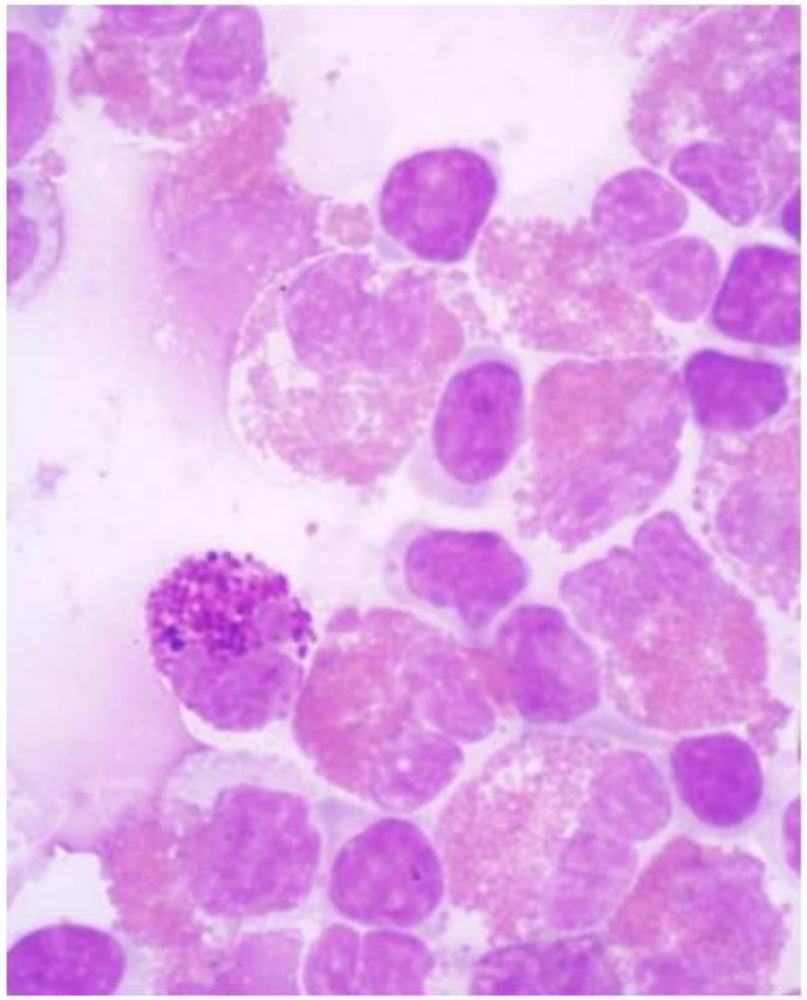
หมายถึง ภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบที่ตรวจพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophilic ในน้ำไขสันหลัง ตั้งแต่ร้อยละ 10 หรือตั้งแต่ 10 เซลล์/uL

1) พยาธิหอยโข่ง (Angiostrongylus cathonensis) หรือพยาธิปอดหนูหรือพยาธิปวดหัวหอย
2) พยาธิตัวจี๊ด (Gnathostoma spinigirum)
3) ตัวอ่อนของพยาธิตืดหมู (Taenia solium)
4) สาเหตุอื่นๆ เช่น tuberculous meningitis, Cryptococcal meningitis

Eosinophilic meningitis

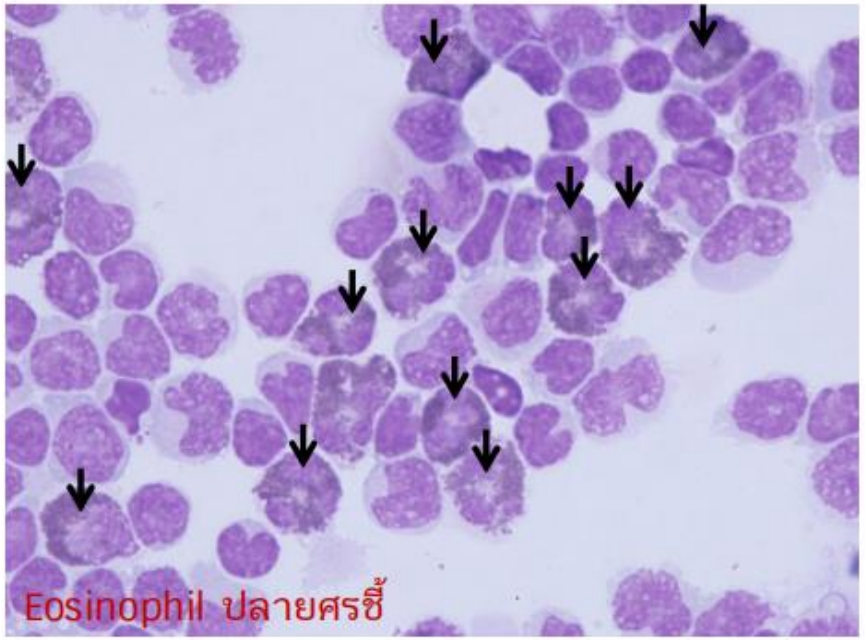


Eosinophil pleocytosis

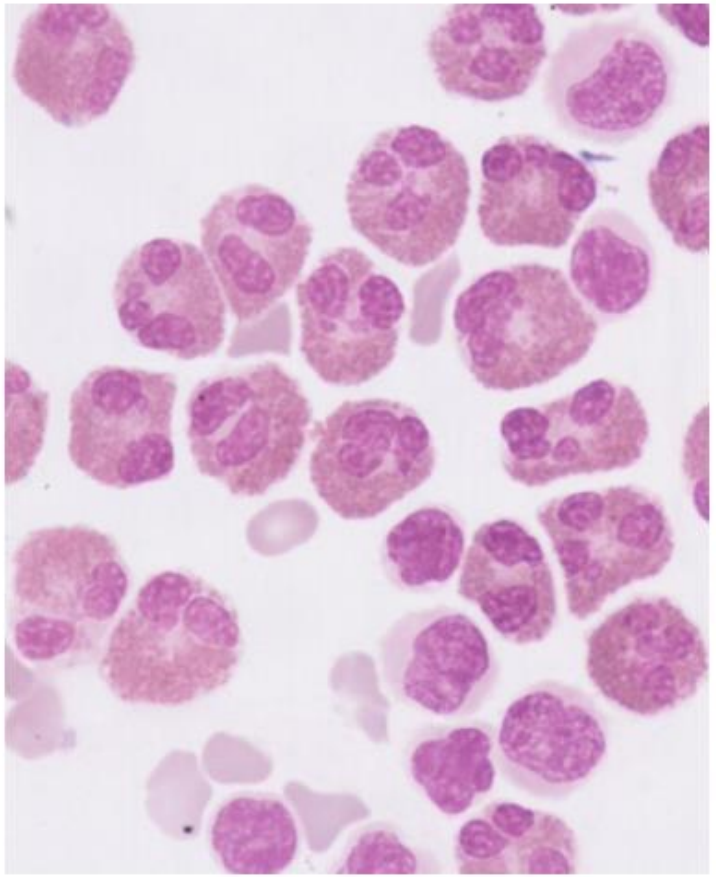


Eosinophil pleocytosis

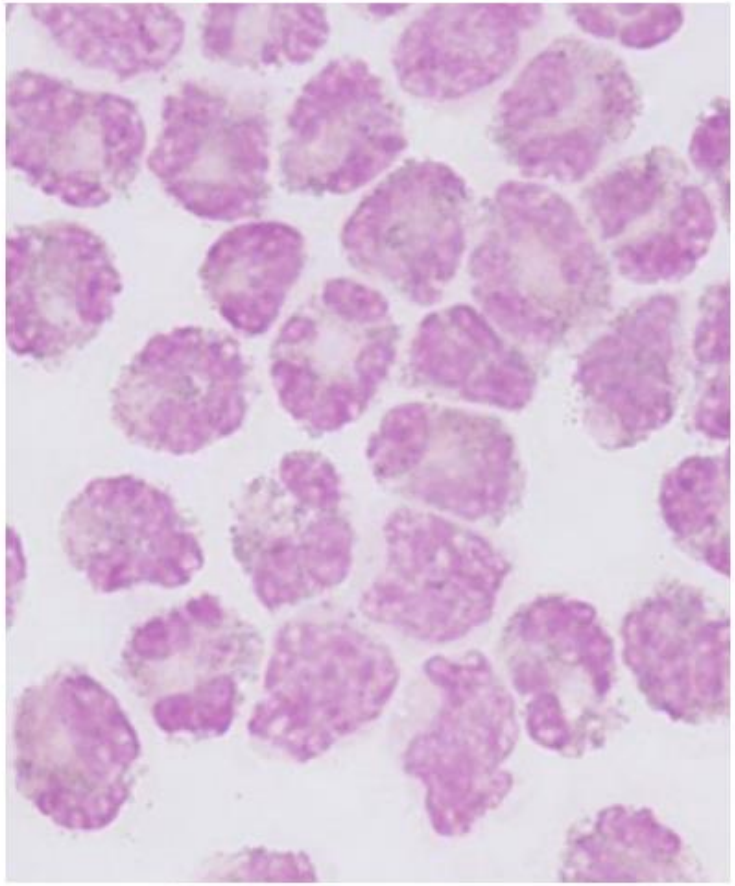
ข้อควรระวัง Neutrophil VS Eosinophil



Eosinophil ปลายศรชี้



ทั้งหมดคือ eosinophil



ทั้งหมดคือ neutrophil

หากดูเซลล์ Neutrophil และ Eosinophil ไม่ถูกต้อง

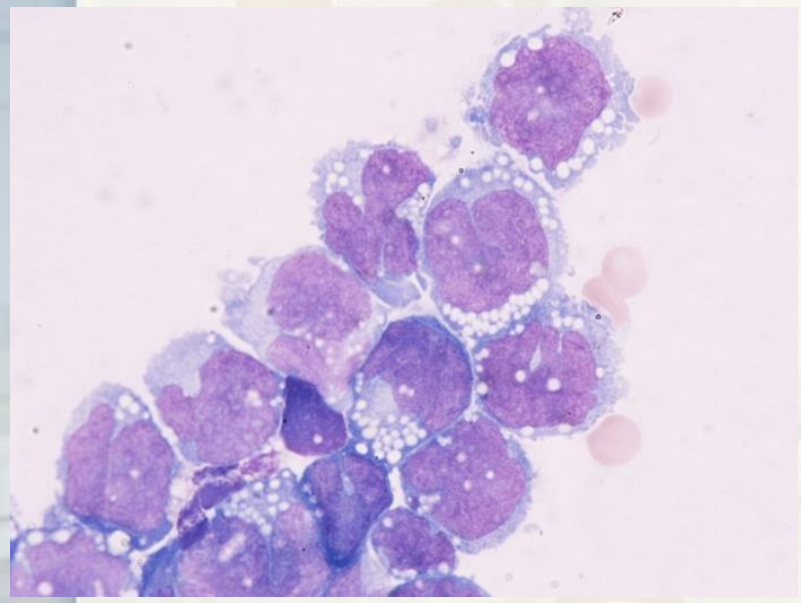
เกิดอะไรตามมา

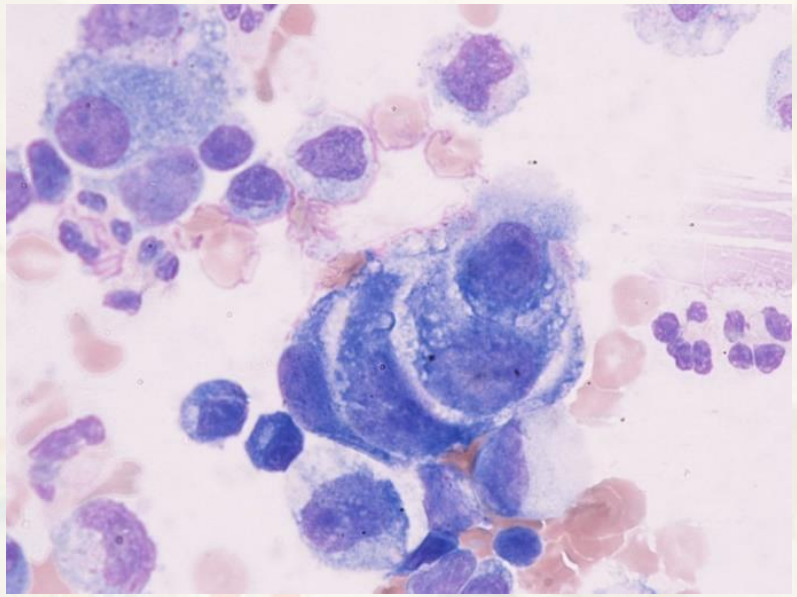
Major Laboratory Results for Differential Diagnosis of Meningitis

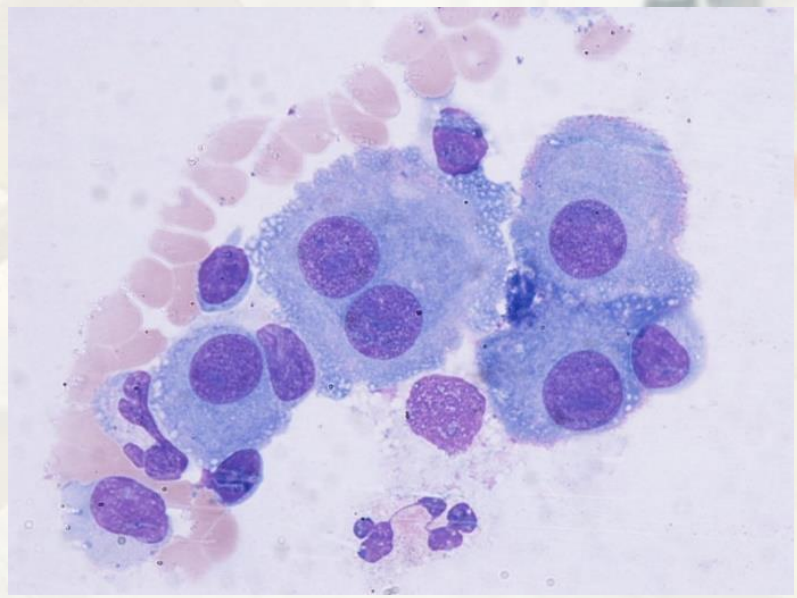
Bacteria	Viral	Tubercular	Fungal
Elevated WBC count	Elevated WBC count	Elevated WBC count	Elevated WBC count
Neutrophils present	Lymphocytes present	Lymphocytes and monocytes present	Lymphocytes and monocytes present
Marked protein elevation	Moderate protein Elevation	Moderate to marked protein elevation	Moderate to marked protein elevation
Markedly decreased glucose level	Normal glucose level	Decreased glucose level	Normal to decreased glucose level
Lactate level >35 mg/dL	Normal lactate level	Lactate level >25 mg/dL	Lactate level >25 mg/dL
Positive Gram stain and bacterial antigen tests		Pellicle formation	Positive India ink with *Cryptococcus Neoformans* Positive immunologic test for *C. neoformans*

Strasinger SK. Urinalysis and Body Fluids. 6th edition 2014

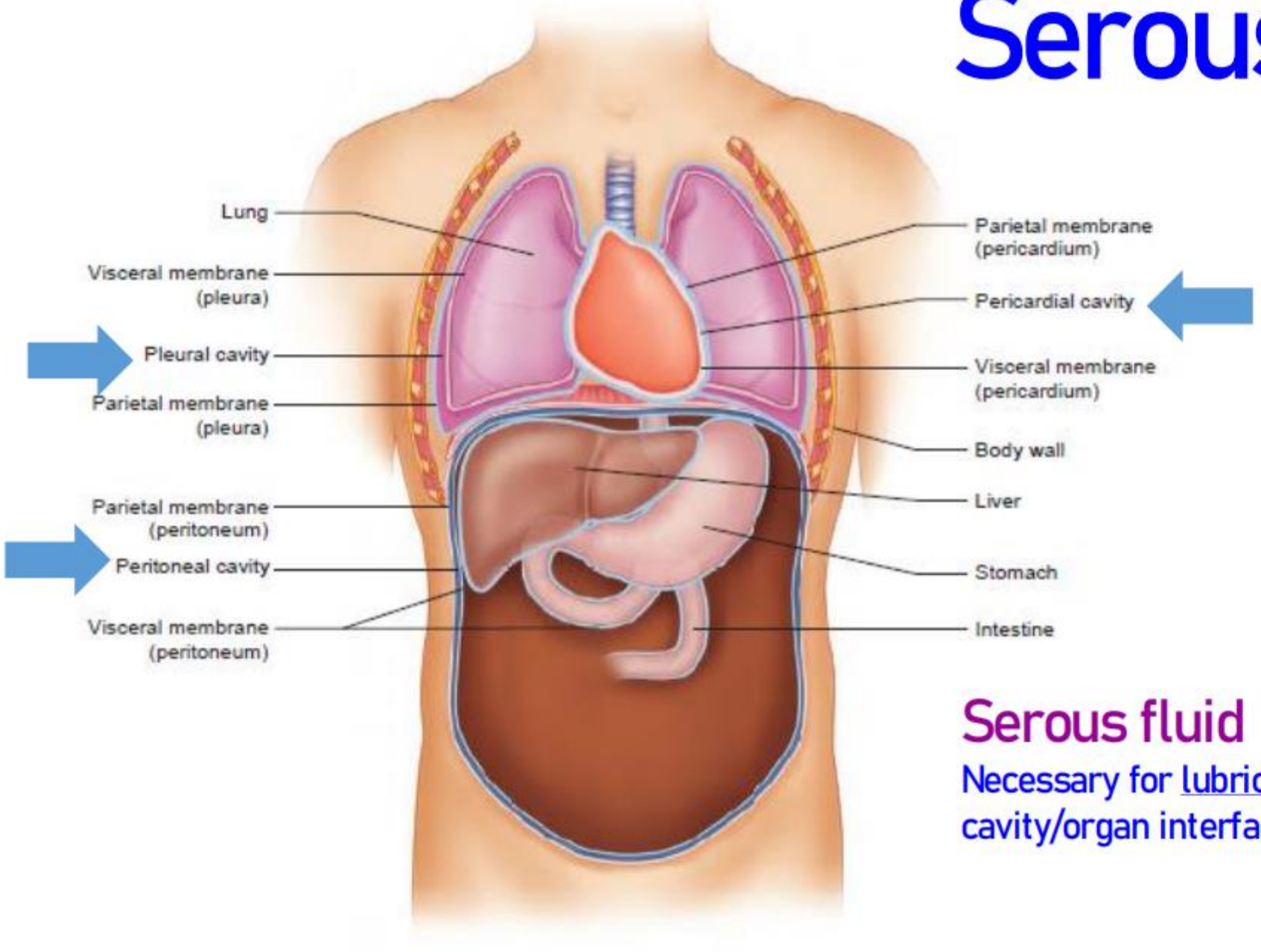
สารน้ำซีรัส Serous Fluids







Serous fluid



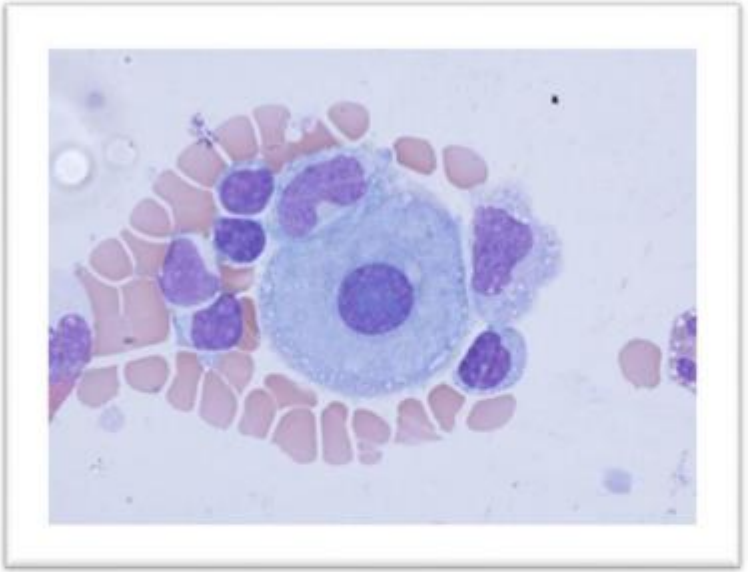
Serous fluid

Necessary for lubrication of the body cavity/organ interface during movement

Normal serous fluid

RBC

- Not normally seen
- RBCs
  - Hemorrhage or traumatic



WBC

- Present in low numbers
- Mononuclear cells predominating

Mesothelial cells

- Present in body fluids due to normal sloughing of cells

Serous fluid

Pathologic Causes of Effusions

- **Increased capillary hydrostatic pressure**
  - Congestive heart failure
  - Salt and fluid retention
- **Decreased oncotic pressure**
  - Nephrotic syndrome
  - Hepatic cirrhosis
  - Malnutrition
  - Protein-losing enteropathy
- **Increased capillary permeability**
  - Microbial infections
  - Membrane inflammations
  - Malignancy
- **Lymphatic obstruction**
  - Malignant tumors, lymphomas
  - Infection and inflammation
  - Thoracic duct injury

ที่มา Urinalysis and Body Fluids. 6th Ed 2014

Differentiation of transudates and exudates

Parameters	Transudates	Exudates
Causes	Increased hydrostatic pressure Decreased oncotic pressure	Increased capillary permeability Decreased lymphatic absorption
Physical Examination - Clarity - Color - Clots spontaneously	 Clear Pale yellow No	 Cloudy Variable (yellow, greenish, pink, red,) Variable; often yes
Microscopic Examination - WBC count - Differential count	 <1,000 /µl (pleural) <300 /µl (peritoneal) Mononuclear cell predominate	Variable, usually >1,000 /µl (pleural) >500 /µl (peritoneal) Early, neutrophils predominate; late, mononuclear
Chemical Examination - Bilirubin ratio (fluid-to-serum) - Glucose - Total protein concentration - Total protein ratio (fluid-to-serum) - LD activity - LD ratio (fluid-to-serum) - Cholesterol ratio (fluid-to-serum)	 ≤ 0.6 Equal to serum <50% of serum level ≤ 0.5 < 60% of serum ≤ 0.6 ≤ 0.3	 > 0.6 Less than or equal to serum > 50% of serum level > 0.5 > 60% of serum > 0.6 > 0.3

" No single set of criteria separates all transuadate from all exuadates for all patients"

Physical examination

ลักษณะขุ่นขาวคล้ายนม

(milky white appearing)

ตัวอย่างของ peritoneal effusion

ที่มา ; https://www.researchgate.net/figure/Four-liters-of-milky-white-appearing-peritoneal-fluid-on-paracentesis_fig2_317390220

ที่มา; Aju R, et al. BMJ Case Rep 2014. doi:10.1136/bcr-2013-203105

ตัวอย่างของ pleural effusion

Chylous Effusion ?

Thoracic duct leakage

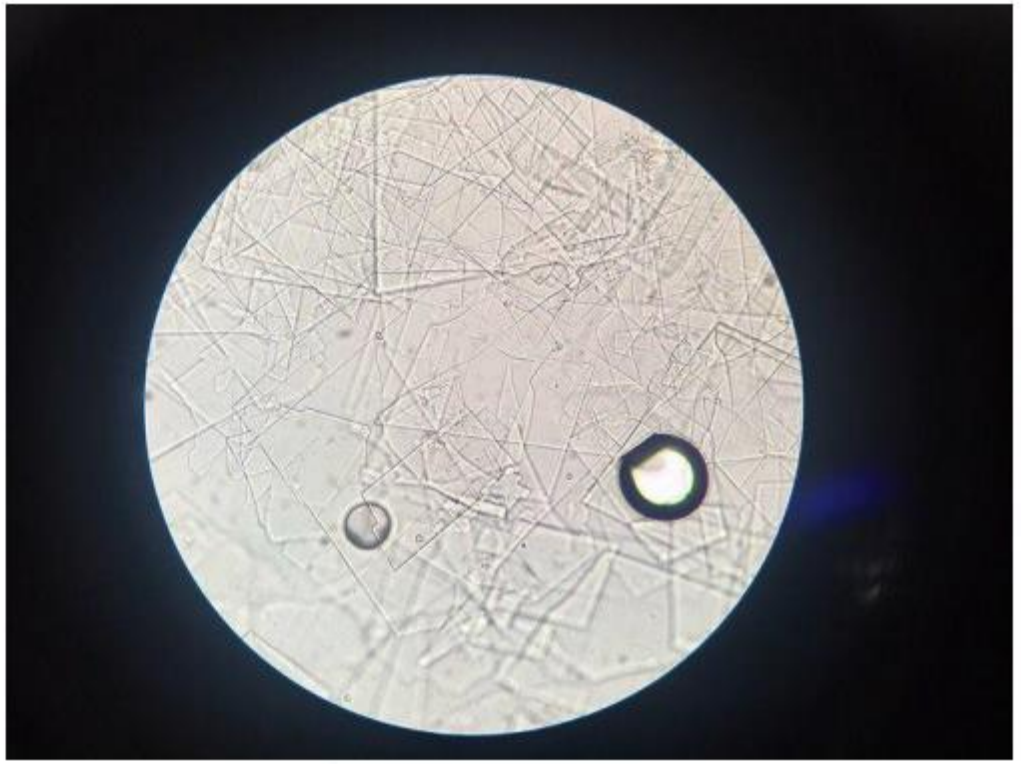
Pseudochylous Effusion ?

Chronic inflammatory conditions

Differentiation of chylous and pseudochylous effusion

Parameters	Chylous effusion	Pseudochylous effusion
Physical examination	Milky	Milky
Chemical examination - Chylomicrons - Triglycerides - Cholesterol	Present >110 mg/dl Usually <200 mg/dl	Absent <110 mg/dl Usually > 200 mg/dl
Microscopic examination	Lymphocytes	Vareity of cell type Lipid-laden macrophage Cholesterol crystals*
Conditions	Pleural effusion due to - Trauma or surgery (cause damage to thoracic duct) - Obstruction of lymphatic system : tumors (lymphomas), fibrosis Peritoneal effusion due to - Hepatic cirrhosis - Portal vein thrombosis	Chronic diseases - Tuberculosis - Rheumatoid arthritis - Collagen vascular disease

* Confirmed pseudochylous effusion



ภาพ: กนกพร ฤทธิ์แสง

Wet preparation

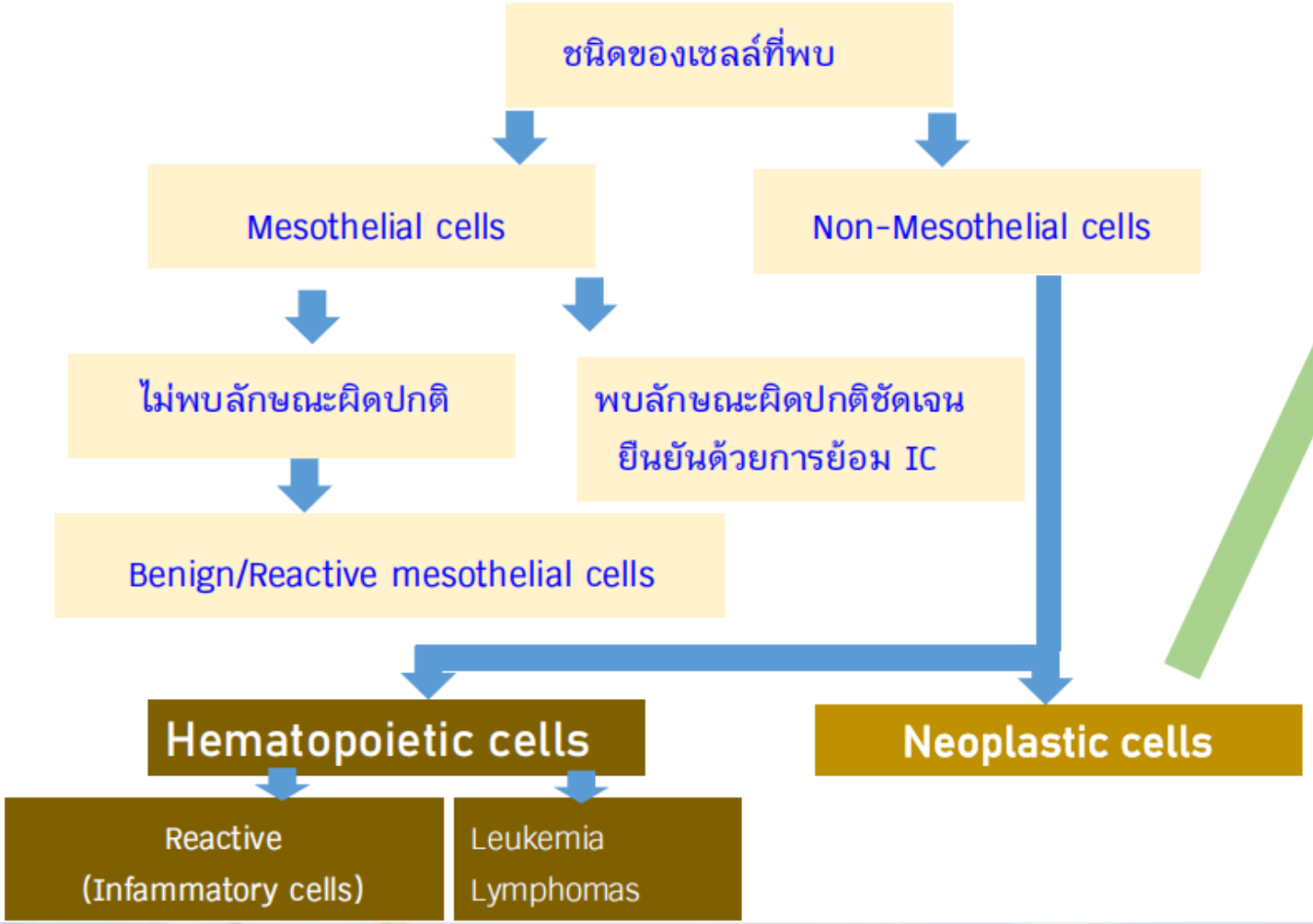
Cholesterol crystals

ภาพ: กนกพร ฤทธิ์แสง

1 Sl

Name

Microscopic examination



Cytologic Examination

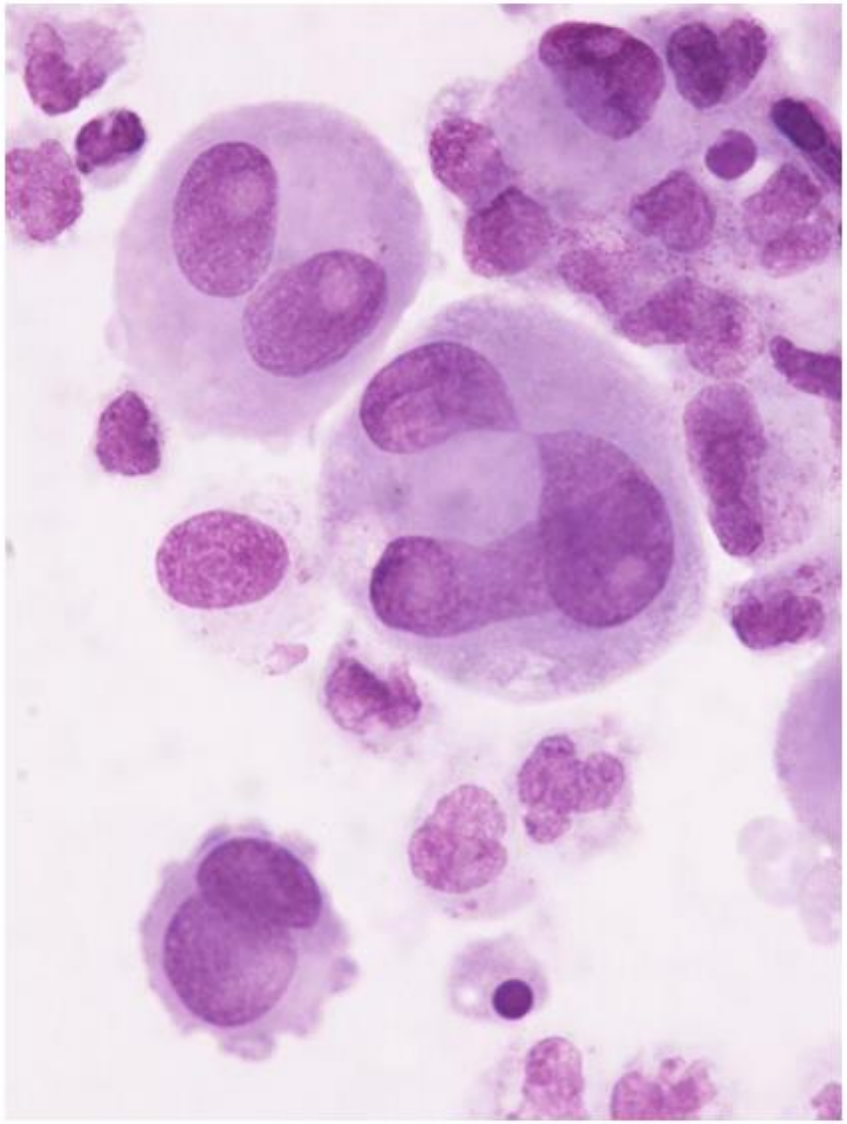
Malignancy?

Sensitivity of the detection of malignancy in hematology lab 20% to 60%

- Sample preparation
- Staining differences
- Differences in the training and experience

การแพร่กระจายของมะเร็งมายัง serous effusion

Site	Men	Women
Pleural	Lung Lymphoma/ leukemia Gastrointestinal tract Sarcoma Mesothelioma Genitourinary (kidney, prostate, bladder) Melanoma	Breast Lung Lymphoma/leukemia Ovary Gastrointestinal tract Endometrium Sarcoma Mesothelioma
Peritoneal	Lymphoma/ leukemia Gastrointestinal tract Pancreas Lung Sarcoma Prostate Melanoma Germ cell tumors Mesothelioma	Ovary Breast Endometrium Stomach Lymphoma/leukemia Colon and rectum Pancreas Mesothelioma



ที่มา Cytology Diagnostic Principles and Clinical Correlates. 5th Ed 2021

Pleural effusion

Cell	Significance
PMN	Pneumonia Pancreatitis Pulmonary infarction Early TB
Lymphocyte	Tuberculosis Viral infection Autoimmune disorders Malignancy
Mesothelial cell	Normal and reactive form have no clinical significance Decreased mesothelial cell are associated with tuberculosis
Plasma cell	Tuberculosis
Malignant cell	Primary adenocarcinoma and small cell carcinoma Metastatic carcinoma

แนวทางในการตรวจสเมียร์ serous effusion

Scanned on low power/high power

⬇

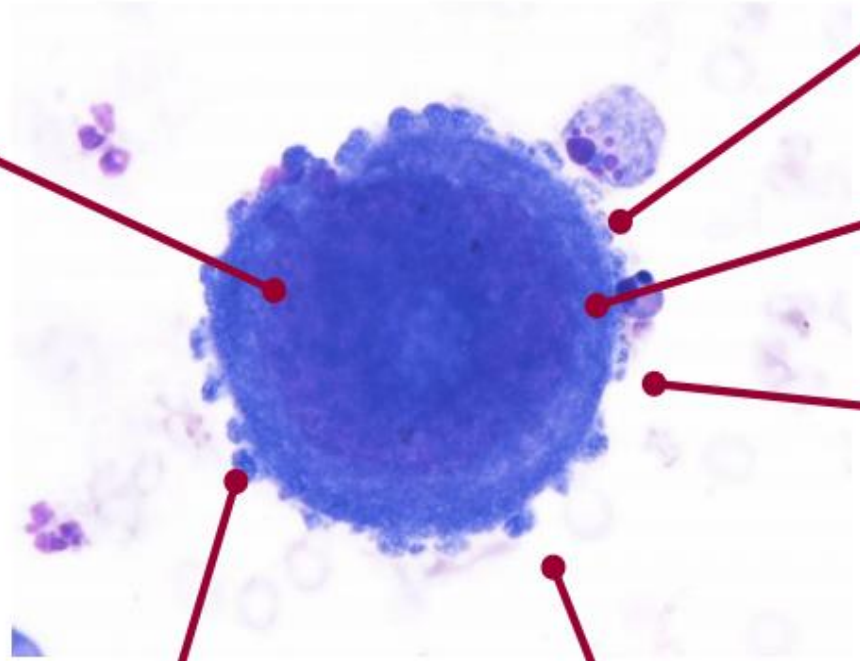
Look for

⬇

Differential WBC : 100x (oil immersion)

https://www.youtube.com/watch?v=7hk6nfj2pno

หลักในการพิจารณาเซลล์ผิดปกติ



Nuclear features
"ลักษณะนิวเคลียส"

Hyperchromasia
Variation in
size,shape,number
Nucleoli features
Nuclear molding
Intranuclear inclusion

Size of cells
"ขนาดเซลล์"

Nuclear : cytoplasmic ratio
"สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึม"

Arrangement of cells
"การเรียงตัวของเซลล์"

Sheetlike
Syncytial
Cell ball
Rosette and glandular
Other forms
Cannibalistic, Indian file arrangement

Cytoplasmic features
"ลักษณะไซโทพลาซึม"

Well defined
Irregular defined
Vacuolated
Deep blue/Cyanophilic
Intracytoplasmic inclusion

Pleomorphism
"ความหลากหลายในขนาดและรูปร่าง ลักษณะ"

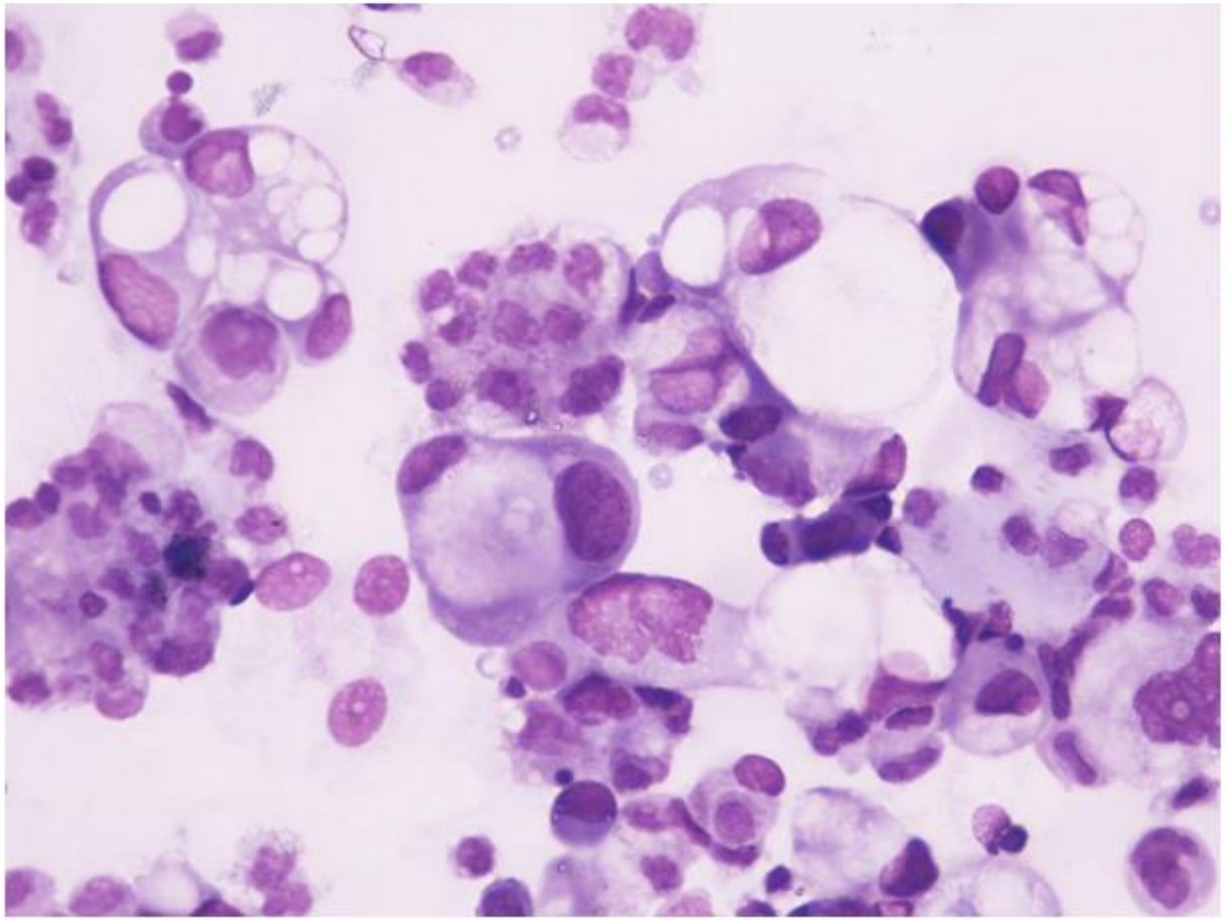
No single microscopic feature that is diagnostic of malignancy !

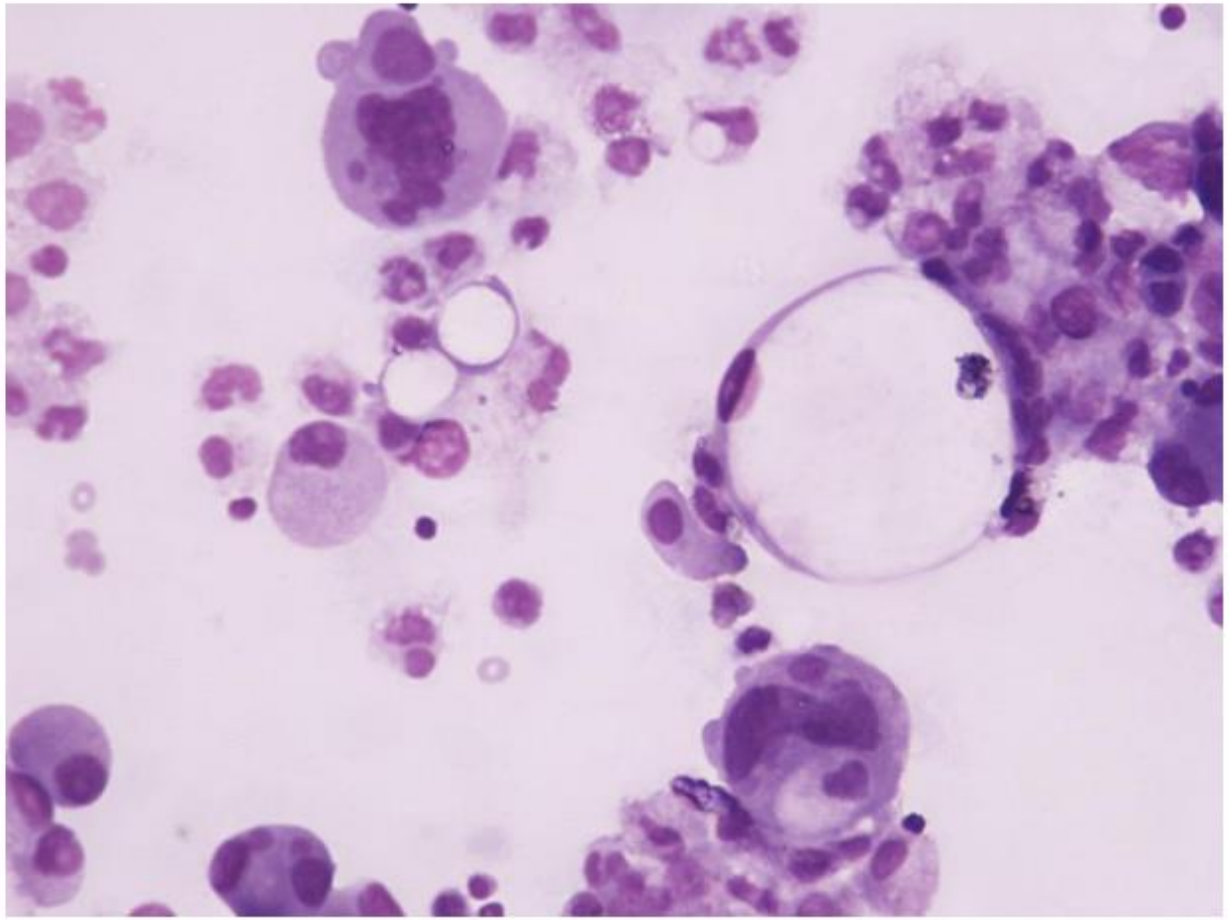
Pleomorphism

ในงานทางโลหิตวิทยา/จุลทรรศน์ การพบความผิดปกติของเซลล์ จะอาศัยการบรรยายลักษณะ ร่วมกับการ differential cell count

Pleomorphism

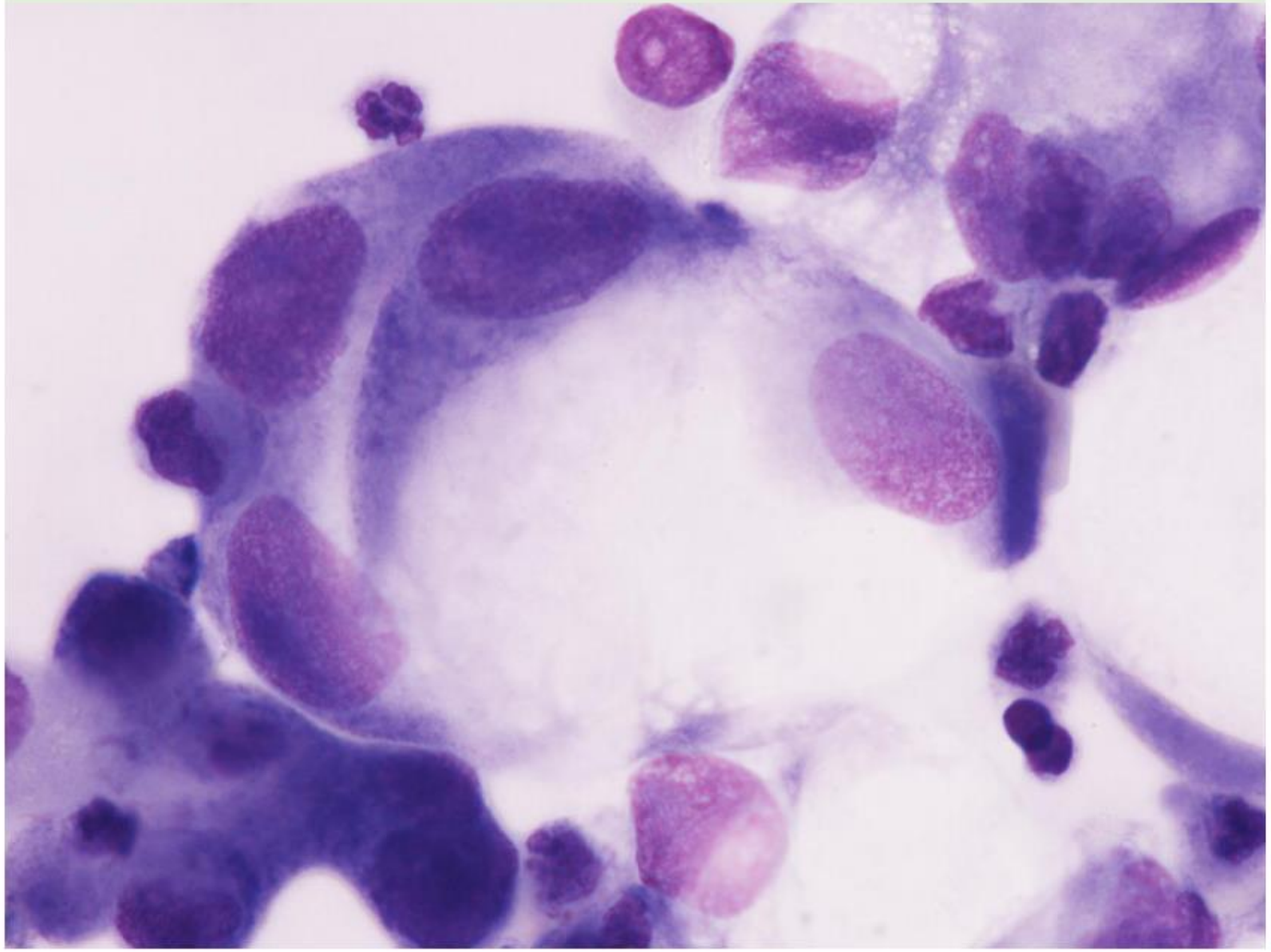
หมายถึง การพบเซลล์ที่มีรูปร่าง ลักษณะและขนาดหลากหลาย ปะปนกันอยู่





High power field

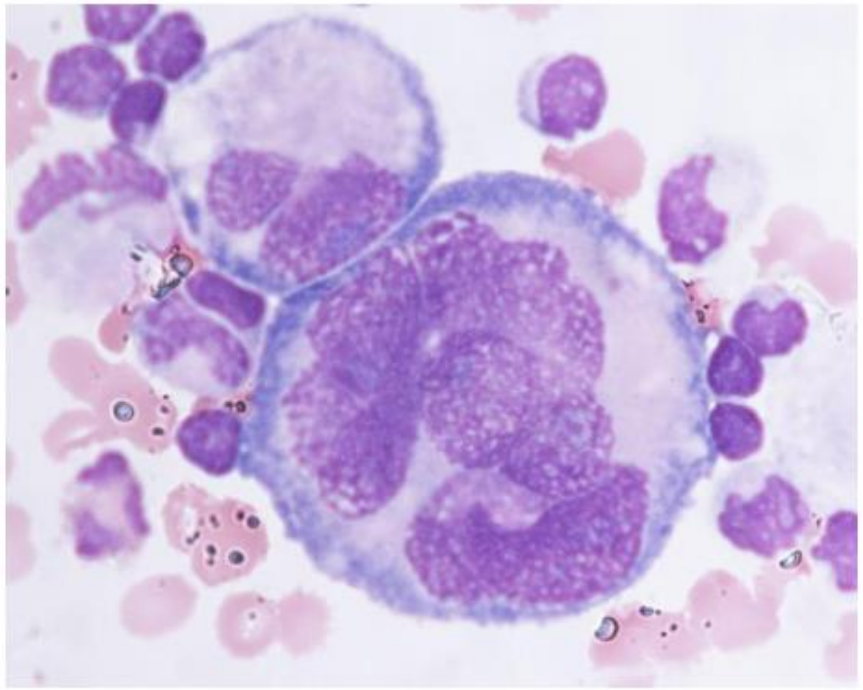
Pleomorphism

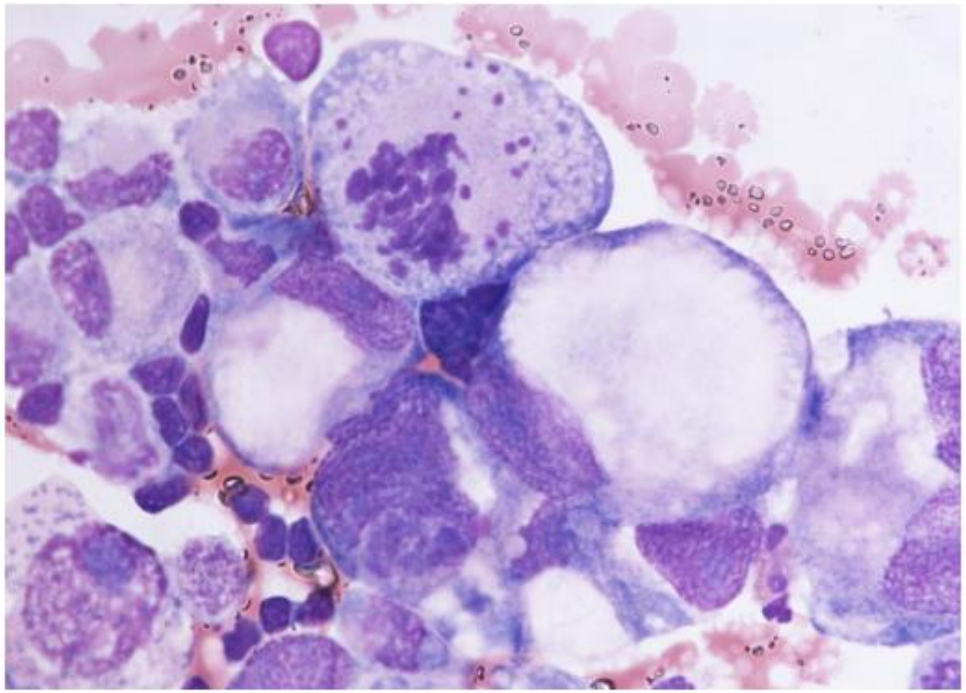


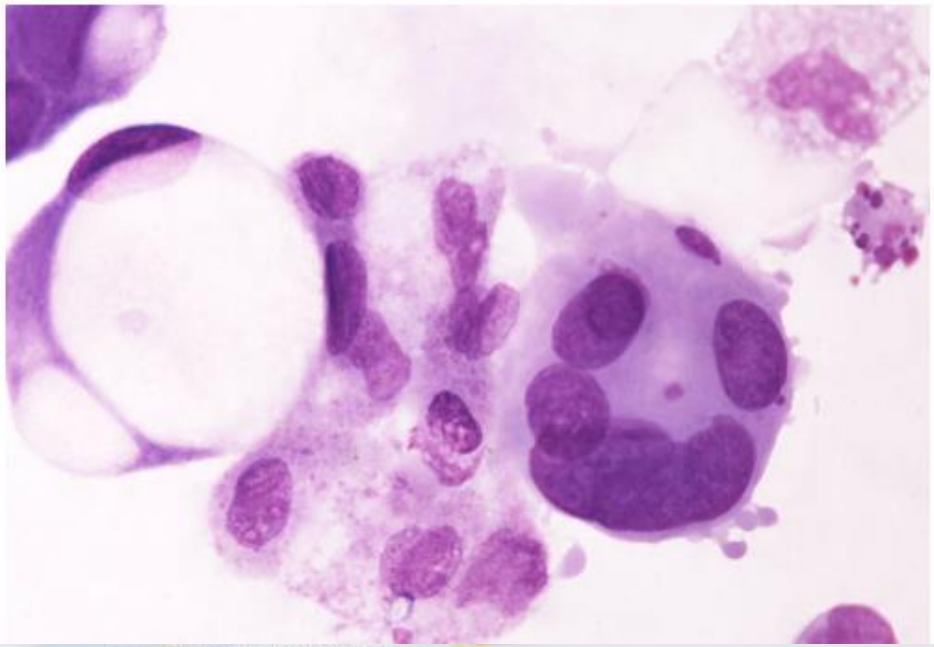
Signet ring cell

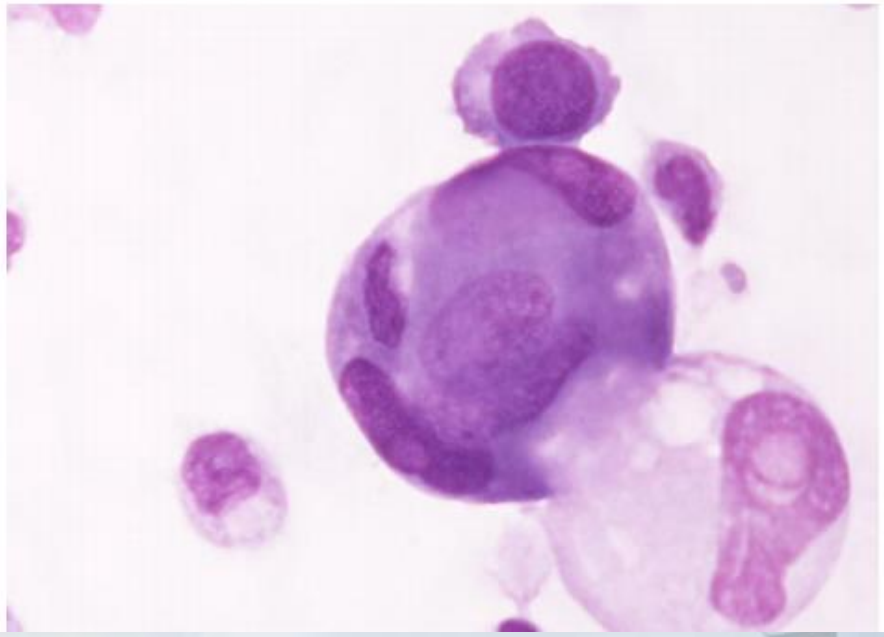
+

Cannibalistic cell

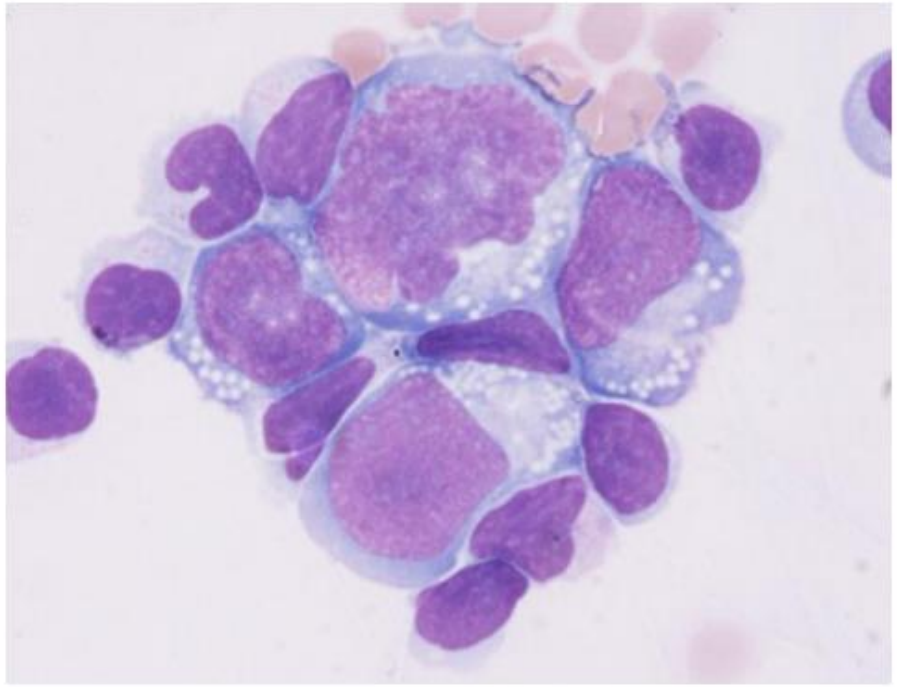


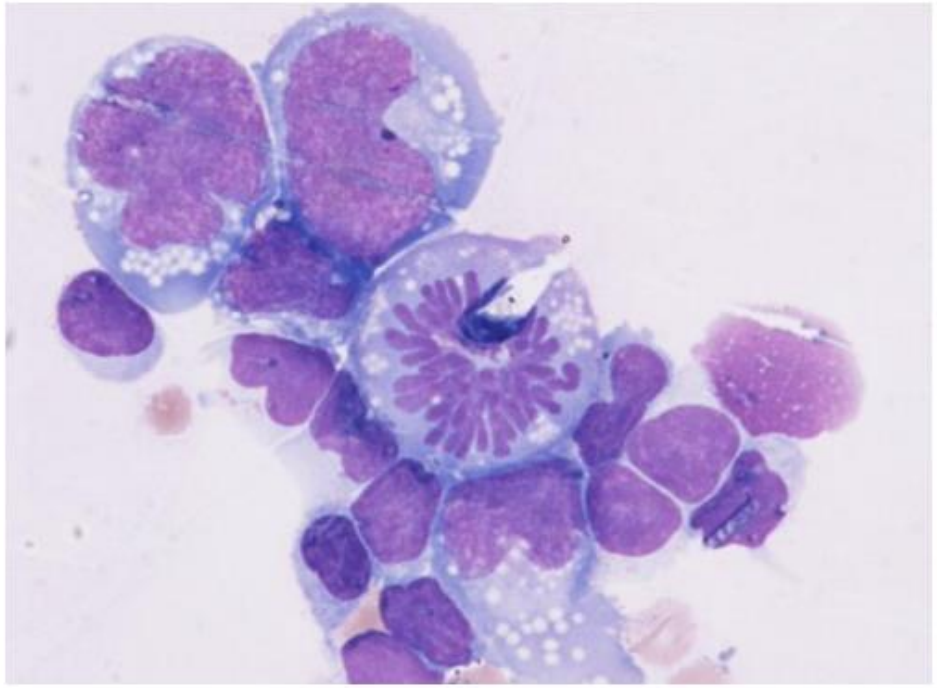


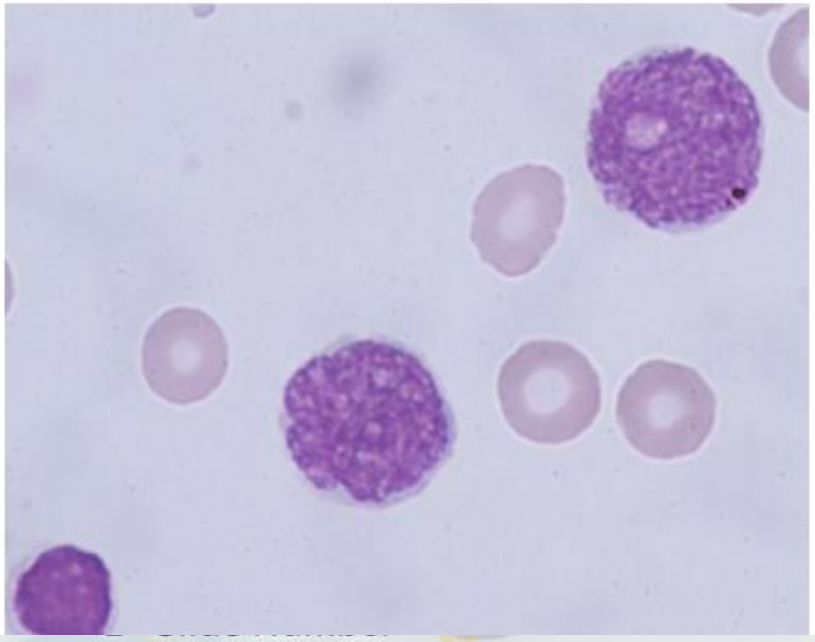


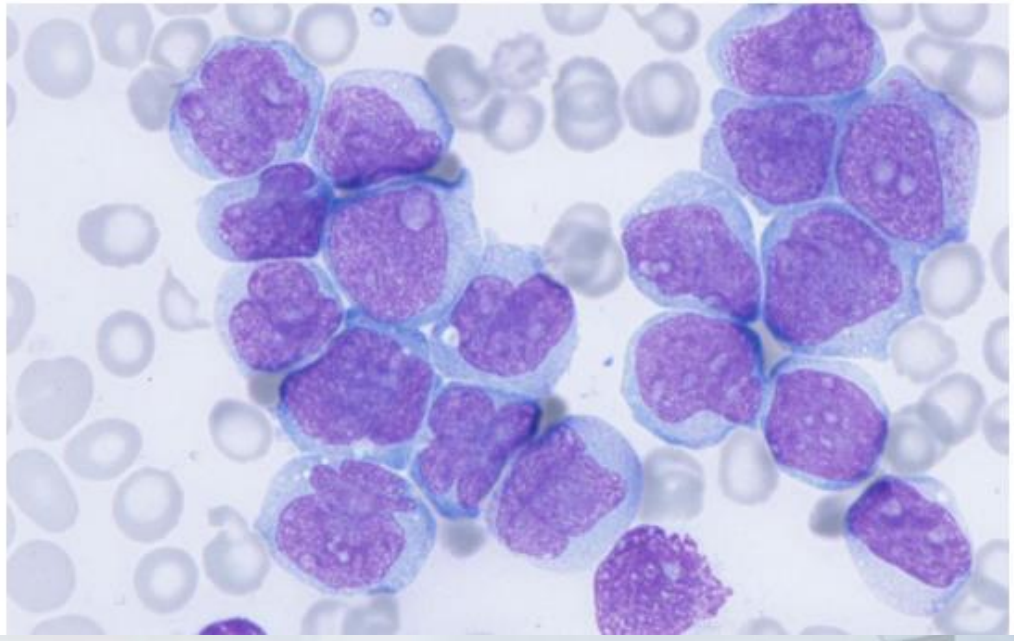


Pleomorphic





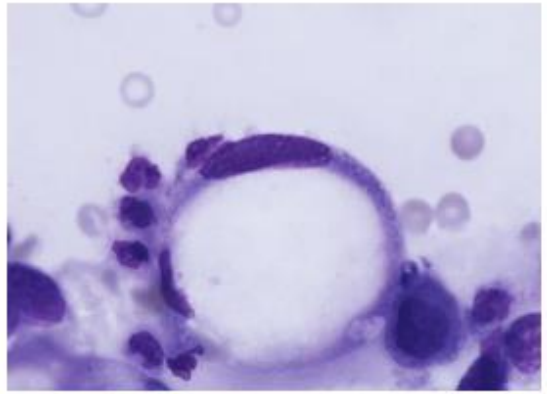


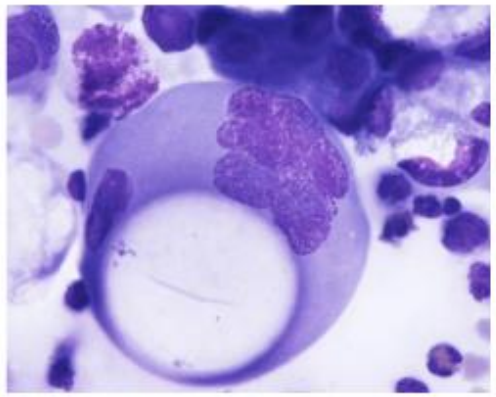


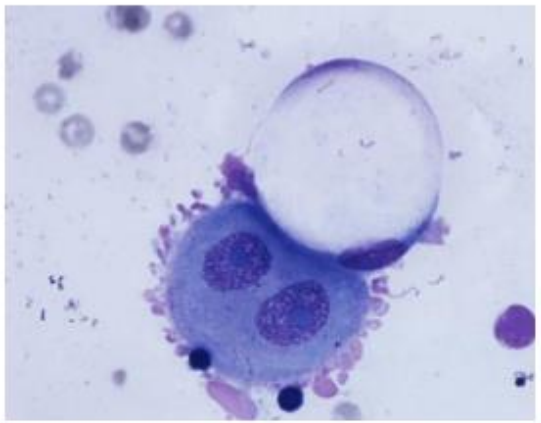
Monomorphic

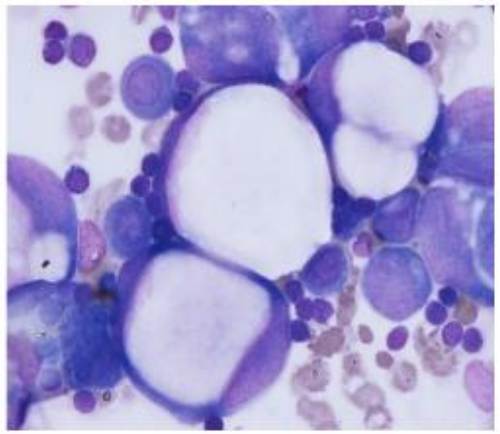
Signet ring cell

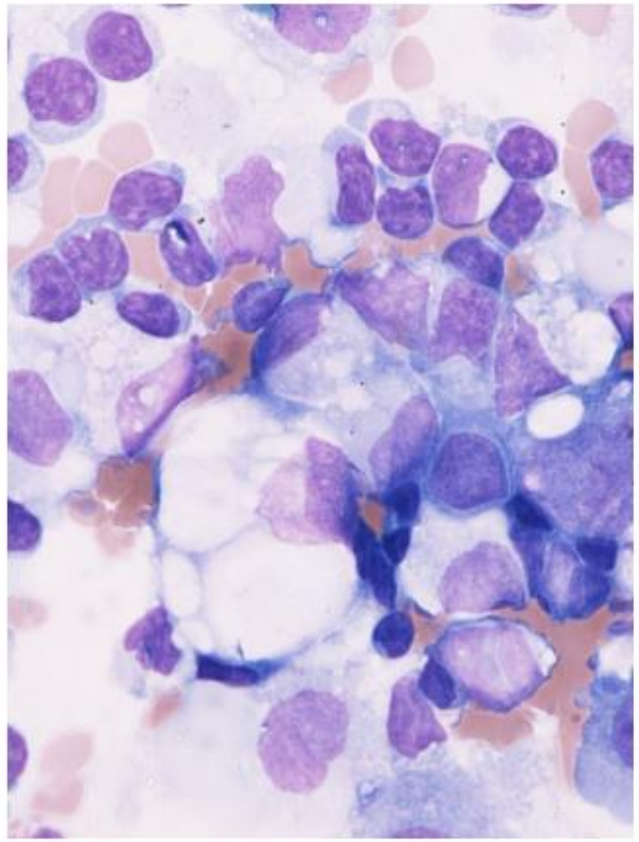
เป็นลักษณะหนึ่งที่พบได้ของเซลล์มะเร็ง โดยที่เซลล์สร้างสารต่างๆ (**secretions**) ภายในไซโทพลาซึม ทำให้นิวเคลียสถูกดันไป อยู่ด้านข้างลักษณะดังกล่าวนี้พบได้บ่อยใน **well differentiated adenocarcinoma** ที่สร้างมิวซิน (**mucin**) บางครั้ง **macrophage** อาจมีลักษณะคล้ายกับ **signet ring cell** ได้

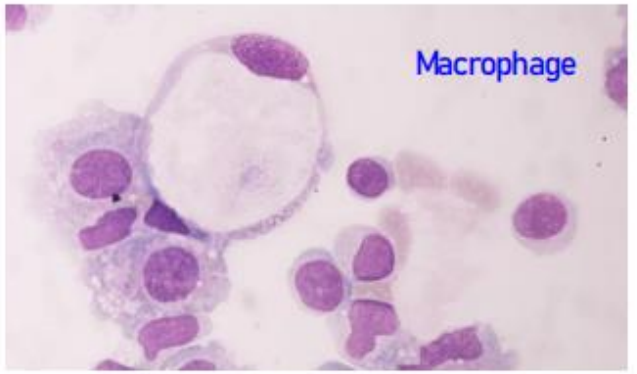


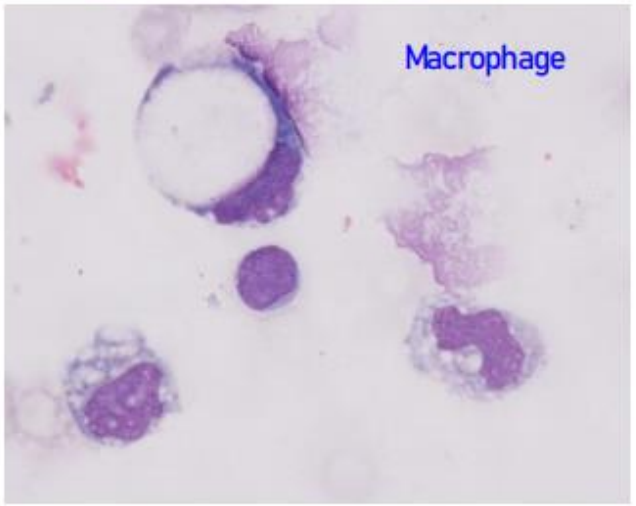






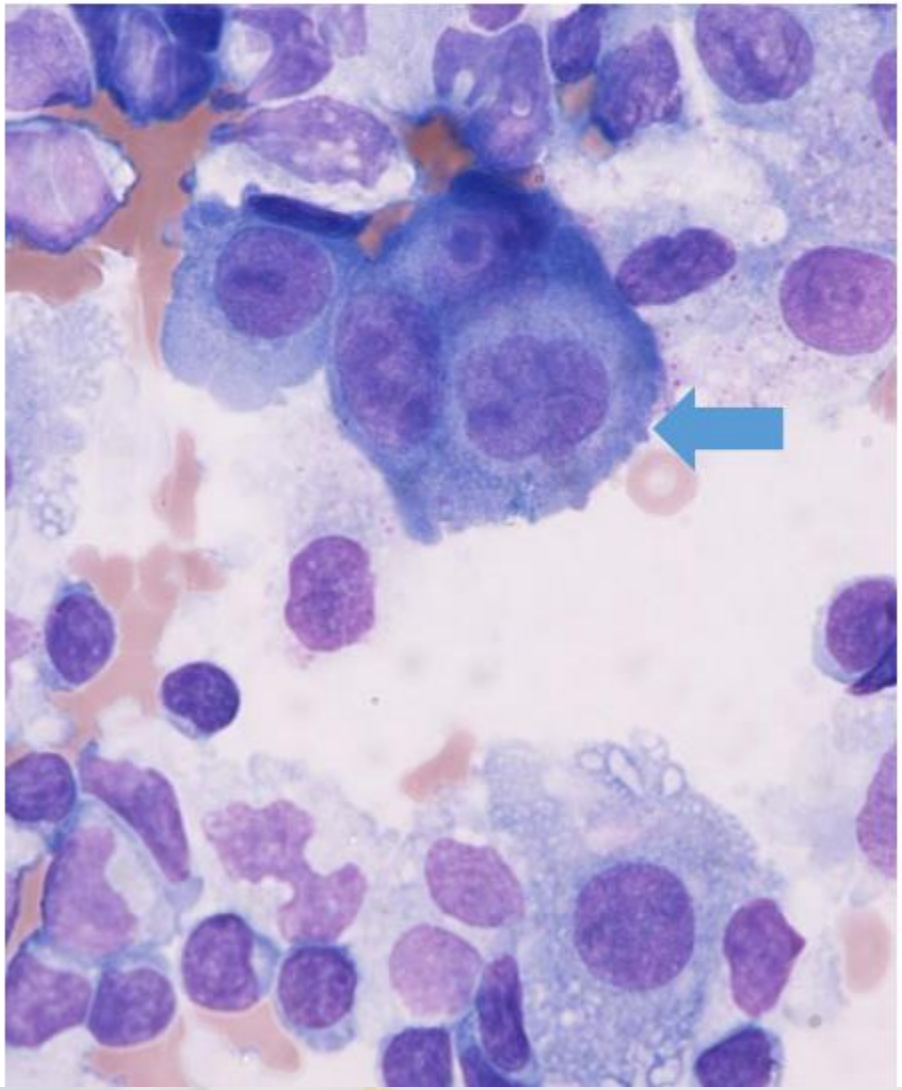


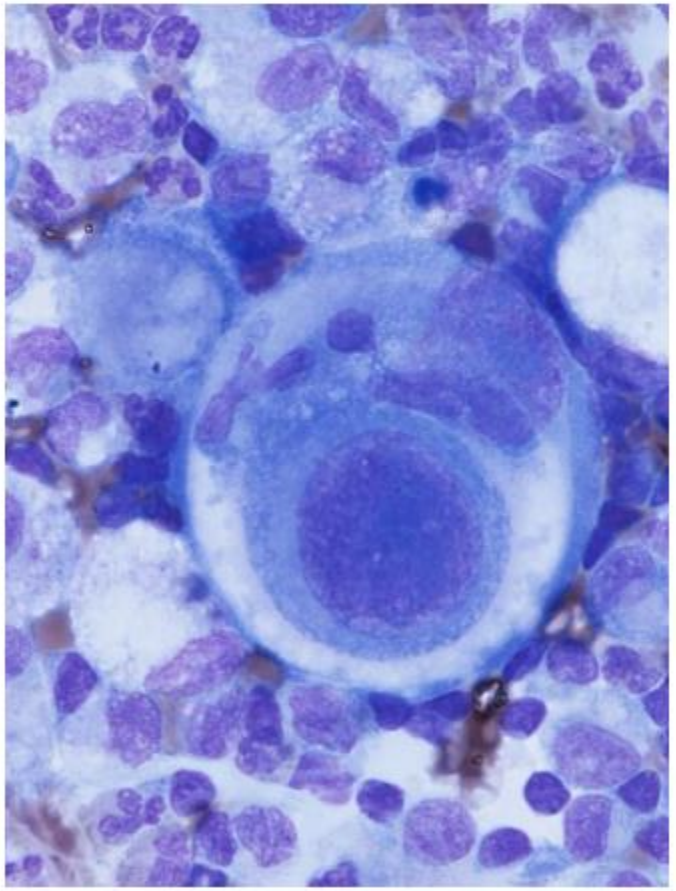


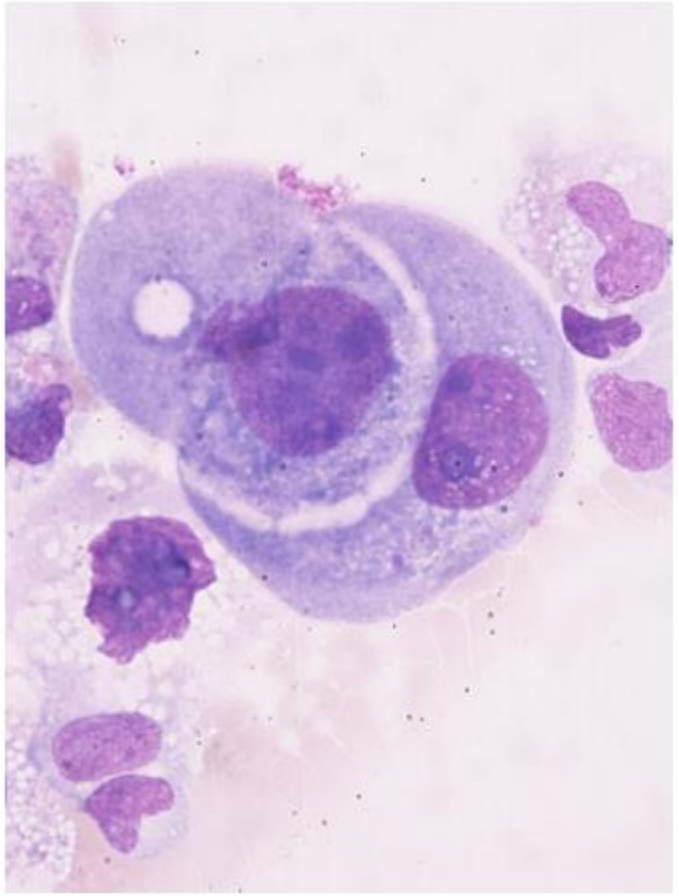


Cannibalism

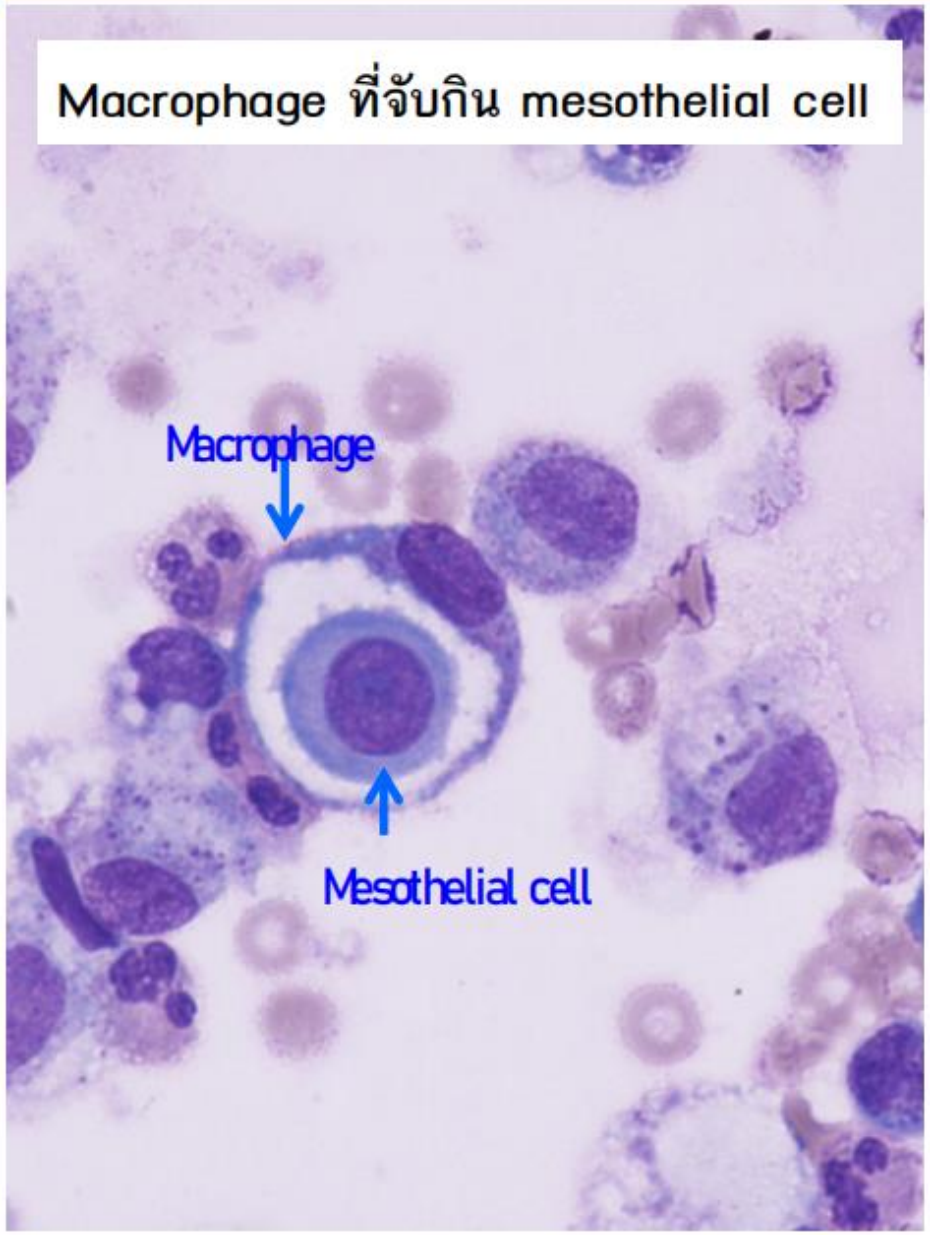
หมายถึง การพบลักษณะเซลล์มะเร็งจับกินเซลล์เซลล์มะเร็งเซลล์อื่นที่มีขนาดเล็กกว่า

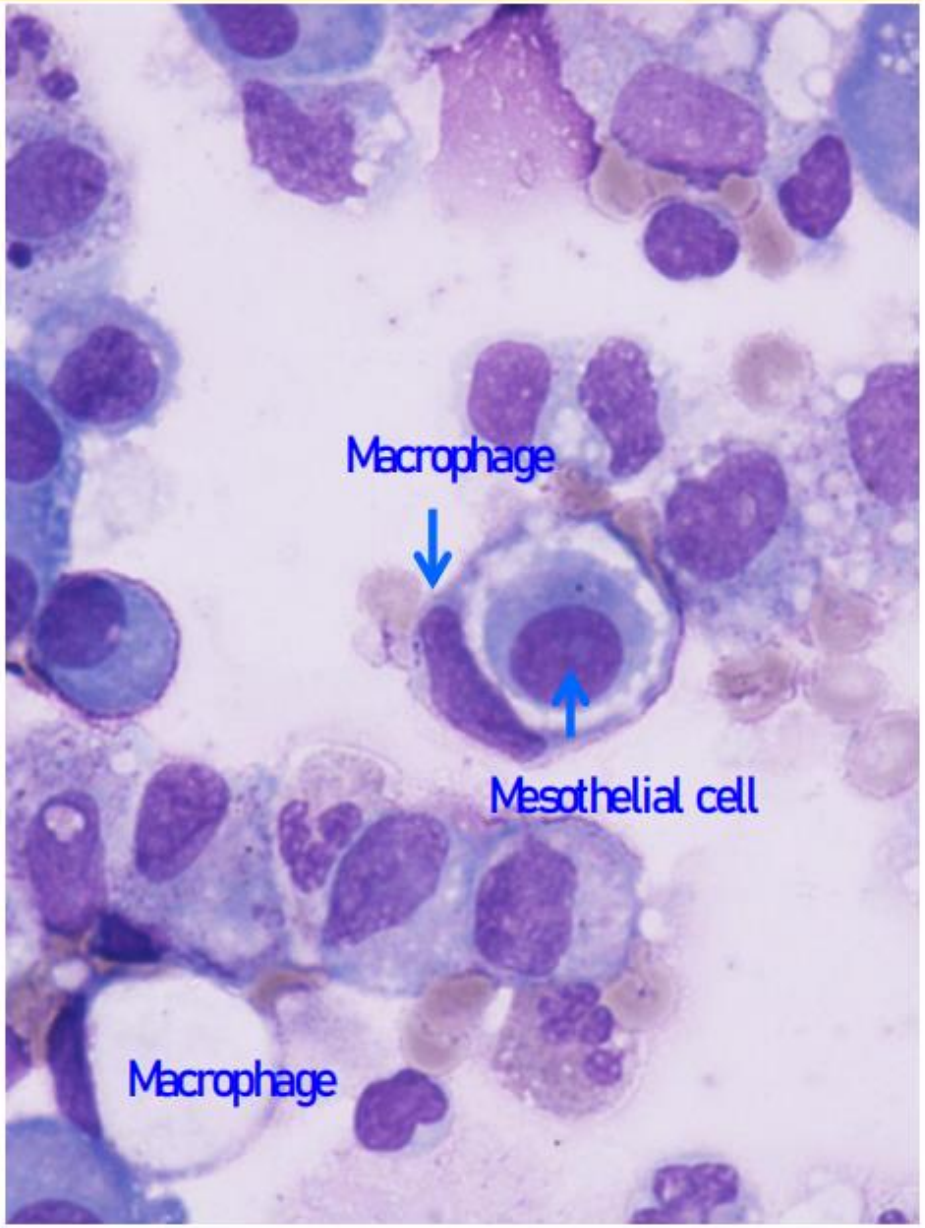






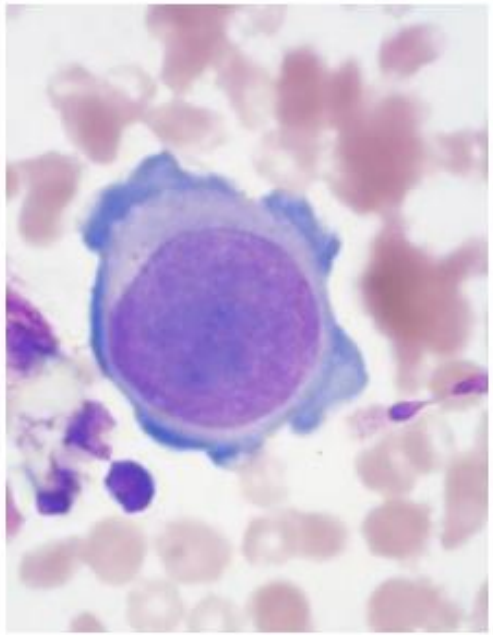
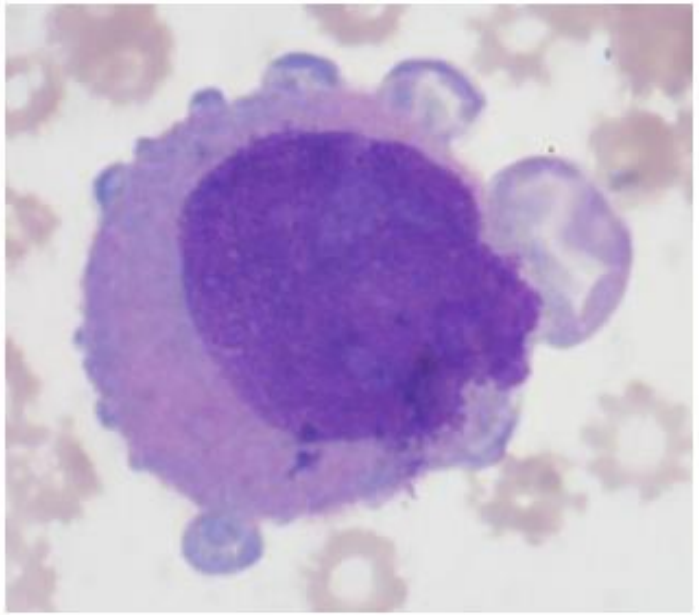
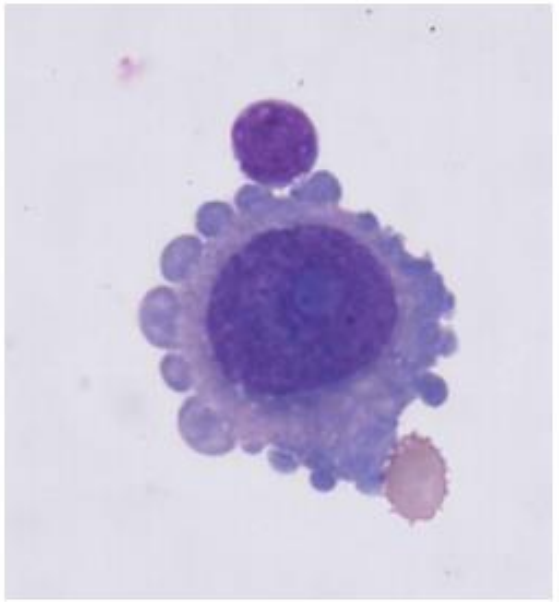
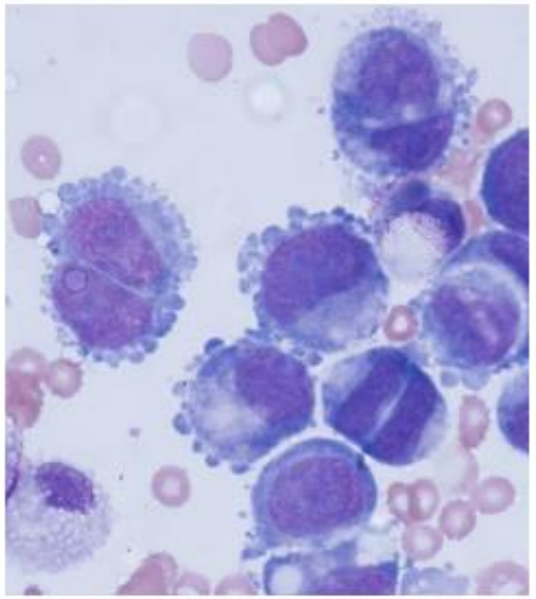
ความยากและควรระวังคือ?





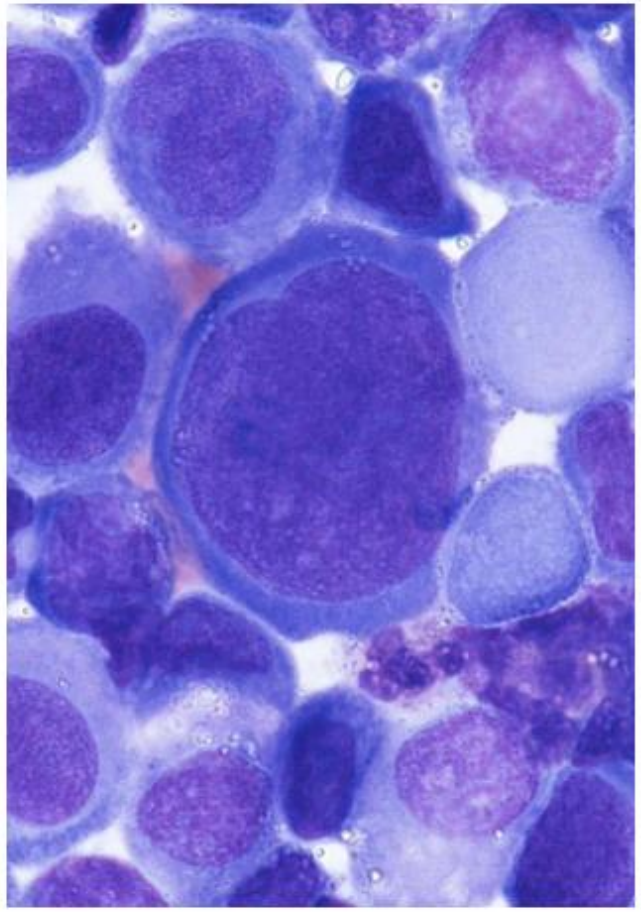
Abnormal large cell with irregular defined cytoplasmic membrane

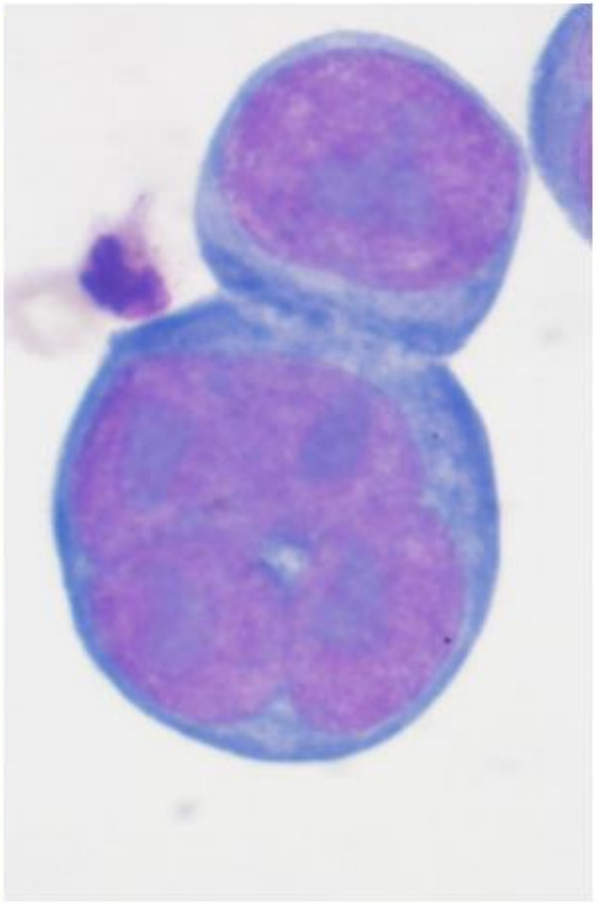
หมายถึง เซลล์มีขนาดใหญ่ผิดปกติและมีไซโทพลาซึมเป็นติ่งหรือปุ่มยื่นออกไป รูปร่างไม่แน่นอน

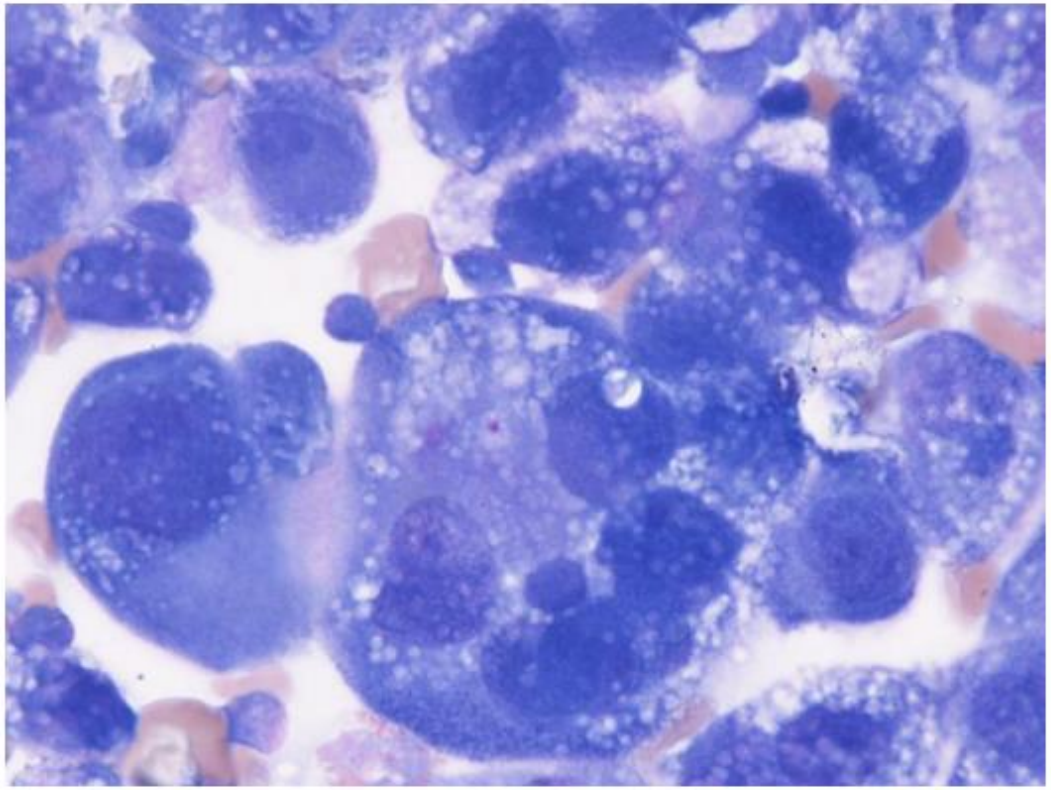





Abnormal large cell with high N/C ratio and deep blue cytoplasm

หมายถึงเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ สัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมสูง ไซโพพลาซึมที่มีสีน้ำเงินเข้ม เป็นลักษณะหนึ่งที่พบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่มักมีนิวเคลียสที่ใหญ่ขึ้น โดยอาจมี N/C ratio ประมาณ 1 ต่อ 1 หรือ 2 ต่อ 1 เป็นต้น

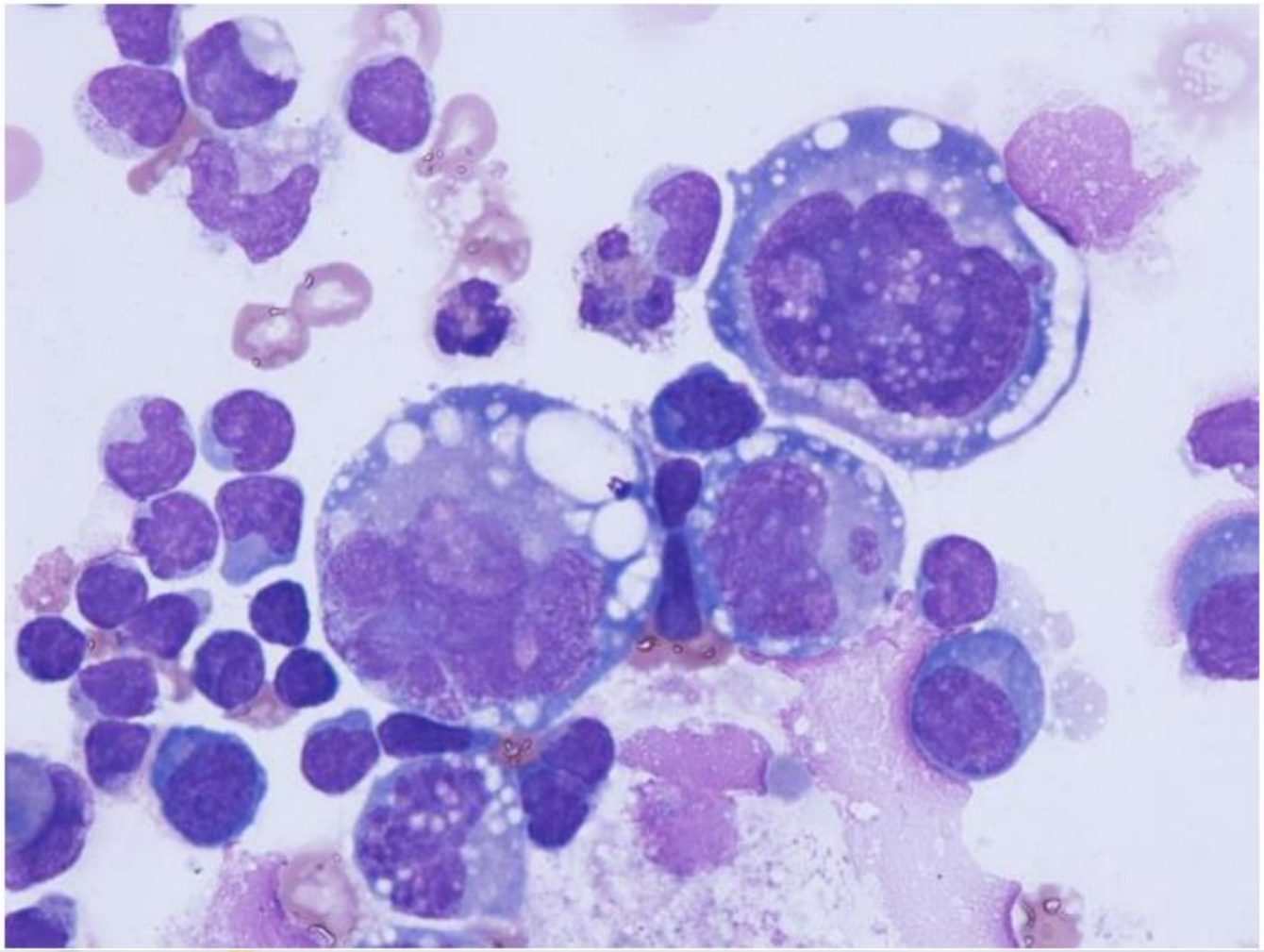






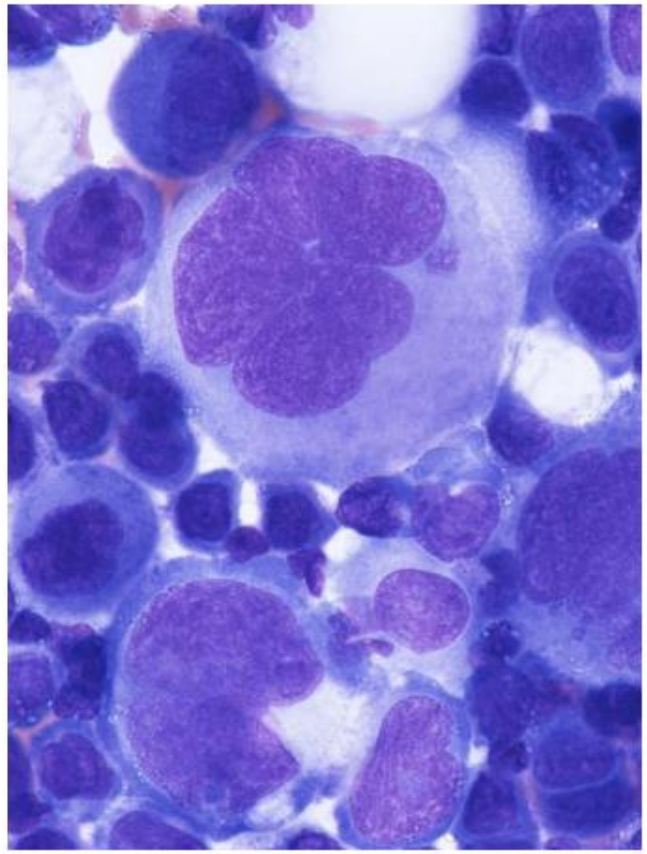
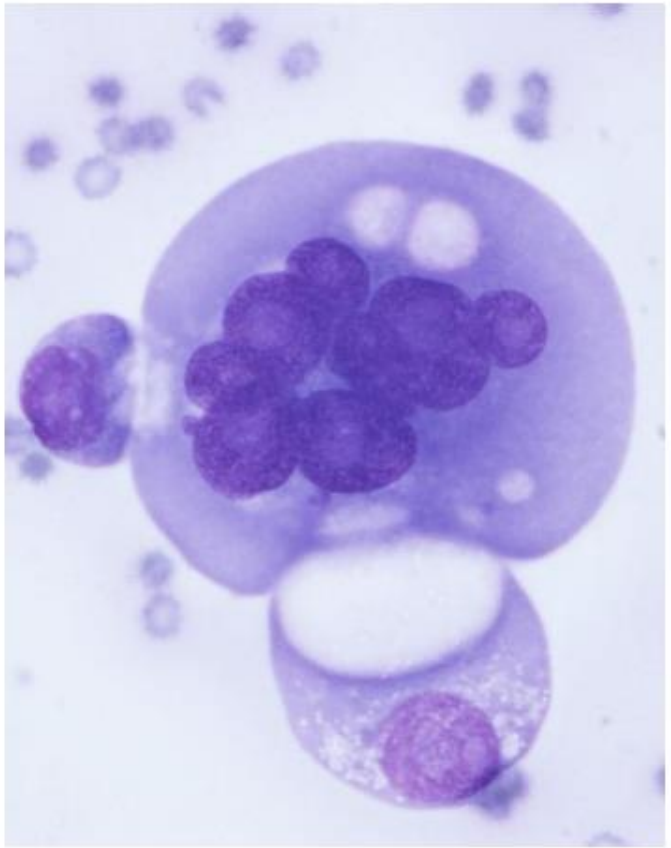
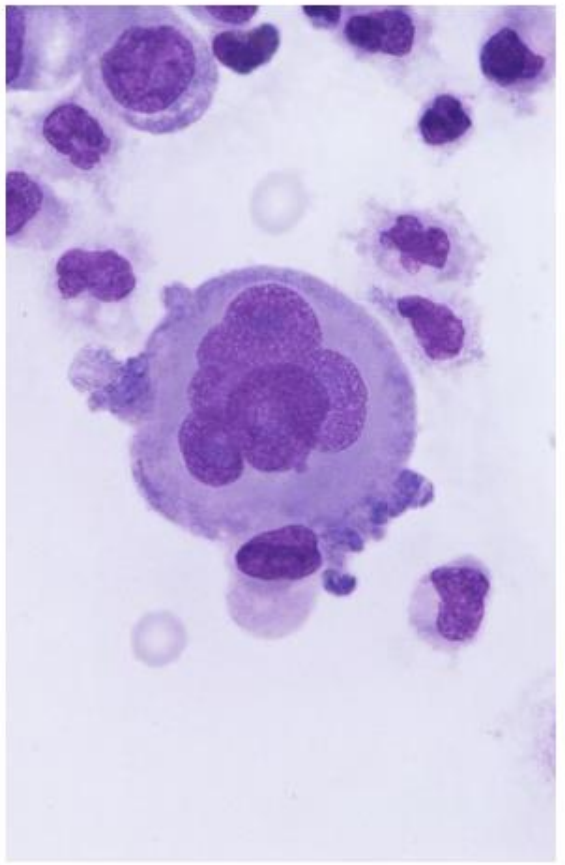
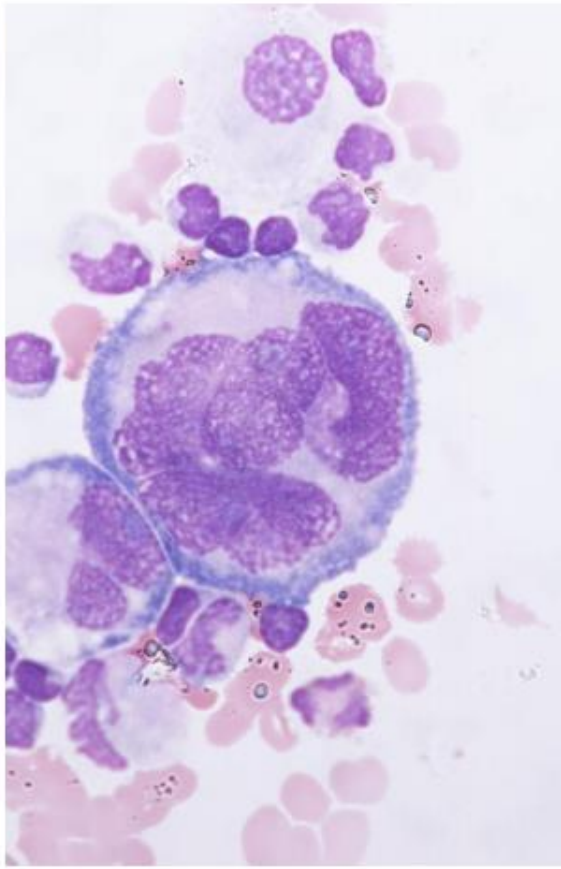
Abnormal large cell with irregular nucleus

หมายถึงเซลล์ขนาดใหญ่ผิดปกติและมีรูปร่างลักษณะนิวเคลียสที่ผิดปกติได้แก่ มีรูปร่างประหลาด (bizarre) แบ่งเป็นพู (lobulated) จับกันเป็นก้อนเนียน (pyknotic) เป็นมุมยื่นออกมา (angular projection) เป็นปุ่ม (notched) ม้วนตัวเข้ามา (folding) หรือเว้าเข้ามาเป็นร่อง (clefts) เป็นต้น



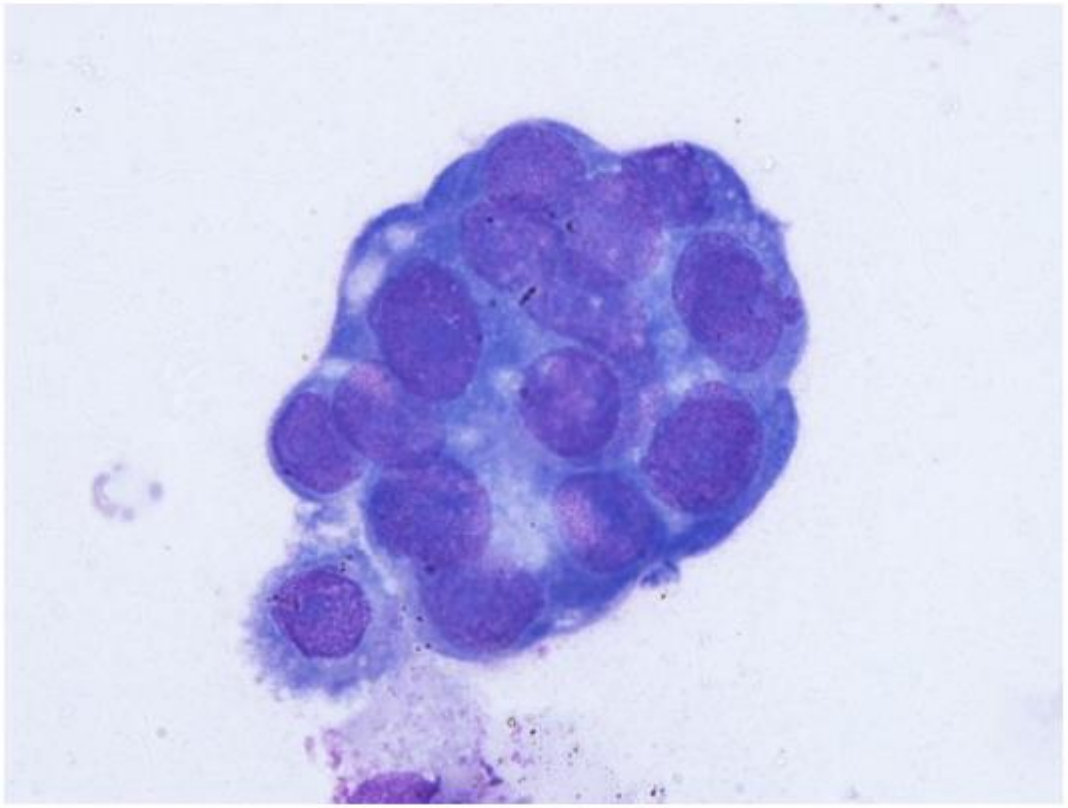
Multinucleated giant cell

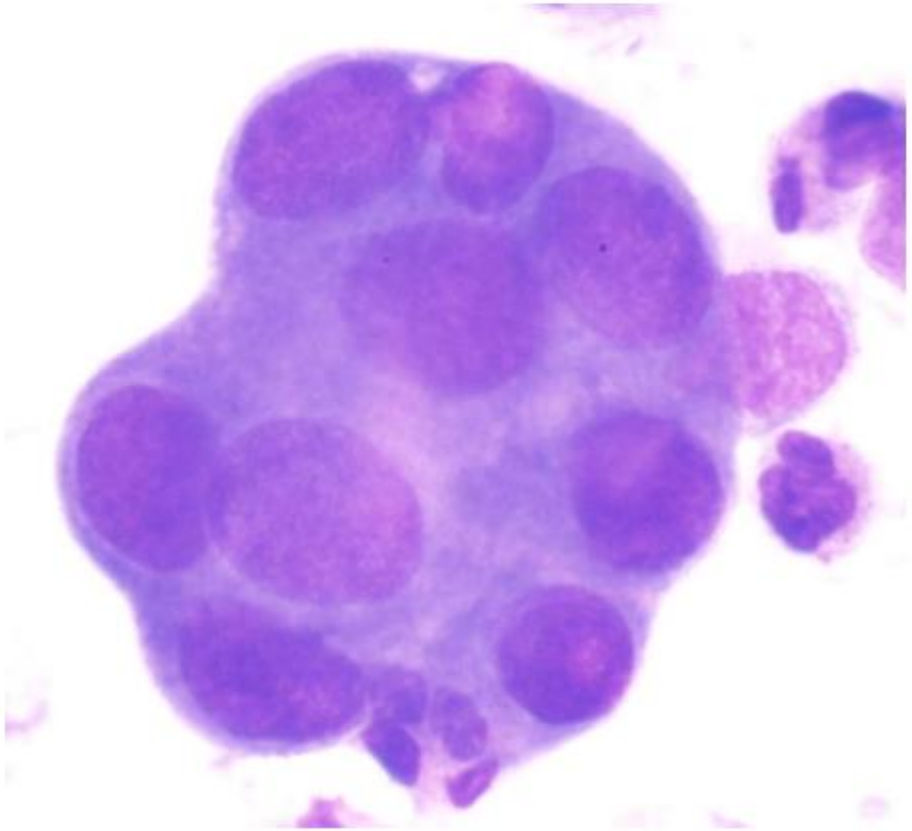
เป็นลักษณะหนึ่งเซลล์มะเร็งที่มีขนาดใหญ่ โดยอาจมีขนาดใหญ่ถึง 60-65 ไมครอน และพบว่ามีนิวเคลียสจำนวนมาก

Syncytial arrangement

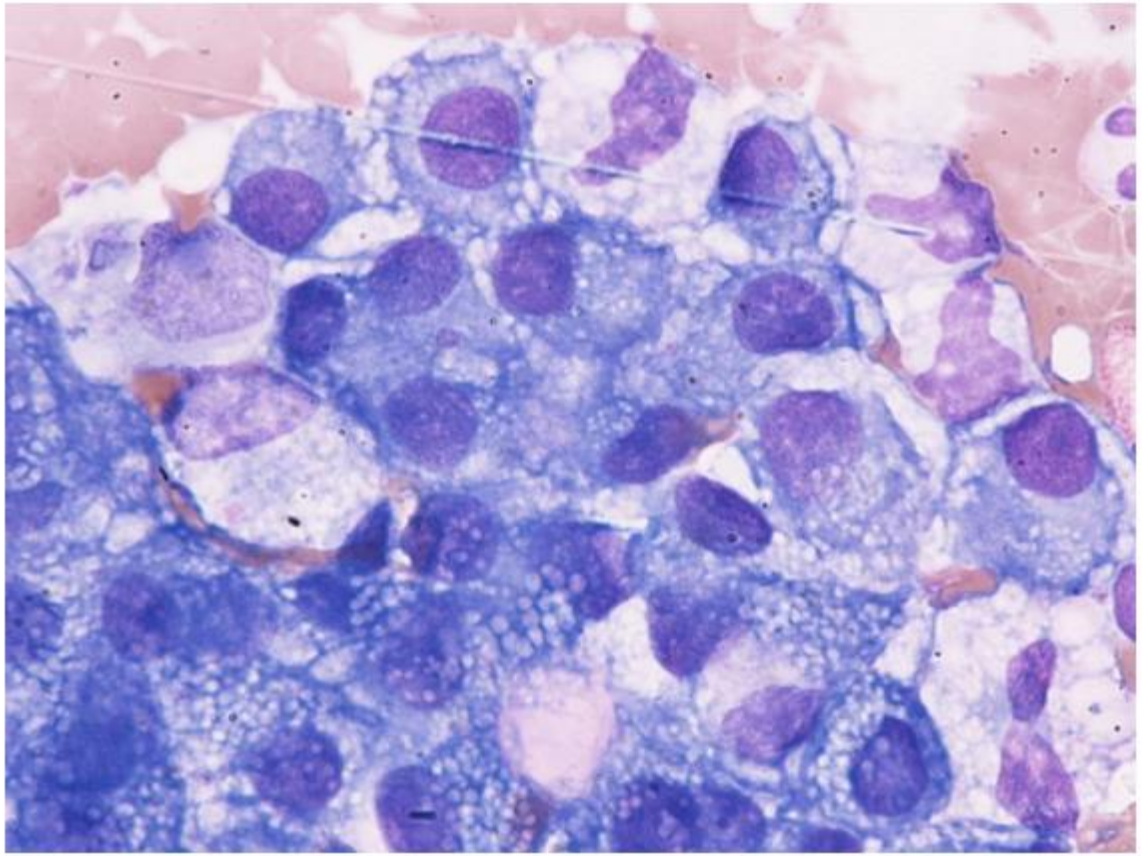
หมายถึง ลักษณะการเรียงตัวต่อกันของเซลล์แบบไม่แน่นอน ขอบเขตแต่ละเซลล์เห็นไม่ชัดเจน ดูคล้ายเชื่อมต่อกัน นิวเคลียสอาจไม่ได้วางตัวอยู่กลางเซลล์เช่นที่พบในเซลล์ปกติ

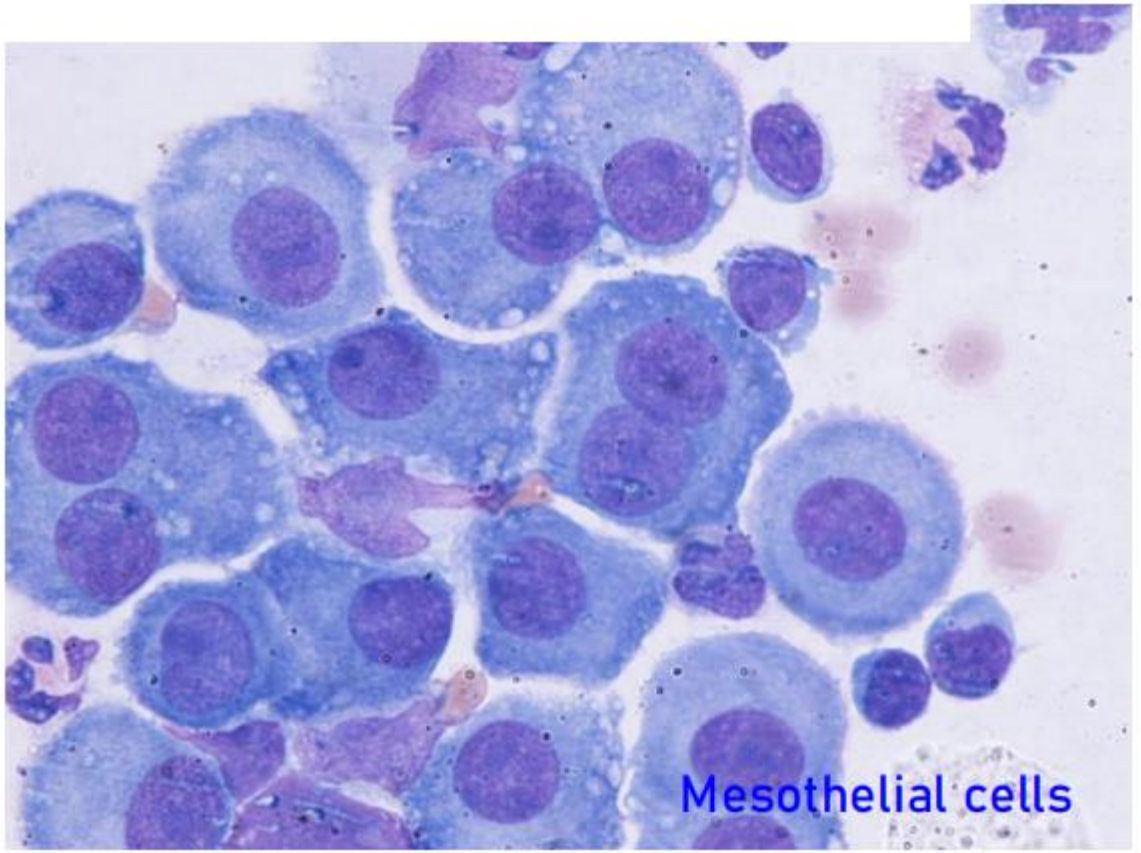




Sheetlike arrangement

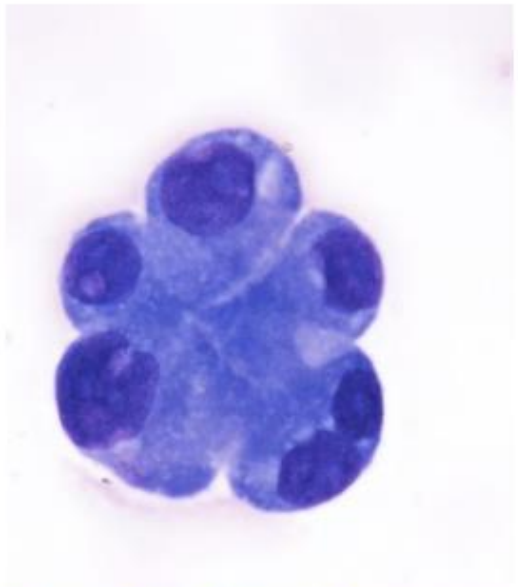
หมายถึง ลักษณะการเรียงตัวต่อกันของเซลล์แบบที่เห็นขอบเขตแต่ละเซลล์เห็นชัดเจน ดูลักษณะเป็นแผ่น mesothelial cells มีการเรียงตัวเป็นลักษณะนี้ได้ จึงควรพิจารณาให้ดี

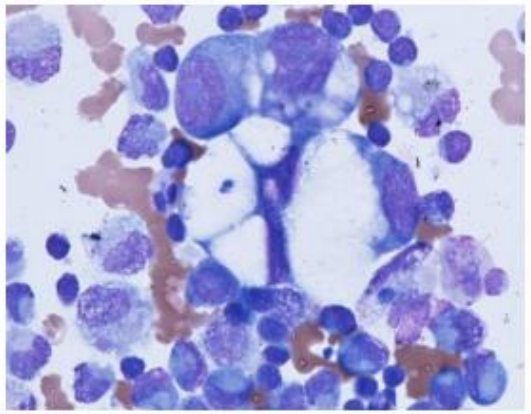


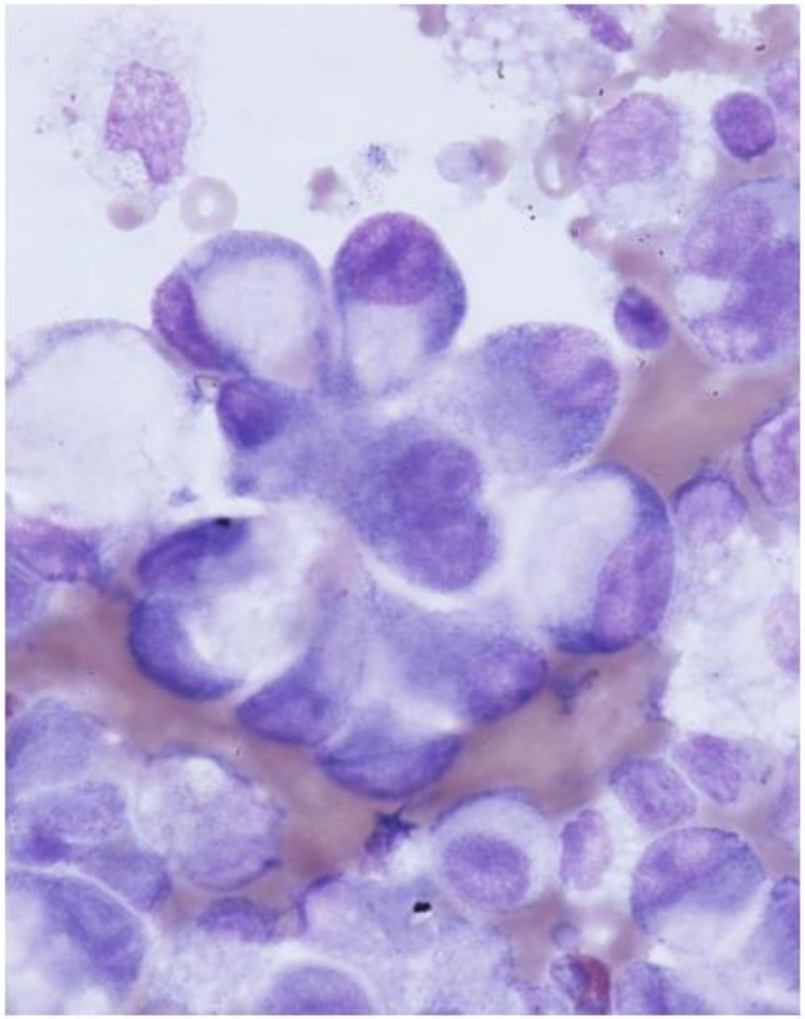


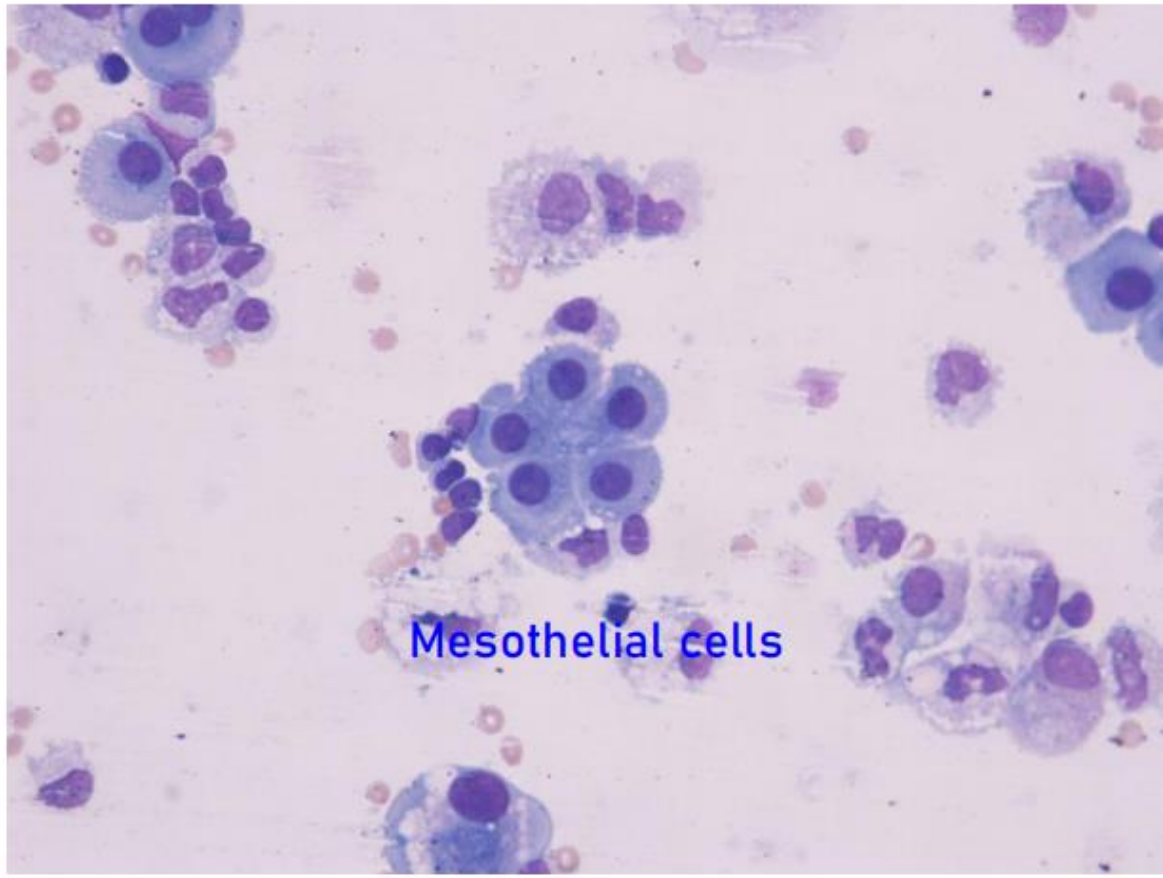
Rosette or glandular formation

หมายถึงลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ที่เอาด้านหนึ่งของเซลล์มาชนกันหรือล้อมรอบกัน มองดูคล้ายดอกกุหลาบ (rosette) อาจพบเซลล์รวมตัวกันคล้ายต่อม (glandular formation)



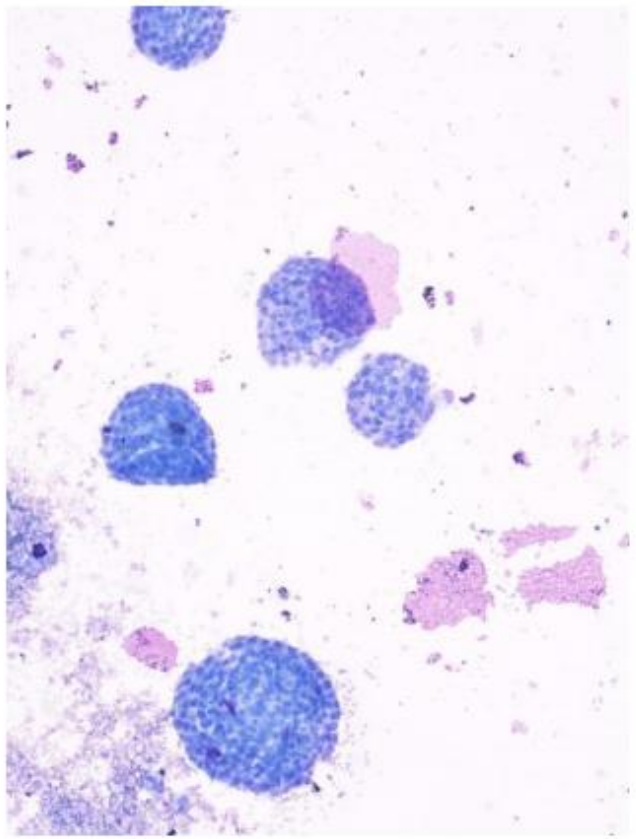
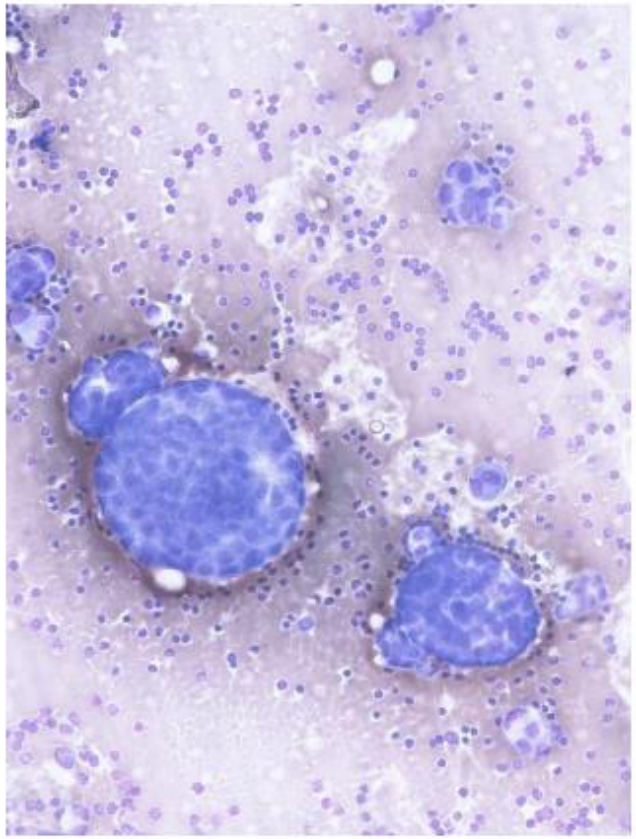
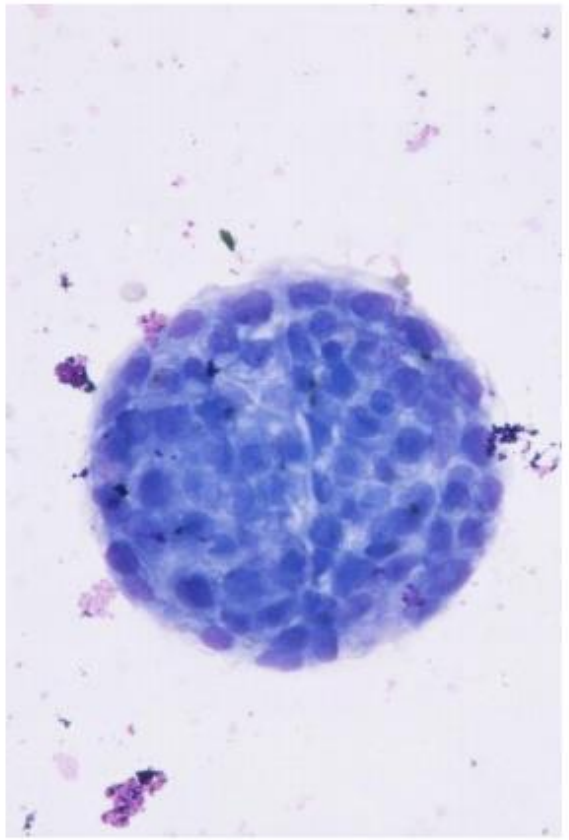
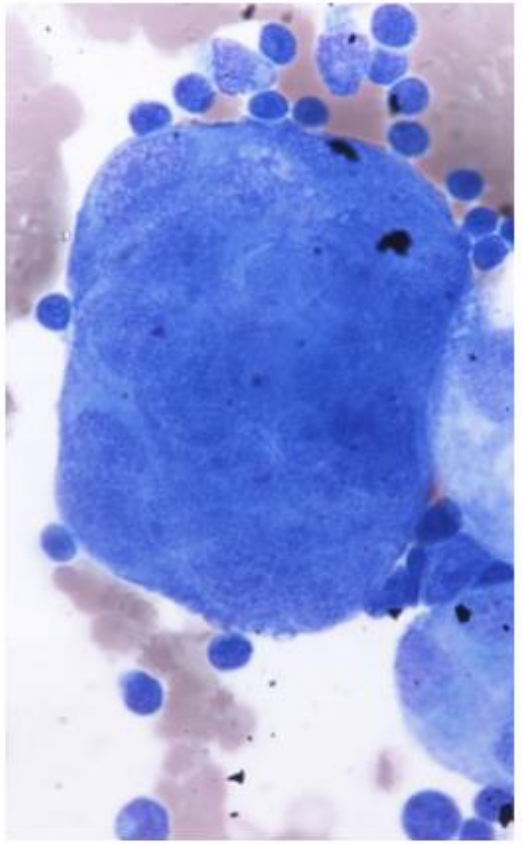






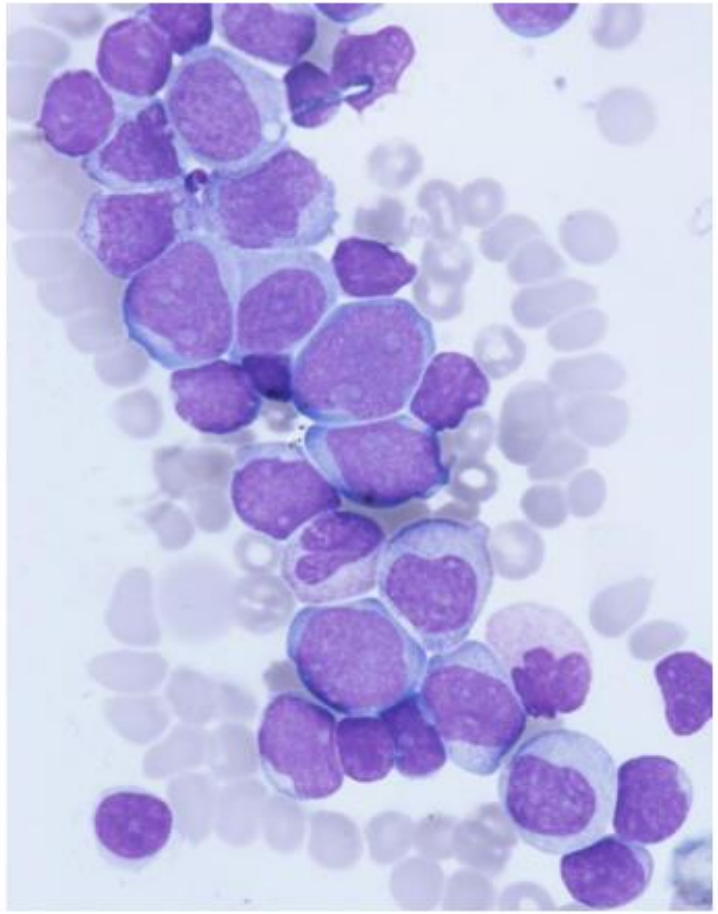
Cell ball (Morulae)

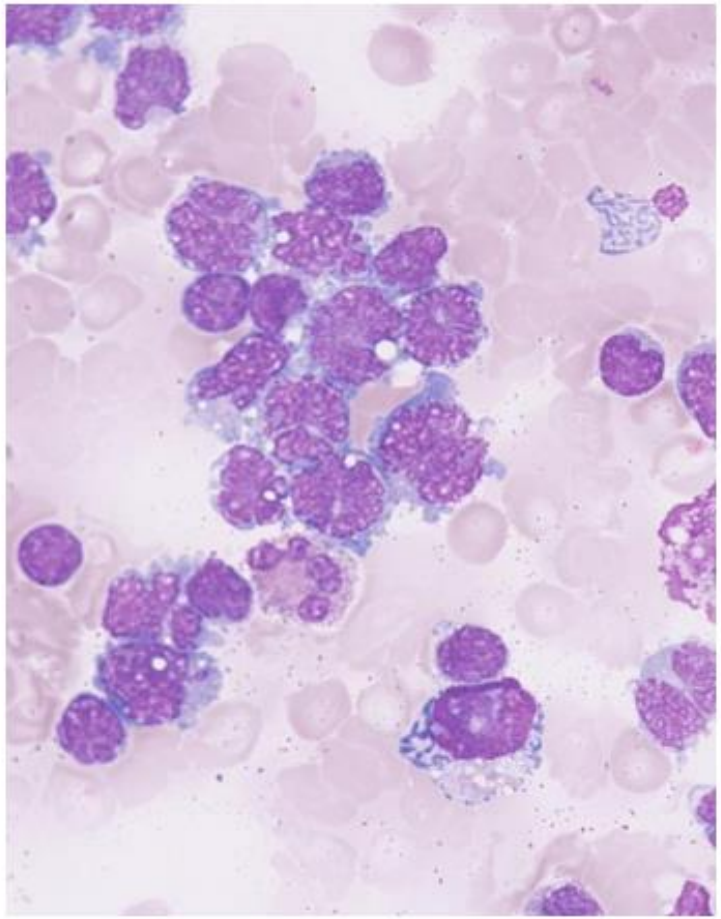
หมายถึง ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ที่เป็นทรงกลม มองดูเป็นลักษณะ 3 มิติ คล้ายลูกบอล เป็นการเรียงตัวลักษณะหนึ่งของเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามอาจพบว่า mesothelial cells มีการเรียงตัวเป็นลักษณะนี้ได้ จึงควรพิจารณาให้ดี

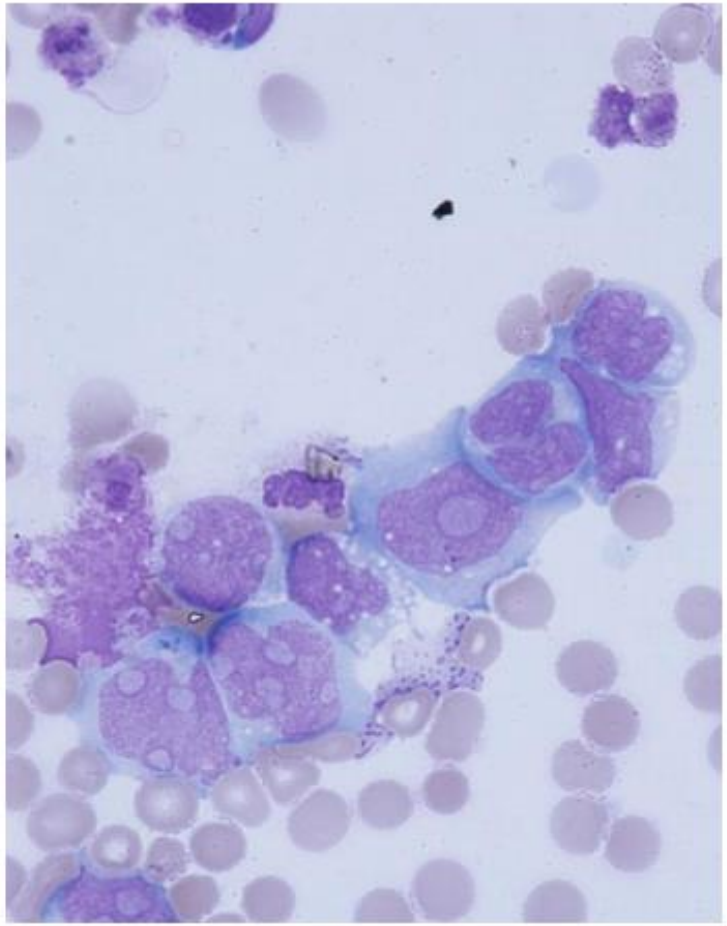





Leukemic cell or blast cell

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดที่พบใน serous effusion อาจเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) เซลล์ที่พบอาจเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่เล็กแตกต่างกันตั้งแต่ประมาณ 10-15 ไมครอน (เปรียบเทียบดูกับเม็ดเลือดแดง) มี N/C Ratio สูง นิวเคลียสมีทั้งที่กลมและคอดเว้า แต่ที่เด่นชัดคือไซโทพลาซึมสีน้ำเงินเข้มและมีแวคคิวโอลจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะมะเร็งเม็ดเลือดขาวขนิด ALL-L3 หรือ lymphoma ชนิด Burkitt lymphoma

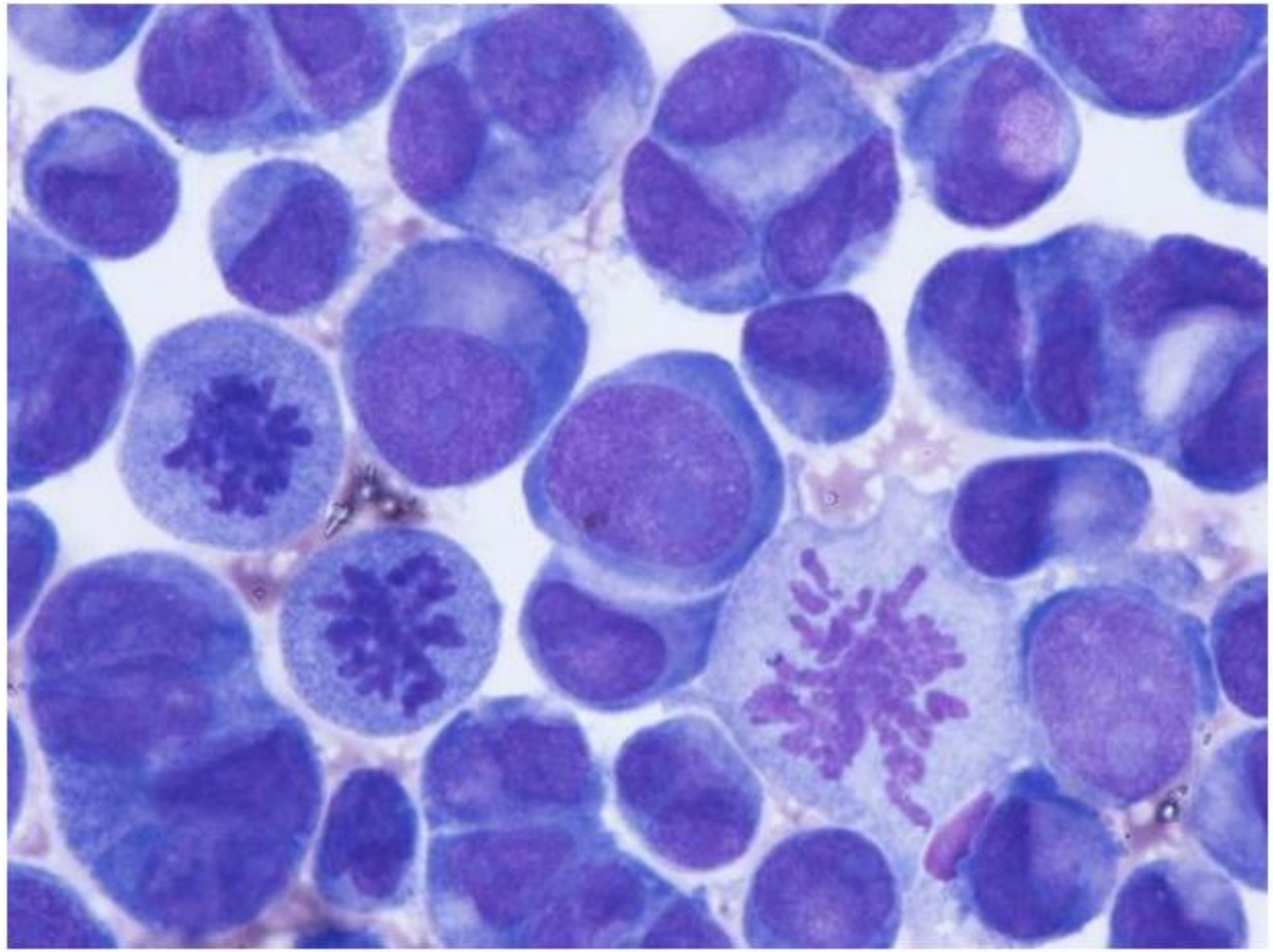




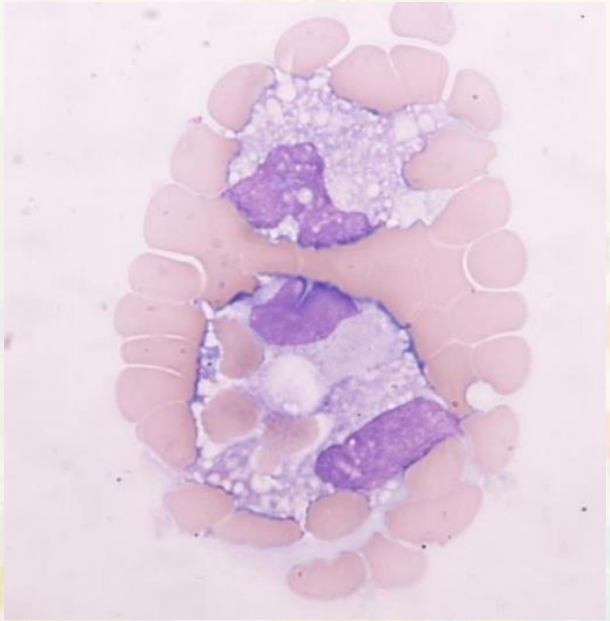


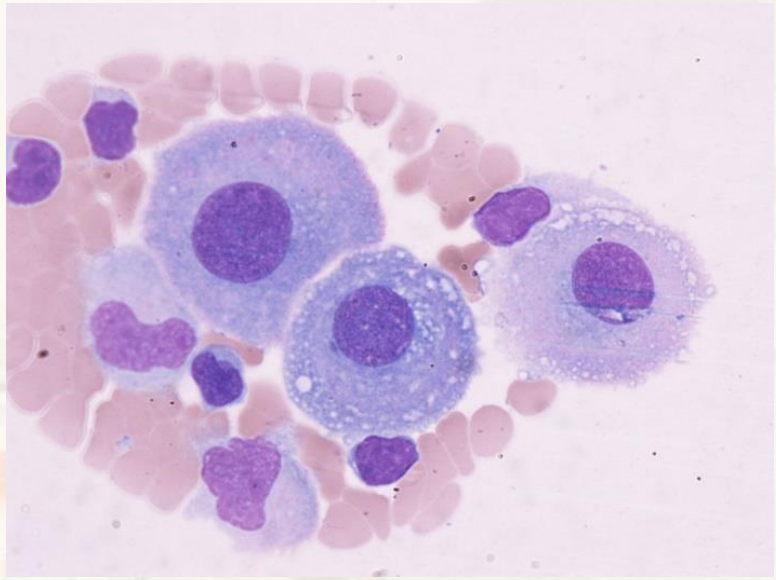
Mitotic figures

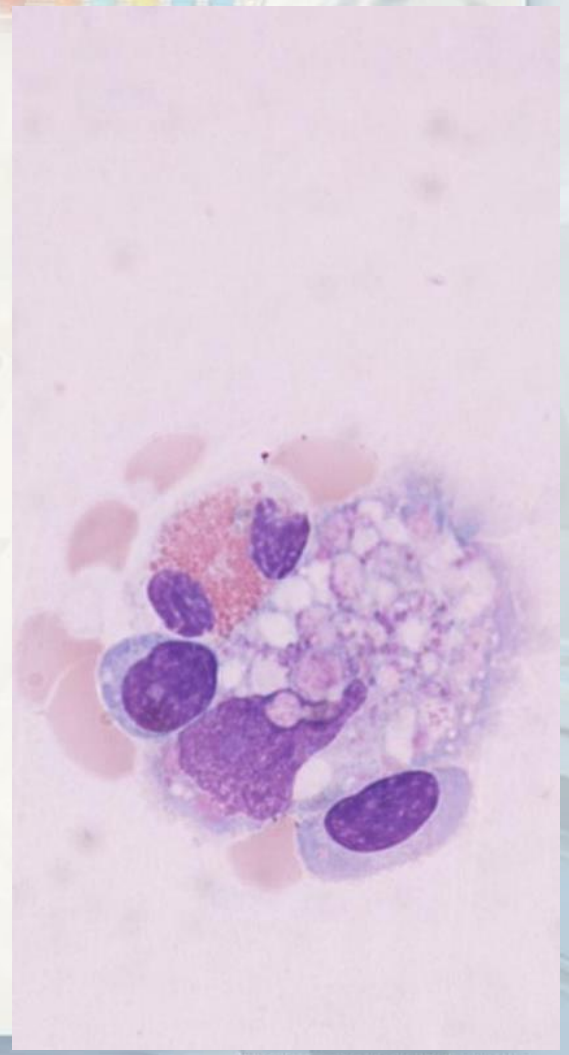
หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ พบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ดี การพบลักษณะดังกล่าวนี้ไม่ได้หมายความว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์มะเร็งเสมอไป



Nonmalignant cells in body fluids







Cell / other found in body fluids

ความต่าง

Peripheral Blood

Blood cells
- Mature cells
- Immature/blast cells

PMN
lymphocytes, monocytes (mononuclear cells),
Eosinophils, basophils

Non-blood cells
- Malignant cell ที่แพร่กระจายมา

Others
- Infectious agents (bacteria, fungus ,virus ,parasite)
- Crystals

Body Fluids

Blood cells
- Mature cells
- Immature/blast cells

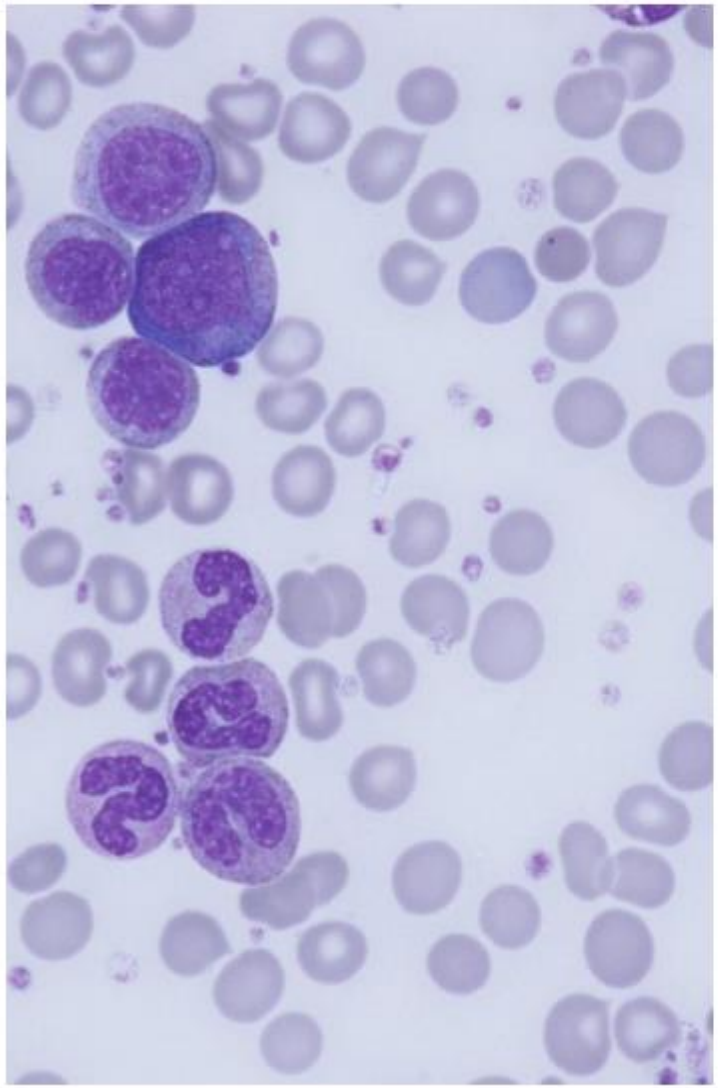
PMN
lymphocytes, monocytes/macrophages (mononuclear cells),
Eosinophils, basophils

Non-blood cells
- Mesothelial cells
- Malignant cell ที่แพร่กระจายมา

Others
- Infectious agents (bacteria, fungus ,virus ,parasite)
- Crystals

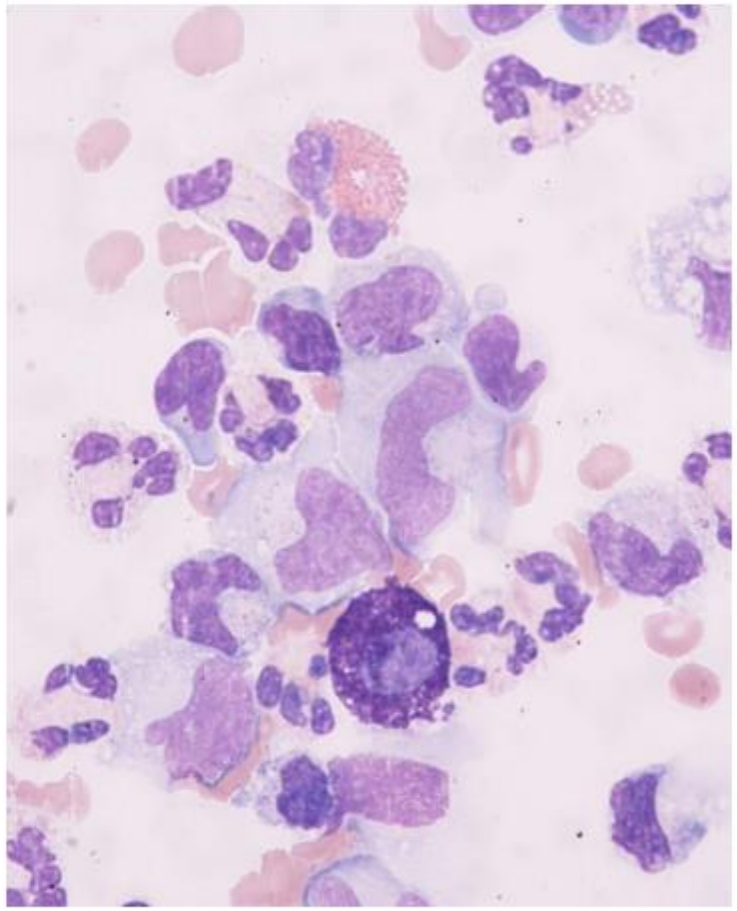
Peripheral Blood

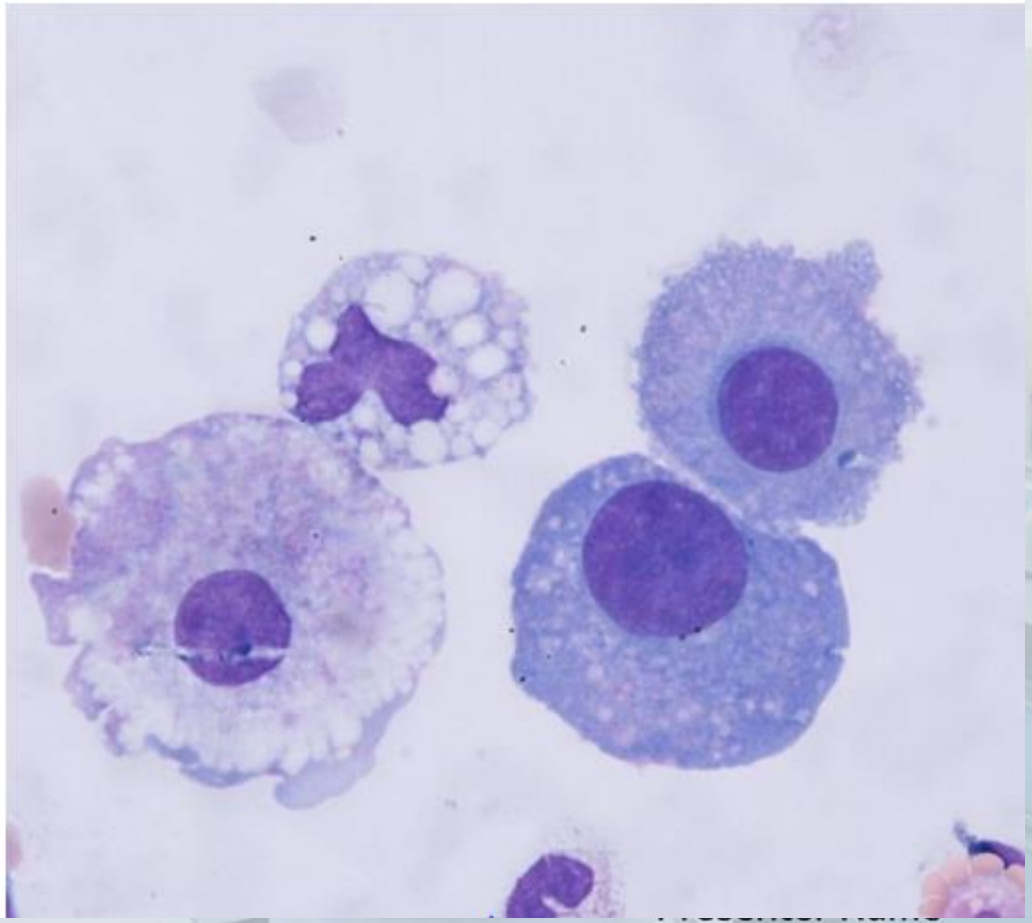
Blood cells



Body Fluids

. Blood cells; *mature or immature*
. Macrophages, Mesothelial cells
. Non hematological neoplastic cells
. Synoviocytes (กรณี synovial fluid)





Cell / other found in body fluids

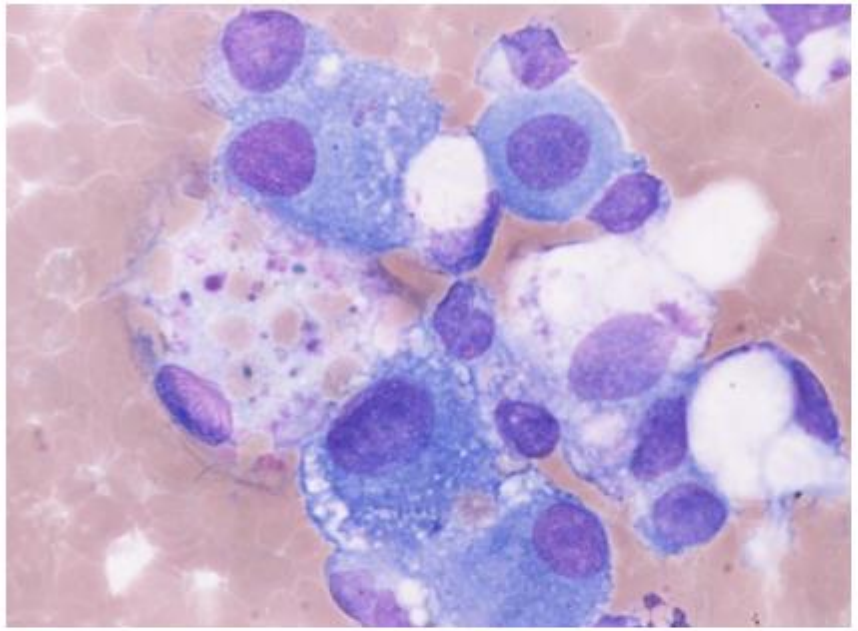
การจำแนกความผิดปกติที่พบใน body fluids

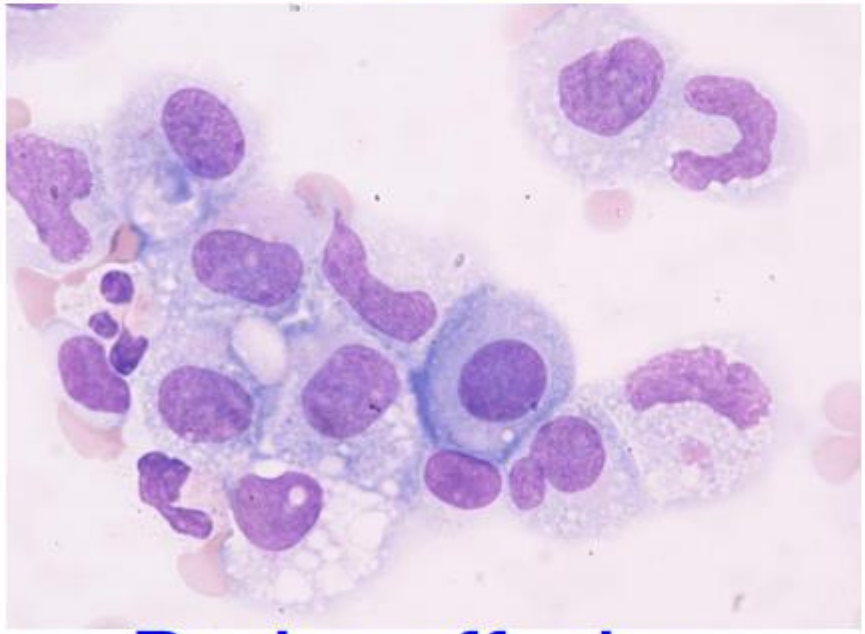
PMN
Lymphocytes, monocyte/macrophage
(mononuclear cells)
Eosinophils, basophils, mast cells,
Pyknotic cells
Mesothelial cells
Erythrophages, hemosiderin,
Infectious agents (bacteria, yeast, fungus)
Crystals

Benign

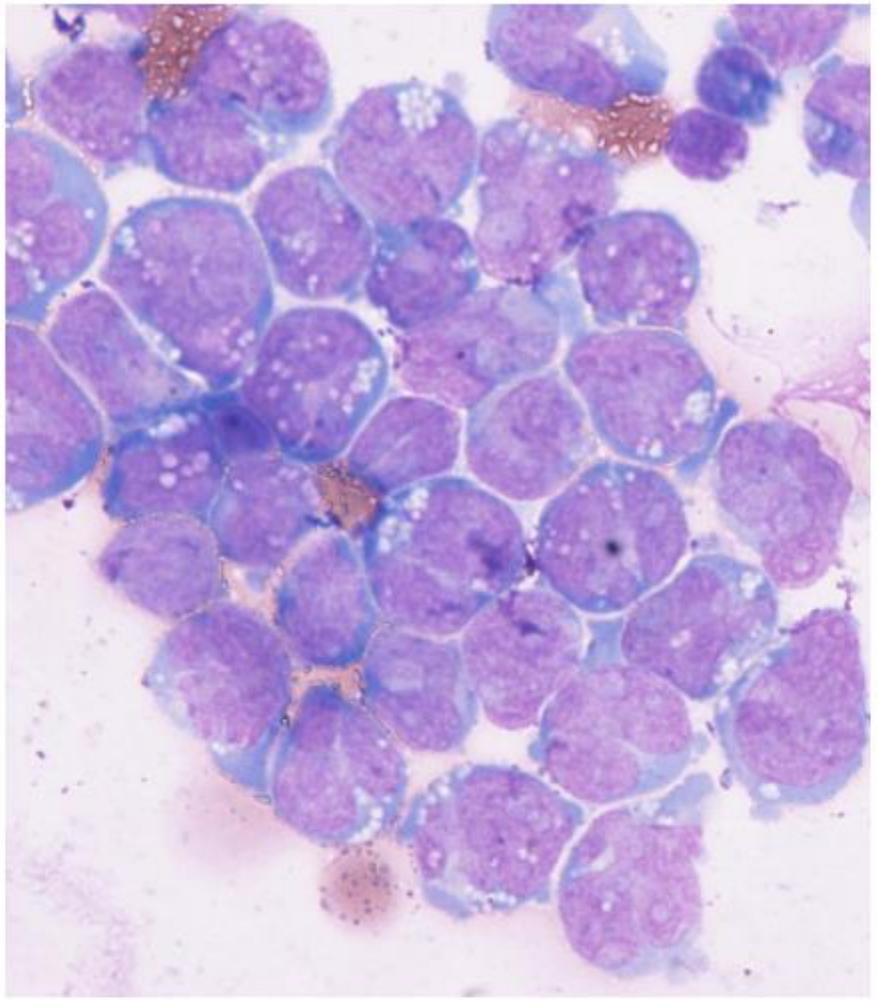
Blast cells, immature cell
Mature cell, lymphoma cells
Malignant cells

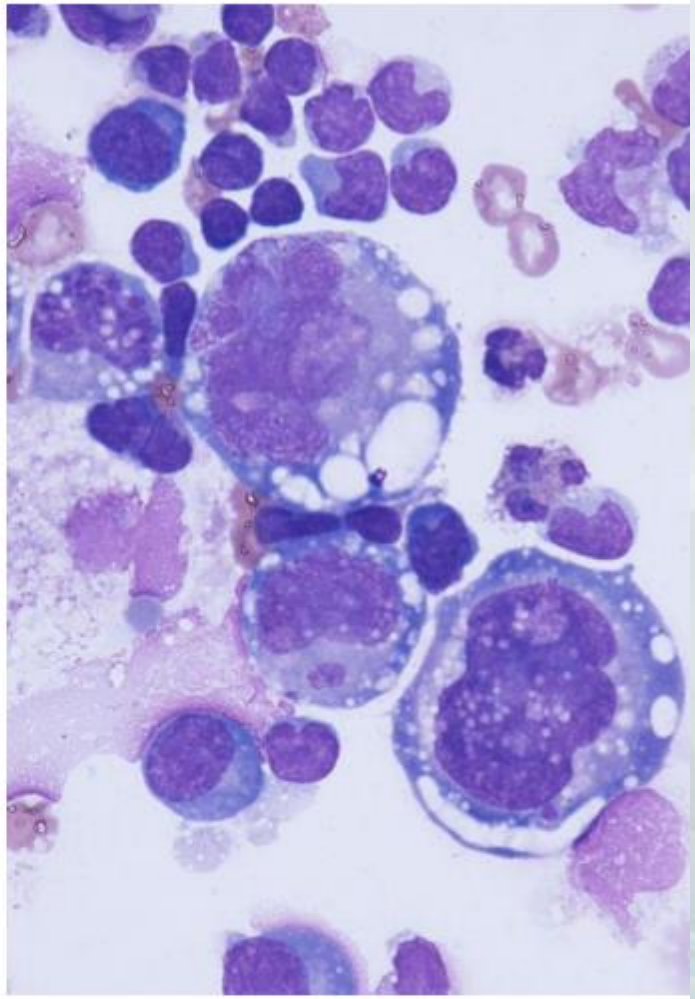
Malignant





Benign effusion





Hematologic malignancy

Non hematologic malignan

Malignant effusion

Cell / other found in serous fluids

Scanned on low power/high power

⬇

Look for

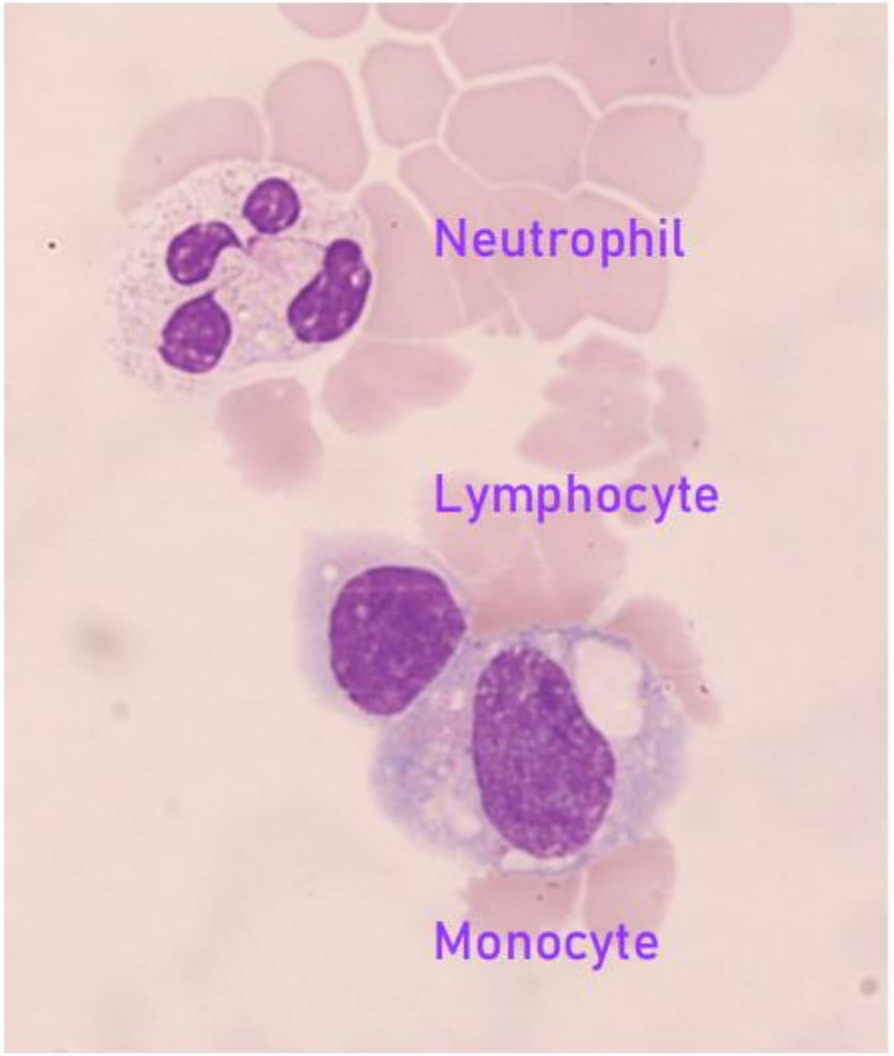
⬇

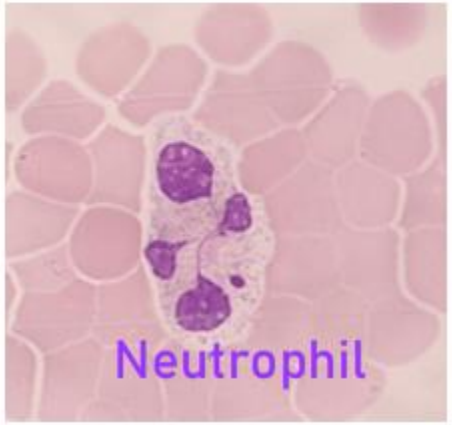
Differential WBC: 100x (oil)

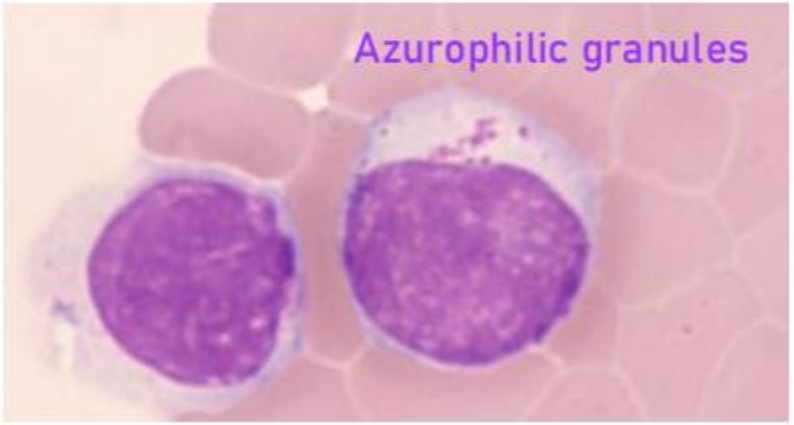
https://www.youtube.com/watch?v=7hk6nfj2pno

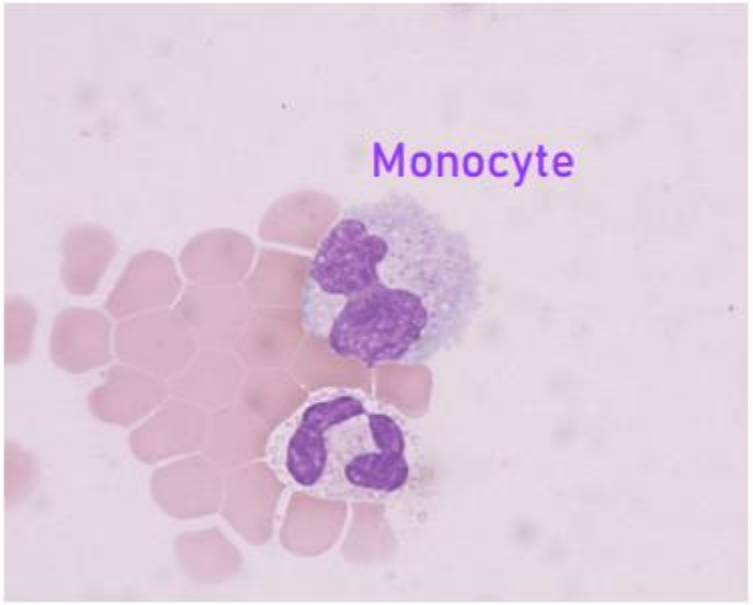
ทำความรู้จักกับเซลล์และความผิดปกติต่างๆ

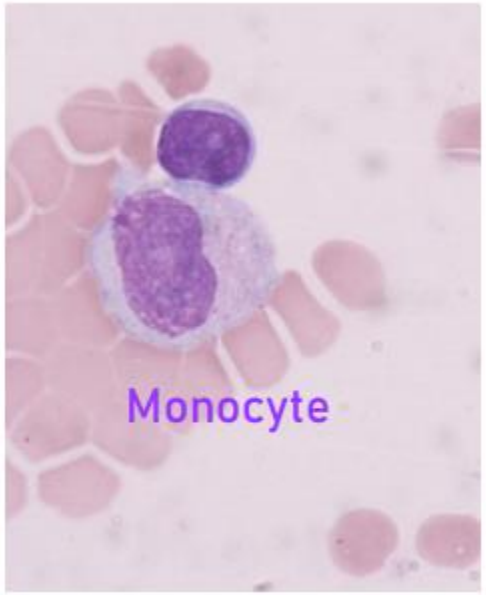
Cell / other found in body fluids



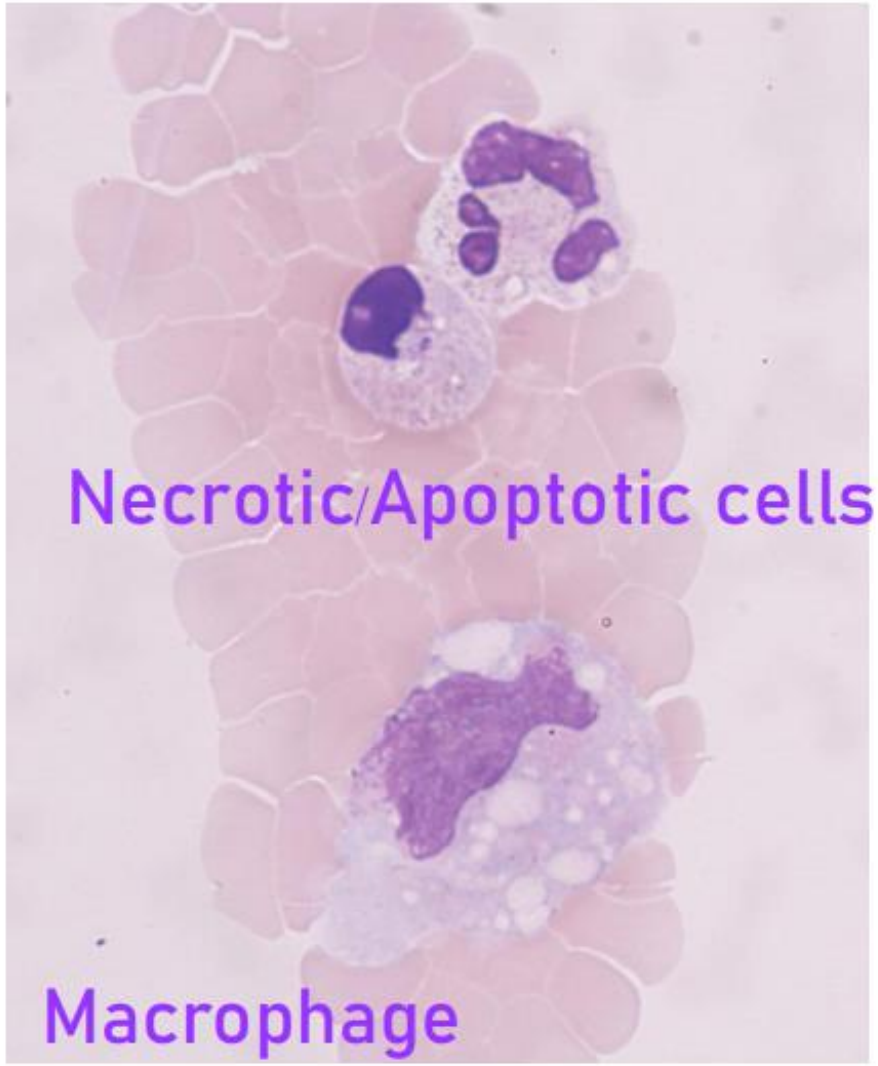


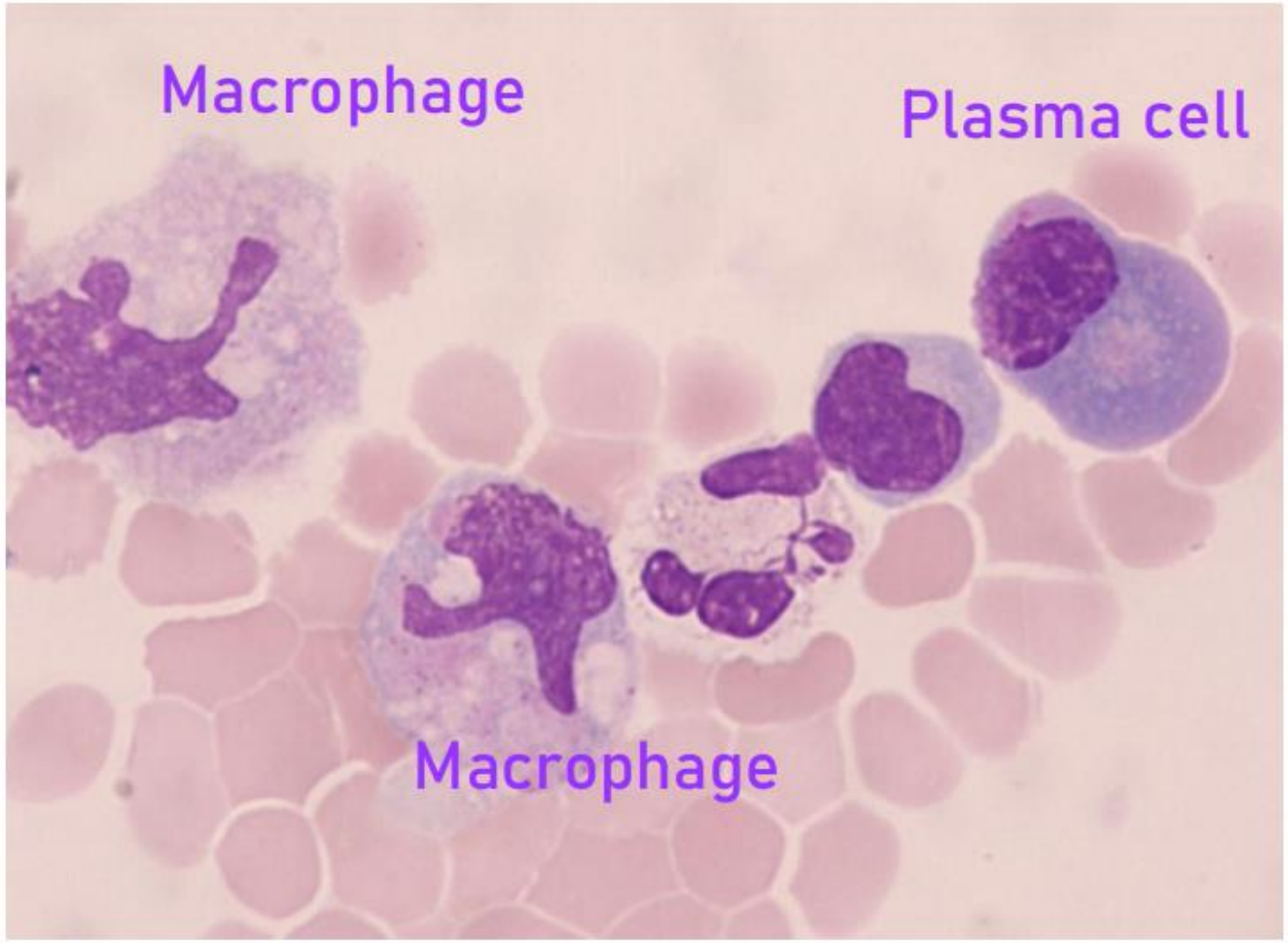




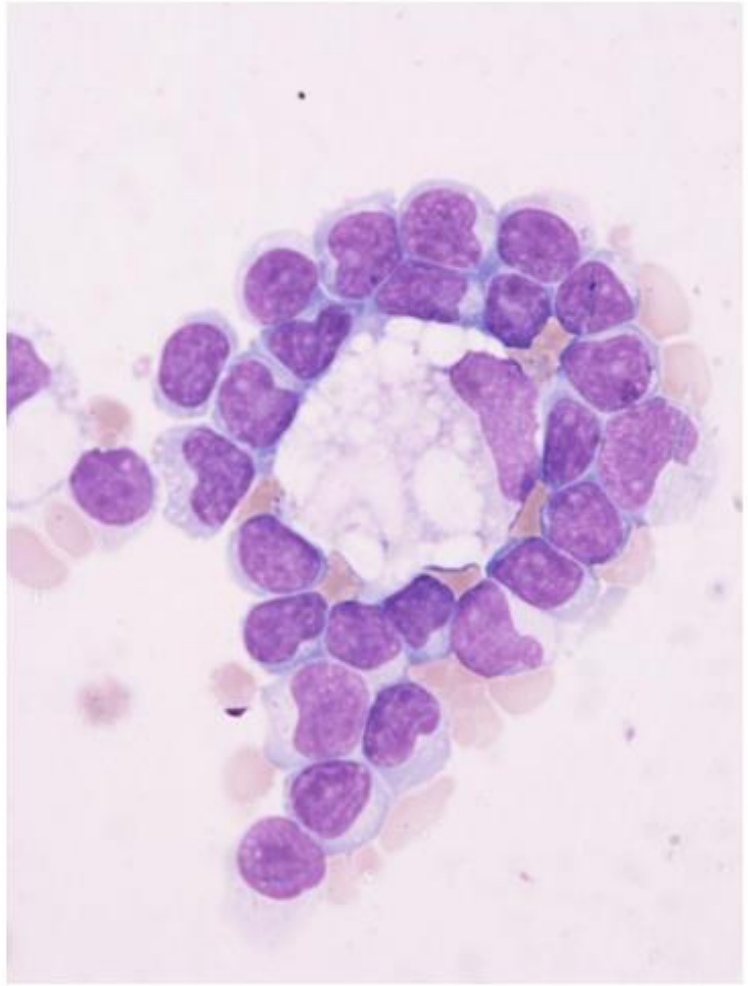


Cell / other found in body fluids





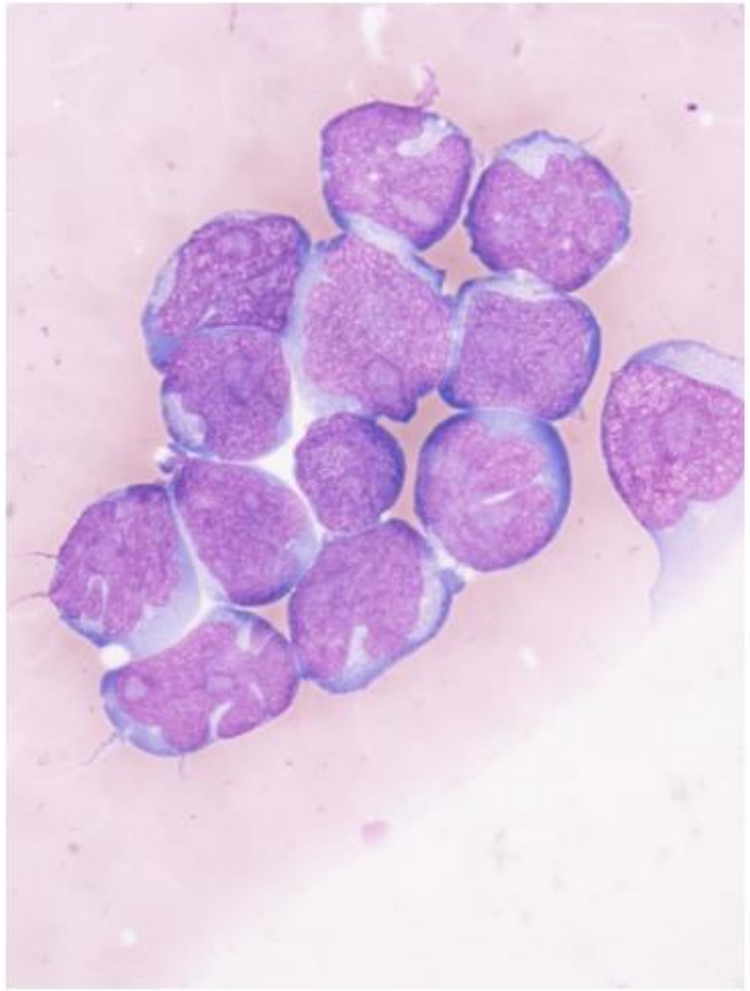
Cell / other found in body fluids



Homogeneity

(Monomorphic)

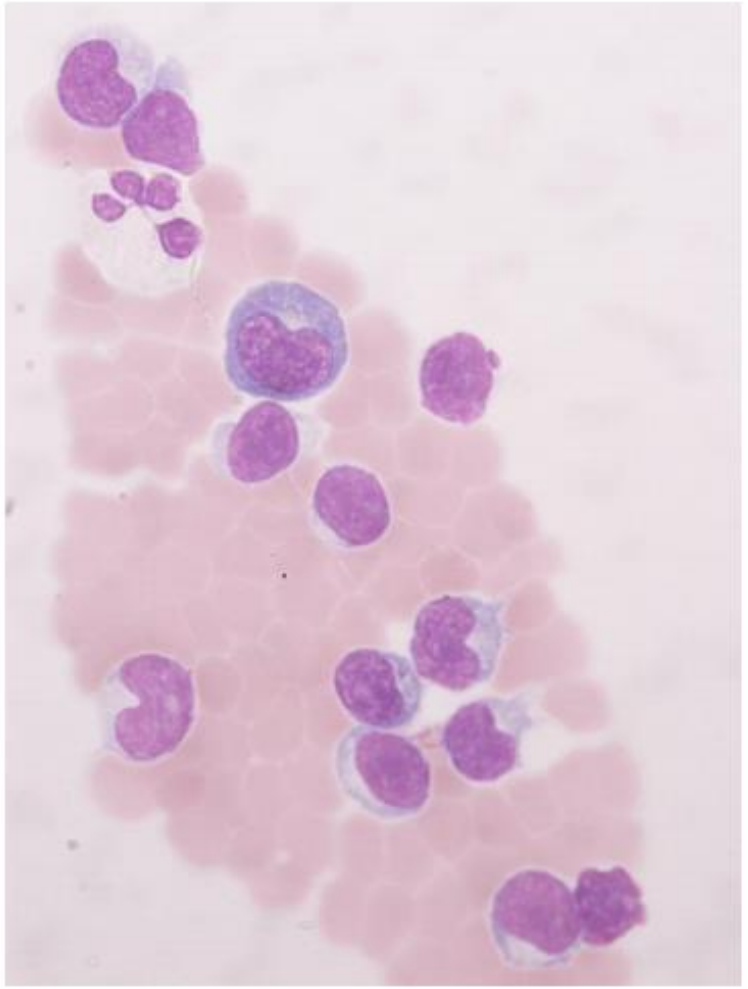
Lymphocytes



Homogeneity

(Monomorphic)

Blast cells

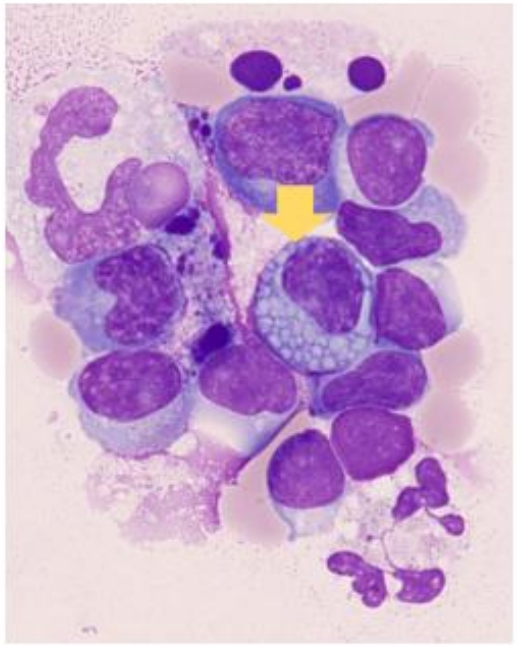


Heterogeneity

(Pleomorphic)

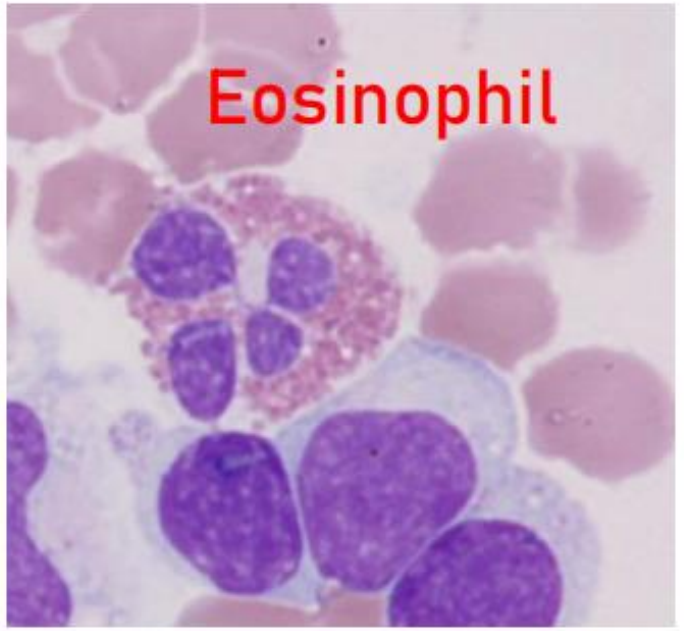
Atypical lymphocytes/plasma ells

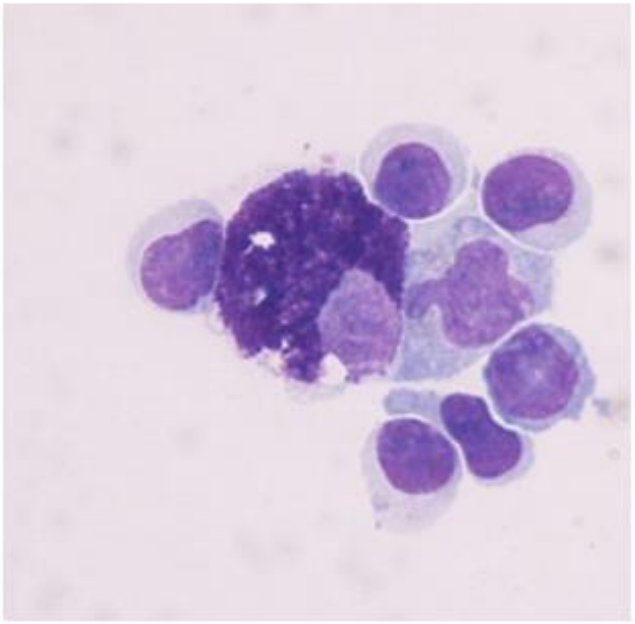
Cell / other found in body fluids



Mott cell

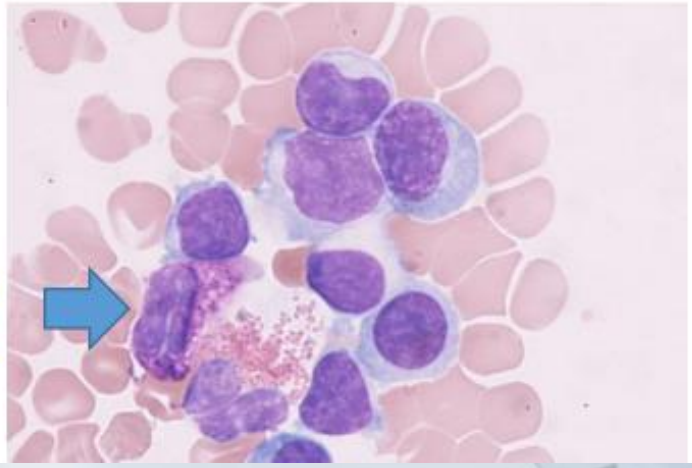
Macrophage



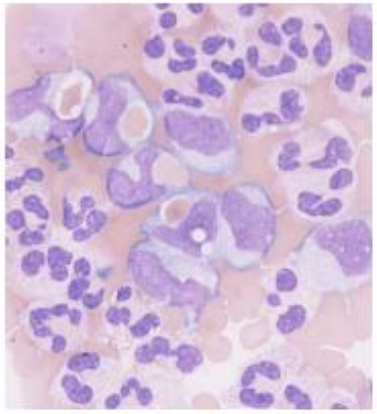


Mast cell

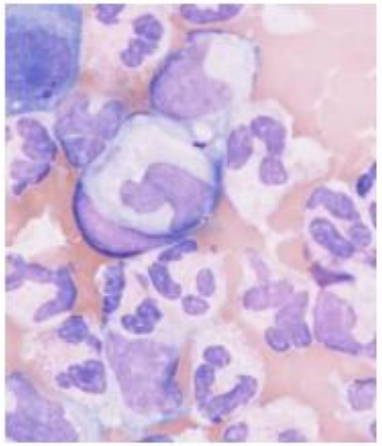
Basophil



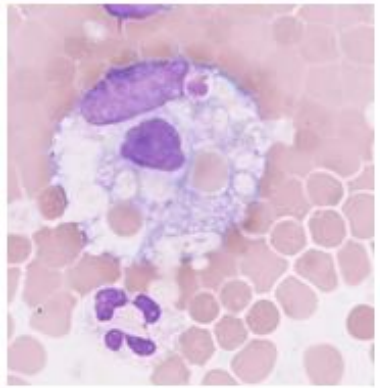
Cell / other found in body fluids



Erythrophage

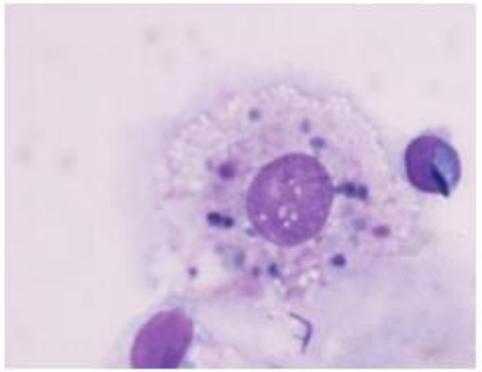


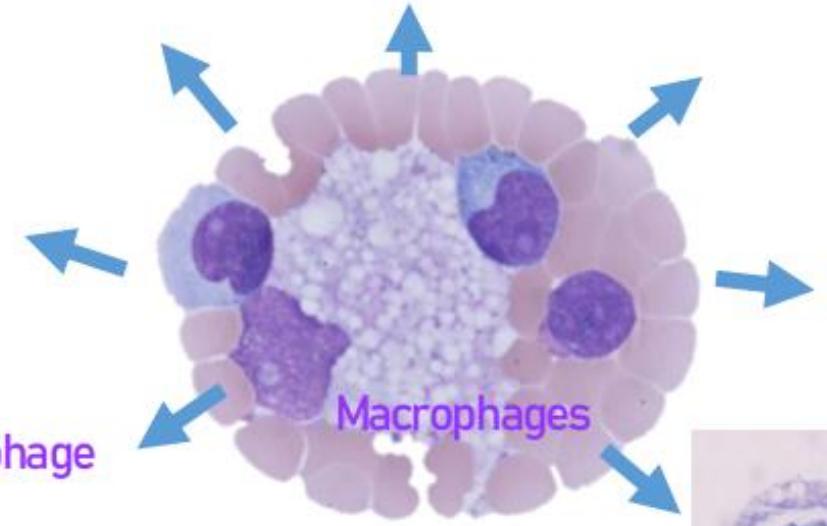
Leukophage



Leukoerythrophage

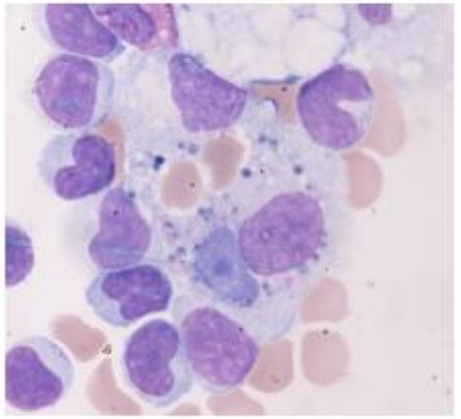
Siderophage



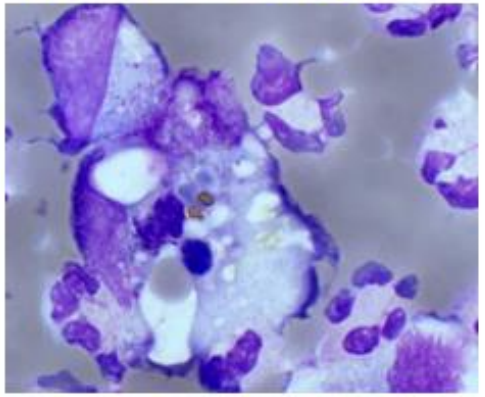


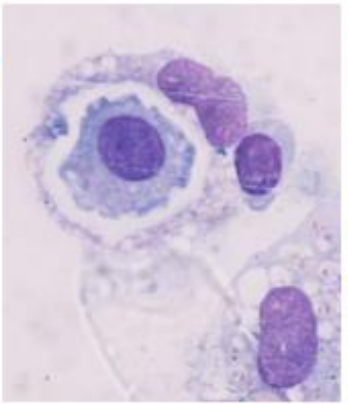
Macrophages

Erythrosiderophage



Hematoidinophages

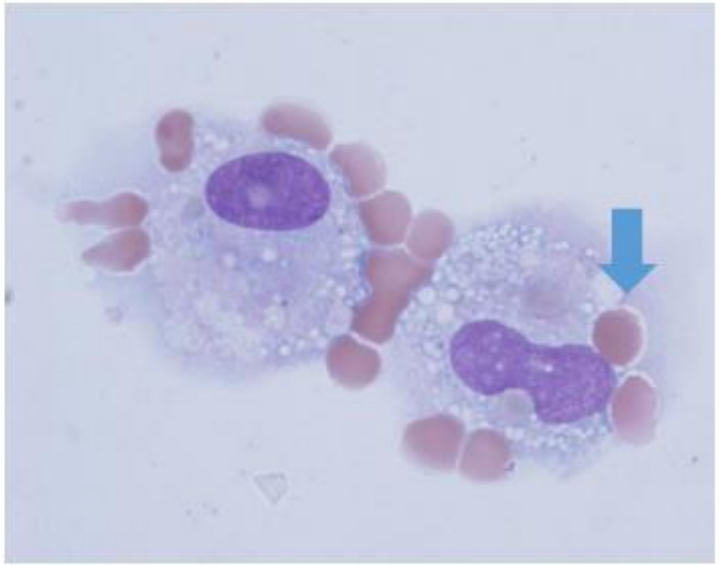


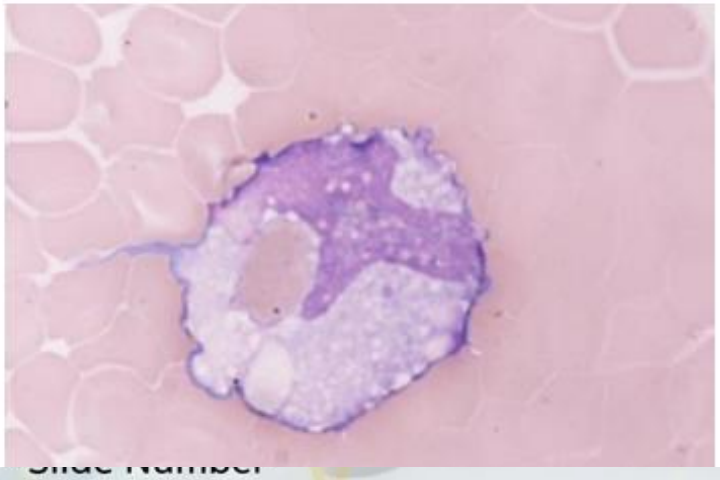


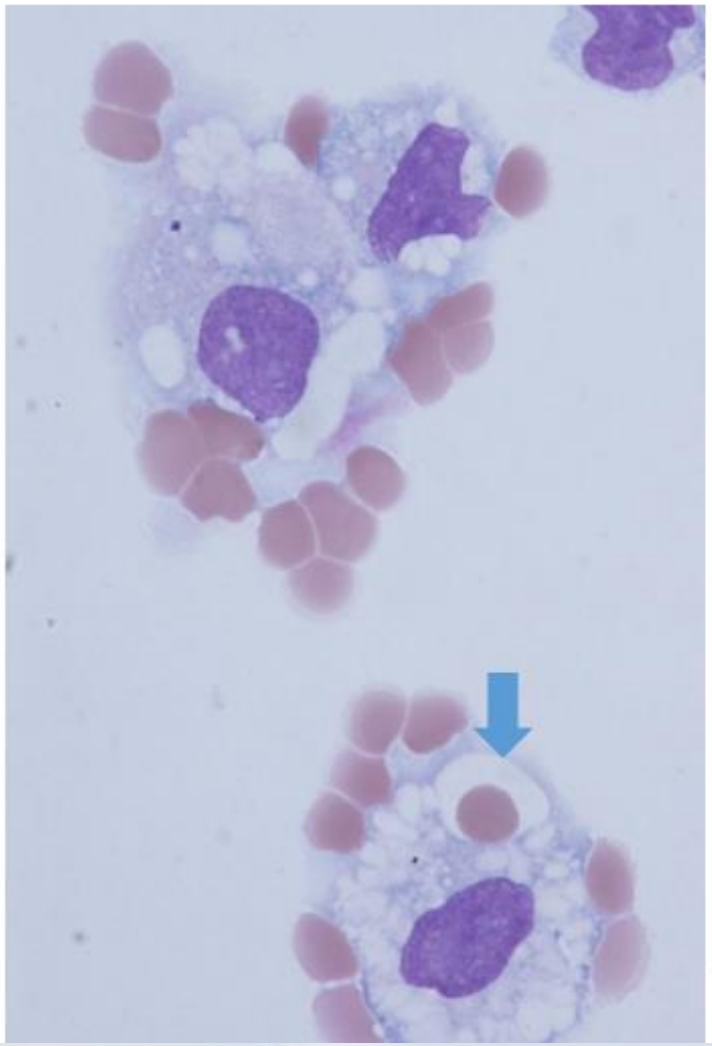
Macrophages with
phagocytose mesothelial cell

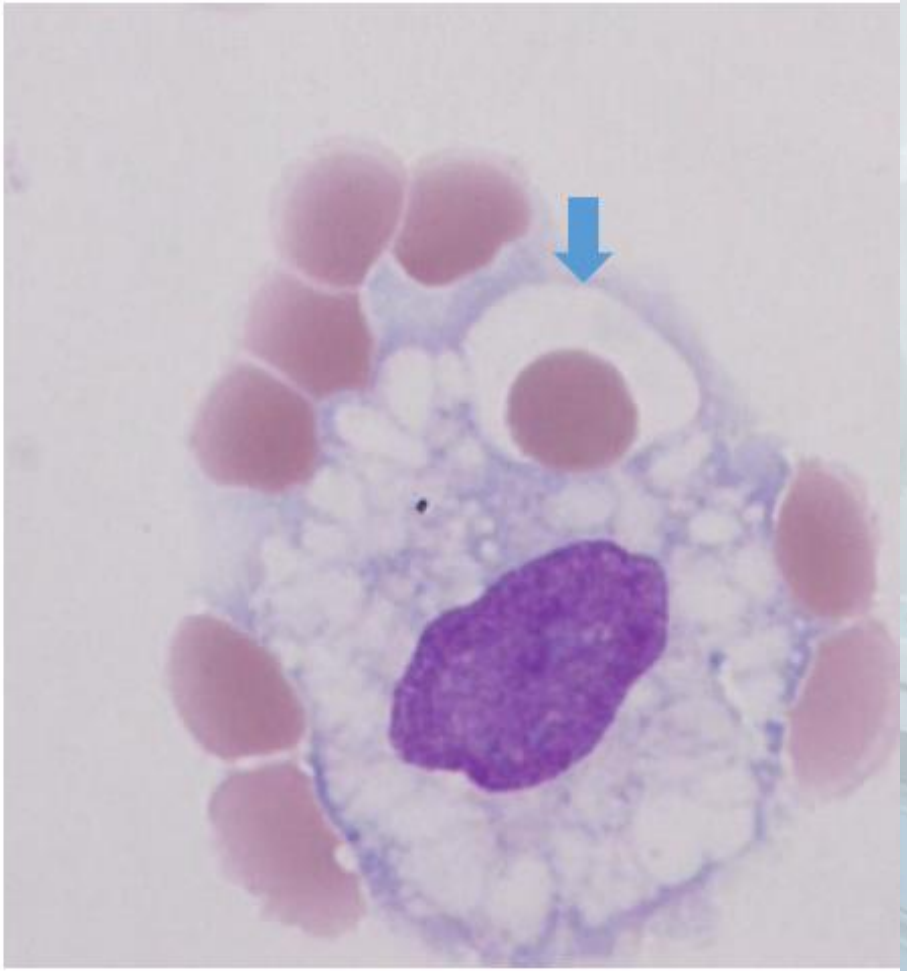
Cell / other found in body fluids

Erythrophages



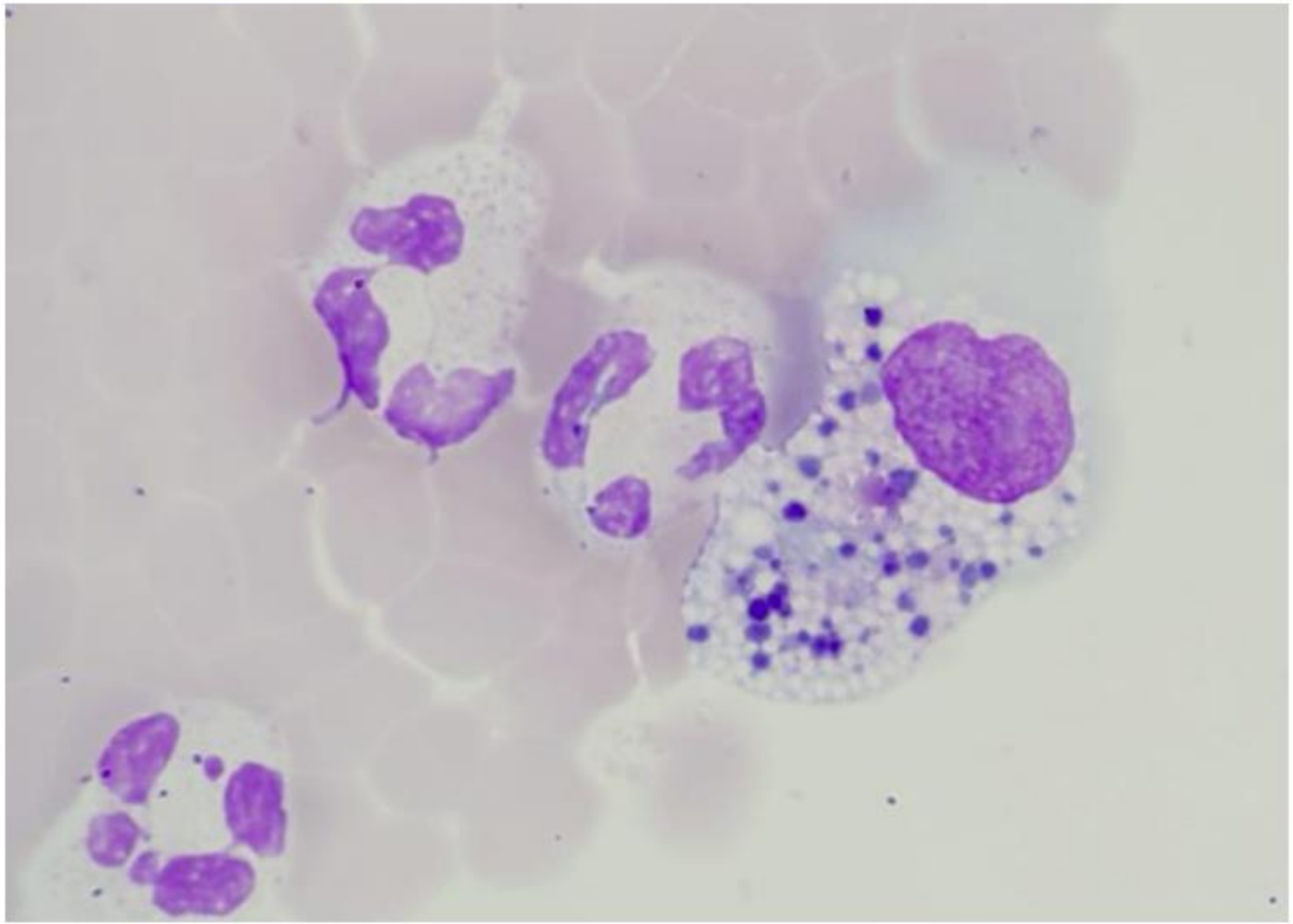


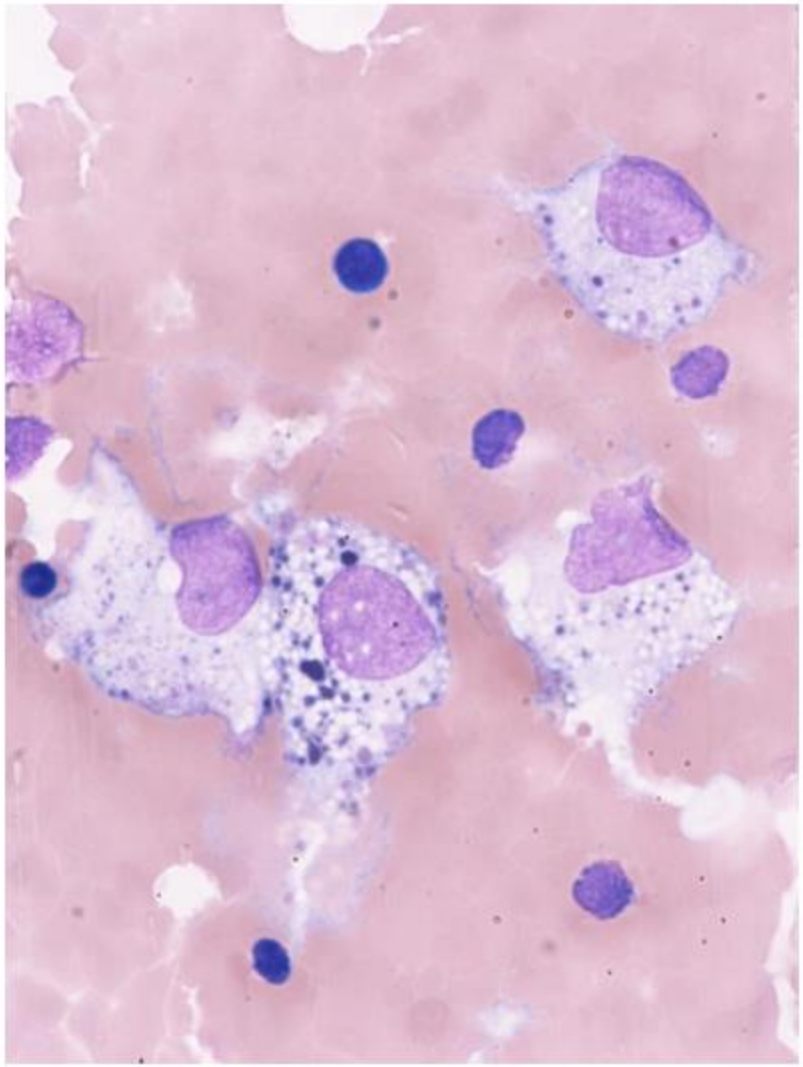




Cell / other found in body fluids

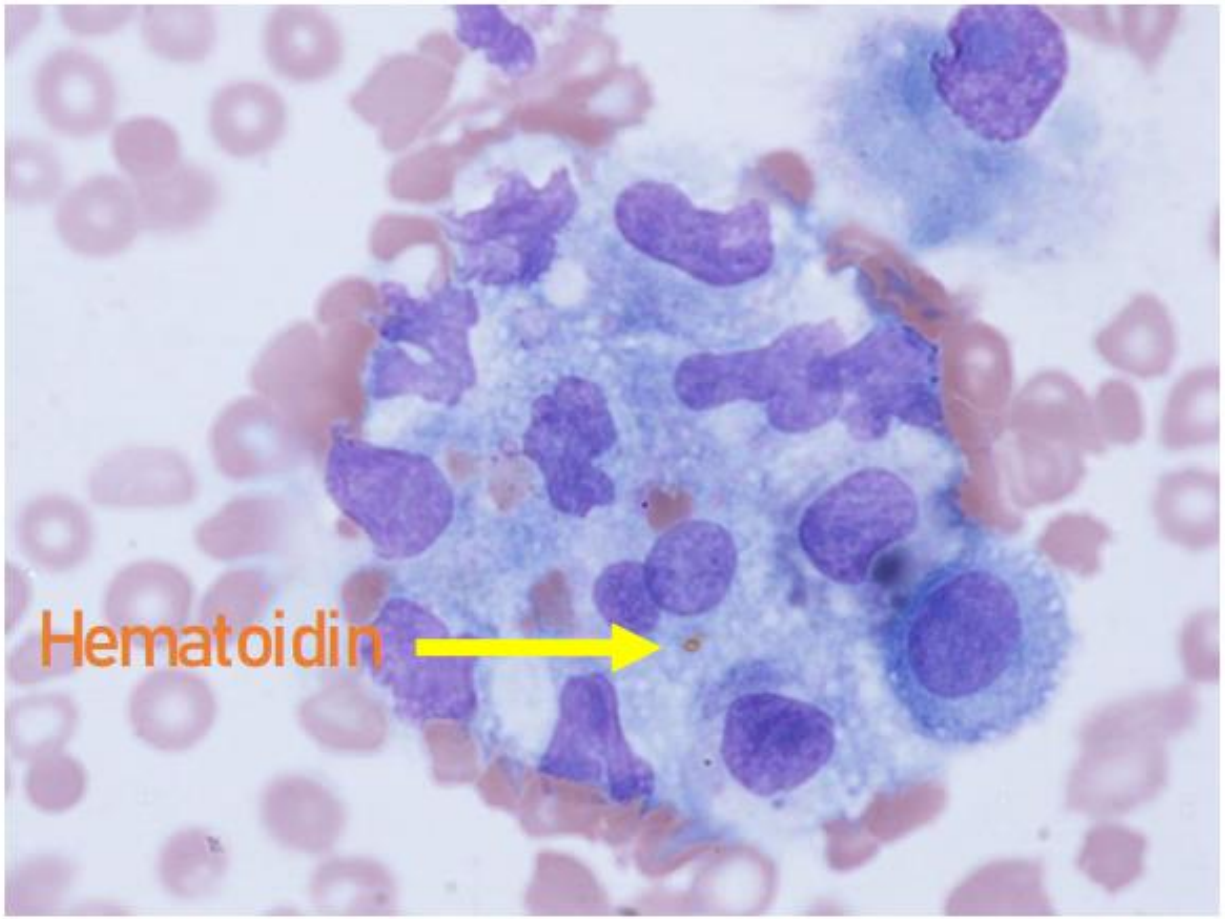
Siderophages

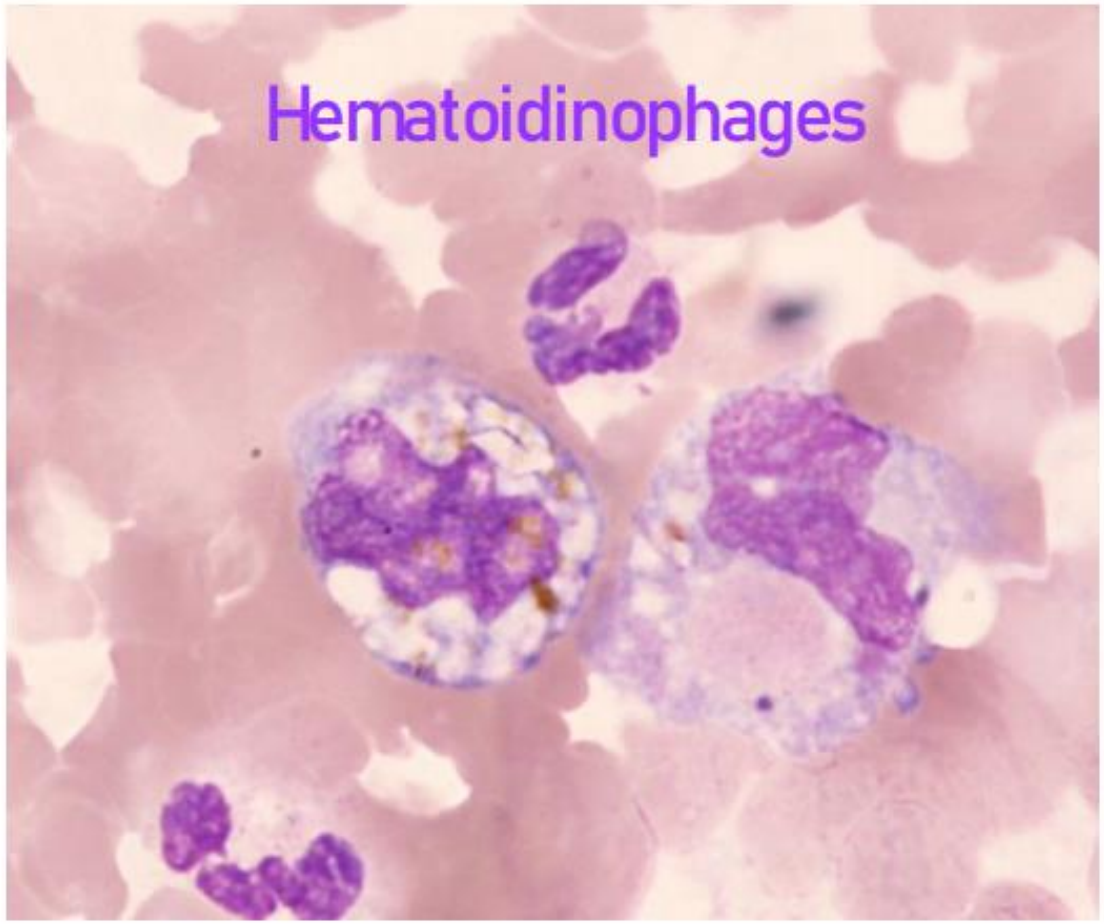




Cell / other found in body fluids

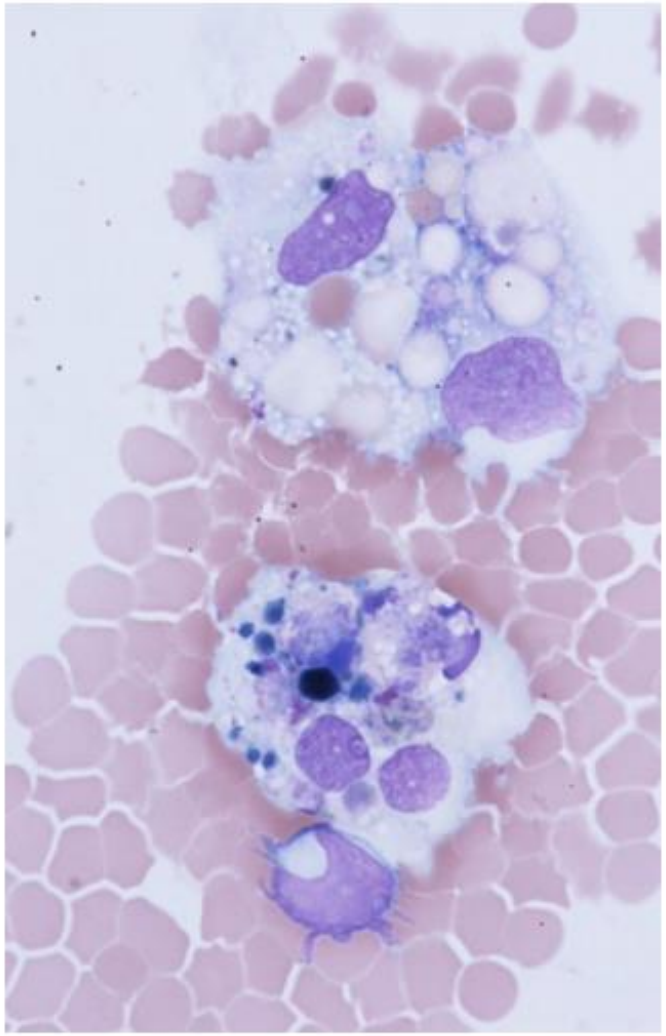
Hematoidinophages

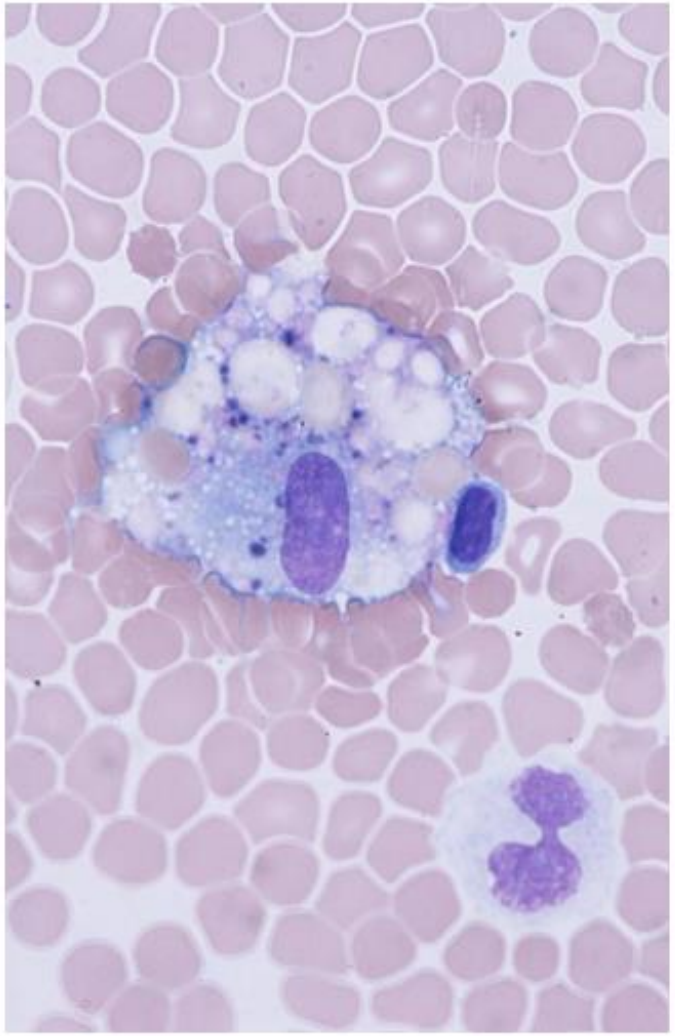


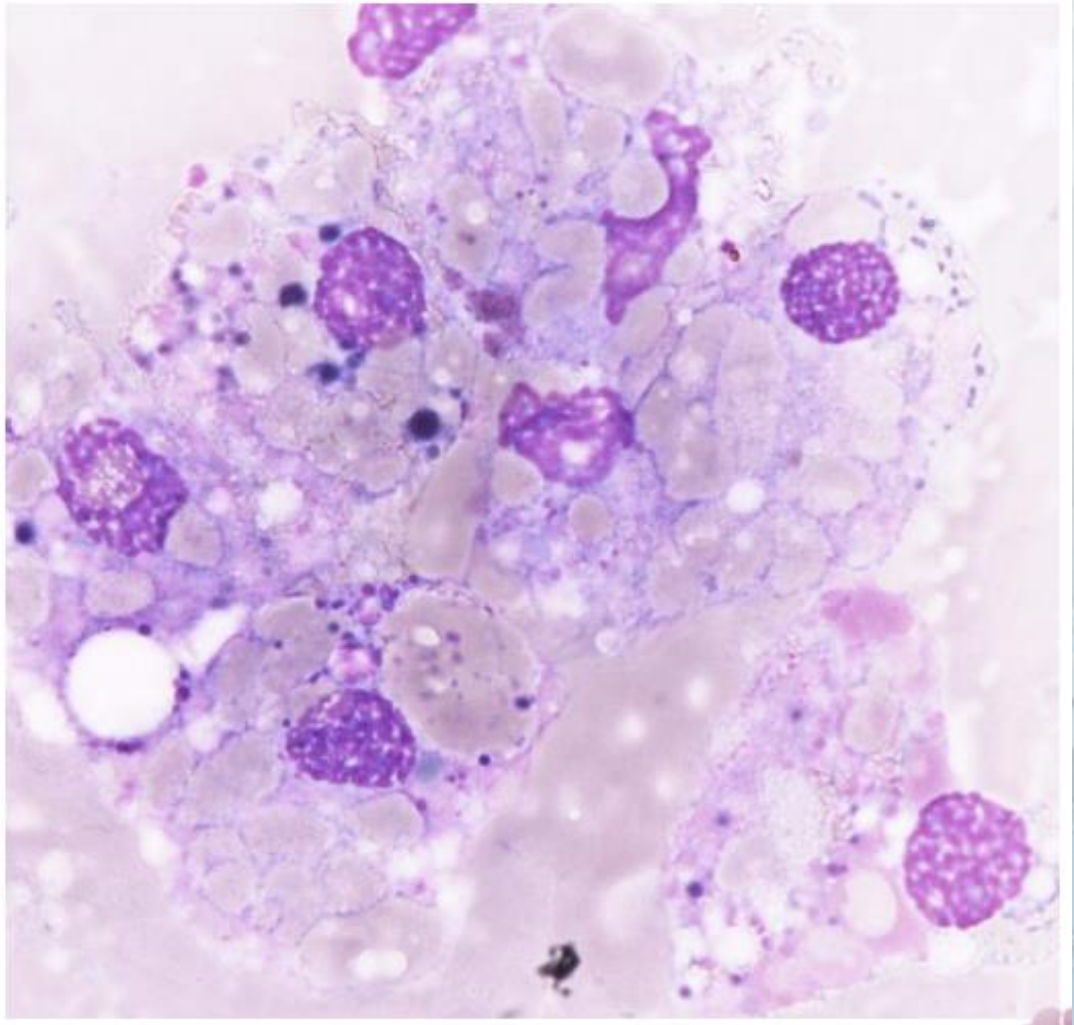


Cell / other found in body fluids

Erythrosiderophages

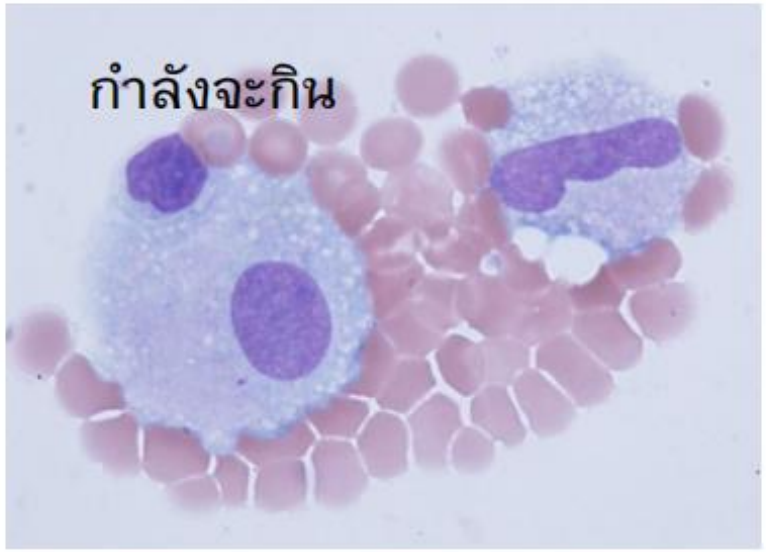


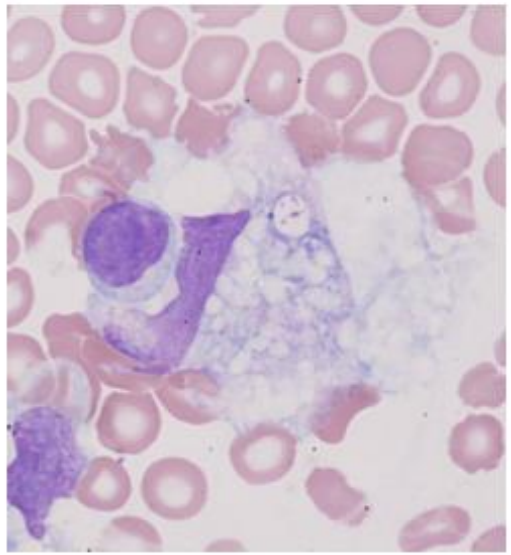


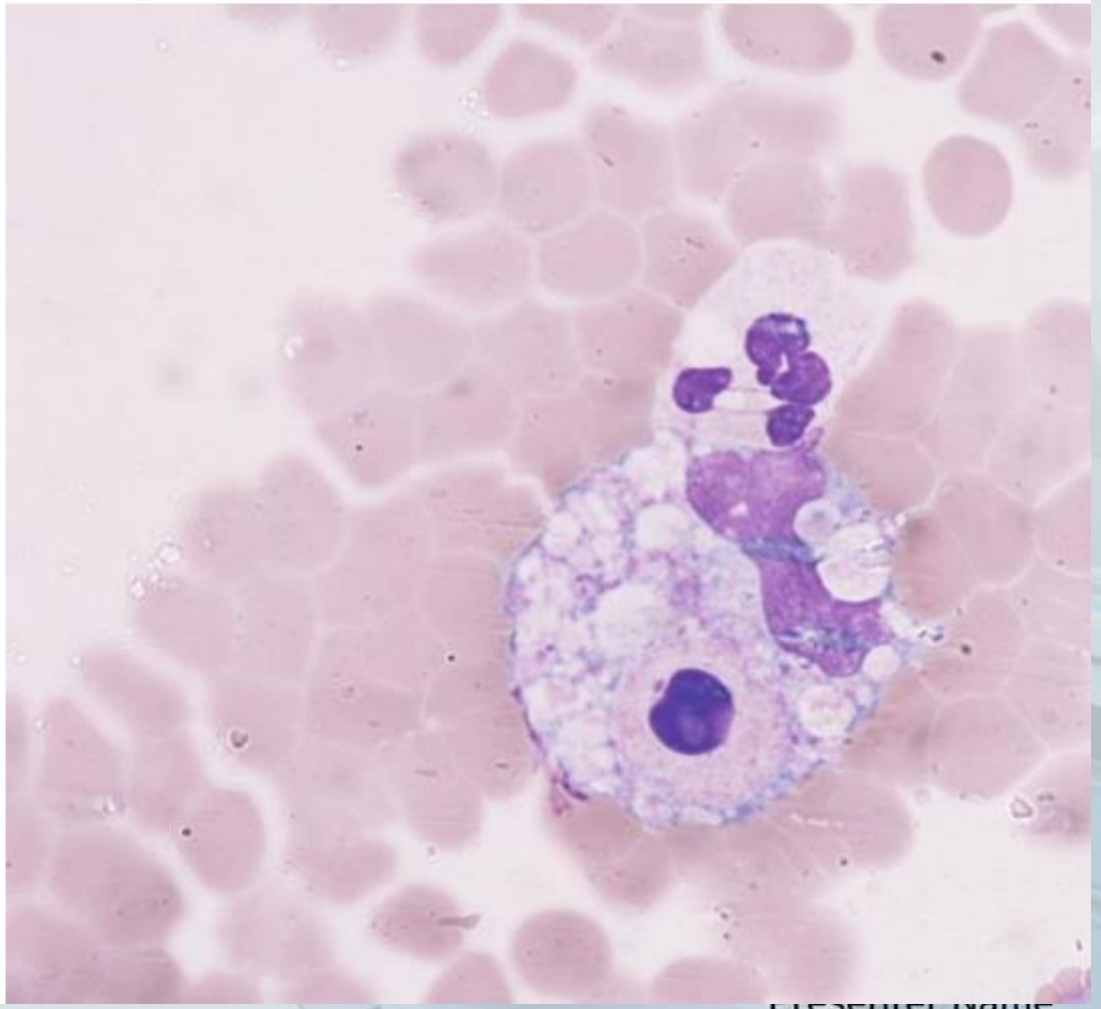


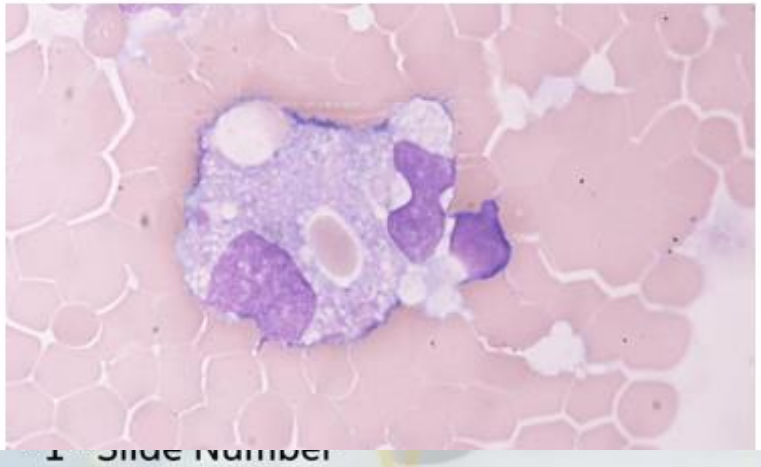
Cell / other found in body fluids

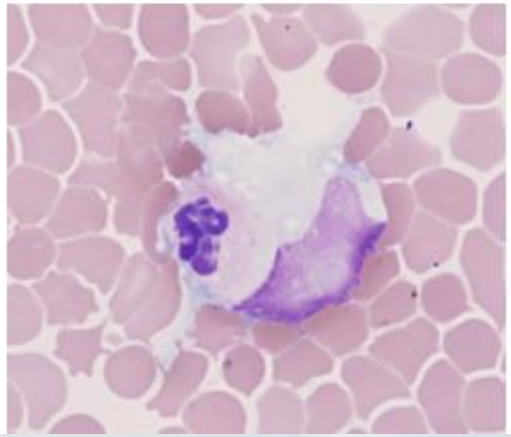
Leukophage





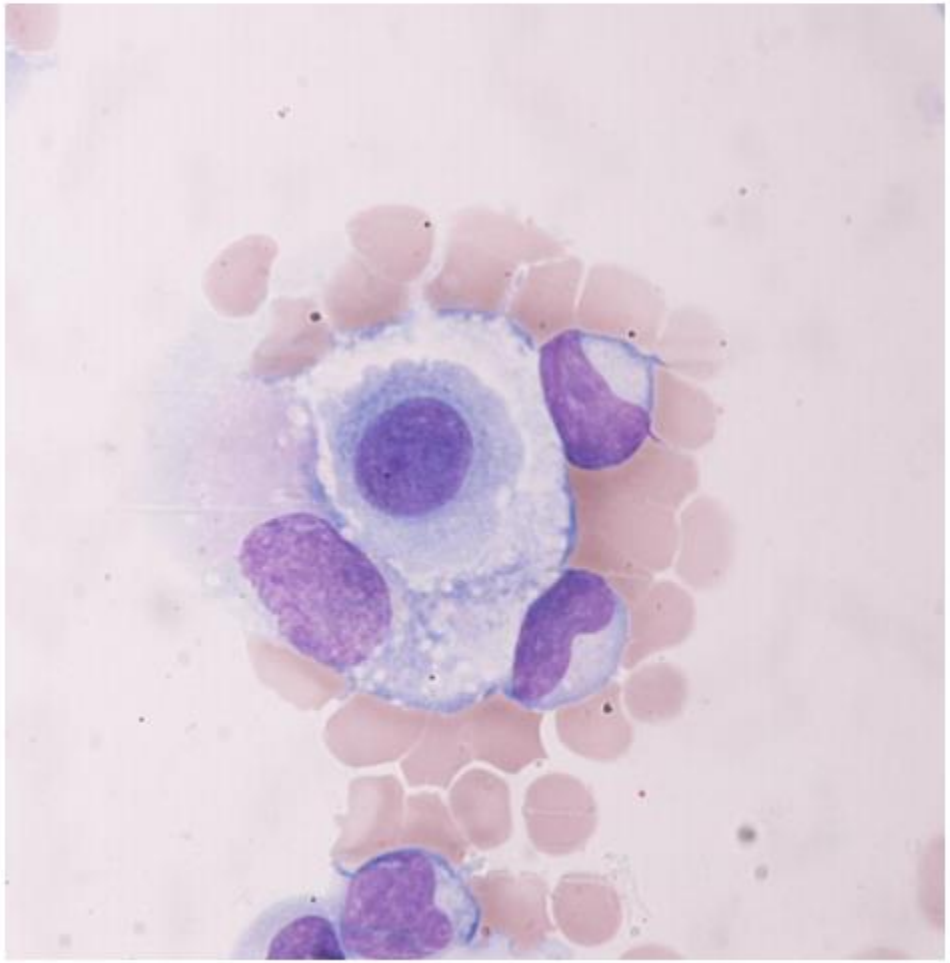


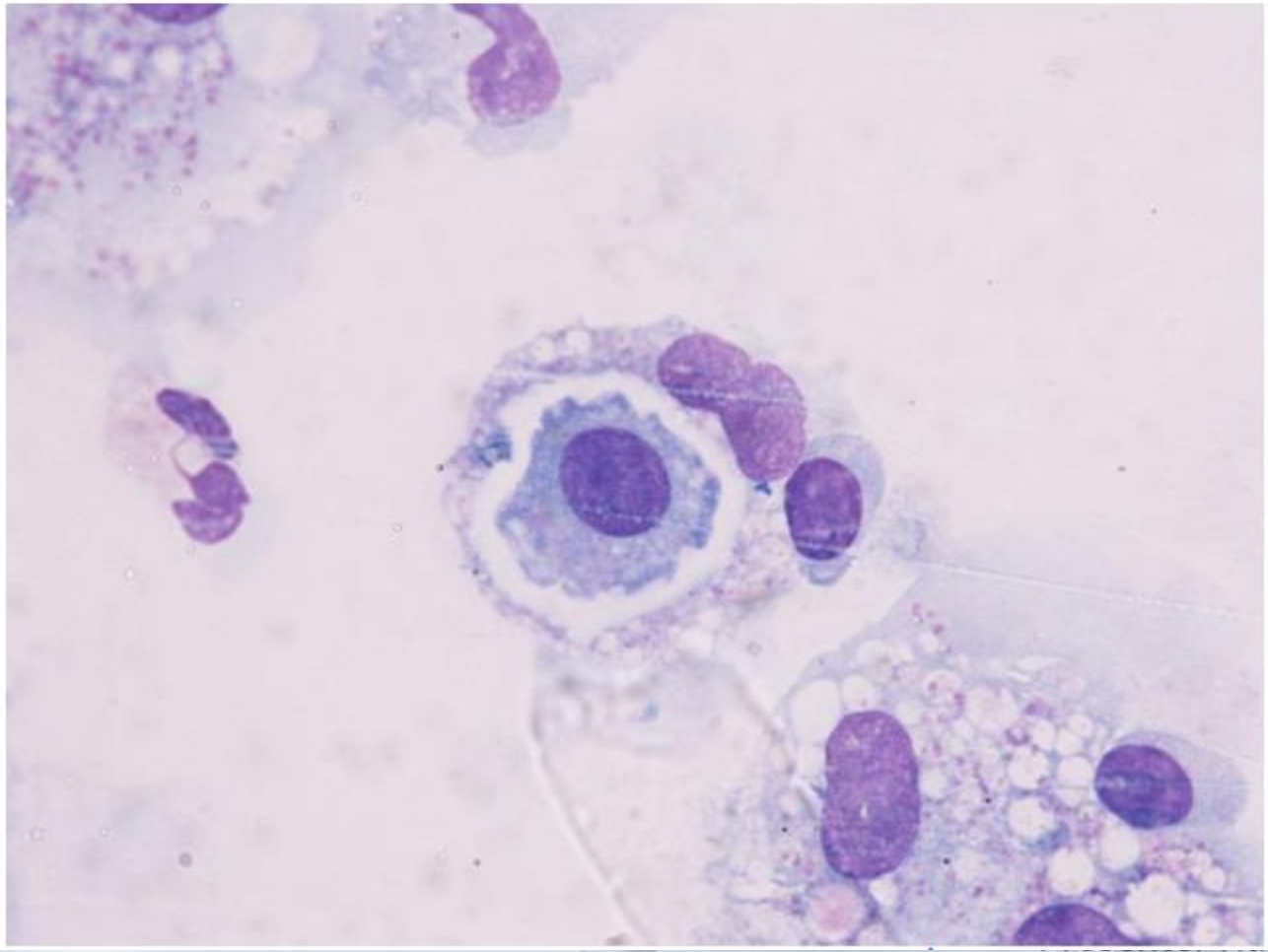




Cell / other found in body fluids

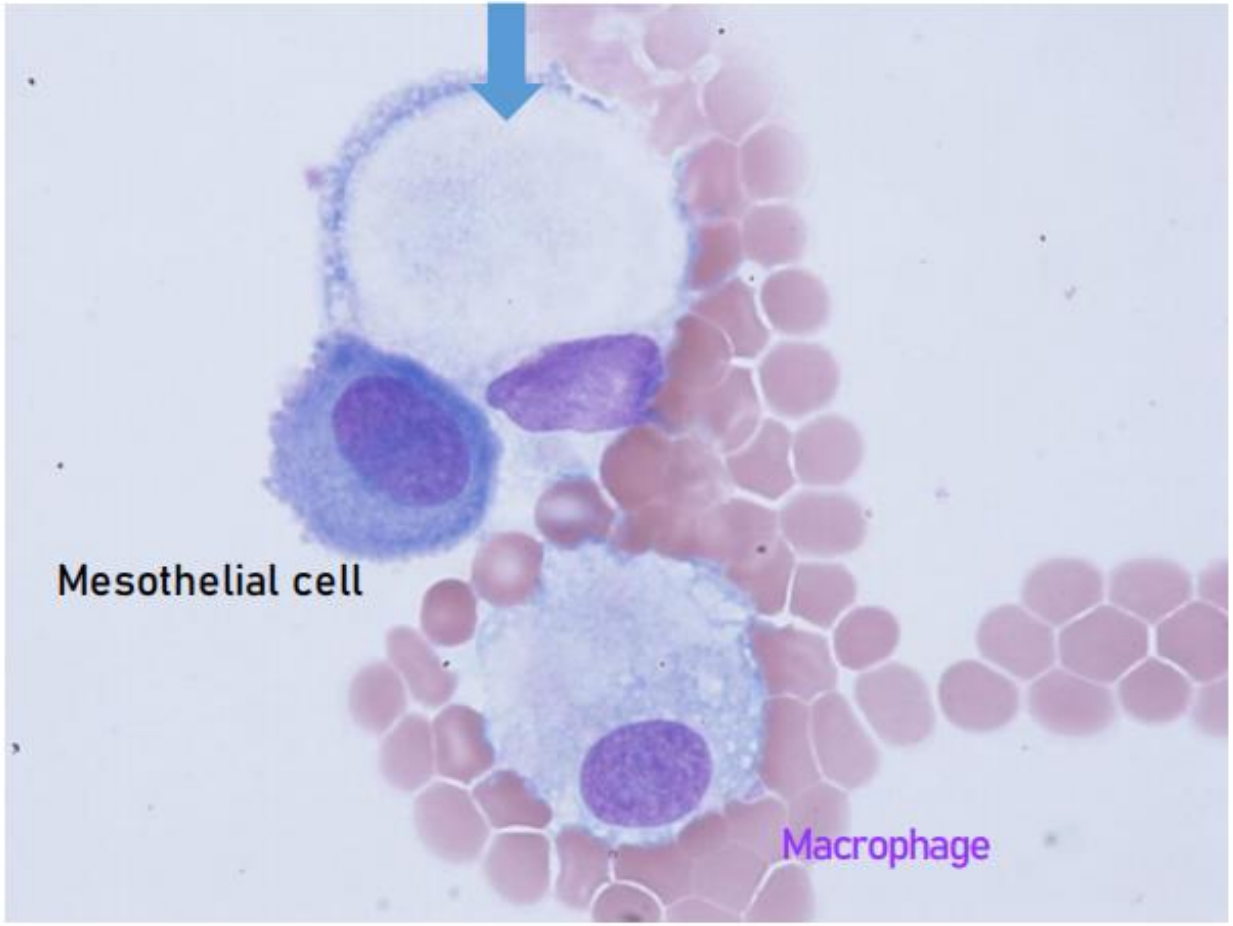
Macrophages with phagocytose mesothelial cell





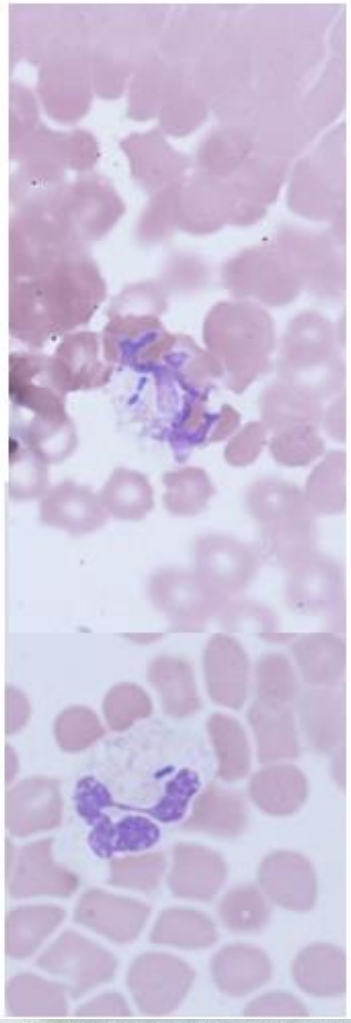
Cell / other found in body fluids

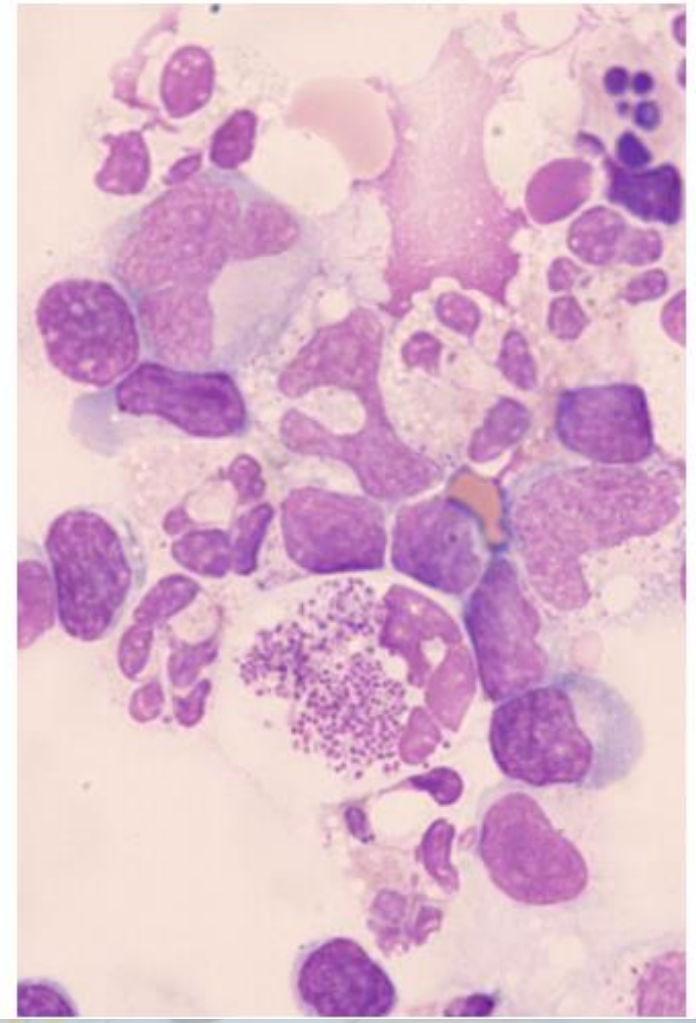
Macrophages ที่คล้าย Signet ring cells

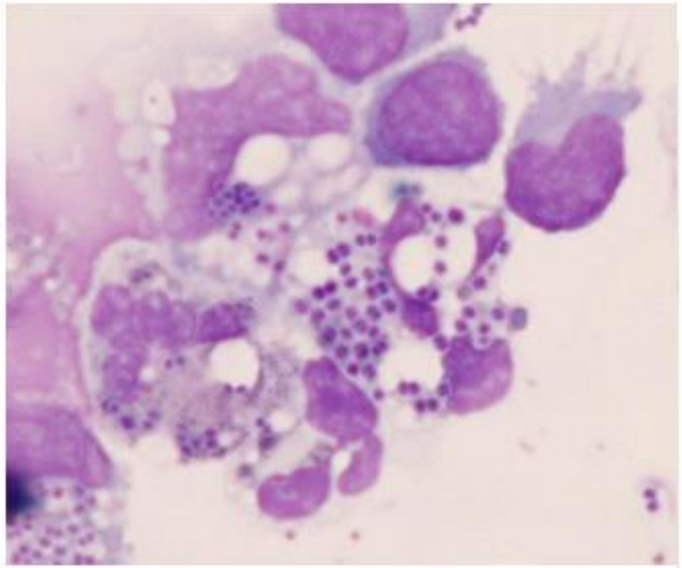


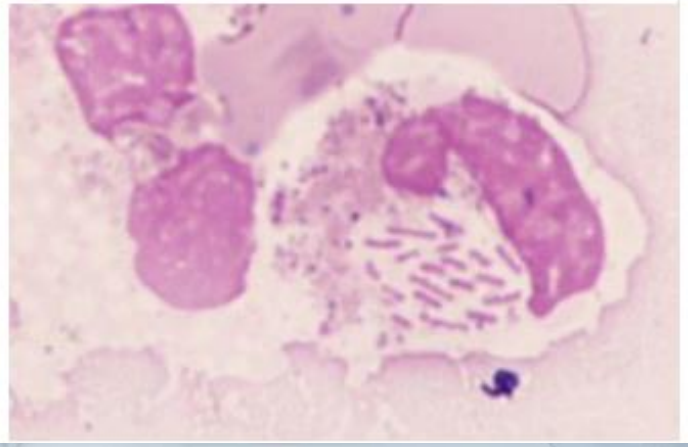
Cell / other found in body fluids

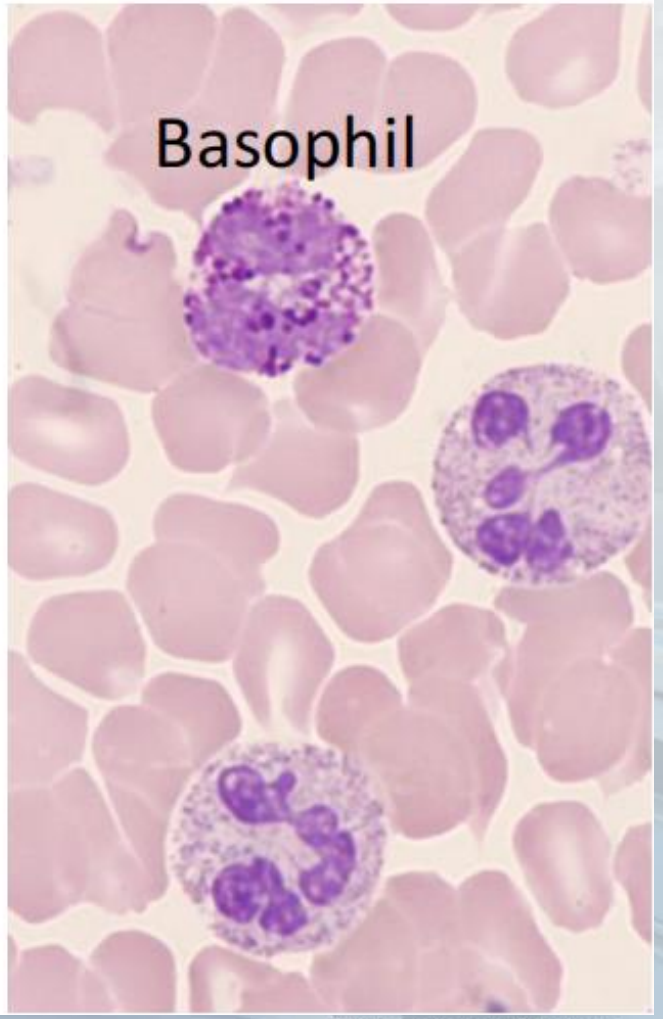
Bacteria







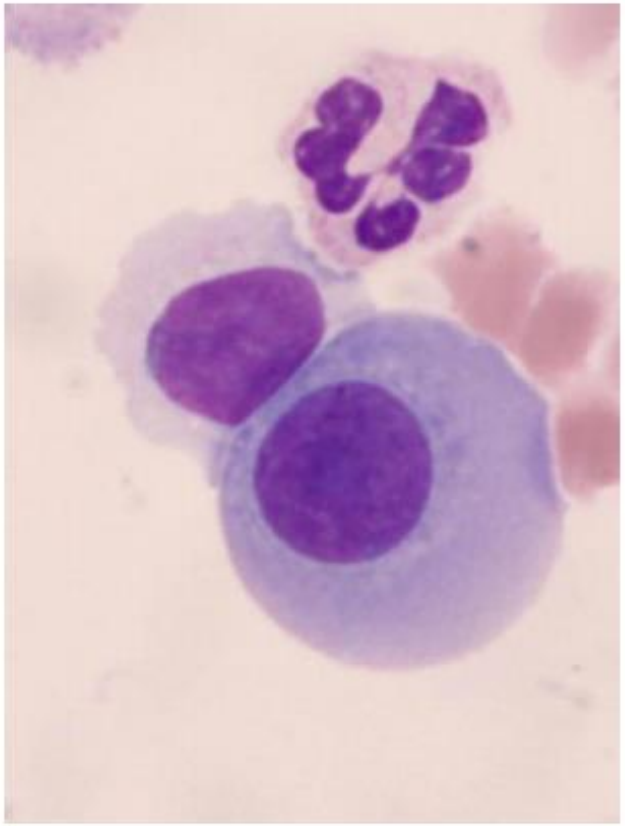


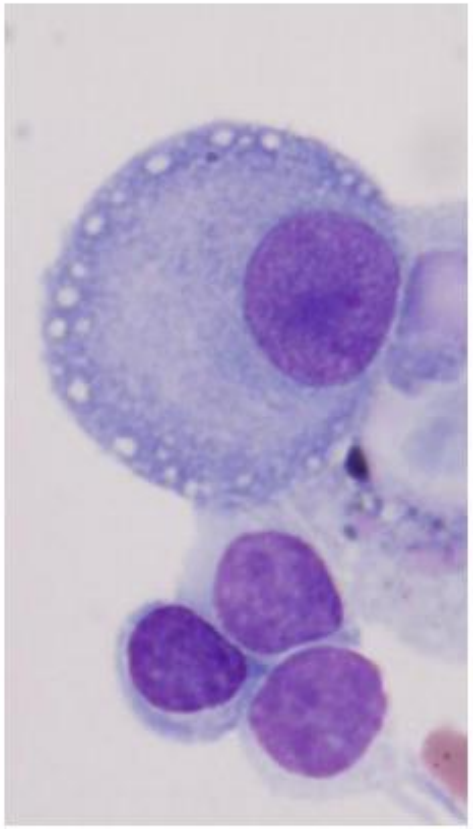


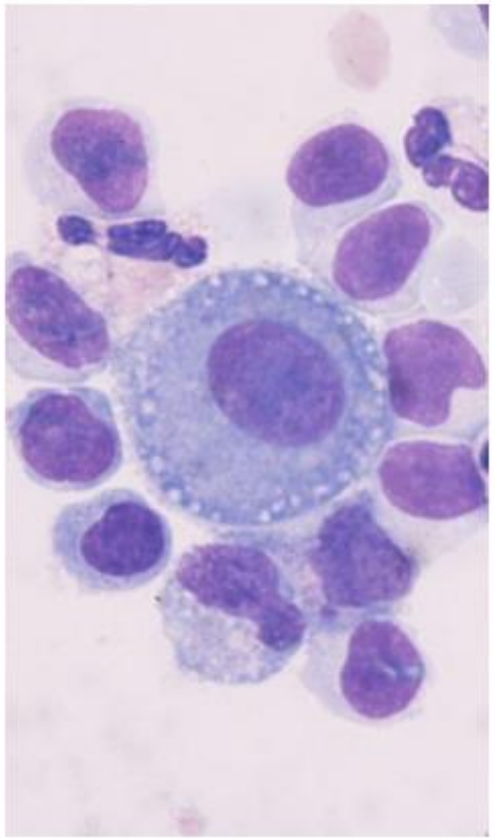
Cell / other found in body fluids

Mesothelial cell

ขนาด 12-30 ไมครอน (ประมาณ 1-2 เท่าของ neutrophils)



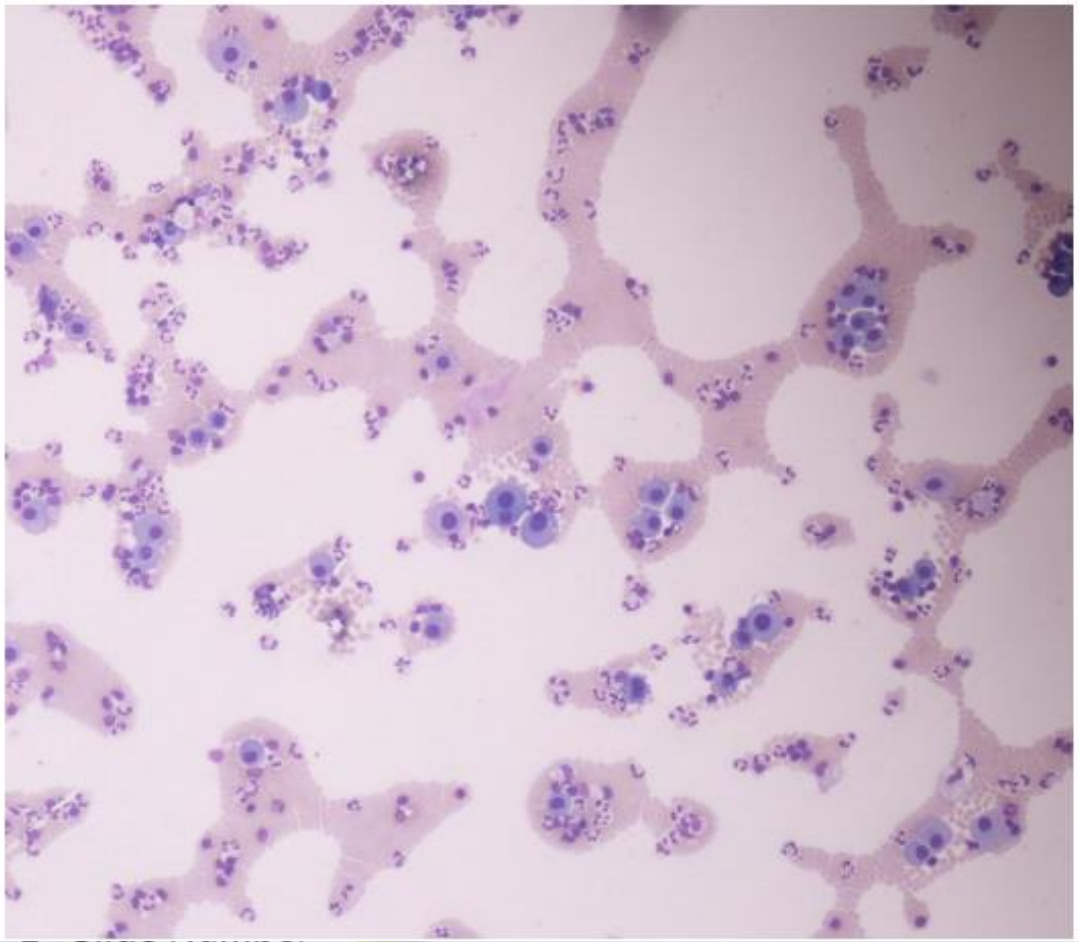


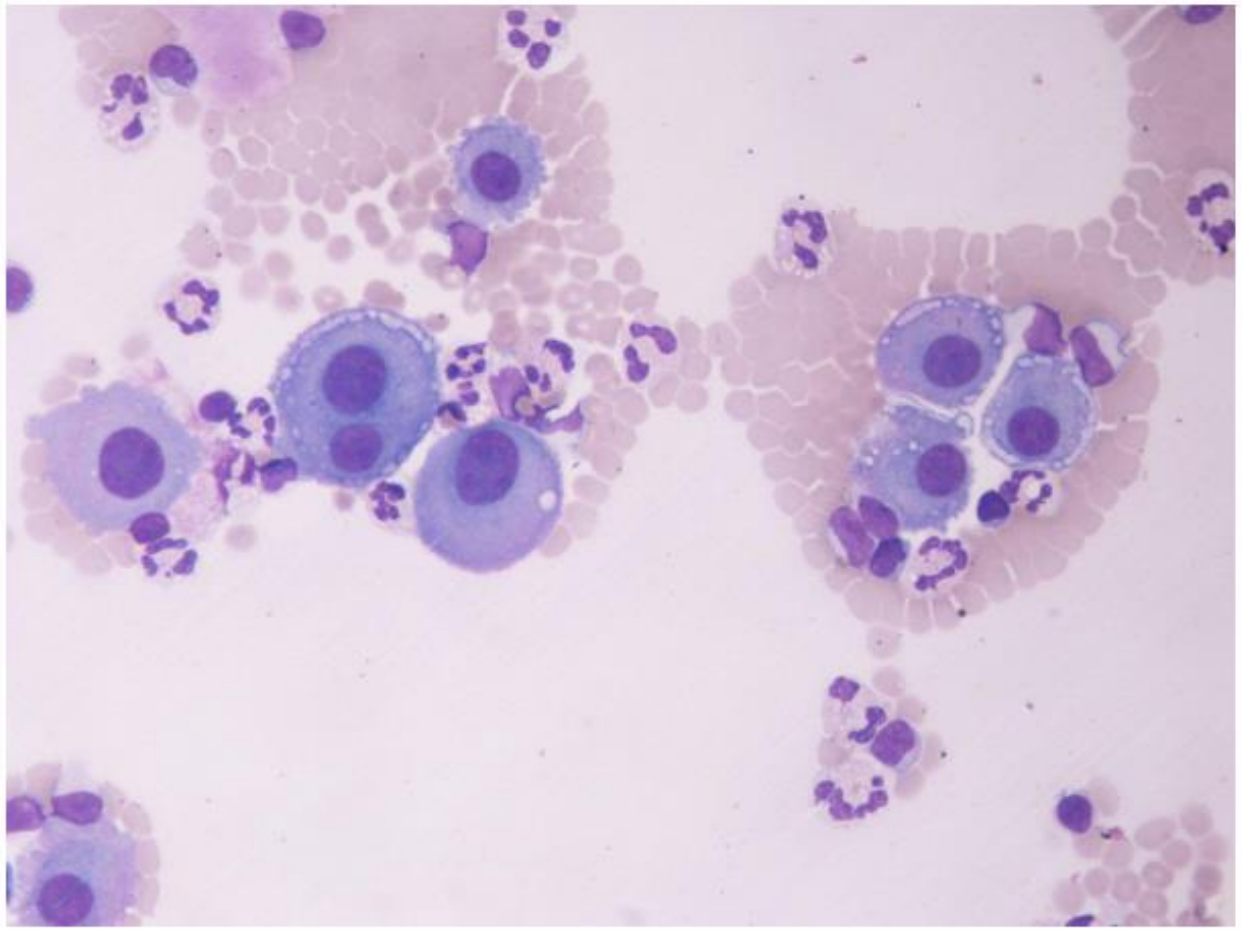


Cell / other found in body fluids

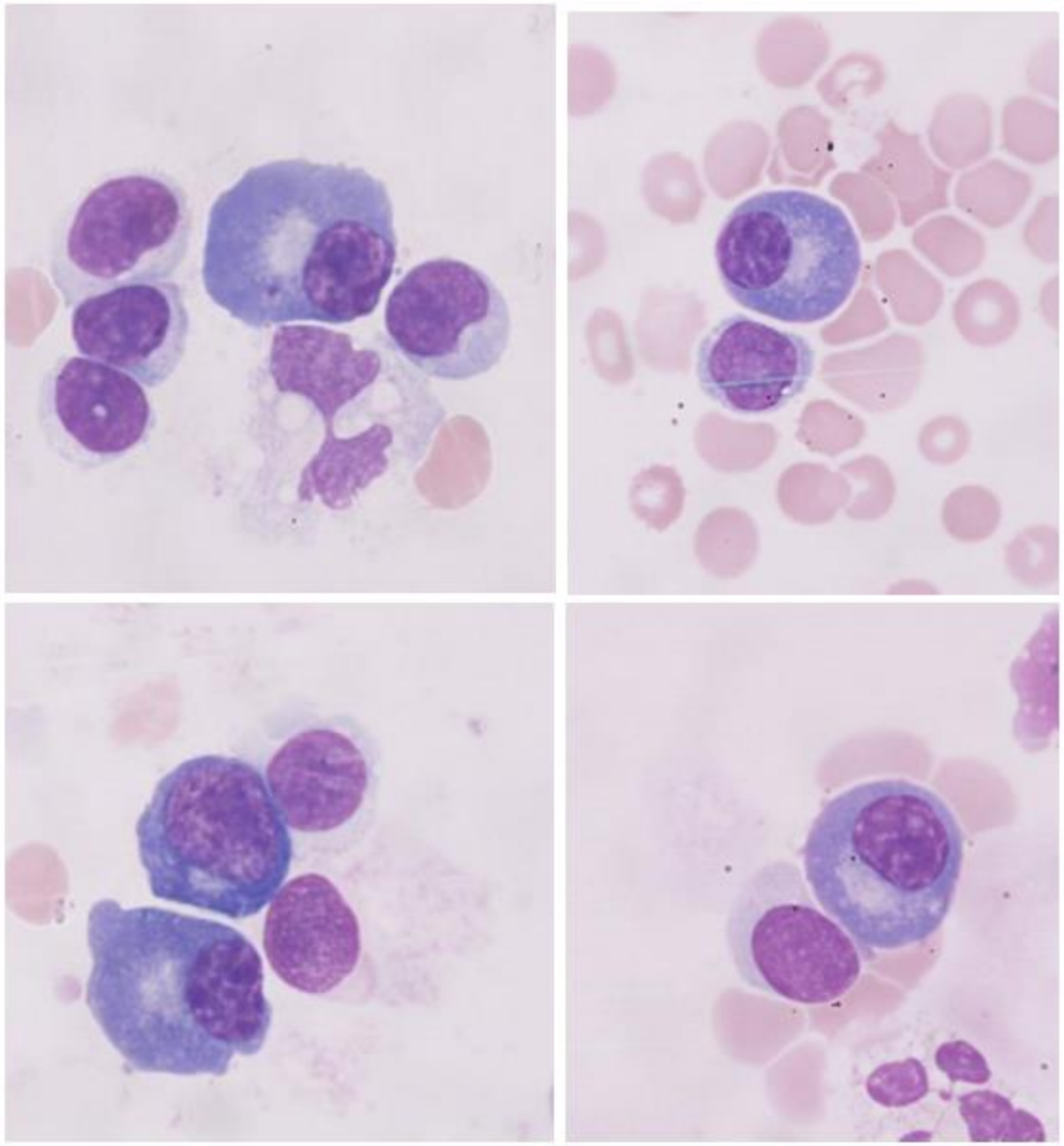
Mesothelial cell

Low and high power field

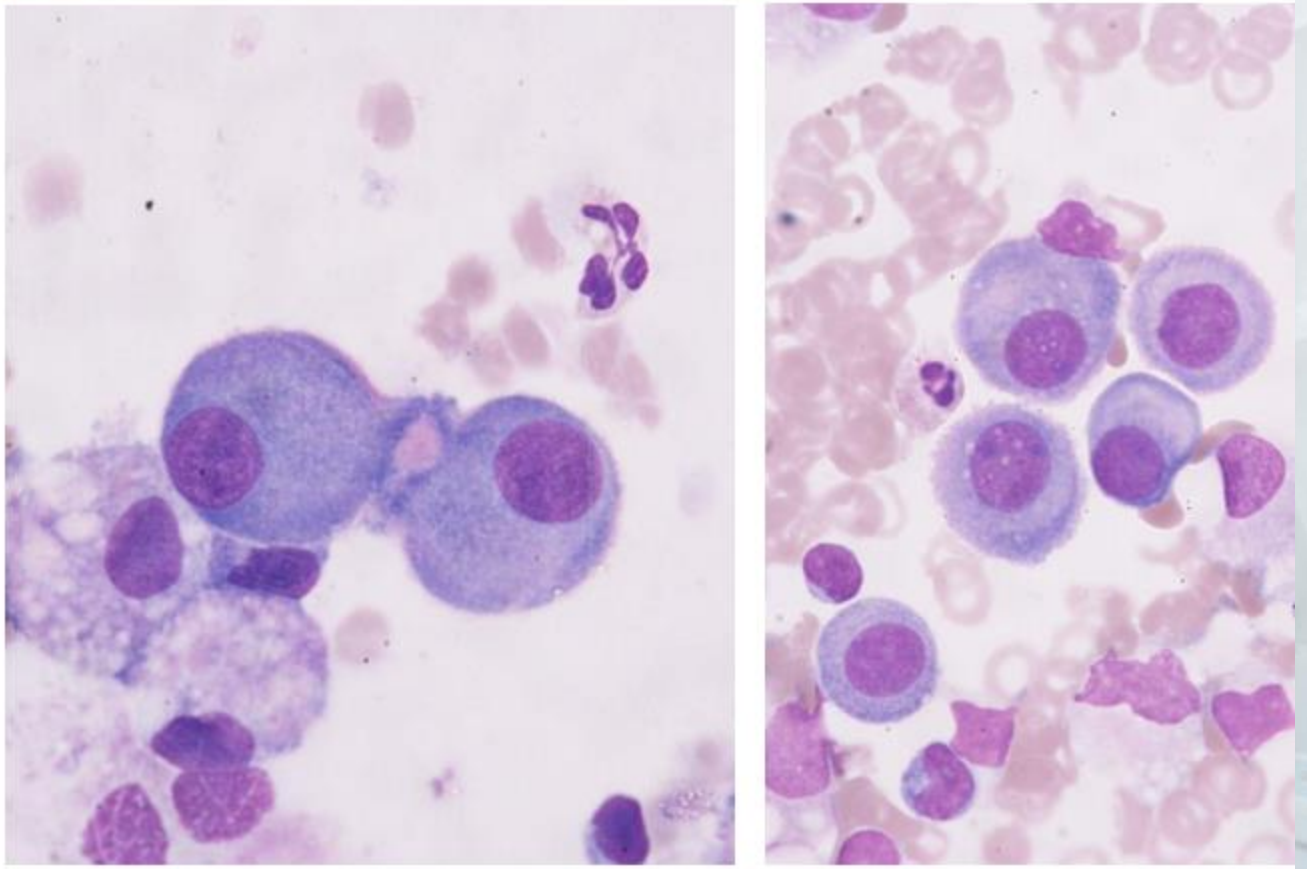




Plasma cell



Mesothelial cell



Plasma cell

Clumped chromatin

Deep blue cytoplasm

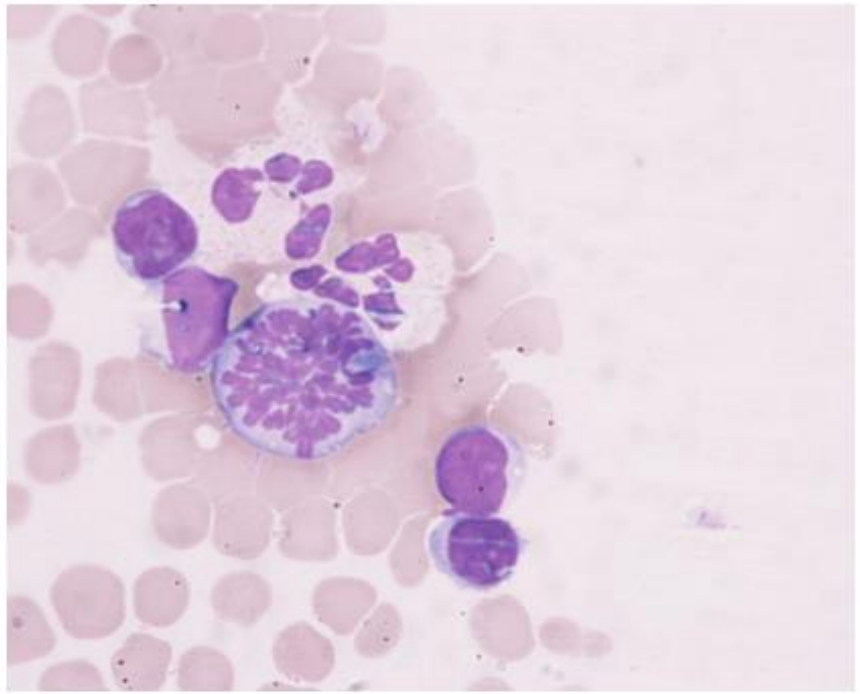
Perinuclear halo

Cell / other found in body fluids

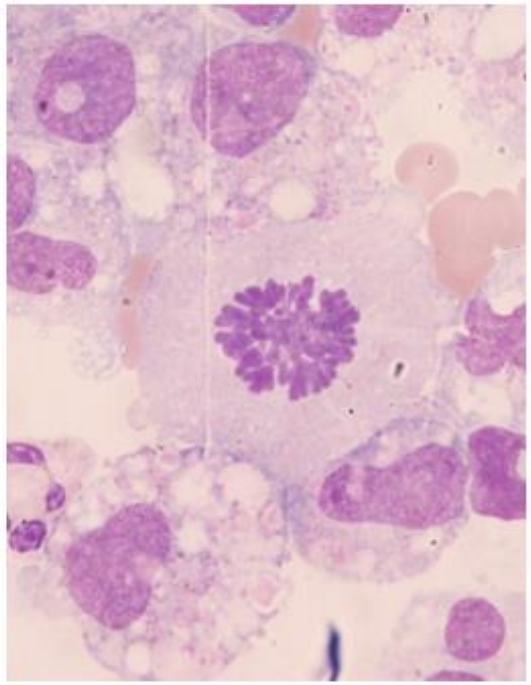
Mitotic figures

หมายถึงเซลล์ที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ พบได้ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด

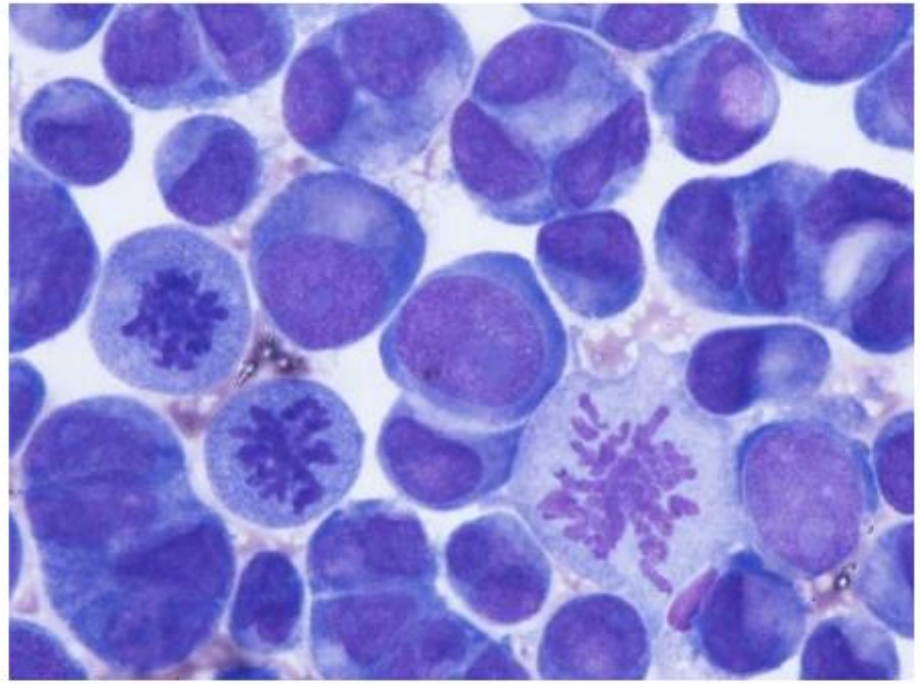
การพบลักษณะดังกล่าวนี้ไม่ได้หมายความว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์มะเร็งเสมอไป



Non-Malignant



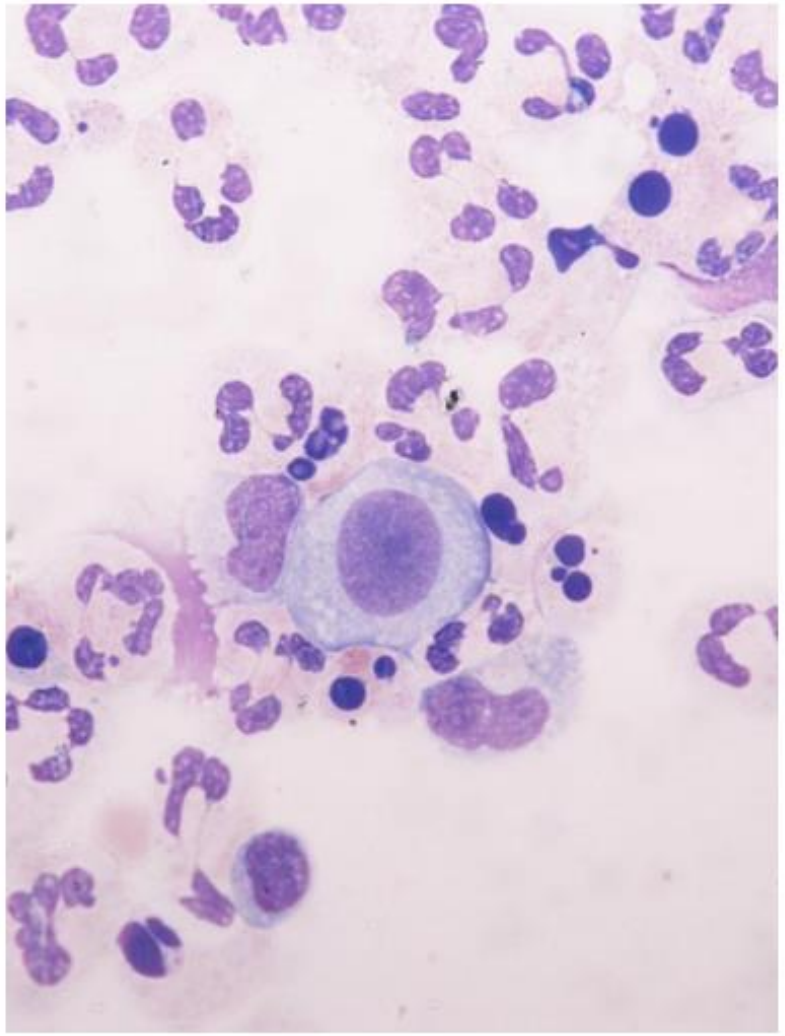
Non-Malignant

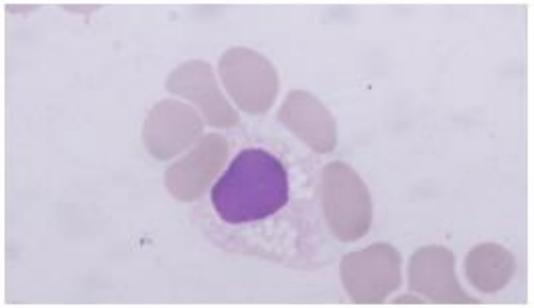


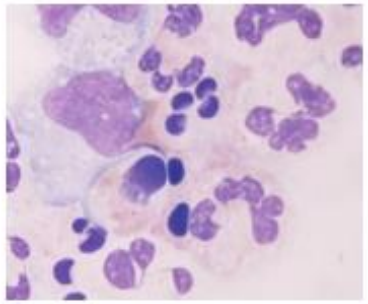
Malignant

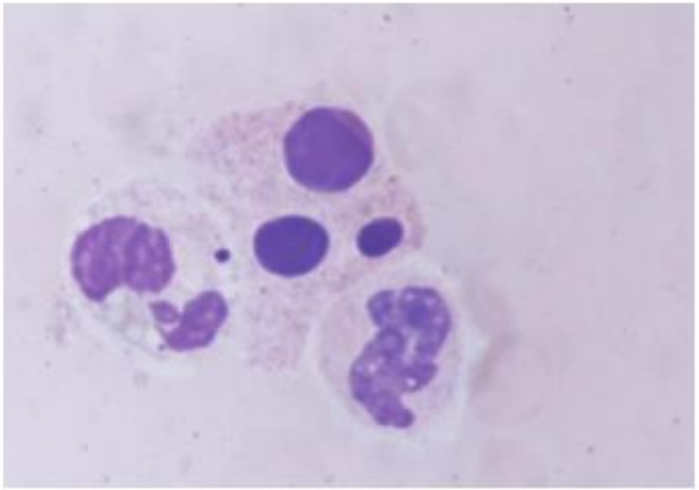
Cell / other found in body fluids

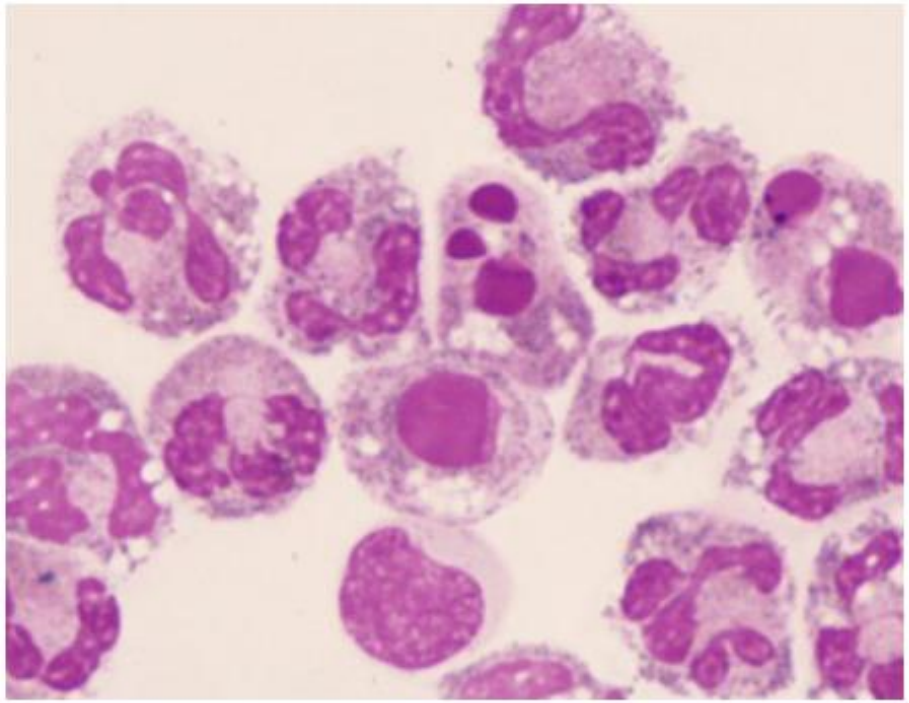
Apoptotic/Necrotic cells

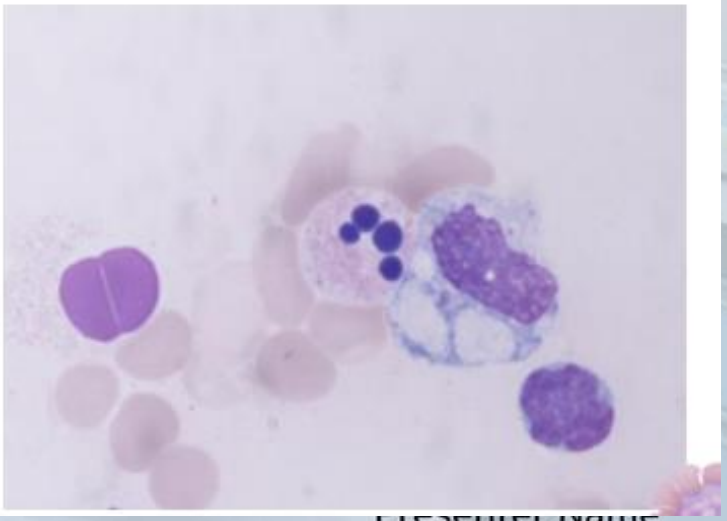






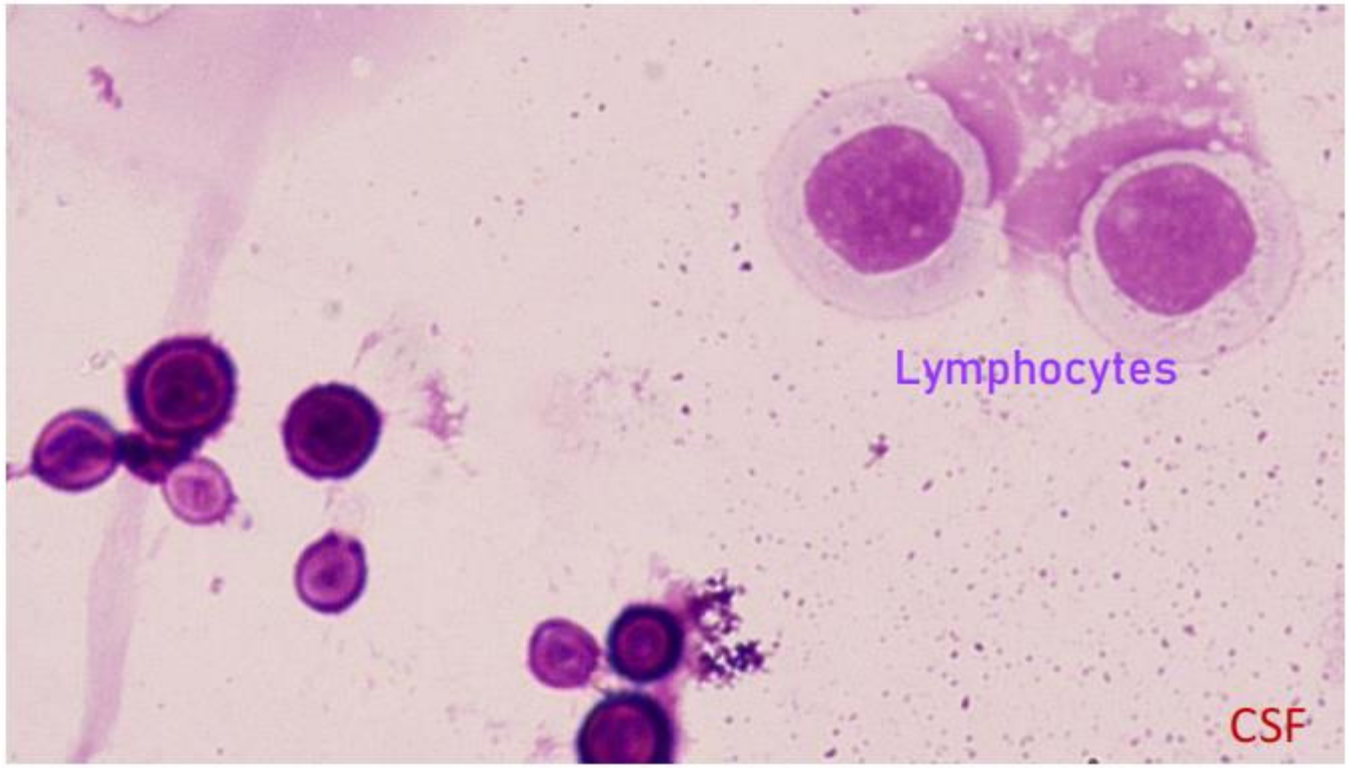


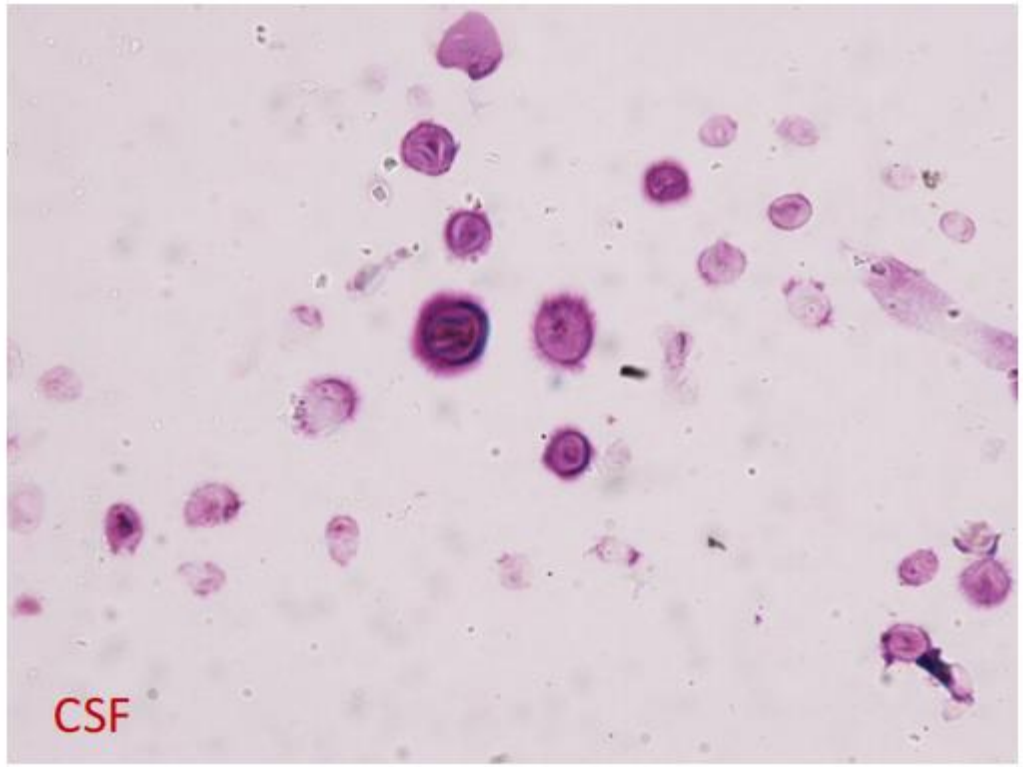




Cell / other found in body fluids

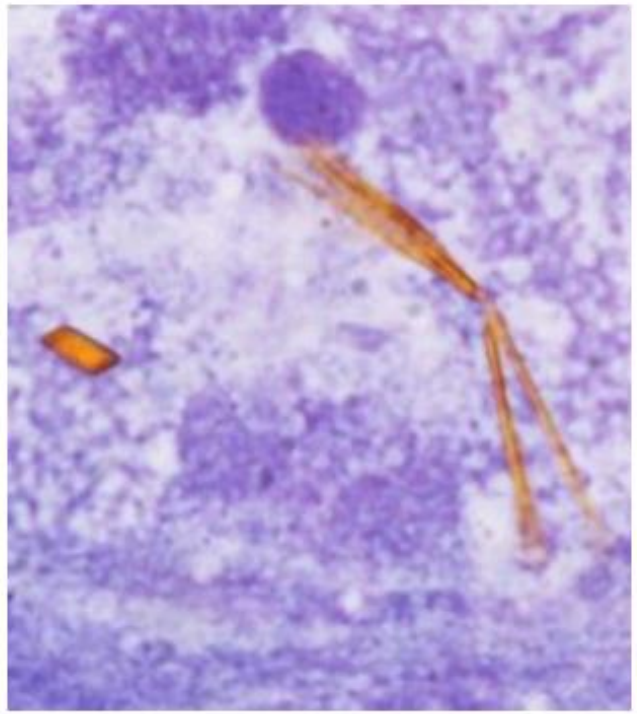
Encapsulated yeast cell cells
Sunburst like yeast cells



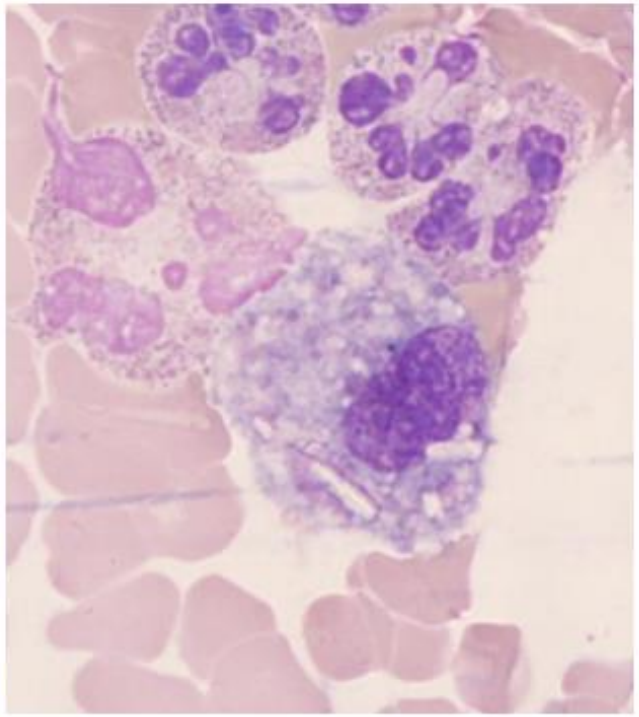


Cell / other found in body fluids

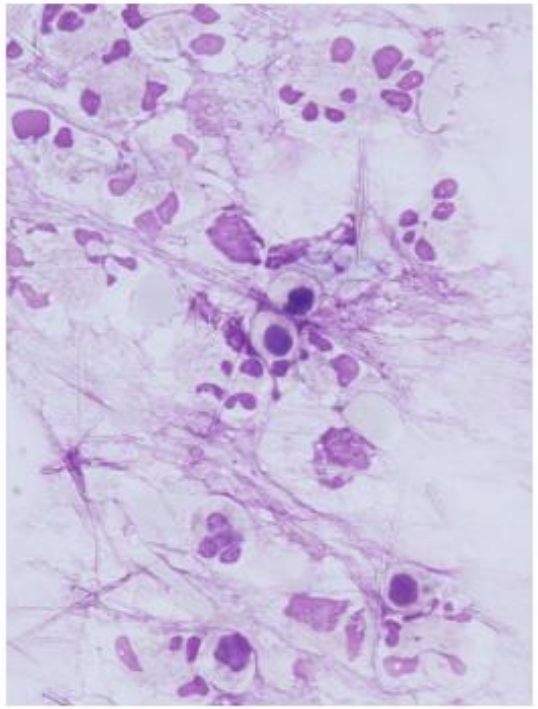
Crystals



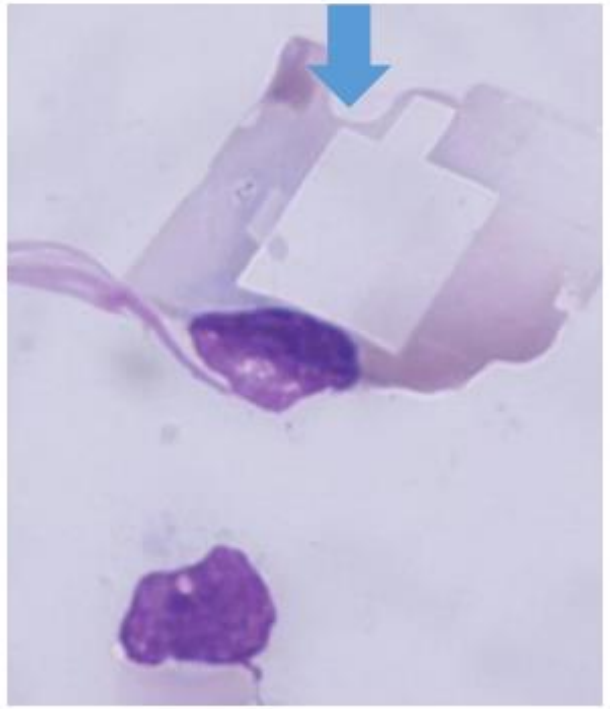
Hematoidin



CPPD



MSU



Cholestreol

Reactive mesothelial cell (benign) หรือ malignant cell

แนวทางการพิจารณา

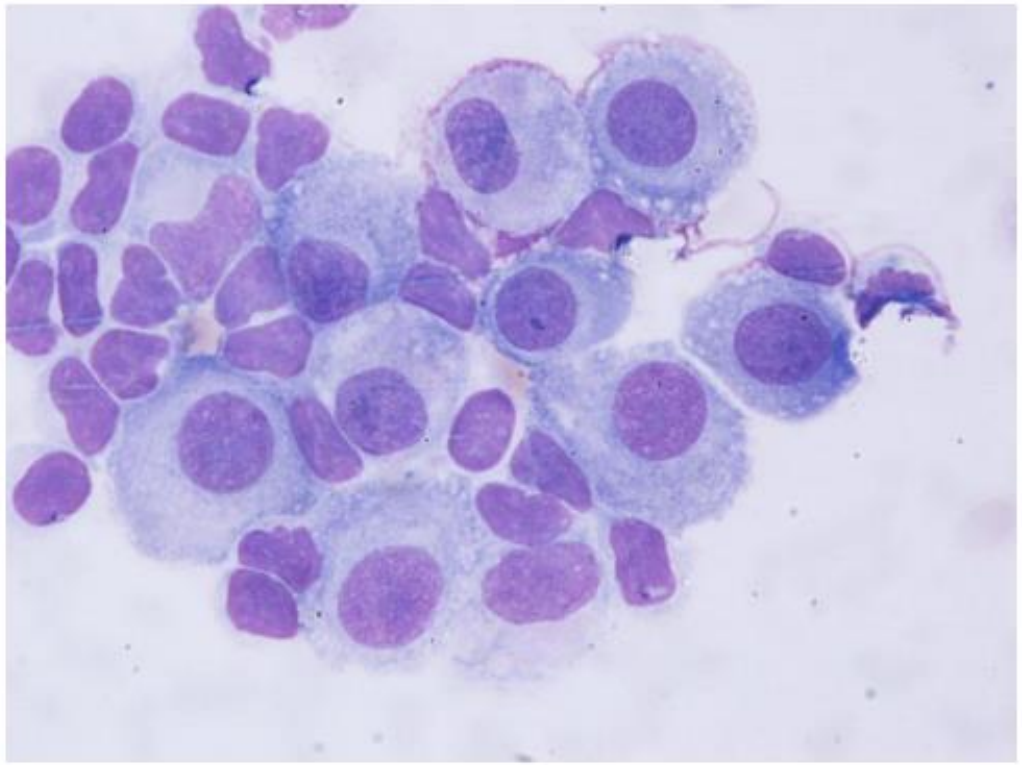
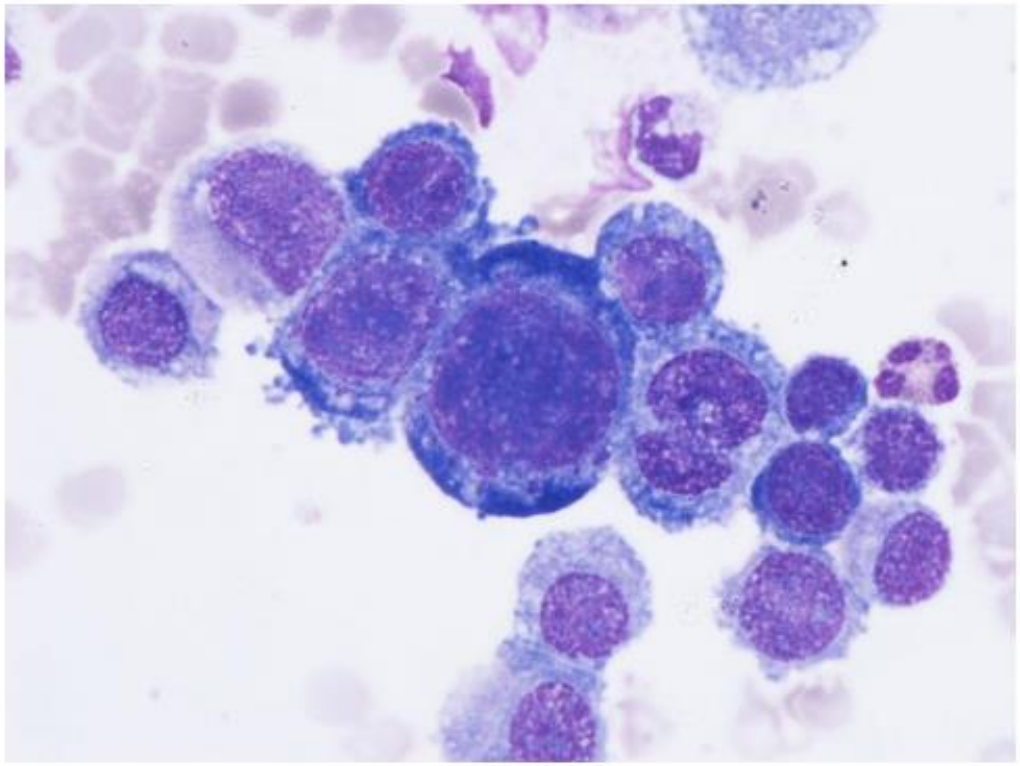
Benign

- ไม่ค่อยพบพบเซลล์ขนาดใหญ่
- เซลล์ติดสีตั้งแต่สีจางจนถึงเข้ม
- ไม่ค่อยพบ mitotic figures
- เซลล์มีนิวเคลียสกลม รี นิวเคลียสขนาดเท่าๆกัน และไซโทพลาซึมปริมาณแตกต่างกันไปบ้าง
- ขอบเขตนิวเคลียสมักเรียบ
- มีนิวคลิโอไลขนาดเล็ก
- ในกรณีที่เป็น mesothelial cell และมีนิวเคลียสหลายอัน นิวเคลียสจะมีขนาด รูปร่างคล้ายๆ กัน
- N/C ratio ปานกลางจนถึงน้อย
- กรณีที่เซลล์มีการเกาะกลุ่ม มักมีลักษณะคล้ายๆ กัน อยู่บนระนาบเดียวกัน อาจพบว่ามีช่องระหว่างเซลล์ (window)

Malignant

- พบเซลล์ขนาดใหญ่ได้บ่อยกว่า
- อาจพบว่าติดสีน้ำเงินเข้มมาก
- พบได้บ่อยว่ามี mitotic figure
- นิวเคลียสอาจมีรูปร่างไม่แน่นอน
- ขอบเขตนิวเคลียสอาจหยัก คอดเว้า
- อาจมีนิวคลิโอไลขนาดใหญ่ ชัดเจน
- เซลล์มักมีขนาด มีรูปร่างที่ไม่แน่นอน
- อาจมี N/C ratio สูงมาก
- เซลล์ที่มาเกาะกลุ่มกัน มักมีขนาด รูปร่างที่ไม่แน่นอน มีลักษณะเป็น 3 มิติ ไม่มีลักษณะของ window

Reactive mesothelial cells (benign) หรือ malignant cells

Benign	Malignant
	

Summary

Cells

Blood cells

.Mature cells
.Immature cells

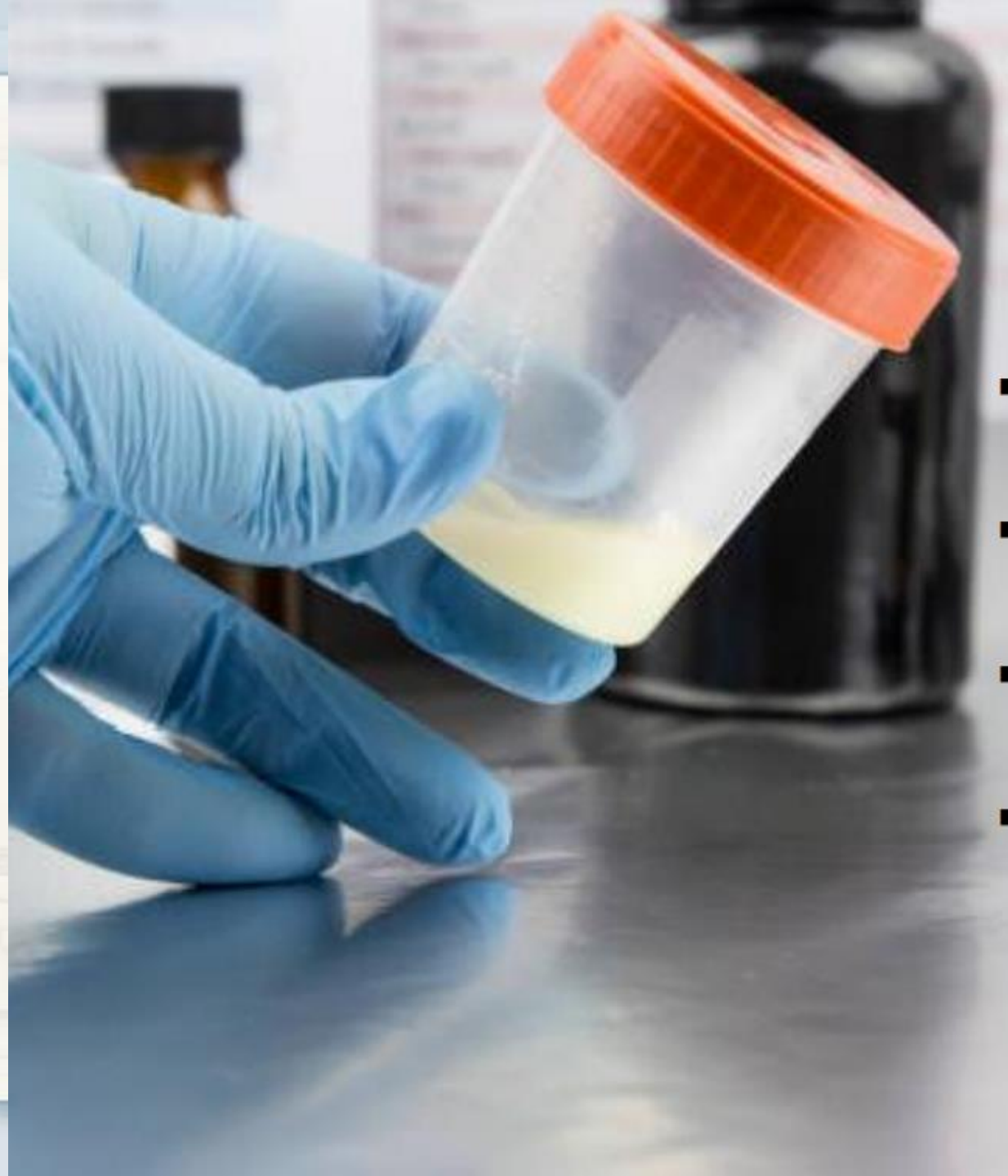
Non blood cells

.Mesothelial cells
.Malignant cell?

Other

.Intracelular
.Extracellular
- Crystals
- Bacteria
- Yeast
- Other

BASIC SEMEN EXAMINATION



SAMPLE COLLECTION

- The specimen container should be a clean, wide-mouthed container made of plastic, from a batch that has been confirmed to be non-toxic for spermatozoa.
- The container must be labelled with the man's name and identification number, the date and time of collection, or unique sample identifying numbers.
- Before ejaculate collection, the specimen container should be kept at ambient temperature, between 20 °C and 37 °C.

https://www.amazon.com/Dealmed-Specimen-Container-Resistant-Sterile/dp/B094W774CZ

SAMPLE RECEPTION

THE FOLLOWING INFORMATION SHOULD BE RECORDED

- Identity of the man (e.g. name and personal code number) and ideally his confirmation that the sample is his own.
- The period of prior ejaculatory abstinence
- The time of collection
- The completeness of the sample
- Ejaculate volume

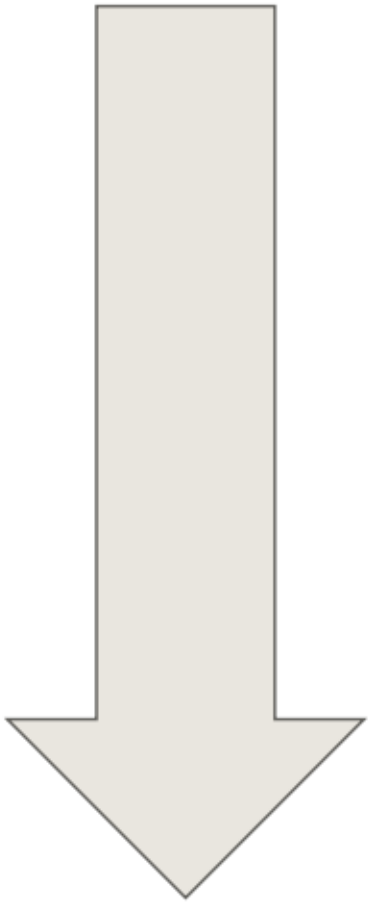
VOLUME BY WEIGHT

- The volume is best measured by weighing the sample in the container in which it has been collected.
- Use a pre-weighed container for collection of the ejaculate, with the weight noted on the container and lid.
- Weigh the container with the ejaculate in it.
- Subtract the weight of the empty container.
- Calculate the volume from the sample weight, assuming the density of semen to be 1 g/ml.

https://www.manotaro.co.th/p/68285078.html?utm_id=google_pla_th&gclid=CjwKCAiA0JKfBhBIEiwAPhZXD4Tz-0Sgk0ZitmPv4_-Qa_sdakjFz_S4A3QH-6p9riB_Y0j4gDGaUBoC02MQAvD_BwE

EXAMINATION PROCEDURES

BETWEEN 30 AND 60 MINUTES AFTER EJACULATE COLLECTION



- Assess liquefaction and macroscopic appearance.
- Measure semen pH.
- Prepare a wet preparation for assessing sperm motility.
- Assess sperm vitality (if the percentage of motile cells is low).
- Make dilutions for assessing sperm concentration.
- Make smears for assessing sperm morphology.

EXAMINATION PROCEDURES

WITHIN 3 HOURS OF EJACULATE COLLECTION

- Sperm concentration
- Sperm morphology.

MACROSCOPIC APPEARANCE

https://medicallabnotes.com/tag/semen-analysis/

- A normal liquefied ejaculate has a macroscopically homogeneous, cream/grey-opalescent appearance.
- slightly yellowish after longer abstinence times
- red-brown when red blood cells are present (haemospermia)
- yellow in a patient with jaundice or taking certain vitamins or drugs

LIQUEFACTION

- The ejaculate is typically a semi-solid coagulated mass or a gel-like clump.
- As liquefaction continues, the ejaculate becomes more homogeneous and waterier but still with a higher viscosity than water.
- Complete ejaculate liquefaction is normally achieved within 15–30 minutes at room temperature.
- A temperature of 37 °C will facilitate liquefaction.
- Swirling movement of the sample container will help liquefaction to complete.

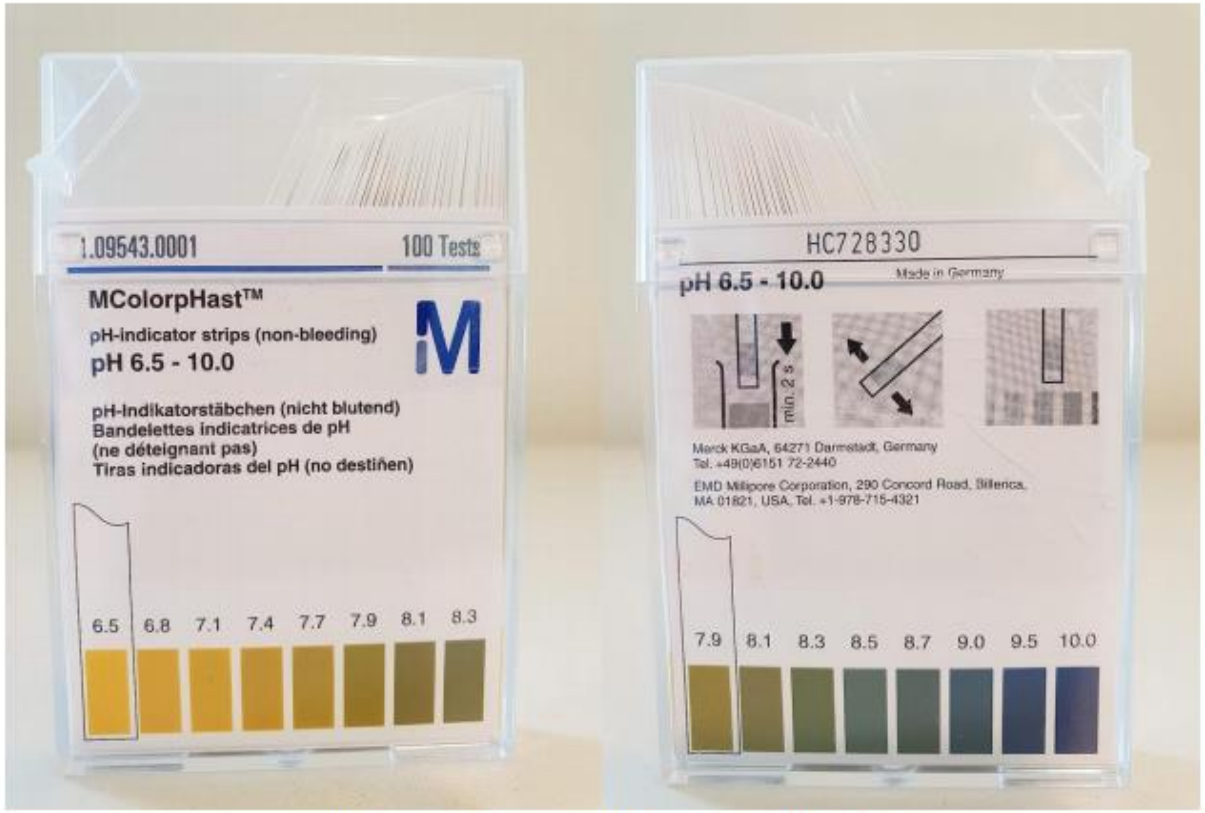
EJACULATE VISCOSITY

- After liquefaction, the viscosity of the ejaculate can be estimated by gently aspirating it into a wide-bore plastic disposable pipette.
- Allow the semen to drop by gravity and observing the length of any thread.
- A normal liquefied ejaculate falls as small discrete drops.
- If viscosity is abnormal, the drop will form a thread more than 2 cm long.

https://www.youtube.com/watch?v=EnYbcMIPsAg

EJACULATE pH

- It should be done at a uniform time, preferably 30 minutes after collection.
- Normal pH of semen is slightly alkaline (7.2-8.8).



https://www.amazon.de/-/en/Merck-pH-indicator-sticks-5-10/dp/B07LBV33P2

MAKING A WET PREPARATION

- Place a 10 µl well-mixed aliquot onto a clean microscope slide.
- Place a 22 mm × 22 mm coverslip by dropping it carefully horizontally over the drop.
- Assess the freshly made wet preparation as soon as the contents are no longer drifting.

SPERM MOTILITY

CATEGORIES OF SPERM MOVEMENT

- Rapidly progressive (25 µm/s) – spermatozoa moving actively, either linearly or in a large circle, covering a distance, from the starting point to the end point, of at least 25 µm (or 1/2 tail length in one second)
- Slowly progressive (5 to < 25 µm/s) – spermatozoa moving actively, either linearly or in a large circle, covering a distance, from the starting point to the end point, of 5 to < 25 µm (or at least one head length length in one second)
- Non-progressive (< 5 µm/s) – all other patterns of active tail movements with an absence of progression
- Immotile – no active tail movements

SPERM MOTILITY

- It can be done at lower magnification (100–200× total magnification).
- Assess approximately 200 spermatozoa per replicate.

SPERM VITALITY

- It is not necessary when at least 40% of spermatozoa are motile.
- The vitality test is important to discriminate between immotile dead sperm and immotile live sperm.
- The presence of a large proportion of live but immotile cells may be indicative of structural defects in the flagellum.
- High percentage of immotile and dead cells may indicate epididymal pathology or an immunological reaction due to an infection.

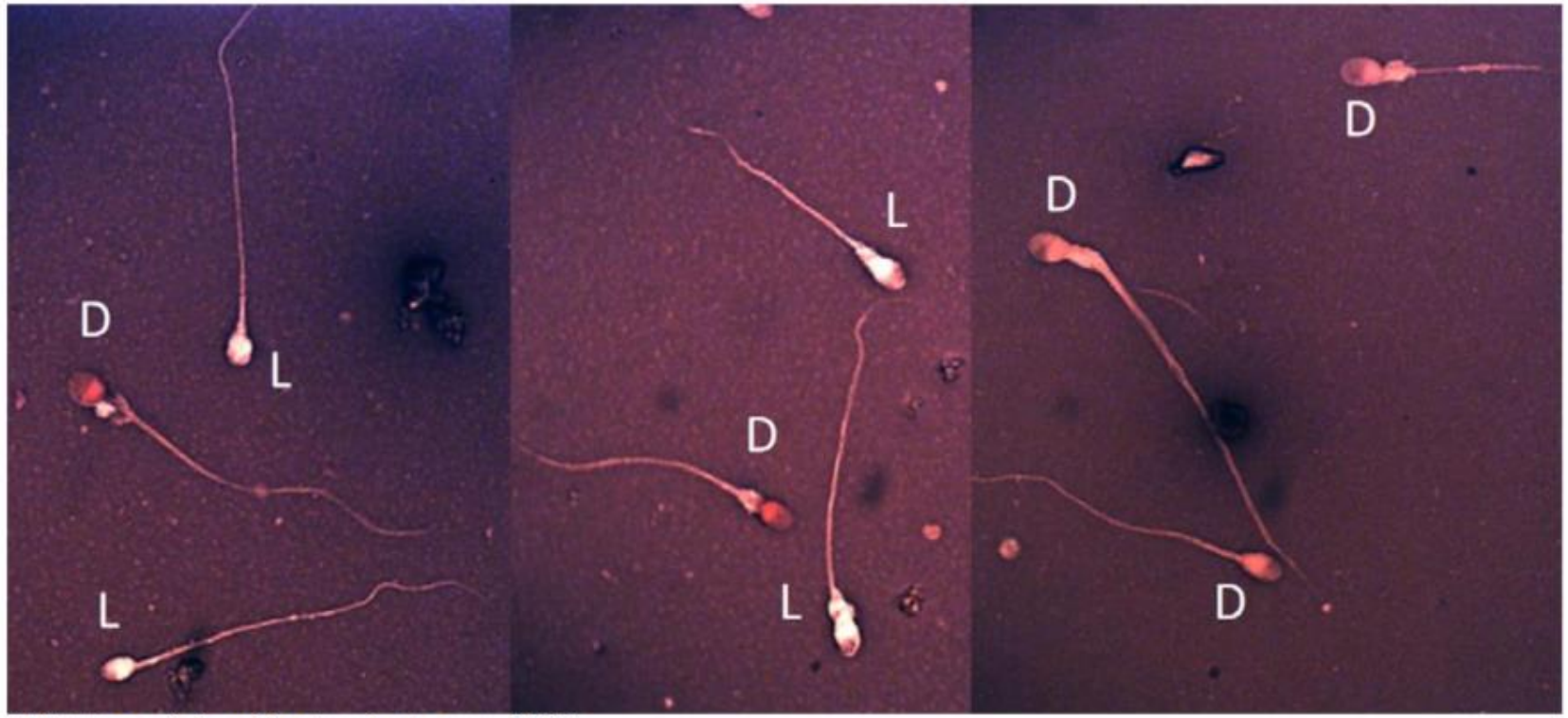
SPERM VITALITY

- Live spermatozoa is assessed by identifying those with an intact cell membrane, by dye exclusion or hypotonic swelling.
- Dead cells have damaged plasma membranes that allow entry of membrane-impermeant stains.
- The recommended test for diagnostic use is the eosin–nigrosin test.
- Sperm vitality should be assessed as soon as possible after liquefaction of the semen sample, preferably at 30 minutes.

VITALITY TEST USING EOSIN–NIGROSIN

Fig. 2.4 Eosin–nigrosin smear observed in brightfield optics

Spermatozoa with red or dark pink heads are considered dead (D), whereas spermatozoa with white heads (L) are considered alive.



WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

- Examine the slide with brightfield optics at ×1000 magnification and oil immersion.
- Evaluate at least 200 spermatozoa.
- Spermatozoa with a faint pink head staining are assessed as dead.

COUNTING SPERMATOZOA

- The number of spermatozoa in the ejaculate is calculated from the concentration of spermatozoa and the ejaculate volume.
- Choose the most appropriate dilution from examination of the wet preparation.
- Prepare dilutions by mixing exact volumes of ejaculate and fixative (sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)).
- Examine by using counting chamber (hemocytometer).
- Load the hemocytometer chamber and leave it in a humid chamber.
- Count at least 200 spermatozoa per replicate.
- Calculate the concentration in spermatozoa per ml.
- Calculate the number of spermatozoa per ejaculate.

COUNTING SPERMATOZOA

Table 2.1 Sufficient volumes of ejaculates – final volumes of diluted sperm suspensions for adequate handling

Spermatozoa per ×400 field	Spermatozoa per ×200 field	Dilution	Ejaculate (µl)	Fixative (µl)
> 200	> 800	1 : 50 (1 + 49)	50	2 450
40–200	160–800	1 : 20 (1 + 19)	50	950
16–40	64–160	1 : 10 (1+ 9)	50	450
2–15	8–64	1 : 5 (1 + 4)	50	200
< 2	< 8	1 : 2 (1 + 1)	100	100

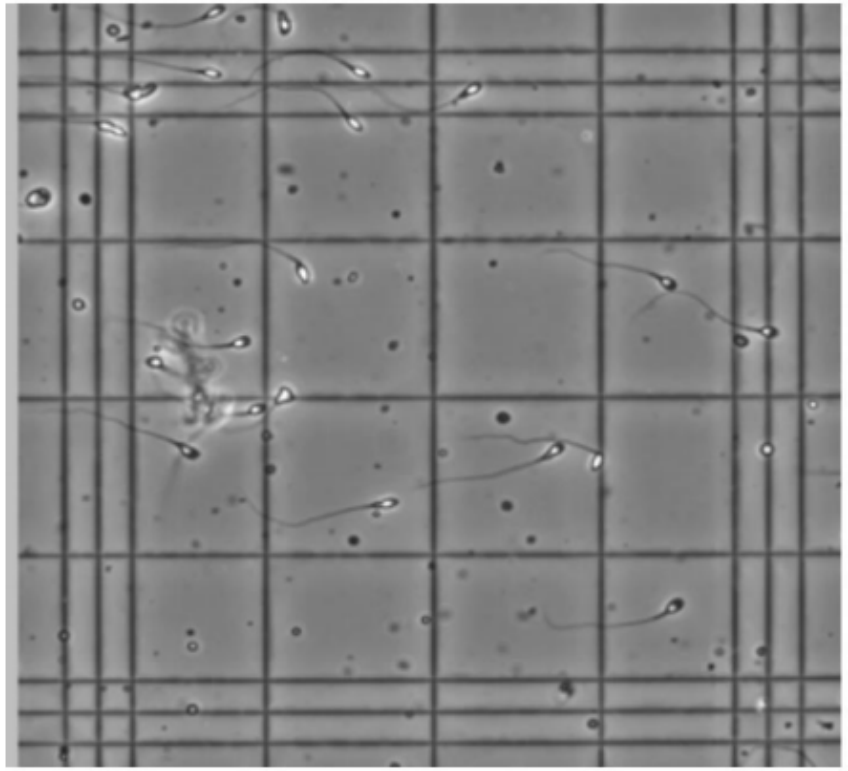
WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

COUNTING SPERMATOZOA

- First assess the upper left large square in the central grid of one side of the chamber.

- Use this number to decide how many large squares of the central grid to assess:

  - < 10 spermatozoa: count the whole grid (25 large squares)
  - 10–40 spermatozoa: count 10 large squares
  - > 40 spermatozoa: count 5 squares



WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

SPERM MORPHOLOGY

- The criteria presented here were developed from investigations of the morphology of spermatozoa able to penetrate cervical mucus and bind to the zona pellucida.
- The practical evaluation of human sperm morphology comprises the following steps:
  - Preparing a smear of ejaculate on a slide
  - Air-drying, fixing and staining the slide
  - Examining the slide with bright field optics at ×1000 magnification with oil immersion
  - Assessing approximately 200 spermatozoa

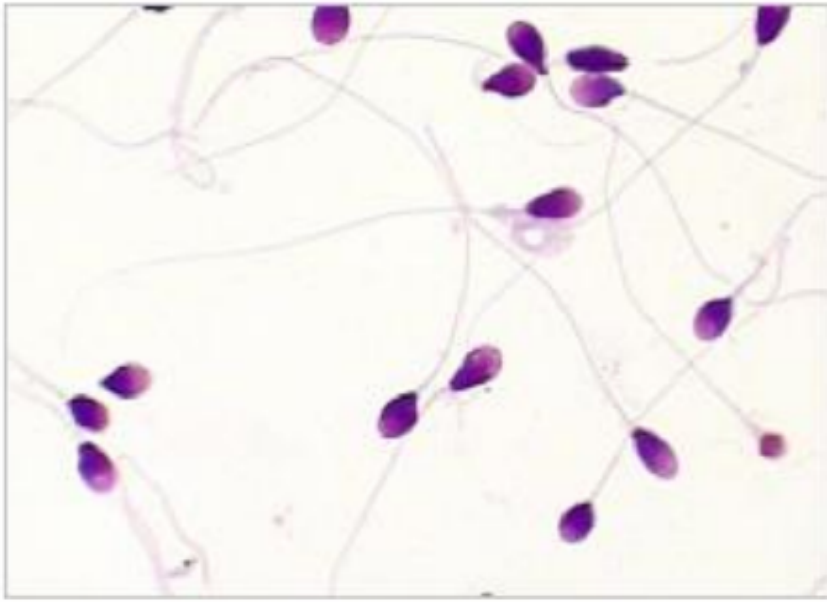
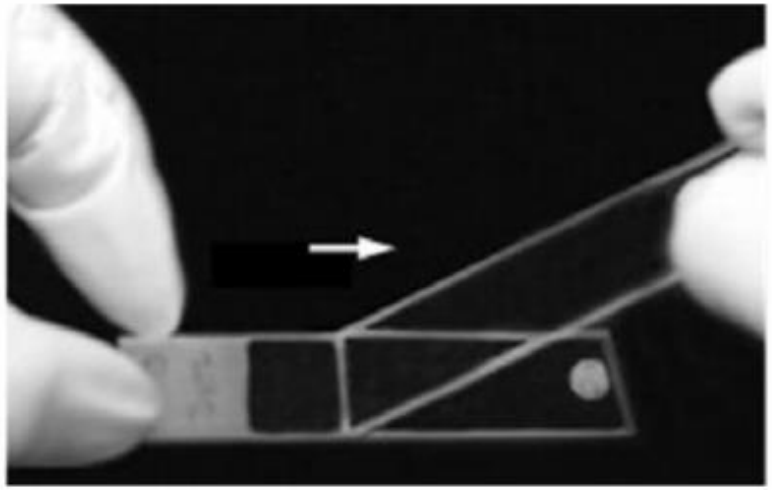
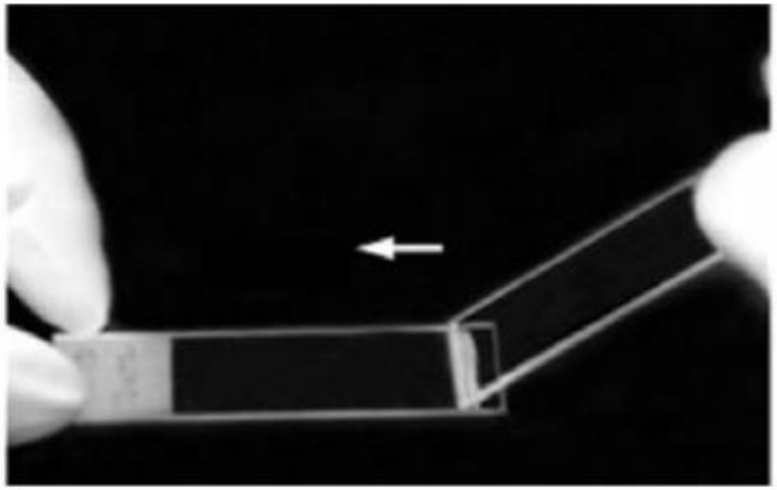


Fig. 2.9 Preparing a normal semen smear

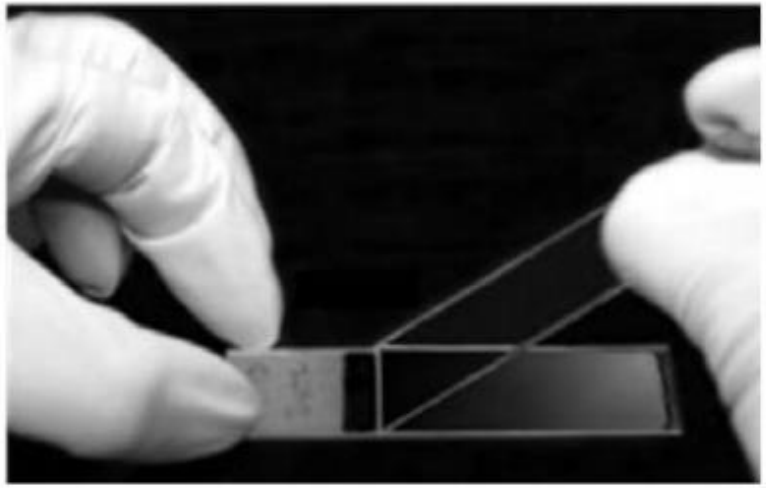
To get the feel for the motion, place the dragging slide at an angle of 45° and move it into contact with the aliquot of semen *(a)*, which runs along the edge of the slide *(b)*. Bring the dragging slide slowly back (over approximately 1 second) along the length of the slide to produce the smear (c).



(a)



(b)



(c)

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

SPERM MORPHOLOGY

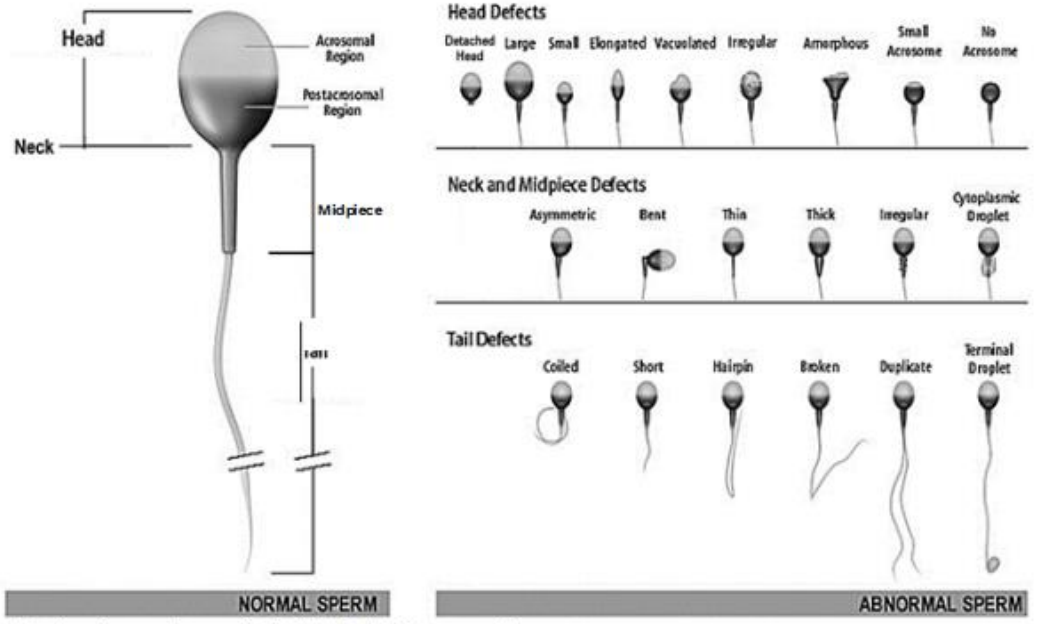
STAINING

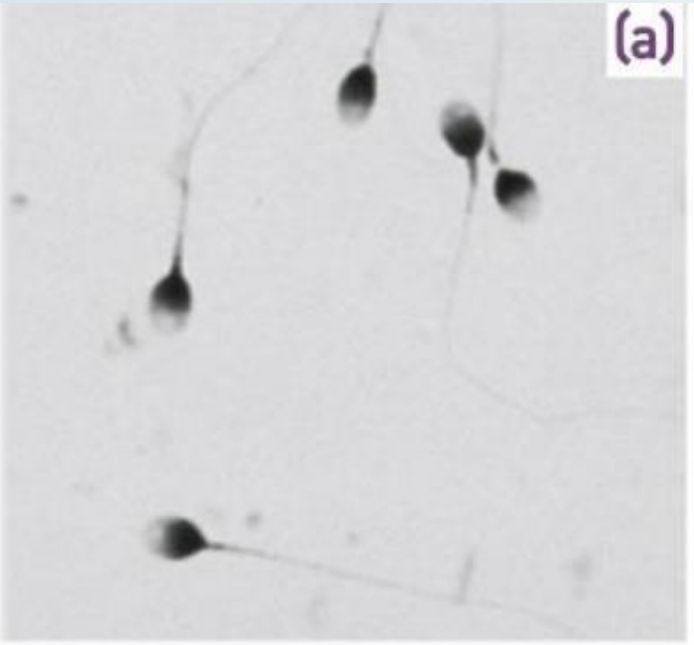
- The Papanicolaou, Diff-Quick or Shorr stains can be used.
- The use of Papanicolaou staining is recommended.
- Papanicolaou staining gives the best overall visibility of all regions of the human spermatozoon.

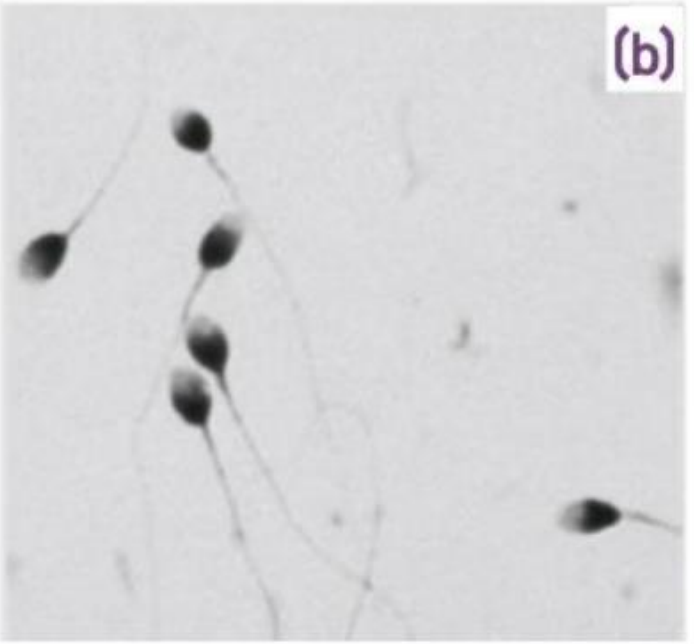
Table 2.6 Classification of sperm morphology

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

Location	Normal (ideal/typical) appearance	Abnormal
Head	The head should be smooth, regularly contoured and generally oval in shape. There should be a well-defined acrosomal region comprising 40–70% of the head area (96). The acrosomal region should contain no large vacuoles, and not more than two small vacuoles, which should not occupy more than one fifth of the sperm head. The post-acrosomal region should not contain any vacuoles.	• acrosome less than 40% or larger than 70% of a normal head area, or • length-to-width ratio less than 1.5 (round) or larger than 2 (elongated), or • shape: pyriform (pear shaped), amorphous, asymmetrical, or non-oval shape in the apical part, or • vacuoles constitute more than one fifth of the head area or located in the post-acrosomal area, or • double heads, or • any combinations

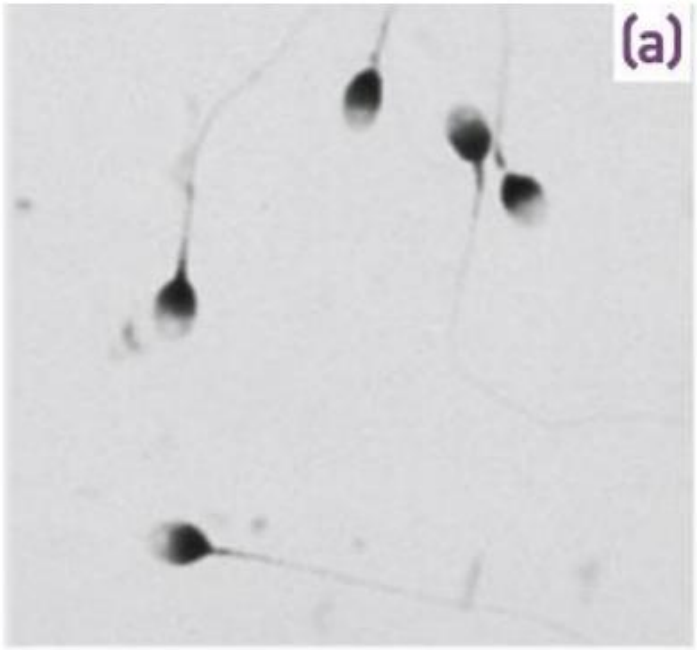






Midpiece	The midpiece should be slender, regular and about the same length as the sperm head. The major axis of the midpiece should be aligned with the major axis of the sperm head.	• irregular shape, or • thin or thick, or • asymmetrical or angled insertion at head, or • sharply bent, or • any combinations
Tail	The principal piece should have a uniform calibre along its length, be thinner than the midpiece and be approximately 45 µm long (about 10 times the head length). It may be looped back on itself, provided there is no sharp angulation indicative of a broken flagellum.	• sharply angulated bends, or • smooth hairpin bends, or • coiled, or • short (broken), or • irregular width, or • multiple tails, or • any combinations
Cytoplasmic residue	Cytoplasmic droplets (less than one third of a normal sperm head size) are normal.	• residual cytoplasm is considered an anomaly only when it exceeds one third of normal sperm head size

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition



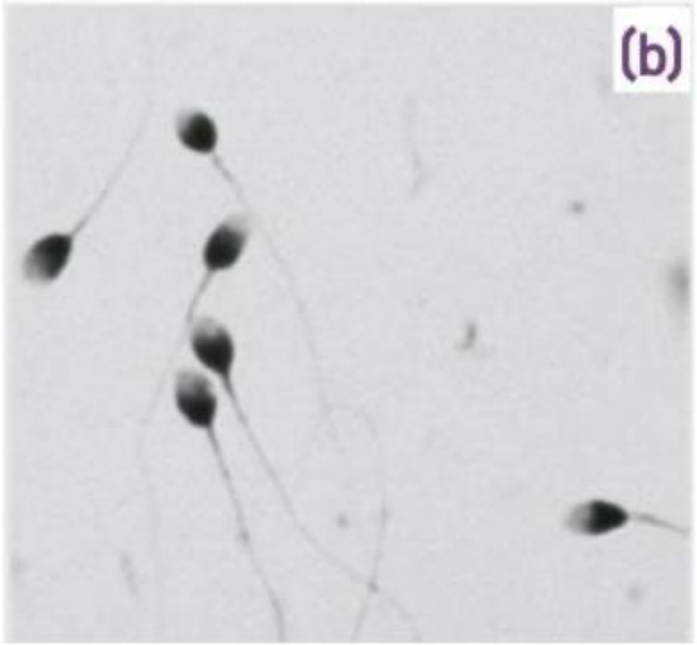
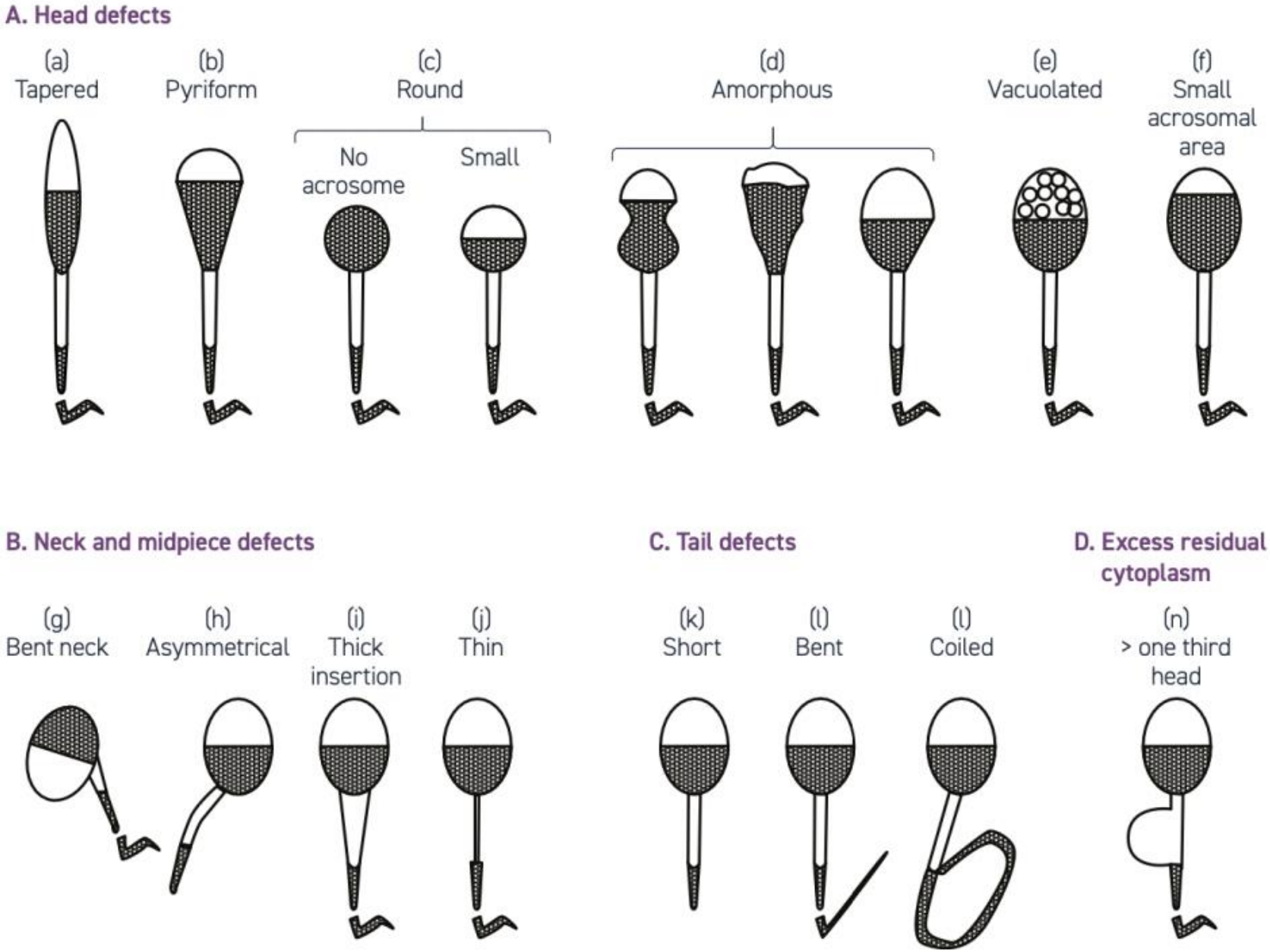


Fig. 2.10 Schematic drawings of some abnormal forms of human spermatozoa



WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition

Categories of sperm abnormalities

The categories, or regions, of interest are:

- head (%H)
- neck and midpiece (%NM)
- tail (%T)
- excess residual cytoplasm (%C).

Semen analysis

Parameters	Reference values
Semen Volume (ml)	≥ 1.4
Sperm concentration (10^6 per ml)	≥ 15
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	≥ 39
Progressive motility (PR, %)	≥ 30
Total motility (PR+NP, %)	≥ 42
Viability (live spermatozoa, %)	≥ 54
Sperm morphology (Normal forms, %)	≥ 4

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2021 (6th edition)

SEMEN NOMENCLATURE

Azoospermia	**No sperm in ejaculate**
Oligozoospermia	Total number / concentration of sperm below reference limit
Asthenozoospermia	% progressive motile sperm below reference limit
Teratozoospermia	% morphologically normal sperm below reference limit
Oligoasthenozoospermia	Total number / concentration of sperm and % progressive motility below reference limit
Oligoteratozoospermia	Total number / concentration of sperm and % normal morphology below reference limit
Asthenoteratozoospermia	% progressive motile sperm and % normal morphology below reference limit
Oligoasthenoteratozoospermia	Total number / concentration of sperm, % progressive motility and % normal morphology below reference limit

https://www.cambridge.org/core/books/subfertility-reproductive-endocrinology-and-assisted-reproduction/semen-analysis-and-sperm-function-tests/C77B1A2E2A27136037FD3BC34C26F30E

Normozoospermia: Normal semen
Aspermia: Absence of semen

ตัวอย่างใบรายงานผล

Semen analysis

Sample No. .....

Appearance O Normal O Viscous O Gel, clump O Liquefied O Delay liquefied

remark.....

Volume .....mL (≥ 1.4 mL) **pH** ..... (7.2 – 8.8)

Motility Progressive motility .....% (≥ 30%)

Total motility .....% (≥ 42%)

Viability .....% (≥ 54%)

Sperm count .....x 10^6/mL (≥ 15 x 10^6/mL)

Total sperm count .....x 10^6/ejaculate (≥ 39 x 10^6/ejaculate)

Sperm morphology Normal .....% (≥ 4%)

Abnormal .....%

- Head defect .....%
- Neck and midpiece defect .....%
- Tail defect .....%
- Cytoplasmic droplet present .....%

แปลผลการตรวจ semen analysis ตามรูปแบบของ semen nomenclature

ผู้จัดทำ: นายภัทรพงษ์ ผลาผล | วันที่ 24 มิถุนายน 2569