3

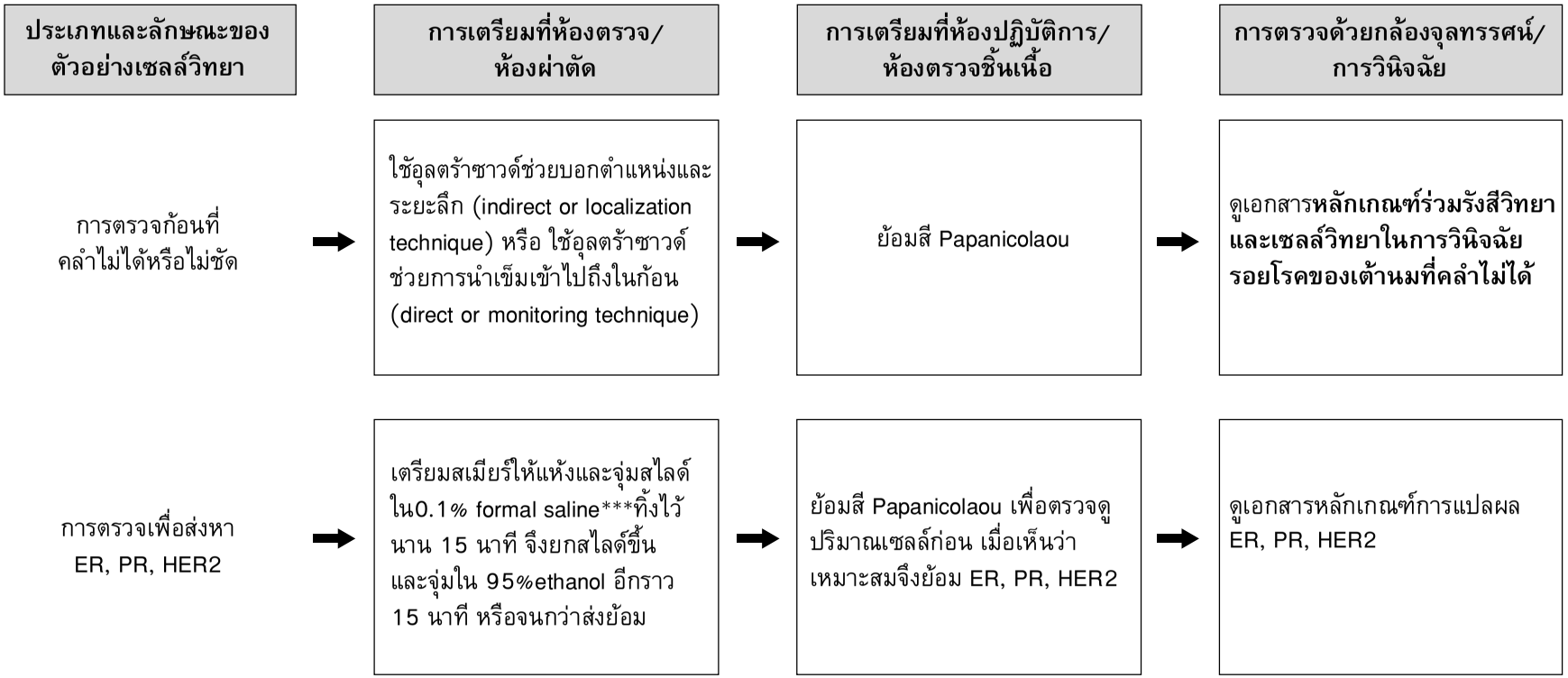
แนวทางการวินิจฉัย ทางพยาธิวิทยาในมะเร็งเต้านม

ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์แห่งประเทศไทย
คณะอนุกรรมการผู้จัดทำ

นพ.พิเชฐ สัมปทานุกุล
นพ.นิพนธ์ ประดิษฐพล
นพ.พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์
พญ.ภาวินี สุวรรณกูล
นพ.อนันต์ กรลักษณ์
นพ.ทรงคุณ วิญญูวรรธน์
พญ.เบญจพร ไชยวรรณ์
พ.ท.ไพสิฐ เพือกสกนธ์
พญ.ศันสนีย์ วงศ์ไวศยวรรณ
พญ.วรนุช ธนากิจ

แผนภูมิการเตรียมและการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาในมะเร็งเต้านม

ประเภทและลักษณะของตัวอย่างเซลล์วิทยา	การเตรียมที่ห้องตรวจ/ห้องผ่าตัด	การเตรียมที่ห้องปฏิบัติการ/ห้องตรวจชิ้นเนื้อ	การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์/การวินิจฉัย
สิ่งเจาะดูดจากก้อนเนื้อ →	สเมียร์บนสไลด์ จุ่มสไลด์ใน 95% ethanol* ทันที หรือพ่นด้วยสเปรย์สำหรับคงสภาพเซลล์**	→ ย้อมสี Papanicolaou (ในกรณีใช้สเปรย์ ต้องแช่ใน 95% ethanol 2 ครั้ง ก่อนย้อมสี Papanicolaou)	→ ดูเอกสาร**แนวทางการอ่านเซลล์วิทยาและรายงานผลสิ่งเจาะดูดจากเต้านมอย่างเป็นระบบ**
สิ่งเจาะดูดจากถุงน้ำ →	ดูดน้ำจนหมด ตรวจซ้ำเจาะดูดซ้ำหากยังมีรอยโรคคลำได้	→ ปั่นสารน้ำเพื่อทำสเมียร์/กรณีที่เป็นเลือดเก่าปน ควรเตรียมสเมียร์ไว้หลายๆ แผ่น/ควรให้ความสำคัญกับสิ่งเจาะดูดซ้ำด้วย/ย้อมสี Papanicolaou	→ การวินิจฉัย Positive, Suspicious or Negative for malignant cells หรือ Carcinoma with cystic feature/ Cyst with atypical cells/Cyst with apocrine/Benign gross cyst
สิ่งคัดหลั่งจากหัวนม →	เช็ดคราบที่หัวนมด้วยน้ำเกลือนอร์มัล/ป้ายสิ่งคัดหลั่งบนสไลด์และจุ่มสไลด์ทันทีใน 95% ethanol /ป้ายสไลด์จำนวนมากๆ ราว 6 แผ่นต่อการตรวจ	→ ย้อมสี Papanicolaou	→ การวินิจฉัย Malignant cells seen/ Suggestive papilloma or papillary tumor/ Negative for malignancy



สูตรน้ำยา

* *95% ethanol - ซื้อสำเร็จรูป จากองค์การเภสัชกรรม หรือกรมสรรพสามิต*

** *spray fixatives (สารคงสภาพในสเปรย์) - ที่มีผลิตจำหน่าย คือ cell-Fixx ของ ThermoShandon, S.B.Spray-Fixx ของ บริษัท เอส บี พยาธิแลบ*

*** *สูตร 0.1% formal saline - ส่วนผสมคือ NaCl 9 g, Distill water 1,000 ml และ 100% formalin (37%-40% formaldehyde solution) 2.5 ml*

ประเภทและลักษณะของตัวอย่างชิ้นเนื้อ	การเตรียมที่ห้องตรวจ/ห้องผ่าตัด	การเตรียมที่ห้องปฏิบัติการ/ห้องตรวจชิ้นเนื้อ	การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์/การวินิจฉัย
แท่งชิ้นเนื้อเจาะตัดด้วยเข็ม (core needle biopsy)/ Mammotome/ตัดชิ้นเนื้อบางส่วนของเนื้องอก (incisional biopsy)	ถ่ายภาพเอ็กซ์เรย์ของชิ้นเนื้อ (กรณีมี microcalcifications)/ วางแท่งชิ้นเนื้อในบล็อก (ถ้ามี)/ นับจำนวนชิ้น/แช่ใน 10% ฟอร์มาลิน*	นับจำนวนชิ้น/ใส่ทั้งหมดลงในบล็อก/ไม่ควรใส่แท่งเนื้อเกิน 3 ชิ้นต่อ 1 บล็อก	วินิจฉัยโรค/ระบุพบหรือไม่พบ microcalcifications
ผ่าตัดก้อน (excision)/ ผ่าตัดก้อนและเนื้อเยื่อรอบๆ (wide excision)/ผ่าตัดก้อนโดยเข็มนำทาง (needle guided wide excision) (ทั่วไป, ไม่ระบุ)	ใช้เชือกผูกทำเครื่องหมายที่ชิ้นเนื้อบอกด้านต่างๆ หรือด้านที่สนใจ แช่ใน 10% ฟอร์มาลิน*	ทำความเข้าใจกับด้านต่างๆ ของชิ้นเนื้อก่อนทำการตัด/ink ขอบและวัดระยะห่างของด้านที่ชิดขอบก้อนมากที่สุด	วินิจฉัยโรค/ระบุภาวะของด้านที่อยู่ชิดขอบก้อนมากที่สุด อาจบอกระยะห่างโดยวัดในกล้องจุลทรรศน์
ผ่าตัดก้อนและเนื้อเยื่อรอบๆ (wide excision)/ผ่าตัดก้อนโดยเข็มนำทาง (needle guided wide excision) (ระบุเพื่อการรักษาแบบสงวนเต้านม)	ควรถ่ายภาพเอ็กซ์เรย์ของชิ้นเนื้อ ใช้เชือกผูกทำเครื่องหมายที่ชิ้นเนื้อบอกด้านต่างๆ ก่อนแช่ใน 10% ฟอร์มาลิน* (ต้องบรรยายหรือวาดรูปเพื่อบอกด้านทั้ง 6 ด้านชัดเจน)	ทำความเข้าใจกับด้านต่างๆ ของชิ้นเนื้อก่อนทำการตัด/ink ขอบและวัดระยะห่างของขอบก้อนถึงขอบเนื้อผ่าตัดทั้ง 6 ด้าน	วินิจฉัยโรค/ระบุภาวะของด้านทั้ง6 ด้าน และวัดระยะห่างจากขอบเนื้อมะเร็งถึงขอบเนื้อผ่าตัด/ระบุสิ่งที่สัมพันธ์กับภาพถ่ายเอ็กซ์เรย์

ประเภทและลักษณะของตัวอย่างชิ้นเนื้อ	การเตรียมที่ห้องตรวจ/ห้องผ่าตัด	การเตรียมที่ห้องปฏิบัติการ/ห้องตรวจชิ้นเนื้อ	การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์/การวินิจฉัย
ผ่าตัดเต้านม (mastectomy) →	ควรผ่าครึ่งเต้านมเพื่อให้ fixation ดี /แช่ 10% ฟอร์มาลิน*ในปริมาตรที่มากกว่าเนื้อนม 10 เท่า/ควรวาดภาพแสดงทิศทางการวางตัวของผิวหนังวงรีของเต้านมที่ผ่าออกมาในใบส่งตรวจ →	ดูเอกสารแนวทางการตรวจเนื้อผ่าตัดเต้านมในส่วน macroscopy →	วินิจฉัยโรค/บอกชนิดของมะเร็ง, เกรด, ขนาดของก้อน, และภาวะของขอบด้านล่างของเต้านม/(ดู**แนวทางการตรวจเนื้อผ่าตัดเต้านม** ในส่วน microscopy and diagnosis)
ผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ (axillary dissection) →	อาจแยกต่อมน้ำเหลืองออกมาให้หรือส่งเนื้อเยื่อทั้งอันจากรักแร้/แช่ใน 10% ฟอร์มาลิน* →	ดูเอกสารแนวทางการตรวจเนื้อผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ →	รายงานจำนวนต่อมน้ำเหลืองทั้งหมดและจำนวนต่อมน้ำเหลืองที่มีมะเร็ง
การตรวจ ER, PR, HER2 →	ใช้เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่แช่ใน 10% ฟอร์มาลิน* (ไม่ควรใช้เนื้อเยื่อที่แช่ในฟอร์มาลินนานเกิน 3 วัน) หรือ ใช้บล็อกพาราฟินที่รักษาสภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อดี →	เนื้อเยื่อมีมะเร็ง invasive carcinoma component/การรักษาการคงสภาพของเนื้อเยื่อ (fixation) ได้มาตรฐาน →	ดูเอกสารหลักเกณฑ์การแปลผล ER, PR, HER2

สูตรน้ำยา

** 10% neutral buffered formalin - Sodium phosphate monobasic (NaH_2PO_4) 4 g, Sodium phosphate dibasic (anhydrous) 6.5 g, Distill water 900 ml และ 100 % formalin (37%-40% formaldehyde solution) 100 ml*

แนวทางการอ่านเซลล์วิทยาและรายงานผลสิ่งเจาะดูดจากเต้านมอย่างเป็นระบบ

นพ.พิเชฐ สัมปทานุกุล

องค์ประกอบของการวินิจฉัย

- **การอ่านสเมียร์**
- **การแปลผล**
- **การรายงานผล**
- **การตรวจสอบคุณภาพ**

บทนำ

การวินิจฉัยตัวอย่างทางเซลล์วิทยาเป็นหนึ่งใน triple test ซึ่งใช้ในการพิจารณาแนวทางการดูแลรักษารอยโรคของเต้านม โดยร่วมกับการวินิจฉัยเงาภาพทางรังสีวิทยาและข้อมูลทางคลินิก

แพทย์ซึ่งดูแลผู้ป่วยจึงควรพิจารณารายงานผลเซลล์วิทยาร่วมกับภาพทางรังสีวิทยาและลักษณะทางคลินิก[1] โดยมีแนวทางดังนี้

Post-triple test recommendation

Triplet categories	Follow-up
Benign triplets	Follow clinically with return visit within 6 months
Malignant triplets	Refer for definitive therapy or Refer for definite therapy following frozen section confirmation of diagnosis
Malignant cytologic diagnosis	Refer for definitive therapy following frozen section or permanent section confirmation of the diagnosis at the discretion of the attending pathologist
Mixed or inconclusive triplets	Perform excisional biopsy of the index nodule

ระบบการรายงานผลของการเจาะดูดทางเซลล์วิทยาเต้านมมีความแตกต่างกันระหว่างระบบอเมริกากับระบบยุโรป แต่หลักการคล้ายคลึงกัน ระบบของอเมริกา[1] จะให้รายงานแบบบรรยาย และสรุปลงไปที่หมวดใดหมวดหนึ่งใน 5 หมวด (ไม่มีการใช้รหัส ให้ใช้ข้อความ) ได้แก่ benign ; atypical/ indeterminate ; suspicious, probably malignant ; malignant และ unsatisfactory (due to.....) สำหรับระบบของยุโรปซึ่งรวมอังกฤษเรียกเป็นระบบรหัส หรือ C1-5[2] โดยเริ่มจาก C1 หมายถึง insufficiency ; C2 หมายถึง Benign ; C3 หมายถึง Atypical, probably benign ; C4 หมายถึง Suspicious, probably in situ carcinoma or malignant และ C5 หมายถึง Malignant

ในประเทศไทยนิยมใช้ตามแบบอเมริกา คือเป็นการรายงานโดยใช้ข้อความ ไม่ใช้รหัส อย่างไรก็ตามระบบรหัสมีข้อดีคือใช้ในการสื่อสารได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการตรวจประเมินคุณภาพ และการเทียบเคียงกับทางรังสีวิทยา[3] ที่นิยมใช้เป็นระบบรหัสทั้งอเมริกาและยุโรป

ในประเทศไทยมีปัญหาการขาดแคลนพยาธิแพทย์ที่เฉพาะทางด้านเซลล์วิทยาเต้านม ผู้เขียนจึงขอนำเสนอการวินิจฉัยที่มีการแยกมิติออกมาให้มองเห็นเป็นส่วนๆ ซึ่งจะทำให้ง่ายแก่การเข้าใจ สามารถใช้ในการฝึกอบรม และเห็นบทบาทที่แยกกันของนักเซลล์วิทยากับพยาธิแพทย์

ในการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยา มีองค์ประกอบหรือมิติที่แยกได้เป็น 3 ส่วน คือ การอ่านสเมียร์ การแปลผล และการรายงานผล แต่ละส่วนมีความสำคัญและรายละเอียดในการสื่อสารเพื่อให้เข้าใจตรงกัน นอกจากนี้ควรมีระบบการตรวจสอบคุณภาพด้วยตนเองเพื่อให้ผลการวินิจฉัยมีความถูกต้องมากที่สุด

ในทางปฏิบัติ นักเซลล์วิทยาช่วยอ่านสเมียร์ได้โดยการกำกับของแพทย์ แต่การแปลผล ควรต้องเป็นพยาธิแพทย์ที่มีประสบการณ์ การรายงานผลมีส่วนของความมั่นใจรวมอยู่ด้วย จึงต้องมีการใช้ข้อความในการวินิจฉัยที่เหมาะสม

การอ่านสเมียร์

ความสำคัญ การอ่านสเมียร์เป็นส่วนแรก สามารถให้ผู้ช่วยหรือนักเซลล์วิทยาทำแทนพยาธิแพทย์ได้ ทั้งนี้ เพื่อให้เป็นแนวทางเดียวกัน และไม่ให้เกิดความสับสน จึงเสนอหลักเกณฑ์ในการอ่านและการบันทึกผลการอ่านเซลล์วิทยาของเต้านมอย่างเป็นระบบขึ้น

ระบบของการอ่าน

อ่าน และบันทึกผล ตามลำดับ ดังนี้

1. คุณลักษณะและปริมาณของสิ่งเจาะดูดที่เห็นด้วยตา
2. การประเมินปริมาณเซลล์และพื้นหลังสเมียร์ ที่เห็นจากกำลังขยายต่ำ
3. การตรวจเซลล์ที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว
4. การตรวจเซลล์ที่อยู่เป็นกลุ่ม
5. การตรวจพื้นหลังสเมียร์

รายละเอียด

1. คุณลักษณะและปริมาณของสิ่งเจาะดูดที่เห็นด้วยตา

1.1 บันทึกว่าสิ่งเจาะดูดที่ได้รับเป็นน้ำ น้ำปนเลือด หรือ เป็นสเมียร์

1.2 กรณีเป็นน้ำ หรือน้ำปนเลือด ให้บันทึกปริมาตรเป็นมิลลิลิตร และนำไปปั่นเพื่อทำเป็นสเมียร์ต่อไป

1.3 การประเมินปริมาณของสเมียร์ ให้ใช้วัดตามยาว โดยเกณฑ์ ดังนี้

สเมียร์มีความยาว น้อยกว่า 1 เซนติเมตร	= ปริมาณน้อย (small volume smear)
สเมียร์มีความยาว ระหว่าง 1-2 เซนติเมตร	= ปริมาณปานกลาง (medium volume smear)
สเมียร์มีความยาว มากกว่า 1 เซนติเมตร	= ปริมาณมาก (large volume smear)

2. การประเมินปริมาณเซลล์และพื้นหลังสเมียร์ ที่เห็นจากกำลังขยายต่ำ

2.1 หลักเกณฑ์ในการประเมินปริมาณเซลล์ มีดังนี้

จำนวนเซลล์มากกว่า 100 ตัว	= ปริมาณเซลล์มาก (high cellularity)
จำนวนเซลล์ระหว่าง 10 - 100 ตัว	= ปริมาณเซลล์ปานกลาง (moderate cellularity)
จำนวนเซลล์น้อยกว่า 100 ตัว	= ปริมาณเซลล์น้อย (low cellularity)

(หมายเหตุ ให้แยกเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ไขมัน และไฟบรัส เป็นพื้นหลัง)

2.2 บันทึกผลการประเมินโดยแยกเป็น ปริมาณเซลล์ที่อยู่เดี่ยวๆ และ ปริมาณเซลล์ที่อยู่เป็นกลุ่ม

2.3 บันทึกปริมาณของพื้นหลังสเมียร์ โดยใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

พื้นหลังสเมียร์มีเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่า 100 ตัว	= อักเสบ (inflamed)
พื้นหลังสเมียร์ปรากฏเลือดชัด	= เลือดออก (hemorrhage)
พื้นหลังสเมียร์ปรากฏสารสีชมพู	= สารเมือกหรือโปรตีนสูง (proteinaceous)
พื้นหลังสเมียร์มีเศษเนื้อเยื่อไขมันเห็นเด่นชัด	= เนื้อเยื่อไขมันมาก (adipose-rich)
พื้นหลังสเมียร์มีเศษเนื้อเยื่อไฟปรัสเห็นเด่นชัด	= เนื้อเยื่อไฟบรัสมาก (fibrous-rich)

3. การตรวจเซลล์ที่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว

3.1 เป็น bipolar naked nuclei หรือไม่

3.2 เป็น histiocytes/ macrophages หรือไม่

3.3 เป็นเซลล์กำลังเสื่อมหรือตายหรือไม่

3.4 เป็นเซลล์ผิดปกติหรือมะเร็งที่หลุดลอกจากกลุ่มหรือไม่ โดยมีเกณฑ์พิจารณาคือ

- **ลักษณะของเซลล์ผิดปกติและเซลล์มะเร็ง**
  - Nuclear enlargement
  - Irregular nuclear contour
  - Macronucleoli
  - Coarsely clumped chromatin
  - Hyperchromasia
  - Pleomorphism

4. การตรวจเซลล์ที่อยู่เป็นกลุ่ม

4.1 เซลล์กลุ่มใหญ่มากมีหรือไม่ (มีเซลล์มากกว่าร้อยตัวในกลุ่ม) ถ้ามี มีรูปแบบของการจัดเรียงตัวพิเศษหรือไม่

- รูปแบบของการจัดเรียงตัวพิเศษของเซลล์กลุ่มใหญ่
  - Discohesive, with cells dropping off the edges
  - Crowded with overlapping of the nuclei in clusters
  - Flat honeycomb sheets, with or without folding
  - Branched, drum stick shaped and 3D (antler horn)
  - Papillary with or without fibrovascular cores and palisaded arrays (“picket fence”)
  - Complex with punched out oval or round holes
  - Small slit-like irregular spaces with streaming or irregular nuclear orientation

4.2 เซลล์กลุ่มเล็กและกลางจำนวนมากไหม มีรูปแบบการจัดเรียงตัวพิเศษหรือไม่

- ถ้ามีมากกว่า 10 กลุ่ม ถือว่า มาก
- รูปแบบการจัดเรียงตัวพิเศษมี ดังนี้
  - Open, angulated tubule
  - Linear cord
  - Monolayered sheet
  - 3-D aggregate
  - Papillary-frond like

4.3 มีเซลล์ลักษณะผิดปกติและมะเร็งหรือไม่

- ลักษณะของเซลล์ผิดปกติและเซลล์มะเร็ง
  - Nuclear enlargement
  - Irregular nuclear contour
  - Macronucleoli
  - Coarsely clumped chromatin
  - Hyperchromasia
  - Pleomorphism

5. การตรวจพื้นหลังสเมียร์

5.1 พื้นหลังสเมียร์มีลักษณะจำเพาะหรือไม่

- ลักษณะจำเพาะของพื้นหลังสเมียร์
  - ○ cystic
  - ○ inflamed
  - ○ hemorrhage
  - ○ mucin, fibrillary? (ต้องมีลักษณะเป็นลายเส้น หรือ fibrillary จึงเป็น mucin)
  - ○ necrotic
  - ○ adipose-rich
  - ○ cellular fibro-stromal fragment rich

การแปลผล

ความสำคัญ เป็นส่วนที่สองหลังจากการอ่านสเมียร์ นำผลการอ่านมาแปลผลโดยมีวิธีการแปลผลแยกเป็นสองระบบ คือ การแปลผลจากลักษณะสเมียร์ (cytomorphologic base) และ การแปลผลตามโรคและการเปลี่ยนแปลงของเต้านม (clinicopathological entities base) การแปลผลวิธีหลังต้องใช้พยาธิแพทย์หรือแพทย์ที่มีความชำนาญร่วมกับการเจาะดูดที่ได้เซลล์มากพอ และได้รายละเอียดครบ ในการศึกษาย้อนหลังของการเจาะดูดรอยโรคที่ไม่ร้าย[4] พบว่ามีเกือบครึ่งหนึ่งที่สามารถให้วินิจฉัยตามโรคที่เหลือ ไม่สามารถระบุชื่อโรคได้ชัดเจน จึงใช้การวินิจฉัยเชิงพรรณนาเซลล์ที่เห็นในกลุ่มของการวินิจฉัยชื่อโรคได้ พบร้อยละ 80 มีการวินิจฉัยตรงกับในชิ้นเนื้อ ส่วนกลุ่มที่ไม่แสดงลักษณะจำเพาะส่วนมาก (ร้อยละ 70) เป็น fibrocystic change

รายละเอียด

การแปลผลจากลักษณะสเมียร์ (cytomorphologic base)

- ○ Presence of malignant cells in clusters
- ○ Presence of malignant cells in dispersal
- ○ Large epithelial fragments with atypia
- ○ Large epithelial fragments without atypia
- ○ Fibroadenoma feature
- ○ Mucinous feature
- ○ Cyst feature, benign
- ○ Cyst feature with atypical cells
- ○ Low/ scant cellularity

การแปลผลตามโรคและการเปลี่ยนแปลงของเต้านม (clinicopathological entities base)

- ○ Cyst and/ or apocrine metaplasia
- ○ Duct ectasia
- ○ Proliferative changes (Ductal hyperplasia, Adenosis, Complex sclerosing lesion or radial scar)
- ○ Papilloma
- ○ Atypical hyperplasia / carcinoma in situ
- ○ Fibroadenoma
- ○ Cellular fibroadenoma or Phyllodes
- ○ Phyllodes, no atypia or with atypia
- ○ Ductal carcinoma, low grade or high grade

- Lobular carcinoma
- Mucinous carcinoma
- Lymphoma
- Sarcoma
- Suppurative inflammation (Mastitis, abscess)
- Granulomatous mastitis
- Fat necrosis
- Parafinoma

การรายงานผล

ความสำคัญ เป็นส่วนที่สามใช้สำหรับสื่อสารถึงผลการวินิจฉัยซึ่งมีความหมายรวมถึงความมั่นใจในผลอยู่ด้วย เพื่อแพทย์ที่รับผลจะใช้ในการตัดสินใจในการดูแลรักษาต่อไป ระบบของการรายงานผลมีแบบใช้ตัวเลขเป็นรหัสและระบบของการรายงานผล ที่ใช้วลีหรือข้อความ สำหรับประเทศไทย นิยมใช้ตามระบบหลัง ระบบการรายงานที่นำเสนอเป็นระบบการรายงานที่ผสมการแปลผลตามลักษณะสเมียร์และตามการจำแนกโรคของเต้านมโดยพยาธิแพทย์

รายละเอียด

ระบบของการรายงานผล

- Cyst with or without apocrine cells
- Scant cells, Benign change
- Inflammation
- Fibroadenomatoid feature
- Fibroadenoma
- Benign Phyllodes or cellular fibroadenoma
- Large fragment/Epithelial hyperplasia
- Atypical or suspicious cells
- Mammary carcinoma, grade specified
- Mucinous carcinoma
- Carcinoma, subtype suggested
- Lymphoma
- Spindle cell tumor/ Melanoma

ระบบการตรวจสอบคุณภาพ

ความสำคัญ การตรวจสอบคุณภาพเป็นส่วนสำคัญในการปฏิบัติเพื่อระวังข้อผิดพลาดและช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาให้ได้ผลที่เหมาะสม ถูกต้อง และน่าเชื่อถือ

รายละเอียด

การตรวจสอบคุณภาพประกอบด้วย

- **ระวัง artifact**
  โดยเฉพาะอย่างยิ่ง forcefully smeared dis-cohesion และ degenerating apocrine cells in cyst
- **ดูกำลังขยายต่ำด้วยเสมอ**
  ในการปฏิบัติงาน ควรมีลำดับการทำงานดังนี้
  - ดูปริมาณด้วยตาเปล่าเพื่อแยก large volume, high cellularity smear ออกจาก small volume, high cellularity และแยก cyst ออกจาก non-cyst เป็นต้น

- ดูกำลังขยายต่ำ เพื่อแยกเซลล์เดี่ยว เซลล์กลุ่ม และพื้นหลัง และประเมินเชิงปริมาณ
- ดูกำลังขยายสูง เพื่อดูรายละเอียดเซลล์เดียว เซลล์กลุ่ม และพื้นหลัง
- ดูกำลังขยายต่ำ เพื่อเชื่อมโยงก่อนวินิจฉัย

■ **ตรวจสอบการอ่านกับทางคลินิกและรังสีวิทยา**

ควรมีการประชุมร่วมทางคลินิกรังสีวิทยาและพยาธิวิทยาเป็นประจำเพื่อเชื่อมโยงเซลล์วิทยากับลักษณะทางคลินิกกับรังสีวิทยา ถ้ามีความขัดแย้ง ควรพิจารณาทำการตัดชิ้นเนื้อหรือตรวจเพิ่มเติม การตรวจสอบอยู่เสมอทำให้เกิดความมั่นใจและลดข้อผิดพลาด

การอ่านมะเร็งที่เป็นเซลล์ขนาดเล็กและเซลล์ที่มีการพัฒนาการดี ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของพยาธิแพทย์

เอกสารอ้างอิง:

1. The uniform approach to breast fine needle aspiration biopsy. A synopsis. Developed and approved at an NCI-sponsored conference, Bethesda, MD, Sept. 9-10, 1996. Acta Cytol 1996; 40:1120-1126.

2. Guidelines for non-operative diagnostic procedures and reporting in breast cancer screening NHSBSP publication No.50; June 2001.

3. European guidelines for quality assurance in mammography screening, 3rd ed. 2001, p1145-1147.

4. Maygarden SJ, Novotny DB, Johnson DE, Frable WJ. Subclassification of benign breast disease by fine needle aspiration cytology: comparison of cytologic and histologic findings in 265 palpable breast masses. Acta Cyto 1994;38:115-129.

หลักเกณฑ์ร่วมรังสีวิทยาและเซลล์วิทยาในการวินิจฉัยรอยโรคของเต้านมที่คลำไม่ได้

*นพ.พิเชฐ สัมปทานุกุล**

บทนำ

ในการตรวจ วินิจฉัย และดูแลโรคของเต้านม ในปัจจุบัน นิยมแยกพิจารณาเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การตรวจ วินิจฉัย และดูแลก้อน หรือรอยโรคที่คลำได้ (palpable breast masses or lesions) และ การตรวจ วินิจฉัย และดูแลก้อน หรือรอยโรคที่คลำไม่ได้ (non-palpable breast masses or lesions)[1] ในกรณีที่คลำก้อนได้ สามารถตรวจ และทำหัตถการเพื่อการวินิจฉัย ณ ห้องตรวจผู้ป่วยนอก การเจาะดูดเพื่อตรวจทางเซลล์วิทยาในส่วนนี้ เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าให้ผลคุ้มค่า[2, 3] ขณะที่การตรวจวินิจฉัยรอยโรคที่คลำไม่ได้ ยังมีข้อถกเถียงกันว่าจะมีประโยชน์หรือไม่ เนื่องจากมักเป็นรอยโรคขนาดเล็ก ต้องทำ ณ ห้องตรวจรังสีวิทยาเพื่อใช้อุลตราซาวด์ในการระบุตำแหน่งหรือช่วยกำหนดทิศทางในการเจาะดูดของเข็ม บ่อยครั้งที่สิ่งเจาะดูดจะได้เซลล์น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในรอยโรคที่ไม่ร้าย ขณะที่ก้อนที่สงสัยเป็นเนื้อร้าย การผ่าตัดออกโดยใช้การแทงเข็มนำทางน่าจะดีกว่า เพราะสามารถนำรอยโรคออกมาทั้งหมดเพื่อการวินิจฉัยและเป็นการรักษาพร้อมกันในครั้งเดียว อย่างไรก็ตาม การศึกษาของผู้เขียนและคณะ[4] พบว่ารอยโรคที่เป็นการอักเสบและถุงน้ำที่สารมีลักษณะหนืดหรือข้น จะบอกได้ดีในการตรวจทางเซลล์วิทยา ทำให้สามารถเลี่ยงการผ่าตัดได้ จึงดูเหมือนว่า แนวทางการดูแลก้อนหรือรอยโรคโดยใช้หลักเกณฑ์ร่วมรังสีวิทยาและเซลล์วิทยามีความจำเป็นมากในการวินิจฉัยก้อนหรือรอยโรคที่คลำไม่ได้

การตรวจก้อนที่คลำไม่ได้

โดยทั่วไปก้อนที่คลำไม่ได้ (non-palpable mass) หมายถึงก้อนที่ตรวจพบโดย mammogram หรือ ultrasound แต่คลำไม่ได้ อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติยังมีความหมายครอบคลุมถึงก้อนที่เหมือนจะคลำได้บ้างแต่ไม่มั่นใจ อันอาจได้แก่ ก้อนที่อยู่ลึก ก้อนที่ไม่มีขอบเขตแน่ชัด และก้อนที่อยู่ท่ามกลางเนื้อของเต้านมที่มีไฟบรัสมาก เป็นต้น ดังนั้นการตรวจก้อนที่คลำไม่ได้น่าจะหมายถึงรอยโรคของเต้านมที่จำเป็นต้องพึ่งการบอกตำแหน่งและทิศทางการแทงของเข็มเพื่อเจาะดูดเซลล์หรือเนื้อเยื่อเล็กๆ ออกมาวินิจฉัย

การใช้ image-directed biopsies สำหรับรอยโรคขนาดเล็กหรือรอยโรคที่คลำได้ไม่ชัดเจน สามารถใช้ imaging modalities ทั้ง ultrasound, stereotactic mammography, mammography และ magnetic resonance imaging ช่วยนำทิศทางและตำแหน่งของเข็ม[5] การใช้เข็มทำได้โดยใช้เข็มเจาะดูด (needle aspiration biopsy) หรือ เข็มเจาะตัด (needle core biopsy) การเจาะดูดจะได้ตัวอย่างตรวจทางเซลล์วิทยา ขณะที่เจาะตัดจะได้ตัวอย่างตรวจโดยกรรมวิธีทางเนื้อเยื่อ ในบทความนี้จะกล่าวถึงการตรวจโดยใช้เข็มเจาะดูดซึ่งใช้อุลตราซาวด์ (ultrasound)ในการนำทิศทางและตำแหน่งของเข็ม

วิธีการตรวจทำได้ 2 กรณี คือการใช้อุลตราซาวด์เพื่อวางตำแหน่งที่ผิวหนังก่อน จากนั้นจึงแทงเข็มและเจาะดูด (ultrasound assisting skin localization of the lesion) หรือเรียกสั้นๆว่า indirect guide และการใช้อุลตราซาวด์เพื่อนำการแทงเข็มเข้าไปในตัวก้อนและเจาะดูด (ultrasound monitoring the needle aspiration of the lesion) หรือเรียกสั้นๆว่า direct guide การตรวจทั้ง 2 วิธีมีข้อดีและข้อจำกัดต่างๆกัน แบบ direct guide ให้ความมั่นใจว่าเข็มอยู่ในตำแหน่งก้อน การตรวจโดยวิธีนี้ ต้องอาศัยอุปกรณ์และความชำนาญพิเศษ และใช้เวลาในการทำมากกว่า แบบ indirect guide ซึ่งมีข้อจำกัดคือแพทย์ไม่เห็นตำแหน่งของเข็มขณะเจาะ แต่อาจใช้การตรวจดูเงาของรอยเข็มภายหลังเจาะดูดเพื่อยืนยันว่าได้มีการแทงเข็มเข้าไปในก้อนได้ ข้อดีของ indirect guide คือใช้เวลาสั้นและอาศัยความชำนาญของรังสีแพทย์น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ในบางสถานการณ์ เช่น ก้อนที่แขวนอยู่ท่ามกลางเนื้อเยื่อไขมัน ก้อนที่เล็กมากและอยู่ลึก และรูปทรงของเต้านมที่ย้อย เป็นอุปสรรคของการตรวจโดย indirect guide

** การศึกษาวิจัยเรื่องนี้ ผู้เขียนได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2546 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*

การเจาะดูดก้อนที่คลำไม่ได้นี้ ต้องการเทคนิคที่ดี ความชำนาญตลอดจนประสบการณ์ของแพทย์ ขนาดของความดันลบในกระบอกสูบอาจมีผลต่อปริมาณเซลล์และเนื้อเยื่อเล็กๆที่เจาะดูดได้ การเตรียมตัวอย่าง หรือ สเมียร์ ต้องการเทคนิคและประสบการณ์เช่นเดียวกัน จึงจะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อเล็กๆที่มีแนวโน้มว่าจะได้น้อยมีการรักษารูปลักษณะที่ดี และเหมาะสมในการตรวจทางจุลทรรศน์

การวินิจฉัยโดยเกณฑ์ทางเซลล์วิทยา

โดยทั่วไป ก้อนที่ไม่ร้ายมักจะให้เซลล์น้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในรอยโรค ที่เป็นไฟบรัสอาจไม่เห็นเซลล์เลย ก้อนที่เป็นมะเร็ง มีแนวโน้มว่าจะพบเป็นมะเร็งเกรดต่ำซึ่งลักษณะเซลล์บอกเป็นเซลล์มะเร็งอย่างมั่นใจได้ยาก อย่างไรก็ตาม เกณฑ์การวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาใช้เหมือนกับการวินิจฉัยในก้อนที่คลำได้ การรายงาน มักประกอบด้วยข้อความบรรยายสั้นๆ เพื่อบอกเชิงปริมาณและคุณลักษณะของสิ่งเจาะดูด และแปลผลว่า ไม่พบเซลล์ผิดปกติ หรือพบเซลล์ผิดปกติ หรือ พบเซลล์มะเร็ง และอาจใส่ category code ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างข้อความในการรายงานและการวินิจฉัย

Descriptive diagnoses	Category code**
Scant cellularity, no malignant cell seen	1
Cyst, benign	2
Modest cellularity, benign breast change	2
Benign, fibroadenomatoid feature	2
Benign, inflammatory process	2
Atypical cells, favoring benign	3
Necrotic debris, suspicious of malignancy	4
Suspicious malignant cells	4
Likely carcinoma, low grade	4
Carcinoma, high grade	5

**** Category coding system**[6]

Code 1 (C1) หมายถึง Insufficient material หรือ Inconclusive

Code 2 (C2) หมายถึง Benign

Code 3 (C3) หมายถึง Atypical, probably benign

Code 4 (C4) หมายถึง Suspicious, probably in situ carcinoma or malignant

Code 5 (C5) หมายถึง Malignant

การวินิจฉัยโดยเกณฑ์ร่วมรังสีวิทยาและเซลล์วิทยา

การวินิจฉัยโดยเกณฑ์ร่วมรังสีวิทยาและเซลล์วิทยาคือการประสานการวินิจฉัยทางรังสีวิทยาและทางเซลล์วิทยาเข้าด้วยกัน เพื่อให้แนวทางการดูแลต่อของแพทย์มีความชัดเจน การวินิจฉัยโดยเกณฑ์ร่วมนี้ จะได้ประโยชน์มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่พยาธิแพทย์ซึ่งตรวจเซลล์วิทยาได้ทำงานร่วมกับรังสีแพทย์ในขั้นตอนการเจาะดูดรอยโรค

ก่อนที่การวินิจฉัยทางรังสีวิทยาในระบบรายงานตาม American College of Radiology (ACR) – Breast Imaging Reporting and Data System (BIRADS) จะแพร่หลาย แนวทางการตัดสินใจเพื่อดูแลในทางคลินิก เป็นดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาร่วมกับรังสีวิทยาเพื่อการดูแลทางคลินิก[5]

Needle aspiration cytology (NAB) and mammographic findings	Follow-up
+ NAB , + mammography	Definitive treatment
+ NAB , ? mammography	Excisional biopsy or definitive treatment based on confidence of cytologist
- NAB , + mammography	Excisional biopsy
- NAB , ? mammography	Short-interval follow-up mammography

ปัจจุบัน การรายงานตามแบบ ACR- BIRADS เป็นที่นิยม ผู้เขียนจึงได้นำเสนอการวินิจฉัยโดยเกณฑ์ร่วมรังสีวิทยาและเซลล์วิทยา และแนวทางการตัดสินใจการดูแลทางคลินิก ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การวินิจฉัยโดยรังสีวิทยาร่วมกับเซลล์วิทยาและแนวทางการดูแลทางคลินิก

Descriptive diagnoses	Combined Dx	Category code**	Recommendation for further management
BIRADS 5 with cytology showing inflammation without atypical cells	Inflammatory lesion	2	May consider antibiotics first or biopsy
BIRADS 5 with other benign cytology	Inconclusive	1	Excision or biopsy for definite diagnosis
BIRADS 5 with atypical or malignant cytology	Carcinoma	5	Definitive surgery
BIRADS 4 with cytology showing apocrine cyst or fibroadenomatoid feature or modest benign cellularity	Benign	2	Routine follow-up
BIRADS 4 with cytology showing scant cellularity	Inconclusive	1	Excision or biopsy for definite diagnosis
BIRADS 4 with cytology showing atypical or suspicious cells	Suspicious	4	Excision or biopsy for definite diagnosis
BIRADS 4 with malignant cytology	Carcinoma	5	Definitive surgery
BIRADS 3 with cytology showing cyst or benign modest cellularity	Benign	2	Routine follow-up
BIRADS 3 with cytology showing scant cellularity	Probably benign	3	Follow-up 6 months
BIRADS 3 with cytology showing atypical or suspicious malignant cells	Probably malignant	4	Surgical removal

เอกสารอ้างอิง

1. Bibbo M, Hanau C. Cytopathology of the breast. In: Tavassoli FA, ed. Pathology of the breast, 2nd edition. New York : McGraw-Hill . 1999, 75-96.
2. Layfield LJ, Glasgow BI, Cramer TJ. Fine needle aspiration in the management of breast masses. Pathol Ann 1989;24 (p II):43-62.
3. Silverman JFS. Diagnostic accuracy, cost effectiveness and triage role of fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of palpable breast lesions. Breast J 1995;1:3-8.
4. Sampatanukul P, Boonjunwetwat D, Pak-art P. Role of combined fine needle aspiration and ultra sonography in the diagnosis of impalpable lesions of the breast. J Med Assoc Thai 2003;86(Suppl 2):S284-290.
5. Howell LP, Lindfors K. Image-directed biopsies for occult mammary lesions. In: Kline TS, Kline IK, Howell LP, eds. Breast : Guides to clinical aspiration biopsy, 2nd edition. Philadelphia : Lippincott Williams&Wilkins .1999, 253-278.
6. Guidelines for non-operative diagnostic procedures and reporting in breast cancer screening NHSBSP publication No.50; June 2001.

หลักเกณฑ์การอ่าน และแปลผล ER, PR, HER2 ของมะเร็งเต้านม

นพ.พิเชฐ สัมปทานุกุล

บทนำ

การตรวจ ER (Estrogen receptor), PR (Progesterone receptor) และ HER2 (Human epithelial growth factor receptor-2) โดยเทคนิค immunohistochemistry เป็นการตรวจที่จำเป็นสำหรับการวางแผนการดูแลรักษาและการเลือกใช้ยาที่เหมาะสม แก่ผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ที่ประชุมของสมาคมมะเร็งวิทยาแห่งชาติอเมริกามีข้อสรุปในปี ค.ศ. 2000 ว่า การตรวจ ER, PR, และ HER2 จำเป็นสำหรับมะเร็งเต้านมและแนะนำให้ทำการตรวจในมะเร็งเต้านมที่วินิจฉัยใหม่ทุกราย[1] ในทางสถิติ เราพบว่า ER+ พบร้อยละ 55-65 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมทั้งหมด, PR+ พบได้น้อยกว่าคือราวร้อยละ 45-60, และ HER2+ พบได้ ราว 20-30%[2] ซึ่งจากการศึกษาในประเทศไทย ก็พบผลบวกอยู่ในสัดส่วนนี้[3,4] การตรวจ immunohistochemistry เป็นวิธีตรวจหาโปรตีนของเซลล์โดยหลักการของการจับตัวกันอย่างจำเพาะของแอนติเจน-แอนติบอดี้ ในเซลล์ และใช้การติดสีเพื่อให้ตรวจสอบได้ ความถูกต้องนอกจากขึ้นกับคุณภาพของ antibody คุณภาพของการเตรียมเนื้อเยื่อและขั้นตอนการย้อมแล้ว ยังขึ้นกับการอ่านและแปลผลด้วย[5] เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการอ่านผลให้ตรงกัน จึงมีความจำเป็นต้องมีหลักเกณฑ์ในการอ่านและแปลผลนี้ขึ้น โดยเกณฑ์ที่เขียนนี้ อ้างอิงจากสรุปสาระที่กลุ่มพยาธิแพทย์จากสถาบันต่างๆได้ประชุมกัน[6]

อนึ่ง นอกจากการตรวจ ER, PR และ HER2 ในชิ้นเนื้อ ยังมีการใช้วิธีตรวจนี้กับตัวอย่างทางเซลล์วิทยา และเรียกเทคนิคนี้ว่า immunocytochemistry ผลของการตรวจในตัวอย่างเซลล์วิทยาและในชิ้นเนื้อน่าจะคล้ายคลึงกันหากได้ตรวจเซลล์จำนวน มากพอในตัวอย่างทางเซลล์วิทยาให้ได้เหมือนกับในชิ้นเนื้อ ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์สากลว่าต้องมีเซลล์มะเร็งให้ตรวจจำนวนเท่าไรจึงจะมากพอ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในกระบวนการอ่านผล มีการนับเซลล์อย่างน้อย 100 ตัวเพื่อการตรวจสอบว่ามีการติดสีหรือไม่ติดสี ดังนั้นผู้เขียนจึงเห็นว่าอย่างน้อยควรมีเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะเหมาะสมไม่น้อยกว่า 100 ตัวในตัวอย่างทั้งทางเซลล์วิทยาและชิ้นเนื้อที่ได้จาก core needle biopsy จึงจะถือว่าเพียงพอ

ปัจจัยที่มีผลต่อการอ่านผลให้ตรงกัน

1. Preparation and staining protocol

การทำให้เนื้อคงสภาพ (fixation) มีความสำคัญมากในการรักษารูปลักษณะเซลล์และโครงสร้างเนื้อเยื่อไว้ ควรรีบแช่ชิ้นเนื้อใน 10%neutral buffered formalin ที่มีปริมาตรมากๆ เป็น 15-20 เท่าของชิ้นเนื้อ เพื่อชิ้นเนื้อจะได้ถูกน้ำยาซึมซาบทั่วถึงทั้งหมดโดยเร็ว จะได้ไม่มีเนื้อเยื่อบางส่วนเน่า อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อเมื่ออยู่ในฟอร์มาลินหลังจากที่เซลล์และเนื้อเยื่อคงสภาพดี แอนติเจนที่เป็นโปรตีนในเซลล์จะมีการเปลี่ยนคุณสมบัติไปเรื่อยๆ เนื้อเยื่อมีการติดสี immunohistochemistry ด้อยลงชัดเจนในแอนติเจนบางชนิดเมื่อชิ้นเนื้อแช่อยู่ในฟอร์มาลินเกินกว่า 3 วัน และสูญเสียการติดสีของแอนติเจนเกือบทั้งหมดหากทิ้งไว้ในฟอร์มาลินเกิน 7 วัน[7] ด้วยเหตุนี้ จึงสรุปเป็นหลักเกณฑ์ปฏิบัติได้ดังนี้ ในการตรวจด้วย immunohistochemistry ควรต้อง fix โดยเร็ว และเนื้อควรตัดให้เล็กลงเพื่อให้ฟอร์มาลินซึมซาบทั่วถึงได้เร็ว ระยะเวลา fix ที่เหมาะสมคืออยู่ระหว่าง 18-24 ชั่วโมง ระยะเวลาที่มากกว่านี้ จะทำให้เนื้อเยื่อเริ่มกรอบและแข็ง และอาจสูญเสียคุณสมบัติของแอนติเจนที่สนใจได้

ในกรณีของเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ เช่น เต้านมทั้งอัน ควรแบ่งครึ่งเต้านมก่อนแช่ เพื่อให้การซึมซาบของฟอร์มาลินได้ทั่วถึงชิ้นเนื้อทั้งอันโดยเร็ว ตามที่กล่าวไว้แล้ว อัตราการซึมของฟอร์มาลินเข้าไปในเนื้อเยื่ออยู่ที่ 1 มิลลิเมตร ต่อ 1 ชั่วโมง ดังนั้นชิ้นเนื้อที่หนากว่า 5 เซนติเมตร ควรผ่าครึ่งเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการซึมซาบ การตัดควรตัดให้เนื้อขาดจากกัน แต่ให้สามารถเข้าใจง่ายในการประกอบชิ้นส่วนเข้าด้วยกัน เวลาที่พยาธิแพทย์ทำการตรวจชิ้นเนื้อ การเปิดบางส่วนทำให้เนื้อเสียรูปทรง ทำให้การตรวจประเมินระยะห่างจากขอบผิดพลาดได้

สำหรับตัวอย่างเซลล์วิทยานั้นการคงสภาพของโปรตีนตัวรับฮอร์โมนที่ผู้เขียนและพยาธิแพทย์ท่านอื่นใช้อยู่ คือ ใช้สูตร 0.1%formal saline[8] คือ ปล่อยให้สเมียร์แห้งก่อน ค่อยจุ่มสไลด์ในขวดใส่น้ำยา 0.1% formal saline ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายสไลด์ไปแช่อยู่ใน 95%ethanol อีกราว 10 นาที จึงทำการย้อมสี Papanicolaou เพื่อดูว่ามีเซลล์มะเร็งจำนวนมากพอหรือไม่ ถ้ามีจำนวนมากเพียงพอ จึงค่อยส่งย้อมหา ER และ PR ต่อไป สำหรับสเมียร์ที่แช่ในแอลกอฮอล์ก่อน (ไม่ได้เตรียมด้วยสูตร 0.1%formal saline) ไม่สามารถใช้ตรวจ ER และ PR เพราะโปรตีนเสียสภาพไปก่อนแล้ว ส่วนการตรวจ HER2 สามารถตรวจได้ทั้งการแช่ด้วยแอลกอฮอล์และสูตร 0.1%formal saline

ขั้นตอนการย้อมมีความสำคัญเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แอนติบอดี้ ที่ได้คุณภาพ และมีกระบวนการเพิ่มประสิทธิภาพของการแสดงออกของโปรตีน (retrieval process) ในกรณีของ ER และ PR การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจพบโปรตีน ทำได้ดีด้วยการใช้ microwave retrieval technique เช่นเดียวกับการย้อมหา immunohistochemical markers ทั่วไป แต่สำหรับ HER2 ต้องควบคุมขั้นตอนนี้เพื่อไม่ให้เทคนิคไวเกินไปจนตรวจพบโปรตีน HER2 ที่ไม่ใช่ over-expression ของโปรตีน ผู้เขียนและคณะผู้วิจัยจึงเสนอแนะให้ใช้ water-bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 95-99 องศาเซลเซียส ใน protocol สำหรับการย้อม immunohistochemistry ของ HER2[9]

2. Artifacts

Artifacts เกิดได้ในทุกขั้นตอนตั้งแต่การผ่าตัดที่ใช้ความร้อนจนทำให้เนื้อไหม้ การคงสภาพที่ไม่สมบูรณ์ การเตรียมบล็อกและการตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบาง ตลอดจนถึงการย้อม ปัญหาของ artifacts คือทำให้การติดสีผิดเพี้ยนไป การป้องกันการอ่านไม่ตรงกัน จึงแนะนำเลี่ยงการอ่านผลในบริเวณที่เนื้อเยื่อและเซลล์ไม่อยู่ในสภาพที่ดี อันเป็นผลจาก artifacts

3. Heterogeneity

เซลล์มะเร็งเต้านมอาจมีลักษณะแตกต่างกันในบริเวณต่างๆ ของก้อนได้ ทำให้บางครั้งมีการติดสีที่ไม่เป็นเอกภาพ แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อสรุปว่าเกิดจาก clone ที่แตกต่างกัน ดังนั้น การอ่านผลจึงแนะนำให้อ่านร้อยละของบริเวณเซลล์มะเร็งที่ติดสี ถ้ามีมากกว่าร้อยละ 10 ของเนื้อเยื่อมะเร็งที่ตรวจทั้งหมดให้แปลผลเป็นบวก

อนึ่ง การย้อมติดสีที่ไม่สม่ำเสมอ อาจเกิดได้จากน้ำยาท่วมไม่เต็มหน้าสเมียร์ ข้อสังเกตคือการติดสีจะติดทางด้านใดด้านหนึ่งของสเมียร์ ถ้าสงสัย ควรส่งย้อมใหม่

4. Invasive and intraductal part

การตรวจต้องแยกการอ่านเซลล์มะเร็งที่เป็น invasive carcinoma จากเซลล์ที่อยู่ใน intraduct carcinoma component ดังนั้น เพื่อให้การอ่านผลได้ตรงกัน จึงแนะนำให้เลือกอ่านและแปลผลบริเวณที่ชัดเจนว่าเป็น invasive carcinoma

5. เกณฑ์ที่ใช้และ cut-off

เกณฑ์ทั่วไปคือ ให้ประเมินเซลล์มะเร็งที่เป็น invasive carcinoma ทั้งหมดที่ปรากฏใน section โดยเลี่ยงการประเมินในบริเวณที่การรักษารูปลักษณะของเซลล์ไม่สมบูรณ์ และนิยมใช้ cut-off ที่ร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็ง

การอ่านผล ER และ PR

มีการอ่านหลายวิธี[6] ทั้งการประเมินเฉพาะปริมาณเซลล์มะเร็งที่ติดสีที่นิวเคลียสโดยไม่สนใจความเข้มของสี กับวิธีที่นำความเข้มของการติดสีเข้ามาคำนวณร่วมกับสัดส่วนของเซลล์มะเร็งที่ติดสีด้วย ในนานาชาติ ยังไม่มีเกณฑ์ที่เป็นมาตรฐานเดียวแต่ส่วนใหญ่นิยมใช้เกณฑ์ประเมินร้อยละเซลล์ที่ติดสี[10] ความสำคัญของการอ่านคือต้องพิจารณาเฉพาะการติดสีที่นิวเคลียส หลีกเลี่ยงการแปลผลบริเวณที่เนื้อเยื่อรักษาสภาพไม่ดี และควรดู positive control ใน internal reference cells ซึ่งได้แก่การติดสีนิวเคลียสของเซลล์ที่ปกติบางตัว หรือ มีสไลด์ที่เป็น positive control ย้อมคู่ไปด้วย

การแปลผล ER และ PR

การแปลผลและรายงานผล คือ positive และ negative โดยมี cut-off ตามแต่ละวิธีการที่ใช้ ส่วนใหญ่ cut-off ที่ใช้สำหรับวิธีดูสัดส่วนเซลล์ที่ติดสีคือ ร้อยละ 10 ของเซลล์มะเร็งทั้งหมดในแผ่นเนื้อเยื่อนั้น

หมายเหตุ การย้อมสีที่เหมาะสม เซลล์ปกติของเต้านมควรมีการติดสีที่นิวเคลียส บ้าง หากไม่มีการติดเลยหลายๆรายและการตรวจได้ ผลลบ ควรต้องระวัง false negative โดยควรต้องใช้สไลด์ที่เป็น positive control ย้อมคู่กับสไลด์ที่จะตรวจร่วมกันไปด้วย ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบน้ำยา antibody หมดอายุ หรือการ fix เนื้อเยื่อ ที่ไม่ถูกต้อง

การอ่านผล HER2

การอ่าน HER2 ให้ใช้ระบบคะแนนตามความนิยมสากล ดังนี้

คะแนน 0 = ไม่มีการติดสี cytoplasmic membrane หรือการติดสีมีน้อยกว่า 10% ของเซลล์ที่เป็น invasive carcinoma ทั้งหมดที่ปรากฏใน section

คะแนน 1+ = ติดสี membrane แต่ไม่ครบวงของเซลล์ (>10%ของเซลล์ที่เป็น invasive carcinoma ทั้งหมดที่ปรากฏใน section)

คะแนน 2+ = ติดสี membrane ครบวงของเซลล์ แต่ไม่เข้ม (>10%ของเซลล์ที่เป็น invasive carcinoma ทั้งหมดที่ปรากฏใน section)

คะแนน 3+ = ติดสี membrane ครบวงของเซลล์ และเข้ม (>10%ของเซลล์ที่เป็น invasive carcinoma ทั้งหมดที่ปรากฏใน section)

การแปลผล HER2

ผลบวก (Positive HER2 status) = คะแนน 3+

ผลก้ำกึ่ง (Equivocal HER2 status) = คะแนน 2+

ผลลบ (Negative HER2 status) = คะแนน 1+, 0

หมายเหตุ การย้อมสีที่เหมาะสม เซลล์ปกติของเต้านมไม่ควรมีการติดสี membrane ที่ครบวง หากปรากฏว่าเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติมีการติดสี membrane ที่ครบวง ควรแปลผลเป็น equivocal เพื่อจะได้มีการย้อมใหม่หรือตรวจด้วยวิธีการตรวจระดับยีนโดย FISH (Fluorescent in situ hybridization) หรือ CISH (Chromogenic in situ hybridization)

เอกสารอ้างอิง

1. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, Kemeny N, locker GY, Mennel RG, Somerfield MR; American Oncology Tumor Markers Expert Panel: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical practice guidelines of the American Society of Clincal oncology. J Clin Oncol 2001;19:1865-1878.
2. Tavassoli FA. General considerations. In: Tavassoli FA, ed. Pathology of the breast, 2nd edition. New York : McGraw-Hill 1999, p27-74.
3. Lertsanguansinchai P, Chottetanaprasith T, Chatamra K, Sampatanukul P, Wannakrairot P, Rojpornpradit P, Shotelersuk K, Lertbutsayanakul C, Boonjunwetwat D, Vajragupta L. Estrogen and progesterone receptors status in Thai female breast cancer patients: an analysis of 399 cases at King Chulalongkorn Memorail Hospital. J Med Assoc Thai 2002;85(suppl 1):S193-S202.
4. Sampatanukul P, Chaiwun B, Wongwaisayawan S, Suwanagool P, Vinyuvat S, Karalak A, Praditphol N, Paueksakon P, Ruangvejvorachai P, Wannakrairot P. Reproducibility of HER2 test by immunohis tochemistry (IHC): a national developing scheme. Abstract. The 2nd Roche Asia Oncology Forum, Taipei, Taiwan, Oct. 11-12, 2003. Program/ Proceedings p52-53.
5. Paradioso A, Volpe S, Iacobacci A, Marubini E, Verderio P, Costa A, Daidone MG, Marchetti A, Mottolese M, Amadori D, De Paola F, Saragoni L, Medri L, Nenci I, Querzoli P, Gion M, Dittadi R, Plebani M, Orlando C, Bevilacqua G, Silvestrini R; Italian Network for Quality Assessment of Tumor Biomarkers. Quality control for biomarker determination in oncology: the experience of the Italian Network for quality assessment of tumor biomarkers (INQAT). Int J Biol Markers. 2002;17:201-214.
6. Sampatanukul P, Wannakrairot P , Thanakit V , Ruangvejvorachai P, Wongwaisayawan S, Suwanagool P, Vinyuvat S, Chaiwun B, Praditphol N, Paueksakon P, Karalak A. Immunohistochemical determinations of ER, PR and HER2 status of invasive mammary carcinoma: a synopsis on current staining protocol, interpretation criteria and quality control measures by the Breast Pathology Group. Journal Royal College of Pathologists of Thailand (in press).
7. Leong ASY. Immunohistochemistry -theoretical and practical aspects. In: Leong ASY, ed. Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist. London : Edward Arnold 1993, p1-22.
8. Suthipintawong C, Leong ASY, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. Diagn Cytopathol 1996;15:167-174.
9. พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์, นพ.ทรงคุณ วิญญูวรรธน์, ปรีชา เรืองเวชวรชัย. หลักการตรวจและวินิจฉัยโดยวิธี Immunohistochemistry. ใน: พิเชฐ สัมปทานุกูล, นิพนธ์ ประดิษฐผล, บรรณาธิการ. ตำรามะเร็งเต้านม: การวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาและพยากรณ์โรค (อยู่ระหว่างจัดพิมพ์)
10. Elston CW, Ellis IO, Goulding H, Pinder SE. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, eds. The breast. Systemic pathology 3rd edition/ volume 13. Edinburgh: Churchill Livingstone 1998, p385-433.

แนวทางการตรวจเนื้อผ่าตัดทั้งเต้านม

Practical Pathological Guideline for Whole Breast Specimen

คณะอนุกรรมการจัดทำแนวทางปฏิบัติทางพยาธิวิทยาโรคเต้านม
ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์ แห่งประเทศไทย

A. Macroscopic examination:

1. Identify and orient the specimen
2. Measure and record
   - Either the whole breast with axillary content, together; or whole breast and axillary content, separately (measure three dimensions)
   - Skin ellipse (measure two greatest dimensions)
3. Describe the covering skin and nipple (if applicable)
   - Describe and locate position of visible/palpable mass(es) and other abnormalities such as scar, ulcer or surgical wound
   - Describe the nipple and state the abnormality
4. Ink the deep margin and other margin(s) related to tumor
5. Cut whole breast specimen and record
   - Serially section along sagittal axis at approximately 1 cm intervals (maintaining the orientation)
   - Locate and record location of lesion(s) eg. mass, cavity, cyst, etc.
     - Quadrant of mass(es)/hemorrhagic or biopsy cavity if applicable
   - Measure distance of mass(es)/hemorrhagic or biopsy cavity from deep and other lated margins
   - Record size of the lesion(s) (three dimensions if applicable)
     - Size of hemorrhagic or biopsy cavity
     - Size of mass(es)
     - Size of residual tumor(s)
   - Describe tumor mass(es)
     - Color
     - Consistency (eg. soft, hard, firm, rubbery, gritty sensation, etc.)
     - Border
     - Hemorrhage/Necrosis (if applicable)
     - In case of multifocality/multicentricity, describe all other mass(es) as aforementioned and state the distance from main mass
     - Describe the remaining breast tissue and state the abnormality (if applicable).

   Note : For definition of multifocallity or multicentricity (see appendix -1)

B. Sections submitted

- Tumor mass(es) /Residual tumor mass(es)

  Representative sections from tumor and adjacent normal breast tissue are submitted. Additional sections for ancillary study is suggested.
- Previous biopsy cavity (if present)

  Representative sections around the biopsy cavity are submitted. More sampling is indicated in case of DCIS alone (to excluded areas of invasion)

- Deep margin and other margin(s) related to tumor

  At least one perpendicular section of the nearest deep margin and other margin(s) related tumor is submitted.

- Skin

  In case of suspected epidermal involvement or inflammatory breast carcinoma, representative sections from related skin are submitted.

- Nipple

  At least one section is submitted. (Cutting detail, see appendix-2)

Note: Four quadrant samplings may be helpful to detect microscopic multifocal or multicentric tumor(s).

C. Microscopic examination/Diagnosis

Tumor mass(es)/Residual tumor(s):

- **Histologic subtype**: According to WHO classification or other internationally accepted classification
- **Grade**:

1. **Invasive ductal carcinoma**: Employ international accepted grading system (Prefer the Modified Bloom-Richardson grade). If other grading system is used, specify the system used. (see appendix-3) for Modified Bloom-Richardson grading system)
2. **Ductal carcinoma in situ**: Employ the international grading system, specify the system used.
   - **Estimated size**: Macroscopic or Microscopic Measurement (see appendix-4)
   - **Lymphatic/vessel invasion**: Blood/lymphatic vessel around tumor needs evaluation for metastasis and reported if positive (see appendix-5)
   - **Margin**: Status of deep margin and other margin(s) related to tumor (assess the distance from tumor to the nearest resected margin, if applicable)
   - **Nipple and related skin**: Status of nipple, epidermis and positive dermal blood/lymphatic vessel invasion.

Note: 1. Histologic subtype and grading can be omitted if amount of tumor is insufficient for evaluation.
2. There is no international recommendation for grading system of special subtype (eg. lobular carcinoma, medullary carcinoma, mucinous carcinoma, papillary carcinoma, etc.)
3. Tumor size around or less than 2.0 cm need special attention. (see appendix-4)
4. In case of multifocal/multicentric tumors, all foci need evaluation and reported.
5. Breast lesion(s) other than carcinoma should be reported.

Appendix

1. Definition of multifocal and multicentric tumor
2. Nipple cutting
3. Modified Scarff-Bloom-Richardson Grading
4. Macroscopic and microscopic measurement of mass(es)
5. Rosen criteria of lymphatic/vessel invasion

1. Definition of multifocal and multicentric tumor

Multifocality: presence of more than a single focus of intraductal carcinoma, lobular neoplasia, or invasive carcinoma within a slide or a biopsy specimen not larger than 5 cm in its maximum dimension

Multicentricity: presence of independent foci of lesion (lobular neoplasia, in situ, or invasive carcinoma) at 5 cm or more distant from one another

2. Nipple cutting :

There are two acceptable methods.

1. Perpendicular bisection/serial section.
2. En face section plus perpendicular section

3. Modified Bloom-Richardson Grading of breast carcinomas

Feature:

Tubule formation

Majority of tumor (>75%)	1 point
Moderate degree (10-75%)	2 points
Little or none (<10%)	3 points

Clear lumina must be present to be scored

Nuclear pleomorphism

Uniform or regular, small nuclei and minimal variation	1 point
Moderate degree of variation in nuclear size and shape,and occasional nucleoli	2 points
Marked variation in nuclear size and bizarre nuclei, often one or more prominent nucleoli	3 points

Mitotic counts: - Count at periphery or the most mitotically active part of the tumor,at least 10 HPF

1. 0-10/10HPFs 1 point
   11-19/10HPFs 2 points
   >20/10HPFs 3 points
   - Based on a microscopic field with a diameter of 0.59 mm and an area of 0.274 mm^2(Leitx Ortholux microscope with wide-angle eyepieces and x25 objective)
2. 0-5/10 HPFs 1 point
   6-10/10 HPFs 2 points
   >10/10 HPFs 3 points
   - Based on a microscopic field with a diameter of 0.44 mm and an area of 0.152 mm^2 (Nikon Labophot microscope with a x40 objective)
3. 0-11/10 HPFs 1 point
   12-22/10 HPFs 2 points
   >22/10 HPFs 3 points
   - Based on a microscopic field with a diameter of 0.63 mm and an area of 0.312 mm^2(Leitz Diaplan microscope with a x40 objective)

Overall Tumor grade

3 to 5 points = Grade I, well differentiated

6 to 7 points = Grade II, moderately differentiated

8 to 9 points = Grade III, poorly differentiated

4. Macroscopic and microscopic measurement of the mass

In case of tumor size is around 2.0 cm, more accurate microscopic measurement is preferred.

Rationale :

TNM clinical classification

T- Primary tumor

T1 = Tumor 2 cm or less in greatest dimension

T1mic = Microinvasion 0.1 cm or less in greatest dimension

T1a = More than 0.1 cm but not more than 0.5 cm in greatest dimension

T1b = More than 0.5 cm but not more than 1.0 cm in greatest dimension

T1c = More than 1.0 cm but not more than 2.0 cm in greatest dimension

T2 = Tumor more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension

T3 = Tumor more than 5 cm in greatest dimension

T4 = Tumor of any size with direct extension to chest wall or skin

pTNM pathological classificaiton

pT- Primary tumor

The pathologic classification requires the examination of the primary carcinoma with no gross tumor at the margins of resection. A case can be classified pT if there is only microscopic tumor in a margin.

The pT categories correspond to the T categories.

Note: When classifying pT, the tumor size is a measurement of the invasive component.

If there is a large in situ component (eg.4 cm.) and a small invasive component (eg. 0.5 cm.), the tumor is coded pT1a.

5. Rosen criteria of lymphovascular invasion

5.1 Lymphovascular invasion (LVI) must be diagnosed outside the border of the invasive carcinoma. The most common area for LVI to occur is within 0.1cm from the edge of the carcinoma.

5.2 The tumor emboli usually do not conform exactly to the contours of the space in which they are found. In contrast, invasive carcinoma with retraction artifacts mimicking LVI has exactly the same shape.

5.3 Endothelial cell nuclei should be seen in the cells lining the space.

5.4 Lymphatics are often found adjacent to blood vessels and often partially encircle a blood vessel.

เอกสารอ้างอิง

1. Tavassoli F. General Consideration. In: Pathology of the breast. 2nd.ed. New York: McGraw-Hill,1999, p27-74.

2. Lester SC. Breast. In. Lester SC. Manual of Surgical Pathology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 2001, p129-146.

แนวทางการตรวจเนื้อผ่าตัดต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้
Practical Pathological Guideline for Axillary Dissection

คณะอนุกรรมการจัดทำแนวทางปฏิบัติทางพยาธิวิทยาโรคเต้านม
ราชวิทยาลัยพยาธิแพทย์ แห่งประเทศไทย

A. Macroscopic examination:

1. Measure three dimensions of the axillary content
2. Dissect all lymph nodes
   a. Record the total number of possible lymph nodes
   b. Record the size of the largest single lymph node
   c. If present, record the number and size of matted lymph nodes

B. Sections submitted

1. One representative section from each possible lymph node is submitted.
2. For matted lymph nodes, one representative section from each node is submitted.

Note: For optimal quality of sections, each block should contain no more than 4 possible lymph nodes.

C. Microscopic examination/Diagnosis

1. Specify the number of positive lymph nodes and total microscopically verified lymph nodes.
2. Specify extracapsular invasion, if present.

เอกสารอ้างอิง

1. Tavassoli F. General Consideration. In: Pathology of the breast. 2nd.ed. New York: McGraw-Hill,1999, p27-74
2. Lester SC. Breast. In. Lester SC. Manual of Surgical Pathology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 2001, p129-146