

Praktické cvičení č. datum: _____ jméno: _____

Téma praktika:

Biochemické a cytomorfologické vyšetření mozkomíšního moku

Okruhy k nastudování a dotazy:

- 1) Přečtěte si protokol a zopakujte si popsanou problematiku.
- 2) Které parametry v likvoru stanovujeme na biochemickém automatickém analyzátoru?
- 3) Které buňky hodnotíme v cytospinu?
- 4) K čemu slouží výsledky spektrofotometrické křivky likvoru?
- 5) Co je to izoelektrická fokuzace ?

Přístroje a pomůcky:

Automatický biochemický analyzátor
Vzorky likvoru

Úkoly:

- 1) Rozdělte vzorek likvoru č.1 a č.2 na alikvoty pro biochemické vyšetření a alikvoty pro cytologické vyšetření. Alikvot pro biochemické vyšetření centrifugujte při 2500 otáčkách po dobu 5 minut:
- 2) Proveďte makroskopický popis vzhledu před centrifugací a po centrifugaci s využitím komentářů používaných na OKBH:

Likvor 1:

Likvor 2:

- 3) Proveďte semikvantitativní stanovení koncentrace hemoglobinu pomocí proužku HEMOPHAN:

Likvor 1:

Likvor 2:

- 4) Na biochemickém analyzátoru proveďte základní biochemické vyšetření likvidu – stanovení glukosy, CB a laktátu. Výsledky včetně jednotek zapište:

	glukosa	CB	laktát
Likvor 1:			
Likvor 2:			

Normální hodnoty: CB – 0,15 – 0,40 g/l

Laktát – 1,2 – 2,1 mmol/l

glukosa – 2,5 – 4,0 mmol/l

- 5) Kvantitativní cytologie – seznámení a demonstrace

Připraví se dva preparáty – nativní a barvený. Zatím co počítáme buňky v nativním preparátu, v druhém dochází k cytolýze erytrocytů a obarvení jaderných buněk. Optimální doba barvení je 5-15 minut. Po delší době může dojít k přebarvení buněk a je pak lépe připravit preparát nový.

Počítání elementů ve Fuchs-Rosenthalově komůrce:

Dle níže uvedeného postupu naplnit komůrku a prohlížet a počítat v mikroskopu za použití objektivu 20 (event. 40). Počítat ve všech , tj. **16 x 16 = 256 čtverečcích**.

Při velkém množství buněk, lze počítat jen v části komůrky a příslušně vynásobit.

a) celkový počet buněk se počítá v nativním likvoru:

20 ul nativního, promíchaného likvoru se napipetuje do komůrky , vloží do mikroskopu a spočítá se.

b) počet jaderných elementů se získá po obarvení a rozpadu erytrocytů vlivem kyselého methylvioleti.

50 ul promíchaného likvoru napipetovat na hodinové sklo + **5 ul neředěné barvy** (methylvioleť)

Promíchat a napipetovat **20 ul nabarveného likvoru do komůrky** a spočítat pouze jaderné buňky.

Odhad procentuálního poměru mezi jadernými buňkami (mononukleáry a polynukleáry) se určí až z cytopspinového preparátu .

c) počet erytrocytů :

celkový počet buněk z nativního likvoru -- celkový počet jaderných buněk z obarveného likvoru = počet erytrocytů

Takto získané **výsledky se dělí 3** a vyjadřují **počet buněk v 1 ul**.

6) Kvalitativní cytologie - seznámení a demonstrace

Zhotovení preparátu na Cytospinu:

- na podložní sklo napsat číslo preparátu tužkou
- vyjmeme rotor z Cytospinu a zatažením za uvolňovací kolíček odjistíme a odejmeme vrchní průhlednou část rotoru
- do kyvety v připraveném klipu napipetujeme 200 ul moku
- vložit do rotoru, vyvážit jiným klipem
- uzavřít průhledným krytem a zajistit zatlačením na uvolňovací/zajišťovací kolíček
- vložit do Cytospinu, uzavřít, zapnout přístroj a dále :
 - 1.vyvolat příslušný program - zmáčknout LOAD
 - 2.zvolit číslo programu 1
 - 3.potvrdit – ENTER
 - 4.START (Nastavení : 800 otáček, 10 minut, low-pomalou).Cytospin se sám zastaví, otevřít – OPEN/LID – 2x, cytopspinový klip vyndat, odstranit filtrační papír , komůrku namočit do desinfekčního roztoku.
- sklo se vzorkem musí být dokonale suché, pak ihned barvit.

Barvení preparátu : setem Diff-Quik (MEDION Diagnostics)

Set obsahuje 3 roztoky, umožňující rychlé obarvení cytologických preparátů se zcela srovnatelným výsledkem jako při klasickém barvení dle Pappenheima.

Roztok I - fixační (Fast green v metanolu) zelenomodrý
Roztok II – barvicí roztok 1 (Eosin G v pufru) červenooranžový
Roztok III – barvicí roztok 2 (Thiazin v pufru) tmavomodrý

Provedení: • sklíčko s cytologickým sedimentem ponoříme **5 x na 1 vteřinu do roztoku I**. Přebytek barvy lehce oklepeme do buničité vaty a ze zadní stěny oťřeme.

• sklíčko ponoříme **5 x na 1 vteřinu do roztoku II** a přebytek barvy odstraníme stejným

- způsobem.
- sklíčko ponoříme **4-5 x (dle potřeby) na 1 vteřinu do roztoku III** a ihned opláchneme destilovanou vodou. (Nutno používat destilovanou vodu dobré kvality – od Moduláru.)

Hodnocení: jádra buněk modrá, cytoplazma šedo-modrá - mononukleáry
 jádra buněk granulovaná modrá, cytoplazma růžová - polynukleáry
 červené buňky s projasněním - erytrocyty

Normální rozmezí : **mononukleáry** **do 3 /ul**
 polynukleáry **do 0,3 /ul**
 erytrocyty **0 /ul**

Výsledky získané v bodě pět a korigované pomocí cytopsinu zapište do tabulky:

Počet/ul	mononukleáry	polynukleáry	erytrocyty
Likvor 1:			
Likvor 2:			

- 7) Dle návodu používaného na OKBH proveďte měření spektrofotometrické křivky likvoru. Výsledky včetně spektra zhodnoťte a přiložte k protokolu:

Při spektrofotometrii patologického likvoru lze prokázat krevní pigmenty s absorpčními maximy:
 oxyhemoglobin – HbO₂ 415 nm (minoritní max.540 a 577nm)
 methemoglobin - MetHb 407nm
 bilirubin 420 a 460 nm (měříme při 455 nm)

Výsledná spektrofotometrická křivka je sumační - maxima nejsou oddělena, ale často jen naznačena. Přítomnost MetHb se projeví posunem abs. maxima Hb ke kratším vlnovým délkám 410 - 408 nm

Hodnocení:

- 8) Průkaz oligoklonálních pásů v séru a likvoru – seznámení s izoelektrickou fokuzací, ukázka elektroforeogramů a jejich hodnocení:

Takto se získají důležité informace pro podporu klinické diagnózy některých demyelinizačních onemocnění (hlavně SM) a infekčních chorob CNS.

Použitá metoda : izoelektrická fokuzace na agarózové vrstvě

Izoelektrická fokusace bílkovin se využívá k průkazu oligoklonálních pásů IgG v likvoru. Dělení probíhá v elektrickém poli v gradientu pH podle izoelektrického bodu jednotlivých bílkovin.

Princip:

Jde o elektroforetickou metodu, při které se látky dělí podle velikosti svého izoelektrického bodu. Izoelektrický bod je taková oblast pH, kdy má částice celkový náboj nulový a v elektrickém poli se nepohybuje.

Dělení probíhá v gradientu pH (pH nosiče se v průběhu dělení rovnoměrně mění směrem od kyselých k alkalickým oblastem). U anody je pH nejnižší a směrem ke katodě roste. Při dělení narazí bílkoviny na pH svého izoelektrického bodu (pI) a dále se již v el. poli nepohybují.

Pro stanovení se nejprve stanoví koncentrace IgG v séru a likvoru, sérum i likvor se naředí na koncentraci 20 mg/l.

Při analýze se vždy nanáší vzorek likvoru a séra vedle sebe.

Výsledek je pozitivní v případě, že jsou pásy přítomny.

Možnosti přítomnosti pásů:

- 1) Přítomny v likvoru a nejsou v séru - lokální syntéza imunoglobulinů ve třídě IgG (autoimunitní onemocnění – RS, neuroinfekce - borelióza)
- 2) V likvoru a séru jsou ve stejném místě – porušena hematolikvorová bariéra (meningitida)
- 3) Kombinovaná porucha – více pásů v likvoru než v séru - těžké poškození CNS, encefalitida
- 4) Přítomnost monoklonálního IgG – 3-4 silné poučky v úzkém gradientu pH v séru i likvoru – monoklonální gamapatie