

Praktické cvičení č.  
Letní semestr

datum \_\_\_\_\_ jméno \_\_\_\_\_

*Téma praktika:*

## **Biochemické a cytomorfologické vyšetření likvoru**

### **Teoretický úvod**

Likvor (mozkomíšni mok, zkratka CSF z angl. cerebrospinal fluid) je tekutina vyplňující mozkové komory, cisterny na bazi lební a prostory mezi arachnoideou a pia mater (subarachnoidální prostory).

Změny složení likvoru pomáhají diagnostikovat některá neurologická onemocnění, zejména:

- Infekční záněty mozku a zejména mozkových obalů (encefalitidy, meningitidy)
- Autoimunitní onemocnění nervového systému (roztroušená skleróza, akutní zánětlivá demyelinizační polyneuropatie)
- Krvácení do likvorových cest (subarachnoidální krvácení, popř. krvácení do mozkových komor)
- Nádorovou infiltraci mozkomíšních plen

### **Vyšetření likvoru**

Zahrnuje posouzení vzhledu likvoru před centrifugací a po ní, stanovení počtu jaderných buněk („elementů“) a erytrocytů (popř. orientační diferenciací jaderných buněk na mononukleáry a polymorfonukleáry) ve Fuchs-Rosenthalově komůrce, kvalitativní zkoušku na přítomnost hemoglobinu testacím papírkem, na některých pracovištích orientační test na bílkoviny – Pandyho reakci (princip: srážení bílkovin nasyceným roztokem fenolu), zhotovení cytologického preparátu, v němž diferencujeme jaderné buňky na lymfocyty, monocyty, neutrofilní a eosinofilní granulocyty, případně další typy buněk (buňky výstelky likvorových cest, za patologických stavů plazmocyty, fagocyty, atypické či nádorové buňky), kvantitativní stanovení celkové bílkoviny, glukosy a laktátu. Obsolentní je stanovení chloridového aniontu. V indikovaných případech provádíme spektrofotometrické vyšetření likvoru nebo speciální imunochemická vyšetření – stanovení albuminu a imunoglobulinů v likvoru a séru s výpočtem intrathékální syntézy imunoglobulinů a detekci oligoklonálních IgG pásů v likvoru a séru metodou izoelektrické fokusace se specifickou detekcí IgG.

Vyšetření likvoru zahajujeme posouzením jeho vzhledu. Normální likvor je vždy čirý a bezbarvý; obráceně to bohužel neplatí, tj. čirý a bezbarvý likvor může mít jak normální, tak patologické složení.

U krvavého likvoru je nezbytné část materiálu co nejdříve centrifugovat a popsat vzhled likvoru po centrifugaci. U arteficiální příměsi krve (z nabodnutí drobné cévy při vpichu) je po centrifugaci nad sedimentem erytrocytů čirý a bezbarvý likvor, u krvácení do likvorových cest je likvor po centrifugaci různě intenzívně nažloutlý – xanthochromní. Tzv. zkouška tří

zkumavek se provádí přímo při odběru u lůžka pacienta – u arteficiální příměsi se likvor zpravidla „čistí“, tj. první porce je nejvíce krvavá a poslední porce nejméně krvavá, bohužel to ale není pravidlem; u krvácení do likvorových cest jsou všechny porce stejně krvavé nebo jsou poslední porce dokonce více krvavé než první. Tato zkouška je však velmi nespolehlivá. Je užitečné vědět, že u masivní arteficiální příměsi krve zpravidla dochází ve zkumavce ke koagulaci, u krvácení do likvorových cest většinou koagulum nenacházíme. Ani toto však není pravidlem. Lépe odliší krvácení do likvorových cest cytologické vyšetření likvoru, kde nacházíme fagocytované erythrocyty, od 3.-4. dne po krvácení granula hemosiderinu (lze je pozorovat již v základním barvení a speciálně znázornit cytochemickou reakcí na průkaz trojmocného železa). Další pomůckou je spektrofotometrické vyšetření, kde pátráme po přítomnosti oxyhemoglobinu s absorpčním maximem při 415 nm a bilirubinu s plochým maximem mezi 430-460 nm. Konvenčně se měří bilirubinová absorbance při 476 nm z důvodu menší interference oxyhemoglobinu. Ani spektrofotometrické vyšetření není spolehlivé, při masivní arteficiální krevní příměsi dostáváme falešně pozitivní výsledek.

Imunochemická vyšetření likvoru byla probrána v rámci praktika Instalace turbidimetrické/nefelometrické metody (posouzení funkčního stavu hemalivorové bariéry pomocí kvocientu albuminu,  $Q\text{ Alb} = \text{Alb}_{\text{CSF}}/\text{Alb}_{\text{sérum}}$ , výpočty intrathekální syntézy IgG, IgA a IgM). Pro IgG je běžně používán kvalitativní průkaz intrathekální syntézy pomocí elektroforetické separace IgG v likvoru a séru se srovnáním obrazu v obou tekutinách. Produkce tzv. oligoklonálních imunoglobulinů (běžně jsou detekovány jen oligoklonální IgG) je podmíněna množstvím několika málo klonů plazmatických buněk, přičemž každý klon produkuje molekuly IgG stejných fyzikálně-chemických vlastností (stejně pořadí aminokyselin variabilních oblastí molekuly). Přednost se dává elektroforetické separaci v gradientu pH, tzv. izoelektrické fokusaci, při níž se IgG v pH gradientu rozdělí podle svých izoelektrických bodů (pI). Zmnožení jednoho klonu plazmocyty se projeví několika sousedícími liniemi IgG v těsné blízkosti (tzv. spektrotyp). Zmnožení několika klonů plazmocyty produkujících IgG se projeví nálezem několika skupinek IgG pásů – hovoříme o oligoklonálním profilu (řecky oligos – několik málo). Z definice můžeme hovořit o oligoklonalitě pouze tehdy, jsou-li přítomny alespoň 2 IgG pásy. Pokud jsou tyto linie – „pásy“ – přítomné pouze v likvoru a nikoliv v séru, usuzujeme na intrathekální (tj. v kompartmentu CNS) syntézu IgG. (Normálně v CNS nejsou plazmatické buňky detekovatelné.) Nález intrathekální syntézy oligoklonálního IgG svědčí pro chronické zánětlivé onemocnění CNS, nejčastější příčinou takového nálezu je roztroušená mozkomíšni skleróza (lat. sclerosis multiplex, angl. multiple sclerosis). Nález alespoň 2 IgG pásů v likvoru nepřítomných v séru umožňuje u pacientů s více demyelinizačními ložisky na magnetické rezonanci mozku stanovit diagnózu roztroušené sklerózy již při prvních projevech nemoci a tak zavčas zahájit účinnou léčbu.

Podle mezinárodního konsensu (Andersson et al. 1994; Freedman et al. 2005) se nálezy při detekci oligoklonálních IgG pásů (o-IgG) v párových vzorcích likvorů a sér dělí na 5 typů:

Typ	Popis	Interpretace
1	Žádné pásy v likvoru ani v séru	Normální nález
2	Pásy v likvoru nepřítomné v séru ( $\geq 2$ )	Intrathekální syntéza o-IgG
3	Pásy v likvoru nepřítomné v séru ( $\geq 2$ ) + pásy společné v likvoru i séru ( $\geq 2$ )	Intrathekální syntéza o-IgG + systémová syntéza o-IgG
4	Pásy společné v likvoru i séru ( $\geq 2$ )	Systémová syntéza o-IgG
5	V likvoru i séru 2-8 pásů v těsném rozmezí pH gradientu, s pravidelnými rozestupy, zpravidla stoupající intenzitou ke katodě	Monoklonální spektrotyp – přítomnost monoklonálního IgG

*Okruhy k nastudování a dotazy:*

1. Pro zkoušku i pro praxi budete potřebovat znát referenční meze základních likvorových testů – počtu buněk, koncentrace celkové bílkoviny, glukózy a laktátu. Naučte se je už nyní.
2. Seznamte se s principem detekce oligoklonálních IgG pásů v likvoru a zásadami hodnocení – jak je v tomto testu definována přítomnost intrathekální syntézy oligoklonálního IgG?

*Přístroje a pomůcky:* Fuchs-Rosenthalova komůrka, mikroskop, analyzátor Cobas 8000, analyzátor UF5000 (Sysmex), spektrofotometr Helios  $\beta$ , trojúhelník s ryskou (v nouzi stačí pravítko), elektroforetický přístroj Hydrasys2 SCAN, prohlížečka gelů

*Úkoly:*

1. Posuďte vzhled vzorku likvoru před centrifugací a po ní.
2. Kápněte 20  $\mu$ L vzorku likvoru na pole močového testovacího papírku pro detekci krve/hemoglobinu. Výsledek vyhodnoťte.
3. Spočítejte jaderné buňky a erytrocyty ve Fuchs-Rosenthalově komůrce ve vzorku nativního likvoru. Srovnajte s počtem buněk zjištěným automatizovanou analýzou průtokovou cytometrií na přístroji UF5000 (Sysmex).
4. Spočítejte mononukleáry a polymorfonukleáry ve Fuchs-Rosenthalově komůrce ve vzorku likvoru barveném roztokem methylvioleti.
5. Proveďte spektrofotometrické vyšetření likvoru.
6. Vyhodnoťte zadanou spektrofotometrickou křivku nativního likvoru.
7. Vyhodnoťte nález získaný při detekci oligoklonálních IgG pásů v párovém vzorku likvoru (číslo bez apostrofu) a séra (číslo s apostrofem). Odhadněte počet IgG pásů v likvoru a séru, vyjádřete se, zda je přítomna intrathekální syntéza IgG, a klasifikujte nález do jednoho z pěti typů podle mezinárodně přijaté klasifikace.

**Návod k jednotlivým úlohám:**

3.-4. viz praktické cvičení Cytologie likvoru

**5.-6. Hodnocení spektrofotometrické křivky:**

Nakreslete tečnu zdola ke grafu. Změřte vzdálenost odpovídající rozsahu absorbancí na ose y a vyjádřete ji v mm nebo cm. Poté rozpůlte pravítkem vzdálenost na ose x mezi značkami 450 a 500 (odpovídajícími vlnové délce v nm); označená vzdálenost odpovídá 475 nm. V tomto bodě udělejte kolmici k ose x. Na této kolmici změřte vzdálenost od tečny ke grafu (v mm nebo cm, ale **VŽDY VE STEJNÝCH JEDNOTKÁCH JAKO VZDÁLENOST ODPOVÍDAJÍCÍ ROZSAHU ABSORBANCÍ, KTEROU JSTE ZMĚŘILI NA OSE y!!!**). Pokud je v záznamu patrný pík oxyhemoglobinu (mezi 410-418 nm), veďte od vrcholu píku kolmici k ose x, změřte vzdálenost mezi vrcholem píku a tečnou ke grafu. Poté trojčlenkou vypočtete neznámé absorbance a vyjádřete jako „NOA“ (net oxyhaemoglobin absorbance) a „NBA“ (net bilirubin absorbance).

Příklad výpočtu:

Rozsah absorbancí na ose y: 0 – 0,1

Vzdálenost mezi 0 a 0,1 na ose y: 11 cm (změřte vzdálenost na svém grafu, může se lišit!!)

Vzdálenost mezi tečnou a vrcholem píku oxyhemoglobinu při cca 415 nm: 3,3 cm

Vzdálenost mezi tečnou a grafem při 475 nm: 1,1 cm

Potom  $11/0,1 = 3,3/NOA = 1,1/NBA$  a tedy

$NOA = 0,1 \times 3,3/11 = 0,1 \times 0,3 = 0,03$ ;  $NBA = 0,1 \times 1,1/11 = 0,1 \times 0,1 = 0,01$ .

Na závěr si zkontrolujte pohledem na osu y a Vámi změřenou vzdálenost, zda Váš výpočet zhruba odpovídá (tak snadno odhalíte např. řádovou chybu).

Při hodnocení nálezů Vám budou k dispozici britská guidelines (Cruickshank *et al.* 2008).

### Hodnocení oligoklonálních IgG pásů

Do protokolu запиšte číslo gelu + datum jeho zhotovení a zadanou pozici párového vzorku.

První vzorek (bez apostrofu) je vždy likvor, druhý vzorek (s apostrofem) je sérum.

Prohlédněte si celý gel; pásy přítomné ve všech pozicích jsou artefakty a nepočítají se.

Spočítejte pásy v likvoru, v séru, zařaďte IEF obraz do některého z typů 1-5 podle mezinárodní klasifikace a zhodnoťte, zda je či není přítomna intrathékální syntéza oligoklonálního IgG (tj. alespoň 2 pásy v likvoru bez protějšku v séru), případně zda je přítomna pouze „systémová“ syntéza oligoklonálního IgG s pasívním přestupem do likvoru (typ 4 – mirror pattern) nebo paraprotein (typ 5). Pozor – paraprotein se zobrazí jako 2-8 IgG pásů v těsné blízkosti, shodných v likvoru i séru (nikoliv jako 1 pás, jak jste zvyklí z elektroforéz).

*Pozn.: Počítejte pouze zřetelné, ostré pásy, které jasně „vystupují“ z „polyklonálního“ pozadí. Pokud žádné nejsou, udejte počet 0, typ 1 a hodnocení „normální nález“ (výraz „polyklonální pásy“, používaný některými studenty, je protismyslný a chybný!).*

### Výsledky:

#### 1. Základní vyšetření likvoru a hodnocení nálezu

Vzorek č.:	Datum:	Hodnocení likvorového nálezu
Vzhled před centrifugací		
Vzhled po centrifugaci		
Krev/hemoglobin		
Počet jaderných buněk ve Fuchs-Rosenthalově komůrce		
- z toho mononukleáry (lymfocyty + monocyty)		
- z toho polymorfonukleáry (granulocyty)		
Počet erytrocytů ve Fuchs-Rosenthalově komůrce		
Spektrofotometrie		
Celková bílkovina (g/L)		
Glukosa (mmol/L)		
Laktát (mmol/L)		

2. **Vyhodnocení zadané spektrofotometrické křivky;** vyhodnocení zakreslete přímo v křivce, kterou přiložte k protokolu. (Využijte při tom návod pro vyhodnocení, který Vám bude k dispozici.)

Křivka č.:

Slovní hodnocení:

3. **Vyhodnocení intrathekální syntézy oligoklonálních IgG pásů** v zadaném vzorku vizuálním odečtem – srovnáním obrazu v likvoru a séru z gelu:

Vzorek č.:	Datum:
Počet IgG pásů – likvor	
Počet IgG pásů – sérum	
Typ IEF nálezu	
Hodnocení	

***K dispozici Vám bude návod na hodnocení spektrofotometrické křivky podle revidovaného britského doporučení:***

Cruickshank A et al. Revised national guidelines for analysis of cerebrospinal fluid for bilirubin in suspected subarachnoid haemorrhage. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 238-244