

Практика № 5. Исследование спинномозговой жидкости.

Исследования ликвора – это неотъемлемая часть диагностики заболеваний, поражающих центральную нервную систему.

Макроскопическое исследование ликвора:

Макроскопическое исследование – это вся информация о биоматериале, которую лаборант может получить при помощи органов чувств.

1. Цвет – в норме спинномозговая жидкость бесцветна и по виду не отличается от воды. Появление окраски свидетельствует о патологическом процессе в цнс. Для обнаружения слабой окраски сравнивают доставленный ликвор с дистиллированной водой, налитой в такую же пробирку.

2. Прозрачность – в норме спинномозговая жидкость прозрачная. Степень помутнения определяют сравнением доставленного в пробирке ликвора с таким же количеством дистиллированной воды, налитой в такую же пробирку, при дневном освещении на черном фоне. Если ликвор прозрачен, как дистиллированная вода, его описывают в бланке как полностью прозрачный, при нарушении прозрачности – опалесцирующий, слегка мутноватый, мутный, резко мутный.

3. Фибринозная пленка – в норме в спинномозговой жидкости низкое содержание фибрина и пленка при отстаивании не образуется. Высокое содержание фибрина дает нежную сеточку или пленку на стенках пробирки, мешочек, содержащий ликвор с клеточными элементами, или желеобразный сгусток на дне пробирки. Процесс образования пленки начинается сразу после получения ликвора и его нельзя нарушать, встряхивая или переливая часть доставленного ликвора в другую пробирку. Пленка может образовываться сразу после получения ликвора или через некоторое время (через 30 мин, 1 ч, 10-15 и более часов.. При обнаружении в пробирке с ликвором фибриновой пленки в виде мешочка нужно помнить, что в мешочке клеточные элементы сохраняются при комнатной температуре в течение 10-15 ч после получения ликвора. Из фибринового мешочка пастеровской пипеткой можно извлечь каплю ликвора с клетками, нанести каплю извлеченного из мешочка ликвора на предметное стекло, покрыть покровным стеклом и изучить сохранившиеся клетки. Эти клетки окраске азур-эозином не подлежат, так как нарушаются свойства клеток воспринимать окраску.

Микроскопическое исследование ликвора:

Это один из самых ответственных этапов исследования спинномозговой жидкости, на основании данных которого нередко подтверждаются либо опровергаются диагнозы.

Подсчет количества форменных элементов проводится в течении 30 минут после извлечения спинномозговой жидкости с последующей дифференциацией клеток. Для подсчета *лейкоцитов* препарат окрашивают реактивом Самсона: 2,5 мл спиртового раствора фуксина 1:10 + 30 мл уксусной кислоты + 2 г карболовой кислоты + дистиллированной воды до 100 мл, время окрашивания 10-15 минут.

Окрашенный препарат помещают в камеру Фукса-Розенталя объемом 3,2 мкл. Камера Фукса- Розенталя состоит из 16 больших квадратов, каждый из которых разделен на 16 малых, всего в камере содержится 256 малых квадратов. Малый квадрат является счетной единицей камеры. Лейкоциты считают во всех 256 квадратах. Количество клеток в 1 мкл ликвора (X) определяют по формуле : $X=(A*11)/(3,2 *10)$, где A – количество клеток в камере, 11/10 – степень разведения ликвора, 3,2 – объем камеры. На практике объем камеры округляют до 3 мкл и не учитывают степень разведения ликвора: $X=A/3$. Ответ представляют в 1 литре ликвора. Например: $4*10^9/л$.

Нормальное количество клеток в 1мкл ликвора называется цитоз (нормоцитоз), увеличение количества клеток в 1 мкл ликвора – плеоцитоз.

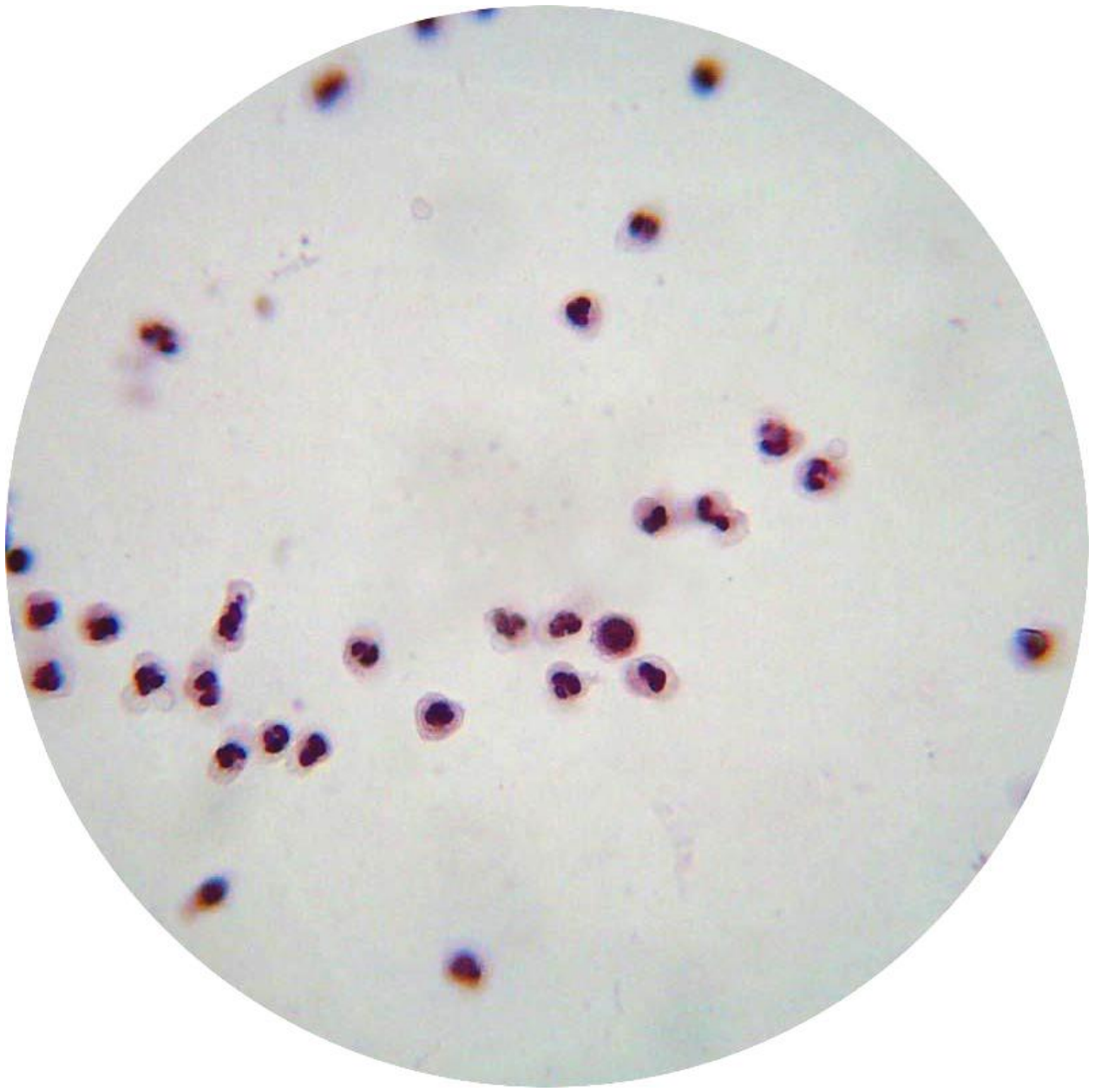


Рис. Нейтрофилы в ликворе, реактив Самсона, ув.400х



Рис. Эозинофилы в ликворе , реактив Самсона, ув.*1000

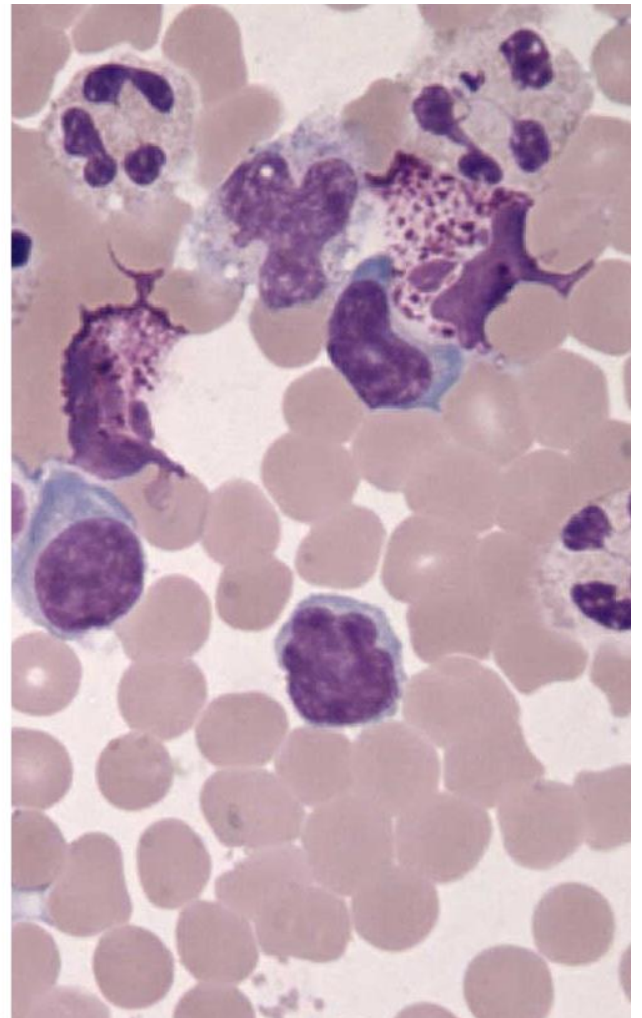
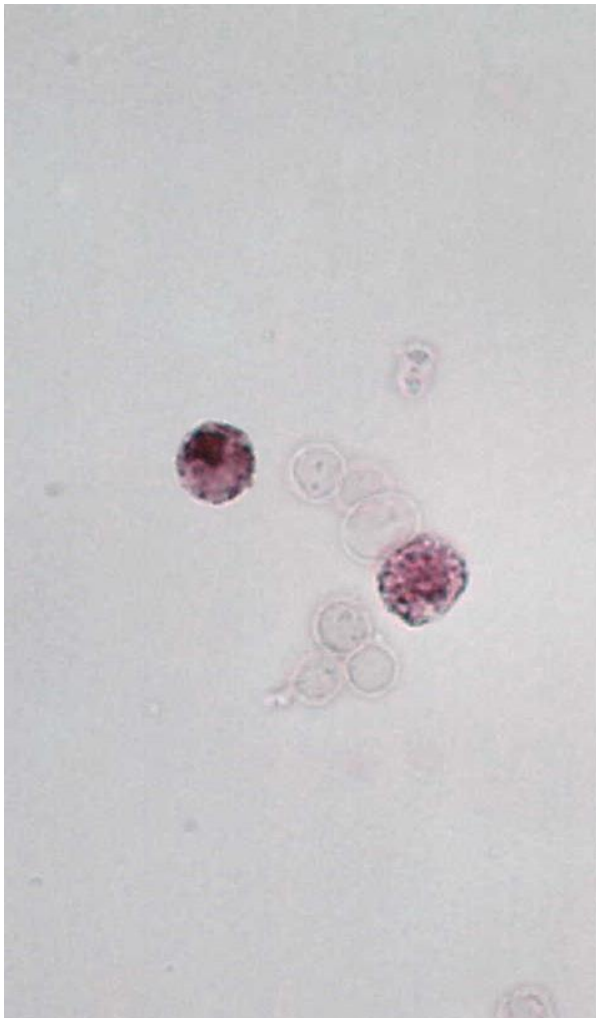


Рис. Базофилы в ликворе.



Рис. Нейтрофилы и лимфоциты в ликворе, реактив Самсона. Ув. x1000

Общеклиническое исследование ликвора

Определение глобулинов реакцией Панди. Реакция основана на осаждении глобулинов насыщенным раствором карболовой кислоты.

Готовится насыщенный раствор карболовой кислоты: 100 г карболовой кислоты растворяют в 1 л воды, встряхивают и оставляют в термостате при 37°C на сутки. После пребывания при комнатной температуре в течение 2-3 суток надосадочную жидкость сливают и используют в качестве реактива.

На часовое стекло, помещенное на черную бумагу, наливают 1 мл реактива и по краю настилают 1–2 капли ликвора. В случае положительного результата в месте соприкосновения реактива с СМЖ образуется молочно-белое облачко, переходящее в муть. Рассматривают результат реакции на темном фоне и отмечают его через 2 минуты. Для обозначения результатов реакции Панди пользуются системой четырех плюсов:

- значительное помутнение 4 (++++);
- умеренное 3 (+++);
- заметная опалесценция 2 (++);
- слабая опалесценция 1 (+).

Метод определения белка с сульфосалициловой кислотой. Интенсивность помутнения при коагуляции белка сульфосалициловой кислотой пропорциональна его концентрации.

Реактивы:

1. 6% раствор сульфосалициловой кислоты (ССК).
2. 14% раствор безводного сульфата натрия.

Для анализа применяют свежеприготовленную смесь равных объемов этих реактивов (рабочий раствор)

3. Стандартный раствор альбумина – 1 % раствор: 1 г лиофилизированного альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9% раствора хлорида натрия в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствором хлорида натрия до метки. Реактив нестойкий. Для стабилизации к стандартному раствору прибавляют 1 мл 5% раствора азиды натрия (NaN₃) В этом случае при хранении в холодильнике реактив годен к употреблению в течение 2 мес. 1 мл раствора содержит 10 мг альбумина

4. 0,9% раствор хлорида натрия.

Для учета результата реакции используют фотоколориметр.

В пробирку наливают 5 мл свежеприготовленного рабочего раствора и 0,5 мл ликвора. Тщательно перемешивают. Через 10 мин интенсивность помутнения измеряют на фотоэлектроколориметре в кювете с длиной оптического пути 1 см против контроля, длина волны 410–480 нм (сине-фиолетовый светофильтр). В контроль вместо реактива берут 0,9% раствор хлорида натрия. Расчет ведут по калибровочному графику.

Перед опытом целесообразно поставить реакцию Панди (качественная проба на белок), и если результат реакции оценивают 3+ или 4+, то перед количественным исследованием ликвор надо развести изотоническим раствором хлорида натрия и при расчете учесть степень разведения. Прямолинейная зависимость при построении калибровочного графика сохраняется до 0,6 г/л, поэтому при более высоких концентрациях белка ликвор следует разводить.

Обязательно колориметрировать опытную пробу против холостой, так как выраженная окраска СМЖ может приводить к ошибкам при определении концентрации белка (завышение результатов) при колориметрии против воды. Если муть начинает оседать, перед измерением на фотоэлектроколориметре пробирку следует тщательно встряхнуть.

!!! ЗАДАНИЕ – ПОДГОТОВИТЬ СООБЩЕНИЕ НА ТЕМУ «Лабораторные показатели ликвора при инфекционно - воспалительных процессах, травмах, опухолях и др. состояниях».

Требования к оформлению: лист А4, поля слева 2 см, справа 1 см, сверху и снизу 1,5 см, шрифт 12, Times New Roman, объем не менее 2 страниц и не более 3 страниц.

**ПРИСЛАТЬ ДО 07.05.2020г. (присланные позже рассматриваться не будут !!!)
НА ЭЛ. АДРЕС mirsaitova73@mail.ru**