

**Спинномозговая жидкость,
лабораторные методы
исследования и их клинико-
диагностическое значение**

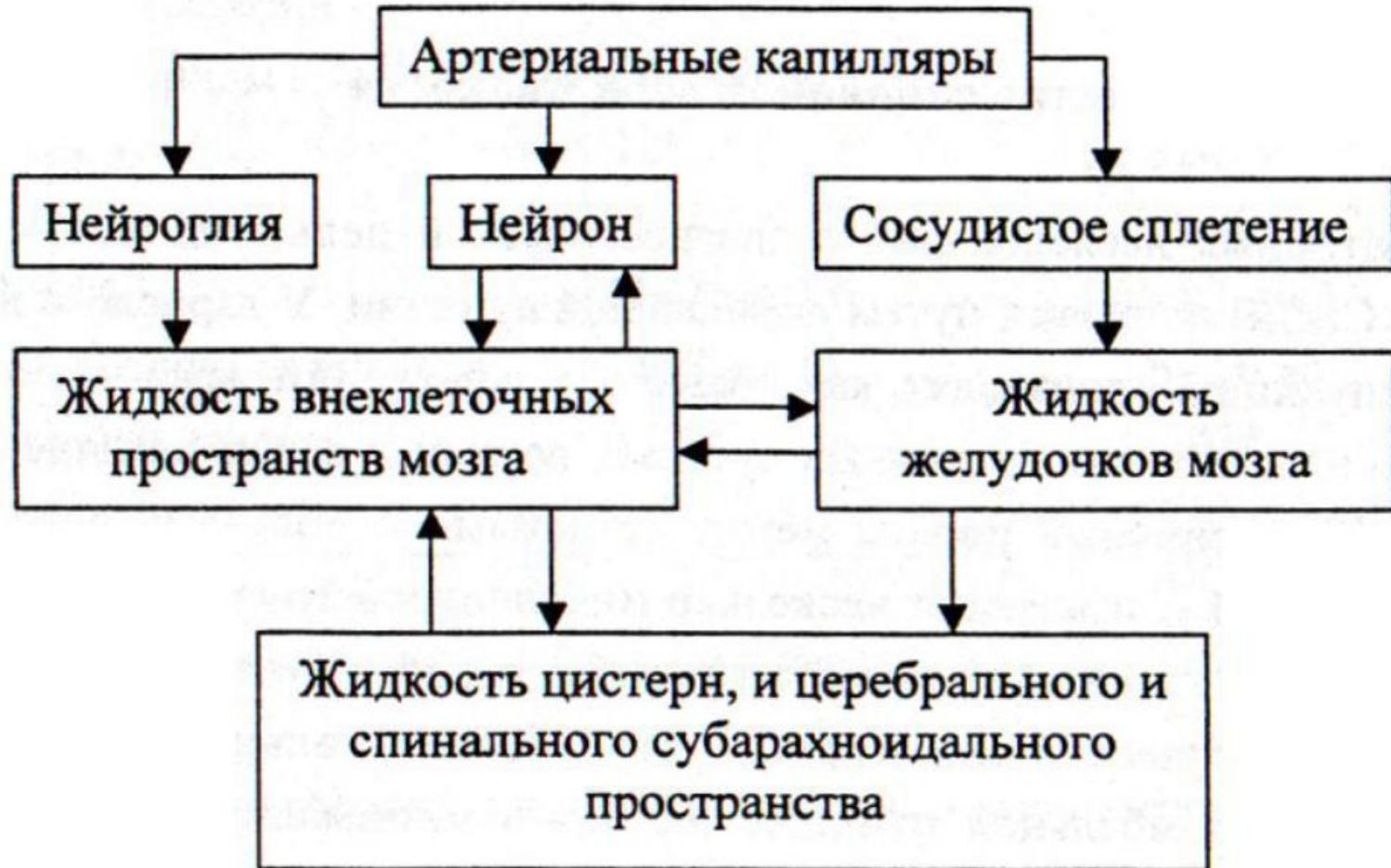
Что такое ликвор?

Ликвор (спинномозговая жидкость, СМЖ) — прозрачная, бесцветная, похожая на воду биологическая жидкость, находящаяся внутри системы желудочков мозга, центральном канале спинного мозга и субарахноидальном пространстве.

Ликвор, заключенный в эластичный мешок твердой мозговой оболочки, окружает головной мозг в виде водяной подушки, а спинной — в виде

рукава. Объем его колеблется соответственно изменениям внутричерепного давления.

Схема основных путей образования ликвора



Физиологическое значение ликвора

1. механическая защита мозга;
2. экскреторная, т.е. удаляет продукты метаболизма нервных клеток;
3. транспортная, транспортирует различные вещества, в том числе кислород, гормоны и д.р. биологически активные вещества;
4. стабилизация мозговой ткани: поддерживает определенную концентрацию катионов, анионов и pH, что обеспечивает нормальную возбудимость нейронов;
5. осуществляет функцию специфического защитного иммунобиологического барьера.

Показания для взятия

1. Подозрение на заболевания головного и спинного мозга (травматические, неопластические, дегенеративные, воспалительные)
2. Мониторинг ответа на терапию воспалительных заболеваний ЦНС
3. Болезненность шеи (не) сопровождающаяся гипертермией

К сожалению, на основании исследования СМЖ диагноз не ставится, НО как дополнительный метод исследования помогает при дифференцировке заболеваний.

Он сопровождается другими методами диагностики МРТ, КТ, Б/Х, ОАК, серологические исследования – ПЦР; гистология и т.д

Противопоказания

1. Тяжелые коагулопатии
2. Неоправданные анестезиологические риски
3. Тяжелая травма позвоночника
4. Высокое внутричерепное давление (также нельзя использовать анестезиологические препараты, которые повышают ВЧД, например, кетамин для кошек). Для диагностики ВЧД делаем УЗИ базиллярной артерии, МРТ, за неимением этого ориентируемся на общие симптомы : угнетенное состояние, горизонтальный нистагм, неравномерное расширение зрачков, повышенное АД и т.д

Правила взятия ликвора

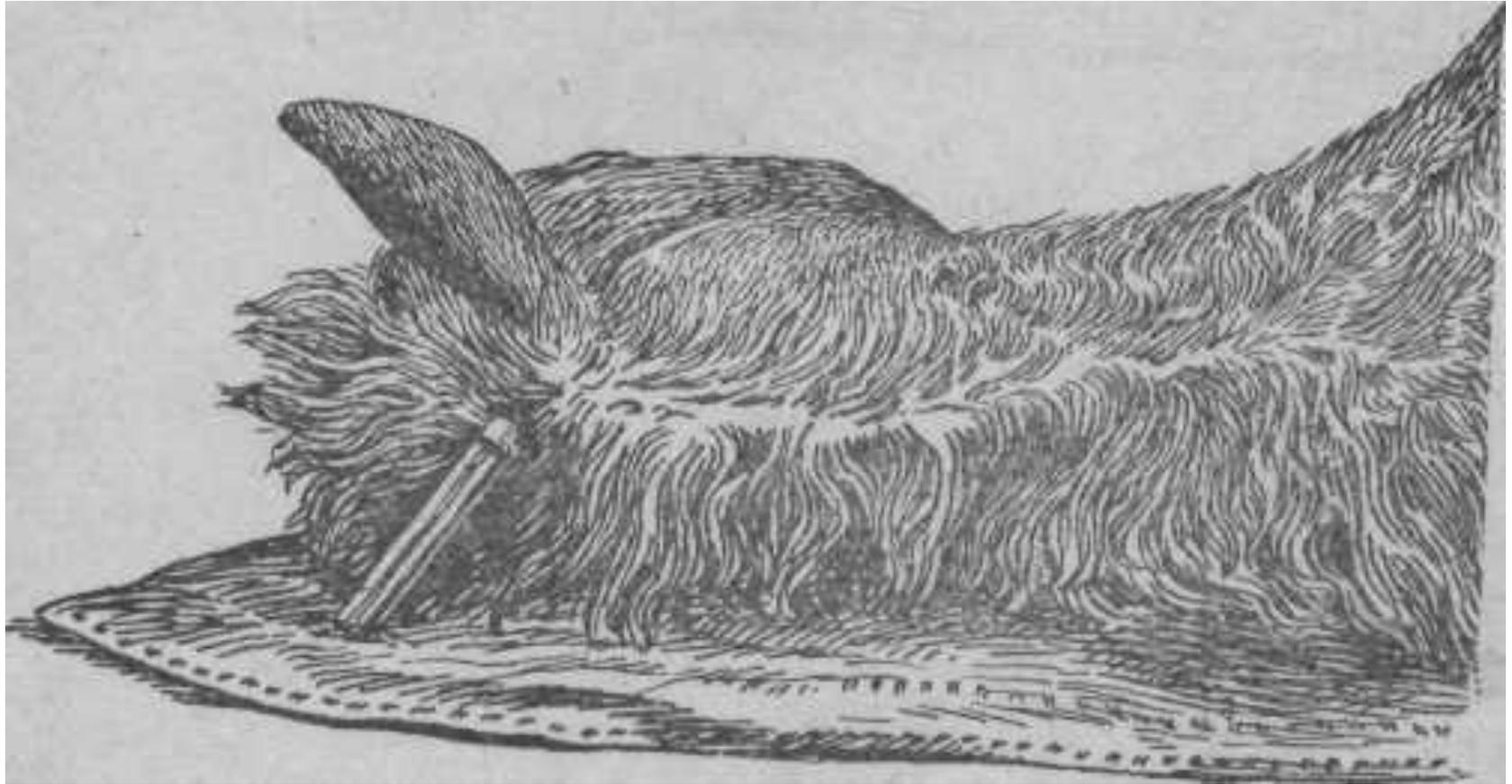
У лошади и КРС

СМЖ получают методом субокципитального прокола и цервикальной пункцией.

Цервикальный: Взятие ликвора производится на стоящем животном. Для прокола используется игла Вира, игла Синева, а также инъекционная игла длиной не менее 6 см. Прокол производится между вторым и первым шейными позвонками в точке, где мысленно пересекаются линии, проведенные от крыльев атланта и соединяющие между собой его углы. Животное фиксируется с помощью закрутки, а у больных животных, в стадии угнетения, пункция возможна и без фиксации. Подготовка места операции состоит в выстригании шерсти и смазывании кожи настойкой иода. При проколе твердой мозговой оболочки создается осязательное впечатление, такое как будто бы прокалывается пергаментная бумага. Это своеобразное ощущение и служит критерием для прекращения дальнейшего вкалывания иглы. Мандрен после этого извлекается и ликвор вытекает.

Окципитальный прокол производится на поваленном животном. При надлежащей фиксации головы, по Синеву, прокол возможен на стоящей лошади при условии устранения кивания головой (приведение и отведение), которое представляет большую опасность при проколе. Местом операции является «ямка», на которой лежит ремень уздечки. Ямка расположена на расстоянии 5—6 см от гребня затылка и определяется легко при давлении пальцем. Грива и шерсть перед проколом удаляются, кожа очищается спиртом и дезинфицируется настойкой иода. Острая игла с просветом, закрытым мандреном, вкалывается в ткани гребня до мембраны, прикрывающей foramen

Взятие ликвора из церебромедуллярной цистерны у лошади



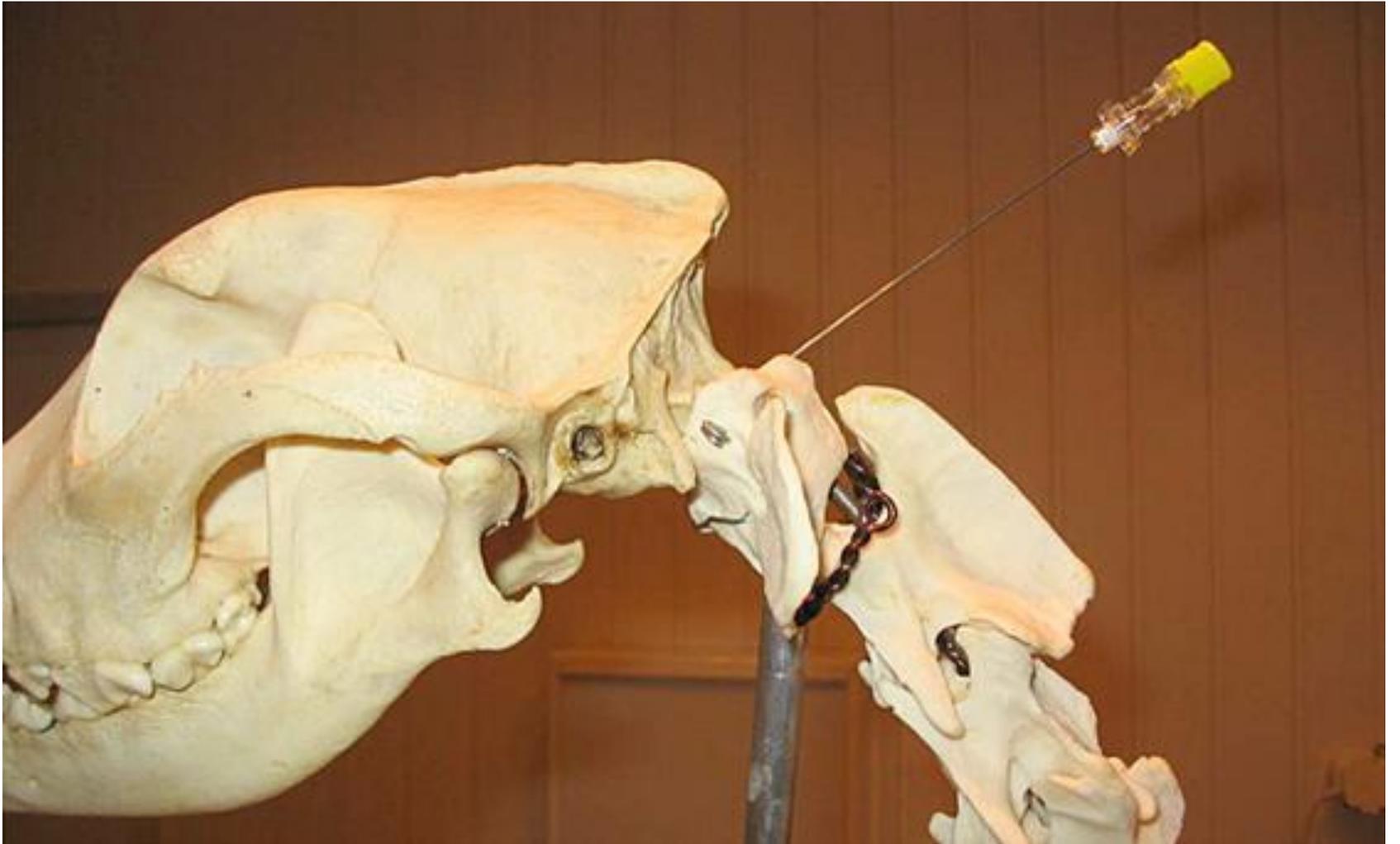
Правила взятия ликвора

У кошек и собак

Субокципитальная (шейная) пункция. Укладка животного в боковом положении, остистые отростки параллельны плоскости стола. Голову пациента наклоняют (без особого усилия), чтобы увеличить пространство между затылочной костью и дорсальной дужкой атланта. Анатомические ориентиры — крылья атланта и наружный затылочный гребень.

Место вкола иглы — средняя точка между затылочным гребнем и линией, мысленно проведенной между крыльями атланта (обычно в этом месте находится естественное углубление)

В месте пункции выбривают волосы, кожу обрабатывают как операционное поле (не йодсодержащими растворами). Иглу вводят под прямым углом к коже. Косой срез на конце иглы при этом должен быть ориентирован краниально.

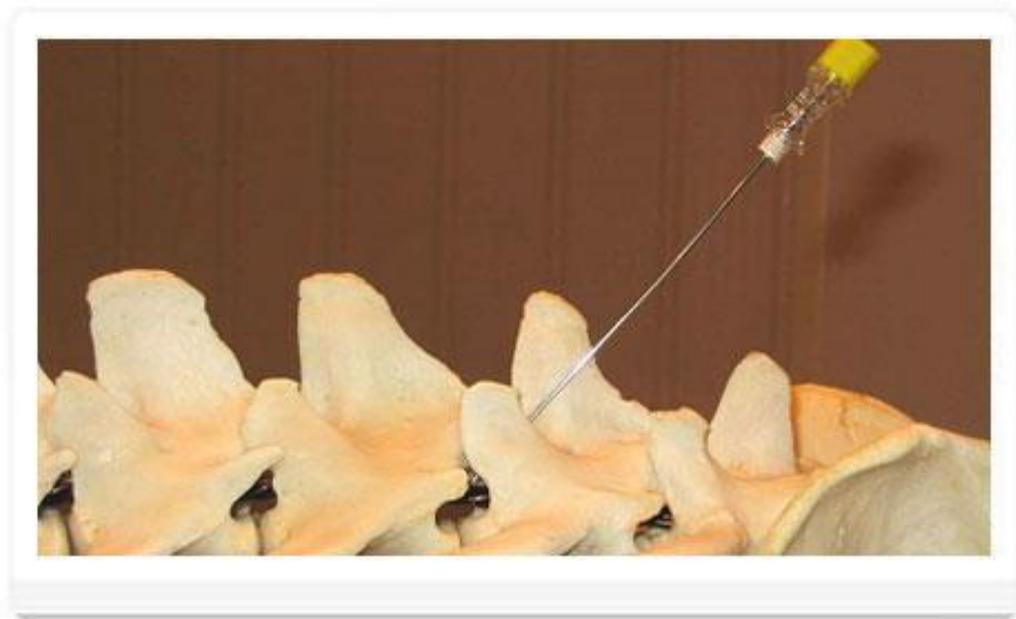


Правила взятия ликвора

У кошек и собак

Люмбальная (поясничная) пункция. Животное укладывают в вентральное положение, тазовые конечности вытягивают краниально вдоль тела и фиксируют. Это позволяет согнуть ПС и увеличить расстояние между дужками позвонков. Цель — ввести иглу через дорсальное межпозвонковое пространство между позвонками или LV ...LVI у собак и в LVI....LVII у кошек.

Место пункции подготавливают с соблюдением правил асептики. Ориентиры — дорсальные остистые отростки поясничных позвонков (LVII по размеру меньше других и находится между крыльями подвздошной кости, но именно он служит ориентиром при поиске остистых отростков LIV, LV, LVI). Иглу вводят перпендикулярно коже, латерально костистым отросткам LIV, LV, LVI, каудальнее междискового пространства и, по касательной к остистому отростку, проводят вниз к его основанию. Пройдя через желтую связку, иглу продвигают в полость позвоночного канала до упора в дорсальную поверхность тела позвонка. Подтверждением того, что игла находится в позвоночном канале, служит подергивание у пациента хвоста или тазовых конечностей



Сколько необходимо для анализа?

- У собак 0,2 мл /кг ; 1 мл/кг, но не более 5 мл на животное. Не более 1 мл за 30 сек
- У кошек 0,5 – 1 мл
- У котят 10 – 20 капель

У других видов с/х животных (КРС и лошадь) удавалось собрать до 70 мл ликвора, но для стандартного исследования (цитология, определение клеточного состава, белок) будет достаточно 10 мл у с/х животных, 0,5-2 мл у МДЖ. Для проведения ПЦР, бак.посева соответственно количество ликвора необходимо будет увеличить, но с безопасностью для состояния животного.

Путевая кровь

Первые 5 капель ликвора удаляют, что позволяет освободиться от примеси «путевой» крови, в результате повреждения иглой кровеносных сосудов, расположенных в области эпидурального пространства.

- 1) Затрудняет исследование ликвора и подсчет клеточности в камере
- 2) Незначительно влияет на общую клеточность и количество белка
- 3) При субарахноидальном кровотечении >12 часов в мазке может наблюдаться эритрофагоцитоз
- 4) При кровотечении > 1-2 дней появляется ксантохромия

Нельзя проводить более 3 пункций, если они сопровождаются кровью, так как это может привести к повреждению СМ.

При появлении путевой крови ликвор собирается не менее чем в 3 пробирки

Критерии отличия истинной эритроцитарии от «путевой»

Истинная эритроцитария	Путевая кровь
Субдуральное кровоизлияние, ЧМТ	
Все порции СМЖ окрашены кровью	Окрашена чаще только первая порция
Количество эритроцитов примерно равно во всех пробах	Различное кол-во эритроцитов
СОЭ более 2 часов	СОЭ 15-20 минут
После центрифугирования ликвор ксантохромной окраски	После центрифугирования бесцветная
Не образуется кровяной сгусток	1 мл крови свертывается в течении 30-40 минут

Пробирки для забора

Не рекомендуется брать:

1. в стеклянные пробирки, т.к они вызывают адгезию клеток на себя и уменьшается количество лейкоцитов.
2. в пробирки с ЭДТА, т.к он может ложно повышать уровень белка

Можно набрать в:

1. Эппендорфы
2. Пробирки для бак. посева



Лабораторное исследование

ликвора

Ликвор следует исследовать немедленно после пункции (в течение 30-60 минут), так как клетки лизируют с большой скоростью, однако для определения некоторых биохимических показателей возможно использование охлажденных (не более 4-8 часов) образцов.

При невозможности немедленного исследования добавляют:

- а. 4%т или 10% формалин
- б. 50-90% спирт
- в. 20% альбумин
- г. аутологическую сыворотку

Основными этапами исследования являются:

- макроскопическое исследование;
- микроскопическое исследование;
- биохимическое исследование;
- бактериологическое и бактериоскопическое исследование.

Макроскопическое

ИССЛЕДОВАНИЕ

Цвет

в норме спинномозговая жидкость бесцветна и по виду не отличается от воды. Цвет ее определяют, сравнивая пробирку с материалом с такой же пробиркой, заполненной водой на белом фоне. Он может изменять при различных патологических процессах:

красный – примесь неизмененных эритроцитов (эритроцитархия). Определить ее можно при помощи тест-полосок (ГемоФАН), которые имеют 2 шкалы сравнения: одна из них меняет цвет при наличии интактных эритроцитов, другая – при наличии свободного гемоглобина в ликворе; гемолиз, путевая кровь

ксантохромный (желтый, желто-коричневый, розовый, коричневый) окрас возникает в присутствии оксигемоглобина, метгемоглобина и билирубина;

розовый цвет ликвору придает оксигемоглобин, освободившийся из лизированных эритроцитов;

желтый цвет обусловлен высоким содержанием билирубина, который образуется из гемоглобина. Для определения билирубинархии и ее выраженности используют тест-полоски (ИктоФАН), их реакгентная зона меняет цвет от бледно-розового до насыщенного розового в зависимости от концентрации билирубина;

коричневый цвет ликвору придают метгемоглобин и метальбумин, они появляются при наличии инкапсулированных гематом и геморрагий в ЦНС;

зеленая окраска возникает при выраженной билирубинархии, так как происходит переход билирубина в биливердин – пигмент оливкового цвета. Иногда она обусловлена примесью гноя.

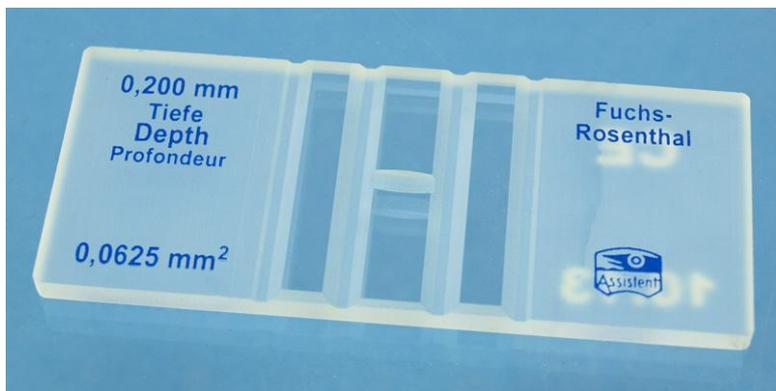
Прозрачность

Прозрачность – в норме спинномозговая жидкость прозрачная, определяют этот параметр, сравнивая полученный материал с дистиллированной водой. Легкое помутнение ликвора наблюдается при лейкоцитозе свыше $200 \times 10^6/\text{л}$, содержания эритроцитов более $400 \times 10^6/\text{л}$, общего белка – более 3 г/л. Если после центрифугирования спинномозговая жидкость становится прозрачной, то мутность ее обусловлена форменными элементами, если остается мутной – микроорганизмами. Опалесценция ликвора возникает при высокой концентрации фибриногена.

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 или желеобразный сгусток. Ликвор, содержащий большое количество грубодисперсных белков сразу после выпуска свертывается в виде желеобразного сгустка.



Где исследуют?



Камера Фукса – Розенталя

Не окрашенный ликвор:
Эритроциты двояковогнутые диски
бледно-оранжевые
Лейкоциты более зернистые

Для подсчета лейкоцитов препарат окрашивают одним из реактивов:

1. 5 мл 10% раствор ледяной уксусной кислоты + 0,1 метилового фиолетового + вода до 50 мл – время окрашивания 2 минуты;
2. Реактив 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.

Хорошие результаты исследования форменных элементов дают: окраска по Алексееву, Розиной, Возной

Клеточный состав ликвора

Норма	Плейоцитоз
Кошки <8 кл/мкл	Слабый 6-50 кл/мкл
Собаки <5 кл/мкл	Умеренный 51-1000 кл/мкл
	Значительный > 1000 кл/мкл

По Федотову, количество форменных элементов в одном поле зрения(под микроскопом): у здоровых лошадей 0—1 кл/ мм³, у крупного рогатого скота 0—2 кл/мм³, у овец и коз 1—2 кл/мм³, у собак 0—1 кл/мм³, у кроликов 1—2 кл/мм³

Ликвор очень малоклеточная жидкость!

Измерение общего белка

В ликворе уровень белка очень низкий, поэтому следует определять не только общий уровень белка, но и уровень микроальбумина (в том числе и в моче)

Исследование проводят по методу Эсбаха – Ниссля, Робертса – Стольникова и рефрактометром

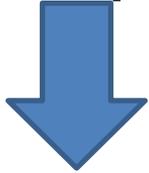
Уровень нормального белка увеличивается в rostro-каудальном направлении, т.е в люмбальной цистерне его больше (<45 мг/дл), чем в цереброспинальной (<25-30 мг/дл)

85-90% всего белка ликвора - альбумин, 5-12% - гамма-глобулины

Общее количество белка у разных ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Вид животного	Количество белка в мг%
Лошадь	29,7 - 40
КРС	23,3 - 30
Овцы и козы	20 - 25
верблюды	25 - 32
собака	15 - 20
кошка	8 - 16

Гиперпротеинария – повышенное содержание белка в ликворе



Без повышения уровня клеточности называется альбуминово-цитологическая диссоциация (грыжа диска, после судорог при температуре, неоплазии, ишемическая миелопатия)



С повышением уровня клеточности

Повышение наблюдается при

Нарушение работы ГЭБ

Некроз

Локализованное образование иммуноглобулинов (опухольями в интратекальное пространство)

Затруднение оттока ликвора и повышенное образование глобулинов

Дополнительные ИССЛЕДОВАНИЯ

Глюкоза (ограниченная чувствительность), уровень зависит от количества в общем кровотоке (60-80% концентрации в плазме) и меняется скачкообразно (кровь -> ликвор) от 1 до 3 часов. Уровень глюкозы снижается при бактериальных инфекциях, кровотечениях (гликолитические свойства бактерий)

КФК, ЛДГ, АСТ – повышаются при поражении ЦНС с дегенерацией миелина

Определение титра антител, например: риккетсионные, протозойные, грибковые заболевания определяются эффективнее, чем при исследовании крови.

Бактериологический посев при плеиоцитозе (много нейтрофилов). Растет плохо.

ПЦР (вирусы, гибки – токсоплазмоз, FIP, вирусный лейкоз кошек, чума плотоядных)

Электрофорез белков позволяет выявить природу заболевания (неопластическое, дегенеративное, воспалительное и т.д.)

Цитологическое исследование

Цитоцентрифугирование (100-150 об/мин)

Седиментация

Окрашивание по Романовскому, Diff – Quick использовать не рекомендуется, вызывает дегенерацию клеток. По Грамму – обнаружение бактерий, метиленовый синий – для определения грибов.

Нормальная цитология

Моноцитоидные клетки 60-100%

Малые лимфоциты 0 -27%

Нейтрофилы 0 -9% (иногда до 25%,
например при путевой крови)

Макрофаги 0-3%

Эозинофилы 0-1%

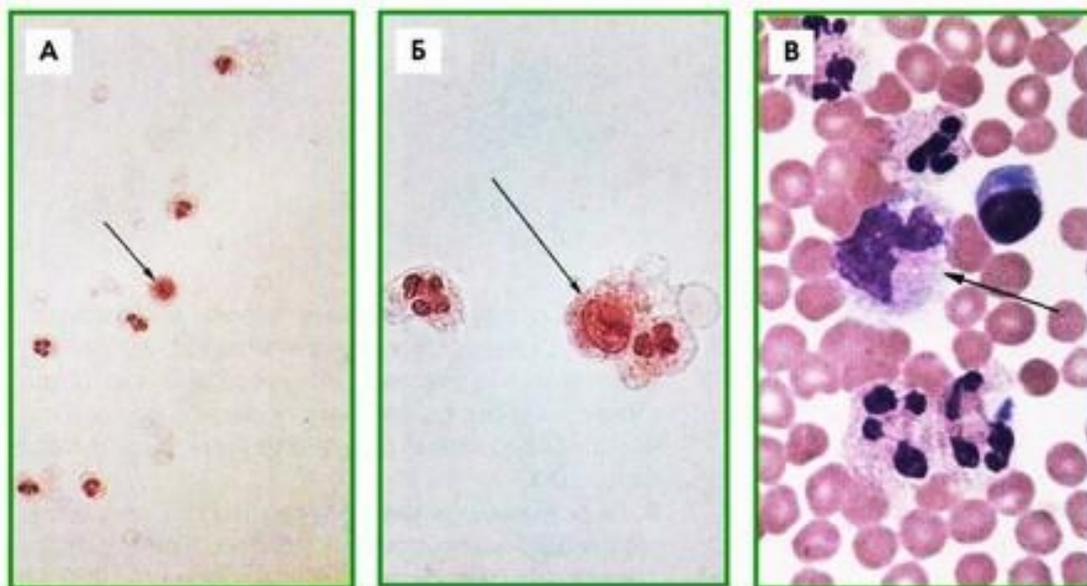


Рис. 129. Моноциты в ликворе.
А. Моноцит в центре поля зрения на фоне лизированных эритроцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Препарат с реактивом Самсона. $\times 400$. Б. Моноцит и два сегментоядерных нейтрофила. Препарат окрашен реактивом Самсона. Иммерсия. $\times 1000$. В. Активированный моноцит в центре поля зрения на фоне эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцита. Препарат окрашен азур-эозином. Иммерсия. $\times 1000$

Цитология ликвора

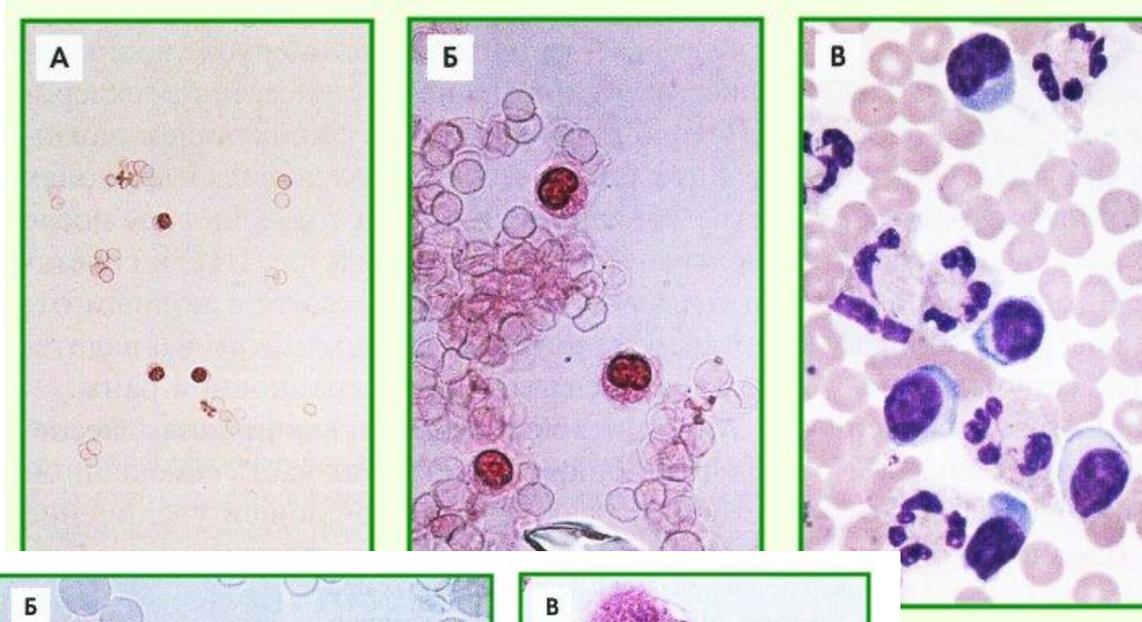


Рис. 128. Лимфоциты в ликворе. А. Лимфоциты на фоне частично лизированных эритроцитов. Препарат с реактивом Самсона. $\times 400$. Б. Глыбчатая структура хроматина в ядрах малых лимфоцитов и узкий ободок бледно-розовой цитоплазмы. Препарат окрашен реактивом Самсона. Иммерсия. $\times 1000$. В. Четыре активированных лимфоцита на фоне эритроцитов и гиперсегментированных нейтрофилов. Препарат, окрашенный азур-эозином. Иммерсия. $\times 1000$

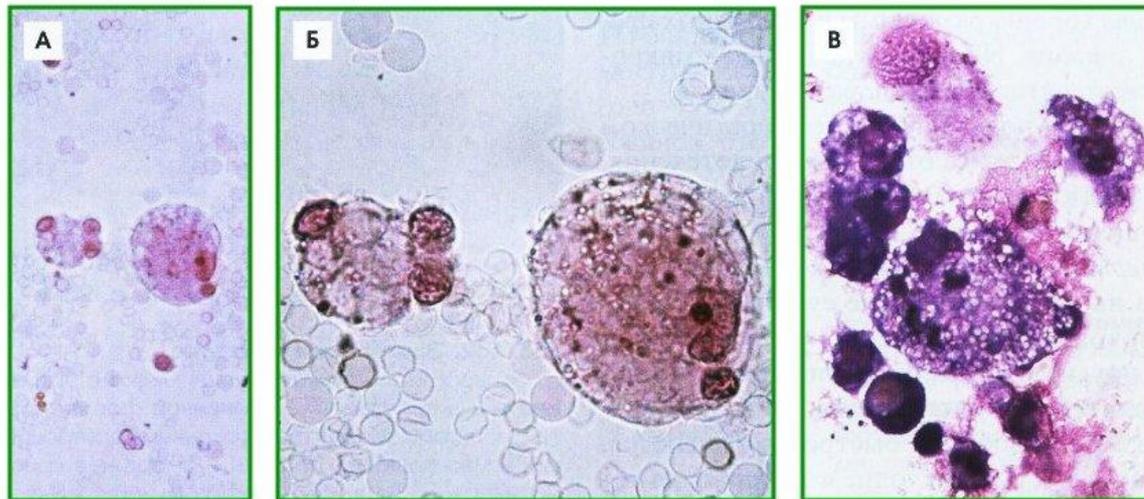


Рис. 130. Макрофаги в ликворе. А. Два макрофага в центре поля зрения на фоне частично лизированных эритроцитов. Препарат окрашен реактивом Самсона. $\times 400$. Б. То же поле зрения: два макрофага округлой формы, разного размера, с фагоцитированными лимфоцитами, эритроцитами и образовавшимися при внутриклеточном гемолизе аморфными кристаллами гемосидерина. Фон препарата – частично лизированные эритроциты. Иммерсия. $\times 1000$. В. Пять макрофагов с фагоцитированными клетками и недифференцируемыми клеточными частичками. Препарат окрашен азур-эозином. Иммерсия. $\times 1000$

Плейоцитоз

Нейтрофильный: >50%

Смешанный: два или более вида клеток
занимает >20% всех клеток

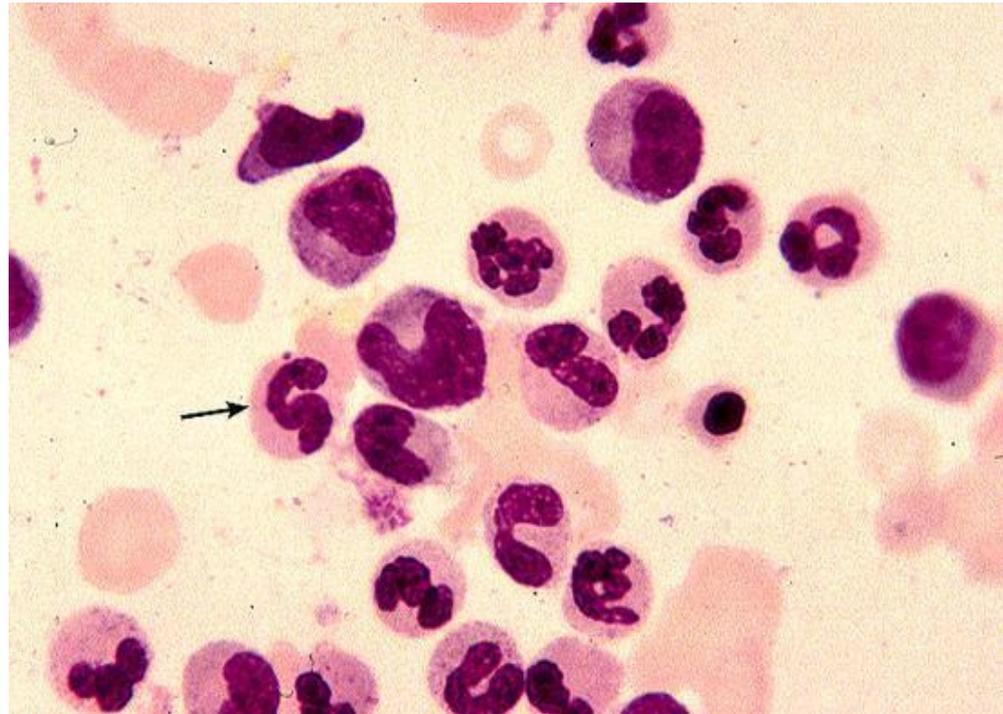
Мононуклеарный >75%

Лимфоцитарный >75%

Эозинофильный >20%

Увеличение процента нейтрофилов без плейоцитоза

- У некоторых животных может быть в норме
- Слабое или начальное воспалительное заболевание
- Невоспалительное заболевание ЦНС
- Заболевание отдаленное от места взятия
- Гемодилюция



Нейтрофильный плеиоцитоз

Инфекционное воспаление

Бактериальный менингоэнцефалит
(Staphylococcus spp., Esherichia coli,
Pasteurella Bacteroides,
Fusobacterium, Peptostreptococcus,
Eubacterium, Proprionobacterium,
Streptococcus)

FIP кошек

Криптококкоз

Гистоплазмоз

Аспергиллез

Эрлихиоз

Токсоплазмоз кошек

Токсокароз, дирофилляриоз,
цистицирроз

Неинфекционное воспаление

Стероид-зависимый менингит-
артериит

Грыжа межпозвоночного диска

Ишемическая миелопатия

Дефицит тиамина у кошек

Киари-подобная мальформация

Неоплазия(лимфома,
астроцитомы, остеосаркома,
менингиома, плазмоцитомы)