

VOORSCHRIFTEN:

IMMUNOLOGIE

Laboratorium voor donor- en Praenataal bloedgroepen onderzoek

Laboratorium voor Bloedgroepenserologie

Laboratorium voor Immuno-Haematologie

Laboratorium voor Testserumbereiding

L A B O R A T O R I U M

voor

BLOEDGROEPEN SEROLOGIE

BROMELINE - OPLOSSING

=====

Voorschrift voor 1 liter

oplosvloeistof : 900 ml NaCl - opl. 0,9%
+
+ 100 ml buffer

Buffer bestaat uit : 5 ml opl. A
95 ml opl. B

Oplossing A = 11,876 g Na_2HPO_4 } per liter
Oplossing B = 9,078 g KH_2PO_4 }

5 g bromeline oplossing in 1 ltr oplosvloeistof

Toevoegen 2 g complexon III met Na_2 (EDTA)

Na oplossing met een der beide buffer componenten

pH op 5,5 precies brengen

Dan in flessencentrifuge afdraaien en helder bovenstaande
filtreren.

Dit wordt gedaan met EKB-filter 14 cm

Dan invriezen.

Bromeline wordt betrokken van : N C B Ohio Cleveland

(bromelineoplossing werd vroeger op gelijke wijze zonder
complexon gemaakt)

CONTROLE TESTSERA

=====

Testserum anti B

Titerbepaling : Een titratie van 10 buisjes van het testserum maken in phys.zout oplossing (2 dr. verdunning)
Hieraan 2 dr. van een 2% erythrocytensuspensie van bloedgroep B toevoegen.
Mengen, daarna de buisjes centrifugeren 1 minuut bij 1000 rpm.
De agglutinaties macroscopisch beoordelen door de sedimenten op te tikken (de sterkten aangeven met +++ ++ +⁺ + (+) en +)

Specificiteitstest

Het testserum bij 16°C incuberen met ongeveer 10 verschillende A₁, A₂ en O erythrocytensuspensies, gedurende 1½ uur.
Reacties microscopisch aflezen.

Aviditeitstest

Op een melkglasplaat bij 1 druppel testserum 1 dr. 10% erythrocytensuspensie van bloedgroep B brengen. Mengen, de plaat een weinig in beweging brengen en noteren na hoeveel seconden de agglutinatie begint en na hoeveel seconden de agglutinatie totaal is. Ook aangeven of de totale agglutinatie grof, middelgrof of fijn is.

Testserum anti A

Dit testserum op dezelfde wijze controleren als testserum anti B, alleen nu met A_1 , A_2 , A_2B en A_4 erythrocytensuspensies de titraties maken.

Specificiteitstest

met B en O erythrocyten

Aviditeitstest

met A_1 en A_2 erythrocyten

Testserum anti A+B

Dit testserum op dezelfde wijze controleren als testserum anti B
De titraties maken met A_1 , A_2 , A_2B en A_4 ery's

Specificiteitstest

met O en B erythrocyten

Aviditeitstest

met A_1 , A_2 en B erythrocyten

Testserum anti A_1

Een titratie van het testserum maken van ± 7 buisjes in phys.zout oplossing (2 dr. verdunning) bij $20^{\circ}C$ en $37^{\circ}C$
Hieraan 2 druppels van een 2% erythrocytensuspensie van bloedgroep A_1 toevoegen.
Mengen, 1 uur incuberen en de reacties microscopisch aflezen.

Specificiteitstest

Het testserum bij $20^{\circ}C$ en $37^{\circ}C$ met ± 5 suspensies van bloedgroep A_2 en ± 8 suspensies van bloedgroep O en B 1 uur incuberen.
De reacties microscopisch aflezen.

Testserum anti M en anti N

Titerbepaling : Bij 16°C en 20°C twee titraties van het testserum maken (2 dr. verdunning)
Aan de eerste titratie 2 dr. van een + 3% suspensie van MM (bij anti N serum resp. NN) erythrocyten toevoegen.
Aan de tweede titratie 2 dr. van een + 3% suspensie van MN erythrocyten toevoegen.
Mengen en 1 uur incuberen bij de beide temperaturen.
Hierna de reacties microscopisch aflezen.

Specificiteitstest

Het testserum 1 uur bij 16°C en 20°C incuberen met verschillende A₁ NN, B NN en O NN erythrocyten-suspensies (bij testserum anti N met verschillende A₁ MM, B MM en O MM erythrocytensuspensies)
De reacties microscopisch aflezen.

N.B. Testserum anti N (van *Vicia Gramina*) controleren bij 20°C en 37°C.

Anti P₁ serum

Titerbepaling : Twee titraties bij 16°C en twee titraties bij 20°C
make (2 dr. verdunning)
Aan de eerste reeksen 2 dr. van een + 3% suspensie
van bekende sterke P₁ + erythrocyten toevoegen.
Mengen en 1 uur bij beide temperaturen incuberen.
Reacties microscopisch in zout aflezen.

Specificiteitstest

Het anti serum bij 16°C en 20°C incuberen met
verschillende A P₁⁻, B P₁⁻ en O P₁⁻ erythrocyten
suspensies (1 uur)
Reacties microscopisch aflezen in zout.

Anti H serum

Titraties maken bij 20°C en 37°C met + 3% suspensie
van A₁, A₂ en O testerythrocyten (alles in duplo)
Mengen, 1 uur incuberen bij 20°C of 37°C.
De reacties microscopisch aflezen.
Van de verdunning die negatief is in zout, de
indirecte Coombstest verrichten met anti γ globulinen
en anti non γ globulinen serum.

Absorptie proeven

Met speeksel van een secretor en een non secretor
van bloedgroep O (zie speeksel-onderzoek)
Met het speeksel van een secretor moet absorptie
optreden.

Contrôle Coombssera

Verdunde Coombssera

Specificiteitstest

- A 15 normale sera incuberen met 1 erythrocytensuspensie gedurende 1 uur bij 37^oC (in duplo)
Indirecte Coombstest verrichten met Coombsserum wat momenteel wordt gebruikt en het te controleren Coombsserum.
- B Eén AB serum incuberen met 15 verschillende erythrocytensuspensies gedurende 1 uur bij 37^oC (in duplo)
Indirecte Coombstest verrichten met Coombsserum wat momenteel wordt gebruikt en het te controleren Coombsserum.

Titerbepaling : Titraties maken van het te controleren Coombsserum en het Coombsserum dat momenteel wordt gebruikt op een melkglasplaat en in buisjes met :

- gesensibiliseerde D erythrocyten
- gesens. Kell erythrocyten
- gesens. Fy(a) erythrocyten
- gesens. Le(a) of Le(b) erythrocyten
- gesens. koude erythrocyten

De reacties in buisjes bij 37^oC worden na 1 uur incuberen microscopisch afgelezen.

Aviditeitstest

De directe Coombstest op zoveel mogelijk verschillende gesensibiliseerde erythrocyten (bv. van pasgeborene) verrichten op melkglasplaat met beide C Coombssera.
De sterkten van de reacties opgeven in +++ ++ + of (+)

Onverdunde CoombsseraSpecificiteitstest

- A 15 normale sera incuberen met één erythrocyten-suspensie 1 uur bij 37°C (in duplo)
Indirecte Coombstest verrichten met een onverdunde Coombsserum dat momenteel wordt gebruikt en het te onderzoeken Coombsserum.
- B Eén AB serum incuberen met 15 verschillende erythrocytensuspensies van gestold bloed, dat bij 4°C was bewaard (in duplo)
De indirecte Coombstest ook met beide Coombssera verrichten. Alle reacties microscopisch aflezen.

Titerbepaling : Met gesensibiliseerde D erythrocyten
gesens. Kell erythrocyten
gesens. Fy(a) erythrocyten
gesens. Le(a) of Le(b) erythrocyten
gesens. koude erythrocyten en op de zelfde wijze als bij de verdunde Coombsserum-controle
Tevens het serum controleren met erythrocyten van H A patiënten.

BDB

0,23 g benzidine oplossen in 45 ml 0,5 N HCl
0,175 g Na NO₂ in 5 ml gedest. water
30 min. samen incuberen bij 0°C onder af en toe roeren.
Uitvullen in 0,5 ml ampullen bij -7.8°C d.w.z.
koolzuursneeuw/alcohol mengsel.
Bewaren bij -20°C.

Controle anti Kell serum

Titerbepaling : Drie titraties van 10 buisjes van het antiserum maken (1 dr. verdunning) en 1 dr. + 3% K+ erythrocyten suspensie toevoegen.

Bij de eerste titratie 1 druppel bromeline toevoegen, alles 1 uur bij 37°C incuberen.

De bromeline titratie na 1 uur microscopisch aflezen. Indien van de andere twee titraties de reacties in zout negatief zijn, dan de indirecte anti globuline test verrichten met anti γ globuline serum op de eerste titratie.

De tweede titratie, na 3x wassen, incuberen met 1 dr. vers mensecomplement gedurende 15 min. bij 37°C (II-step)

Hierna weer 3x wassen en dan anti non γ globuline serum (of anti complement serum) toevoegen.

Alle reacties microscopisch aflezen.

Specificiteitstest

Het antiserum met + 10 verschillende A₁ K-, B K- en O K- erythrocytensuspensies bij 37°C incuberen. (1 uur) voor de vier verschillende technieken:

- I reacties in zout, na 1 uur incuberen microscopisch aflezen.
- II reacties in bromeline, na 1 uur incuberen.
- III reacties voor de indirecte Coombstest met anti γ globuline serum.
- IV reacties voor de indirecte Coombstest met anti non γ globuline (of anti - complement) serum in II-step, zoals bij de titerbepaling beschreven is.

Controle anti Fy(a) en anti Jk(a) serum

Dit gaat op de zelfde wijze als de controle van anti Kell serum, met Fy(a+) en Fy(a-) of Jk(a-) en Jk(a+) erythrocytensuspensies.

Controle anti S serum

Dit gaat op de zelfde wijze als de controle van anti Kell serum.

De titraties echter inzetten met SS en Ss erythrocytensuspensies.

Ook een titratie maken voor de zout/albumine techniek met SS en Ss erythrocytensuspensies en de specificiteitstest ook met de zout/albumine techniek verrichten.

N.B. Sommige anti S sera bevatten uitsluitend complete antistoffen. De titerbepaling en de specificiteitstest dan ook bij 16°C of 20°C verrichten.

ELUAAT vlg's Weiner

=====

Materiaal : Erythrocyten opgevangen in Na - citraat (9:1)

50% alcohol (met aq.dest uit 96% alcohol verdund)
voorgekoeld tot tenminste -6°C .

Methode

Erythrocyten 6x wassen in zout.

Pipetteer maximaal 10 cc van deze erythrocyten packed in een droog steriel 100 cc flesje, bij -20°C incuberen tot erythrocyten juist bevroren zijn.

Zo snel mogelijk bij kamertemperatuur ontdooien (waterbad) voeg tien maal de hoeveelheid aan 50% alcohol (tenhoogste op -6°C gebracht) toe, meng dat goed en laat het flesje 1 tot $1\frac{1}{2}$ uur bij -20°C staan. Daarna uitvullen in rondbodem buizen en zeker 10 min. bij 4000 toeren centrifugeren.

Bovenstaande verwijderen en met aqua dest het sediment wassen tot bovenstaande niet meer of nauwelijks haemolytisch is (+ 5x).

Zonodig het sediment met wattendragers losmaken.

Bij de laatste keer wassen wordt het sediment zo packed mogelijk gemaakt, een half volumedeel phys.zout toegevoegd en bij 37°C gedurende 1 uur incuberen, af en toe mengen.

5 min. scherp afcentrifugeren, bovenstaande afpipetteren en invriezen.

UREUM ELUAAT
=====

In 100 cc flesjes (droog) 20 ml 6x gewassen packed erythrocyten pipetteren en met 80 ml aqua dest haemolyseren. Inhoud flesje met 4 N HCl (pH meter) op pH 5.4 brengen, daarna in rondbodembuizen scherp afcentrifugeren en met aqua dest wassen tot bovenstaande niet meer haemolytisch is (+ 5x)

Aan goed afgezogen sediment 1 ml 6 mol Ureum (opgelost in aq.dest) toevoegen, mengen en na 1 uur bij + 4°C incuberen (af en toe mengen)

Afcentrifugeren en bovenstaande 1 nacht in 2 liter phys.zout dialyseren.

ETHER ELUAAT (Lubin)
=====

Erythrocyten 6x wassen, daarna in centrifuge buis.

1 deel packed cells

1 deel zout

2 delen ether

dit mengsel 1 min. schudden en daarna 10 minuten

centrifugeren bij 3000 toeren. Men ziet dan 3 lagen :

de bovenste laag is ether

de 2e laag is stroma

de 3e laag is zout waarin de antistoffen zitten.

ELUAAT vlg Rosenfield
=====

0,4 Packed erythrocyten (6x wassen in phys.zout) schudden met 1 mg digtonine, tot alles gehaemolyseerd is. Haemolysaat met aq.dest wassen tot bovenstaande geen haemolyse meer vertoont.

Sediment mengen met 0,8 ml glycinebuffer (pH 3.0) scherp afcentrifugeren, bovenstaande met Na-loog op pH 7.0 brengen en vervolgens dialyseren om het geheel isotonisch te maken.

ONDERZOEK OP IMMUNO - CONGLUTININEN
=====

Het te onderzoeken serum $\frac{1}{2}$ uur op 56°C verhitten en 1x absorberen met 3x gewassen packed schapenerythrocyten (2 delen ser. - 1 deel cellen) : 20 min. bij 20°C . $1\frac{1}{2}$ uur KT

Het serum uittitreren (2 voudige verdunningen in phys.zout)

Aan 2 dr. verdunning 2 dr. alexinated cells en 2 dr. phys.zout toevoegen.

Incuberen 30 min. op 37°C , dan afdraaien 1 min. op 1000 rpm. en reacties macroscopisch beoordelen.

Alexinated cells

4 ml 5% suspensie van schapenerythrocyten en 4 ml bovine serum (geïnactiveerd 1:2 verdund)

incuberen 15 min. bij 37°C in waterbad.

Hierna suspensie 2x wassen in zout en dan weer 5% suspensie maken.

Hiervan 2 ml nemen en 2 ml geïnactiveerd paardencomplement, 2 ml vers paardencomplement en 14 ml zout toevoegen.

Dit mengsel weer 15 min. bij 37°C in waterbad incuberen.

Daarna de suspensie weer 3x wassen in zout (vooral niet hard draaien).

De bevroren erythrocyten eerst met de 16% glycerol opl. wassen (gelijke delen ery's en glycerolopl.)

Daarna met de 12% opl., de 8% opl., de 4% opl. en de 2% opl.

Vervolgens nog tweemaal wassen in 0,9% NaCl opl.

MINOR CEL POPULATION

=====

Maak een suspensie van het te onderzoeken bloedmonster.

Deze suspensie 3x wassen in phys.zout.

Daarna een 5% suspensie maken.

Meng in een centrifugebuis 4 druppels 5% erythrocytensuspensie en 4 druppels anti B (of anti A) serum, 20 min. bij kamertemperatuur incuberen.

Daarna de suspensie 4x wassen in phys.zout.

Vervolgens weer 5% suspensie maken.

Aan deze 4 druppels 5% suspensie, 4 druppels testerythrocyten-suspensie (ook 5%) B. (resp.A₁) toevoegen.

Gedurende 1 min. schudden.

Dan de suspensie centrifugereren 1 min. bij 1000 rpm. weer voorzichtig mengen en vervolgens nog 2x centrifugereren en 2 + mengen +

Na de derde maal resuspenderen, de suspensie microscopisch bekijken of er zeer kleine agglutinaties (rozetvormige) aanwezig zijn.

POLY-AGGLUTINABILITEIT VAN ERYTHROCYTEN

=====

Benodigdheden

Cholerafiltraat (NV. Philips Duphar A'dam) gedroogd,
volgens voorschrift oplossen in aqua dest.

T-antigeen activeren van erythrocyten

Gelijke delen cholerafiltraat en 3x gewassen O-erythrocyten packed
1 uur bij kamertemperatuur incuberen, af en toe mengen en vervolgens
3x wassen met overmaat fysiologisch zout.

Contrôle

Testsera anti B, anti A en anti A+B geven bij kamertemperatuur met
poly-agglutinabele erythrocyten een agglutinatie, indien bij 37°C
geïncubeerd zal de titer lager zijn.
Voor bloedgroepbepaling de benodigde testsera en een normaal serum,
1 uur met gelijke delen packed met Cholerafiltraat behandelde
O-erythrocyten absorberen tot geen agglutinatie meer optreedt met de
met Cholerafiltraat behandelde cellen.

SCHEIDEN VAN ERYTHROCYTEN VAN VERSCHILLENDE ABO GROEPEN
=====In Petri schaal

20 druppels 1x gewassen + 5% suspensie van te scheiden erythrocyten voegen bij 20 druppels testserum (afhankelijk van bloedgroep anti A of anti B).

+ 10 min. onder voorzichtig mengen bij kamertemperatuur laten agglutineren.

Over pipetteren in centrifugebuis en agglutinataten laten uitzakken (evt. door langzaam af te centrifugeren + 20 min. bij 1000 toeren).

Bovenstaande suspensie afpipetteren en centrifugeren 5 min. bij 2000 toeren.

Sediment resuspenderen tot 5% en gehele behandeling herhalen.

SPEEKSEL ONDERZOEK

=====

Het aantonen van A, B en H substantie in speeksel

Het speeksel 10 min. koken, 5 min. hard centrifugeren en het bovenstaande afpipetteren. Dit bovenstaande onderzoeken.

1. Anti A serum absorberen met gelijke delen speeksel, 40 min. bij 20°C. Hierna dit mengsel uittitreren (2 dr. titratie) en 2 dr. A₁ erythrocytensuspensie toevoegen. 1 uur incuberen bij 20°C. Reacties microscopisch aflezen.

Indien er geen agglutinatie optreedt, bevatte het speeksel A substantie.

Het aantonen van B of H substantie geschiedt op de zelfde wijze met anti B serum en B erythrocyten of met anti H serum, en O erythrocyten.

2. Maak van het speeksel een titratie (1 dr. verdunning) en voeg overal 1 dr. anti A (resp. anti B of anti H serum) toe, 40 min. bij 20°C incuberen. Daarna overal 2 dr. erythrocytensuspensie A₁ (resp. B of O) toevoegen, en 1 uur bij 20°C laten incuberen. Reacties microscopisch aflezen.

Indien in het begin van de titratie geen agglutinatie optreedt, bevatte het speeksel dus genoeg A substantie om al het anti A te absorberen. Later in de titratie zal de hoeveelheid A substantie niet meer genoeg zijn om al het anti A te absorberen, er ontstaat dus een agglutinatie met de A₁ erythrocyten.

Als controle inzetten zowel voor (1) als voor (2)

Anti A serum + zout (40 min. bij 20°C) en daarna A₁ erythrocyten toevoegen 1 uur bij 20°C.

De agglutinatie microscopisch aflezen en beoordelen met +++ ++ of +

Het is het beste altijd een speeksel van een bekende secretor en een bekende non secretor gelijktijdig in te zetten.

Indien men wil weten of een nog onbekende antistof door speeksel wordt geabsorbeerd of niet, maakt men van een speeksel van een bekende secretor en een bekende non secretor een titratie.

Voeg aan elke verdunning een gelijke hoeveelheid onverdund anti serum toe en laat dit 40 min. incuberen bij de temperatuur waarbij het antistof het beste werkzaam was. Voeg daarna een erythrocytensuspensie toe en incubeer nogmaals 1 uur.

De reacties microscopisch beoordelen.