

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

voor

IMMUNO HAEMATOLOGIE

I N H O U D

0704 en 830

=====

1 = Haemolytische anaemieën (routine onderzoek)	2 pag.
2 = Antistoffen tegen erythrocyten	
3 = Antistoffen tegen erythrocyten in aanwezigheid van geneesm. phenacetine, salazopyrine, aspirine, pyramidon	
4 = Antistoffen tegen erythrocyten in aanwezigheid van geneesm. penicilline	
5 = Haemolysinen (monofasisch - biphasisch)	3 pag.
6 = Acid Ham-test	
7 = Kruisproeven	
8 = Osmotische resistentie	2 pag.
9 = Paul en Bunnell	
10 = Enzymbehandelde cellen	
11 = Bisdiazo Benzidine cellen	
12 = Tannine cellen	
a= CrCl ₃ cellen	
b= Cell coating met chroomchloride voor microtiter plaatjes	2 pag.
c= Glutaraldehyde behandeling van erythrocyten	
13 = Mensecomplement	
14 = Ether eluaat vlgs Lubin - 56°C Eluaat	
15 = Antiglobuline reagentia (onverdund)	
16 = Contrôle testsera, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	6 pag.
17 = Anti complementserum	2 pag.
18 = Sugarwatertest	2 pag.

HAEMOLYTISCHE ANAEMIEEN

Routine onderzoek

Erythrocyten patient

1) Bloedgroep en rhesusphenotype:

Bij autoagglutinatie van de erythrocyten, suspensie 10 min. in waterbad van 37°C, snel centrifugeren in verwarmde cups (eventueel in centrifuge van 37°C) en drie keer wassen met phys.zout van 37°C.

2) Directe antiglobulinetest:

Screening met antiglobulineserum anti totaal en anti non γ ; 1 dr. serumverdunding 1:4 t/m 1:32 (4 buisjes)
Aan elke dr. serumverdunding 1 dr. 3x gewassen 5% erythrocyten-suspensie van de patient toevoegen.
Mengen en na 1 uur incuberen bij 37°C, microscopisch aflezen.

Contrôle:

Erythrocytensuspensie patient in AB serum.

Als een van de sera of beide de patiente-erythrocyten agglutineren de specifieke antiglobulinesera anti IgG, anti IgA, anti IgM, anti IgD, anti IgE en anti C' titreren.

Als de directe antiglobulinetest met anti IgG serum positief is, kan men de subtypesera anti IgG₁, anti IgG₂, anti IgG₃ en anti IgG₄ titreren, en: anti K en anti λ serum.

De laatste twee sera ook titreren in geval van positieve directe antiglobulinetest met anti IgM of anti IgA serum.

Als de directe antiglobulinetest met anticomplementserum positief is, kan men de subtypesera anti α_2 D, anti β_1 A/C en anti β_1 E titreren.

Serum patientAgglutinerende antistoffen:

16°C 1 dr. serum patient + 1 dr. 5% suspensie van
+ 6 verschillende panellicellen van bloedgroep O, (eventueel ook A₁ en A₂), van een Oii cel (of O navelstrengbloed) en van de eigen erythrocyten patient,
1 uur incuberen bij 16°C
microscopisch aflezen.

37°C Serum patient incuberen gedurende 1 uur bij 37°C
met een 5% suspensie van + 6 verschillende panellicellen,
a) in zout: microscopisch aflezen
b) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum, indien nodig indirecte antiglobulinetest met anti IgA, anti IgM of ander antiglobulineserum.
c) II step reactie, met mensecomplement in 2e phase, en indirecte antiglobulinetest met anticomplementserum.
(zie onder: Antistoffen tegen erythrocyten b 3) 0704/2)
d) Serum patient 1:2 verdund incuberen met enzym behandelde celsuspensies, microscopisch aflezen.
Indien positief specificiteit en titer van de antistof vaststellen.

ANTISTOFFEN TEGEN ERYTHROCYTEN

=====

Koude antistoffen

1 dr. serum patient + 1 dr. 5% suspensie testerythrocyten
(OI cellen, Oii cellen), en eigen erythrocyten patient.

1 uur incuberen bij 16°C.

Microscopisch aflezen.

Warmte antistoffen

1 dr. serum patient + 1 dr. 5% suspensie testerythrocyten

1 uur incuberen bij 37°C.

1) microscopisch aflezen in zout (complete antistoffen)

2) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum.

Indien nodig:

indirecte antiglobulinetest met anti IgA, anti IgM,
anti IgD of anti IgE serum.

3) indirecte antiglobulinetest met anti complementserum
in de II step methode:

na 1 uur incuberen van celsuspensie en serum bij 37°C
de cellen 3x wassen in phys.zout,

1 dr. mensecomplement toevoegen en weer

30 min. incuberen bij 37°C.

Cellen 3x wassen en 1 dr. anti complementserum toevoegen.

Mengen en 30 min. incuberen bij 37°C.

Macroscopisch aflezen.

4) 1 dr. serum patient (1:2 verdund in phys.zout), +

1 dr. 5% suspensie van enzymbehandelde testerythrocyten

1 uur incuberen bij 37°C.

Microscopisch aflezen.

ANTISTOFFEN TEGEN ERYTHROCYTEN IN AANWEZIGHEID VAN GENEESMIDDELEN

(phenacetine, salazopyrine, aspirine, pyramidon e.a.)

- a. 1 dr. serum patient in de verdunningen 1:1, 1:2 en 1:4 in phys.zout,
+ 1 dr. geneesmiddel in verzadigde, isotonische oplossing.
+ 1 dr. 5% suspensie in phys.zout van normale O-erythrocyten
- b. als a) maar 1 dr. 5% suspensie in phys.zout van de patiente-erythrocyten in plaats van normale erythrocyten.

Dit 3 x :

- 1) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum
 - 2) indirecte antiglobulinetest met anti non γ serum
 - 3) II. step methode met anti C' serum
- (zie onder: Antistoffen tegen erythrocyten 3) 0704/2)

Contrôle

1 dr. AB serum + 1 dr. geneesmiddel + 1 dr. celsuspensie

3 x als boven beschreven.

Indien bovenstaande proeven positief zijn, serum patient incuberen met O erythrocytensuspensie zonder toevoeging van geneesmiddel.

1 dr. serum patient in de verdunningen 1:1, 1:2 en 1:4 in phys.zout,
+ 1 dr. 5% erythrocytensuspensie.

3 x als boven beschreven.

en: directe antiglobulinetest op de erythrocyten van de patient.

ANTISTOFFEN TEGEN ERYTHROCYTEN IN AANWEZIGHEID VAN GENEESMIDDELEN
=====

(penicilline)

8 cc vers afgenomen O citraatbloed of gedefibrineerd bloed
toevoegen aan 1 flesje penicilline van 200.000 E
(of 4 cc bij 100.000 E).

(Na-Penicilline-G 1 miljoen E; inhoud + 642 mg.
1/10 deel hiervan = 64 mg = 100.000 E + 4 cc vol bloed)

Mengen

1 uur incuberen bij 37°C en 24 uur incuberen bij 4°C.

Cellen 3x wassen in fysiologisch zout.

3 verdunningsreeksen maken (1:1, 1:2 en 1:4)

van serum patiënt in fys.zout (2 dr.)

Aan elke reeks 2 dr. penicilline behandelde 5% O suspensie toevoegen.

1 uur incuberen bij 37°C.

- a) microscopisch aflezen in zout.
- b) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum
- c) indirecte antiglobulinetest met anti non γ serum
- d) II step techniek met MC in 2e fase en indirecte antiglobulinetest met anti complementserum.

(zie onder: Antistoffen tegen erythrocyten 3) 0704/2)

Zo mogelijk serum met penicilline antistoffen meenemen
als positieve contrôle.

Indien a), b), c) of d) positief:

serum patiënt + onbehandelde erythrocytensuspensie
indirecte antiglobulinetest met de 3 antiglobuline sera.

HAEMOLYSINEN =====

I Monofasisch haemolysine

Benodigdheden:

Vers AB serum als complementbron (= MC, voor contrôle zie elders)

HCl 0.2546 N

(13 dr. menselijk serum + 1 dr. HCl 0.2546 N geven een pH van ± 6.5).

Enzymbehandelde O erythrocyten van volwassene (I), 20% suspensie in fysiologisch zout.

Enzymbehandelde O erythrocyten van navelstrengbloed of van volwassen Oii cellen, 20% suspensie in phys.zout.

Methode:

5 dr. serum patient pH 6.5 in verdunning 1:2 en 1:8 in MC van pH 6.5 + 1 dr. 20% erythrocytensuspensie van OI, resp. Oii-cellen.

Als contrôle:

5 dr. MC pH 6.5 + 1 dr. 20% erythrocytensuspensie van O I, resp. Oii cellen.

Koude haemolysine

1½ uur incuberen bij 16°C.

Sterkte van de haemolyse bekijken.

Warmte haemolysine

Serum en erythrocytensuspensie gescheiden

10 min. vóórverwarmen in waterbad van 37°C.

Dan bij elkaar voegen, mengen en nog 1½ uur bij 37°C laten staan.

Sterkte van de haemolyse bekijken.

In bepaalde gevallen de haemolysebepalingen ook doen bij pH 7.5 (zonder toevoeging van HCl), of met andere celtypen: pp cellen, eigen erythrocyten.

Indien nodig (serum patient haemolytisch of anti complementair) wordt de II step methode uitgevoerd.

II step methode voor bepaling monofasisch haemolysine

5 dr. serum patient pH 6.5 (zie "Monof.haemolysine")
titreren in phys.zout, dat met fosforzuur op pH 6.5 is gebracht.
(pH-meter)

1 dr. 20% celsuspensie toevoegen van enzymbehandelde O cellen.
(voor 37°C, 10 min. vóórverwarmen van cellen en serum)
1 uur incuberen bij 37°C, resp. 16°C.

Bovenstaande afpipetteren, cellen 1x wassen in zout
van 37°C, resp. van 16°C.

Aan elk buisje 5 dr. MC toevoegen van pH 6.5
1½ uur incuberen bij 37°C (waterbad) resp. 16°C.
(voor 37°C incubatie weer 10 min. vóórverwarmen).

Contrôle :

MC i.p.v. patiente serum.

II Onderzoek op biphasisch haemolysine (Donath Landsteiner)

Benodigdheden:

Vers AB serum als complementbron = MC, (bereiding zie elders)
20% erythrocytensuspensie in physiologisch zout.

Methode:

5 dr. serum patient in verdunning 1:2, 1:4, 1:8 en 1:16 in MC.
Na vóórincuberen van serumverdunningen en celsuspensies bij 0°C gedurende 10 minuten, aan elk buisje 1 dr. van de 20% erythrocytensuspensie toevoegen.

Mengen en gedurende 1 uur bij 0°C incuberen.

Voorzichtig centrifugeren (1 min. à 1000 toeren).

Bovenstaande verwijderen en vervangen door 5 dr. cavia complement.

(7 dr. aqua dest + 1 dr. cavia complement RIV

→ verdunning van 1:10)

Mengen en 20 minuten in waterbad 37°C incuberen.

Hemolyse beoordelen (eventueel de buisjes nog even voorzichtig centrifugeren).

Contrôles:

a. 5 dr. MC + 1 dr. 20% celsuspensie en cavia complement

b. 5 dr. serum patient 1:2 verdund in MC + 1 dr. 20% celsuspensie
en geïnactiveerd cavia complement.

In bepaalde gevallen de hemolysebepalingen ook doen met ii cellen en/of pp cellen.

ACID - HAM TEST

=====

(Paraxysmale Nachtelijke Haemoglobinurie)

1. 13 dr. vers AB serum + 1 dr. HCl (0,2546 N) +
1 dr. 50% 3x gewassen normale erythrocytensuspensie.
2. 13 dr. vers AB serum + 1 dr. 50% 3x gewassen
normale erythrocytensuspensie.
3. 13 dr. vers AB serum + 1 dr. HCl (0,2546 N) +
1 dr. 50% 3x gewassen erythrocytensuspensie patient.
4. 13 dr. vers AB serum + 1 dr. 50% 3x gewassen
erythrocytensuspensie patient.
5. 13 dr. geïnactiveerd AB serum + 1 dr. HCl + 1 dr.
50% 3x gewassen erythrocytensuspensie patient.
6. 13 dr. geïnactiveerd AB serum + 1 dr. 50% 3x gewassen
erythrocytensuspensie patient.

1 uur incuberen bij 37°C elke 15 min. voorzichtig mengen.
Na incubatie even afcentrifugeren.

Acid Ham-test positief indien alleen 3. haemolyse vertoont.

KRUISPROEVEN

=====

2 dr. serum patient in de verdunningen 1:1, 1:2 en 1:4
incuberen met 2 dr. 1x gewassen 4% suspensie van de donor-
erythrocyten.

1 uur bij 37°C.

- a) in zout aflezen.
- b) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum.
- c) II step reactie, met MC in de 2e phase en indirecte
antiglobulinetest met anti C' serum. (zie onder 0704/2)
- d) 1 dr. 1:2 verdund serum patient + 1 dr. enzymbehandelde
erythrocytensuspensie donor.

Microscopisch aflezen.

OSMOTISCHE RESISTENTIE

=====

Benodigdheden

Aantal oplossingen van afnemende concentratie nl.:

0,90% - 0,80% - 0,76% - 0,72% - 0,68% - 0,64% - 0,60%

0,56% - 0,52% - 0,50% - 0,48% - 0,46% - 0,44% - 0,42%

0,40% - 0,38% - 0,36% - 0,34% - 0,32% - 0,30% - 0,28%

0,26% - 0,24% - 0,22% - 0,20% - 0,18%

Deze oplossingen worden gemaakt door aan een stamoplossing bestaande uit:

Na Cl	180	g	} pH 7.4
Na ₂ H ₁ PO ₄ 2 aq.	34,20	g	
Na H ₂ PO ₄ 2 aq.	4,86	g	
Aqua dest ad	2000	cc	

aqua dest toe te voegen (producent: Contrôle Lab.)

Afnemen van bloed

± 5 cc bloed van patient en van een contrôle persoon, in buis met enkele korrels heparine (vitrum); vooral niet te veel.

Het onderzoek dient op vers bloed te geschieden (niet ouder dan enkele uren).

Van opgestuurd bloed kan de O.R. alleen gedaan worden wanneer een gelijktijdig afgenomen bloedmonster van een normaal persoon als contrôle wordt meegestuurd.

Uitvoering

In rose-test buizen wordt telkens ± 1 cc van bovenstaande verdunningen gepipetteerd.

In elk van deze buisjes wordt één druppel goed gemengd heparine bloed gebracht (pasteurse pipet), daarna worden de suspensies goed gemengd en na 1½ uur incubatie bij kamertemperatuur macroscopisch afgelezen.

Als totale haemolyse neemt men die verdunning waarin zich na centrifugeren geen erythrocyten meer op de bodem bevinden.

Als begin haemolyse neemt men het eerste buisje waarin de bovenstaande vloeistof een rose-achtige verkleuring vertoont.

Indien nodig wordt de O.R. opnieuw bepaald na 24 uur incuberen bij 37°C :

Aan de resterende hoeveelheid heparine bloed wordt penicilline-streptomycine (lab.dr Eysvoogel) toegevoegd 1:1000 (0,25 ml op 250 ml bloed, eventueel verdunnen) en dit wordt gedurende 24 uur bij 37°C in de stoof gezet.

Daarna wordt de osmotische resistentie nogmaals op bovenstaande wijze bepaald.

Normale waarden:

Bij vers heparine bloed:	Begin haemolyse	+ 0,48%
	Totale haemolyse	+ 0,32%

Na 24 uur incubatie bij 37°C:

	Begin haemolyse	+ 0,60%
	Totale haemolyse	+ 0,40%

PAUL EN BUNNELL

=====

(bij mononucleosis infectiosa)

Serum patient 30 min. bij 56°C inactiveren.

+ 10 dr. van dit geïnactiveerde serum 1 uur bij kamertemperatuur absorberen met gelijke delen 3x gewassen packed enzymbehandelde schapenerythrocyten (zie: Enzymbehandelde cellen 0704/10)

Titratie in Rose-test buizen:

2 titraties van geïnactiveerd patienteserum (A, B)

2 titraties van geïnactiveerd, geabsorbeerd patienteserum (C, D)

Als volgt:

8 dr. phys.zout + 2 dr. serum (verd. van 1:5).

Hieruit een 2-voudige verdunningsreeks maken van 5 dr. in phys.zout (8 buisjes).

Aan titratie A en C worden 2 dr. 2% suspensie van normale schapen-erythrocyten aan elke buis toegevoegd.

Aan titratie B en D 2 dr. 2% suspensie van enzymbehandelde schapen-erythrocyten.

Contrôle in zout met beide suspensies meenemen.

Mengen en gedurende 1 uur bij 37°C incuberen.

Daarna + 12 uur bij 4°C.

Macroscopisch de agglutinaties aflezen.

Titratie D moet negatief zijn (contrôle op voldoende absorptie)

Titratie C geeft de sterkte van de Paul en Bunnell aan.

N.B. Indien D positief is, nogmaals absorberen en opnieuw titreren.

ENZYM BEHANDELDE CELLEN

=====

Trypsine-cellen

9 delen van een 3x gewassen 4% erythrocytensuspensie in phys.zout
+ 1 deel 1% trypsine oplossing
30 minuten incuberen bij 37°C.
2x wassen.

Trypsineren van erythrocyten vlgs Dacie

1% trypsine oplossing in 0,05 N HCl
 $\frac{1}{2}$ tot 1 week bij 4°C laten staan.
Deze oplossing 1:10 verdunnen in phys.zout
 $\frac{1}{2}$ ml 3x gewassen packed cells met 2 $\frac{1}{2}$ ml van de 0,1% trypsine oplossing.
1 uur incuberen bij 37°C.
3x wassen
Trypsine cellen + 9 uur bruikbaar.

Papaïne cellen

1 deel 1% papaïne oplossing
+ 1 deel cysteine HCl 0,1%
+ 8 delen zout
Mengen.
2 delen papaïne/cysteïne mengsel
+ 1 deel 3x gewassen packed cells
 $\frac{1}{2}$ uur incuberen bij 37°C
3x wassen.

Bromeline cellen

1 deel bromeline oplossing
9 delen 4% erythrocytensuspensie (3x gewassen)
 $\frac{1}{2}$ uur incuberen bij 37°C
2x wassen.

BISDIAZO BENZIDINE CELLEN
=====Oplossing

0,23 g benzidine oplossen in 45 ml 0,5 N HCl
0,175 g NaNO_2 in 5 ml aqua dest.
30 min. samen incuberen bij 0°C onder af en toe roeren.
Uitvullen in 0,5 ml ampullen bij -70°C d.w.z.
koolzuursneeuw/alcohol mengsel.
Bewaren bij -20°C .

Belangrijk

Ontdooien in 0° badje - meteen gebruiken

Uitvoering

0 cellen 2x wassen in zout of fosfaatbuffer
50% suspensie in zout of in buffer
4 dl antigeen in gewenste verdunning
+ 2 dl BDB (1:15 verdund in zout of buffer)
+ 1 dl 50% celsuspensie in zout of buffer
20 minuten K.T.
3x wassen in zout of buffer.

N.B.:

BDB-oplossing pas vlak vóór gebruik ontdooien en verdunnen.

TANNINE CELLEN
=====

A. Fosfaatbuffer

KH_2PO_4	1.45 g	
Na_2HPO_4	7.60 g	pH 7.4
NaCl	4.80 g	
aqua dest	ad 1000 ml	

Tannine oplossing

0.005 g/100 cc fosfaatbuffer of phys.zout
1 dag houdbaar.

Vers afgenomen O bloed, gedefibrineerd (10 cc bloed gedurende 10 min. schudden met + 15 kralen) of citraatbloed.

Gelijke delen 4% 3x gewassen erythrocytensuspensie in buffer of in phys.zout incuberen met tannine opl., 10 min. bij K.T.

1x wassen met buffer of met phys.zout (3 min. à 1000 rpm).

2% suspensie in buffer of in phys.zout $\frac{1}{2}$ uur bij K.T. incuberen met gelijke delen antigeen verdunning.

3x wassen in buffer of zout

2% suspensie maken in buffer of zout

Titraties verrichten op Kline-plates en 10 min. bij K.T. schudden op schudapparaat van Kline.

Macroscopisch aflezen.

N.B.: fosfaatbuffer alleen gebruiken als de cellen in phys.zout agglutineren.

- B. 1 dr. 50% suspensie van vers O bloed
+ 2 dr. tannine zuur (5 mg tannine in 10 cc zout)
+ 4 dr. antigeen verdunning (voor de immunoglobulinen 0,05%)
mengen - 20 min. bij K.T.,
3x wassen.

CrCl3 cellen (techniek mevr.v. Loghem)

=====

Ongestold bloed, niet ouder dan 4-5 dagen.

6x wassen in groen phys.zout (niet gebufferd zout)

Buizen spoelen met groen zout.

in buis:

1 dl proteïne (2 mg/ml), evt. gedialyseerd tegen groen zout.

2 dl groen zout

1 dl packed cells 6x gewassen

1 dl CrCl3 1% oplossing 1:25 verdund in groen zout

(Stock-opl. CrCl3: 1% in groen zout. Bewaren in ijskast

Te gebruiken zolang kleur groen is)

Buisjes mengen, kurken, en 15 min. schudden bij K.T. op schudapparaat.

3 à 4x wassen in groen zout. Laatste wassing kan gebeuren met gebufferd zout.

Suspensie maken in gebufferd zout, of in bewaarvloeistof:

1 dl packed cells + 9 dl bewaarvloeistof

+ 1 maand houdbaar.

Bepaling

1 dr antiserumverdunding + 1 dr 0,5% celsuspensie in microtiter plaatjes of in buisjes.

1½ uur K.T. of 16°C

Macroscopisch of microscopisch aflezen.

CELL COATING MET CHROOMCHLORIDE VOOR MICROTITER PLAATJES

(techniek H. Reesink)

Erythrocyten (niet ouder 4-5 dagen) 6x wassen in
ongebufferd fysiologisch zout (groen zout)

vervolgens wordt toegevoegd:

- 2 delen antigeen 1 mg/ml = 0,1 %
- 1 deel packed cells
- 2 delen CrCl₃

N.B.:

- 1) Antigeen en chroomchloride oplossing moeten opgelost zijn in ongebufferd zout. Indien het antigeen in gebufferd zout is opgelost moet dit er uitgedialyseerd worden.
- 2) In principe moet voor elk antigeen de juiste concentratie CrCl₃ oplossing gezocht worden. Hiervoor worden 4 verschillende oplossingen gemaakt van de Stock oplossing van 1%.

- | | | | | |
|----|------|---|---|--|
| 1. | 1/50 | % | } | 15 min. op trilapparaat bij K.T.
(hard trillen) |
| 2. | 1/25 | % | | |
| 3. | 1/15 | % | } | 5 min. " " |
| 4. | 1/10 | % | | |

(Bij lagere concentraties soms auto-agglutinatie)

15 min. of 5 min. op trilapparaat
vervolgens 3x wassen met ongebufferd zout op 1500 rpm
Resuspenderen in gebufferd zout.

Bewaren van de gecoate cellen:

in bewaarvloeistof (zie 830/12a)

Gebruik microtiter plaatjesErythrocytensuspensie:

Indien mogelijk resuspenderen in 1-2% AB serum in gebufferde zoutoplossing.

Indien geen AB serum gebruikt kan worden dan:

Serum verdunningen

in een gebufferde zoutoplossing met :

per 500 cc zout : 12,5 mg P.V.P.
: 1 druppel Tween

Voor de microtiterplaatjes is een erythrocytensuspensie van 0,5 - 0,1% wenselijk.

Incubatie op schudapparaat $\pm$ 15 - 20 min. op kamertemperatuur van erythrocyten en antistof in microtiterplaatjes

N.B. goed afdekken in verband met uitdrogen.

Na incubatie wordt gecentrifugeerd in grote SME centrifuge tot 1500 toeren, dan wordt de centrifuge afgezet. (Tarreren)

Plaatje verticaal zetten en na 15 min. de reactie aflezen.

N.B. ook ongecoate cellen als contrôle meenemen in verband met heteroagglutinaties.

GLUTARALDEHYDE BEHANDELING VAN ERYTHROCYTEN (25% Koch Light)
=====I Glutaraldehydefixatie:

1% glutaraldehyde in PBS
2% celsuspensie 3x gewassen

} 30 min. à 4°C
3x wassen in PBS

Bewaren als 10% suspensie (1 mg/ml gedest.water of zout+sodium azide)

II Tanneren:

3x wassen in PBS
1 dl 2% suspensie
1 dl tanninezuur 1:40.000 (=5mg/200cc)

} 30 min. à 56°C
3x wassen

III Fixeren van antigeen:

cellen 3x wassen in C.P.buffer
1 dl 4% suspensie
1 dl antigeen

} 30 min. à 37°C
3x wassen

10% suspensie bij 4°C bewaren.

(fibrinogeencellen gaven na 1/2 jr nog dezelfde titers)

=====

(vers menselijk AB serum)

Contrôle

Na afname het gestolde AB bloed + 1 uur bij kamertemperatuur en 1 nacht bij 4°C laten stollen.

Centrifugeren en serum in buizen uitvullen.

Invriezen.

Daarna controleren:

a) agglutinerende antistoffen

16°C 1 dr. serum wordt 1 uur geïncubeerd bij 16°C met 1 dr. 4% suspensie panelcellen O, A₁, A₂ en B in zout microscopisch aflezen.

37°C 1 dr. serum wordt 1 uur geïncubeerd bij 37°C met 1 dr. 4% suspensie panelcellen O, A₁, A₂ en B

a) in zout microscopisch aflezen

b) indirecte antiglobulinetest met anti IgG serum

c) indirecte antiglobulinetest met anti non γ serum

Bovendien het serum 1:2 verdund bij 37°C incuberen met enzymbehandelde erythrocytensuspensie van panelcellen O, A₁, A₂ en B.

Microscopisch aflezen.

b) haemolyserende antistoffen

Het nieuwe MC in titratie vergelijken met het oude, met een serum dat monofasische en een serum dat bifasische haemolysinen bevat.

Contrôle: alleen MC

Voor methode zie: Haemolysine bepalingen 0704/5

c) complementgehalte

Het nieuwe en het oude MC titreren

6 dr. serumverdunding 1:10, 1:20, 1:30 etc. t/m 1:100

4 dr. haemolytisch systeem toevoegen

1 uur à 37°C

haemolyse aflezen.

Contrôle: Niet -ges.schape-erythrocyten.

Als de haemolysetiter met de onbehandelde schape-ery. even hoog is als met haemol.systeem dan het AB serum absorberen bij 0°C (vóórkoelen) met schape-ery en de titraties herhalen.

ETHER ELUAAT vlgs Lubin
=====

1 deel 6x gewassen packed cells
1 deel fysiologisch zout
2 delen ether.

Dit mengsel 2 minuten schudden.
 $\frac{1}{2}$ uur incuberen bij 37°C (waterbad)
10 min. centrifugeren bij 3000 rpm.

Men ziet dan 3 lagen:

de bovenste laag is ether
de 2e laag is stroma
de 3e laag is hemolysaat dat de antistoffen bevat.

Ether afpipetteren; door stroma heen
het hemolysaat uit de buis halen → eluaat I

Op het stroma weer 1 deel phys.zout brengen, goed mengen
en 1 nacht bij -20°C laten staan.

Centrifugeren en bovenstaande als eluaat II nazien.
Dit kan nog eens herhaald worden → eluaat III.

56°C ELUAAT
=====

1 deel 6x gewassen packed cells +
1 deel phys.zout, mengen,
10 minuten à 56°C
Snel centrifugeren en bovenstaande afpipetteren.

Andere Eluatien: zie voorschriften Bloedgroepenserologie 0702.

ANTIGLOBULINE REAGENTIA (onverdund)

=====

Contrôle:Heteroagglutinin:

serum 3x titreren 1:1, 1:2, 1:4 en 1:8 in phys.zout.

1 dr. serumverdunding + 1 dr. 5% 1x gewassen erythrocyten-
suspensie van de bloedgroep O, A₁ en B

1 uur bij K.T. incuberen.

Microscopisch aflezen.

Indien er hemolyse heeft plaatsgevonden het complement
inactiveren door het serum precies $\frac{1}{2}$ uur bij 56°C te zetten.

Eventuele heteroagglutinin absorberen door aan 2 delen
serum 1 deel packed 6x gewassen menselijke erythrocyten toe
te voegen.

1 uur bij K.T. laten staan, centrifugeren en bovenstaande
opnieuw controleren op de aanwezigheid van heteroagglutinin.

ANTI IgG SERUM

=====

I Titerbepaling:

- a) 1 dr. serumverdunding 1:1 t/m 1:2000 (2-voudige verdunningen in phys.zout)
1 uur bij 37°C incuberen met 1 dr. 3x gewassen 5% suspensie van gesensibiliseerde D cellen
1:10 en 1:80, resp. met gesensibiliseerde Kell en Fy^a cellen
Microscopisch aflezen.

Gesensibiliseerde D cellen:

Anti D serum met incomplete antistoffen
1:10 en 1:80 verdunnen in phys.zout.
1 uur bij 37°C incuberen met gelijke delen
1x gewassen 5% suspensie van D positieve erythrocyten
3x wassen.

Gesensibiliseerde Kell en Fy^a cellen:

anti Kell en anti Fy^a serum incuberen met
K⁺ resp. Fy^(a+) celsuspensie (5%)
1 uur à 37°C
3x wassen.

- b) 1 dr. serumverdunding 1:1 t/m 1:512 (2-voudige verdunningen in phys.zout)
+ 1 dr. IgG gecoate tannine cellen, 2% suspensie
10 min. bij K.T. schudden.
Macroscopisch aflezen.

Titers vergelijken met bekend, goed anti IgG serum.

II Specificiteit

- a) 1 dr. AB serum incuberen met 1 dr. 1x gewassen 5% suspensie van testerythrocyten O, A₁, A₂ en B 1 uur incuberen bij 37°C, 3x wassen.
Indirecte antiglobulinetest met het anti IgG serum in een bepaalde verdunning.
(Vast te stellen uit de titerbepaling).
- b) 1 dr. anti IgG serum in verdunningen 1:1, 1:2 en 1:4 incuberen met 1 dr. 3x gewassen 5% suspensie van cellen waarop complementfactoren zijn gefixeerd, nl.:
"vivo cellen" (cellen van patient met positieve directe anti complementtest).
"vitro cellen",
"inc. K.A. cellen", en II step gesensibiliseerde Le cellen.
(voor bereiding van bovenstaande cellen; zie: Contrôle anticomplementserum 0704/17).
- c) 1 dr. anti IgG serum 10 min. bij K.T. schudden met 1 dr. tanninecellen waarop: IgA, IgM, IgD, fibrinogeen, humaan albumine, transferrine enz.

ANTI IgM SERUM

=====

Contrôle als voor anti IgG serum, maar bij de
titerbepaling: IgM gecoate tannine cellen gebruiken.

en:

1 dr. serumverdunding 1:1 t/m 1:512
+ 1 dr. 3x gewassen 5% erythrocytensuspensie van
patient met positieve directe antiglobulinetest met
anti IgM serum.

bij specificiteitsonderzoek:

1 dr. serumverdunding 1:1, 1:2 en 1:4
1 uur bij 37°C incuberen met gesensibiliseerde D cellen (1:10)

en:

tannine behandelde cellen met IgG, IgA en IgD enz.

ANTI IgA SERUM

=====

Contrôle als voor anti IgG serum, maar bij de
titerbepaling: IgA gecoate tannine cellen gebruiken.

en:

1 dr. serumverdunding 1:1 t/m 1:512
+ 1 dr. 3x gewassen 5% erythrocytensuspensie van patient met
positieve directe antiglobulinetest met anti IgA serum.

bij specificiteitsonderzoek:

1 dr. serumverdunding 1:1, 1:2 en 1:4
1 uur bij 37°C incuberen met gesensibiliseerde D cellen (1:10)

en:

tannine behandelde cellen met IgG, IgM, IgD enz.

ANTI IgD SERUM

=====

Contrôle als voor anti IgG serum, maar bij de
titerbepaling: IgD gecoate tannine cellen gebruiken.

bij specificiteitsonderzoek:

1 dr. serumverduunning 1:1, 1:2 en 1:4

1 uur bij 37°C incuberen met gesensibiliseerde D cellen (1:10)

en:

tannine behandelde cellen met IgG, IgA, IgM enz.

ANTI IgE SERUM

=====

Contrôle als voor anti IgG serum.

Maar: titerbepaling nog niet mogelijk.

bij specificiteitsonderzoek:

1 dr. serumverduunning 1:1, 1:2 en 1:4

1 uur bij 37°C incuberen met gesensibiliseerde D cellen (1:10)

en:

tannine behandelde cellen met IgG, IgA, IgM, IgD enz.

ANTI COMPLEMENTSERUM

=====

Contrôle:I Titerbepaling:

- a) 1 dr. serumverdunding 1:1 t/m 1:2000
(2-voudige verdunningen in phys.zout)
1 uur bij 37°C incuberen met
1 dr. 3x gewassen 5% suspensie van erythrocyten
waarop complementfactoren zijn gefixeerd, nl.:

"vivo cellen":

patientecellen waarop in vivo complement is
gefixeerd.

"vitro cellen":

1 deel anti I serum +
1 deel mensecomplement (MC) +
2 delen 6% suspensie van O I cellen
1 uur incuberen bij 16°C
3x wassen met 37°C zout.

"inc.K.A. cellen":

20 dr. serum van bloedgroep A of B +
1 dr. packed O cellen
1½ uur bij 0°C
3x wassen in zout.

Gesensibiliseerde Le cellen in II step methode:

1 deel anti Le(a) of anti Le(b) serum +
1 deel 5% suspensie O Le(a+) of O Le(b+) cellen
1 uur bij 16°C
3x wassen bij K.T.
+ enkele druppels MC
½ uur 37°C, 3x wassen bij K.T.

Alle buisjes microscopisch aflezen.

- b) 1 dr. serumverdunding 10 min. bij K.T., schudden met 1 dr. tannine behandelde cellen, gecoat met : β_1A , β_1E en α_2D .
Titers vergelijken met bekend, goed serum.

II Specificiteit:

- a) 1 dr. vers AB serum + 1 dr. 5% suspensie testerythrocyten van de bloedgroep O, A_1 , A_2 en B.
1 uur bij $37^{\circ}C$. Indirecte antiglobulinetest met anti complementserum in bepaalde verdunding.
(Vast te stellen uit de titerbepaling).
- b) 5 sera (bloedgroep O, A_1 , B, AB) incuberen met een 5% suspensie van 1x gewassen O erythrocyten.
1 uur bij $37^{\circ}C$. Indirecte antiglobulinetest met anti complementserum.
- c) Van + 5 normale bloedmonsters uit $4^{\circ}C$ kast een suspensie maken, 3x wassen.
1 dr. anti complementserum in bepaalde verdunding.
(Vast te stellen uit de titerbepaling) +
1 dr. 5% suspensie
1 uur bij $37^{\circ}C$
Microscopisch aflezen.
- d) Tannine cellen met IgG, IgA, IgM, IgD, fibrinogeen, humaan albumine, transferrine enz.
1 dr. anti complementserum in verdunding 1:2, 1:4 en 1:8, +
1 dr. tannine cellen met bovenstaande antigenen
10 min. bij K.T. schudden.
Macroscopisch aflezen.
- e) 1 dr. serumverdunding 1:1, 1:2 en 1:4
incuberen 1 uur bij $37^{\circ}C$ met
1 dr. 5% 1x gewassen gesensibiliseerde D cellen (1:10)
en met 1 dr. 5% 1x gewassen patiente-erythrocyten
met positieve directe IgM, IgA, IgG antiglobulinetest.

SUGARWATERTEST

(uit: New Eng. J. Med. 275, 155)

I "for screening purposes" : one level tablespoon of sucrose was dissolved in $3\frac{1}{2}$ ounces (103 ml) of dist. water, or alternately 9 to 10 ml of dry sugar in 100 ml of dist. water pH = 7.4.

C.L.B.:

Isotonische suikeroplossing: 9,25% , pH = 7.4

citraat bloed, oxalaatbloed of gedefibrineerd bloed van patient.

9 druppels suikeroplossing	}	$\frac{1}{2}$ uur 37°C waterbad
1 druppel MC		voorz. centrifugeren: hemolyse ?
1 druppel vol bloed patient		(in voorschrift geen MC erbij, wel <u>vers</u> bloed patient)

Kontrôles : Norm. bloed i.p.v. pat. bloed
suikeropl., zonder MC

II Isotonische suikeroplossing: 92,4 g of reagent-grade sucrose
in 910 ml of 0.005 M NaH_2PO_4
en 90 ml of 0.005 M Na_2HPO_4
adjust pH to 6.1 if necessary

0.85 ml sucrose oplossing	}	- volgens voorschrift
0.05 ml MC of eigen vers ser.		
0.1 ml 50% susp. gewassen ery patient		

9 druppels sucrose oplossing	}	- CLB - A'dam
1 druppel MC		
1 druppel 50% suspensie		

30 min. 37°C waterbad, of K.T., centrifugeren : hemolyse ?

III Sucrose / buffer oplossing vlgs Stratton and Evans

Stock buffer solution : 486.1 g of sucrose

5.095 g of sodium diethyl barbiturate

(CaCl_2 0.083 g and MgCl_2 0.508 g)

were dissolved in about 500 ml of dist.water

the pH was adjusted to 7.6 with N-HCl and the volume

made up to 1000 ml with dist.water.

For use this stock buffer was diluted five-fold with dist.water

to give the working sucrose-veronal buffer solution with a sucrose

concentration of 9.7% ($\mu=0.01$)

Cellen patient 5 x wassen in zout

50 % suspensie 1 druppel + + 40 dr. buffer, centrifugeren → packed cells

hierop 10 dr. buffer

+ 20 dr. MC 1:40 verdund in buffer

1 uur à 37°C waterbad

voorz. centrifugeren : hemolyse ?