

# **VOORSCHRIFTEN:**

Laboratorium voor

## **RHEUMA-SEROLOGIE**

=====

- 1 = Onderzoek naar de aanwezigheid van C-reactief eiwit  
(acute phase proteïne)
- 2 = Gemodificeerde Waaler-Rose test voor het aantonen van  
de rheumafactor
- 3 = LE-celtest
- 4 = Bepaling van de anti-streptolysine titer

2 pag.

## ONDERZOEK NAAR DE AANWEZIGHEID VAN C-REACTIEF EIWIT (ACUTE PHASE PROTEINE)

---

### Principe van de bepaling

C-reactief proteïne is een serumeiwit, dat zijn naam dankt aan de eigenschap, met pneumococcon C-poly-saccharide, een precipitaat te vormen.

Het is alleen bij patiënten aantoonbaar in het acute stadium van ziekten, die met weefselverval gepaard gaan.

Wanneer men het C-reactief eiwit inspuit bij een konijn, vormt dit dier specifieke precipiterende antistoffen.

Met behulp van de agar-precipitatie techniek volgens Ouchterlony gaat men na of er een precipitatielijn optreedt tussen het patiëntenserum en het konijnen-anti C-reactief eiwit serum.

De uitslag wordt opgegeven als positief of negatief.

### Bepaling

Objectglasje ontvetten en drogen.

1 druppel 3% agar opbrengen en uitsmeren.

Vervolgens drogen, daarna nummers opschrijven.

3 cc 1½% agar in fysiologisch zout (pH 7,5) opbrengen, horizontaal laten stollen.

Gaatjes ponsen en serum en antiserum in de gaatjes brengen (zie fig.)

Gedurende één nacht in vochtige ruimte bij kamertemperatuur.

3 dagen wassen met fysiologisch zout.

Drogen met geperforeerd filtreerpapier gedurende één dag bij 37°C.

Kleuren gedurende 3 uur.

Kleurvloeistof :

15 cc ijsazijn;

50 cc glycerine

3,4 gram na. ac.

0,5 gram aminozwart

aanvullen met aqua dest. tot 500 cc.

Afspoelen onder kraan.

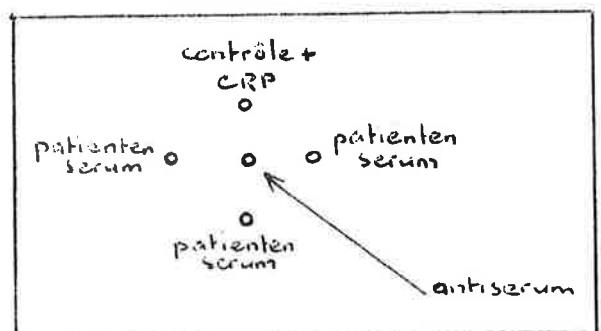
Daarna 10 min. ontkleuren met ontkleuringsvloeistof.

Ontkleuringsvloeistof :

10 cc ijsazijn;

50 cc glycerine.

Dit aanvullen tot 500 cc met aqua dest.



GEMODIFICEERDE WAALER-ROSE TEST VOOR HET AANTONEN VAN DE RHEUMAFACITOR  
=====Principe van de bepaling

De rheumafactor is een immunoglobuline (vaak IgM), dat de eigenschap heeft zich te binden aan veranderd menselijk of een dierlijk IgG-globuline.

Bij de gemodificeerde Waaler-Rose test maakt men gebruik van menselijke O-erythrocyten, die gesensibiliseerd zijn met incomplete antistoffen (afkomstig van een konijn, dat met menselijke O-erythrocyten is geïmmuniseerd). Bij deze gesensibiliseerde cellen voegt men het patiëntenserum. Indien in dit serum de rheumafactor aanwezig is, dan reageert deze met het op de erythrocyten aanwezige konijnenglobuline, waardoor agglutinatie optreedt.

Bepaling

Maak een tweevoudige verdunningsreeks, uitgaande van een 1:4 verdunning van het te onderzoeken serum. Het eerste buisje wordt hiertoe gevuld met 0,3 ml fysiologisch zout; de volgende buisjes (3 stuks) met 0,2 ml zout. Voeg aan het eerste buisje 0,1 ml serum toe. Pipetteer na mengen steeds 0,2 ml over in het volgende buisje, en gooi uit het laatste buisje 0,2 ml weg (0,2 ml = 5 druppels).

Voeg aan iedere verdunning 0,2 ml van een 1% suspensie van gesensibiliseerde O-cellen toe.

Deze cellen zijn bereid door een konijn te immuniseren met gewassen menselijke O-erythrocyten tot een titer aan incomplete antistoffen van  $> 1:10^6$  is bereikt, terwijl de complete agglutinenen een titer hebben, die kleiner dan  $1:10^4$  is.

Verdun het serum tot twee maal de titer van de complete antistoffen. Voeg hieraan eenzelfde hoeveelheid van een 2% menselijke O-erythrocytensuspensie toe. Controleer of er met bekende positieve Rose-sera wel en met normale sera geen agglutinatie optreedt.

Na mengen worden de buisjes gedurende 2 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  geïncubeerd. De agglutinatiereductie wordt daarna macroscopisch afgelezen. Een agglutinatie bij een verdunning van  $> 1:8$  wordt als positief beschouwd.

Als controle op eventuele iso -agglutinenen wordt aan een buis met 0,1 ml fysiologisch zout en 0,12 ml serum, 0,2 ml van een 1% suspensie van onge-sensibiliseerde menselijke O-erythrocyten toegevoegd, waarna dezelfde procedure wordt gevolgd.

**LE-CELTEST**

=====

Neem een buis stolbloed af van iemand met bloedgroep O.

Zet dit 1½ uur in een waterbad bij 37°C te stollen.

Afdraaien, 5 min., bij 2500 toeren.

Bovenstaande serum afpipetteren.

Stolsel kapot maken met spatel en filteren door een 3 dubbel gaasje.

Bij ½ cc serum ½ cc van dit doorgeperste stolsel doen en dit mengen.

10 min. laten staan bij kamertemperatuur, daarna mengen.

10 min. laten staan en vervolgens 5 min. afdraaien bij 2500 toeren.

Bovenstaande serum weggooien.

De buffycoat in haematocrietbuis doen.

5 min. afdraaien bij 2000 toeren.

Bovenstaande met zeer dunne Pasteurs pipet afzuigen.

Van de buffycoat 4 uitstrijkjes maken en laten drogen.

10 minuten fixeren met alcohol methylicus, daarna drogen.

20 min. kleuren met een 10% Giemsa-oplossing.

Spelen onder de kraan en vervolgens drogen.

Altijd een positieve en een negatieve contrôle meenemen.

BEPALING VAN DE ANTI-STREPTOLYSINE TITER  
=====Principe

Streptolysine, een door haemolytische streptococcon geproduceerd enzym, veroorzaakt lysis van erythrocyten. Bij het bepalen van de AST gaat men na hoe sterk het serum van de patiënt lysis van konijnenerythrocyten door streptolysine remt. Bedraagt de hoeveelheid anti-streptolysine in het serum meer dan 250 E, dan spreekt men van een verhoogde anti-streptolysine titer.

Bepaling

Aan 2,4 ml fysiologisch zout wordt 0,1 ml van het te onderzoeken serum toegevoegd. Na mengen wordt 1 ml hiervan bij 3 ml fysiologisch zout gedaan. Dit levert een serumverdunding van 1:100 op.

Maak nu een verdunningsreeks van 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 en 1:6400 door in iedere buis van een reeks van 6 buizen 0,5 ml fysiologisch zout te pipetteren en na toevoegen van 0,5 ml van de 1:100 verdunding aan de eerste buis steeds 0,5 ml in de volgende buis over te brengen.

Aan iedere buis wordt nu 0,5 ml van een lysine-oplossing toegevoegd. Deze lysine-oplossing geeft met 0,5 ml van een standaard anti-streptolysine verdunding, die 0,5 E per ml bevat, in aanwezigheid van 0,25 ml van een 5% konijnenerythrocytensuspensie, juist een partiële haemolyse.

Om dit te bereiken worden eerst drie verdunningsreeksen van een standaard anti-streptolysine serum gemaakt, uitgaande van een oplossing van 1 E/ml. Ieder buisje bevat uiteindelijk 0,5 ml van een oplossing van respectievelijk 1,00, 0,80, 0,63, 0,50, 0,40, 0,32, 0,25 en 0,20 E per ml. Aan de eerste reeks wordt nu 0,5 ml van een 1:12 verdunde, zelf bereide, lysine-oplossing toegevoegd. De buisjes van de tweede reeks ontvangen 0,5 ml van een 1:14, en die van de derde reeks 0,5 ml van een 1:16 verdunding.

Na mengen, 15 min. incuberen bij 37°C, het toevoegen van 0,25 ml van een 5% konijnenerythrocytensuspensie, mengen, 45 min. incuberen bij 37°C en één nacht bij +4°C, wordt bepaald welke lysine-oplossing een partiële haemolyse geeft met de vierde buis. Deze buis bevatte oorspronkelijk 0,5 E/ml.

De buisjes worden na mengen gedurende 15 min. in een waterbad van 37°C geplaatst. Aan ieder buisje wordt dan 0,25 ml van een 5% konijnenerythrocytensuspensie toegevoegd. Na mengen en nog 45 min. incuberen bij 37°C worden de buizen één nacht bij +4°C geplaatst.

De volgende dag wordt de haemolysegraad vergeleken met de haemolyse, die verkregen werd met bepaalde verdunningen van een standaard anti-streptolysine serum. Hiertoe werden, naast de patiëntensera, verdunningen van het standaard serum, die resp. 1,00, 0,80, 0,63, 0,50, 0,40, 0,32, 0,25 en 0,20 E per ml bevatten, in de test meegenomen.