

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	1 von 14



Informationsexemplar — Unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Standard-Arbeitsanweisung*

Inhalt	Seite
1 Indikation, Verantwortlichkeiten	2
2 Testprinzip, theoretischer Hintergrund	2
2.1 Hämagglutination	3
2.2 Coombstest (ICT, DCT)	3
2.3 Hämolysen	3
2.4 AB0-System	3
2.5 Weitere Blutgruppen-Systeme	3
2.6 Arbeitstechnik	4
3 Patientenbezogene und methodische Angaben	5
3.1 Untersuchungsmaterial	5
3.2 Mindestmenge	5
3.3 Störfaktoren	5
3.4 Stabilität	5
4 Reagenzien, Hilfsmaterialien, Geräte	5
4.1 Reagenzien	5
4.2 Hilfsmaterialien	6
4.3 Geräte	6
5 Qualitätskontrolle	7
5.1 Tägliche Qualitätskontrolle	7
5.2 Wöchentliche Kontrollen	7
6 Durchführung des Tests	7
6.1 Vorbereitung	7
6.2 Testansatz AB0 Blutgruppe, Rh-Faktor und DAT (1.DCT)	8
6.3 Testansatz der Serumeigenschaften	8
6.4 Testansatz direkter Coombstest (2. DCT)	8
6.5 Ablesen der Agglutinationsreaktionen	9
7 Ergebnisse, Befundung	9
7.1 Ergebnisse AB0 Blutgruppe und Rh-Faktor	9
7.2 Ergebnisse direkter Coombstest	10
7.3 Befundung	11
7.4 Vorgehensweise bei positivem DCT	11
8 Referenzbereiche	11
9 Grenzen des Verfahrens	11
10 Literatur	11
11 Mitgeltende Unterlagen	12
12 Anlagen	12

* © 2017 Wolf D. Kuhlmann, Standard-Arbeitsanweisung auf Anfrage (e-mail w.d.kuhlmann@gmx.de)

	erstellt	geprüft	freigegeben
Name	Prof. Dr. W. D. Kuhlmann QM-Stelle		
Abteilung			
Datum			
Unterschrift			

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	2 von 14

1 Indikation, Verantwortlichkeiten

Immunhämatologische Untersuchungen sind ärztlich angeordnete Aufträge. Sie unterliegen der *Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer (2017)* sowie der *Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK 2014)* und sind entsprechend durchzuführen.

Indikationen für immunhämatologische Untersuchungen bei Neugeborenen sind z.B.

- Untersuchung des Neugeborenen einer RhD-negativen Mutter
- Untersuchung von Neugeborenenblut bei Risiko oder Verdacht auf Blutgruppen-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind (Erythroblastose, Morbus haemolyticus neonatorum)
- Im Rahmen einer Hämotherapie, Notfall-Hämotherapie

Der Untersuchungsumfang einer „Neugeborenen-Blutgruppenbestimmung“ beinhaltet i.d.R. folgende Untersuchungen

- AB0-Blutgruppenmerkmale
- Merkmal RhD (ggf. weitere Erythrozytenmerkmale)
- Direkter Coombstest (DCT)

Die eindeutige Identitätssicherung ist unerlässlich, der anfordernde Arzt ist primär verantwortlich.

Die angewandten Untersuchungsverfahren, die einzelnen Untersuchungsgänge sowie die Auswertung der Untersuchungsergebnisse liegen in der Verantwortung der zuständigen Ärzte (QM-Handbuch). Die technische Durchführung der einzelnen Untersuchungsverfahren wird an eingewiesenes, geschultes Personal delegiert. Für die Überwachung und Kontrolle des immunhämatologischen Arbeitsplatzes werden mehrere Mitarbeiter namentlich benannt.

Die Benennung von mehreren Mitarbeitern ermöglicht Flexibilität bei der Dienstplangestaltung und sorgt für eine wechselseitige Vertretung. Änderungen werden dienstlich angeordnet.

Alle Standardarbeitsanweisungen haben den Charakter einer Dienstanweisung und beschreiben umfassend das jeweilige Arbeitsgebiet. Die hohe Dichte an Informationen und Handlungsanweisungen ist der Verantwortung der Tätigkeit und der gesetzlichen Regelung geschuldet. Für die Routine des geschulten Personals wird auf entsprechende Kurzanleitungen verwiesen.

Bei unklaren Untersuchungsergebnissen bzw. Problemfällen hat eine Unterrichtung des Dienstarztes zu erfolgen zur Klärung des weiteren Vorgehens und der Ergebnisbeurteilung, ggf. muss externer ärztlicher Sachverstand eingeholt werden (DRK-Blutspendedienst).

2 Testprinzip, theoretischer Hintergrund

Blutgruppen der Erythrozytenmembran sind Antigene, die mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die für die Blutgruppenserologie wichtigen Antikörper gehören den Immunglobulinklassen IgG und IgM an (seltener der IgA Klasse).

Je nach Immunglobulinklasse reagieren die Antikörper serologisch verschieden. Die hauptsächliche Methode zum Nachweis von erythrozytären Blutgruppenmerkmalen ist die Hämagglutination in ihren Modifikationen. In geringem Umfang ist auch noch die Beurteilung der Hämolyse beim Nachweis von Blutgruppenantigenen (bzw. Antikörpern) von Bedeutung.

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung	Version	03
	AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Gültig ab	---
		Seite	3 von 14

2.1 Hämagglutination

Die Hämagglutination ist die sichtbare Verklumpung der Erythrozyten durch Antikörper. Erythrozyten tragen an ihrer Oberfläche einen Überschuss an negativer Ladung und stossen sich gegenseitig ab. Um eine für das Auge sichtbare Verklumpung zu erreichen, ist eine Reaktion des spezifischen Antikörpers mit zwei benachbarten Erythrozyten notwendig.

In der Regel sind nur IgM Moleküle aufgrund ihres grösseren Durchmessers (grösser als IgG Moleküle) in der Lage die durch die negative Ladung bedingte Distanz der benachbarten Erythrozyten zu überbrücken und somit ohne zusätzliche Hilfsmittel eine sichtbare Agglutination zu erzielen (komplette Antikörper). Man nennt sie auch NaCl wirksame Antikörper, da sie in physiologischer Kochsalzlösung reagieren. ihr Reaktionsoptimum liegt in der Regel bei Raumtemperatur oder darunter, im Extremfall bei 0°C.

Antikörpermoleküle der IgG Klasse reagieren zwar mit den individuellen Erythrozyten, sie können aber aufgrund der geringeren Molekülgrösse den Abstand zwischen benachbarten Erythrozyten nicht ohne weitere Hilfsmittel überbrücken. Durch Zugabe von Supplementen (Albumin, Dextran) oder Enzymen (Bromelin, Papain etc.) wird die Distanz reduziert, so dass ein IgG Molekül nun auch in der Lage ist, mit Antigenen von benachbarten Erythrozyten zu reagieren, um eine sichtbare Agglutination auszulösen (inkomplette Antikörper. Diese inkompletten Antikörper haben ihr Reaktionsoptimum bei einer Temperatur von 37°C.

2.2 Coombstest (ICT, DCT)

Der Antihumanglobulin (AHG)- bzw. Coombs-Test ist eine weitere Form der Hämagglutination zum Nachweis von inkompletten Antikörpern. Abhängig von der Indikation wird der AHG-Test als indirekter Coombstest (ICT) oder als direkter Coombstest (DCT) durchgeführt.

- Indirekter Coombs-Test: der ICT dient der Sichtbarmachung einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Er wird als Mehrstufentest durchgeführt. Serum wird mit Testerythrozyten versetzt, bei 37°C kommt es zur Bindung der Antikörper an das komplementäre Antigen. Anschliessend erfolgt die Zentrifugation. Die beladenen Erythrozyten agglutinieren mittels AHG (das sich in dem Gelröhrchen befindet). Je nach Antikörperstärke findet eine mehr oder weniger ausgeprägte Agglutinationsreaktion statt
- Direkter Coombs-Test: der DCT dient dem Nachweis von Antikörpern und/oder Komplementfaktoren, die sich in vivo an die Erythrozyten gebunden haben. Es entfällt die Inkubation bei 37°C. Die Erythrozyten werden einmal mit Waschlösung gewaschen. Der DCT kommt zur Anwendung:
 - a) bei Verdacht auf eine autoimmunhämolytische Anämie,
 - b) zum Nachweis einer Bindung von Alloantikörpern an transfundierte Erythrozyten,
 - c) bei Neugeborenen zur Diagnose eines M.h.n. durch mütterliche IgG Antikörper

2.3 Hämolyse

Abhängig von der Immunglobulinklasse des Antikörpers und der Antigendichte am Erythrozyten können Antigen-Antikörper-Komplexe das Komplementsystem (falls frische komplementaktive Sera verwendet werden) aktivieren und eine Zerstörung der Erythrozytenmembran mit Freisetzung von Hämoglobin bewirken.

2.4 AB0-System

Das AB0-System ist das wichtigste Blutgruppensystem für die Bluttransfusion und besteht aus den vier Blutgruppen A, B, AB und 0. Das Probanden-Serum enthält reguläre Antikörper gegen diejenigen AB0-Antigene, die nicht auf der Oberfläche der eigenen Erythrozyten vorhanden sind. Es handelt sich vorwiegend um komplette Antikörper (IgM Klasse), die erst im Verlauf der ersten Lebensmonate gebildet werden. Die Bestimmung der AB0-Blutgruppe wird immer als Doppelbestimmung durchgeführt und zwar

- Untersuchung der Erythrozytenmerkmale mit monoklonalen Testreagenzien Anti-A und Anti-B
- Bestätigung der Serumeigenschaften (Anti-A und Anti-B) mit Testerythrozyten A₁, A₂ und B
- **Im Falle der Blutgruppenbestimmung bei Neugeborenen entfällt die Serumgegenprobe, stattdessen erfolgt eine Doppelbestimmung der Erythrozyteneigenschaften**

2.5 Weitere Blutgruppen-Systeme

Das Rhesus-System ist ein weiteres wichtiges und vom AB0-System unabhängiges Blutgruppensystem. Als Rh-positiv werden alle Personen bezeichnet, bei denen das Merkmal „D“ nachweisbar ist. Ein Antikörper gegen „d“ konnte bisher nicht nachgewiesen werden, deshalb wird jede Person als Rh-negativ (dd) bezeichnet, bei der das Merkmal „D“ nicht feststellbar ist. Etwa 85% der mitteleuropäischen Bevölkerung sind Rh-positiv. Im Fall einer Transfusion muss insbesondere das Merkmal D aufgrund seiner starken Immunogenität beachtet werden.

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung	Version	03
	AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Gültig ab	---
		Seite	4 von 14

Ausserhalb des Rh-Systems besitzen die Hauptantigene des Kell-Systems eine starke Immunogenität. Bei Frauen im gebärfähigen Alter und bei Patienten mit einer voraussehbar langzeitigen Transfusionsbehandlung wird daher neben der Rh-Formel auch das Kell-System (Kell, cellano) bei der Hämotherapie berücksichtigt.

Darüber hinaus gibt es ca. 300 weitere Antigene, die nicht routinemässig untersucht werden. Bei der Vielzahl der möglichen Kombinationen können im Fall einer Transfusion alle diese Antigene im Sinne einer identischen Übertragung keine Berücksichtigung finden. Sie werden aber beim Antikörpersuchtest über den Ausschluss irregulärer Antikörper und durch Kompatibilitätsprüfung bei der serologischen Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) auffällig.

2.6 Arbeitstechnik*

Für die Blutgruppenserologie kommt das Diamed-ID-System zur Anwendung. Bei diesem System findet die Agglutination in einem mit Gelkügelchen befüllten Röhrchen statt (Geltechnik).

Im Mittelpunkt der Geltechnik stehen mit Gelkügelchen (Dextran) befüllte Mikroröhrchen. Das Prinzip des Geltests beruht auf der Kombination von Agglutinationsreaktion (Antigen-Antikörper-Reaktion) und Zentrifugation des Gelröhrchens.

Erythrozyten und Serum werden in den nach oben erweiterten Bereich des Röhrchens (= Reaktionskammer) eingefüllt und inkubiert. Anschliessend werden die Mikroröhrchen unter definierten Bedingungen zentrifugiert. Bei negativem Reaktionsausfall sedimentieren die Erythrozyten bis zum Röhrchenboden; bei positivem Reaktionsausfall werden die agglutinierten Erythrozyten im Gel aufgehalten.

Das Gel erfüllt drei verschiedene Funktionen:

- zu Beginn der Zentrifugation werden die Erythrozyten aufgrund ihres Gewichtes vom Serum getrennt
- danach treffen sie auf das Reagenz und werden schliesslich im Gel aufgehalten aufgrund der entstandenen Komplexe (= Antigen-Antikörper-Reaktion, i.e. agglutinierte Erythrozyten)
- oder die Erythrozyten passieren die Gelmatrix (= nicht agglutinierte Erythrozyten)



Positive Reaktion: eine positive Reaktion ist als rote Linie auf dem Gel sichtbar.

Schwach positive Reaktion: bei schwach positiven Reaktionen sind die Agglutinate im Gel verteilt.

Negative Reaktionen: bei negativen Reaktionen sind die Erythrozyten am Boden der Röhrchen als roter Knopf sichtbar.

Die Inkubations- und Ablesetechnik ist einfach und sicher durchzuführen. In der Reaktionskammer erfolgt nach dem Einbringen von LISS, Erythrozyten und Serum bei 20°C (AB0 und Rh-System) bzw. bei 37°C im Wärmeblock (AKS und Kreuzproben) die Antigen-Antikörper-Reaktion. Während der Zentrifugation bei fest eingestellter g-Zahl und Zentrifugationszeit sedimentieren die Erythrozyten in Abhängigkeit von der Agglutinationsstärke. Grosse Agglutinate bleiben oben in der Säule hängen; je feiner die Agglutinate sind desto tiefer senken sie sich. Bei Verwendung von Mikroröhrchen mit AHG-Reagenz werden die nicht an Erythrozyten gebundenen Gammaglobuline durch eine hochmolekulare Flüssigkeit in der Reaktionskammer gehindert, das in der Säule befindliche Coombs Serum zu neutralisieren.

Beim Diamed-ID-System kommen folgende Varianten der Geltechnik zum Einsatz:

* Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handelt.

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	5 von 14

- Blutgruppen Bestimmungskarten: Testreagenzien sind in den Reaktionskammern enthalten
- Rh-Untergruppen (plus Kell) Bestätigungskarten: Testreagenzien sind in den Reaktionskammern enthalten
- Blutgruppen Bestätigungskarten: Testreagenzien befinden sich in den Reaktionskammern
- Gelkarten für NaCl-, Enzymtest und Kälteagglutinine: s. Neutral-Gel (NaCl) Karten
- Neutral-Gel (NaCl) Karten: Mikroröhrchen enthalten nur Gelkugeln (Dextran) in Suspensionsflüssigkeit
- LISS/Coombs Karten: oberhalb der Gelmatrix befindet sich eine hochmolekulare Flüssigkeit; die Gelmatrix enthält Antihumanglobulin Antikörper

Die Blutgruppen- und Rh-Faktorbestimmung werden immer zusammen angesetzt. Das Diamed-ID-System zur Blutgruppenbestimmung bietet in einem Ansatz ein vollständiges Profil für die Bestimmung von AB0 und RhD einschliesslich des Antihumanglobulintests (für den Antikörpersuchtest bzw. **bei Neugeborenenblut für den DCT**). Die zwei Anti-D Antikörper in den Gelkarten sind negativ für die Variante D^{VI}.

Die Serumgegenprobe entfällt bei Neugeborenenblut (s. Punkt 2.4).

Eine zusammenfassende Darstellung von Fehlermöglichkeiten der Diamed-Methode s. Anlage.

3 Patientenbezogene und methodische Angaben

3.1 Untersuchungsmaterial

Blutproben für blutgruppenserologische Untersuchungen sind immer nur für diesen Zweck bestimmte, frisch abgenommene Blutproben. Die eindeutige Identitätssicherung ist unerlässlich

- Vollblut, EDTA-Blut
- **Nabelschnurblut** (Nabelschnurblut wird als solches gekennzeichnet)

Nach Abschluss der Untersuchungen wird das Original-Probengefäss mindestens 10 Tage gekühlt bei 2 bis 8°C aufbewahrt.

3.2 Mindestmenge

- 5 mL

3.3 Störfaktoren

- Hämolyse des Blutes

3.4 Stabilität

- 14 Tage bei 2-8°C

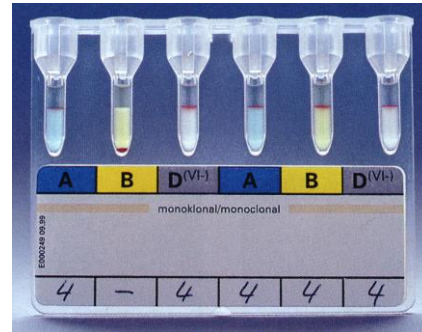
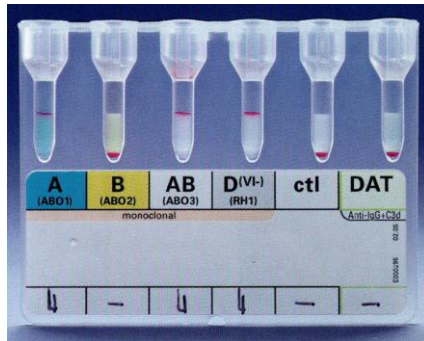
4 Reagenzien, Hilfsmaterialien, Geräte

4.1 Reagenzien

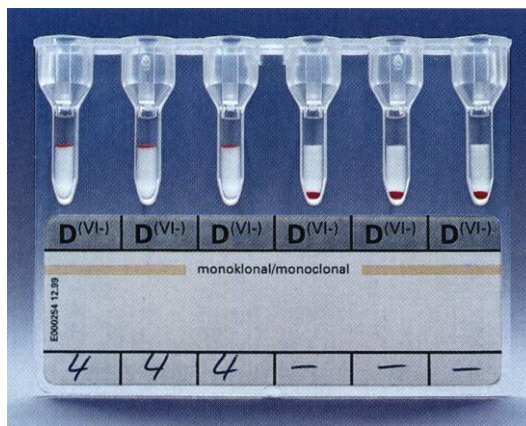
Es werden ausschließlich CE zertifizierte Reagenzien verwendet. Hersteller und Chargenbezeichnung aller Testreagenzien werden dokumentiert.

- ID-Karte DiaClon A-B-AB-D^{VI}-ctl-DAT mit monoklonalen Antikörpern Anti-A, Anti-B, Anti-D (für Neugeborene). Ein Mikroröhrchen enthält die negative Kontrolle (ctl). Das Anti-Humanglobulin ist eine Mischung aus Kaninchen Anti-IgG und monoklonalem Anti-C3d
- ID-Karte DiaClon ABD-Bestätigung mit monoklonalen Antikörpern A-B-D^{VI}
- ID-Karte LISS/Coombs mit polyspezifischem Antihumanglobulin (AHG) vom Kaninchen

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung	Version	03
	AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Gültig ab	---
		Seite	6 von 14



- ID-Karte DiaClon Anti-D^{VI} neg. mit monoklonalen Antikörpern Anti-D^(VI-) (diese Karte wird für die tägliche Qualitätskontrolle verwendet)



- ID-Interne Qualitätskontrolle (mit Cell 1, Cell 2, Cell 3, Cell 4 und Cell 5 sowie Serum 1, Serum 2 und Serum 3)
- ID-Diluent 2
- 0.9% NaCl Lösung

4.2 Hilfsmaterialien

- Rundbodenröhrchen
- Suspensionsröhrchen
- ID-Tips (Pipetorspitzen)
- Pipettenspitzen

4.3 Geräte

- Eppendorf Pipette 10-100 µL
- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Inkubator 37°C
- ID-Zentrifuge
- **Saxo ID-Reader und Maestro-Software (DiaMed)**, teilautomatisiertes Gerätesystem für die Probenbearbeitung unter Verwendung der DiaMed ID-Karten: Probenerfassung, Arbeitslisten, Inkubation, Zentrifugation, Auswertung (= Ablesung der Reaktionen mit Vorschlag der Untersuchungsergebnisse als sog. erst-ablesende Person, die von einer zwei-

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	7 von 14

ten Person immer bestätigt werden müssen), Dokumentation und Befunderstellung mit systematischer Überwachung aller Arbeitsschritte

5 Qualitätskontrolle

Qualitätskontrollen umfassen interne und externe Kontrollen gemäss Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBÄK); externe Qualitätssicherung (einmal pro Quartal) mittels Ringversuche der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie und INSTAND entsprechend Art der durchgeführten immunhämatologischen Untersuchungen.

5.1 Tägliche Qualitätskontrolle

- Visuelle Kontrolle der Reagenzien, ID-Karten und Materialien auf Abweichungen gemäss Herstellerangaben
- Wechsel von Reagenzienchargen: Qualitätskontrollen, wenn die Reagenzienchargen gewechselt werden
- Prüfung auf Autoagglutination: Kontrolle mit Rhesuskontrollserum muss bei jeder Rhesus-D-Blutgruppenbestimmung, eindeutig negativ sein muss (Standardarbeitsanweisung SA- ... *Rhesus-Kontrolle, Autoagglutination*)

5.2 Wöchentliche Kontrollen

- Chargenkontrolle: alle Chargen werden zusätzlich zur visuellen Kontrolle einer wöchentlichen Funktionskontrolle unterzogen; Überprüfung des Verfallsdatums; Chargenänderungen werden dokumentiert; alte Chargen werden verworfen. Jede Untersuchung muss eindeutig zu den verwendeten Reagenzien/Chargen zuzuordnen sein
- AB0-Blutgruppe mit der entsprechenden ID-Karte (ID-Karte DiaClon A-B-AB-D-ctl-AHG) und ID-Interne Qualitätskontrolle (Cell 1 bis Cell 4; Cell 5 für den direkten Antihumanglobulintest)
- Anti-D Kontrolle: Verwendung von Rh-positiven und Rh-negativen Testerythrozyten (Cell 1 und Cell 3 aus der ID-Interne Qualitätskontrolle) in der ID-Karte DiaClon Anti-D^{VI} negativ mit monoklonalen Antikörpern Anti-D^(VI-)



6 Durchführung des Tests

6.1 Vorbereitung

- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen
- **Nabelschnurblut vor Gebrauch mit 0.9% NaCl Lösung waschen (3 Waschzyklen)**
- Herstellung einer 0.8%igen gewaschenen Erythrozytensuspension in ID-Diluent 2

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	8 von 14

- 1.0 mL ID-Diluent 2 in ein sauberes Röhrchen pipettieren
- 10 µL Erythrozytenkonzentrat zugeben, leicht mischen, die Erythrozytensuspension kann sofort verwendet werden
- Cell 1, Cell 2, Cell 3, Cell 4 und Cell 5 aus ID-Interne Qualitätskontrolle vorsichtig resuspendieren

Hinweis zum DAT-Röhrchen: zusammen mit der Blutgruppenbestimmung ansetzen; das DAT-Röhrchen ist ein „**DCT-Ansatz**“, der parallel zur ID-Karte LISS/Coombs (DCT) angesetzt wird.

6.2 Testansatz AB0 Blutgruppe, Rh-Faktor und DAT (1.DCT)

- Gemäss der *Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie, Gesamtnovelle 2014)* wird die Bestimmung der Merkmale des AB0-Systems und des Rh-Faktors D im Doppelansatz durchgeführt. Für das AB0-System kommen monoklonale Antikörper Anti-A und Anti-B zum Einsatz, eine Negativkontrolle (ctl) wird mitgeführt. Als Zweitansatz dient die *ID-Karte DiaClon ABD-Bestätigung*
- ID-Karte „DiaClon A-B-AB-D-ctl-DAT für Neugeborene“ und ID-Karte DiaClon „ABD-Bestätigung“ eindeutig beschriften
- Aluminiumfolie in aufrechter Kartenposition entfernen
- Jeweils 50.0 µL der Erythrozytensuspension in die Mikroröhrchen der ID-Karten pipettieren
- a) Manuelle Bearbeitung: ID-Karte 10 Minuten in der ID-Zentrifuge zentrifugieren, Reaktionen ablesen und protokollieren
- b) Teilautomatisierte Bearbeitung: ID-Karte in den Saxo ID-Reader stellen, die weiteren Schritte werden von dem Gerät selbständig (Maestro-Software) gesteuert und durchgeführt
- Qualitätskontrolle: Test-Erythrozyten unverdünnt und wie die Patienten-Erythrozyten in den Test einsetzen

6.3 Testansatz der Serumeigenschaften

- Bei Neugeborenen/Säuglingen werden keine Serumeigenschaften angesetzt. Hier erfolgt ein Zweitansatz der Erythrozyteneigenschaften mit der *ID-Karte DiaClon ABD-Bestätigung* (s.o.).
Richtlinie Hämotherapie 2017 (Kap 4.4.6), *Zitat: Bei Neugeborenen und Säuglingen bis zum Abschluss des 3. Lebensmonats kann die Serumgegenprobe entfallen. In diesem Fall ist der serologische Befund als vorläufig zu kennzeichnen.*

6.4 Testansatz direkter Coombstest (2. DCT)

- ID-Karte LISS/Coombs eindeutig beschriften
- Aluminiumfolie in aufrechter Kartenposition entfernen
- Jeweils 50.0 µL der Erythrozytensuspension in die Mikroröhrchen der ID-Karten pipettieren
- a) Manuelle Bearbeitung: ID-Karte 10 Minuten in der ID-Zentrifuge zentrifugieren, Reaktionen ablesen und protokollieren
- b) Teilautomatisierte Bearbeitung: ID-Karte in den Saxo ID-Reader stellen, die weiteren

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	9 von 14

Schritte werden von dem Gerät selbständig (Maestro-Software) gesteuert und durchgeführt

6.5 Ablesen der Agglutinationsreaktionen

- Allgemeines Auswertungsprinzip der Diamed-ID-Gelkarten

Auswertung der Gelsäulen	
Ø Reaktion	Alle Erythrozyten sind durch die Gelsäule gewandert und bilden einen glatten Zellknopf
1 + Reaktion	Die meisten Erythrozyten sind in die untere Hälfte der Gelsäule gewandert. Ein Zellknopf ist am Boden zu sehen
2 + Reaktion	Agglutinierte Erythrozyten sind über die gesamte Gelsäule verteilt. Ein kleiner Zellknopf kann am Boden der Säule vorhanden sein
3 + Reaktion	Agglutinierte Erythrozyten sind in der oberen Hälfte der Gelsäule hängen geblieben
4 + Reaktion	Agglutinierte Erythrozyten bilden eine Schicht auf der Gelsäule

- Interpretation der Reaktionen in der DiaMed-ID-Karte „DiaClon AB0/D+DAT“ siehe Kapitel 7 Ergebnisse, Befundung

7 Ergebnisse, Befundung

Vollständige Protokollierung aller blutgruppenserologischen Untersuchungen einschliesslich Reaktionsausfall und Kontrollen.

7.1 Ergebnisse AB0 Blutgruppe und Rh-Faktor

Reaktionen der Blutgruppen AB0 *			
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Blutgruppe
+ bis +++++	negativ	+ bis +++++	A
negativ	+ bis +++++	+ bis +++++	B
+ bis +++++	+ bis +++++	+ bis +++++	AB
negativ	negativ	negativ	0

* Das Mikroröhrchen „ctl“ muss eine negative Reaktion aufweisen. Falls „ctl“ positiv ist, ist die Blutgruppenbestimmung ungültig. Der Test muss wiederholt werden (s. unten Anmerkung)

Reaktionen für RhD *			
ID-Karte	+++ bis +++++	± bis ++	negativ
RhD	RhD positiv	RhD schwach positiv	RhD negativ
* Das Mikroröhrchen „ctl“ muss eine negative Reaktion aufweisen. Falls „ctl“ positiv ist, ist die RhD-Bestimmung ungültig. Der Test muss wiederholt werden (s. unten Anmerkung)			

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung	Version	03
	AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Gültig ab	---
		Seite	10 von 14

* Bei Rh-negativen Müttern ist die Bestimmung des RhD und des schwachen D beim Neugeborenen unerlässlich.
Bei schwachen, ± oder Spuren von Reaktionen werden weiterführende Untersuchungen zur Unterscheidung zwischen schwachen und Kategorien der partiellen D Typen empfohlen

- Anmerkung: die negative Kontrolle (ctl) muss immer eine negative Reaktion zeigen. Falls sie positiv ist, wie folgt fortfahren:
 - Erythrozyten erneut waschen (1 Waschzyklus mit isotonischer Kochsalzlösung oder mit ID-Diluent 2)
 - Zubereitung einer 0.8%igen Erythrozytensuspension
 - Fortfahren wie bei 6.2 und 7.1 beschrieben
- Alle Untersuchungsergebnisse werden durch eine **zweite Person** gegengelesen und dokumentiert; bei Verwendung des Saxo ID-Readers (mit der Maestro-Software) entspricht das Gerätesystem dem *Erstableser*. Die bearbeitende MTA ist als *Zweitableser* (= die *zweite ablesende Person*)
- Alle Blutgruppenergebnisse werden mit Angabe der Reaktionsstärke dokumentiert
- Bei negativem Ergebnis aller RhD-Testansätze gilt die Blutprobe als RhD-negativ. Bei übereinstimmend positivem Ergebnis ist die Blutprobe RhD-positiv
- Bei Anwesenheit von „schwachen D's“ können die Reaktionsstärken der beiden Anti-D's variieren. In diesen Fällen ist die aktuelle **Hämotherapie Richtlinie der Bundesärztekammer** (Gesamtnovelle 2017) zu beachten
- **Das Mikroröhrchen „ctl“ und der Test auf Autoagglutination müssen immer „negativ“ reagieren.** Bei positiven Reaktionen ist die Blutgruppenbestimmung ungültig
- Alle Ergebnisse einschl. der Qualitätskontrolle protokollieren, durch den Namen des Untersuchers dokumentieren und als Dokument archivieren
- Zweifelhafte Untersuchungsergebnisse müssen immer wiederholt werden. Bei unklaren Untersuchungsergebnissen hat eine Unterrichtung des diensthabenden Arztes zu erfolgen zur Klärung des weiteren Vorgehens und der Ergebnisbeurteilung, ggf. muss externer Sachverstand eingeholt werden (DRK-Blutspendedienst)

7.2 Ergebnisse direkter Coombstest

- Alle Untersuchungsergebnisse werden durch eine zweite Person gegengelesen; bei Verwendung des Saxo ID-Readers (mit der Maestro-Software) entspricht das Gerätesystem dem *Erstableser*. Die bearbeitende MTA ist dann die *zweite ablesende Person*
- Alle Blutgruppenergebnisse werden mit Angabe der Reaktionsstärke protokolliert und dokumentiert
- Eine negative Reaktion in den Mikroröhrchen bedeutet, dass auf den Erythrozyten keine Immunglobulinmoleküle oder C3d Komplementkomponenten gebunden bzw. nachweisbar sind
- Zweifelhafte Untersuchungsergebnisse werden wiederholt. Bei weiterbestehenden Zweifeln wird die Blutprobe zur weiteren Abklärung an ein Referenzlabor (DRK Blutspendedienst) geschickt
- Eine positive Reaktion (± bis +++) deutet darauf hin, dass die Erythrozyten sensibilisiert worden sind (Erythrozyten *in vivo* mit Immunglobulin/Antikörpern und/oder C3d beladen). **Ein positiver direkter Coombstest gilt als Hinweis auf die Beladung der kindlichen Erythrozyten mit mütterlichen, plazentagängigen Alloantikörpern (IgG-Typ). Es besteht die Gefahr eines Morbus haemolyticus neonatorum**

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	11 von 14

- Bei positivem Ausfall sind weitere Untersuchungen zur Klärung anzustreben: Spezifität der Antikörper, ggf. Blutproben vom Neugeborenen und der Mutter weiterleiten an ein Referenzlabor (DRK-Blutspendedienst)

7.3 Befundung

- Prinzipiell: alle „BG-Befunde“ (AB0, DCT etc.) müssen von der für die technische Untersuchung verantwortlichen Person überprüft und durch Unterschrift betätigt werden; dies betrifft auch jede Eintragung von Blutgruppenbefunden in Ausweise
- Untersuchungsergebnisse werden (nach der Gegenlesung durch eine zweite Person) zur Befundfreigabe und ärztlichen Validation in ein LIS (EDV) eingegeben; Schreibweise der Befunde, siehe Anlagen *Schreibweise der Blutgruppen-Ergebnisse in Befundberichten*
- Mitteilung im Laborbericht, dass die Blutgruppe ohne Serumeigenschaften bestimmt wurde und eine Kontrolle nach dem 1. Lebensjahr erfolgen soll (z.B. „Vorläufiger Befund, bitte Kontrolle nach einem Jahr“)
- Die klinische Relevanz von immunhämatologischen Auffälligkeiten (z.B. DCT) ist im Befund anzugeben
- Ergebnisse einer „Fremdleistung“ müssen im **exakten Wortlaut** in den Blutgruppenbefund übernommen werden
- Jede Befundausgabe (ärztlicher Befund/Laborbericht) wird von dem für die Untersuchung verantwortlichen Arzt unterschrieben
- Die Weitergabe von Blutgruppenbefunden über Telefon ist nicht zulässig

7.4 Vorgehensweise bei positivem DCT

- Bei einem positiven direkten Coombstest wird der behandelnde Arzt in Kenntnis gesetzt, dass eine Blutprobe des Neugeborenen und eine Probe der Mutter weiter differenziert werden sollten (Weiterleitung an ein Referenzlabor, z.B. DRK Blutspendedienst). Diagnostische Schritte können bei klinischem und laborchemischem Anhalt für einen Morbus haemolyticus neonatorum erforderlich werden (Beachtung der mütterlichen Anamnese, Beachtung von Hämolysezeichen)

8 Referenzbereiche

Nicht belegt

9 Grenzen des Verfahrens

- Fehlermöglichkeiten und Gefahren bei der Gelkarten-Technik (s. Anlage)
- Beipackzettel Diamed-ID Micro Typing System, Fa. DiaMed AG

10 Literatur

- Transfusionsgesetz (TFG). Transfusionsgesetz mit textlich nachgewiesenen Änderungen. Das Transfusionsgesetz ist online abrufbar unter: <http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/tfg/>
- Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie). Aufgestellt gemäß §§ 12a und 18 Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut, Gesamtnovelle 2017.
Die Richtlinie ist online abrufbar unter:

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	12 von 14

http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/MuE/Richtlinie_Haemotherapie_2017.pdf
oder online abrufbar unter:
<http://www.baek.de/haemotherapie>

- Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK). Dtsch Ärztebl 111, Heft 38, A1583-A1618, 2014
- Kretschmer V und Sonneborn HH: Blutgruppenantigene und –Antikörper. In: *Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik* (Thomas L, Hrsg.), pp 1226-1290, 7. Auflage. TH-Books, Frankfurt 2008
- Singbartl G und Walther-Wenke G: *Transfusionspraxis*, 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin 2014

11 Mitgeltende Unterlagen

- Gesetze und Richtlinien (s. 10 Literatur)
- VA- ... Probenannahme, Auftragsprüfung und Erfassung
- KA- ... Kurzanleitung Probenerfassung
- KA- ... Kurzanleitung Qualitätssicherung in der Blutgruppenserologie
- BA- ... Bedienungsanleitung DiaMed Saxo Modul
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Rh-Formel und Kell
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Antikörpersuchtest (AKS)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung ABD-Bestätigungstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Direkter Coombstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Serologische Verträglichkeit (Kreuzprobe)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)

12 Anlagen

- Fehlermöglichkeiten und Gefahren bei der Gelkarten-Technik

Problem	Mögliche Auswirkung	Ursachen	Lösungen
Flüssigkeitsspiegel im Gelröhrchen niedrig (<1 mm über der Gelsäule)	Falsch positive Ergebnisse	Gelröhrchen verfallen	a) Test mit neuer Karte wiederholen b) Lagerungsvorschrift beachten
Kälteagglutinine	Alle Ansätze einschl. Eigenkontrolle sind positiv	AHG-Test ohne vorheriges Waschen der Erythrozyten	Wiederholung des Tests, Serum und Erythrozyten auf 37°C vorwärmen, kein LISS verwenden, 30 Min. inkubieren
Überlagerte Proben	a) Diffuse und unklare Reaktionen b) Falsch positive Ergebnisse (gesprenkeltes Reaktionsbild)	a) alte geronnene und antikoagulierte Proben neigen zur Absorption von IgG und Komplement	Wiederholung des Tests mit frischem Probenmaterial

Labor	Standard-Arbeitsanweisung		Dok.-Nr. SOP ...
	Blutgruppenbestimmung		Version 03
	AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)		Gültig ab ---
			Seite 13 von 14

		b) Veränderung der Erythrozytenmembran bei Lagerung	
Falsche Zentrifugationsgeschwindigkeit	a) Falsch positive Ergebnisse b) Unklare Ergebnisse c) falsch negative Ergebnisse	a) Zentrifugation zu niedrig: Erythrozyten bleiben hängen (schwach pos. oder unklares Ergebnis) b) Zentrifugation zu hoch: schwache Agglutinate sinken auf den Boden (falsch negatives Ergebnis)	Wiederholung des Tests, Zentrifugation nach Vorschrift
Niedriger Flüssigkeitsstand in der Säule nach Testbeendigung	Falsch negative Ergebnisse	Fehlende Materialzugabe (Serum fehlt)	Wiederholung des Tests und sicher stellen, dass alle Reaktionspartner zugegeben wurden
Gemischte Zellpopulationen	Mischfeld-Agglutination (starke Reaktion oben in der Säule und Zellknopf am Boden)	Mischfeldagglutination a) bei Vortransfusion, b) bei Transplantation c) bei genetischem Chimärismus	Transfusionsanamnese beachten
Linien an der Oberfläche	Linien können als falsch positiv interpretiert werden, Erscheinungsbild wie bei Mischfeld-Agglutination	a) Fibrinpartikel im Plasma b) unvollständig gewaschene Erythrozyten	a) Fibrinpartikel durch Zentrifugation entfernen b) Erythrozyten einmal waschen, um Plasmareste und Thrombozyten zu entfernen c) Patientenanamnese

- Beipackzettel Diamed-ID Micro Typing System, Fa. DiaMed AG (nur im Arbeitsexemplar der Arbeitsanweisung)
- Schreibweise der Blutgruppen-Ergebnisse in Befundberichten (Auszug aus *Richtlinie Hämotherapie*)

- **Erythrozytenmerkmale im AB0-System**

A
B
0
AB

die Untergruppen werden durch Zusätze gekennzeichnet, z.B.

A(1), A(2), A(1)B, A(2)B

- **Erythrozytenmerkmale im Rhesus-System (Rh)**

RhD-positiv und RhD-positiv (weak D positiv) sind Personen mit folgenden Merkmalen im Rh-System (Schreibweise beispielhaft empfohlen)

CcD.ee

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeb.)	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	14 von 14

CCD.ee

CcD.Ee

ccD.EE

ccD.ee

RhD-negativ sind Personen mit folgenden Merkmalen im Rh-System:

ccddee

Ccddee

ccddEe

CcddEe

usw.

- **Sonstige Blutgruppenmerkmale der Erythrozyten**

Die Schreibweise richtet sich nach der international üblichen Nomenklatur. Bei handschriftlichen Befundeintragungen müssen zur Vermeidung von Verwechslungen Blutgruppenbezeichnungen mit Kleinbuchstaben grundsätzlich mit einem Querstrich über dem Buchstaben versehen werden.