

| | | | |
|--------------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 1 von 10 |

X 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 | 3 |
| 2.3 | Hämolyse | 3 |
| 2.4 | AB0-System | 3 |
| 2.5 | Rhesus-System (Rh-System) | 3 |
| 2.6 | Weitere Blutgruppen-Systeme | 4 |
| 2.7 | 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 | 6 |
| 5.1 | Wöchentliche Qualitätskontrolle | 7 |
| 6 | Durchführung des Tests | 7 |
| 6.1 | Vorbereitung (vgl. 6.2 Testansatz Rh-Formel und Kell) | 7 |
| 6.2 | Testansatz Rh-Formel und Kell | 8 |
| 6.3 | Ablesen der Reaktionen für Rh-Phänotypen und Kell | 8 |
| 7 | Ergebnisse, Befundung | 9 |
| 7.1 | Ergebnisse | 9 |
| 7.2 | Befundung | 10 |
| 8 | Referenzbereiche | 11 |
| 9 | Grenzen des Verfahrens | 11 |
| 10 | Literatur | 11 |
| 11 | Mitgeltende Unterlagen | 11 |
| 12 | Anlagen | 12 |

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

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

| | | | |
|-------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 2 von 13 |

1 Indikation, Verantwortlichkeiten

Die Indikation zur Bestimmung von immunhämatologischen Parametern stellt der behandelnde Arzt. 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.

Allgemeine Indikationen für immunhämatologische Untersuchungen sind z.B.

- Präoperative Patientenvorbereitung
- Untersuchung im Rahmen einer Mutterschaftsvorsorge
- Vorbereitung im Rahmen einer geplanten Hämotherapie
- Untersuchungen im Rahmen einer Notfall-Hämotherapie
- Blutgruppenbestimmung mit Rh-Formel bei Mutter und Neugeborenem bei Verdacht auf MHN
- Rhesus-Formel (CcD.Ee) und Hauptantigene des Kell-Systems werden bei entsprechender Indikation (TFG, Richtlinie Hämotherapie) untersucht, z.B. bei Kindern, Mädchen und Frauen im gebärfähigen Alter mit voraussichtlicher Transfusion sowie bei polytransfundierten Patienten und bei Personen mit voraussichtlicher Langzeittransfusion
- Zu jeder Blutgruppenbestimmung gehört ein Antikörpersuchtest mit dem indirekten Coombstest (ICT); ein positiver Antikörpersuchtest erfordert weitere Abklärungen (Spezifität, Antikörpertiter)
- Die eindeutige Identitätssicherung ist bei allen immunhämatologischen Untersuchungen 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).

| | | | |
|--------------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 3 von 13 |

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.

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

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 (in der Geltechnik, s.u.): 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 als Doppelbestimmung durchgeführt. Für die Untersuchung der Erythrozytenmerkmale kommen monoklonale Testreagenzien Anti-A und Anti-B zur Anwendung. Zur Bestätigung werden die Serumeigenschaften (Anti-A und Anti-B) mit Testerythrozyten A₁, A₂ und B nachgewiesen.

2.5 Rhesus-System (Rh-System)

„Rhesus“ ist die Bezeichnung für ein wichtiges, unabhängig vom AB0-System existierendes Blutgruppensystem. Als Rh-positiv werden alle Personen bezeichnet, bei denen das Merkmal „D“ nachweisbar ist. Ein Antikörper

| | | | |
|--------------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 4 von 13 |

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.

Auf der Oberfläche eines D-positiven Erythrozyten befinden sich ca. 10.000-30.000 Rh-D Antigenmoleküle. Das einzelne D-Antigen setzt sich wie ein Mosaik aus verschiedenen Epitopen zusammen. Bei den sog. schwachen D-Antigenen ist entweder die Anzahl der D-Antigene (alle Epitope vorhanden) auf der Erythrozytenoberfläche vermindert oder es fehlen einige Epitope.

- D^{weak} (früher meistens als D^u bezeichnet): alle Epitope sind vollständig vorhanden, die Anzahl der D-Antigene ist jedoch verringert (< 10.000). Diese Personen können kein Anti-D bilden und werden als Rh-positiv befundet (Schwangere erhalten keine Anti-D-Prophylaxe)
- Kategorie-D (= D^{partial}, D variant): die Anzahl der D-Antigenmoleküle auf den Erythrozyten ist meist verringert (kann aber auch wie bei einem normalen D-positiven Probanden im Normbereich liegen). Bei den D-Antigenen der D-Kategorie sind bestimmte Epitope nicht vorhanden. Bei der sog. Kategorie D^{VI} sind nicht alle Epitope vorhanden und zusätzlich ist die Anzahl der D-Antigene vermindert. Diese Personen können Anti-D Antikörper bilden
- Richtlinie Hämotherapie (Gesamtnovelle 2017): [Zitat] ... „Bei diskrepanten, fraglich positiven oder schwach positiven Ergebnissen der Testansätze mit monoklonalen IgM-Anti-D ist der Patient vorerst als „Empfänger RhD-negativ“ zu deklarieren. Eine Differenzierung mit molekulargenetischen Verfahren sollte durchgeführt werden, insbesondere bei Mädchen, bei gebärfähigen Frauen und bei Patienten mit chronischem Transfusionsbedarf ...“

Neben dem Merkmal D (das den Rh-Faktor bestimmt) gehören noch die Antigene C, c, E, e und deren Varianten zum Rh-System. Das Serum enthält in der Regel keine natürlich gebildeten Antikörper gegen Rh-Antigene. Antikörper gegen Rh-Antigene werden vorwiegend im Verlauf von Rh-Untergruppen ungleichen Transfusionen oder während einer Schwangerschaft gebildet. Dabei handelt es sich überwiegend um IgG Antikörper (seltener um IgM oder in Ausnahmen auch um IgA Antikörper)

2.6 Weitere Blutgruppen-Systeme

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 (K [Kell], k [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.

2.7 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.

Das Rhesus-Blutgruppensystem besitzt eine starke Immunogenität und muss bei Bluttransfusionen berücksichtigt werden (vgl. Transfusionsgesetz und s. oben „Rhesus-System“). Abgesehen von dem Merkmal „D“ können prinzipiell alle Rhesus-Antigene zu einer Alloimmunisierung führen und bei hämotherapeutischen Massnahmen gefährliche Transfusionszwischenfällen auslösen. Im blutgruppenserologischen Labor können deshalb abgesehen vom D-Antigen (Bestimmung mit zwei verschiedenen monoklonalen Anti-D IgM Testseren, die die Kategorie D^{VI} nicht erfassen) andere wichtige Rhesus-Antigene (C, c, E, e) sowie die Hauptantigene des Kell-Systems routinemässig bestimmt werden.

Die Nachweise von C, c, E und e sowie der Nachweis von K (Kell) erfolgen im Doppelansatz mit Immunsereen von zwei verschiedenen Herstellern oder von einem Hersteller mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern.

* 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 Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 5 von 13 |

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 durch den abnehmenden Klinikarzt ist unerlässlich (vgl. QM-Handbuch).

Wenn von einem gegebenen Patienten im Labor noch keine gültige Blutgruppenbestimmung vorliegt (in der Kartei kontrollieren), muss immer aus einer Zweitprobe (zeitversetzte Blutentnahme) unter Bezug auf die Erstuntersuchung die Blutgruppe kontrolliert werden; der Vorgang ist zu dokumentieren.

Folgende Untersuchungsproben sind prinzipiell geeignet,

- Vollblut
- EDTA-Blut
- Nabelschnurblut/Neugeborenenblut (Nabelschnurblut wird als solches gekennzeichnet)

Nach Abschluss der Untersuchungen wird das Original-Probengefäß mindestens 10 Tage gekühlt bei 4 bis 8°C aufbewahrt.

3.2 Mindestmenge

- 5 mL

3.3 Störfaktoren

- Hämolyse des Blutes

3.4 Stabilität

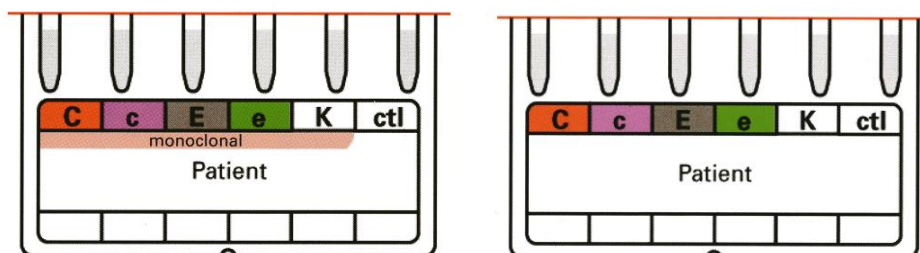
- 14 Tage bei 2-8°C

4 Reagenzien, Hilfsmaterialien, Geräte

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

4.1 Reagenzien

- ID-Karte Rh-subgroups + K (C-c-E-e-K-ctl) mit polyklonalen (humanen) Antikörpern Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e und Anti-K humanen Ursprungs
- ID-Karte Rh-subgroups + K (C-c-E-e-K-ctl) mit monoklonalen Antikörpern Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e und Anti-K



| | | | |
|-------|---|-----------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 6 von 13 |

- ID-Interne Qualitätskontrolle (mit Cell 1, Cell 2, Cell 3, Cell 4 und Cell 5 sowie Serum 1, Serum 2 und Serum 3)
- Immucor corQC EXTEND Complete, Erythrozyten mit definierten Antigen-Phänotypen:
 - a) Cor QC Std. = 0 Rh CC D ee
 - b) Cor QC 1 = 0 Rh Cc dd ee K^{neg}
 - c) Cor QC 2 = 0 Rh cc dd Ee K^{neg}
 - d) Cor QC 3 = 0 Rh cc dd ee K^{pos}
 - e) Cor QC 4 = 0 Rh cc D EE
- ID-Diluent 1 (enthält Bromelin)
- ID-Diluent 2

4.2 Hilfsmaterialien

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

4.3 Geräte

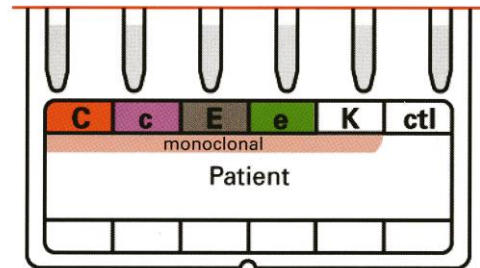
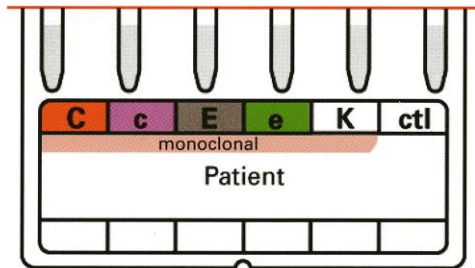
- Eppendorf Pipette 10-100 µL
- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- ID-Zentrifuge
- **Saxo ID-Reader und Maestro-Software (DiaMed)**, teilautomatisiertes Gerätesystem für die Probenbearbeitung unter Verwendung der DiaMed ID-Karten: Probenerfassung, Arbeitslisten, Inkubation, Zentrifugation, Auswertung (= Ablesung der Reaktionen mit Vorschlag der Untersuchungsergebnisse als sog. erst-ablesende Person, die von einer zweiten Person immer bestätigt werden müssen), Dokumentation und Befunderstellung mit systematischer Überwachung aller Arbeitsschritte

5 Qualitätskontrolle

Qualitätskontrollen umfassen interne und externe Qualitätskontrollen 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.

- Anti-D Kontrolle, s. Standardarbeitsanweisungen *Blutgruppenbestimmung ABO und Rh-Faktor*
- Kontrolle weiterer Rh-Merkmale: Mitführung von Positiv- und Negativkontrollen mit Immucor corQC EXTEND Complete in der ID-Karte Rh-subgroups + K (C-c-E-e-K-ctl) mit monoklonalen Antikörpern Anti-C, Anti-c, Anti-E, Anti-e und Anti-K

| | | | |
|-------|---|-----------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 7 von 13 |



Positiv-Kontrolle:

| | | |
|----------|---|------------|
| Cor QC 1 | = | Gelsäule C |
| Cor QC 1 | = | Gelsäule c |
| Cor QC 2 | = | Gelsäule E |
| Cor QC 2 | = | Gelsäule e |
| Cor QC 3 | = | Gelsäule K |

Negativ-Kontrolle:

| | | |
|-------------|---|------------|
| Cor QC 3 | = | Gelsäule C |
| Cor QC Std. | = | Gelsäule c |
| Cor QC 3 | = | Gelsäule E |
| Cor QC 4 | = | Gelsäule e |
| Cor QC 1 | = | Gelsäule K |

- Visuelle Kontrolle aller Reagenzien, ID-Karten und Materialien; auf Abweichungen gemäss Herstellerangaben achten
- Wechsel von Reagenzienchargen: Qualitätskontrollen, wenn die Reagenzienchargen gewechselt werden
- Prüfung auf Autoagglutination: Kontrolle mit Rhesuskontrollserum, eine aktuelle Kontrolle zur Prüfung auf Autoagglutination der Probe muss vorliegen und eindeutig negativ sein (Standardarbeitsanweisung *Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)*)

5.1 Wöchentliche Qualitätskontrolle

- Chargenkontrolle: alle Chargen werden zusätzlich zur visuellen Kontrolle einer wöchentlichen Funktionskontrolle unterzogen; Überprüfung des Verfallsdatums, Chargenänderungen werden dokumentiert und alte Chargen werden verworfen. Jede Untersuchung muss eindeutig zu den verwendeten Reagenzien/Chargen zuzuordnen sein
- Rh-Untergruppen und K (Kell) mit den entsprechenden ID-Karten (polyklonal und monoklonal) sowie der ID-Internen Qualitätskontrolle (Cell 1 bis Cell 4)

6 Durchführung des Tests

6.1 Vorbereitung (vgl. 6.2 Testansatz Rh-Formel und Kell)

- Herstellung einer 5%igen Erythrozytensuspension in ID-Diluent 1 für die ID-Karte „Rh-subgroups“ mit polyklonalen Antikörpern humanen Ursprungs
 - ID-Diluent 1 vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen
 - 0.5 mL ID-Diluent 1 in ein sauberes Röhrchen pipettieren
 - 50 µL Vollblut oder 25 µL Erythrozytenkonzentrat zugeben, leicht mischen
 - Suspension (im Röhrchen oder direkt in der ID-Karte) 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren; Erythrozytensuspension innerhalb von 15 Minuten nach der Inkubation verwenden
- Herstellung einer 5%igen Erythrozytensuspension in ID-Diluent 2 für die ID-Karte „Rh-subgroups“ mit monoklonalen Antikörpern murinen Ursprungs

| | | | |
|--------------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 8 von 13 |

- ID-Diluent 2 vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen
- 0.5 mL ID-Diluent 2 in ein sauberes Röhrchen pipettieren
- 50 µL Vollblut oder 25 µL Erythrozytenkonzentrat zugeben, leicht mischen
- Suspension (im Röhrchen oder direkt in der ID-Karte) 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren; Erythrozytensuspension innerhalb von 15 Minuten nach der Inkubation verwenden
- Immucor *corQC EXTEND Complete* unverdünnt verwenden, Erythrozyten vorsichtig resuspendieren
- Cell 1, Cell 2, Cell 3 und Cell 4 aus ID-Interne Qualitätskontrolle unverdünnt verwenden, vorsichtig resuspendieren

6.2 Testansatz Rh-Formel und Kell

- Gemäss *Richtlinie Hämotherapie* wird die Bestimmung von Rh-Merkmalen und anderer Blutgruppenmerkmale mit jeweils zwei verschiedenen Testreagenzien durchgeführt
- ID-Karte „Rh-subgroups + K“ mit polyklonalen Antikörpern mit dem Patientennamen (Nummer) eindeutig beschriften
- ID-Karte „Rh-subgroups + K“ mit monoklonalen Antikörpern mit dem Patientennamen (Nummer) eindeutig beschriften
- Jeweils Aluminiumfolie in aufrechter Kartenposition entfernen
- 12.5 µL der Erythrozytensuspension in alle Mikroröhrchen der ID-Karten pipettieren
- a) Manuelle Bearbeitung: ID-Karten 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (vgl. Arbeitsschritt 6.1 Vorbereitung), dann ID-Karten 10 Minuten in der ID-Zentrifuge zentrifugieren, Reaktionen ablesen und protokollieren
- b) Teilautomatisierte Bearbeitung: ID-Karten in den Saxo ID-Reader stellen, die weiteren Schritte werden von dem Gerät selbständig (Maestro-Software) gesteuert und durchgeführt
- Wöchentliche Qualitätskontrolle: Test-Erythrozyten (Cell 1 bis Cell 4) unverdünnt und wie die Patienten-Erythrozyten in den Test einsetzen
- Prüfung auf Autoagglutination: Eine Eigenkontrolle, die im Rahmen eines AKS durchgeführt wird, kann auch als Eigenkontrolle der Bestimmung weiterer Rh-Merkmale herangezogen werden, vorausgesetzt die Untersuchungen werden zusammen angesetzt und beurteilt
- Immucor QC Testzellen für die tägliche Kontrolle von Rhesus-Merkmalen unverdünnt in den Test einsetzen

6.3 Ablesen der Reaktionen für Rh-Phänotypen und Kell

- Allgemeines Auswertungsprinzip der Diamed-ID-Gelkarten

| Auswertung und Interpretation der Gelsäulen | |
|--|--|
| ∅ 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 |

| | | | |
|-------|---|------------------|----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 9 von 13 |

| | |
|---------------------|--|
| | 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 |

- Bei der Ablesung immer auf **Mischfeldagglutination** achten (entsteht z.B. durch Transfusion von Untergruppen ungleichen EK). Die Untergruppe kann nicht sicher bestimmt werden
- Interpretation der Reaktionen in der DiaMed-ID-Karte „Rh-subgroups + K“ siehe Kapitel 7 Ergebnisse, Befundung

7 Ergebnisse, Befundung

Vollständige Protokollierung aller blutgruppenserologischen Untersuchungen einschliesslich Reaktionsausfall und Kontrollen.

7.1 Ergebnisse

- 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 dann die *zweite ablesende Person*
- Alle Blutgruppenergebnisse werden mit Angabe der Reaktionsstärke dokumentiert
- Eine positive Reaktion von +++ bis ++++ weist auf das Vorhandensein des entsprechenden Antigens hin
- Eine negative Reaktion bedeutet Abwesenheit des entsprechenden Antigens
- Eine Doppelpopulation (negative und positive ++++ Reaktionen) in dem gleichen Mikroröhrchen zeigt das Vorliegen von Antigen positiven und Antigen negativen Erythrozyten, z.B. nach Transfusion, wenn die Antigenkonfiguration des transfundierten Blutes verschieden war zum Patienten; die Rh-Untergruppe kann nicht sicher bestimmt werden
- **Das Mikroröhrchen „ctl“ und der Test auf Autoagglutination müssen immer eine negative Reaktion zeigen.** Bei positiven Reaktionen werden die Bestimmungen als ungültig gewertet. In diesem Fall wird der Test mit einer (in Kochsalzlösung oder in ID-Diluent 2) gewaschenen Erythrozytensuspension wiederholt
- Alle Ergebnisse einschl. Qualitätskontrollen protokollieren, durch den Namen des Untersuchers dokumentieren und als Dokument archivieren
- Zweifelhafte Untersuchungsergebnisse müssen 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)

| | | | |
|-------|---|-----------|-----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 10 von 13 |

| Reaktionsschema für die Rh-Formel | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| Anti-C plus Pat.-Ery | Anti-c plus Pat.-Ery | Anti-E plus Pat.-Ery | Anti-e plus Pat.-Ery | Rh-Formel (Patient) |
| positiv | positiv | negativ | positiv | Ccee |
| negativ | positiv | positiv | positiv | ccEe |
| negativ | positiv | negativ | positiv | ccee |
| positiv | negativ | negativ | positiv | CCee |
| negativ | positiv | positiv | negativ | ccEE |
| positiv | positiv | positiv | positiv | CcEe |
| positiv | negativ | positiv | positiv | CCEe |
| positiv | positiv | positiv | negativ | CcEE |
| positiv | negativ | positiv | negativ | CCEE |
| negativ | negativ | negativ | negativ | Rh-Null * |
| * Nur in Verbindung mit ebenfalls negativem Testansatz für beide Anti-D's | | | | |

| Reaktionsschema für das Merkmal K (Kell-Antigen) | |
|---|--|
| Anti-K plus Pat.-Ery | Untersuchungsbefund |
| 4 + Reaktion | K positiv * |
| 1 + bis 3 + Reaktion | Anamnese, ggf. Vortransfusion, DCT durchführen |
| negativ | K negativ |
| * Antigen Cellano bestimmen (bei EK-Bedarf) sowie bei Kindern/Mädchen, Schwangeren, Frauen im gebärfähigen Alter, Patienten mit irregulären Antikörpern und bei Patienten mit hämatologischen/onkologischen Erkrankungen (bei chronischem Transfusionsbedarf) | |

7.2 Befundung

- Prinzipiell: alle „BG-Befunde“ (AB0, Rhesus-Antigene etc.) müssen durch den für die technische Untersuchung Verantwortlichen überprüft und durch seine Unterschrift bestätigt werden; dies betrifft auch jede Eintragung von Befunden in Ausweise
- Untersuchungsergebnisse werden (nach der Gegenlesung durch eine zweite Person) zur Befundfreigabe und ärztlichen Validation in ein LIS (EDV) eingegeben. Die EDV-Eingabe wird von einer zweiten Person kontrolliert und dokumentiert. Schreibweise der Blutgruppen-Befunde, s. Standardarbeitsanweisung *Blutgruppenbestimmung AB0 und Rh-Faktor*
- Hinweis: Wenn eine Transfusion dringend erforderlich ist und bei der Rh-Bestimmung eine Rh-Untergruppe unklar reagiert (**Mischfeldagglutination**), dann jedenfalls keine EK's mit den „Buchstaben“ transfundieren, die unklar reagieren. Die Untergruppe als „wahrscheinlich“ dokumentieren, den behandelnden Arzt sofort informieren und den

| | | | |
|-------|---|------------------|-----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 11 von 13 |

Patienten auf Vortransfusionen prüfen.

Befundmitteilung: Untergruppe kann nicht sicher bestimmt werden, erneute Bestimmung in 4-6 Wochen, den Patienten auf Vortransfusionen prüfen

- 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

8 Referenzbereiche

Nicht belegt

9 Grenzen des Verfahrens

- Siehe Anlage, Beipackzettel Fa. DiaMed AG
- Fehlermöglichkeiten und Gefahren bei der Gelkarten-Technik

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:
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
-

| | | | |
|--------------|---|------------------|-----------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Dok.-Nr. | SOP ... |
| | | Version | 03 |
| | | Gültig ab | --- |
| | | Seite | 12 von 13 |

- BA- ... Bedienungsanleitung DiaMed Saxo Modul
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung AB0 und Rh-Faktor
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Antikörpersuchtest (AKS)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung ABD-Bestätigungstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Direkter Coombstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Serologische Verträglichkeit (Kreuzprobe)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeborene)
- 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 b) Veränderung der Erythrozytenmembran bei Lagerung | Wiederholung des Tests mit frischem Probenmaterial |
| 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 |

| | | |
|--------------|---|-------------------------|
| Labor | Standard-Arbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung Rh-Formel und Kell | Dok.-Nr. SOP ... |
| | | Version 03 |
| | | Gültig ab --- |
| | | Seite 13 von 13 |

| | | | |
|----------------------------|---|--|--|
| 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 d) Untergruppen (A3, Am etc.) e) Probenkontamination, Fibrinreste f) schwächere Antigene | 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)
 - ID-Karte Rh-subgroups + K (C-c-E-e-K-ctl) polyklonal
 - ID-Karte Rh-subgroups + K (C-c-E-e-K-ctl) monoklonal
 - ID-Diluent 1
 - ID-Diluent 2