

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	1 von 9

X Informationsexemplar — Unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Standard-Arbeitsanweisung*

Inhalt.....	Seite
1 Indikation, Verantwortlichkeiten.....	2
2 Testprinzip, theoretischer Hintergrund	2
2.1 Arbeitstechnik	3
3 Patientenbezogene und methodische Angaben	3
3.1 Untersuchungsmaterial	3
3.2 Mindestmenge	3
3.3 Störfaktoren	3
3.4 Stabilität.....	3
4 Reagenzien, Hilfsmaterialien, Geräte.....	3
4.1 Reagenzien	3
4.2 Hilfsmaterialien	4
4.3 Geräte	4
5 Qualitätskontrolle	4
5.1 Tägliche Qualitätskontrolle.....	4
5.2 Wöchentliche Qualitätskontrolle.....	4
6 Durchführung des Tests.....	5
6.1 Vorbereitung	5
6.2 Testansatz Rhesus control.....	5
6.3 Ablesen der Reaktionen.....	5
7 Ergebnisse, Befundung.....	6
7.1 Ergebnisse.....	6
7.2 Befundung	6
8 Referenzbereiche	7
9 Grenzen des Verfahrens	7
10 Literatur	7
11 Mitgeltende Unterlagen	7
12 Anlagen	8

* © 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 Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	2 von 9

1 Indikation, Verantwortlichkeiten

Eine Eigenkontrolle (Prüfung auf Autoagglutination), z.B. mit Rhesuskontrollserum, wird bei jeder Bestimmung des Merkmals RhD sowie bei der Bestimmung weiterer Rh-Merkmale und anderer Blutgruppenmerkmale mitgeführt. Eine Eigenkontrolle, die im Rahmen eines Antikörpersuchtests durchgeführt wird, kann auch als Eigenkontrolle herangezogen werden, vorausgesetzt, dass die Untersuchungen zusammen angesetzt und beurteilt werden.

Eine Autoagglutination kann verursacht werden durch

- Geldrollenbildung
- Kälteautoantikörper, Komplementfaktoren
- Wärmeautoantikörper, Komplementfaktoren
- Beladung von Erythrozyten im Rahmen therapeutischer Maßnahmen, z.B. Adsorption von Immunglobulinen bei hoher Dosierung und von Bestandteilen aus Infusionslösungen
- Fibringerinnsel (zur Vermeidung wird die Probengewinnung in EDTA empfohlen), native Proben vor den Testansätzen nochmal 10 Min. bei 1500 g zentrifugieren

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 entsprechenden 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 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 von Bedeutung.

Ausführliche Beschreibungen zur Blutgruppensystematik und zur Nachweismethodik sind in den einschlägigen Standardarbeitsanweisungen zum ABO- und Rhesus-System abgebildet (Mitgeltende Unterlagen).

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	3 von 9

2.1 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. Prinzip und Funktion des Geltests sind in der Standardarbeitsanweisung SA- ... *Blutgruppenbestimmung ABO Rh-Faktor* ausführlich beschrieben.

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.

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 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

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

4.1 Reagenzien

- ID-Karte NaCl, Enzymtest und Kälteagglutinine

* 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 Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	4 von 9



- DiaClon Rhesus control, negative Kontrolle der Rh-Bestimmung mit monoklonalen Reagenzien
- 0.9% NaCl Lösung
- 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

5.1 Tägliche Qualitätskontrolle

- Visuelle Kontrolle aller Reagenzien, bei ID-Karten und Materialien auf Abweichungen gemäss Herstellerangaben achten
- Chargenwechsel: Qualitätskontrollen, wenn die Reagenzienchargen gewechselt werden
- Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination): Bei jeder Bestimmung des Merkmals RhD

5.2 Wöchentliche Qualitätskontrolle

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	5 von 9

- 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

6 Durchführung des Tests

6.1 Vorbereitung

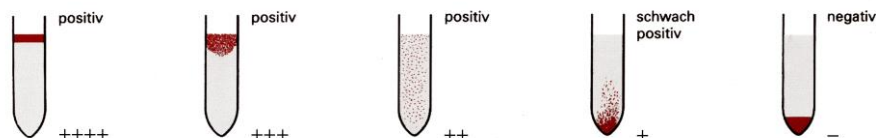
- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen
- Nabelschnurblut vor Gebrauch mit 0.9% NaCl Lösung waschen (3 Waschzyklen)
- Herstellung einer 5%igen Erythrozytensuspension in ID-Diluent 2
 - 0.5 mL ID-Diluent 2 in ein sauberes Röhrchen pipettieren
 - 50 µL Vollblut oder 25 µL Erythrozytenkonzentrat 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

6.2 Testansatz Rhesus control

- ID-Karte „NaCl“ mit dem Patientennamen (Nummer) eindeutig beschriften
- Aluminiumfolie in aufrechter Kartenposition entfernen
- 12.5 µL der Erythrozytensuspension in das jeweilige Mikroröhrchen der ID-Karten pipettieren
- Jeweils 12.5 µL „Rhesus control“ in die Mikroröhrchen 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

6.3 Ablesen der Reaktionen

- Allgemeines Auswertungsprinzip der Diamed-ID-Gelkarten



Auswertung und Interpretation der Gelsäulen	
∅ Reaktion	Alle Erythrozyten sind durch die Gelsäule gewandert und bilden einen glatten Zellknopf

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	6 von 9

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

- Testansatz von Patienten-Erythrozyten mit DiaClon Rhesus control in der ID-Karte NaCl: Agglutinationen von + bis ++++ deuten auf eine Reaktion zwischen Erythrozyten und „Dia Clon Rhesus control“

7 Ergebnisse, Befundung

Vollständige Protokollierung aller Untersuchungen einschliesslich Reaktionsausfall.

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*
- Die Erythrozyten müssen eine **negative Reaktion** mit dem Rh-Kontroll-Reagenz zeigen
Kontrolle negativ: keine sichtbare Agglutination
Kontrolle positiv: Agglutinationen von + bis ++++ weisen auf unspezifische Reaktionen
- Bei positiver Reaktion sind die Resultate der Rh-Bestimmung ungültig
- Positive Reaktionen mit „DiaClon Rhesus control“ können verursacht sein durch:
 - Geldrollenbildung
 - Kälte-/Wärmeautoantikörper
 - Sonstige Beladung von Erythrozyten, z.B. durch therapeutische Maßnahmen
- Wenn der Testansatz mit „DiaClon Rhesus control“ „positiv“ reagiert, dann wird anschliessend ein direkter Coombstest (DCT) durchgeführt, um ggf. eine in vivo Sensibilisierung der Erythrozyten mit Antikörpern und/oder Komplement zu detektieren
- **Negativer DCT** und **positiver Testansatz** mit „DiaClon Rhesus control“: Hinweis auf Geldrollenbildung/Kälteautoantikörper.
Wiederholung von „DiaClon Rhesus control“ mit einer 3 x gewaschenen (37° C) Erythrozytensuspension
- Falls eine Abklärung/Differenzierung der Reaktionen nicht möglich ist, dann wird die Patientenprobe in ein Referenzlabor zur weiteren Bearbeitung geschickt (DRK Blutspendedienst)

7.2 Befundung

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	7 von 9

- Alle Befunde müssen von der für die technische Untersuchung verantwortlichen Person überprüft und durch seine Unterschrift bestätigt werden (Dokumentation)
- Unklarheiten immer in einem Referenzlabor (DRK Blutspendedienst) abklären lassen

8 Referenzbereiche

Nicht belegt

9 Grenzen des Verfahrens

- Fehlermöglichkeiten 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:
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 AB0 und Rh-Faktor
 - SA- ... Standardarbeitsanweisung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeborene)
 - SA- ... Standardarbeitsanweisung Rh-Formel und Kell
-

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	8 von 9

- SA- ... Standardarbeitsanweisung ABD-Bestätigungstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Direkter Coombstest

12 Anlagen

- Fehlermöglichkeiten (allgemein) 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
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	Transfusionsanamnese beachten

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Blutgruppenbestimmung Rhesus-Kontrolle (Autoagglutination)	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	9 von 9

		f) schwächere Antigene	
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 NaCl, Enzymtest und Kälteaagglutinine
 - DiaClon Rhesus control
 - ID-Diluent 2