

<b>Labor</b>	<b>Standard-Arbeitsanweisung</b>	<b>Dok.-Nr.</b>	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	<b>Version</b>	03
		<b>Gültig ab</b>	---
		<b>Seite</b>	1 von 8

**X** Informationsexemplar — Unterliegt nicht dem Änderungsdienst

Standard-Arbeitsanweisung\*

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

\* Arbeitsanweisung auf Anfrage (e-mail w.d.kuhlmann@gmx.de)

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

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	<b>Dok.-Nr.</b>	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	<b>Version</b>	03
		<b>Gültig ab</b>	---
		<b>Seite</b>	2 von 8

## 1 Indikation, Verantwortlichkeiten

Immunhämatologische Untersuchungen sind ärztlich angeordnete Aufträge. Die Durchführung der Untersuchungsaufträge richtet sich nach der *Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer (2017)* sowie der *Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK 2019)*.

Indikationsbeispiele für immunhämatologische Untersuchungen:

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

Zur serologischen Blutgruppenbestimmung gehören in der Regel folgende Untersuchungsgänge

- Bestimmung der antigenen AB0-Blutgruppenmerkmale
- Bestimmung des Merkmals RhD
- Bestimmung weiterer Blutgruppenmerkmale je nach medizinischer Indikation
- Durchführung des direkten Coombstests (DCT, direkter Antiglobulintest [DAT])

Die eindeutige Identitätssicherung ist bei allen immunhämatologischen Untersuchungen unerlässlich (Hämotherapie-Richtlinie). Die abnehmende Person ist für die Identität der Blutprobe verantwortlich und muss identifizierbar sein.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt durch eingewiesenes, geschultes Personal (MTA-Gesetz).

Bei unklaren Untersuchungsergebnissen bzw. bei Problemfällen hat eine Unterrichtung des Dienstarztes zu erfolgen. Er ist verantwortlich für die Ergebnisbeurteilung, die Klärung des weiteren Vorgehens und ggf. für die Einholung von externem Sachverstand (z.B. durch den DRK-Blutspendedienst).

## 2 Testprinzip, theoretischer Hintergrund

Beschreibungen s. Kurzanleitung BLUTGRUPPENBESTIMMUNG – BEGLEITENDE ANMERKUNGEN.

## 3 Patientenbezogene und methodische Angaben

### 3.1 Untersuchungsmaterial

Für blutgruppenserologische Untersuchungen ist eine nur für diesen Zweck bestimmte und geeignete Blutprobe mit eindeutiger Identitätssicherung erforderlich (Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer, Gesamtnovelle 2017).

- Nabelschnurblut (Nabelschnurblut wird als solches gekennzeichnet)

Nach Abschluss der Untersuchungen wird die Probe (Original-Probengefäß) mindestens 10 Tage gekühlt bei 2 bis 8°C aufbewahrt.

### 3.2 Mindestmenge

- 5 mL

### 3.3 Störfaktoren

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	3 von 8

- Hämolyse des Blutes

### 3.4 Stabilität

- 14 Tage bei 2-8°C

## 4 Reagenzien, Hilfsmaterialien, Geräte <sup>1</sup>

### 4.1 Reagenzien

Alle Reagenzien müssen CE zertifiziert sein. Reagenzien z.B. von DiaMed/BioRad. Hersteller und Chargenbezeichnung aller Testreagenzien sind zu dokumentieren.

- ID-Karte DiaClon A-B-AB-D<sup>VI</sup>-ctl-DAT mit monoklonalen Antikörpern Anti-A, Anti-B, Anti-D. Ein Mikroröhrchen enthält die negative Kontrolle (ctl). Das DAT-Röhrchen enthält Anti-Humanglobulin, eine Mischung aus Kaninchen Anti-Human IgG und monoklonalem Anti-C3d
- ID-Karte DiaClon A-B-AB-D<sup>VI</sup>-D<sup>VI</sup>-ctl (= zweite Reagenz-Charge)
- ID-Karte LISS/Coombs mit polyspezifischem Antihumanglobulin (AHG) vom Kaninchen
- Interne Qualitätskontrolle mit IH-QC-Modulsystem (Bio-Rad)
- 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
- Optional: 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

---

<sup>1</sup> 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	<b>Dok.-Nr.</b>	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	<b>Version</b>	03
		<b>Gültig ab</b>	---
		<b>Seite</b>	4 von 8

## 5 Qualitätskontrolle

Interne und externe Qualitätskontrollen gemäß Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBÄK).

### 5.1 Tägliche Qualitätskontrolle

- Visuelle Kontrolle der Reagenzien/ID-Karten (Herstellerangaben beachten) sowie der sonstigen Materialien
- Qualitätskontrollen bei jedem Reagenzienwechsel (MPBetreibV, RiliBÄK 2014)
- Kontrolle auf Autoagglutination, z.B. das **DAT-Feld** der ID-Karte DiaClon A-B-AB-D<sup>VI</sup>-ctl-DAT und/oder ID-Karte LISS/Coombs

### 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-Merkmale und RhD: siehe Anleitung, Beschreibung und Durchführung in der Kurzanleitung QUALITÄTSSICHERUNG SEROLOGISCHE BLUTGRUPPENBESTIMMUNG
- DCT: siehe Anleitung, Beschreibung und Durchführung in der Kurzanleitung QUALITÄTSSICHERUNG SEROLOGISCHE BLUTGRUPPENBESTIMMUNG

## 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
  - 1.0 mL ID-Diluent 2 in ein sauberes Röhrchen pipettieren
  - 10 µL Erythrozytenkonzentrat zugeben, leicht mischen, die Erythrozytensuspension kann sofort verwendet werden
- Interne Qualitätskontrolle gemäß Kurzanleitung <sup>2</sup>

### 6.2 Testansatz AB0 Blutgruppe, RhD und DAT

- Bestimmung der AB0-Merkmale und des Rh-Faktors D immer im Doppelansatz. Eine Reagenzkontrolle (ctl) wird mitgeführt.
- ID-Karten eindeutig beschriften
- Folie 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

---

<sup>2</sup> Durchführung der Qualitätskontrolle s. Kurzanleitung QUALITÄTSSICHERUNG – SEROLOGISCHE BLUTGRUPPENBESTIMMUNG

---

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	5 von 8

- b) Teilautomatisierte Bearbeitung: z.B. ID-Karten in den Saxo ID-Reader stellen; weitere Schritte werden vom Gerät über die Maestro-Software gesteuert und durchgeführt

### 6.3 Testansatz der Serumeigenschaften

Hinweis: Bei Neugeborenen/Säuglingen entfällt die Bestimmung der Serumeigenschaften. Stattdessen erfolgt ein Zweitansatz (= zweite Reagenz-Charge, s.o.).

Richtlinie Hämotherapie der BÄK: Bei Neugeborenen und Säuglingen bis zum Abschluss des 3. Lebensmonats kann die Serumgegenprobe entfallen. Der serologische Blutgruppenbefund wird als vorläufig gekennzeichnet.

### 6.4 Testansatz direkter Coombstest (DCT)

- ID-Karte LISS/Coombs eindeutig beschriften
- Folie 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

### 6.5 Ablesen der Agglutinationsreaktionen

Auswertungsprinzip, s. Kurzanleitung BLUTGRUPPENBESTIMMUNG– BEGLEITENDE ANMERKUNGEN.

## 7 Ergebnisse, Befundung

Vollständige Protokollierung aller blutgruppenserologischen Untersuchungen (Patienten, Kontrollen) mit Angabe der Reaktionsstärken und des Namens der die Untersuchung durchführenden Person. Protokolle werden als Dokumente archiviert.

### 7.1 Ergebnisse AB0 Blutgruppe und RhD

Reaktionen der Blutgruppen AB0 *			
Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Blutgruppe
+ bis +++++	negativ	+ bis +++++	<b>A</b>
negativ	+ bis +++++	+ bis +++++	<b>B</b>
+ bis +++++	+ bis +++++	+ bis +++++	<b>AB</b>
negativ	negativ	negativ	<b>0</b>

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

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	Version	03
		Gültig ab	---
		Seite	6 von 8

Reaktionen für RhD			
ID-Karte	++++	± bis +++	negativ
<b>RhD</b>	voll ausgeprägt positiv	schwach bis abgeschwächt <sup>3</sup>	D Antigen serolog. nicht nachweisbar

- Die ctl Kontrolle muss „negativ“ sein; falls nicht, dann wie folgt fortfahren:
  - Erythrozyten erneut waschen (1 Waschzyklus mit isotonischer Kochsalzlösung oder mit ID-Diluent 2) und 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*)
- Bei negativem Ergebnis aller RhD-Testansätze gilt die Blutprobe als RhD-negativ. Bei übereinstimmend positivem Ergebnis (**voll ausgeprägt**) 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 „negativ“ reagieren
- Zweifelhafte Untersuchungsergebnisse müssen wiederholt werden. Bei unklaren Untersuchungsergebnissen hat eine Unterrichtung des diensthabenden Arztes zur Klärung des weiteren Vorgehens und der Ergebnisbeurteilung zu erfolgen, 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*
- 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 wurden (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**
- 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)

<sup>3</sup> Bei „schwachen D's“ ist die Hämotherapie Richtlinie der Bundesärztekammer (Gesamtnovelle 2017) zu beachten

<b>Labor</b>	<b>Standard-Arbeitsanweisung</b>	<b>Dok.-Nr.</b>	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	<b>Version</b>	03
		<b>Gültig ab</b>	---
		<b>Seite</b>	7 von 8

### 7.3 Befundung

- Ergebnisse von Blutgruppenuntersuchungen müssen nach Abschluss aller Untersuchungsgänge von der für die technische Untersuchung verantwortlichen Person geprüft und freigegeben werden
- EDV-Eingaben werden von einer zweiten Person kontrolliert. Der Vorgang wird dokumentiert. Schreibweise der Befunde, siehe Kurzanleitung BLUTGRUPPENBESTIMMUNG – BEGLEITENDE ANMERKUNGEN
- Mitteilung im Laborbericht, dass die Blutgruppe ohne Serumeigenschaften bestimmt wurde (Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer, Gesamtnovelle 2017); Befund wird gekennzeichnet als „Vorläufiger Befund“
- Die klinische Relevanz von immunhämatologischen Auffälligkeiten (z.B. im DCT) ist im ärztlichen Labor-/Befundbericht anzugeben
- 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, ggf. sollten die Blutprobe des Neugeborenen und eine Probe der Mutter weiter differenziert werden (Weiterleitung an ein Referenzlabor, z.B. DRK Blutspendedienst). Bei Zeichen eines Morbus haemolyticus neonatorum können weitere Maßnahmen erforderlich werden

## 8 Referenzbereiche

Nicht belegt

## 9 Grenzen des Verfahrens

- Beipackzettel BioRad ID-System, Bio-Rad Laboratories GmbH

## 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](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). Die Richtlinie ist online abrufbar unter: <http://www.bundesaerztekammer.de/rilibaek2019>

<b>Labor</b>	Standard-Arbeitsanweisung	<b>Dok.-Nr.</b>	SOP ...
	<b>Blutgruppenbestimmung AB0, RhD, DCT (Neugeb.)</b>	<b>Version</b>	03
		<b>Gültig ab</b>	---
		<b>Seite</b>	8 von 8

- 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, serologische Blutgruppenbestimmung
- KA- ... Kurzanleitung Blutgruppenbestimmung – Begleitende Anmerkungen
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung AB0 und Rh-Faktor
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Rh-Formel und Kell
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Direkter Coombstest

## 12 Anlagen

- Beipackzettel BioRad ID-System, Bio-Rad Laboratories GmbH