

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	1 von 7

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	3
3.4 Stabilität.....	3
4 Reagenzien, Materialien, Geräte	3
4.1 Reagenzien	3
4.2 Hilfsmaterialien	3
4.3 Geräte	3
5 Qualitätskontrollen	3
6 Durchführung des Tests.....	4
6.1 Vorbereitung	4
6.2 Testansatz direkter Coombstest	4
6.3 Ablesen der Reaktionen für den direkten Coombstest	4
7 Ergebnisse, Befundung.....	4
7.1 Ergebnisse.....	4
7.2 Befundung	5
7.3 Vorgehensweise bei positivem DCT	5
8 Referenzbereiche	6
9 Grenzen des Verfahrens	6
10 Literatur	6
11 Mitgeltende Unterlagen.....	6
12 Anlagen	7

* 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 ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	2 von 7

1 Indikation, Verantwortlichkeiten

Immunhämatologische Untersuchungen sind ärztlich angeordnete Aufträge. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgt nach der *Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer (2017)* und der *Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (RiliBÄK 2019)*.

Indikationsbeispiele:

- Nachweis einer *in vivo* Bindung von Antikörpern/Komplementfaktoren an Patienten-Erythrozyten, z.B. von Alloantikörpern nach Blutgruppen ungleicher Transfusion, von idiopathischen oder erworbenen Kälte- bzw. Wärme-Autoantikörpern
- Nachweis einer Antikörperbeladung von Erythrozyten des Kindes/Neugeborenen nach diaplazentarem Übertritt mütterlicher IgG Antikörper als Folge einer Immunisierung gegen fetale Erythrozytenantigene (Rhesus-/AB0-Inkompatibilitäten von Mutter und Kind)

Die eindeutige Identitätssicherung ist bei allen immunhämatologischen Untersuchungen unerlässlich (Hämotherapie-Richtlinie). Der anfordernde Arzt ist für die korrekte Probenentnahme verantwortlich.

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

Bei unklaren Untersuchungsergebnissen bzw. Problemfällen hat eine Unterrichtung des Dienstarztes zu erfolgen. Er ist verantwortlich für die Ergebnisbeurteilung, für die Klärung des weiteren Vorgehens und ggf. 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 erforderlich (Richtlinie Hämotherapie der Bundesärztekammer [Gesamtnovelle 2017]). Es muss immer auf eine eindeutige Identitätssicherung geachtet werden.

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

Folgende Untersuchungsproben sind prinzipiell geeignet,

- Vollblut
- EDTA-Blut (bevorzugt)
- Nabelschnurblut/Neugeborenenblut wird nach einer eigenen Arbeitsanweisung abgearbeitet (siehe AB0-RHD-DCT-NEUGEBORENE)

3.2 Mindestmenge

- 5 mL

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	3 von 7

3.3 Störfaktoren

- Hämolyse des Blutes

3.4 Stabilität

- 14 Tage bei 2-8°C

4 Reagenzien, Materialien, Geräte ¹

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

4.1 Reagenzien

- ID-Karte LISS/Coombs, enthält polyspezifisches Antihumanglobulin (Kaninchen Anti-Human IgG und monoklonales Anti-C3d)
- Interne Qualitätskontrolle mit dem IH-QC-Modulsystem (Bio-Rad)
- 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-Inkubator
- ID-Zentrifuge
- Optional: z.B. Saxo ID-Reader und Maestro-Software (DiaMed) als teilautomatisiertes Gerätesystem für die Probenbearbeitung unter Verwendung der DiaMed ID-Karten. Die Ergebnisse müssen von der bearbeitenden MTA (Zweit-Ableser) bestätigt/protokolliert werden.

5 Qualitätskontrollen

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

- Visuelle Kontrolle der Reagenzien/ID-Karten (Herstellerangaben beachten) sowie der sonstigen Materialien

¹ 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 ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	4 von 7

- Wöchentlich: Qualitätskontrollen/Funktionskontrollen (mit Dokumentation)
- Qualitätskontrollen bei jedem Reagenzienwechsel (MPBetreibV, RiliBÄK 2019) mit Dokumentation. Jede Untersuchung muss eindeutig zu den verwendeten Reagenzien/Chargen zuzuordnen sein
- DCT-Kontrolle: siehe Anleitung, Beschreibung und Durchführung in der Kurzanleitung Qualitätssicherung²

6 Durchführung des Tests

6.1 Vorbereitung

- Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen
- Patientenerythrozyten 1 x mit NaCl Lösung auswaschen
- Herstellung einer 0.8%igen Erythrozytensuspension (Patientenblut, Kontrollblut) in Diluent 2
 - 1.0 mL Diluent in ein sauberes Röhrchen pipettieren
 - 10 µL Erythrozytenkonzentrat zugeben, leicht mischen, die Erythrozytensuspension kann sofort verwendet werden

6.2 Testansatz direkter Coombstest

- ID-Karte LISS/Coombs mit Patientennamen bzw. Kontrollprobe eindeutig beschriften
- Folie in aufrechter Kartenposition entfernen
- Je 50 µL Erythrozytensuspension in das entsprechende Mikroröhrchen pipettieren
- Manuelle Bearbeitung: ID-Karte 10 Minuten in der ID-Zentrifuge zentrifugieren, Reaktionen ablesen und protokollieren
- Teilautomatisierte Bearbeitung: z.B. die ID-Karten in den Saxo ID-Reader stellen, die weiteren Schritte werden vom Gerät selbständig (Maestro-Software) gesteuert und durchgeführt

6.3 Ablesen der Reaktionen für den direkten Coombstest

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

- Alle Untersuchungsergebnisse werden durch eine zweite Person gegengelesen und dokumentiert; bei Verwendung des Saxo ID-Readers (mit der Maestro-Software) entspricht

² Durchführung der Qualitätskontrolle s. Kurzanleitung QUALITÄTSSICHERUNG – SEROLOGISCHE BLUTGRUPPENBESTIMMUNG

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	5 von 7

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 nachweisbaren Immunglobuline (Antikörper) oder C3d Komplementkomponenten gebunden sind
- Eine positive Reaktion (\pm bis +++) bedeutet, dass die Erythrozyten sensibilisiert sind (Erythrozyten wurden *in vivo* mit Immunglobulinen/Antikörpern/C3d beladen)
- Bei Patienten, die noch nie eine Bluttransfusion erhalten haben, kann ein positiver direkter Coombstest als Hinweis auf Wärmeautoantikörper/Kälteautoantikörper gelten; weitere Abklärung von Spezifität, Titer und ggf. Temperaturamplitude (z.B. durch den DRK-Blutspendedienst)
- Bei Neugeborenen/Säuglingen weist ein positiver direkter Coombstest auf eine Beladung der kindlichen Erythrozyten mit mütterlichen, plazentagängigen Alloantikörpern (IgG-Typ). Es besteht die Gefahr eines Morbus haemolyticus neonatorum
- Bei erwachsenen Personen: Ein positiver direkter Coombstest kann als Folge einer inkompatiblen Transfusion von Blutprodukten beobachtet werden.
Hinweis: Auch die unmittelbare Boosterung eines sensibilisierten Patienten ist möglich, bei dem zum Zeitpunkt der Transfusion keine irregulären Antikörper nachweisbar waren; durch Boosterung gebildete Alloantikörper binden an transfundierte Erythrozyten. Die Spezifität der Antikörper muss festgestellt werden, um Boosterung durch nachfolgende Transfusionen zu vermeiden. Weitere Transfusionen erfolgen im Regelfall erst nach einer Abklärung und unter Verwendung von entsprechend antigen-negativen EK
- Erkrankungen, Antibiotika und andere Medikamente können einen positiven direkten Coombstest verursachen; Anamnese beachten
- Auslösung eines positiven DCT durch chimärise Antikörper bei Organtransplantation (übertragene Lymphozyten)
- Zweifelhafte Untersuchungsergebnisse müssen wiederholt werden. Bei weiterhin unklaren Untersuchungsergebnissen wird der diensthabende Arzt unterrichtet, um das weitere Vorgehen zu klären, ggf. muss externer Sachverstand eingeholt werden (z.B. DRK-Blutspendedienst)

7.2 Befundung

- Differenzierung eines positiven DCT: Bei Verdacht auf Vorliegen von Allo- oder Autoantikörpern wird i.d.R. eine Differenzierung angestrebt; Abklärung ggf. in einem Referenzlabor (z.B. DRK-Blutspendedienst). Die 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

7.3 Vorgehensweise bei positivem DCT

- Bei einem positiven direkten Coombstest wird der einsendende Arzt informiert, dass die Patientenprobe weiter differenziert wird. Abklärungen sind bei klinischem und laborchemischem Anhalt für eine hämolytische Anämie (Hämolyseparameter) erforderlich.
Hinweis: Ein positiver DCT hat diagnostische Bedeutung, wenn er durch klinische Informationen (kürzlich transfundiertes Blut, bestimmte Grunderkrankungen, Therapieformen,

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	6 von 7

Medikamente etc.) und labormedizinische Untersuchungen (Hämolyseparameter) abgesehen und plausibilisiert worden ist

- Bei fehlendem klinischen und laborchemischem Anhalt für eine hämolytische Anämie ist eine weitere Abklärung nicht zwingend erforderlich. Es werden aber Elution und Untersuchung des Eluats auf Antikörper empfohlen
- Bei Neugeborenen wird der Einsender über das Untersuchungsergebnis in Kenntnis gesetzt und über die Möglichkeit eines Morbus haemolyticus neonatorum informiert

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 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>
- 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 AB0 und Rh-Faktor
-

Labor	Standard-Arbeitsanweisung	Dok.-Nr.	SOP ...
	Direkter Coombstest	Version	02
		Gültig ab	---
		Seite	7 von 7

- SA- ... Standardarbeitsanweisung AB0, Rh-Faktor, DCT (Neugeborene)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Rh-Formel und Kell
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Antikörpersuchtest (AKS)
- SA- ... Standardarbeitsanweisung ABD-Bestätigungstest
- SA- ... Standardarbeitsanweisung Serologische Verträglichkeit (Kreuzprobe)

12 Anlagen

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