

SERATEC[®] HemDirect Hämoglobintest

Art.-Nr. HbF07

In-vitro-Diagnostikum für den forensischen Gebrauch zum schnellen Nachweis von menschlichem Blut über die Erfassung von Hämoglobin in einer optisch auswertbaren immunchemischen Reaktion

Anwendung

Der SERATEC[®] HemDirect Test dient der schnellen Identifikation von menschlichem Blut in der Forensik. Der Nachweis beruht auf der Erfassung von menschlichem Hämoglobin im Probenmaterial durch eine immunchemische Reaktion. Die Auswertung erfolgt visuell über das Erscheinen einer Ergebnislinie bei Hämoglobin positiven Proben. Der Test ist ohne besondere Vorkenntnisse durchführbar und kann bei Bedarf direkt am Tatort eingesetzt werden.

Hintergrund

Der rote Blutfarbstoff Hämoglobin (Hb) ist Bestandteil der roten Blutkörperchen und dient vor allem dem Gastransport im Körper. Hämoglobin hat ein Molekulargewicht von 64,5 kDa. Es besteht aus 4 Aminosäureketten, von denen je zwei identisch sind. Jede der Ketten ist mit einer Hämgruppe assoziiert, die ca. 4% des Gesamtgewichts des Moleküls ausmachen. Mit Konzentrationen von 120-160 mg/ml bzw. 140-180 mg/ml bei Frauen bzw. Männern ist es eines der am häufigsten im Blut vorkommenden Proteine.

Bei der Aufklärung eines Tathergangs kann es erforderlich sein abzuklären, ob eine biologische Probe Blut enthält und/oder ob es sich um humanes Blut handelt. Verschiedene Nachweismethoden beruhen auf der Detektion von Hämoglobin in dem Probenmaterial, lassen jedoch nicht die Aussage zu, ob das Blut humanen Ursprungs ist. Um dies zu untersuchen, sind häufig immunologische Tests oder DNA-basierte Hybridisierungssays erforderlich, die mit einem relativ hohen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden sind und in der Regel nicht direkt am Tatort durchgeführt werden können. Mit dem Einsatz von Immunoassays, bei denen der Nachweis von Hämoglobin über spezifische Antikörper erfolgt, lassen sich diese Probleme umgehen. Ursprünglich für den Nachweis von okkultem Blut im Stuhl zur Früherkennung von Darmkrebs entwickelt, zeichnet sich der SERATEC[®] HemDirect Test durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus, und kann zur Identifizierung von menschlichem Blut in Kriminalfällen eingesetzt werden. Der Einsatz des Tests bietet gegenüber herkömmlichen Methoden folgende Vorteile:

- Die Ergebnisfindung erfordert keine schwierigen Manipulationen des Probenmaterials und kann direkt vor Ort durchgeführt werden.
- Das Testergebnis liegt sehr schnell vor. 5 Minuten nach Probenauftrag kann der Test einfach visuell ausgewertet werden.
- Der SERATEC[®] HemDirect Test zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität aus. Der Test erfasst bereits Konzentrationen von 40 ng/ml. In Extraktionspuffer verdünntes Frischblut ergibt bei einer 10⁶ Verdünnung ein deutlich positives Testergebnis. Selbst 10⁷ Verdünnungen werden in der Regel noch gut erfasst.
- Der Test ist spezifisch für humanes Hämoglobin. Eine Kreuzreaktivität zeigt sich mit Primatenblut. Damit kann die Aussage, ob es sich bei dem Probenmaterial um humanes Blut handelt relativ eindeutig getroffen werden.

Literaturdaten^{1,2} zeigen, dass Immunoassays auch zur Detektion sehr alter Blutflecken geeignet sind. 2-31 Jahre alte Blutflecken auf Kleidungsstücken ergaben nach einer vorausgegangenen Extraktion im Labor positive Testergebnisse. Getrocknete Blutflecken und Muskelgewebeprobe, die unter verschiedenen Umweltbedingungen für einen Monat gelagert wurden, ergaben nach Extraktion im Labor ebenfalls positive Testergebnisse. Allerdings scheinen Detergenzien wie z.B. SDS oder Sarcosyl und Laugen Hämoglobin zu denaturieren und bewirken negative oder nur sehr schwach positive Testergebnisse.

Die Aussagekräftigkeit von Immunoassays zum Nachweis von menschlichem Blut wird in der Regel durch zwei Faktoren begrenzt. Zum einen können auch andere Körperflüssigkeiten als Blut (z.B. Urin, Stuhl, Samenflüssigkeit, Vaginalflüssigkeit oder Speichel) Spuren von Hämoglobin enthalten und positive Testergebnisse hervorrufen. Es ist jedoch anzunehmen, dass dies in dem Großteil der Fälle nicht zu Interpretationsschwierigkeiten führen wird. Zum anderen muss bei der Durchführung eines immunchromatographischen Schnelltests beachtet werden, dass es bei zu hohen Hämoglobinkonzentrationen innerhalb der Probe durch den High Dose-Hook Effekt (Prozone Effekt) zu negativen Testergebnissen kommen kann (siehe Testprinzip). Dieser Effekt kann vermieden werden, indem verschiedene Verdünnungsstufen getestet werden. Ein optischer Anhaltspunkt kann dabei die Färbung der Probe sein. Zwischen einer 10⁻³ und einer 10⁻⁴ Verdünnung verschwindet die für den Anwender sichtbare Färbung der Hämoglobinlösung. In diesem Bereich ist dann kein High Dose Hook Effekt mehr zu erwarten.

Produktbeschreibung

Der SERATEC[®] HemDirect Test wurde ursprünglich zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl zur Früherkennung von Darmkrebs entwickelt. In der forensischen Anwendung wird der Test zum Nachweis von humanem Hämoglobin zur Identifizierung menschlicher Blutspuren eingesetzt.

Testprinzip

Bei dem Test handelt es sich um einen chromatographischen Immunoassay. Er basiert auf zwei hoch spezifischen Antikörpern gegen humanes Hämoglobin gemäß dem nachfolgenden Funktionsprinzip:

Auf die Membran ist in der Testergebnisregion ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes Hämoglobin (hHb) linienförmig fixiert. Die oberhalb liegende Kontrollregion enthält, ebenfalls linienförmig fixiert, polyklonale Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper. Ein vor der Membran liegendes Glasfaserkissen dient der Probenaufnahme und leitet die Flüssigkeit zu einem Vlies mit einem getrockneten zweiten mobilen monoklonalen Maus-Antikörper gegen hHb, der mit Goldkolloidpartikeln farbig markiert ist und gegebenenfalls in der Probe vorhandenes hHb bindet. Weiterhin enthält das Vlies goldmarkierte Kaninchen-Antikörper.

Nach Auftragen der Probe wandert durch die Kapillarkräfte der Membran das Reaktionsgemisch zu den verschiedenen Regionen. Unabhängig vom Hb-Gehalt der Probe formt der goldmarkierte Kaninchen-Antikörper mit den Anti-Kaninchen-Antikörpern der Kontrollregion einen Komplex, was durch die Entwicklung einer farbigen Kontrolllinie im oberen Bereich des Ergebnisfensters angezeigt wird. Diese Bande ist ein Hinweis auf die korrekte Durchführung des Tests. Im Falle einer Hämoglobin-positiven Probe wird der Komplex zwischen dem goldmarkierten mobilen Antikörper und dem Hämoglobin von den fixierten monoklonalen Maus-Anti-hHb-Antikörpern der Testergebnisregion abgefangen, die ein anderes Epitop von hHb erkennen (SandwichKomplex). Dabei kommt es zur Ausbildung einer zweiten farbigen Linie (Testergebnislinie).

Ein **High DoseHook Effekt** entsteht, wenn zu viel freies Hämoglobin, das nicht an den goldmarkierten Antikörper gebunden ist, in die Testlinienregion gelangt. Ist die Menge sehr hoch, wird der dort fixierte Antikörper mit freiem Hämoglobin abgesättigt und ist nicht mehr in der Lage den farbigen Komplex aus goldmarkiertem Antikörper und Hämoglobin zu binden. In diesem Fall wird die Ausbildung der Testergebnislinie unterdrückt, so dass das Testergebnis negativ erscheint, obwohl Hämoglobin in der Probe vorhanden ist.

Materialien

Gelieferte Materialien: 30 Testkassetten, 30 Röhrchen mit Extraktionspuffer zum Solubilisieren des Probenmaterials, eine Gebrauchsanleitung
Zusätzlich benötigt: Stoppuhr oder Timer

Lagerung und Haltbarkeit

Der Test sollte während der angegebenen Haltbarkeitszeit gekühlt bei +2 bis +8 °C oder bei Raumtemperatur (nicht über 30 °C) ungeöffnet aufbewahrt werden.

Qualitative Eigenschaften

Sensitivität

Der Nachweisbereich des Tests liegt zwischen 40 ng/mL und 500 µg/mL Hämoglobin (Mindestwerte).¹ Bei höheren Konzentrationen ist ein Einsetzen des High Dose Hook Effekts erkennbar, was durch eine zunehmende Abschwächung der Testergebnislinie erkennbar wird.

Referenzmaterial

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Tests in der finalen Qualitätskontrolle dient humanes Hämoglobin der Fa. Sigma, das auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt wird.

Leistungsmerkmale

Für die Erkennung von 40 ng/mL Hämoglobin im Probenpuffer (angezeigt durch das Auftreten der Ergebnislinie) weist der SERATEC[®] HemDirect Test folgende Leistungsmerkmale auf:

Analytische Sensitivität:	100 %
Analytische Spezifität:	100 %
positiver Vorhersagewert:	100 %
negativer Vorhersagewert:	100 %
Reproduzierbarkeit:	100 %

Spezifität

Der Test zeigt keine Kreuzreaktion mit dem Hämoglobin folgender Tierspezies: Hund, Kaninchen, Katze, Rind, Schwein, Wildschwein, Pferd, Huhn, Schaf, Maultier, Ziege, Rothirsch. Mit Blut von Primaten und Frettchenblut wurde eine positive Reaktion beobachtet.¹

Testdurchführung

Sicherheitshinweise

Bei Probenmaterial, das humanes Blut enthält, handelt es sich um potentiell infektiöses Material, das mit der entsprechenden Sorgfalt und nur mit geeigneten Schutzmaßnahmen (z.B. Handschuhe, Laborkleidung) untersucht werden sollte.

- Test nur für den einmaligen In-vitro-Gebrauch bestimmt.
- Test nicht nach Ablauf des Verfallsdatums oder bei Beschädigung des Schutzbeutels einsetzen.
- Testkassette erst unmittelbar vor Gebrauch aus dem Schutzbeutel entnehmen.
- Während des Tests benutzte Materialien vor der Entsorgung autoklavieren, da sie potentiell infektiöses Material (humanes Blut) enthalten.
- Bei den eingesetzten Materialien des Tests (z.B. Antikörpern) handelt es sich um potentiell infektiöse Materialien, von denen bei sachgemäßer Anwendung jedoch keine Gefahr ausgeht.

Probennahme/-aufbereitung

Halten Sie das Röhrchen mit dem Extraktionspuffer senkrecht und schrauben Sie den Deckel ab. Entnehmen Sie mit dem am Deckel befestigten Stäbchen etwas Probematerial (z.B. getrocknetes Blut, Blut befleckte Stofffasern) und überführen es in den Puffer. Verschließen Sie das Röhrchen und lösen das Blut durch gründliches Schütteln. Die so gelösten Proben sind bei Raumtemperatur für mindestens 2 Tage stabil. Bei alten Blutflecken kann die Solubilisierung erschwert sein. Hier kann die Extraktion in dem mitgelieferten Puffer im Labor erfolgen (Puffer in anderes Reaktionsgefäß überführen, Probematerial zugeben, 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler, anschließend kurz abzentrifugieren und Überstand verwenden).

Als Extraktionspuffer empfehlen wir den im Röhrchen mitgelieferten Puffer. Es können jedoch auch andere Puffersysteme im neutralen pH Bereich verwendet werden (z.B. PBS oder TBS). Von einer Verwendung von reinem Wasser ist abzuraten, da sie zu einer Verminderung der Sensitivität führt. Eine Zugabe von Detergenzien wie z.B. SDS oder Sarcosyl zum Extraktionspuffer sollte vermieden werden. Bei Unsicherheit, ob ein Puffersystem zur Extraktion geeignet ist, empfiehlt es sich, eine Verdünnungsreihe mit Frischblut anzulegen, und zu überprüfen, dass eine $10^6/10^7$ Verdünnung gut erfasst werden. Der erste Verdünnungsschritt sollte in destilliertem Wasser erfolgen, um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu gewährleisten. Alternativ kann eine 40 ng/ml hHb-Lösung verwendet werden.

Bitte beachten!

High Dose Hook Effekt:

Auf Grund ihres hohen Hämoglobin-Gehalts wird empfohlen, Proben von frischen Blutflecken stark verdünnt einzusetzen, um einen High Dose Hook Effekt zu vermeiden. Als Anhaltspunkt für eine geeignete Verdünnung kann die Färbung der Lösung genommen werden. Die sichtbare Färbung durch das Hämoglobin verschwindet zwischen einer 10^{-3} und einer 10^{-4} Verdünnung einer frischen Blutprobe. In diesem Bereich ist kein High Dose Hook Effekt zu erwarten. Bei deutlich gefärbten Lösungen besteht die Gefahr eines negativen Testergebnisses durch den High Dose Hook Effekt.

pH-Wert des Probenmaterials:

Der pH-Wert des Probenmaterials sollte nach Möglichkeit nicht zu sehr vom neutralen Bereich abweichen. Proben mit einem pH-Wert von unter 5 können falsch positive Testergebnisse hervorrufen. Im alkalischen Bereich ist ab einem pH-Wert von 9 die Sensitivität leicht herabgesetzt. Ab einem pH Wert von 12 ist der Test nicht mehr funktionell. Da der Extraktionspuffer eine gute Pufferkapazität aufweist, ist ein Abweichen des pH-Wertes durch das Einbringen geringer Mengen von Probenmaterial in der Regel jedoch nicht zu erwarten.

Einfluss der Temperatur:

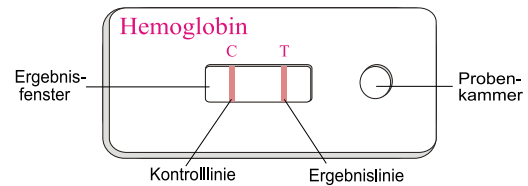
Um die Sensitivität des Tests von 40 ng/ml hHb zu gewährleisten, sollte die Testdurchführung bei Raumtemperatur erfolgen. Eine Absenkung der Temperatur auf 8 °C führt zu einem Verlust der Sensitivität um ca. eine Zehnerpotenz.

Extraktionspuffer:

Bei Bedarf kann der Extraktionspuffer selbst hergestellt werden:
12,1 g Tris; 8,8 g Na_3Citrat ; 0,2 g NaN_3 → pH auf 6,8 mit HCl
0,5 g Tween 20; 5 g BSA → auf 1000 ml mit Aqua dest auffüllen.

Anwendung des Tests

- Die Testkassette und die Probe sollten vor dem Testen auf Raumtemperatur gebracht werden. Entnehmen Sie die Testkassette erst unmittelbar vor Durchführung des Tests aus dem Schutzbeutel. Markieren Sie gegebenenfalls die Kassette zu Identifikationszwecken.



- Geben Sie 3 Tropfen der Probe (ca. 100 µl) in die runde Vertiefung (Probenkammer). Falls die Extraktion im Röhrchen erfolgte, öffnen Sie den Deckel (Schraubverschluss), oder nehmen Sie ein Papiertuch (Spritzgefahr) und brechen das Siegel des Röhrchens mit einer leichten Drehbewegung ab. Halten Sie das Röhrchen senkrecht und geben durch leichten Druck auf die Seitenwände 3 Tropfen Flüssigkeit in die runde Probenkammer. Starten Sie die Zeitmessung. Heben Sie verbleibende Flüssigkeitsrückstände auf, um gegebenenfalls weitere Verdünnungsstufen zu untersuchen.
- Warten Sie 5 Minuten. Während dieser Zeit entwickeln sich im Ergebnisfenster ein oder zwei rötlich gefärbte Linien. Negative Testergebnisse sollten nach 10 Minuten Inkubationszeit noch einmal bestätigt werden.

Ergebnisinterpretation

Negatives Ergebnis (kein humanes Hämoglobin vorhanden bzw. Hämoglobin-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze)

Nur **eine** rötlich gefärbte Linie erscheint in der **Kontrollregion (C)**. Das **Fehlen** einer Linie in der **Testergebnisregion (T)** zeigt ein negatives Testergebnis an. In diesem Fall ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass die Probe menschliches Hämoglobin bzw. Blut enthält.

Anmerkung:

Vergewissern Sie sich, dass die Verdünnung der Probe im messbaren Bereich liegt. Zu niedrige z.B. bei mangelhafter Extraktion und zu hohe hHb-Konzentrationen z.B. durch unzureichende Verdünnung (siehe High Dose Hook Effekt) interferieren mit der Ausbildung der Ergebnislinie.

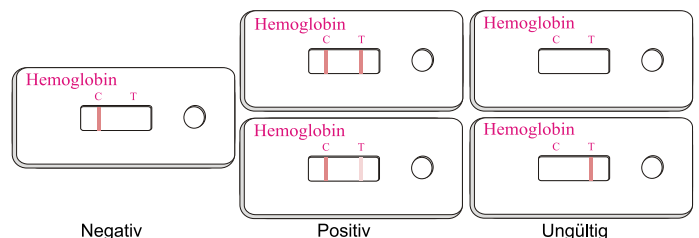
Positives Ergebnis (humanes Hämoglobin vorhanden)

Zwei rötlich gefärbte Linien erscheinen im Ergebnisfenster; eine in der **Kontrollregion (C)** und eine in der **Testergebnisregion (T)**. Die Farbintensität der Linien kann variieren. Selbst eine schwach ausgeprägte Testergebnislinie bedeutet ein positives Testergebnis. In diesem Fall kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Probe menschliches Blut enthält.

Ungültiges Ergebnis

Die Kontrolllinie (**C**) wird nicht gebildet.

In diesem Fall sollte der Test mit einer neuen Testkassette wiederholt werden.



Literatur

¹Amanda Misencik and Dale L. Laux: Validation Study of the *Seratec HemDirect Hemoglobin Assay* for the Forensic Identification of Human Blood. Midwestern Association of Forensic Science, Newsletter Spring 2007, p. 25 et seq. <http://mafs.net/fileadmin/Research/Validation%20Study%20of%20Seratec%20HemDirect%20Hemoglobin%20Assay.pdf>

²Hochmeister et al. (1999) Validation Studies of an Immunochromatographic 1-Step Test for the Forensic Identification of Human Blood. J Forensic Sci Vol 44: 597-601.