

SERATEC[®] PMB Test

REF: PMB, PMB/8, PMB/30

Anwendung

Der SERATEC[®] PMB Test ist ein chromatographischer Immunoassay für den schnellen Nachweis von humanem Blut und/oder Menstrualblut mit Hilfe der Detektion von Hämoglobin und D-Dimer in forensischen Proben. Das Produkt enthält monoklonale Antikörper als aktive Komponenten.

Einleitung

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.

D-Dimer ist ein Abbauprodukt des Fibrins, der als Folge der Fibrinolyse im Blut gebildet wird. Es enthält zwei quervernetzte D-Fragmente des Fibrins, woraus sich der Name ableitet. Da während der Menstruation vermehrt fibrinolytischer Abbau stattfindet, ist D-Dimer als Marker für Menstrualblut geeignet.^{1,4,5,6}

Die D-Dimer Konzentration in peripherem Blut verändert sich während der Menstruation nicht signifikant, da der Gerinnungsprozess hauptsächlich extravasal stattfindet, was eine mögliche Erklärung für die gleichbleibende Konzentration im Blut ist.¹

Der **SERATEC[®] PMB Test** kombiniert den Nachweis von humanem Hämoglobin und D-Dimer. Dadurch ermöglicht der Test den Nachweis von humanem peripherem Blut und humanem Menstrualblut sowie deren Unterscheidung. Für die forensische Anwendung bietet das Produkt folgende Vorteile:

- Einfach zu benutzen, direkt am Tatort oder im Labor
- Schnelle und zuverlässige Ergebnisse nach nur 5-10 Minuten
- Hohe Sensitivität: Proben mit nur 20 ng/ml humanem Hämoglobin reagieren positiv. Humanes Blut zeigt bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} positive Testergebnisse.
- Die optimierte Sensitivität für D-Dimer beträgt 400 ng/mL.
- Der Test ist spezifisch für humanes Hämoglobin und D-Dimer. Kreuzreaktionen können mit Primaten- und Frettchenblut auftreten.

High Dose Hook Effekt: Aufgrund des hohen Hämoglobin-gehalts sollten frische Blutproben verdünnt werden, um einen High Dose Hook Effekt zu vermeiden. Verdünnungen von etwa 1:50 bis 10^{-7} mit der Pufferlösung werden positiv getestet. Daher ist eine stärkere Verdünnung sinnvoll: mindestens 1:50. Wattetupfer oder anderes Material sollte in 0,5 mL Pufferlösung extrahiert werden. Als optischer Anhaltspunkt kann die Färbung der Probe dienen. Zwischen einer Verdünnung von 10^{-3} und 10^{-4} verschwindet die sichtbare Färbung der Hämoglobinlösung.

Materialien

- 8 (PMB/8) oder 30 (PMB/30) luftdicht verpackte Testkassetten, mit jeweils einer Plastikpipette
- 8 (PMB/8) oder 30 (PMB/30) Pufferröhrchen mit 1,5 mL Verdünnungspuffer
- Anleitung

Zusätzlich benötigte Materialien: Stoppuhr oder Timer

Lagerung und Haltbarkeit

Die Testkassetten und die Pufferlösung sollten während der angegebenen Haltbarkeitszeit (auf dem Schutzbeutel, bzw. auf dem Pufferbehältnis angegeben) bei +2 bis +30°C aufbewahrt werden. Die Testkassetten müssen bis zur Benutzung im verschlossenen Schutzbeutel verbleiben.

Sensitivität

Hämoglobin: 20 ng/mL

D-Dimer: 400 ng/mL

Spezifität

Hämoglobin: Der Test zeigt u.a. keine Kreuzreaktion mit dem Hämoglobin folgender Tierspezies: Hund, Kaninchen, Katze, Rind,

Schwein, Wildschwein, Pferd, Huhn, Schaf, Maultier, Ziege, Rothirsch. Die vollständige Liste ist in (2) einsehbar. Blut von Primaten und Frettchenblut kann zu positiven Ergebnissen führen.

D-Dimer: Thrombose, postoperative Wundheilung, maligne Tumorerkrankungen sowie Leberzirrhose können Ursachen einer erhöhten D-Dimer-Konzentration im Blut sein. Der Cut-Off von 400 ng/mL wurde sorgfältig ausgewählt, um positive Ergebnisse bei Proben ohne Menstrualblut möglichst auszuschließen.

Referenzmaterial

Zur Überprüfung der Leistungsmerkmale des Tests wird humanes Hämoglobin der Fa. Sigma und D-Dimer der Firma Hytest verwendet.

Sicherheitshinweise

Bei forensischen Proben handelt es sich um potentiell infektiöses Material, das mit der entsprechenden Sorgfalt und nur mit geeigneten Schutzmaßnahmen (Handschuhe, Laborkleidung) untersucht werden sollte. Während der Testdurchführung benutzte Materialien sollten vor der Entsorgung autoklaviert werden, da sie potentiell infektiöses Material enthalten.

- Testkassette bei Beschädigung des Schutzbeutels nicht benutzen!
- Testkassette und Pufferlösung nicht nach Ablauf des Verfallsdatums benutzen!
- 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.
- Testkassette erst unmittelbar vor Gebrauch aus dem Schutzbeutel entnehmen.
- Testkassette nicht einfrieren!

Hinweise zur Probennahme und Handhabung

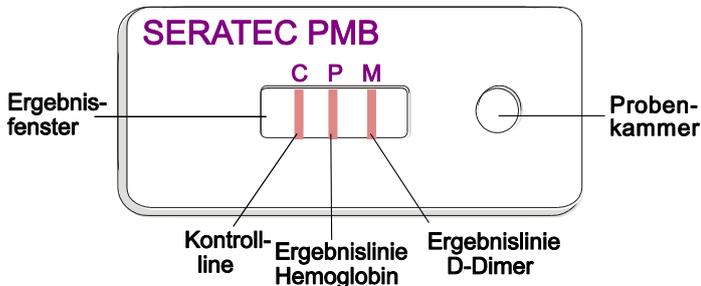
- Verwenden Sie zur Extraktion bzw. Verdünnung die mitgelieferte Pufferlösung. Diese ist speziell für den Test entwickelt. Andere Pufferlösungen können zu schwankenden Linienintensitäten und z.B. Wasser zu einer verminderten Sensitivität führen.
- Detergenzien wie SDS oder Sarcosyl können zur Denaturierung von Hämoglobin und damit zu negativen oder nur sehr schwach positiven Testergebnissen führen.
- Flüssigkeiten mit pH-Werten von unter 4 oder über 12 können zu falschen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wird die Verwendung des mitgelieferten Verdünnungspuffers ausdrücklich empfohlen!
- Gewebepartikel beeinflussen das Testergebnis nicht.
- Proben die länger als zwei Tage aufbewahrt werden, sollten kühl (2-8°C) und trocken gelagert werden. Flüssige Proben können auch eingefroren werden.
- Ältere Gewebeproben sollten länger als frische Proben extrahiert werden.²
- Schnittstücke aus Stoff sollten etwa eine Größe von 0,25-1 cm² zur Extraktion aufweisen.

Probenvorbereitung

Zunächst sollte das Röhrchen mit dem Extraktionspuffer senkrecht gehalten und der Deckel abgeschraubt werden. Danach kann mit dem am Deckel befestigten Stäbchen etwas Probematerial (z.B. getrocknetes Blut, Blut befleckte Stofffasern) entnommen und in das Röhrchen gegeben werden. Alternativ können Schnittstücke von Stoffen, Wattepads oder anderes Probenmaterial direkt hineingegeben werden. Nach dem Verschließen des Röhrchens wird die Probe durch gründliches Schütteln extrahiert. Die so gelösten Proben sind bei Raumtemperatur für mindestens 2 Tage stabil. Bei alten Blutflecken kann die Solubilisierung erschwert sein. Hier kann die Extraktion im Labor mit Hilfe eines Rüttlers erfolgen.² Als Extraktionspuffer empfehlen wir den im Röhrchen mitgelieferten Puffer. Es können jedoch auch andere Puffersysteme im neutralen pH-Bereich verwendet werden (z.B. PBS, HEPES oder TBS). Bei Bedarf kann der Extraktionspuffer selbst hergestellt werden: 12,1 g Tris; 8,8 g Na₃Citrat; 0,2 g NaN₃ → pH auf 6,8 mit HCl, 0,5 g Tween 20; 5 g BSA → auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen.

Testdurchführung

- Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur bringen. Eine auf 8°C abgesenkte Temperatur führt z.B. zu einer Verringerung der Hämoglobinsensitivität auf etwa 200 ng/ml.
- Schutzbeutel der Testkassette entfernen und Kassette zur Identifikation beschriften.
- Geben Sie 3 Tropfen der Probe (ca. 120 µl) in die Probenkammer. Falls die Extraktion im Röhrchen erfolgte, öffnen Sie den Deckel (Schraubverschluss) und verwenden Sie die mitgelieferte Pipette. Alternativ können Sie auch mit Hilfe eines Papiertuchs (Spritzgefahr!) das Siegel des Röhrchens mit einer leichten Drehbewegung abbrechen und durch leichten Druck auf die Seitenwände 3 Tropfen Flüssigkeit in die Probenkammer geben. Verbleibendes Probenmaterial sollte in einem verschließbaren Gefäß aufbewahrt werden.
- Starten Sie die Zeitmessung. Heben Sie verbleibendes Probenmaterial auf, um gegebenenfalls weitere Testungen durchzuführen.
- Nach 10 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur kann das Ergebnis abgelesen werden. Die Flüssigkeit in der Probenkammer sollte zu diesem Zeitpunkt vollständig aufgesogen worden sein.
- Negative Testergebnisse sollten nach 10 Minuten Inkubationszeit noch einmal bestätigt werden.



Ergebnisinterpretation

Negatives Ergebnis (kein Hämoglobin und kein D-Dimer in der Probe bzw. Hämoglobin/D-Dimer unterhalb der Nachweisgrenze)

Nur **eine** rote Linie ist in der **Kontrollregion (C)** nach 10 Minuten sichtbar. Das **Fehlen** der Linien **P und M** zeigt ein negatives Ergebnis an.

Hinweis: Stellen Sie sicher, dass die Probe nicht zu stark verdünnt wurde, damit Hämoglobin und D-Dimer nachweisbar sind.

Positives Ergebnis

Versio n 1 (humanes Hämoglobin und D-dimer positiv)

Drei rote Linien sind im Ergebnisfenster sichtbar, Kontrolllinie (**C**), Hämoglobinlinie (**P**) und D-Dimer-Linie (**M**). Die Farbeintensität der Linien kann stark variieren. Auch schwache Linien (P) und (M) bedeuten, dass das Ergebnis positiv ist.

Interpretation: Hämoglobin und D-Dimer-Konzentration sind oberhalb der Nachweisgrenze, was ein starker Hinweis auf Menstrualblut bzw. eine Mischung aus Menstrualblut und peripherem Blut ist.

Versio n 2 (humanes Hämoglobin positiv)

Zwei rote Linien sind sichtbar, die **Kontrolllinie (C)** und die **Hämoglobinlinie (P)**. In der **Testregion (M)** ist keine Linie sichtbar. Die Farbeintensität der Linien kann stark variieren.

Interpretation: Die Hämoglobinkonzentration liegt oberhalb der Nachweisgrenze, was ein Hinweis auf humanes peripheres Blut ist.

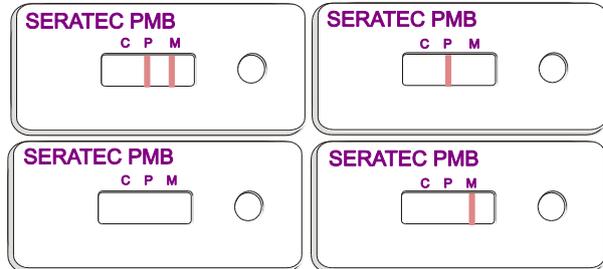
Versio n 3 (humanes D-Dimer positiv)

Zwei rote Linien sind sichtbar, die **Kontrolllinie (C)** und die **D-Dimer-Linie (M)**. In der **Testregion (P)** ist keine Linie sichtbar. Die Farbeintensität der Linien kann stark variieren.

Interpretation: Die D-Dimer-Konzentration liegt oberhalb der Nachweisgrenze. Es ist aber unwahrscheinlich, dass D-Dimer positiv und Hämoglobin negativ ist. Dies kann bei hochkonzentrierten Proben (siehe Hook Effekt) vorkommen. Die Probe sollte z.B. 1:10 mit dem Extraktionspuffer verdünnt und der Test wiederholt werden.

Ungültiges Ergebnis

Die **Kontrolllinie C** ist nicht sichtbar. Der Test sollte in diesem Fall mit einer neuen Kassette wiederholt werden.



Literatur

(1) Chan, H. H., Johnson J. A., Panju, A., Bradley, C.A. 2004. D-Dimer Assay during Menstrual Period, **Blood**, 104:4035.

(2) Misenick, A., Laux D. L. 2007. Validation Study of the *Seratec HemDirect Hemoglobin Assay* for the Forensic Identification of Human Blood. **Midwestern Association of Forensic Science, Newsletter Spring**, p. 25 et seq.
<http://mafs.net/fileadmin/Research/Validation%20Study%20of%20Seratec%20HemDirect%20Hemoglobin%20Assay.pdf>

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

(4) Holtkötter H., Dierig L., Schürenkamp M., Sibbing U., Pfeiffer H. and Vennemann M. 2015. Validation of an immunochromatographic D-dimer test to presumptively identify menstrual fluid in forensic exhibits. **Int J Legal Med** 129:37-41.

(5) Holtkoetter H., Stadler C.; Dias Filho C.R., Roca M.G. 2016. Development and validation of a simple preliminary test for menstrual blood detection, 5th ENQFor and 2nd Brazilian Society of Forensic Sciences Meeting Book of abstract, p36.
http://www.enqfor.com.br/index.php?lang=en_US

(6) Baker D.J., Grimes E.A., Hopwood A.J. 2011. D-dimer assays for the identification of menstrual blood. **Forensic Science International**, 212(1-3):210-4.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741187>



Verfallsdatum

Lagertemperatur

Chargennummer