

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Haemo-/Haptoglobin Complex

Art. Nr.: G09031



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20





## 1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex ist ein Enzym-immunoassay zum quantitativen Nachweis des humanen Hämoglobin-/Haptoglobin-Komplexes in Stuhlproben.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

In Deutschland erkranken jährlich ungefähr 66.000 Menschen neu an Darmkrebs und ca. 30.000 Personen sterben pro Jahr an den Folgen der Erkrankung. Damit ist das Kolonkarzinom eine der häufigsten Krebsarten und Todesursachen bundesweit. Etwa 10 % der Neuerkrankten sind erblich vorbelastet und gehören zu einer Hochrisikogruppe. Die Bundesärztekammer empfiehlt aufgrund der hohen Inzidenz regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen ab dem 50. Lebensjahr. Das Kolonkarzinom entwickelt sich langsam im Verlauf von 10 - 12 Jahren aus makroskopisch sichtbaren und oft lange unverändert bestehenden Adenomen. Bei frühzeitiger Erkennung und Entfernung dieser Formen bestehen sehr gute Heilungsmöglichkeiten - bis zur vollständigen Genesung. Die Koloskopie ist als direkte Nachweismethode die Referenz. Karzinome und zum Teil auch größere Adenome geben intermittierend Blut/Hämoglobin in das Darmlumen ab. Auf dem gleichen Weg gelangt auch der Hämoglobin-/Haptoglobin-Komplex (Hb/Hp-Komplex), der eine wichtige Rolle bei der Rückgewinnung von Hämoglobin aus lysierten Erythrozyten spielt, in den Darm. Sowohl Hämoglobin als auch der Hb/Hp-Komplex können zum Nachweis von okkultem (nicht sichtbarem) Blut im Stuhl herangezogen werden.

Das derzeit meistverwandte nicht-invasive Testverfahren zum Nachweis von okkultem Blut im Stuhl basiert auf der Umwandlung des farblosen Guajak-Harzes durch die unspezifische Pseudo-Peroxidase-Aktivität des Porphyrinrings (Häm), dem zentralen funktionellen Bestandteil des Hämoglobins, zu einem blauen Farbstoff. Der Test beruht also nicht auf dem artspezifischen Nachweis von Proteinketten des humanen Hämoglobins, wodurch es bei Hämoglobin und Myoglobin aus tierischen Fleischprodukten sowie bei Nahrungsbestandteilen mit Peroxidase-Aktivität (z.B. Obst- und Gemüse wie Radieschen oder Meerrettich) zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

Falsch negative Ergebnisse können durch antioxidativ wirkende, sekundäre Pflanzenstoffe (z.B. in Rotwein) und auch durch Vitamin C (Ascorbinsäure), welches vielen Lebensmitteln als Konservierungsmittel zugesetzt wird, auftreten. Ohne eine hinreichende Diät vor und während der Probennahme sind bei der Guajak-

Testmethode keine aussagekräftigen Ergebnisse gewährleistet. Dieses erklärt die zum Teil schlechte Sensitivität von 28 - 40 % solcher Testverfahren.

Moderne, immunologische Tests haben durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die ausschließlich humanes Hämoglobin bzw. den humanen Hämoglobin/Haptoglobin-Komplex nachweisen, einen deutlichen Vorteil gegenüber dem biochemischen Nachweis der Guajak-Tests. Auf eine vorgeschaltete Diät kann verzichtet werden; falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse durch Nahrungsbestandteile sind nahezu ausgeschlossen. Der immunologische Test erkennt darüber hinaus humanes Hämoglobin in 100fach niedrigerer Konzentration als biochemische Methoden.

Die Bestimmung des Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes bietet einen ergänzenden diagnostischen Vorteil. Da der Hb/Hp-Komplex sehr stabil gegenüber dem Abbau durch Säuren bzw. Proteasen ist, lässt dieser sich auch nach längeren Darmpassagen im Stuhl nachweisen. Somit können Blutbeimengungen von größeren Darmpolypen und höher gelegenen Kolonkarzinomen ebenfalls mit einer hohen Sensitivität erfasst werden.

Da Karzinome und Polypen in einem unterschiedlichen Ausmaß und intermittierend bluten können, ist es aber auch bei immunologischen Nachweisverfahren ratsam, mehrere Stuhlproben (2 bis 3) zu untersuchen.

Die zuverlässigere und unter Umständen auch frühere Diagnose mittels immunologischer Tests ermöglicht in den meisten Fällen die frühzeitige Entfernung von Polypen, Adenomen und Karzinomen in einer anschließend durchzuführenden Koloskopie. Daraus resultieren bessere Heilungsprognosen und nicht zuletzt geringere Folgekosten für die Patienten.

### **3. Testprinzip**

Im RIDASCREEN<sup>®</sup> Haemo-/Haptoglobin Complex werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind polyklonale Antikörper gegen Epitope des humanen Haptoglobins gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe wird in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und darin inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschriff und eine zweite Inkubation zusammen mit einem monoklonalen Anti-Hämoglobin-Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Bei Anwesenheit des Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes bildet sich ein Sandwich-Komplex aus den immobilisierten Antikörpern, dem Hb/Hp-Komplex und dem

konjugierten Antikörper. Nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die gemessene Extinktion ist proportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes.

#### 4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Tab. 1: Packungsinhalt für RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex (G09031)

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit polyklonalen Antikörpern (aus Kaninchen) gegen humanes Haptoglobin
Diluent   3	100 ml	Probenverdünnungspuffer 3 (zur Endverdünnung); Protein-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % NaN <sub>3</sub> ; gebrauchsfertig; rot gefärbt
Wash 10x	100 ml	Waschpuffer 10x (10-fach konz.); Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung; enthält 0,1 % Thimerosal
Calibrator	4 St.	Kalibrator (zum Standardabgleich); 0,5 ml lyophilisiert
Control   +	4 St.	Positivkontrolle; 0,5 ml lyophilisiert
Low control   +	4 St.	Niedrige Positivkontrolle; 2 ml lyophilisiert
Conjugate	12 ml	Konjugat; Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Antikörper gegen humanes Hämoglobin (aus Maus) in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig
SeroSC	12 ml	Substrat; Wasserstoffperoxid / TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Material Safety Data Sheets (MSDS) [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien inkl. der lyophilisierten Kalibratoren, Positivkontrolle und Niedrige Positivkontrolle sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem jeweiligen Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Rekonstitution von Kalibrator, Positivkontrolle und Niedriger Positivkontrolle sind diese unmittelbar im Test einzusetzen. Restlösungen der rekonstituierten Lyophilisate sind nach Testansatz zu verwerfen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C für 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der Alu-Beutel, der die Mikrotiterplatte enthält, ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

### 6.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2. Zubehör

- RIDA<sup>®</sup>TUBE Haemoglobin (GZ3012)
- Vortex-Mixer (optional, siehe 9.4.)
- Mikropipette für 20 – 100 µl und 1 ml Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm; Referenzfilter 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %-igen Hypochloritlösung

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur

Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Der Kalibrator, die Positivkontrolle und die Niedrige Positivkontrolle enthalten humanes Blut, welches auf HIV und Hepatitis getestet und für negativ befunden wurde. Dennoch sollten Kalibrator und Kontrollen, ebenso wie die Stuhlproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden

Extraktions- und Probenverdünnungspuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,1 %  $\text{NaN}_3$ . Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden! Bei Hautkontakt mit Wasser spülen.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden. VORSICHT: Um die Bildung giftiger Gase zu vermeiden, muss Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

## **8. Sammlung und Lagerung der Proben**

Die Stuhlprobe wird mit RIDA®TUBE Haemoglobin Stuhlentnahmeröhrchen gesammelt. Die Probe ist im Extraktionspuffer für 5 Tage bei 2 – 30 °C stabil.

## 9. Testdurchführung

### 9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** unbedingt auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind. Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zum Ausschluss von Kreuzkontamination zu vermeiden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

### 9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffers 10x **Wash 10x** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt (1:10). Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

### 9.3. Vorbereitung von Kalibrator und Positivkontrolle (optional Niedrige Positivkontrolle)

Der Kalibrator **Calibrator**, Positivkontrolle **Control | +** und Niedrige Positivkontrolle **Low control | +** liegen lyophilisiert vor und müssen für jeden Testansatz erst kurz vor Testbeginn frisch in Probenverdünnungspuffer **Diluent | 3** gelöst werden. Dazu werden Kalibrator **Calibrator** und Positivkontrolle **Control | +** in 500 µl und die Niedrige Positivkontrolle **Low control | +** in 2 ml Probenverdünnungspuffer 3 **Diluent | 3** aufgenommen. Die Lyophilisate müssen vor Verwendung vollkommen rückstandsfrei gelöst sein. Dazu kann ein Vortex-Mixer verwendet werden. Überschüssige Reste von Kalibrator, Positivkontrolle und Niedriger Positivkontrolle müssen verworfen werden.



#### 9.4. Probenaufarbeitung und –suspension mit RIDA®TUBE Haemoglobin (Art. Nr. GZ3012)

Das mit 2,5 ml gebrauchsfertigem Extraktionspuffer vorbefüllte RIDA®TUBE Haemoglobin nimmt 10 mg Stuhlprobe auf. Bei flüssigen Stuhlproben können 10 µl der Stuhlprobe mit der Pipette abgemessen und direkt in den Extraktionspuffer pipettiert werden.

Die Probennahme und –extraktion ist in der Gebrauchsanweisung, die den RIDA®TUBE Haemoglobin Stuhlentnahmeröhrchen beiliegt, detailliert beschrieben und illustriert und kann alternativ unter [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de) heruntergeladen werden.

Die Stuhlextrakte dürfen nicht länger als 5 Tage bei 2 – 30 °C gelagert werden.

##### a. Probenverdünnung bei manueller Abarbeitung

50 µl der mit dem RIDA®TUBE Haemoglobin (Art. Nr. GZ3012) erhaltenen Stuhlsuspension werden - wie in der Gebrauchsanleitung von GZ3012 unter Punkt 8 beschrieben - in der Kavität der Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 50 µl RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer 3 Diluent | 3 direkt in der Mikrotiterplatte weiter verdünnt.

##### b. Probenverdünnung bei Abarbeitung am Automaten

Erfolgt die Testdurchführung auf einem DSX-ELISA-Vollautomaten der Firma Dynex, wird das hierfür erforderliche Messprotokoll auf Anfrage von der R-Biopharm AG zur Verfügung gestellt und auf dem Gerät appliziert.

In den Halterahmen der RIDASCREEN® Haemoglobin-Mikrotiterplatte Plate wird die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen eingesetzt. Die mit dem Stuhlröhrchen extrahierte Stuhlsuspension wird im ELISA-Automaten auf der Mikrotiterplatte Plate vom Gerät automatisch 1:2 verdünnt (Endverdünnung 1:500). Hierzu werden 50 µl der Stuhlsuspension aus dem (Art. Nr. GZ3012) direkt in die Haemoglobin-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 50 µl Probenverdünnungspuffer 3 Diluent | 3 direkt in der Mikrotiterplatte weiter verdünnt.

Zur Testdurchführung auf anderen ELISA-Pipettierautomaten wenden Sie sich bitte an die R-Biopharm AG.

### 9.5. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl des gelösten Kalibrators **Calibrator** (in Doppelbestimmung), des RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffers 3 **Diluent | 3** (=Negativ-Kontrolle), Positivkontrolle **Control | +** und der zu untersuchenden Stuhlprobensuspension in die jeweiligen Vertiefungen. Bei Bedarf kann die Niedrige Positivkontrolle **Low control | +** mitgeführt werden. In diesem Fall sind auch hier 100 µl in die entsprechende Kavität zu pipettieren. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

### 9.6. Erster Waschschrift

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer (siehe 9.2.) gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei der Verwendung von Waschautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Mikrotiter-Plattentyp zu beachten. Ferner sollte eine nicht komplett partikelfreie Stuhlsuspension vor dem ersten Waschen manuell durch Ausschleudern aus den Kavitäten entfernt werden, um Verstopfungen der Waschnadeln zu vermeiden.

Bei den Waschschriften muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden. Nach dem letzten Waschschrift sollte die Platte gründlich auf saugfähigem, sauberem Papier oder Labortüchern ausgeschlagen werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

### 9.7. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl Konjugat **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

## 9.8. Zweiter Waschschritt

Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Konjugat in den Kavitäten zunächst in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit-Lösung zwecks Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-mal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

## 9.9. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt.

Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

## 10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle muss bei jeder Testdurchführung der Kalibrator **Calibrator** (in Doppelbestimmung), die Positivkontrolle **Control | +** und der Probenverdünnungspuffer 3 **Diluent | 3** als Negativ-Kontrolle mitgeführt werden, um Reagenzien-Stabilität und die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativ-Kontrolle bei 450 nm/620 nm kleiner als 0,05 ist und der gemittelte Extinktionswert (OD) des Kalibrators innerhalb des auf dem chargenspezifischen Datenblatt angegebenen Bereiches liegt. Zur weiteren Validierung der Testergebnisse wird empfohlen die Positivkontrolle routinemäßig mitzuführen. Diese sollte dann innerhalb des auf dem Datenblatt angegebenen chargenspezifischen Konzentrationsbereiches liegen.

Bei der Abarbeitung des RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex auf offenen ELISA-Vollautomaten kann, je nach Automat, der gemessene OD-Wert des Kalibrators **Calibrator** von dem auf dem chargenspezifischen Zertifikat vorgegebenen Bereich abweichen. Auf ELISA-Vollautomaten ist die Positivkontrolle **Control | +** für die Validität der Testergebnisse ausschlaggebend und muss daher immer mitgeführt werden. Die Verwendung der Niedrige Positivkontrolle **Low control | +** ist nicht zwingend erforderlich.

Eine Abweichung von den geforderten Werten ebenso wie eine Reagenzienrührung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten kann ein

Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm-Distributeur.

## 11. Auswertung und Interpretation

### 11.1. Ein-Punkt-Quantifizierung nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell

Die Bestimmung der Konzentration des Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes in µg/g Stuhl erfolgt beim RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex nach dem 4-Parameter-logistic-log-Modell (4PL).

Für die Ergebnisermittlung wird die Auswertesoftware RIDA®SOFT Win.net benötigt. Die RIDA®SOFT Win.net bzw. ein Update kann auf Anfrage von der R-Biopharm AG oder über Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur bezogen werden.

Alternativ zur RIDA®SOFT Win.net kann eine andere Auswertesoftware, die das 4-Parameter-logistic-log-Modell zur Verfügung stellt, verwendet werden.

Die für die 4PL-Berechnung benötigten Parameter (A - D) der Standardkurve sowie der Sollwert für Kalibrator, Positivkontrolle und Niedrige Positivkontrolle sind auf dem dem Testkit beiliegenden chargenspezifischen Datenblatt aufgeführt und müssen vor einer Messung jeweils mit den Werten in der Auswertesoftware abgeglichen werden.

Die R-Biopharm AG ermittelt unter optimalen Testbedingungen für jede Kitcharge die Standardkurve (inkl. der Parameter A - D) sowie jeweils einen Sollwert und einen erlaubten Bereich für die Standardabweichung von Kalibrator, Positivkontrolle und Niedrige Positivkontrolle.

Der Kalibrator Calibrator wird mitgeführt, um Testschwankungen auszugleichen und um die Qualität des Testlaufes prüfen zu können. Die Positivkontrolle dient bei manueller Abarbeitung nur der Labor-internen Testvalidierung. Wird der Test auf einem ELISA-Automaten durchgeführt, muss die Positivkontrolle mitgeführt werden.

Aus dem Mittelwert der Doppelbestimmung der Kalibrator-Kontrolle und dessen Sollwert wird durch die RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net intern ein Korrekturfaktor F berechnet und mit den Extinktionen der Stuhlproben verrechnet. Innerhalb der Grenzen der Standardkurve ist eine sichere und zuverlässige Bewertung der Testergebnisse möglich.

#### 11.2. Testergebnis

Ab einem Cut-off-Wert von  $> 2 \mu\text{g/g}$  des humanen Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes im Stuhl ist das Ergebnis als positiv zu bewerten. Liegen die Ergebnisse unterhalb des Cut-off-Wertes sind die Proben als negativ zu werten.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

**Bei Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{g/g}$  empfehlen wir eine 1:5 Verdünnung des Extrakts in Diluent 3.**

### 12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN<sup>®</sup> Haemo-/Haptoglobin Complex weist Epitope des humanen Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes in Stuhlproben nach. Blut im Stuhl kann neben Darmkrebs auch durch andere Faktoren hervorgerufen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis ist ein deutliches Indiz für eine Blutungsquelle im Darm, kann aber auch durch spezifische Partientenfaktoren gegeben sein (z.B. Menstruationsblut bei weiblichen Patienten oder Hämorrhoiden).

Ein negatives Ergebnis schließt mögliche blutende Veränderungen der Darmwand nicht aus. Das kann durch eine intermittierende Ausscheidung von Blut und die damit verbundene zu geringe Antigenmenge in der Probe oder durch eine inhomogene Verteilung des Hämoglobin/Haptoglobin-Komplexes in der Stuhlprobe verursacht sein.

Besteht anamnetisch der begründete Verdacht auf eine Darmerkrankung, wird daher empfohlen immer mehrere Proben (2 bis 3) aufeinander folgender Stuhlgänge zu testen.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1. Testqualität

Der RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex wurde in einer Studie mit insgesamt 80 Stuhlproben bezüglich Sensitivität und Spezifität in einem externen Labor gegen den dort routinemäßig eingesetzten Immuno-chemiluminometrischen Assay (ILMA) getestet.

Aus der Untersuchung ging die folgende Korrelation hervor:

Sensitivität: 100,0 %

Spezifität: 91,3 %

### 13.2. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze des RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex wurde mit Hilfe des  $B_0$ -Wertes (n=22) festgelegt und berechnet sich aus der Addition des  $B_0$ -Wertes und der 2-fachen Standardabweichung von  $B_0$ . Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze für den Hämoglobin-/Haptoglobin-Komplex von 0,38 µg/g Stuhl.

### 13.3. Kreuzreaktivität

Verschiedene Blutproben von nahrungsrelevanten Tieren wurden mit dem RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex untersucht. Es konnten keine Kreuzreaktivitäten festgestellt werden (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Kreuzreaktivität des RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex mit nicht humanen Blutproben

Proben:	Verdünnung/ Konzentration	OD
Negativkontrolle (Diluent   3)		0,004
Positivkontrolle (humanes Blut)	1/50000	1,581
Ziegenblut	1:10	0,006
Ziegenblut	1:100	0,003
Pferdeblut	1:10	0,004
Pferdeblut	1:100	0,003
Schafsblut	1:10	0,005
Schafsblut	1:100	0,004
Hühnerblut	1:10	0,004
Hühnerblut	1:100	0,004

#### 13.4. Präzision

Die Intra- und Inter-Assay-Reproduzierbarkeit des RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex wurde durch Mehrfachbestimmung (n=72 bzw. n=24) von zwei verschiedenen Haemo-/Haptoglobin-Konzentrationen aus Blut an verschiedenen Tagen unter Einhaltung optimaler Bedingungen ermittelt. Die Tabellen 6 und 7 geben die Ergebnisse wieder.

Tab. 6: Intra-Assay-Reproduzierbarkeit

<b>Intra-Assay</b>	RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex	
	1. Konzentration	2. Konzentration
MW (OD)	0,285	1,186
SD	0,021	0,059
<b>VK %</b>	<b>7,3</b>	<b>5,0</b>

Tab. 7: Inter-Assay Reproduzierbarkeit

<b>Inter-Assay</b>	RIDASCREEN® Haemo-/Haptoglobin Complex	
	1. Konzentration	2. Konzentration
MW (OD)	0,296	1,214
SD	0,013	0,050
<b>VK %</b>	<b>4,4</b>	<b>4,1</b>

## Literatur

1. Lüthgens K, Maier A, Kampert I, Sieg A, Schmidt-Gayk H. Hemoglobin-Haptoglobin-Complex: A Highly Sensitive Assay for the Detection of Fecal Occult Blood. Clin Lab 1998; 44: 543-551.
2. Sieg A, Thoms C, Lüthgens K, John MR, Schmidt-Gayk H. Detection of colorectal neoplasms by the highly sensitive hemoglobin-haptoglobin complex in feces. Int J Colorectal Dis 1999; 14(6): 267-71.
3. Meguro T. Measurement of fecal hemoglobin-haptoglobin complex as a new diagnostic tool of lower gastrointestinal tract diseases. Hokkaido Igaku Zasshi 1994; 69(4): 995-1009.
4. Xing PX, Young GP, Ho D, Sinatra MA, Hoj PB, McKenzie IF. A new approach to fecal occult blood testing based on the detection of haptoglobin. Cancer 1996; 78(1): 48-56.
5. Xing PX, Young G, McKenzie IFC. Development of a fecal occult blood test using a monoclonal antibody to haptoglobin. Redox Report 2001; 6(6): 363-365(3).
6. Labortipp: Sensitiver Test hilft, Tumoren im Kolon zu finden. Ärzte Zeitung 27.02.2003.