

SERATEC HemDirect

Cat No: HBF07

Rev. 08.2013

DE	Bedienungsanleitung
EN	Instructions for use
ES	Instrucciones de uso
FR	Mode d'Emploi
IT	Istruzioni per l'uso
PL	Instrukcja użytkowania
RU	Инструкция по применению



SERATEC[®]
Gesellschaft für Biotechnologie mbH

Ernst-Ruhstrat-Str. 5
D -37079 Göttingen
Germany

Phone: +49 (0)551/504 800
Fax: +49 (0)551/504 80 80
E-mail: contact@seratec.com
Web: www.seratec.com

Anwendung

Der SERATEC® HemDirect Test ist ein chromatographischer Immunoassay für den schnellen Nachweis von humanem Hämoglobin in forensischen Proben. Das Produkt enthält zwei monoklonale murine anti-human-Hämoglobin 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.

Verschiedene Nachweismethoden beruhen auf der Detektion von Hämoglobin in forensischem Probenmaterial, lassen jedoch nicht die Aussage zu, ob das Blut humanen Ursprungs ist. Dadurch sind weitere Untersuchungen nötig, die in der Regel nicht direkt am Tatort durchgeführt werden können.

Der SERATEC® HemDirect Test ermöglicht den Nachweis von humanem Hämoglobin und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Das Produkt bietet gegenüber herkömmlichen Methoden folgende Vorteile:

- Einfache Handhabung ohne zusätzliches Equipment.
- Direkt am Tatort oder im Labor einsetzbar.
- Sehr hohe Sensitivität! Der Test erfasst bereits Konzentrationen von 40 ng/ml. In Extraktionspuffer verdünntes Frischblut ergibt bei einer Verdünnung von 10^{-7} ein deutlich positives Testergebnis.
- Der Test ist spezifisch für humanes Hämoglobin. Eine Kreuzreaktivität zeigt sich mit Primaten- und Frettchenblut. Damit kann die Aussage, ob es sich bei dem Probenmaterial um humanes Blut handelt relativ eindeutig getroffen werden.
- Hämoglobin ist sehr stabil und dadurch lange Zeit nachweisbar. Positive Nachweise konnten mit 31 Jahre alten Proben erzielt werden.¹

Getrocknete Blutflecken und Muskelgewebeproben, die unter verschiedenen Umweltbedingungen für einen Monat gelagert wurden, ergaben nach Extraktion im Labor positive Testergebnisse.

Es ist zu beachten, dass andere Körperflüssigkeiten als Blut (z.B. Urin, Stuhl, Samenflüssigkeit, Vaginalsekret oder Speichel) Spuren von Hämoglobin enthalten können wodurch positive Testergebnisse erzielt werden. Allerdings ist dies bei Verwendung des Verdünnungspuffers (Extraktion) äußerst unwahrscheinlich. Dadurch sinkt die Hämoglobin Konzentration anderer Körperflüssigkeiten sehr wahrscheinlich unter die Nachweisgrenze.

Materialien

- 30 luftdicht verpackte Testkassetten, mit jeweils einer Plastikpipette
- 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 Pufferbehälter angegeben) bei +2 bis +30°C aufbewahrt werden. Die Testkassetten müssen bis zur Benutzung im Schutzbeutel verbleiben.

Qualitative Eigenschaften

Sensitivität: Mit Hilfe des Produktes sind mindestens 40 ng/ml humanes Hämoglobin nachweisbar.

High Dose Hook Effekt: Aufgrund des hohen Hämoglobingehalts 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. Um sicherzugehen sollte die Verdünnung daher stärker als $1:50$ sein, $1:500$ wird empfohlen. Als optischer Anhaltspunkt kann die Färbung der Probe dienen. Zwischen einer Verdünnung von 10^{-3} und 10^{-4} verschwindet die sichtbare Färbung der Hämoglobininlösung.

Referenzmaterial

Zur Überprüfung der Leistungsmerkmale des Tests wird humanes Hämoglobin der Fa. Sigma verwendet.

Spezifität

Der SERATEC® HemDirect 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 **Ref.1** einsichtbar.

Blut von Primaten und Frettchenblut kann zu positiven Ergebnissen führen.¹

Sicherheitshinweise

Bei forensischen Proben handelt es sich um potentiell infektiöses Material, das mit der entsprechenden Sorgfalt und nur mit geeigneten Schutzmaßnahmen (z.B. 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!

Probennahme und Handhabung

Generelle Hinweise

- Verwenden Sie zur Extraktion bzw. Verdünnung die mitgelieferte Pufferlösung. Diese ist speziell für den HemDirect 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 falschen oder ungültigen Ergebnissen führen. Die Verwendung des Verdünnungspuffers führt zu einem optimalen pH-Wert der Probe.
- Gewebepartikel beeinflussen das Testergebnis nicht.
- Proben die länger als zwei Tage aufbewahrt werden, sollten kühl (2-8°C) und trocken lagern. Flüssige Proben können auch eingefroren werden.
- Ältere Gewebeproben sollten länger extrahiert werden als frische Proben.¹
- Viskose Proben sollten für etwa eine Minute bei 13,000g zentrifugiert werden. Der Überstand wird zur Testung genommen.
- Schnittstücke aus Stoff sollten etwa eine Größe von $0.25-1 \text{ cm}^2$ zur Extraktion aufweisen.

- Reine Blutproben und Proben mit sehr hoher Hämoglobin Konzentration sollten mindestens 1:500 verdünnt werden.
- Die Verwendung von unverdünnten Flüssigkeiten egal welcher Herkunft wird nicht empfohlen. Flüssige Proben sollten mindestens 1:500 verdünnt werden.

Proben Vorbereitung

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, Wattepad 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.

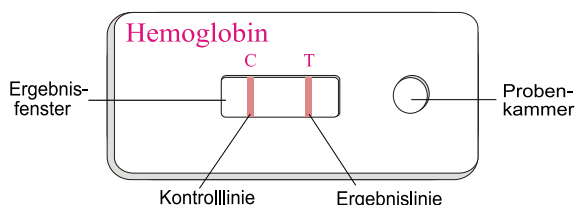
Bei alten Blutflecken kann die Solubilisierung erschwert sein. Hier kann die Extraktion im Labor mit Hilfe eines Rüttlers erfolgen.

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).

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 Sensitivität 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. Sollte Verbleibendes Probenmaterial sollte dann aber 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 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.

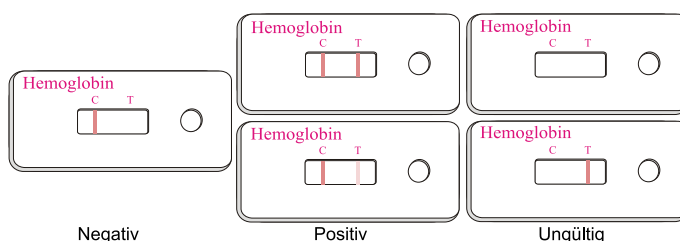
Positives Ergebnis: (humanes Hämoglobin vorhanden)

Zwei rötlich gefärbte Linien sind im Ergebnisfenster sichtbar; eine in der Kontrollregion (C) und eine in der Test-ergebnis-region (T). Die Farbintensität der Linien kann variieren. Jede sichtbare Ergebnislinie (schwach oder stark gefärbt) zeigt ein positives Ergebnis an!

Ungültiges Ergebnis

Die Kontrolllinie (C) wird nicht gebildet.

In diesem Fall sollte der Test wiederholt werden.



Literatur

1. Amanda 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.
2. Hochmeister 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.

Symbole

	Verfallsdatum
	Lagertemperatur
	Chargennummer

Rev: 08.2013

Intended use

The SERATEC® HemDirect Hemoglobin test is a chromatographic immunoassay for the rapid detection of human hemoglobin in forensic samples. It contains two monoclonal murine anti-human-hemoglobin antibodies as active compounds.

Introduction

Hemoglobin (Hb) is located in the erythrocytes and predominantly serves to carry oxygen and carbon dioxide within the body. Hemoglobin has a molecular weight of 64.5 kDa and is composed of 4 amino acid chains, two of which are identical. Each chain is associated with a hem group that contributes to around 4% of the total weight of the molecule. With concentrations between 120-160 mg/ml and 140-180 mg/ml for women and men, respectively, hemoglobin is one of the most abundant proteins in blood. Various confirmatory tests for the identification of blood are based on the detection of hemoglobin but do not allow differentiating between human and non-human blood. This question requires additional testing.

The SERATEC® HemDirect test eliminates these problems and combines a high specificity with an excellent sensitivity. Accordingly, the product is suitable for the identification of human blood traces in forensic samples. It has the following advantages over conventional methods:

- Ready-to-use product kits, no further equipment needed
- Easy in use, directly at crime scenes or in the laboratory
- Quick and reliable result after only 5 -10 minutes
- Extremely high sensitivity. Samples containing only 40 ng/ml human hemoglobin react positive. Fresh human blood diluted in the extraction buffer up to 10^{-7} shows clear positive test results.
- The test is specific to human hemoglobin. Cross reactivity occurs with primate and ferret blood.
- Due to the long stability of hemoglobin, SERATEC® HemDirect is able to confirm presence of blood in very old stains. A study by Laux et al. demonstrates that the SERATEC® HemDirect is suitable for detecting hemoglobin in aged blood stains. Even a 31 year old stain reacted positive.¹

Dried blood stains and muscle tissue stored at different environmental conditions for one month reacted positive upon extraction. In contrast, additions of detergents like SDS, sarcosyl or bleach to the sample led to negative or weak positive results, probably caused by the denaturation of hemoglobin.

SERATEC® HemDirect results will be affected in their evidence by two facts. First, hemoglobin may also be present in other body fluids (e.g. urine, stool, seminal fluid, vaginal fluid or saliva), which may lead to positive results. However, the proper usage of SERATEC® HemDirect requires obligatory dilution of collected sample material. In this case, the test react positive with blood samples only, whereas the hemoglobin concentration of other body fluids decreases below the detection limit.

Second, very high concentration of human hemoglobin in the sample may lead to negative test results – a phenomenon known as high dose hook effect (prozone effect). This effect can be avoided by using the buffer and if necessary testing different dilutions of one sample. As the visible color caused by the hemoglobin vanishes between a 10^{-3} and a 10^{-4} dilution, the color of the sample might be a guide for the user. At these concentrations no high dose hook effect is observed.

Materials provided

- 30 individually sealed HemDirect cassettes, with one plastic pipette each
- 30 buffer tubes containing 1.5 mL of standard buffer solution
- User instruction leaflet

Materials required but not provided: Timer

Storage and Stability

Both cassettes and buffer are stable up to the batch expiration dates stated on the sealed pouch and the buffer tube. Cassettes and buffer can be stored at room temperature or refrigerated (+2-+30°C resp. 38-86°F). The cassette must remain in the sealed pouch until use.

Qualitative Characteristics

Sensitivity: result line is visible at as low as 40ng/mL Hem.

Fresh bloodstains should be diluted prior to testing to avoid false negative results caused by the high dose hook effect. Using the standard buffer, dilutions in the range from 1:50 to $1:10^7$ are tested positive. For this reason the recommended minimum dilution for fresh blood samples is 1:500.

Reference Material

The qualitative characteristics of the test are confirmed in a final QC testing using human hemoglobin purchased at SIGMA. The extraction buffer is used as solvent.

Specificity

The SERATEC® HemDirect Test shows no cross reactivity with bovine, dog, rabbit, cat, pig, wild boar, horse, chicken, sheep, mule, goat and red deer hemoglobin. Primate and ferret blood may react positive. Ref.1 shows the complete list.

Precautions

Forensic samples and all materials coming in contact with it should be handled and disposed of as if capable of transmitting infection. Avoid contact with skin by wearing gloves and proper laboratory attire. The product itself and all materials coming in contact with forensic samples should be autoclaved before disposal.

- Do not use cassettes or buffer after expiration date.
- Do not use cassettes if the pouch has been damaged.
- The product consists of potentially infectious materials (e.g. antibodies). These materials do not cause any danger if the product is used according to the instructions.
- Do not open pouches until ready to perform the assay.
- Do not freeze the test cassettes.

Specimen collection and handling

- It is strongly recommended to use the provided buffer. It is adapted for obtaining optimal results. Other buffers may lead to varying line intensities and e.g. water to a decrease of sensitivity.
- Do not use liquids with a pH-value below 4 or above 12 for testing. It can cause false or invalid results. The application of the provided buffer will adjust the sample to an optimal pH-value.
- Tissue particles do not interfere with the test result.
- Samples being subject to storage of two days or longer should be kept dry and cold (2-8°C). Liquid samples could be frozen.
- Very old or small stains should be extracted longer than fresh and strong stains.¹
- Pure blood samples and samples of very high blood concentration should be diluted at least 1:500 prior to use.
- Viscous samples should be centrifuged for about one minute at 13,000g. The supernatant is used for testing. If the supernatant is still too viscous it should be further diluted.

Instructions for use: SERATEC HemDirect Cat No: HBF07

- Fabric cuttings from dried stains should be between 0.25-1 cm² for extraction with the buffer.
- The addition of neat liquid samples from any source is not recommended. Liquid samples should be diluted at least 1:500 prior to testing.
- No detergents like SDS or Sarcosyl should be added to the extraction buffer.

Test procedure

Specimen preparation

Hold collection tube upright and unscrew the purple cap. Collect the sample material (e.g. dried blood, blood stained thread of clothing) with the applicator stick attached at the cap or with other appropriate tools. Samples (e.g. cotton swabs, fabric cuttings) can be placed directly in the tube. Screw the cap tightly and extract the blood by shaking thoroughly. At this stage the specimen is stable at room temperature for at least 2 days.

The extraction of old bloodstains may be difficult.¹ If necessary the extraction can be done in the laboratory with the help of a shaker.

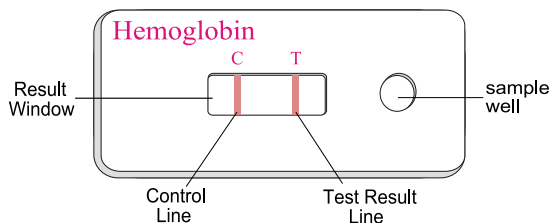
As solvent we recommend using the extraction buffer provided in the kit. However, other buffers at a neutral pH range (e.g. Phosphate, HEPES or TRIS buffered saline) might be used as well.

Extraction Buffer

The extraction buffer is composed of the following ingredients: 12.1 g TRIS; 8.8 g Na₃Citrate; 0.2 g NaN₃ → adjust pH auf 6.8 with HCl, 0.5 g Tween 20; 5.0 g BSA → fill with distilled water to 1000 ml

Assay Procedure

- Allow all test components to warm up to room temperature before starting the test. Only this will guarantee the stated sensitivity. A sample temperature of 8 °C leads to a decrease of the sensitivity to approximately 200 ng/ml.
- Remove the cassette out of the foil pouch and tag the cassette with a marker, if necessary.
- Add about 120 µl (three drops with the provided pipette) into the sample well of the cassette. Either directly out the buffer tube after breaking the seal of the tube by the use of a piece of paper (danger of splattering) or via a pipette. Keep remaining sample if possible, in case it might be necessary to test additional dilutions.
- Read result after 5 minutes incubation time at room temperature.
- Negative results should be confirmed after 10 minutes.



Interpretation of results

Negative result (no hemoglobin in the sample or hemoglobin below the detection limit)

Only one red colored line appears in the control region (C) after 10 minutes. The absence of a line in the test result region (T) indicates a negative test result.

Note:

Make sure that the dilution of the sample is within the detectable range of Hemoglobin concentrations!

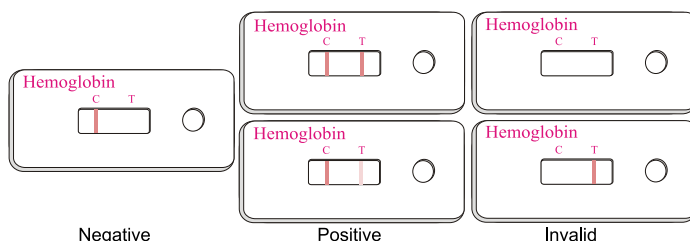
Positive result (human hemoglobin present in the sample)

Two red colored lines appear in the result window, one at the control region (C) and one in the test result region (T). The color intensities of the two lines may vary. Even a weak test result line after 10 minutes indicates a positive test result.

Invalid result

The control line (C) does not appear.

In this case the test is invalid and should be repeated.



Literature

- Amanda 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.
- Hochmeister 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.

Symbols

	Expiration date
	Storage temperatur
LOT	Lot number

Rev: 08.2013

Uso previsto

El test HemDirect de SERATEC® es un inmunoensayo cromatográfico para la detección rápida de hemoglobina humana en muestras forenses. El producto contiene como componentes activos dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la hemoglobina humana.

Introducción

El pigmento rojo hemoglobina (Hb) es un componente de los glóbulos rojos que sirve para el transporte de gases en el cuerpo humano. La Hemoglobina tiene una masa molecular de 64.5 kDa y está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales dos son idénticas. Cada cadena está asociada a un grupo hemo, el cual constituye aproximadamente un 4% de la masa molecular. La hemoglobina es una de las proteínas más abundantes de la sangre, con concentraciones de 120-160 mg/mL en mujeres y 140-180 mg/mL en hombres.

Existen distintos métodos que permiten confirmar la presencia de sangre en muestras forenses basándose en la detección de hemoglobina. No obstante, dichos métodos no permiten afirmar si la sangre es de origen humano. Para ello se requieren análisis adicionales, que normalmente no pueden ser llevados a cabo directamente en el lugar de los hechos.

El test HemDirect de SERATEC® permite la detección de hemoglobina humana y se caracteriza por una alta sensibilidad y especificidad. El producto ofrece, frente a métodos convencionales, las siguientes ventajas:

- Fácil manejo sin necesidad de equipamiento adicional.
- Puede emplearse directamente en el lugar de los hechos o en el laboratorio.
- Muy alta sensibilidad: el test es capaz de detectar concentraciones a partir de 40 ng/mL. Diluciones de hasta 10^{-7} de sangre fresca conducen a resultados positivos.
- El test es específico para hemoglobina humana. Se pueden observar reacciones cruzadas con sangre de primates y hurones. Con ello puede determinarse con relativa seguridad si las muestras son de origen humano.
- La hemoglobina es muy estable y puede detectarse tras largos periodos de tiempo. Se han podido conseguir resultados positivos incluso con muestras de 31 años de antigüedad.¹

Manchas secas de sangre y muestras de tejido muscular que habían sido almacenadas durante un mes bajo distintas condiciones ambientales, condujeron tras la extracción en el laboratorio a resultados positivos.

Ha de tenerse en cuenta que otros fluidos corporales (p.ej. orina, heces, semen, secreción vaginal o saliva) pueden contener trazas de hemoglobina y por ello conducir a resultados positivos. No obstante, esta situación es muy improbable si se utiliza el buffer de dilución/extracción. Con el buffer de dilución se reduce la concentración de la hemoglobina de otros fluidos corporales muy probablemente bajo el límite de detección.

Materiales

30 casetes de ensayo almacenados herméticamente, cada uno con una pipeta de plástico

30 recipientes con 1.5 mL de buffer de dilución

Instrucciones de uso

Requerimiento adicional: cronómetro o temporizador

Almacenamiento y caducidad

Los casetes de ensayo y el buffer deben almacenarse hasta la fecha de caducidad (indicada en la bolsa protectora y en el recipiente del buffer respectivamente) entre +2 y +30°C.

Los casetes de ensayo deben permanecer en la bolsa protectora hasta el momento de su utilización.

Características cualitativas

Sensibilidad: con el producto puede detectarse hemoglobina humana en concentraciones a partir de 40 ng/mL.

Efecto de gancho con dosis alta: las muestras frescas de sangre, debido a su gran contenido en hemoglobina, deben diluirse para evitar un efecto de gancho con dosis alta. Diluciones de entre aproximadamente 1:50 a 10^{-7} con el buffer proporcionado conducen a resultados positivos. Por ello deben utilizarse diluciones a partir de 1:50, siendo 1:500 la dilución recomendada. La coloración de la solución de hemoglobina puede servir como punto de referencia visual: el color visible desaparece con una dilución de entre 10^{-3} y 10^{-4} .

Material de referencia

En el control de calidad final se comprueba el funcionamiento del test con hemoglobina humana de la marca Sigma a distintas concentraciones.

Especificidad

El test HemDirect de SERATEC® no muestra reacciones cruzadas con hemoglobina de los siguientes animales: perro, conejo, gato, vaca, cerdo, jabalí, caballo, gallina, cabra, mula, cabra o ciervo. La lista completa puede encontrarse en la referencia 1.

La sangre de primates y hurones puede conducir a resultados positivos.¹

Indicaciones de seguridad

Las muestras forenses son material potencialmente infeccioso, que ha de tratarse con las correspondientes medidas de seguridad y protección (p.ej. guantes, vestimenta de laboratorio). Los materiales utilizados para la realización del test deben ser esterilizados en autoclave antes de su eliminación, ya que contienen material potencialmente infeccioso.

- No utilizar el casete de ensayo en el caso de que la bolsa protectora se encuentre dañada.
- No utilizar el casete de ensayo ni el buffer tras la fecha de caducidad.
- Los materiales empleados en el test (p.ej. anticuerpos) representan material potencialmente infeccioso. No obstante, con el uso adecuado no se deriva ningún peligro.
- No sacar los casetes de ensayo de la bolsa protectora hasta inmediatamente antes de su uso.
- No congelar los casetes de ensayo.

Toma de muestras y manipulación

Indicaciones generales

- Utilice para la extracción y dilución el buffer proporcionado con el producto. Este ha sido especialmente desarrollado para el test HemDirect. El uso de otros buffers puede conducir a una reducción de la sensibilidad y a fluctuaciones en la intensidad de las líneas. El uso de agua en lugar del buffer proporcionado reduce la sensibilidad del test.
- Los detergentes como el SDS o sarcosil pueden desnaturar la hemoglobina y con ello conducir a resultados negativos o muy débilmente positivos.
- El empleo de líquidos con un valor de pH menor que 4 o mayor que 12 puede producir resultados falsos o no válidos. La utilización del buffer de dilución conduce a un pH óptimo.
- Las partículas de tejido no influyen en el resultado del test.
- Las muestras que deban ser almacenadas durante un periodo superior a dos días han de ser conservadas en un lugar refrigerado (2-8°C) y seco. Las muestras líquidas pueden ser congeladas.
- Las muestras de tejido antiguas necesitan tiempos de extracción más largos que las muestras frescas.¹

- Las muestras viscosas deben ser centrifugadas a 13000 g durante aproximadamente un minuto. A continuación el sobrenadante es utilizado para el test.
- Para la extracción de muestras textiles deben utilizarse fragmentos de 0.25 a 1 cm².
- Las muestras de sangre pura o con concentraciones de hemoglobina muy altas necesitan una dilución de al menos 1:500.
- No se recomienda la utilización de muestras líquidas no diluidas, independientemente de la procedencia de éstas. Las muestras líquidas deben ser diluidas como mínimo 1:100.

Preparación de las muestras

En primer lugar abrir el tapón de rosca manteniendo el tubo de ensayo con el buffer de extracción en posición vertical. Seguidamente tomar algo de muestra (p.ej. sangre seca o fibras textiles con restos de sangre) con el hisopo que se encuentra unido al tapón e introducirla en el tubo de ensayo. De modo alternativo se pueden introducir directamente en el tubo de ensayo fragmentos de tejidos, algodón u otros materiales. A continuación cerrar el tubo de ensayo y agitarlo enérgicamente para llevar a cabo la extracción. Las muestras solubilizadas de este modo son estables por lo menos durante dos días a temperatura ambiente.

La extracción en muestras antiguas de sangre puede presentar dificultades. En dicho caso puede llevarse a cabo la extracción en el laboratorio con un agitador mecánico.

Para la extracción se recomienda el buffer proporcionado con el producto. No obstante, se pueden utilizar otros sistemas de buffer a pH neutro (p.ej. PBS o TBS).

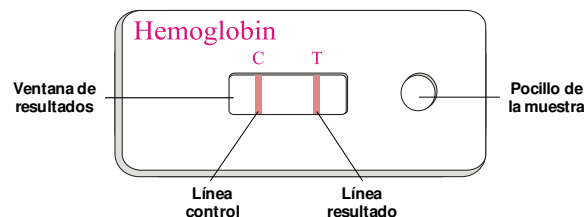
Si es necesario se puede preparar buffer de extracción como se indica a continuación:

12,1 g Tris; 8,8 g Na₃Citrato; 0,2 g NaN₃ → a pH 6,8 con HCl
0,5 g Tween 20; 5 g BSA → rellenar hasta 1000 ml con agua destilada.

Realización del test

- Antes del inicio del test, permitir que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente. Una temperatura de 8°C conduce a una disminución de la sensibilidad a 200 ng/mL aproximadamente.
- Retirar la bolsa protectora del casete de ensayo.
- Dosificar 3 gotas de la muestra (aprox. 120 µL) en el pocillo de la muestra. En caso de que la extracción haya sido realizada en tubo de ensayo, abrir el tapón de rosca y utilizar la pipeta proporcionada. De modo alternativo puede utilizar un pañuelo de papel (peligro de salpicaduras) para, girando el tapón, romper el sellado del tubo de ensayo, y haciendo ligera presión sobre las paredes del tubo dejar caer 3 gotas en el pocillo de muestra. En caso de sobrar algo de material de la muestra, este deberá ser conservado en un recipiente cerrado.
- Empezar a medir el tiempo. Conservar la cantidad de muestra que haya sobrado para poder realizar posteriores ensayos si fuese necesario.
- El resultado puede leerse tras 10 minutos de tiempo de reacción a temperatura ambiente. Llegado ese momento el líquido situado en el pocillo de la muestra debería haber sido completamente absorbido.
- Los resultados negativos deben confirmarse de nuevo tras un tiempo de incubación adicional de 10 minutos.

Interpretación de los resultados



Resultado negativo: (ausencia de hemoglobina humana o concentración menor que el límite de detección)

Sólo aparece una línea rojiza en la región de control (C). La ausencia de una línea en la región de test (T) indica un resultado negativo.

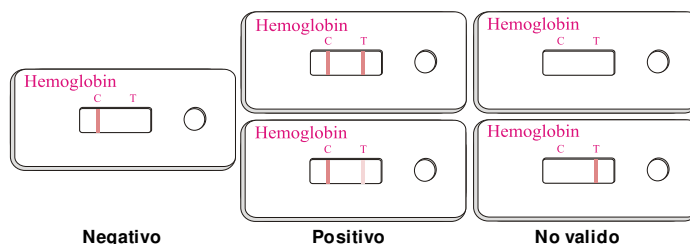
Resultado positivo: (hemoglobina humana presente)

Dos líneas rojizas aparecen en la ventana de resultados. Una en la región de control (C) y otra en la región de test (T). La intensidad del color de las líneas puede variar. Todo resultado visible, ya sea de coloración débil o intensa, indica un resultado positivo.

Resultado no válido

No se observa la línea de control (C).

En este caso el test debe ser repetido.



Referencias

- Amanda 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.
- Hochmeister 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*.

Símbolos

	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de lote

Rev: 08.2013

Usage

Le SERATEC® HemDirect Test est un Immunoassay chromatographique qui, à partir d'un échantillon médico-légal, permet la rapide détection d'hémoglobine humaine. Ce produit comprend comme composant actif, deux murines monoclonales anticorps anti-hémoglobine-humaine.

Introduction

L'hémoglobine des globules rouges (Hb) est un élément des globules sanguins et sert avant tout au transport du gaz dans le corps. L'hémoglobine a un poids moléculaire de 64,5 kDa. Elle est constituée de 4 chaînes d'acides aminés, dont deux identiques. Chaque chaîne est associée à un groupe d'hèmes, qui fait environ 4% du poids total de la molécule. Avec une concentration de 120-160 mg/ml chez les femmes ou 140-180 mg/ml chez les hommes, c'est une des protéines le plus fréquemment présente dans le sang.

Plusieurs méthodes d'identification assurent la détection d'hémoglobine dans les échantillons médico-légaux, mais n'affirment cependant pas si le sang est d'origine humaine ou non. De plus, des enquêtes supplémentaires sont nécessaires, ne pouvant en règle générale pas être réalisées directement sur le lieu du crime.

Le test SERATEC® HemDirect permet la détection d'hémoglobine humaine et se définit par une importante sensibilité et spécificité. Ce produit propose, outre des méthodes conventionnelles, les avantages suivants :

- Manipulation facile sans aucun équipement supplémentaire.
- Utilisable directement sur le lieu du crime ou en laboratoire.
- Très haute sensibilité ! Le test enregistre actuellement une concentration de 40 ng/ml. Dans le tampon d'extraction, le sang frais dilué révèle à une dilution de 10^{-7} , un net résultat positif.
- Le test est spécialement pour les hémoglobines humaines. On observe une réactivité croisée entre le sang de primate et le sang de furet. De ce fait, on peut affirmer avec une relative certitude si, dans le cas du matériel d'essai, il s'agit de sang humain.
- L'hémoglobine est très stable et, de ce fait, longtemps détectable. La détection positive peut être faite à partir d'échantillons de 31 ans d'âge.¹

Les taches de sang séché et les échantillons de tissu musculaire qui avaient été stockés sous différentes conditions environnementales ont révélé, après extraction, un résultat positif au test.

Il doit être noté le fait que d'autres liquides corporels que le sang (ex : Urine, selles, liquide séminal, liquide vaginal ou salive) peuvent laisser des traces d'hémoglobine et de ce fait un résultat positif au test peut être obtenu. Cependant, cela est on ne peut plus improbable lors de l'utilisation du tampon de dilution. Par ailleurs la concentration d'hémoglobine dans les autres liquides corporels chute probablement en dessous de la limite de détection.

Matériel

30 cassettes tests étanches à l'air, accompagnées à chaque fois d'une pipette en plastique

30 tube de tampon avec 1,5 ml de tampon de dilution.

Un Manuel d'utilisation

Matériel supplémentaire nécessaire: un chronomètre ou une horloge.

Stockage et conservation

La cassette de test et la solution tampon doivent être conservées à une température de +2 à +30 °C et ce, durant la date de conservation (indiquée sur le sachet de protection ou sur le récipient tampon). Les cassettes tests doivent être conservées dans le sachet de protection jusqu'à utilisation.

Caractéristiques qualitatives

Sensibilité : Avec l'aide des produits, il est possible de détecter un minimum de 40ng/ml d'hémoglobine humaine.

High Dose Hook Effekt (effet prozone) : En raison de la teneur en hémoglobine élevée, le sang frais devra être dilué afin d'éviter un effet prozone. Une dilution de la solution tampon d'environ 1:50 jusqu'à 10^{-7} , serait testée positive. Pour être sûr, on fera une dilution supérieure à 1:50 et il sera alors conseillé d'utiliser une échelle de 1:500. La couleur de l'échantillon peut servir de point de repère optique. Pour une dilution entre 10^{-3} et 10^{-4} , la couleur percevable de l'hémoglobine s'en va.

Matériel de référence

Des hémoglobines humaines de l'entreprise Sigma seront utilisées dans le but de contrôler la performance du test.

Spécificité:

Le test SERATEC® HemDirect ne montre pas de réaction croisée avec les hémoglobines des espèces animales suivantes : chien, lapin, chat, bœuf, porc, sanglier, cheval, poulet, mouton, mulet, chèvre, cerf. La liste suivante est visible dans la Ref.1.

Le sang des primates et des furets peut amener à un résultat positif.¹

Consignes de sécurité

Pour les échantillons médico-légaux, il s'agit de prêter attention aux potentielles infections du matériel. Ils requièrent un soin adapté et doivent seulement être examinés avec l'utilisation d'outils de protection adaptés (ex : gants de protection, vêtement de laboratoire). Durant le déroulement du test, les outils utilisés doivent être autoclavés avant leur destruction, ceux-ci pouvant contenir des agents infectieux.

- Ne pas utiliser les cassettes tests dans un sachet de protection endommagé.
- Ne pas utiliser les cassettes tests et les solutions tampons après la date limite de conservation.
- Le matériel utilisé lors des tests (ex : anticorps) peut contenir des agents infectieux qui, en cas d'utilisation correcte, ne présentent pas de danger.
- Extraire immédiatement les cassettes tests de leur sachet de protection avant leur utilisation.
- Ne pas congeler les cassettes tests!

Echantillonnage et manipulation

Conditions générales

- Utiliser les solutions tampons fournies pour l'extraction ou la dilution. Celles-ci sont spécialement élaborées pour les HemDirect. D'autres solutions tampons peuvent conduire à une intensité de rayon variable et, par exemple pour l'eau, à une sensibilité inférieure.
- Les détergents tels que SDS ou Sarcosyl peuvent entraîner une dénaturation de l'hémoglobine et, de ce fait, un résultat au test négatif ou très faiblement positif.
- Les liquides au PH inférieur à 4 ou supérieur à 12 peuvent provoquer de faux résultats positifs ou des résultats invalides. L'utilisation du tampon de dilution assure une valeur du PH optimale de l'échantillon.
- Les particules tissulaires n'influencent pas les résultats des tests.
- Les échantillons devant être conservés plus de deux jours, doivent être mis au froid (2-8 °C) et être stockés au sec. Les tests liquides peuvent aussi être congelés.
- Les échantillons de tissus anciens doivent être extraits plus longtemps que les échantillons frais.¹
- Les échantillons visqueux doivent être centrifugés à 13,000g durant au minimum une minute. Le surnageant sera testé.
- Les morceaux de tissus doivent avoir une taille d'environ 0,25-1cm² pour être inclus à l'extraction.

- Les échantillons sanguins purs et les échantillons à la concentration élevée en hémoglobine doivent être dilués à une échelle de minimum 1:500.
- L'utilisation d'un liquide non dilué est contre-indiquée et ce quel que soit sa provenance. Les échantillons liquides doivent être dilués à une échelle de minimum 1:500.

Préparation des échantillons

Tout d'abord, le tube contenant le tampon d'extraction doit être tenu perpendiculairement et le couvercle doit, lui, être dévissé. Ensuite, on peut prélever des échantillons (ex : sang séché, tache de sang sur les fibres textiles) à l'aide des baguettes fixées au couvercle et les introduire dans le tube.

L'autre possibilité est de placer les morceaux de tissus, cotons ou autres échantillons directement dans le tube. Après la fermeture du tube, bien agiter afin que l'échantillon puisse être extrait.

Les échantillons ainsi dissous restent stables durant au minimum 2 jours.

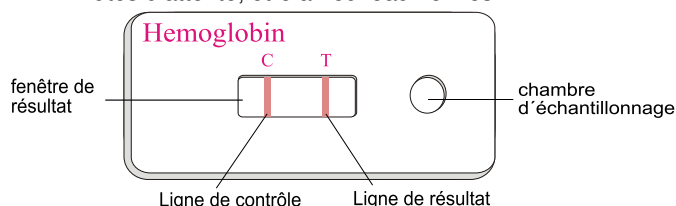
Pour les anciennes taches de sang, la solubilisation peut être compliquée. Dans ce cas-là, l'extraction en laboratoire, à l'aide d'un vibreur, peut réussir.

En tant que tampon d'extraction nous conseillons le tampon joint dans le tube. D'autres systèmes tampons peuvent cependant être utilisés, ce dans un secteur au pH neutre (ex : PBS ou TBS).

Selon les besoins, le tampon d'extraction peut être réalisé par soi-même : 12,1 g Tris; 8,8 g Na₃Citrat; 0,2 g NaN₃ → pH 6,8 avec HCl, 0,5 g Tween 20; 5 g BSA → remplir d'eau distillée sur 1000 ml.

Réalisation du test

- Avant le début du test, ramener tous les composants à température ambiante. Un composant abaissé à une température de 8°C conduit par exemple à une diminution de la sensibilité d'environ 200 ng/l.
- Séparer la cassette test du sachet de protection et inscrire l'identification sur la cassette.
- Verser 3 gouttes de l'échantillon (ca. 120 µl) dans la chambre d'échantillonnage. Dans le cas où l'extraction dans le tube est réussie, ouvrir le couvercle (dévisser) et utiliser la pipette jointe. Sinon, vous pouvez, à l'aide d'une serviette en papier (risque d'éclaboussures), décrocher le joint du tube avec un faible mouvement rotatif puis insérer 3 gouttes de liquide dans la chambre d'échantillonnage en faisant de faibles pressions sur les côtés. Dans le cas où il y aurait encore des problèmes au niveau du matériel, l'échantillon devra rester conservé dans un récipient pouvant être fermé.
- Démarrer le chronomètre. Dans le cas d'échantillonnage restant, le conserver pour éventuellement, par la suite, effectuer d'autres tests.
- Après 10 minutes de temps de réaction à température ambiante, le résultat peut être lu. A ce moment-là, le liquide dans la chambre d'échantillonnage doit être entièrement absorbé.
- Les résultats négatifs au test doivent être après 10 minutes d'attente, être à nouveau vérifiés.



Interprétation du résultat

Résultat négatif: (pas de détection d'hémoglobine humaine ou alors, concentration d'hémoglobine inférieure à la limite de détection)

Il apparaît dans la région de contrôle (C), uniquement une ligne de couleur rouge. Le manque d'une ligne dans la région de résultat (T) démontre un résultat négatif au test.

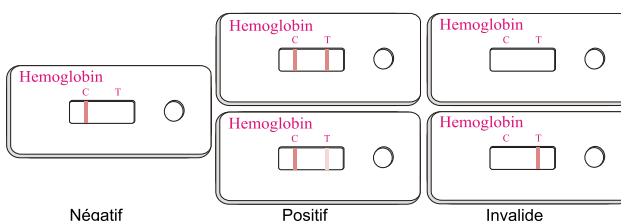
Résultat positif: (détection d'hémoglobine humaine)

On peut observer deux lignes de couleur rouge dans la fenêtre de résultat : une dans la région de contrôle (C) et une dans la région de résultat (T). L'intensité de la couleur peut varier. Toutes les lignes de résultat visibles (faiblement ou fortement colorées), démontrent un résultat positif au test.

Résultat non-valide:

La ligne de contrôle (C) ne s'est pas formée.

Dans ce cas-là, le test devra être répété.



Bibliographie

1. Amanda 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.
2. Hochmeister 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.

Symbole

	Date limite de conservation
	Température de conservation
LOT	Numéro de lot

état de révision: 09.2013

Uso previsto

Il test SERATECâ HemDirect è un dosaggio immunologico cromatografico per l'identificazione rapida di emoglobina umana in campioni forensi. Il prodotto contiene due anticorpi murini monoclonali di emoglobina antiumana come componenti attivi.

Introduzione

Il colorante rosso del sangue, l'emoglobina (Hb), fa parte dei globuli rossi e serve soprattutto al trasporto di gas nel corpo. L'emoglobina ha un peso molecolare di 64,5 kDa. È costituita da 4 catene di amminoacidi di cui 2 sono uguali. Ognuna delle catene è associata a un gruppo di ematina e queste costituiscono circa il 4% del peso molecolare totale. Con concentrazioni di 120-160 mg/ml o 140-180 mg/ml nelle donne o negli uomini è una delle proteine più comuni nel corpo umano.

Diversi metodi di rilevazione si basano sull'individuazione di emoglobina in campioni forensi, non accertano però se il sangue è di origine umana. In questo caso sono necessari ulteriori accertamenti che però non vengono eseguiti direttamente sul luogo del reato.

Il test SERATECâ HemDirect permette di dimostrare la presenza di emoglobina umana ed è caratterizzato da un'alta sensibilità e specificità. Il prodotto offre, rispetto ai metodi usuali, i seguenti vantaggi:

- facilità d'uso senza equipaggiamento aggiuntivo
- utilizzo direttamente sul luogo del reato o eseguibile in laboratorio
- sensibilità molto elevata. Il test rileva concentrazioni di 40 ng/mL. In tamponi di estrazione con sangue fresco diluito, una diluizione di 10^{-7} fornisce un risultato nettamente positivo.
- il test è stato sviluppato per rilevare specificatamente emoglobina umana. Reattività crociata avviene con sangue di primati e di furetti. Così l'asserzione che il campione è di sangue umano, è relativamente certa.
- l'emoglobina è molto stabile e quindi rilevabile a lungo. Risultati positivi sono stati raggiunti con campioni di 31 anni.¹

Macchie di sangue secche e campioni di tessuto muscolare che sono stati immagazzinati per un mese sotto diverse condizioni ambientali, hanno fornito dopo l'estrazione in laboratorio risultati di test positivi.

Va notato che liquidi corporei diversi dal sangue (per esempio urina, feci, liquido seminale, liquidi vaginali o saliva) possono contenere tracce di emoglobina con cui si possono ottenere dei risultati positivi al test. Tuttavia, con l'uso di un tampone di diluizione (estrazione) ciò è altamente improbabile. In questo modo la concentrazione di emoglobina in altri liquidi corporei, molto probabilmente cala al di sotto del livello di rilevabilità.

Materiali forniti

- 30 cartucce di test imballate sottovuoto ciascuna con una pipetta di plastica
- 30 tubetti-tampone ognuno con tampone di diluizione
- Istruzioni per l'uso

Altro materiale necessario: cronometro o timer

Stoccaggio e scadenza

Le cartucce di test e la soluzione tampone vanno conservate fino alla scadenza indicata sul contenitore di protezione o sulla busta del tampone, a una temperatura da +2°C a +30°C. Le cartucce di test devono restare nel contenitore di protezione fino al loro utilizzo.

Caratteristiche di qualità

Sensibilità: con l'aiuto del prodotto sono rilevabili almeno 40 ng/mL di emoglobina umana.

Effetto gancio a dose elevata: a causa dell'alto contenuto di emoglobina, campioni di sangue fresco dovrebbero essere diluiti per evitare un effetto gancio a dose elevata. Diluizioni da circa 1:50 a 10^{-7} con soluzione tampone, vengono testate in modo positivo. Per essere sicuri è consigliata quindi una diluizione più alta di 1:50, per esempio 1:500. Come riferimento può servire la colorazione del campione. Tra una diluizione di 10^{-3} e 10^{-4} sparisce la colorazione visibile dell'emoglobina.

Materiale consigliato

Per controllare il rendimento del test nel controllo di qualità finale, è d'aiuto l'emoglobina umana della ditta Sigma che viene regolata alle concentrazioni desiderate.

Specificità

Il test SERATECâ HemDirect non mostra reattività crociata con l'emoglobina di altre specie animali: cane, coniglio, gatto, bovino, maiale, cinghiale, cavallo, gallina, pecora, mulo, capra e cervo europeo. La lista completa è consultabile alla referenza 1.

Il sangue di primati e di furetti può causare risultati positivi.¹

Avvertenze di sicurezza

Con campioni forensi si tratta di materiale potenzialmente infettivo che dovrebbe essere analizzato con la dovuta attenzione e solo con misure preventive adeguate (per esempio, guanti, indumenti da laboratorio). Durante il test i materiali utilizzati devono essere sterilizzati in autoclave poiché contengono materiale potenzialmente infettivo.

- Non usare la cartuccia di test con contenitore di protezione danneggiato!
- Non usare la cartuccia di test e soluzioni tampone dopo la data di scadenza!
- Con i materiali utilizzati per i test (per es. anticorpi) si tratta di materiali potenzialmente infettivi da cui, con uso appropriato, non deriva comunque alcun pericolo.
- Estrarre la cartuccia di test dal contenitore di protezione direttamente prima dell'uso.
- Non surgelare le cartucce di test!

Campionamento e utilizzazione

Avvertenze generali

Usare per l'estrazione o la diluizione la soluzione tampone fornita. Questa è stata sviluppata appositamente per HemDirect. Altre soluzioni tampone possono causare linee d'intensità variabile e provocare per esempio nell'acqua una sensibilità ridotta.

Detergenti come SDS o Sarcosyl possono causare una denaturazione dell'emoglobina e quindi provocare dei risultati negativi o solo positivi molto deboli.

Liquidi con valori pH inferiori a 4 o superiori a 12 possono causare risultati errati o non validi. L'uso del tampone di diluizione provoca un valore pH ottimale del campione.

Particelle di tessuto non influenzano il risultato del test.

Conservare campioni che devono essere immagazzinati per più di due giorni in luogo fresco (2°C - 8°C) e asciutto. Campioni liquidi possono anche venire surgelati.

Campioni di tessuto che sono conservati per più tempo, dovrebbero venire estratti più a lungo di campioni freschi. 1

Campioni viscosi dovrebbero essere centrifugati a 13,000 g per circa un minuto. Il sovrantante viene usato per il test.

Pezzi di stoffa devono avere una grandezza di 0.25 - 1 cm² per l'estrazione.

Campioni puri di sangue o con concentrazioni di emoglobina molto alte dovrebbero venire diluiti almeno di 1:500.

L'uso di liquidi non diluiti, non importa la loro origine, non è consigliato. Campioni liquidi dovrebbero essere diluiti di 1:500.

Preparazione dei campioni

Dapprima tenere il tubetto con il tampone di estrazione perpendicolarmente e svitare il coperchio. Poi prelevare con le asticelle applicate al coperchio, un po' di materiale da campionare (per es. sangue secco, fibre di stoffa macchiate di sangue) e trasferirlo nel tubetto. In alternativa inserire direttamente pezzi di stoffa, pad di cotone o altro materiale da campionare. Dopo la chiusura del tubetto, il campione è estratto tramite un accurato scuotimento. I campioni così disciolti sono stabili a temperatura ambiente per almeno 2 giorni.

Con macchie di sangue vecchie, lo scioglimento può essere più complesso. In questo caso l'estrazione in laboratorio può avvenire con un vibratore.

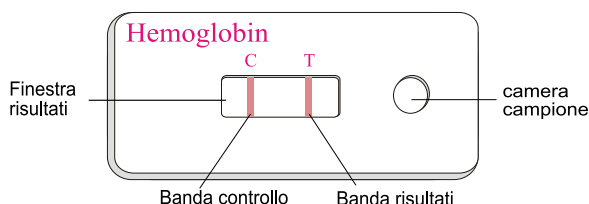
Come tampone di estrazione, consigliamo il tampone contenuto nel tubetto. Possono comunque essere usati anche altri sistemi tampone con pH neutrale (per esempio PBS o TBS).

In caso di necessità il tampone di estrazione può venire prodotto in proprio:

12,1 g Tris; 8,8 g Na₃citrato; 0,2 g Na₃ → pH su 6,8 con HCl
0,5 g Tween 20; 5 g BSA → su 1000 ml riempire con acqua distillata.

Realizzazione del test

- Portare tutti i componenti del test a temperatura ambiente. Una temperatura ridotta a 8°C porta a una diminuzione della sensibilità a circa 200 ng/mL.
- Togliere la cartuccia del test dal suo contenitore di protezione e munirla d'identificazione.
- Mettere 3 gocce del campione (circa 120 µl) nella camera del tampone. Se l'estrazione è avvenuta nel tubetto, aprire il coperchio (chiusura a vite) e usare la pipetta fornita. In alternativa è possibile con l'aiuto di un pezzo di carta (pericolo di spruzzi) spezzare il sigillo del tubetto con un leggero movimento rotatorio; con una leggera pressione laterale inserire 3 gocce di liquido nella camera del tampone. Se resta del materiale di campionamento, conservarlo in un contenitore richiudibile.
- Cominciare il cronometraggio. Conservare il materiale di campionamento restante per eseguire eventualmente altri test.
- Dopo 10 minuti di tempo di reazione a temperatura ambiente, si può leggere il risultato. Il liquido nella camera del tampone dovrebbe adesso essere stato completamente aspirato.
- Risultati negativi del test dovrebbero essere confermati ancora una volta dopo 10 minuti di tempo d'incubazione.



Interpretazione dei risultati

Risultato negativo: (non è presente emoglobina umana o la concentrazione di emoglobina è al di sotto del limite di rilevabilità).

Appare solo una linea rossa nella regione di controllo (C). La mancanza di una linea nella regione del risultato del test (T) dimostra un risultato negativo.

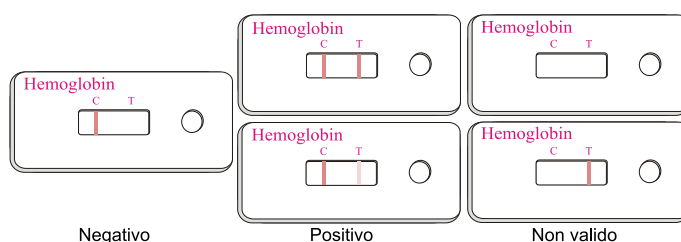
Risultato positivo: (emoglobina umana non presente)

Due linee colorate di rosso sono visibili nella finestra dei risultati; una nella regione di controllo (C) e una nella regione dei risultati del test (T). L'intensità dei colori delle linee può variare. Ogni linea di risultato visibile (molto o poco colorata) testimonia un risultato positivo!

Risultato non valido

La linea di controllo (C) non appare.

In questo caso il test dovrebbe essere ripetuto.



Riferimenti bibliografici

- 1 Amanda 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.
- 2 Hochmeister 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.

Simboli

	Data di scadenza
	Temperatura di stoccaggio
	Numero del Lotto

Stato: 08.2013

Zastosowanie

Test SERATEC® HemDirect jest chromatograficznym testem immunologicznym, który pozwala na szybkie wykrycie ludzkiej hemoglobiny w próbkach kryminalistycznych. Produkt zawiera jako komponenty aktywne dwa mysie monoklonalne przeciwciała przeciwko globulinom ludzkiej hemoglobiny.

Wprowadzenie

Czerwony barwnik krwi hemoglobina (Hb) jest składnikiem czerwonych krwinek i służy przede wszystkim do transportu gazów oddechowych w organizmie. Hemoglobina posiada masę cząsteczkową 64,5 kDa. Składa się ona z 4 aminokwasów, z których każda para jest identyczna. Każdy z łańcuchów jest połączony z grupą hemu, która składa się na 4% łącznego ciężaru cząsteczki. Przy stężeniu 120-160 mg/ml lub 140-180 mg/ml u kobiet lub mężczyzn jest ona białkiem najczęściej występującym we krwi.

Różne metody wykrywania polegają na detekcji hemoglobiny w próbkach kryminalistycznych, jednak nie pozwalają one stwierdzić, czy krew jest pochodzenia ludzkiego. Dlatego konieczne są dalsze badania, których zazwyczaj nie można przeprowadzić na miejscu przestępstwa.

Test SERATEC® HemDirect umożliwia wykrycie obecności ludzkiej hemoglobiny i wyróżnia się wysoką czułością i specyfiką. Produkt ten posiada względem innych dostępnych metod następujące zalety:

- Proste użytkowanie bez dodatkowego sprzętu.
- Może być użyty bezpośrednio na miejscu przestępstwa.
- Bardzo wysoka czułość! Test rejestruje stężenia już od 40 ng/ml. Świeża krew rozcieńczona w buforze ekstrakcyjnym wykazuje wynik wyraźnie pozytywny już przy rozcieńczeniu 10^{-7} .
- Test jest wyspecjalizowany na ludzką hemoglobinę. Reakcje krzyżowe stwierdza się z krwią naczelną i fretek. W związku z tym można względnie dokładnie stwierdzić, czy w przypadku próbki mamy do czynienia z krwią ludzką.
- Hemoglobina jest bardzo stabilna i w związku z tym przez dłuższy czas wykrywalna. W próbkach trzydziestoletnich można osiągnąć pozytywne wyniki.¹

Zaschnięte plamy krwi oraz próbki tkanki mięśniowej, które były przechowywane w różnych warunkach środowiskowych przez miesiąc, wykazały po ekstrakcji w laboratorium pozytywne wyniki.

Należy wziąć pod uwagę, że płyny ustrojowe inne niż krew (np. mocz, kał, sperma, wydzielina pochwy lub ślina) mogą zawierać śladowe ilości hemoglobiny, przez co można osiągnąć wyniki pozytywne. Jednak przy zastosowaniu buforu rozcieńczającego (ekstrakcja) jest to wysoce nieprawdopodobne. Dzięki temu stężenie hemoglobiny w pozostałych płynach ustrojowych z wysokim prawdopodobieństwem spada poniżej granicy wykrywalności.

Materiały

- 30 hermetycznie zapakowane kasety testowe, każda z plastikową pipetą
- 30 rurek buforu z 1.5ml buforu rozcieńczającego
- Instrukcja

Dodatkowo potrzebne: stoper albo minutnik.

Przechowywanie oraz okres przydatności

Kasety testu oraz roztwór buforowy należy przechowywać w podanym okresie przydatności (znajduje się on na woreczku ochronnym lub na pojemniku na roztwór) w temperaturze między +2°C a +30°C. Kasety testowe należy przechowywać w opakowaniu ochronnym do momentu użycia.

Właściwości jakościowe

Czułość: Przy pomocy tego testu można wykryć min. 40 ng/ml ludzkiej hemoglobiny.

Efekt haka (High Dose Hook Effekt): żeby uniknąć efektu haka należy rozcieńczyć świeże próbki krwi. Rozcieńczenia ok. 1:50 do 10^{-7} przy pomocy roztworu buforowego są testowane pozytywnie. Żeby uzyskać pewność, należy używać rozcieńczenie silniejszego niż 1:50, zaleca się 1:500. Kolor próbki może służyć jako wskazówka optyczna. Przy rozcieńczeniu 10^{-3} i 10^{-4} znika widoczne zabarwienie roztworu hemoglobiny.

Materiał referencyjny

Do sprawdzenia wydajności testu w finalnej kontroli jakościowej służy ludzka hemoglobina firmy Sigma, którą ustawia się na wybrane stężenia.

Specyfika

Test SERATEC® HemDirect nie wykazuje reakcji krzyżowych z hemoglobiną następujących gatunków zwierząt: pies, królik, kot, bydło, świnia, dzik, koń, kura, owca, muł, koza, jeleń szlachetny. Pełna lista jest dostępna w odnośniku nr 1.

Krew naczelną oraz fretek może prowadzić do wyników pozytywnych.¹

Środki ostrożności

W przypadku próbek kryminalistycznych mamy do czynienia z materiałem potencjalnie zakaźnym, który należy badać z odpowiednią starannością i wyłącznie z zastosowaniem odpowiednich środków ostrożności (np. rękawiczki, ubranie laboratoryjne). Materiały wykorzystane podczas przeprowadzania testu należy przed usunięciem wysterylizować autoklawem, ponieważ zawierają one materiał potencjalnie niebezpieczny.

- Nie należy używać kasety testowej w przypadku uszkodzenia opakowania ochronnego!
- Nie należy używać kasety testowej oraz roztworu buforowego po upływie daty przydatności!
- W przypadku materiałów użytych do testu (np. przeciwciał) mamy do czynienia z materiałami potencjalnie zakaźnymi, które jednak w przypadku prawidłowego użytkowania nie stwarzają niebezpieczeństwa.
- Kasety testową należy wyjąć z opakowania ochronnego wyłącznie bezpośrednio przed użyciem.
- Nie zamrażać kasety testowej!

Pobieranie próbek oraz użytkowanie

Zalecenia ogólne

- Należy używać dostarczony roztwór buforowy. Został on opracowany specjalnie do testu HemDirect. Inne roztwory buforowe mogą prowadzić do wahań w intensywności linii a np. woda do zmniejszenia czułości.
- Detergenty takie jak SDS lub sarkosyl mogą prowadzić do denaturacji hemoglobiny i w efekcie do wyników negatywnych lub tylko nieznacznie pozytywnych.
- Do przeprowadzenia testu nie należy stosować płynów o pH niższym niż 3 lub wyższym niż 12. Mogłyby one powodować wyniki fałszywie pozytywne lub nieważne.
- Płyny o pH niższym niż 4 lub wyższym niż 12 mogą prowadzić do wyników fałszywych lub nieważnych. Użycie buforu rozcieńczającego gwarantuje optymalne pH próbki.
- Częstki tkanek nie mają wpływu na wynik testu..
- Próbkę, które muszą być przechowywane dłużej niż przez jeden dzień, powinny być składowane w chłodnym i suchym miejscu (2-8°C). Próbkę płynną można zamrażać
- Starsze próbki powinny być dłużej ekstrahowane niż świeże.¹

- Kleiste próbki należy odwirowywać przez ok. minutę przy 13,000g. Do testowania pobiera się supernatant.
- Skrawki materiału powinny do ekstrakcji mieć wielkość 0.25-1 cm².
- Próbki czystej hemoglobiny oraz próbki o bardzo wysokim stężeniu hemoglobiny należy rozcieńczyć w stosunku przynajmniej 1:500.
- Nie zaleca się używania nierozcieńczonych płynów niezależnie od ich pochodzenia. Płynne próbki powinny zostać rozcieńczone przynajmniej w stosunku 1:500.

Przygotowanie próbek

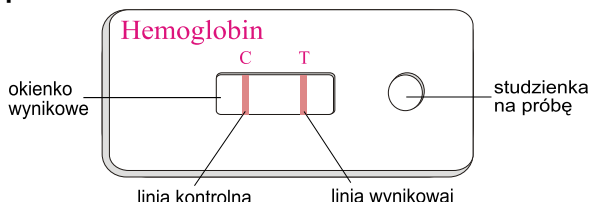
Najpierw należy trzymać pionowo rurkę z buforem ekstrakcyjnym oraz odkręcić zatyczkę. Następnie można przy pomocy przymocowanego do zatyczki patyczka pobrać trochę materiału do badań (np. zaschniętą krew, włókna pokryte krwią) oraz umieścić go w rurce. Alternatywnie można umieścić bezpośrednio skrawki materiału, waciki lub inny materiał do badań. Po zamknięciu rurki należy wyekstrahować próbkę poprzez dokładne potrząsanie. W ten sposób rozpuszczone próbki pozostają stabilne w temperaturze pokojowej przez przynajmniej 2 dni.

Solubilizacja może być utrudniona w przypadku starych plam krwi. W tym wypadku należy przeprowadzić ekstrakcję w laboratorium przy pomocy wstrząsacza

Jako bufor ekstrakcyjny zalecamy bufor dostarczony razem z rurką. Można również zastosować inne systemy buforowe o neutralnym pH (np. PBS lub TBS).

W razie potrzeby można samodzielnie wytworzyć roztwór buforowy: 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 → wypełnić do 1000 ml mit Aqua dest.

Przeprowadzenie testu



- Wszystkie komponenty testu należy przed jego rozpoczęciem doprowadzić do temperatury pokojowej. Temperatura obniżona do 8°C prowadzi m.in. do obniżeniu czułości do ok. 200 ng/ml.
- Usunąć z kasety opakowanie ochronne oraz opisać kasety, aby umożliwić jej identyfikację.
- 3 krople próbki (ok. 120 µl) należy umieścić w komorze na próbkę. Jeśli ekstrakcja miała miejsce w rurce, należy otworzyć zatyczkę (zamknięcie gwintowe) oraz użyć dostarczonej pipetę. Alternatywnie można lekkim ruchem obrotowym przy pomocy ręcznika papierowego (ryzyko odpryskiwania!) urwać zabezpieczenie rurki i przy lekkim nacisku na ścianki boczne umieścić trzy krople płynu w komorze na próbkę. Pozostały materiał należy jednak wtedy przechowywać w zamkniętym pojemniku.
- Należy rozpocząć pomiar czasu. Należy zachować pozostały materiał, aby móc w razie potrzeby przeprowadzić dalsze testy.
- Po 10 minutach od rozpoczęcia reakcji w temperaturze pokojowej można odczytać wyniki. Płyn znajdujący się w komorze próbki powinien zostać całkowicie wchłonięty do tego momentu.
- Negatywne wyniki należy ponownie potwierdzić po 10 minutach inkubacji.

Interpretacja wyników

Wynik negatywny: (nie stwierdzono obecności ludzkiej hemoglobiny lub stężenie hemoglobiny poniżej granicy wykrywalności).

Tylko jedna zabarwiona na czerwono linia pojawia się w miejscu kontrolnym (C). Brak linii w miejscu wyniku testu (T) wskazuje na wynik negatywny.

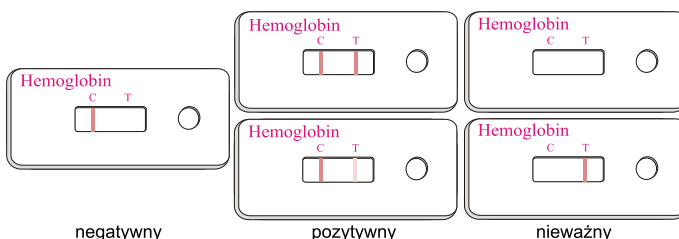
Wynik pozytywny: (stwierdzono obecność ludzkiej hemoglobiny)

Dwie linie zabarwione na czerwono są widoczne w okienku wyniku; jedna w miejscu kontrolnym (C) i jedna w miejscu wyniku testu (T). Intensywność koloru linii jest zmienna. Każda widoczna linia wyniku (zabarwiona słabo lub mocno) wskazuje wynik pozytywny!

Wynik nieważny

Linia kontrolna (C) nie pojawia się.

W tym wypadku należy powtórzyć test.



Bibliografia

1. Amanda 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.

2. Hochmeister 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.

Symbolika

	Data ważności
	Temperatura przechowywania
	Numer partii

Rev: 08.2013

Инструкция по применению: SERATEC HemDirect

Номер изделия: HBF07

Применение

SERATEC® HemDirect — иммунохроматографический экспресс-тест для качественного обнаружения гемоглобина человека при проведении судебно-биологических экспертиз. Активными компонентами теста являются два моноклональных мышиных анти-человеческих гемоглобиновых антител.

Введение

Гемоглобин (Hb) — сложный железосодержащий белок животных и человека, способный обратимо связываться с кислородом, обеспечивая его перенос в организме. Молекулярный вес гемоглобина составляет 64,5 кДа. Гемоглобин состоит из 4-х попарно идентичных цепей аминокислот. Каждая цепь связана с гемогруппой, молекулярный вес которой составляет приблизительно 4% от общего молекулярного веса гемоглобина. Концентрация гемоглобина в крови человека составляет 120-160 мг/мл у женщин и 140-180 мг/мл у мужчин. Это один из наиболее распространенных протеинов в крови человека.

В рамках проведения судебно-биологических экспертиз существуют различные методы обнаружения крови. Многие из этих методов, однако, не в состоянии определить видовое происхождение крови. Чтобы дать ответ на этот вопрос, необходимы дальнейшие анализы, которые, как правило, невозможно провести непосредственно на месте взятия проб.

С помощью SERATEC® HemDirect можно быстро и надежно определить гемоглобин человека. Тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Преимущества теста:

- Прост в выполнении, не требует дополнительных материалов.
- Может быть выполнен на «месте преступления» и/или в лаборатории.
- Очень высокая чувствительность. Тест реагирует положительно на концентрацию гемоглобина в 40 нг/мл. При разведении крови порядка 10^{-7} в прилагаемом буферном растворе тест показывает положительный результат.
- Тест обладает специфичностью на гемоглобин человека. Перекрестная реакционная способность наблюдается с кровью приматов и хорьков. Благодаря высокой специфичности теста можно с высокой долей уверенности сделать вывод о наличии гемоглобина человека при положительном результате.
- Гемоглобин очень стабилен, и поэтому тест успешно применим к старым пробам и образцам. Положительные результаты теста наблюдались с пробами 31-летней давности.¹

Лабораторные тестирования сухих пятен крови и проб мышечной ткани, хранившихся в течение месяца в разных условиях, показали положительные результаты с тестом HemDirect после разведения в буферном растворе.

Следует учесть, что другие телесные жидкости (моча, стул, семенная жидкость, вагинальная жидкость, слюна) могут содержать следы гемоглобина. Однако, при надлежащем экстрагировании проб в буферном растворе положительные результаты с этими пробами очень маловероятны. С большой вероятностью разведение уменьшает концентрацию гемоглобина до значений ниже уровня чувствительности.

Материалы

- 30 кассет с пластиковой пипеткой каждая
- 30 флаконов с 1.5 мл буферного раствора
- Инструкция по применению

Дополнительно необходим таймер (не входит в набор)

Хранение и срок годности

Тест-кассеты и буферный раствор необходимо хранить при температуре от +2 до +30 °C на протяжении срока годности. Срок годности указан на флаконе с буферным раствором и на защитной упаковке каждой кассеты. Тест-кассеты должны оставаться в закрытой упаковке до непосредственного применения.

Качественные характеристики

Чувствительность: Нижняя граница диагностической чувствительности составляет 40 нг/мл гемоглобина человека.

Прозоновый эффект (High Dose Hook Effect)

По причине высокой концентрации гемоглобина в крови, пробы свежей крови необходимо разводить, чтобы избежать прозонового эффекта. Разведения порядка 1:50 и до 10^{-7} в буферном растворе показывают положительный результат. Поэтому следует разводить в соотношении не менее 1:50, лучше — 1:500. Отправной точкой можно считать окраску пробы. Видимая окраска пробы, содержащей гемоглобин, исчезает при разведении между 10^{-3} и 10^{-4} .

Сертифицированный эталонный материал

Для проверки характеристик теста был использован гемоглобин человека компании Sigma.

Специфичность

SERATEC® HemDirect не проявляет перекрестной реакционной способности с гемоглобином собаки, кролика, кошки, быка, домашней свиньи, лесного кабана, коня, курицы, овцы, мула, козы и благородного оленя. Полный список протестированных проб крови животных представлен в списке литературы под номером 1.

Результат тестирования крови приматов и хорьков может быть положительным.¹

Указания по безопасности

Образцы, изъятые на «местах преступления», являются потенциальными носителями инфекции. Работая с ними, необходимо принять надлежащие меры предосторожности. Наденьте лабораторные перчатки и защитную одежду. Перед утилизацией использованного материала его следует автоклавировать.

- Не используйте тест-кассету в случае повреждения защитной упаковки!
- Не используйте тест-кассету и буферный раствор в случае истечения срока годности!
- Активные составляющие теста (антитела) являются потенциальными инфекционными носителями. При надлежащем обращении с тестом они абсолютно безвредны.
- Изымайте тест-кассету из защитной упаковки только непосредственно перед применением!
- Не замораживайте тест-кассету!

Изъятие пробы и обращение с ней

Общие замечания

- Для экстрагирования и разведения используйте прилагаемый буферный раствор, разработанный специально для теста HemDirect. Использование других растворов может привести к пониженной чувствительности и неоднородной интенсивности цветowych полосок.
- Присутствие детергентов, таких как додецилсульфат натрия или Саркосил, может привести к денатурации гемоглобина и, таким образом, к отрицательным или слабо выраженным положительным результатам теста.
- Жидкие пробы со значениями pH < 4 или pH > 12 могут привести к неверным или недействительным результатам. Использование буферного раствора обеспечивает оптимальное значение pH для проведения теста.
- Частицы тканей в растворе не влияют на результат теста.

Инструкция по применению: SERATEC HemDirect

Номер изделия: HBF07

- Хранить пробы в сухом месте при температурах от 2 до 8 °C. Жидкие пробы могут быть заморожены для хранения.
- Старые пробы (например, текстиль с высохшими пятнами крови) необходимо экстрагировать дольше чем свежие пробы.¹
- Вязкие пробы центрифугировать на протяжении 1 мин. При 13,000g. Для теста использовать верхнюю часть (жидкость). Если вязкость оставшейся жидкости все еще высокая, её необходимо развести в буферном растворе.
- Для экстрагирования из текстильных материалов использовать нарезки площадью 0,25 – 1,0 кв.см.
- Образцы крови и жидкости с очень высокой концентрацией гемоглобина необходимо разводить в соотношении не менее 1:500.
- Не рекомендуется применять тест с неразведенными жидкостями вне зависимости от происхождения.

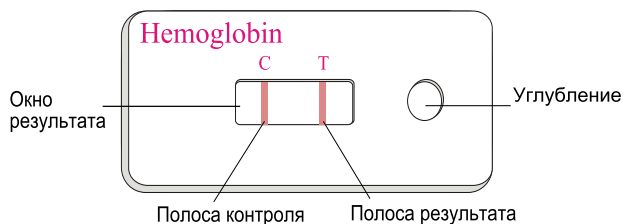
Подготовка к проведению теста

Держать флакон с буферным раствором в вертикальном положении, открутить крышечку. С помощью прикрепленной к крышке пластмассовой палочки собрать пробный материал и поместить в буферный раствор. После этого закрыть флакон с буферной жидкостью и основательно взболтать для экстрагирования. Материал, экстрагированный таким образом, стабилен на протяжении не менее двух дней. Использовать лабораторный шейкер для экстрагирования труднорастворимых образцов.

Применяйте буферную жидкость, входящую в состав комплекта HemDirect. Также допускается применение других буферных растворов с нейтральным pH (натрий-фосфатный буфер или натрий-ТРИС). При необходимости буферный раствор можно приготовить в лабораторных условиях: 12,1 г. ТРИС; 8,8 г. Na₃Citrat; 0,2 г. NaN₃ → pH = 6,8 с HCl, 0,5 г Tween 20; 5 г BSA → добавить дист. воду до общего объема 1000 мл.

Проведение теста

- Привести все компоненты теста и пробу к комнатной температуре. Низкие температуры ухудшают показатель чувствительности. При 8 °C чувствительность теста составляет около 200 нг/мл.
- Изъять кассету из защитной упаковки и маркировать.
- С помощью пластиковой пипетки добавить 3 капли пробы (около 120 мкл) в округлое углубление. Если экстрагирование было произведено в тубе с буферной жидкостью, можно также, приложив бумажную салфетку, надломить крышечку тубы и выдавить из нее 3 капли раствора в округлое углубление тест-кассеты. Рекомендуется сохранить оставшуюся жидкость для последующих тестирований.
- Начните отсчет времени.
- Определите результат после 10 минут реакции при комнатной температуре. К этому моменту нанесенная пробная жидкость должна полностью впитаться.
- Отрицательные результаты следует подтвердить после дополнительных 10 минут инкубации тест-кассеты.



Интерпретация результатов

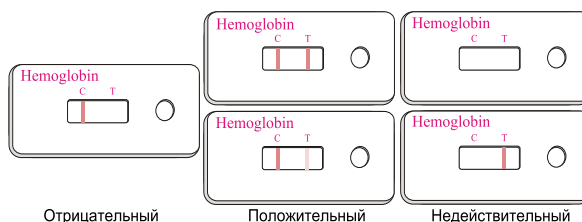
Отрицательный результат: (гемоглобин человека отсутствует или концентрация гемоглобина ниже границы чувствительности) Появляется только одна полоса красноватой окраски в области контроля (C). Отсутствие полосы в области результата (T) означает отрицательный результат.

Положительный результат: (гемоглобин человека присутствует в пробе)

В окне результата появляются две полосы красноватой окраски; одна в области контроля (C), другая в области результата (T). Допускается разная цветовая интенсивность полос. Любая видимая полоса результата означает положительный результат.

Недействительный результат

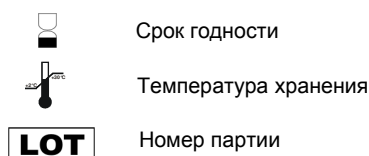
Полоса контроля (C) отсутствует. В этом случае тест следует повторить, используя новую тест-кассету.



Литература

1. Amanda 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.
2. Hochmeister 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.

Символы



Редакция: 08.2013