

SERATEC[®] Test di emoglobina HemDirect

Art.-Nr. HbF07

Diagnostico in vitro ad uso giudiziario per la dimostrazione rapida di presenza di sangue umano con rilevamento di emoglobina in una reazione immunochimica otticamente analizzabile

Impirgo

Il test HemDirect della SERATEC[®] serve alla rapida identificazione di sangue umano nell'attività giudiziaria. L'identificazione si basa sul rilevamento di emoglobina umana nel materiale campionato tramite una reazione immunochimica. L'analisi avviene otticamente con la comparsa di una banda di risultati da campioni positivi all'emoglobina. Il test è realizzabile senza conoscenze preliminari e in caso di necessità, può venire eseguito direttamente sul posto.

Retroscena

Il colorante rosso del sangue emoglobina (Hb) è un componente dei globuli rossi e serve soprattutto al trasporto dei gas nel corpo. L'emoglobina ha un peso molecolare di 64,5 kDa. È costituita da 4 catene di amminoacidi di cui due sono identiche. Ogni catena è associata a un gruppo ematico che rappresenta circa il 4% del peso molecolare totale. Con concentrazioni di 120-160 mg/m o 140-180 mg/ml rispettivamente nelle donne e negli uomini, è una delle proteine più diffuse nel sangue.

Durante il chiarimento dello svolgimento dei fatti può essere necessario verificare se un campione biologico contenga sangue e se questo sia di origine umana oppure no. Diversi processi di verifica si basano sul rinvenimento di emoglobina nel materiale campionato. Questa non permette però di stabilire se si tratti di sangue umano o meno. Per verificare questo sono spesso necessari test immunologici o saggi di ibridizzazione che costano tempo e lavoro e che non possono venire effettuati direttamente sul posto del delitto. Questi problemi si lasciano aggirare con la dimostrazione della presenza di emoglobina che avviene con l'impiego di immunoassy tramite specifici anticorpi. In origine questo test venne sviluppato per dimostrare la presenza di sangue occulto nelle feci per il riconoscimento precoce del cancro al colon; il test SERATEC[®] HemDirect ha un'alta sensibilità e specificità e può venire usato per identificare sangue umano in casi giudiziari. L'utilizzo del test offre, rispetto ai metodi usuali, i seguenti vantaggi:

- Il risultato non richiede complesse manipolazioni delle prove e può venire effettuato direttamente sul posto
- L'esito del test è disponibile molto rapidamente. 5 minuti dopo aver applicato il test, il test può venire analizzato otticamente.
- Il test SERATEC[®] HemDirect è caratterizzato da una sensibilità molto alta. Il test rileva già concentrazioni di 40 ng/ml. Da sangue fresco diluito nel tampone di estrazione con una diluizione di 10^{-6} il risultato del test è chiaramente positivo. Anche diluizioni di 10^{-7} vengono di regola ancora ben rilevate.
- Il test è specifico per emoglobina umana. Una reattività crociata risulta con il sangue dei primati. In questo modo la dichiarazione se il campione sia sangue umano, può venire sostenuta con certezza.

Dati dalla letteratura^{1,2} mostrano che gli immunoassy sono adatti anche per identificare vecchie macchie di sangue. Macchie vecchie da 2 a 31 anni su vestiti sono anche risultate positive dopo una precedente estrazione in laboratorio. Macchie di sangue secche e campioni da tessuti muscolari che sono stati conservati in diverse condizioni ambientali, hanno anche fornito, dopo l'estrazione in laboratorio, risultati positivi al test. Va notato che detergenti come per es. SDA o Sarcosyl e lisciva sembrano denaturare l'emoglobina e mostrano risultati di test negativi o solo leggermente positivi.

La qualità degli immunoassy per dimostrare la presenza di sangue umano viene limitata soprattutto da due fattori. In primo luogo anche altri fluidi organici oltre al sangue (per es. urina, feci, sperma, fluidi vaginali o saliva) contengono tracce di emoglobina e dare dei risultati di test positivi. Nella maggior parte dei casi si ritiene comunque che questo non comporti difficoltà d'interpretazione. D'altra parte all'esecuzione di un test immunostatigrafico rapido, bisogna tenere conto che concentrazioni troppo alte di emoglobina nel campione possono dare dei risultati negativi (vedi principio del test) a causa dell'effetto gancio (effetto di prozone). Questo effetto può venire evitato testando diversi gradi di diluizione. Un punto di riferimento visivo, può essere la colorazione del campione. Con una diluizione di 10^{-3} o 10^{-4} scompare per l'utente la colorazione visibile dell'emoglobina. In questo ambito non è più possibile riscontrare l'effetto gancio.

Descrizione del Prodotto

Il test SERATEC[®] HemDirect venne sviluppato in origine per dimostrare la presenza di sangue occulto nelle feci per il riconoscimento precoce del cancro al colon. Nell'uso giudiziario il test viene usato per rilevare tracce di emoglobina che dimostrano la presenza di sangue umano.

Principio del Test

Il test è costituito da un immunoassay cromostatigrafico. Si basa su due anticorpi altamente specifici anti-emoglobina umana secondo il seguente principio: sulla membrana nella regione del risultato del test si trova un anticorpo monoclonale (topo) anti-emoglobina umana (hHb) fissato linearmente. La seguente regione di controllo contiene, anche fissati linearmente, anticorpi policlonali di capra-anti-coniglio. Un cuscinco in fibra vetrosa, giacente davanti alla membrana, serve alla campionatura e convoglia il fluido a una pellicola con un secondo anticorpo monoclonale (topo) mobile secco anti-hHb, che è marcato a colori con particelle colloidali in oro e che eventualmente lega l'emoglobina disponibile. Inoltre la pellicola contiene anticorpi di coniglio marcati in oro.

Dopo l'applicazione, il campione passa, per forza capillare, attraverso la membrana del mix di reagenza nelle diverse regioni. Indipendentemente dal contenuto di emoglobina del campione, l'anticorpo di coniglio marcato in oro forma con l'anticorpo anti-coniglio della regione di controllo un complesso che tramite lo sviluppo di una banda di controllo viene mostrato nella parte superiore della finestra di controllo. Questa banda indica la corretta esecuzione del test. Se il campione di emoglobina è positivo, il complesso viene trattenuto tra l'anticorpo monoclonale fissato anti-emoglobina (topo) e la regione di risultanza del test che riconoscono un altro epitopo di emoglobina (complesso sandwich). In questo caso si forma una seconda banda cromatica (banda di risultato).

Il cosiddetto effetto **High Dose Hook** insorge quando troppa emoglobina libera che non è legata agli anticorpi marcati in oro penetra nella regione di test. Se la quantità è molto elevata, l'anticorpo fissato lì, viene saturato con emoglobina libera e non è più in grado di legare il complesso cromatico di anticorpi marcati in oro e l'emoglobina. In questo caso la formazione della banda di risultato viene soppressa e il risultato del test sembrerà negativo pur essendo presente nel campione emoglobina.

Materiali

Contenuto del test: 30 kit per test, 30 cannucce con tamponi da estrazione per rendere solubile il materiale da campionatura, istruzioni per l'uso

Accessori: cronometro o contaminuti

CONSERVAZIONE E SCADENZA

Il test può venire conservato fino alla scadenza indicata refrigerato da +2 a +8 °C o a temperatura ambiente (non oltre 30 °C) senza venire aperto.

CARATTERISTICHE QUALITATIVE

Sensitività

Il range registrabile del test è situato tra 40 ng/mL e 500 µg/mL di emoglobina (valori minimi).¹ Con concentrazioni superiori dall'indebolimento della banda di risultato del test è riconoscibile l'inizio dell'effetto High Dose Hook.

Materiale di Riferimento

Per controllare l'efficienza del test nel controllo di qualità conclusivo è d'aiuto l'emoglobina umana della ditta Sigma che può venire regolata nella concentrazione desiderata.

Funzioni

Per l'identificazione di 40 ng/mL di emoglobina nel tampone di campionamento (indicato dalla comparsa della banda di risultato) il test SERATEC[®] HemDirect dispone delle seguenti funzioni:

Sensitività analitica:	100 %
Specificità analitica:	100 %
Valore previsione positivo:	100 %
Valore previsione negativo:	100 %
Riproducibilità:	100 %

Specificità

Il test indica una reazione crociata con l'emoglobina e le seguenti specie animali: cane, coniglio, gatto, manzo, maiale, porcellino d'india, cavallo, pollo, pecora, asino, capra, cervo. Con il sangue di primati e di furetti è stata accertata una reazione positiva.¹

Esecuzione del Test

Indicazioni di sicurezza

Il materiale campionato che contiene sangue umano è materiale potenzialmente infettivo che deve venire trattato con adeguata prudenza e solo con le misure di sicurezza appropriate (per es. guanti, abiti da laboratorio).

- Test destinato a uso unico in vitro.
- Non usare il test dopo la data di scadenza o se l'involucro è danneggiato.
- Estrarre dall'involucro protettivo il kit per il test solo prima dell'uso.
- Durante il test, prima di gettare il materiale usato, sterilizzarlo in autoclave poiché contiene materiale potenzialmente infettivo (sangue umano).
- I materiali usati per il test sono potenzialmente infettivi (per es. anticorpi), ma utilizzati in modo appropriato, non causano alcun pericolo.

Prelievo e preparazione del campione

Tenere il tubetto con il tampone di estrazione perpendicolare e svitare il coperchio. Prelevare con le asticelle applicate al coperchio il materiale da campionare (per es. sangue secco, fibre di stoffa macchiate di sangue) e trasferirlo nel tampone. Chiudere il tubetto e fluidificare il sangue scuotendo scrupolosamente. I campioni così fluidificati sono a temperatura ambiente stabili per almeno 2 giorni. Con macchie di sangue vecchie, la fluidificazione può essere difficoltosa. In questo caso l'estrazione può avvenire in laboratorio con il tampone fornito (trasferire il tampone in un altro recipiente di reazione, aggiungere il materiale campionato e metterlo per due ore a temperatura ambiente in un vibratore, quindi centrifugare e usare un supporto).

Come tampone di estrazione consigliamo il tampone fornito nel tubetto. Possono comunque venire utilizzati altri sistemi-tampone per pH neutrale (per es. PBS o TBS). Si sconsiglia l'uso di acqua pulita, poiché causa una diminuzione della sensibilità. Evitare l'aggiunta di detergenti come per es. SDS o Sarcosyl al tampone di estrazione. In caso di incertezza se un sistema-tampone è idoneo all'estrazione, si consiglia di organizzare una serie di diluizioni con sangue fresco e controllare che diluizioni da $10^9/10^7$ vengano ben rilevate. La prima fase della diluizione dovrebbe avvenire in acqua distillata per garantire una completa dissociazione degli eritrociti. Alternativamente può venire usata una soluzione di 40 ng/ml hHb.

Attenzione!

Effetto High Dose Hook:

A causa dell'alto contenuto di emoglobina, si consiglia di usare campioni di macchie di sangue fresco molto diluiti per evitare l'effetto High Dose Hook. Come punto di riferimento per una diluizione appropriata può venire usata la colorazione della soluzione. La colorazione visibile per l'emoglobina scompare con una diluizione da 10^{-3} e 10^{-4} di un campione di sangue fresco. In questo campo non è più riscontrabile l'effetto High Dose Hook. Con soluzioni colorate chiaramente esiste il pericolo di un risultato negativo del test per l'effetto High Dose Hook.

Valore del pH del materiale campionato:

Il valore del pH del materiale campionato non deve possibilmente differire troppo dal campo neutrale. Campioni con un valore del pH inferiore a 5 possono richiamare risultati di test positivi errati. Nel campo alcalino da un valore di pH 9 la sensibilità risulta leggermente ribassata. Da un valore di pH 12 il test non è più funzionale. Siccome il tampone di estrazione rivela buone capacità tampone, uno scostamento del valore del pH con l'introduzione di piccole quantità di materiale campionato di regola non è riscontrabile.

Influenza della temperatura:

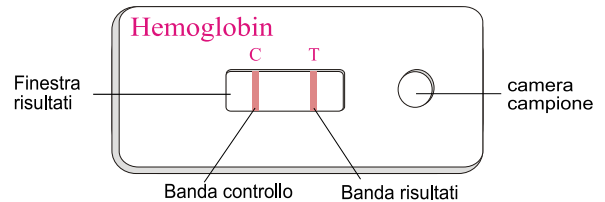
Per garantire la sensibilità del test di 40 ng/ml hHb, il test deve venire eseguito a temperatura ambiente. Una diminuzione della temperatura di 8° C fa diminuire la sensibilità di circa una potenza di dieci.

Tampone di estrazione.

In caso di necessità il tampone di estrazione può venire prodotto in proprio: 12,1 g Tris; 8,8 g Na₃Citrat; 0,2 g NaN₃ → pH su 6,8 con HCl 0,5 g Tween 20; 5 g BSA → su 1000 ml aggiungere acqua dest.

Realizzazione del test

- Il kit per il test e il campione devono essere a temperatura ambiente prima di effettuare il test. Estrarre il kit per il test dall'involucro protettivo direttamente prima di effettuare il test. Marcate il kit per motivi di identificazione.



- Inserire 3 gocce del campione (circa 100 µl) nella cavità tonda (camera campione). Se l'estrazione è avvenuta nel tubetto, aprire il coperchio (chiusura a vite) o prendere un foglio di carta (pericolo di spruzzi) e rompere il sigillo del tubetto con un leggero moto rotatorio. Tenere il tubetto perpendicolarmente e inserire con una leggera pressione sulle pareti laterali 3 gocce di liquido nella camera campione rotonda. Iniziare il cronometraggio. Conservare i resti della soluzione per effettuare, se necessario, ulteriori analisi su diversi livelli di diluizione.
- Attendere 5 minuti. Durante questo arco di tempo, nella finestra di controllo sono visibili una o due bande di colore rosso. Risultati di test negativi devono nuovamente venire confermati dopo un periodo di incubazione di 10 minuti.

Interpretazione dei risultati

Risultato negativo (nessuna emoglobina umana è presente o la presenza di emoglobina è inferiore al limite di prova)

Nel **campo di controllo (C)** compare solo **una** banda colorata in rosso. L'assenza di una banda nel **campo del risultato del test (T)** dà un risultato di test negativo. In questo caso è molto probabile che il campione non contenga emoglobina o sangue umano.

Osservazione:

assicurarsi che la solubilità del campione si trovi in un campo misurabile. Un'estrazione di emoglobina troppo esigua o scarsa o una concentrazione troppo alta, per esempio a causa di una diluizione insufficiente (vedi effetto High Dose Hook) interferiscono con lo sviluppo di una banda di risultati.

Risultato positivo: (presenza di emoglobina umana)

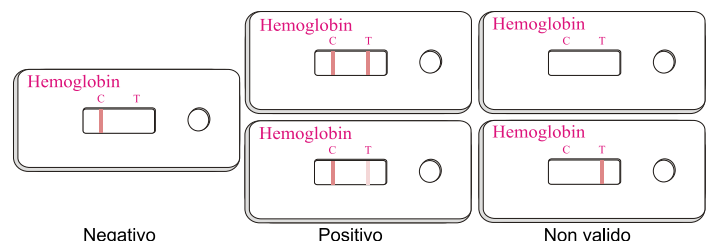
Due bande cromatiche rosse compaiono nella finestra di controllo; una nel **campo di controllo (C)** e una nel **campo di controllo del test (T)**. L'intensità della colorazione delle bande può variare. Anche una banda di test debolmente sviluppata significa un risultato positivo.

In questo caso è molto probabile che il campione contenga emoglobina o sangue umano.

Risultato non valido

La banda di controllo (C) non si forma.

In questo caso il test deve venire ripetuto con un nuovo kit di prova.



Letteratura

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

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