

SERATEC® HemDirect Тест на гемоглобин

Кат. № HbF07

Диагностический иммунохимический экспресс-тест для быстрого обнаружения следов крови человека при проведении судебно-биологических экспертиз

Применение

Тест SERATEC® HemDirect позволяет быстро подтвердить наличие следов гемоглобина человека при проведении судебно-биологической экспертизы. Подтверждение наличия гемоглобина человека происходит путём иммунохимической реакции. Результат реакции – наличие (при положительном результате) или отсутствие (при отрицательном) цветной полосы результата. Проведение экспресс-теста не требует особых знаний за исключением информации, представленной в данной инструкции. Тест может быть проведён в лаборатории или же непосредственно на месте взятия пробы.

Общая информация

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

При расследовании преступления может возникнуть необходимость подтвердить наличие крови и/или подтвердить наличие крови человека в пробе. Для подтверждения наличия крови существуют различные методы, которые, однако, не в состоянии дать ответ на вопрос, является ли исследуемая кровь кровью человеческого происхождения. Ответ на этот вопрос могут дать иммунологические тесты или же гибридационный анализ. Последний метод обладает существенными недостатками: его применение на месте взятия пробы невозможно, а проведение ресурсоёмкого лабораторного анализа занимает достаточно много времени.

С помощью иммунохроматографических экспресс-тестов можно быстро и надёжно определить следы крови и подтвердить их человеческое происхождение. Будучи изначально разработанным для ранней диагностики рака кишечника, SERATEC® HemDirect обладает всеми необходимыми свойствами для обнаружения следов крови при расследовании преступлений. Данный тест обладает рядом преимуществ по сравнению с прочими методами обнаружения крови человека:

- Тест может быть проведён без дополнительной подготовки прямо на месте изъятия пробы.
- Результат теста отчётливо виден после 5 минут.
- SERATEC® HemDirect обладает очень высокой диагностической чувствительностью. Тест показывает положительный результат при концентрации гемоглобина около 40 нг/мл. При разведении свежей крови порядка 10^{-6} в буферном растворе отчётливо видна полоса результата. Разведение порядка 10^{-7} , как правило, также приводит к положительному результату теста.
- Высокая диагностическая специфичность теста позволяет использовать его для подтверждения наличия гемоглобина человека. Кросс-реакция наблюдается с гемоглобином приматов и хорьков. С кровью подавляющего большинства животных тест показывает отрицательный результат.

Научная литература^{1,2} подтверждает особую пригодность иммунотестов для подтверждения очень старых пятен крови. Лабораторные исследования показали, что анализ пятен крови на одежде от 2-летней до 31-летней давности приводит (после соответствующего разведения) к положительному результату теста. Анализ сухих пятен крови и проб мышечной ткани, в течении одного месяца хранившихся в различных условиях, также показывает положительный результат. Однако, гемоглобин подвергается денатурации под воздействием лаурилсульфата натрия, саркозиновых солей, а также щелочных соединений. В данных случаях полоса результата может быть слабо выражена или же отсутствовать вообще.

Применение теста на гемоглобин для подтверждения наличия следов крови человека ограничено двумя факторами: во-первых, следы гемоглобина могут присутствовать в других телесных жидкостях (в моче, семенной жидкости, вагинальной жидкости, слюне) и приводить к ложно-положительным результатам.

Однако, можно с уверенностью предположить, что сложностей с интерпретацией большинства подобных результатов не возникнет. Во-вторых, следует принять во внимание, что проведение экспресс-теста с раствором очень высокой концентрации гемоглобина может вызвать т.н. прозоновый эффект (*high dose hook effect*) и, тем самым, – ложно-отрицательный результат. Прозонового эффекта можно избежать с помощью тестирования разных уровней разведения гемоглобина. При разведении порядка 10^{-3} - 10^{-4} характерная окраска раствора гемоглобина исчезает. В таком случае тест на гемоглобин к прозоновому эффекту не приведёт.

Описание теста

SERATEC® HemDirect первоначально был разработан для подтверждения наличия крови в стуле при ранней диагностике кишечного рака. В данном варианте тест применяется для подтверждения наличия следов гемоглобина человека при проведении судебно-биологических экспертиз.

Принцип теста

Тест представляет собой иммунохроматографический экспресс-тест. Принцип действия основан на двух высокоспецифичных антителах против гемоглобина человека и заключается в следующем:

На мембране теста, в области результата нанесено и зафиксировано в линейной форме моноклональное мышиное антитело против гемоглобина человека (hHb). Перед областью результата на мембране расположена область контроля, в которой похожим образом зафиксированы поликлональные козы анти-кроликовые антитела. Перед мембраной находится стекловолоконная подушечка для впитывания жидкой пробы и её дальнейшей транспортировки в область, содержащую второе, сухое мышиное антитело против hHb, маркированное коллоидом золота. Это антитело также связывает находящийся в пробе гемоглобин. Кроме того, эта область теста содержит маркированные коллоидом золота кроликовые антитела. После нанесения пробы на кассету, пробный материал движется по капиллярам к областям контроля и результата. Независимо от содержания гемоглобина в пробе, мобилизованное и маркированное коллоидом золота кроликовое антитело образует комплекс с анти-кроликовыми антителами, что визуально проявляется в появлении полосы контроля. Появление полосы контроля означает, что тест проведён верно. Если нанесённая проба содержит гемоглобин человека, то образуется комплекс между маркированным коллоидом золота мобильным антителом, гемоглобином и иммобилизованным моноклональным мышиным антителом против гемоглобина, распознающим другой эпитоп hHb. При этом образуется вторая цветная полоса (полоса результата теста).

Прозоновый эффект возникает в том случае, если в пробе присутствует слишком большое количество свободного гемоглобина, который не смог образовать комплексного соединения с антителами. В данном случае происходит «насыщение» иммобилизованного антитела гемоглобином, и комплексное соединение, приводящее к появлению цветной полосы, образоваться не может. Следовательно, цветная полоса результата не видна, и результат теста кажется отрицательным, не смотря на высокую концентрацию гемоглобина в пробе.

Материалы

Содержание набора: 30 тест-кассет, 30 туб с буфером раствора, 1 инструкция по применению

Дополнительные материалы (не содержатся в наборе): таймер

Хранение и срок годности

На протяжении указанного срока годности тест следует хранить в закрытой упаковке в прохладном месте при +2-+8 °C или при комнатной температуре (не выше 30°C).

Качественные свойства

Чувствительность

Диапазон обнаружения гемоглобина составляет от 40 нг/мл до 500 мкг/мл.¹ Более высокая концентрация гемоглобина может привести к прозоновому эффекту и, соответственно, к ослаблению окраски полосы результата.

Стандарт контроля качества

Для проверки свойств используется гемоглобин человека фирмы Sigma в необходимых для проверки качества концентрациях.

Детальные свойства

При обнаружении 40 нг/мл гемоглобина в буферном растворе SERATEC® HemDirect показывает следующие результаты:

Аналитическая чувствительность:	100 %
Аналитическая специфичность:	100 %
Положительное прогнозируемое значение:	100 %
Отрицательное прогнозируемое значение:	100 %
Воспроизводимость:	100 %

Специфичность

Тест не показывает кросс-реакции с гемоглобином следующих животных видов: собака, кролик, кошка, корова, свинья, дикий кабан, лошадь, курица, овца, мул, коза, олень.

Тест показывает положительный результат при анализе крови приматов и хорьков.¹

Проведение теста

Меры предосторожности

Материал, содержащий кровь человека, является потенциальным носителем инфекций. При работе с ним следует соблюдать соответствующие меры предосторожности.

- Тест предназначен для одноразовой диагностики ин-витро
- Не применять тест после истечения срока хранения или повреждения защитной упаковки
- Извлекать тест из защитной упаковки только непосредственно перед применением
- Автоклавировать материалы, использованные при проведении теста, т.к. они могут содержать носителей инфекций (кров человека)
- Действующие компоненты теста (например, антитела) могут быть носителями инфекций; при правильном проведении теста они, как правило, опасности не представляют

Взятие и подготовка пробы

Держите пластиковую трубу с буферной жидкостью в вертикальном положении и откройте крышку. С помощью палочки, прикреплённой к крышке, соберите немного пробного материала и поместите его в буферный раствор. Закройте пластиковую трубу и растворите пробу путём взбалтывания. Пробу, растворённую таким образом, стабильны при комнатной температуре на протяжении как минимум двух дней.

Растворение старых, труднорастворимых пятен крови может быть произведено в лабораторных условиях. Для этого перелейте буферный раствор в другую лабораторную посудину, добавьте туда пробный материал, поместите на вибратор на 2 часа.

В качестве буферного раствора рекомендуется применять буферный раствор, входящий в комплект набора. Также могут применяться другие буферные системы с нейтральным pH, например PBS oder TBS. Не рекомендуется использовать дистиллированную воду, т.к. это приводит к уменьшению чувствительности теста. Избегайте таких добавок как лаурилсульфат натрия или саркозидовые соли. Если есть сомнения в пригодности буферной системы для экстракции, рекомендуется развести свежую кровь несколько раз и убедиться, что разведение порядка 10^{-6} - 10^{-7} хорошо усваивается буферным раствором. Первое разведение следует произвести в дистиллированной воде, чтобы обеспечить полный лизис эритроцитов. Также можно использовать раствор гемоглобина человека с концентрацией 40 нг/мл.

Обратите внимание!

Пронозный эффект (High Dose Hook Effect):

Из-за высокой концентрации гемоглобина настоятельно рекомендуется разводить пробы свежих пятен крови, чтобы избежать пронозного эффекта. Оценить достаточность разведения можно с помощью окраски раствора. Видимая окраска исчезает при разведении свежей крови порядка 10^{-3} - 10^{-4} . В этой области концентрации пронозный эффект не наблюдается. Если буферный раствор имеет характерную для гемоглобина окраску, это может привести к ложно-отрицательному результату теста.

Значение pH пробного материала:

Значение pH пробного материала не должно сильно отклоняться от нейтрального. Ложно-положительные результаты возможны при тестировании проб со значением pH<5. При высоком pH>9 незначительно уменьшается чувствительность теста. При pH>12 тест не будет произведён верно. Благодаря хорошим буферным свойствам раствора для экстракции, значение pH не будет сильно отклоняться при добавлении пробы в буферный раствор.

Влияние температуры

Для обеспечения чувствительности теста 40 нг/мл hHb рекомендуется проводить тест при комнатной температуре. При низких температурах от 8 °C наблюдается потеря чувствительности теста.

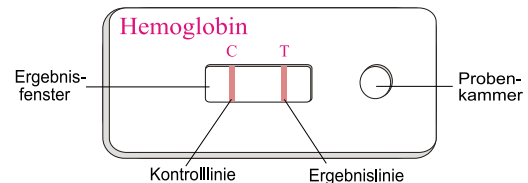
Буферный раствор:

При потребности рекомендуемый буферный раствор может быть произведён в лаборатории:

12,1 г Tris; 8,8 г Na₃Citrat; 0,2 г NaN₃ → pH довести до 6,8 с HCl
 0,5 г Tween 20; 5 г BSA → наполнить Aqua dest до 1000 мл

Применение теста

- Тест-кассета и исследуемая проба должны быть приведены к комнатной температуре.
- Возьмите тест-кассету из защитной упаковки. При потребности пометьте кассету с целью дальнейшей идентификации.



- Поместите 3 капли пробы (ок. 100 мкл) в круглое углубление (Probenkammer). Если растворение было произведено в пластиковой трубе, откройте крышку трубы или же возьмите бумажную салфетку и лёгким движением сломайте заострённый кончик крышки. Держите трубу в вертикальном положении. С помощью лёгкого нажатия на стенки трубы добавьте 3 капли пробы в округлое отверстие. После этого начните отчёт времени. Сохраните оставшийся раствор для возможных дальнейших тестирований при других уровнях разведения.
- Подождите 5 минут. На протяжении этого времени в окне результата появится одна или две красноватых полосы. Отрицательный результат следует подтвердить после 10 минут.

Интерпретация результатов

Отрицательный результат (гемоглобин человека не обнаружен или его концентрация ниже нижней границы диапазона обнаружения)

Появляется только **одна** красноватая полоса в области контроля (**C**)

Отсутствие полосы результата (**T**) говорит об отрицательном результате теста. В этом случае с большой вероятностью. Можно исключить присутствие гемоглобина человека (крови) в пробе.

Примечание:

Убедитесь, что разведение пробы достаточно для определения концентрации. Слишком слабое разведение и высокая концентрация гемоглобина ведут к пронозному эффекту и препятствуют появлению линии результата!

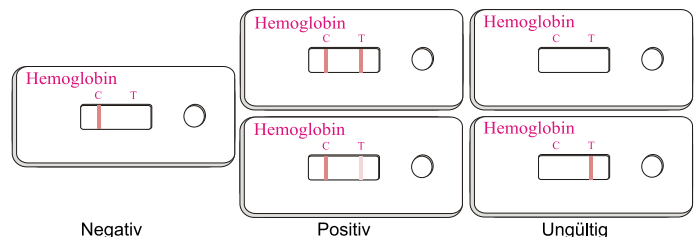
Положительный результат (присутствие гемоглобина человека в пробе)

В окне результата появляются две красноватых полосы: одна в области контроля (**C**) и одна в области результата (**T**). Интенсивность окраски полос может быть различной. Даже слабая полоса результата означает, что результат теста – положительный. В этом случае с большой вероятностью в пробе присутствует гемоглобин человека.

Результат недействителен

Полоса контроля (**C**) не появляется.

В этом случае тест следует повторить, используя новую кассету.



Литература

¹Amada 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.