

## SERATEC® PMB Test

REF: PMB, PMB/8, PMB/30

### Aplicação

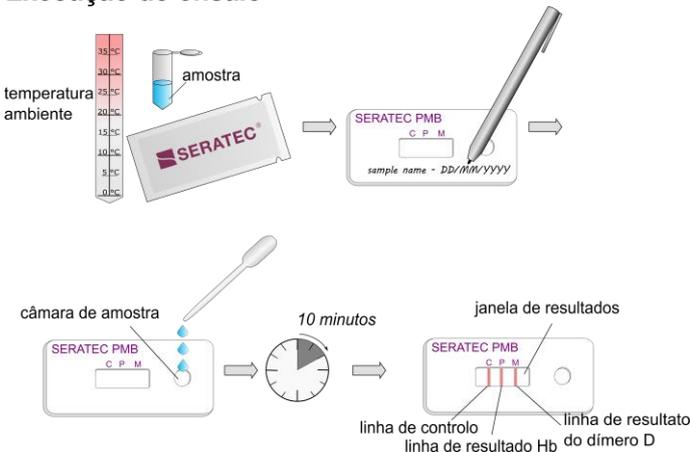
O SERATEC® PMB Test é um imunoenensaio cromatográfico para a deteção rápida de hemoglobina humana (Hb) e de dímero D humano para a identificação de sangue periférico e/ou menstrual em amostras forenses. O produto contém quatro anticorpos monoclonais anti-humanos como componentes ativos.

### Materiais

- 8 ou 30 (PMB/8, PMB/30) PMB Test embalados individualmente em formato de cassete, cada um com uma pipeta de plástico
- 8 ou 30 (PMB/8, PMB/30) garrafas com 1,5 ml de tampão de extração
- Instruções de utilização

Também vai precisar de: Cronómetro ou temporizador

### Execução do ensaio



1. Colocar todos os componentes de ensaio à temperatura ambiente antes da execução. Temperaturas baixas podem resultar na redução da sensibilidade.
2. Retirar o cartucho de ensaio do saco de proteção e rotular para identificação.
3. Adicionar 3 gotas da amostra (aprox. 120 µl) com a pipeta de plástico fornecida na câmara de amostra e iniciar a medição do tempo.
4. Leitura do resultado do ensaio após 10 minutos à temperatura ambiente. O líquido na câmara de amostra deve ter sido totalmente absorvido.
5. Eliminar o material de amostra residual para, se necessário, realizar mais ensaios.

### Interpretação do resultado

Após 10 minutos, na janela de resultados, podem ser legíveis até três linhas:

**Linha de resultado Hb (P):** Apenas visível no caso de amostras positivas de Hb; a intensidade da cor da linha pode variar e depende da concentração de Hb da amostra.

**Linha de resultado do dímero D (M):** Apenas visível no caso de amostras positivas de dímero D; a intensidade da cor da linha pode variar e depende da concentração de dímero D da amostra.

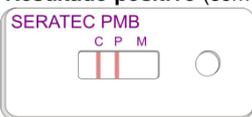
**Linha de controlo (C):** Controlo de eventuais erros de utilização e da integridade dos componentes de ensaio. Esta linha é sempre visível no caso de uma execução bem sucedida do ensaio.

**Resultado negativo** (Hb e dímero D não comprovadas; sem Hb/dímero D na amostra ou concentração abaixo do limite de deteção):



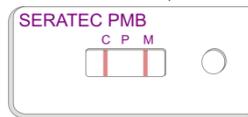
Uma linha visível na janela de resultados. As linhas de resultado do ensaio (P, M) não são visíveis. A exibição da linha de controlo (C) confirma a execução correta do ensaio.

**Resultado positivo** (somente Hb comprovada):

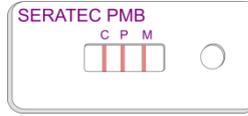


Duas linhas visíveis na janela de resultados: a linha de resultado Hb (P) e a linha de controlo (C). Cada linha P visível (com coloração mais forte ou mais fraca) deve ser considerada como um resultado positivo.

**Positive result** (D-dimer detectable):

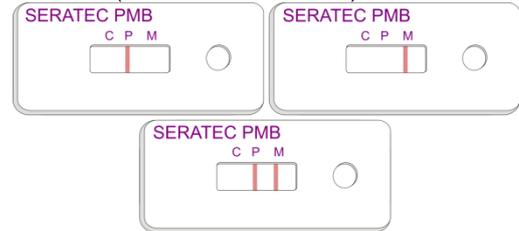


Duas linhas visíveis na janela de resultados: a linha do dímero D (M) e a linha de controlo (C). Cada linha M visível (com coloração mais forte ou mais fraca) deve ser considerada como um resultado positivo.



**Nota:** Na maioria dos casos, quando detetado dímero D, a Hb é igualmente comprovada. Neste caso, são visíveis três linhas na janela de resultados: a linha de resultado do dímero D (M), a linha de resultado Hb (P) e a linha de controlo (C).

**Resultado inválido** (sem resultado relevante):



Nenhuma linha de controlo (C) visível. Neste caso, o ensaio é inválido e deve ser repetido com um novo cartucho de ensaio.

### Instruções sobre a preparação da amostra

Para obter um resultado de ensaio ideal, aplicam-se as seguintes instruções:

- As amostras viscosas devem ser diluídas até que a amostra flua sem problemas na membrana de ensaio.
- Utilize a solução tampão fornecida, uma vez que esta foi especialmente desenvolvida para o PMB Test. Outras soluções tampão ou a utilização de água podem provocar uma redução da sensibilidade ou intensidades lineares oscilantes.
- Não utilize líquidos com um valor pH inferior a 3 ou superior a 12, o que pode conduzir a resultados incorretos ou inválidos.
- A adição de detergentes como SDS, Sarcosyl ou agentes de branqueamento ao material de amostra pode conduzir a resultados incorretos ou inválidos. Isto é provavelmente causado pela desnaturação da Hb e dímero D.
- As partículas de tecido não prejudicam o resultado do ensaio.
- As zaragatoas, os pedaços de tecido ou de preservativos devem ser extraídos numa quantidade suficiente de tampão. O recorte deve ter entre 0,25 e 1 cm<sup>2</sup> e pode ser colocada diretamente no frasco do tampão.
- Em alternativa, o material de amostra pode ser recolhido na tampa do frasco do tampão, com a ajuda do aplicador.
- Recomenda-se um tempo de extração de aprox. 10 minutos. No entanto, aplica-se o seguinte: quanto mais antiga ou pequena a mancha, maior será a duração de extração recomendada. [1,2]
- As amostras extraídas são estáveis durante cerca de 2 dias à temperatura ambiente. Durante um período mais prolongado, devem ser armazenadas num local seco e frio (2 – 8 °C). As amostras líquidas podem ser congeladas.

### Tampão de extração

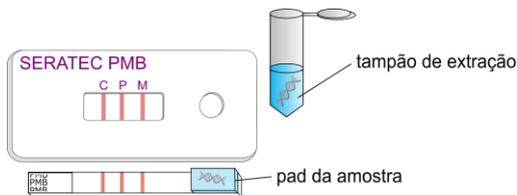
O tampão de extração fornecido contém os seguintes componentes (1 l de H<sub>2</sub>O destilada):

12,1 g Tris; 8,8 g Na<sub>3</sub>Citrat; 0,2 g NaN<sub>3</sub>; 0,5 g Tween 20; 5 g BSA; pH 6,8.

### DNA Profiling

As amostras extraídas podem ser armazenadas para outras análises (por ex., DNA Profiling) (ver preparação da amostra).

A amostra extraída é compatível com análises de ADN. Além disso, é possível obter ADN a partir do pad da amostra para análises adicionais.[3,4]



## Instruções de segurança

As amostras forenses são materiais potencialmente infecciosos, que devem ser analisados com o devido cuidado e apenas com as medidas de proteção adequadas (por ex. luvas, vestuário de laboratório). Os materiais utilizados durante a execução do ensaio devem ser esterilizados automaticamente antes da eliminação, uma vez que contém material potencialmente infeccioso. Devem ter em conta as seguintes instruções:

- Não utilizar o produto em caso de danos.
- Retirar o cartucho de ensaio do saco de proteção apenas imediatamente antes da utilização.
- Não utilizar o produto após o final do prazo de validade.
- Os materiais utilizados no ensaio (por ex. anticorpos) são materiais potencialmente infecciosos. No entanto, em caso de utilização e eliminação corretas, não existe qualquer perigo para o utilizador ou terceiros.
- Não congelar cartucho de ensaio.

## Enquadramento

O pigmento vermelho do sangue Hemoglobina (Hb) é um complexo proteico presente nos glóbulos vermelhos e destina-se sobretudo ao transporte de gases no corpo. Este tem um peso molecular de 64,5 kDa e é composto por 4 subunidades (cadeias de aminoácidos), das quais duas são respetivamente idênticas. Cada subunidade deve ser tratada com um grupo hemático, um complexo de ferro que é responsável pela ligação de oxigénio. Com concentrações de 120-160 mg/ml (mulheres) ou 140-180 mg/ml (homens), a Hb é uma das proteínas mais frequentes no sangue.

Os dímeros D são proteínas que são formadas como produtos de decomposição da fibrina durante a fibrinólise (dissolução própria do corpo de um coágulo de sangue). Estes contêm dois fragmentos D reticulados da fibrina e, por isso, é designado de dímero D. Durante a menstruação, ocorre um aumento da fibrinólise, o que aumenta a percentagem de dímeros D no sangue mecânico. No entanto, a concentração no sangue periférico não aumenta, uma vez que o processo de coagulação é sobretudo extravascular. Os dímeros D são, por isso, adequados como marcadores para a identificação de sangue menstrual.[4-7]

O SERATEC® PMB Test **combina a deteção de hemoglobina humana e dímero D e permite a identificação**, bem como a **distinção entre o sangue periférico e o sangue menstrual**. O ensaio oferece as seguintes vantagens para a aplicação forense:

- Manuseamento simples sem equipamento adicional – diretamente no local do crime ou em laboratório.
- Resultado rápido e fiável após 10 minutos.
- Elevada sensibilidade e especificidade através da deteção direta de Hb humana ou dímero D (v. especificidade).

## Sensibilidade

Com a ajuda do SERATEC® PMB Test, é possível detetar quantidades de, pelo menos, 20 ng/ml de Hb humana ou 400 ng/ml de dímero D humano. O **efeito High Dose Hook**, no caso de concentrações muito altas de Hb, pode conduzir a uma intensidade linear (linha P) reduzida, por isso, recomenda-se sempre a diluição de amostras frescas, líquidas (ver preparação da amostra). O sangue humano é comprovado de forma positiva em diluições de cerca de 1:50 a 1:10<sup>7</sup> no tampão de extração recomendado.

## Especificidade

**Hemoglobina:** O SERATEC® PMB Test não apresenta qualquer reatividade cruzada com outras proteínas no sangue. Com o sangue de diversos tipos de animais (cão, coelho, gato, bovino, porco, javali, cavalo, galinha, ovelha, burro, cabra, veado-vermelho, etc.), não foi observada qualquer reatividade cruzada.[1] O sangue de primatas e furões pode levar a resultados positivos.

**Dímero D:** O SERATEC® PMB Test, no caso de uma concentração elevada de dímero D no sangue periférico, pode apresentar um resultado positivo incorreto para o sangue menstrual. Isto pode ocorrer, por ex., devido à presença de uma trombose, cicatrização pós-operatória, tumores malignos, cirrose hepática. Os limites de deteção

específicos do ensaio, bem como a diluição da amostra recomendada (v. preparação da amostra), reduzem a probabilidade de as amostras que não contenham sangue menstrual apresentem um resultado positivo.

## Armazenamento e durabilidade

- Armazenamento das cassetes de ensaio e da solução tampão a +2 a +30 °C.
- Guardar os cartuchos de ensaio no saco de proteção até à utilização.
- Não utilizar após a data de validade indicada.

## Características de qualidade

Os nossos produtos são fabricados de acordo com os padrões de qualidade da norma europeia ISO 9001. As características de desempenho são confirmadas num controlo de qualidade final, aplicando as seguintes normas: *human hemoglobin* (Sigma Aldrich, H7379); Liquicheck™ D-Dimer Control (Bio-Rad).

Para mais informações ou em caso de dúvidas, entre em contacto connosco.

## Literatura

- [1] A. Misencik, D.L. Laux, Validation Study of the Seratec HemDirect Hemoglobin Assay for the Forensic Identification of Human Blood, in: 2007.
- [2] M.N. Hochmeister, B. Budowle, R. Sparkes, O. Rudin, C. Gehrig, M. Thali, L. Schmidt, A. Cordier, R. Dirnhöfer, Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 597–602.
- [3] A. Barbaro, P. Cormaci, S. Votano, A.L. Marca, Evaluation study about the SERATEC® rapid tests, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 5* (2015) e63–e64. doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.025.
- [4] H. Holtkötter, C.R. Dias Filho, K. Schwender, C. Stadler, M. Vennemann, A.C. Pacheco, G. Roca, Forensic differentiation between peripheral and menstrual blood in cases of alleged sexual assault—validating an immunochromatographic multiplex assay for simultaneous detection of human hemoglobin and D-dimer, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 683–690. doi:10.1007/s00414-017-1719-y.
- [5] H.H. Chan, J.A. Johnson, A. Panju, C.A. Bradley, D-Dimer Assay during Menstrual Period., *Blood.* 104 (2004) 4035–4035. <http://www.bloodjournal.org/content/104/11/4035> (accessed June 26, 2019).
- [6] H. Holtkötter, L. Dierig, M. Schürenkamp, U. Sibbing, H. Pfeiffer, M. Vennemann, Validation of an immunochromatographic D-dimer test to presumptively identify menstrual fluid in forensic exhibits, *Int. J. Legal Med.* 129 (2015) 37–41. doi:10.1007/s00414-014-1097-7.
- [7] D.J. Baker, E.A. Grimes, A.J. Hopwood, D-dimer assays for the identification of menstrual blood, *Forensic Sci. Int.* 212 (2011) 210–214. doi:10.1016/j.forsciint.2011.06.013.

## Símbolos

