ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКАДАИКОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЛЛЮСКАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «DSP-Check», производства фирмы Parapharm Laboratories Co., Ltd, Япония

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
№ 01.016 - 07

gost.e-ecolog.ru

Экспресс-определение окадаиковой кислоты в моллюсках с помощью тест-системы «DSP-Check», производства фирмы Parapharm Laboratories Co., Ltd, Япония. Методические рекомендации - М.: ФГУЗ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 14 с.

1. Методические рекомендации разработаны:
   ГУ НИИ питания РАМН (академик РАМН, профессор В.А. Тутельян, д.м.н., профессор С.А. Хотимченко, Ю.А. Коханова), Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора (И.В. Брагина , Е.С.Шальнова , Л.С. Осипова) , ООО «Стайлаб» (А.В. Галкин).
2. Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 28 мая 2007 г.)
3. Утверждены и введены в действие Председателем Лабораторного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека , Главным врачом ФГУЗ « Федеральный центр гигиены и эпидемиологии » Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.И. Верещагиным 15 июня 2007 г.
4. Введены впервые.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Назначение и область применения
2. Общие положения
3. Принцип метода
4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы
5. Требования безопасности
6. Требования к квалификации персонала
7. Условия измерений
8. Подготовка к проведению анализа
9. Выполнение измерений
10. Обработка результатов измерения

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Председатель Лабораторного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

А.И. Верещагин

« 15 » июня 2007 г

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКАДАИКОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЛЛЮСКАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «DSP-Check», производства фирмы Parapharm Laboratories Co., Ltd, Япония

МР № 01.016 - 07

1. Назначение и область применения

Настоящие методические рекомендации устанавливают методику экспресс-определения содержания окадаиковой кислоты в моллюсках методом иммуноферментного анализа.

Диапазон определяемых концентраций составляет 100 – 1000 мкг/кг.

2. Общие положения

Фикотоксины представляют собой группу веществ, продуцируемых некоторыми видами водорослей, микроводорослей и цианобактерий. Эти вещества способны аккумулироваться в организме морских и пресноводных животных и, при попадании в организм человека, вызывать отравления различной степени тяжести.

Фикотоксины, входящие в группу DSP (diarrhoeic shellfish poison – диарейный яд моллюсков), получили свое название по синдрому вызываемого ими отравления. К данной группе относятся окадаиковая кислота и ее производные – динофизистоксины.

Синдром отравления DSP-токсинами широко распространен. Особо часто сезонные вспышки происходят в Европе и Японии, однако случаи отравления DSP отмечаются и в Америке, Южной Африке, Новой Зеландии, Австралии и Таиланде. В ряде стран DSP токсины нередко обнаруживаются в моллюсках при исследованиях, проводимых в рамках программ мониторинга

Основной механизм действия окадаиковой кислоты заключается в ингибировании серин/треонин фосфатазы 1 и 2А и опосредованном потенцировании действия серин-треонин киназ. Это приводит к избыточному накоплению фосфорилированных белков и нарушению многих процессов, протекающих в клетке. Кроме того, окадаиковая кислота является мощным стимулятором развития опухолевых процессов.

Основными симптомами при отравлении окадаиковой кислотой являются диарея, тошнота, рвота, боли в животе. Они развиваются через 30 мин – несколько часов после употребления контаминированных моллюсков. Продолжительность этого периода обычно недолгая – в тяжелых случаях до нескольких дней. Однако при хронической интоксикации возможно развитие опухолевых процессов.

Безопасный уровень содержания DSP токсинов в тканях двустворчатых моллюсков был установлен Европейским Союзом в 2002 году для окадаиковой кислоты, динофизистоксинов и пектенотоксинов в сумме не более 160 мкг/кг эквивалента окадаиковой кислоты.

В последнее время в целях скрининга за рубежом в рутинной лабораторной практике широко применяется метод иммуноферментного анализа (ИФА).

Наборы «DSP-Check» представляют собой тест-системы для иммуноферментного анализа в комплекте с необходимыми реагентами, выпускаются серийно и предназначены для экспресс-определения окадаиковой кислоты в моллюсках.

3. Принцип метода

Принцип работы тест-системы «DSP-Check» основан на методе конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован окадаиковой кислотой.

Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые (стандартные) образцы, препарат, содержащий антитела к окадаиковой кислоте, конъюгированные с ферментом, дозируются в лунки планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы окаданковой кислоты в объеме раствора и на поверхности планшета,

конкурируя между собой, взаимодействуют с конъюгированными антителами к окадаиковой кислоте. В процессе конкуренции происходит иммуносорбция антител к окадаиковой кислоте на поверхности планшета, степень которой обратно пропорциональна концентрации токсина в объеме раствора.

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются несвязанные конъюгированные антитела к окадаиковой кислоте.

После промывки планшета в его лунки дозируется смесь субстрата с хромогеном. В процессе инкубации, при химическом взаимодействии субстрата с хромогеном, в котором ферментный фрагмент молекулы конъюгата, связанной на поверхности лунки, выступает в качестве катализатора, образуются окрашенные продукты реакции. После определенного времени развития данной цветной реакции, в результате которой хромоген окрашивается в голубой цвет, в лунки добавляется стоп-реагент, при этом голубой цвет раствора меняется на желтый.

Оптическая плотность в лунках, измеренная на планшетном фотометре при 450 нм, обратно пропорциональна концентрации окадаиковой кислоты в исследуемых образцах.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений концентрации окадаиковой кислоты применяются следующие средства измерения, реактивы, вспомогательные устройства и материалы.

4.1 Средства измерений

Спектрофотометр для ИФА (ридер) с фильтром 450 нм;

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г — ГОСТ 24104

Одноканальные автоматические пипетки, объем дозирования 50 мкл

8-канальные автоматические пипетки на 250 мкл;

Цилиндры градуированные 2-го класса точности вместимостью 50 $см^3$ и 100 $см^3$ — ГОСТ1770

Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 50 и 100 $см^3$ — ГОСТ1770

Пипетка градуированная 2-го класса точности вместимостью 5 $см^3$ — ГОСТ 29227

4.2 Реактивы

Тест-система «DSP-Check» для иммуноферментного анализа в стандартной комплектации, включая:

Микротитровальный планшет (3 стрипов по 8 лунок),

покрытый окадаиковой кислотой – 2 шт;

Конъюгат антител к окадаиковой кислоте с пероксидазой, конц.

Пустой флакон для разведения конъюгата [2] + [6]

Субстрат, 15 мл

Хромоген

Пустой флакон для смешивания субстрата с хромогеном [3] + [4]

Стоп-раствор

Моющий буферный раствор

Стандарт окадаиковой кислоты № 1 , на 10 мкг/ дм^3

Стандарт окадаиковой кислоты № 2 , на 100 мкг/ дм^3

Разовые микропипетки

Инструкцию по использованию тест-системы на русском и английском языках.

Метанол ч.д.а.	ГОСТ 6995-77
Дистиллированная или деионизированная вода	ГОСТ 6709

4.3 Вспомогательные устройства и материалы

Гомогенизатор для измельчения моллюсков	
Центрифуга напольная	
Воронка стеклянная	ГОСТ 25336
Виалы темного стекла объемом 2 см^3	
Пробирки центрифужные	
объемом 10 см^3	ГОСТ25336
Наконечники для автоматических пипеток	
Листовая фильтровальная бумага	
Разовые резиновые перчатки	
Тара для лабораторных отходов	

4.4 Замечания по использованию и хранению тест-систем

Не используйте тест-систему с истекшим сроком годности. Срок годности тест-системы указан на этикетке.

Не заменяйте реагенты в составе одного набора реагентами из другого набора с другим номером партии. Не используйте реагенты других производителей. Разбавление или замена реагентов может привести к потере чувствительности определения.

Храните набор при температуре 2-8 °С. **НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ НАБОР.**

Для хранения неиспользованных стрипов (лунок) упакуйте их в фольгированный пакет и плотно закройте его.

Поскольку раствор хромогена светочувствителен, избегайте попадания прямых солнечных лучей на флакон с раствором.

В случае голубоватого окрашивания раствора хромогена не рекомендуется использовать раствор, так как это является признаком порчи.

5. Требования безопасности

5.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ12.1.004 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, указанные в технической документации на весы, спектрофотометр и вспомогательные устройства.

5.2. Помещение, в котором производится выполнение измерений, должно быть снабжено приточно-вытяжной вентиляцией.

5.3. **Внимание!** Стандарты содержат окадаиковую кислоту. При работе используйте разовые резиновые перчатки, избегайте контакта реагентов с кожей.

5.4. После каждого анализа следует тщательно промывать оборудование и лабораторную посуду для предотвращения перекрестного загрязнения от пробы к пробе. Все использованные материалы, жидкие отходы, расходные материалы и лабораторная посуда должны быть деконтаминированы путем замачивания в течение не менее 60 минут в 5% растворе гипохлорита натрия. Затем лабораторную посуду следует отмыть обычными лабораторными моющими средствами и промыть дистиллированной водой.

5.5. Стоп-реагент содержит в своем составе кислоту. Избегайте контакта стоп-реагента с кожей.

5.6. Метанол относится к легковоспламеняющимся растворителям. Емкость с метанолом должна быть всегда плотно закрыта. Храните емкость с метанолом вдали от источников тепла, искр и открытого пламени. Не курите во время работы. **Метанол токсичен при попадании внутрь! Пары метанола токсичны! Не вдыхайте пары** метанола! Избегайте контакта метанола с кожей.

6. Требования к квалификации персонала

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное образование, прошедшие соответствующий инструктаж, освоившие метод в процессе стажировки.

7. Условия измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

Температура воздуха	20 - 25 °С
Атмосферное давление	84.0 - 106.7 кПа (630 - 800 мм. рт. ст.);
Влажность воздуха	не более 80% при температуре 25°С;
Напряжение в сети	220 ± 10 В;
Частота переменного тока	50 ± 1 Гц

8. Подготовка к проведению анализа

8.1. Отбор проб

Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб. Пробы доставляют в лабораторию немедленно после их отбора. Пробы, предназначенные для анализа, должны храниться в холодном темном месте.

8.2 Подготовка реактивов и материалов

Перед использованием доведите температуру всех реагентов (включая дистиллированную воду) до комнатной (20-25 °С). Это займет около 1 часа.

Приготовление 45%-ного раствора метанола. В мерную колбу на 50 $см^3$ помещают 22,5 см3 метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают. Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели.

Приготовление 90%-ного раствора метанола. В мерную колбу на 100 $см^3$ помещают 90 $см^3$ метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают. Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели.

Микротитровальный планшет. Перед выполнением анализа из планшета следует извлечь необходимое количество стрипов (лунок) вместе с рамкой. Остальные стрипы (лунки) следует тщательно упаковать в фольгированный пакет, закрыть и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

8.3. Пробоподготовка

8.3.1. Раскрывают раковину, промывают мясо моллюска водой, обсушивают образец.

8.3.2. Берут навеску от 1 до 10 г моллюска, помещают навеску в стакан гомогенизатора, фиксируют вес образца.

8.3.3. Добавляют 5-кратный объем 90% раствора метанола, фиксируют добавленный объем.

8.3.4. Гомогенизируют образец с раствором метанола в течение 1 – 2 минут.

8.3.5. Центрифугируют гомогенат.

8.3.6. Отбирают 1 $см^3$ супернатанта, переносят в чистую пробирку (или виалку), с помощью дистиллированной воды доводят объем раствора до 2 $см^3$ (разбавление в 2 раза).

8.3.7. Для анализа используют 50 мкл раствора на лунку планшета.

9. Выполнение измерений

9.1. Предварительные замечания к проведению измерений с помощью тест-системы «DSP-Check»:

- немедленно после использования охлаждают все оставшиеся реагенты до температуры 2 – 8°С, избегайте длительного хранения реагентов при комнатной температуре;

- иммуноферментная реакция начинается после добавления в лунки планшета препарата антител. При дозировании рекомендуется использовать, многоканальную пипетку;

- в процессе выполнения анализа не допускайте полного высыхания лунок планшета. Избегайте перерывов между отдельными рабочими стадиями;

- воспроизводимость результатов иммуноферментного анализа существенно зависит от тщательности отмывки планшета в процессе анализа. Внимательно следуйте описанной далее процедуре отмывки планшета;

- на стадии инкубации с хромогеном избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется поместить планшет в темный бокс.

9.2. Приготовление стандартных растворов. Добавьте по 5 $см^3$ 45 %-го раствора метанола во флаконы [7] и [8], содержащие рассчитанные навески окадаиковой кислоты (отметка на флаконе соответствует объему 5 $см^3$), закройте крышки флаконов и энергично встряхните. Полученные растворы содержат 10 мкг/ $дм^3$ окадаиковой кислоты [7] и 100 мкг/ $дм^3$ окадаиковой кислоты [8].

9.3. Приготовление раствора конъюгата. В пустом флаконе [2] + [6] смешайте 50 мкл конъюгированных антител к окадаиковой кислоте [2] и 5 $см^3$ моющего буфера [6] (разведение конъюгата 1:100).

9.4. Приготовление раствора хромогена. В пустом флаконе [3] + [4] смешайте 50 мкл хромогена [4] и 5 $см^3$ субстрата [3] (смесь 1:100). Готовый раствор хромогена следует поместить в темный бокс.

ПРИМЕЧАНИЕ: Готовые растворы необходимо израсходовать в одно и тоже время.

9.5. Проведение измерений

9.5.1. Извлекают из фольгированного пакета необходимое количество лунок - по одной лунке на каждую пробу. Помещают лунки в рамку.

9.5.2. Оставшиеся лунки немедленно упаковывают в фольгированный пакет и помещают на хранение при 4 °С.

9.5.3. Наносят координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов на разграфленную бумагу.

9.5.4. Помечают лунки, чтобы идентифицировать их после промывки.

9.5.5. Осторожно, не допуская вспенивания, перемешивают реагенты во флаконах.

9.5.6. Перед пипетированием смачивают каждый свежий наконечник пипетки дозируемым раствором (набирают и выпускают раствор).

9.5.7. Используя разовые микропипетки, вносят по 50 мкл стандартных растворов окадаиковой кислоты (10 мкг/ $дм^3$ и 100 мкг/ $дм^3$) и исследуемых растворов, приготовленных по п. 9.2, в лунки стрипа. Каждый раствор вносится новой микропипеткой.

9.5.8. Немедленно вносят по одной капле (50 мкл) готового раствора конъюгата ([2] + [6]) в каждую лунку.

9.5.9. Инкубируют стрипы в течение 10 минут при комнатной температуре (20–25°С). Во время инкубации рекомендуется перемешивать растворы в лунках стрипов, перемещая стрипы быстрыми возвратно-поступательными движениями по поверхности стола. После использования трижды промывают флакон [2] + [6] дистиллированной водой.

9.5.10. Выливают жидкость из лунок в раковину, выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного постукивания стрипами по столу, накрытому чистой фильтровальной бумагой.

9.5.11. Наполняют лунки моющим буферным раствором [6]. Выливают жидкость из лунок, выбивают стрипы, как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок еще три раза.

9.5.12. Добавляют по одной капле (50 мкл) смешанного раствора хромогена ([3] + [4]) в каждую лунку.

9.5.13. Инкубируют при комнатной температуре в течение 6 минут в темноте. После использования трижды промывают флакон [3] + [4] дистиллированной водой.

9.5.14. Добавляют по одной капле (50 мкл) стоп-раствора ([5]) в каждую лунку.

9.5.15. Осторожно перемешивают вручную, быстро перемещая стрипы возвратно-поступательными движениями по поверхности стола.

9.5.16. Через три минуты после остановки реакции сравнивают окраску в лунках со стандартными и исследуемыми растворами (чем выше концентрация окадаиковой кислоты, тем бледнее окраска в лунках).

9.5.17. С помощью планшетного фотометра измеряют оптические плотности растворов в лунках стрипов при 450 нм.

10. Обработка результатов измерения

Постройте калибровку в полулогарифмической системе координат, по абсциссе откладывая концентрацию окадаиковой кислоты в стандартных растворах, а по ординате оптическую плотность растворов, измеренную при 450 нм. С помощью калибровочной кривой найдите концентрацию окадаиковой кислоты в исследуемых растворах по их оптической плотности.

Предел обнаружения и диапазон измерения окадаиковой кислоты в экстрактах с помощью набора DSP-Check составляет соответственно 10 мкг/ дм^3 и 10 – 100 мкг/ дм^3 по калибровочной кривой.

Внимание: при выполнении исследования по настоящей методике концентрация окадаиковой кислоты в растворе 10 мкг/ дм^3 соответствует 100 мкг/кг окадаиковой кислоты в пробе моллюска (разбавление при экстракции 1:5, далее супернатанты разбавляются еще вдвое). Также, найденная концентрация 100 мкг/ дм^3 окадаиковой кислоты в растворе соответствует 1 мг/кг окадаиковой кислоты в пробе моллюска.

Пример исследования шести образцов (Ст. - стандарты, Пр. - пробы).

Стрип 1	A	B	C	D	E	F	G	H
	Ст. 1	Ст. 2	Пр. 1	Пр. 2	Пр. 3	Пр. 4	Пр. 5	Пр. 6
в пробе:	160 мкг/кг	1 мг/кг						

Для вычисления концентрации окадаиковой кислоты (ОК) в пробах моллюсков необходимо использовать следующую формулу:

(концентрация ОК в пробе, мкг/кг) = (концентрация ОК по калибровке, мкг/ $дм^3$) X (объем экстрагента, $см^3$) X 2 / (вес пробы, г).

Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA® SOFT. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

gost.e-ecolog.ru