ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ САКСИТОКСИНА В МОЛЛЮСКАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)», производства фирмы R-Biopharm AG, Германия

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
№ 01.015 - 07

gost.e-ecolog.ru

Экспресс-определение сакситоксина в моллюсках с помощью тест-системы «Ridascreen Fast PSP (Saxitoxin)», производства фирмы R-Biopharm AG, Германия. Методические рекомендации - М.: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2007. – 15 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.Ю. 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 САКСИТОКСИНА В МОЛЛЮСКАХ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)», производства фирмы R-Biopharm AG, Германия

МР № 01.015 - 07

1. Назначение и область применения

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

Диапазон определяемых концентраций составляет 50 – 800 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.

Токсины, входящие в группу PSP (paralytic shellfish poison) (паралитический яд моллюсков), являются одними из сильнейших нервно-паралитических ядов, известных человечеству. Свое название они получили по синдрому вызываемого ими отравления.

Существует более 24 форм PSP, обладающих способностью к взаимопревращению в метаболических реакциях. Сакситоксин является наиболее токсичным представителем данной группы веществ.

Отравления людей токсинами группы PSP происходят ежегодно. Основными продуктами, употребление которых приводит к интоксикации, являются двустворчатые моллюски. Установлено, что тепловая обработка или замораживание не позволяют полностью освободить продукты от PSP. Около 15% всех зарегистрированных случаев отравления приводят к летальному исходу.

Механизм действия сакситоксина и его производных заключается в блокировании токсином тока ионов натрия через потенциал-зависимые натриевые каналы в мембранах нервных и мышечных клеток, что ведет к нарушению клеточной деполяризации и, как следствие, нарушению проводимости.

Проявления отравления PSP варьируются от чувства онемения и легкого покалывания в области губ до летального исхода. В среднетяжелых и тяжелых случаях к этим ощущениям присоединяется онемение кончиков пальцев кистей рук и стоп, которое в течение 4 – 6 часов распространяется на руки, ноги и шею. Резко затруднены движения. Нарушаются функции черепно-мозговых нервов. Реже встречаются гастроинтестинальные симптомы, которые проявляются в виде тошноты, рвоты, диареи и болей в животе. Сознание пострадавших остается ясным.

В случае летального исхода смерть наступает в результате развития дыхательной недостаточности в течение 2 – 12 часов с момента отравления.

Антидота для токсинов PSP на данный момент не существует.

Безопасный уровень содержания PSP в тканях моллюсков был установлен FDA (Food and Drug Administration) и составляет 80 микрограмм/100грамм продукта.

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

Наборы «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)» представляют собой тест-системы для иммуноферментного анализа в комплекте с необходимыми реагентами, выпускаются серийно и предназначены для экспресс-определения сакситоксина и некоторых его производных в моллюсках.

3. Принцип метода

Принцип работы тест-системы «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)» основан на методе конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). В основе процедуры анализа

лежит взаимодействие антигенов с антителами. Поставляемый в комплекте набора планшет сенсибилизирован антителами «захвата», специфичными к антителам к сакситоксину.

Анализ выполняется следующим образом. Исследуемые и стандартные образцы, препарат, содержащий антитела к сакситоксину и препарат, содержащий конъюгат сакситоксина с ферментом, дозируются в лунки активированного планшета. При инкубации планшета в течение определенного времени молекулы сакситоксина и молекулы конъюгата сакситоксина с ферментом, конкурируя между собой, связываются антителами к сакситоксину. В то же самое время, при инкубации, происходит иммуносорбция этих антител на поверхность лунок планшета за счет их взаимодействия с антителами «захвата» на поверхности

Далее, путем промывки планшета, из лунок удаляются свободные молекулы конъюгата.

После промывки планшета в его лунки дозируется раствор, содержащий субстрат и хромоген. 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 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 450нм, обратно пропорциональна концентрации сакситоксина в исследуемых образцах.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

При выполнении измерений концентрации сакситоксина 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 50мкл;

Одноканальные автоматические пипетки переменного объема 100 – 1000 мкл;

8-канальные автоматические пипетки на 250 мкл;

Колбы мерные вместимостью 50 и 250 $см^3$; ГОСТ1770

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

4.2 Реактивы

Тест-система «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)» для иммуноферментного анализа в стандартной комплектации, включая:

Микротитровальный планшет на 48 лунок (6 стрипов по 8 лунок), сенсибилизированный антителами «захвата»;

Комплект стандартных растворов сакситоксина, объемом 1,3 $см^3$, со следующими концентрациями: 0 мкг/ $дм^3$, 2,5 мкг/ $дм^3$, 5 мкг/ $дм^3$, 10 мкг/ $дм^3$, 20 мкг/ $дм^3$, 40 мкг/ $дм^3$;

Коньюгат сакситоксина с пероксидазой (красная крышка), концентрированный раствор объемом 0,4 $см^3$;

Антитела к сакситоксину (черная крышка), концентрированный раствор объемом 0,4 $см^3$;

Субстрат/хромоген (белая крышка), подкрашенный раствор объемом 6,0 $см^3$;

Стоп-реагент (желтая крышка), содержащий 1 N раствор серной кислоты, объемом 6,0 $см^3$;

Буфер для разбавления конъюгата, антител и растворов образцов, объемом 50$см^3$;

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

Соляная кислота концентрированная ГОСТ 3118-77

Дистиллированная или деионизированная вода ГОСТ 6709

4.3 Вспомогательные устройства и материалы

Блендер или гомогенизатор для измельчения моллюсков;

pH-метр;

Центрифуга напольная;

Водяная баня;

Магнитная мешалка с подогревом;

Тефлоновые мешатели ;

Магнитная удочка;

Воронка стеклянная ГОСТ 25336

Стаканы термостойкие 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 вместе с силикагелем (осушителем) и плотно закройте пакет.

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

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

В случае если величина оптической плотности, измеренной в лунке с нулевым стандартом, не превышает 0,6, это может быть признаком порчи реагентов.

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!** Стандартные растворы содержат сакситоксин. 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 30 минут в 5% растворе гипохлорита натрия с последующим добавлением в раствор ацетона 5% по объему и выдерживанием еще 30 минут. Затем лабораторную посуду следует отмыть обычными лабораторными моющими средствами и промыть дистиллированной водой.

5.5. Стоп-реагент содержит в своем составе серную кислоту. Избегайте контакта, стоп-реагента 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.

Стандартные растворы. Стандартные растворы сакситоксина поставляются готовыми для использования. Величина концентрации сакситоксина, нанесенная на флаконы с растворами дана без учета фактора разбавления исследуемых образцов при пробоподготовке, поэтому для расчета результата определения требуется учитывать фактор разбавления.

Приготовление 0,1 Н раствора соляной кислоты. В мерной колбе объемом 250 $см^3$ 2,1 $см^3$ концентрированной соляной кислоты разводят до 250 $см^3$. Раствор тщательно перемешивают. Срок хранения раствора при комнатной температуре не ограничен.

Приготовление 5 Н раствора соляной кислоты. В мерной колбе объемом 50 $см^3$ 20,6 $см^3$ концентрированной соляной кислоты разводят до 50 $см^3$. Раствор тщательно перемешивают. Срок хранения раствора при комнатной температуре не ограничен.

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 вместе с осушителем, закрыть застежку пакета и поместить на хранение при температуре 2 - 8 °С.

8.3. Пробоподготовка

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

8.3.2. Взвешивают 10 г гомогената, смешивают навеску в стаканчике с 10 $см^3$ соляной кислоты (0,1 Н).

8.3.3. Кипятят в течение 5-ти минут при перемешивании на магнитной мешалке с подогревом (допускается использование водяной бани).

8.3.4. Центрифугируют в течение 10 мин при эффективности 3500 g (иногда супернатант получается мутным, однако это не влияет на результаты последующего анализа)

8.3.5. После центрифугирования проверяют pH супернатанта, если величина pH более 4,0, закисляют раствор с помощью 5Н соляной кислоты.

8.3.6. Отбирают 100 мкл супернатанта, переносят в чистую пробирку (или виалку), с помощью разбавляющего буфера доводят объем раствора до 1 $см^3$ (разбавление в 10 раз)* для анализа используют 50 мкл раствора на лунку планшета

** для проб с высоким уровнем содержания сакситоксина, результат определения, возможно, не будет попадать в линейный диапазон калибровочной кривой или будет находиться вообще вне диапазона калибровки. В этом случае рекомендуется разбавить раствор еще в десять раз разбавляющим буфером и при расчетах принимать во внимание фактор разбавления – 200.*

9. Выполнение измерений

9.1. Предварительные замечания к проведению измерений с помощью тест-системы «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)»:

- 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 всех стадиях инкубации избегайте воздействия прямого солнечного света. При инкубации рекомендуется прикрыть планшет непрозрачным экраном.

9.2 Приготовление раствора коньюгата

Коньюгат сакситоксина с ферментом (флакон с красной крышкой) поставляется в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор коньюгата имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрированного раствора коньюгата осторожно встряхивают содержимое флакона. Для приготовления готового к использованию раствора коньюгата разбавляют концентрат коньюгата буферным раствором, имеющимся в комплекте набора, в отношении 1:11 (например, смешивают 200 мкл концентрата коньюгата с 2 $см^3$ буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов)

9.3 Приготовление раствора антител

Антитела к сакситоксину (флакон с черной крышкой) поставляются в концентрированном виде. Поскольку разбавленный раствор антител имеет ограниченную стабильность, следует готовить раствор по потребности. Перед разбавлением концентрата антител осторожно встряхивают содержимое флакона. Для приготовления готового раствора антител разбавляют концентрат буферным раствором, имеющимся в комплекте набора, в отношении 1:11 (например, смешивают 200 мкл концентрата антител с 2 $см^3$ буфера - данного разведения достаточно для 4-х стрипов).

9.4. Проведение измерений

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

9.4.2. Оставшиеся лунки немедленно упаковывают в фольгированный пакет вместе с осушителем и помещают на хранение при 4°С.

9.4.3. Наносят координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов на разграфленную бумагу как это показано на рисунке (Ст. - стандарты, Пр. - пробы):

Стрип 1	Стрип 2	Стрип 3	Стрип 4	Стрип 5	Стрип 6
Ст. 1	Пр. 3	Пр. 11	Пр. 19	Пр. 27	Пр. 35

Ст. 2	Пр. 4	Пр. 12	Пр. 20	Пр. 28	Пр. 36
Ст. 3	Пр. 5	Пр. 13	Пр. 21	Пр. 29	Пр. 37
Ст. 4	Пр. 6	Пр. 14	Пр. 22	Пр. 30	Пр. 38
Ст. 5	Пр. 7	Пр. 15	Пр. 23	Пр. 31	Пр. 39
Ст. 6	Пр. 8	Пр. 16	Пр. 24	Пр. 32	Пр. 40
Пр. 1	Пр. 9	Пр. 17	Пр. 25	Пр. 33	Пр. 41
Пр. 2	Пр. 10	Пр. 18	Пр. 26	Пр. 34	Пр. 42

9.4.4. Помечают лунки, чтобы идентифицировать их после промывки.

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

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

9.4.7. Добавляют по 50 мкл стандартных и исследуемых растворов в соответствующие лунки. При каждом дозировании используют новый наконечник дозатора.

9.4.8. Осторожно, не касаясь лунок, добавляют по 50 мкл готового разбавленного раствора конъюгата в каждую лунку, согласно рисунку на разграфленной бумаге (см.п. 9.4.3.).

9.4.9. Таким же образом добавляют в каждую лунку по 50 мкл готового разбавленного раствора антител.

9.4.10. Перемешивают вручную, соблюдая осторожность, и оставляют на инкубацию в течение 15-ти минут при комнатной температуре (20 - 25°С)

9.4.11. Выливают жидкость из лунок в раковину, переворачивают рамку планшета и выбивают капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому чистой фильтровальной бумагой.

9.4.12. С помощью промывалки или многоканальной пипетки наполняют лунки по 250 мкл дистиллированной (или деионизованной) воды и снова выливают воду. Выбивают капельки воды как описано выше. Повторяют процедуру промывки лунок водой еще два раза.

9.4.13. Добавляют по 2 капли (по 100 мкл) субстрата/хромогена (флакон с белой крышкой) в каждую лунку.

9.4.14. Перемешивают вручную, соблюдая осторожность, и инкубируют при комнатной температуре (20 – 25 °С) в течение 15 минут в темноте.

9.4.15. Добавляют в каждую лунку по 2 капли (по 100 мкл) стоп-реагента (желтая крышка) и осторожно перемешивают вручную.

9.4.16. В течение 10-ти минут после добавления стоп-реагента измеряют оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм ("бланк" или нулевое считывание по воздуху).

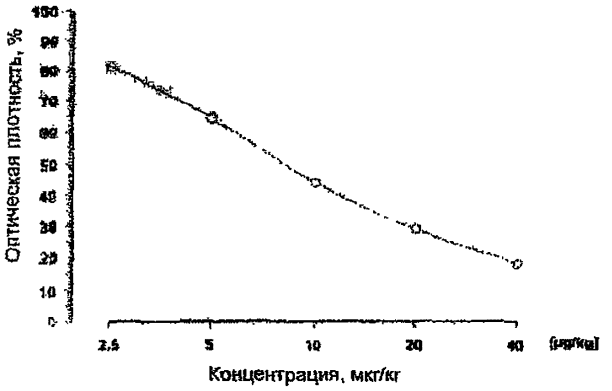
10. Обработка результатов измерений

Средние значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на среднее значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

$$\frac{\text{Оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{Оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов, и соответствующим значениям концентрации сакситоксина в мкг/кг строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат. Калибровочная кривая должна быть почти линейна в диапазоне 5 - 20 мкг/кг

Рисунок 1. Калибровочная кривая, полученная для набора реагентов «RIDASCREEN FAST PSP (Saxitoxin)»



Концентрация сакситоксина в исследуемых растворах в мкг/кг считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

Внимание:

Для того чтобы вычислить концентрацию сакситоксина в исследуемой исходной пробе, величину концентрации, полученную по калибровочной кривой, следует умножить на соответствующий фактор разбавления. При выполнении пробоподготовки и анализа в полном соответствии с приведенной методикой фактор разбавления принимает следующие значения:

Моллюски - 20 (или 200 при повторном разбавлении по п. 8.3.6)

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