

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Председателя
Государственного комитета
по стандартизации
Республики Беларусь
_____ С.А. Ивлев

«_____» _____ 2009 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь
_____ В.И. Качан

«_____» _____ 2009 г.

ВРЕМЕННАЯ МЕТОДИКА
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАЛИТИЧЕСКОГО ЯДА
МОЛЛЮСКОВ (САКСИТОКСИНА) И РОДСТВЕННЫХ ТОКСИНОВ
ВОДОРΟΣЛЕЙ В МОЛЛЮСКАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ «РИДАСКРИН® RSP SC» ПРОИЗВОДСТВА
R-BIOPHARM (ГЕРМАНИЯ)

Срок действия методики с 01.06.2009 г по 01.06.2011 г

СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Показатели прецизионности методики	3
3	Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, материалы	4
4	Метод измерения	5
5	Требования безопасности	6
6	Требования к квалификации оператора	6
7	Условия выполнения измерений	6
8	Подготовка к проведению испытания	7
9	Выполнение измерений	8
10	Обработка результатов измерений	9

1 Область применения

Методика предназначена для количественного определения паралитического яда моллюсков (сакситоксина) и родственных токсинов водорослей в моллюсках методом твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «Ридаскрин® Fast PSP SC» (Ridascreen® Fast PSP SC) производства фирмы R-Biopharm (Германия).

Фикотоксины, продуцируемые различными видами микроводорослей, а также цианобактериями, способны накапливаться в моллюсках, питающихся придонными отложениями. Промысловые двустворчатые моллюски служат в свою очередь передаточным звеном перехода этих контаминантов к плотоядным организмам. Попадая в организм человека с пищей, фикотоксины вызывают отравления. Одной из групп токсинов, вызывающих наибольшую опасность для здоровья человека, является группа PSP (паралитический яд моллюсков). Сакситоксин, гониаутоксин, декарбамоилсакситоксин – основные представители группы PSP. Высокая токсичность данных контаминантов, возможные последствия воздействия этих веществ на организм человека требуют осуществления строгого контроля содержания фикотоксинов в морепродуктах.

В данной методике содержание токсинов группы PSP определяется с помощью автоматического микропланшетного фотометра и с применением набора для количественного определения сакситоксина методом конкурентного иммуоферментного анализа «Ридаскрин® RSP SC» производства R-Biopharm (Германия).

Нижний предел обнаружения сакситоксина составляет 50 мкг/кг.

2 Показатели прецизионности методики

Относительные значения показателей прецизионности (повторяемости и воспроизводимости) и относительные значения пределов повторяемости и воспроизводимости при доверительной вероятности $P=0,95$ МВИ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости, воспроизводимости и относительные значения пределов повторяемости и воспроизводимости МВИ при доверительной вероятности $P=0,95$

Анализируемый объект	Метрологические параметры, $P = 0,95$, $n = 7$				
	Нижний предел обнаружения мкг/кг	Показатель повторяемости $\sigma_r, \%$	Показатель внутрилабораторной воспроизводимости $\sigma_R, \%$	Предел повторяемости $r, \%$	Предел воспроизводимости $R, \%$
Мидии	50,0	5	8	14	23
Гребешки	50,0	6	9	17	25

3 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1 Средства измерений

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более $\pm 5\%$)		
Весы лабораторные общего назначения не ниже 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г и ценой деления 0,001 г		ГОСТ 24104
Иономер универсальный ЭВ-74 в комплекте с электродами, диапазон измерений от 1 рН до 19 рН, с пределом допускаемой основной погрешности $\pm 0,05$ рН		
Плитка электрическая ЭИЧ 1-1.2/220		ГОСТ 1493-83
Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 20-200 мкл с шагом 1,0 мкл и точностью дозирования не более $\pm 2\%$		
Автоматический пипет-дозатор с переменным объемом 100-1000 мкл с шагом 5,0 мкл и точностью дозирования не более $\pm 1,5\%$		
Многоканальный пипет-дозатор с переменным объемом 50-250 мкл с шагом 1,0 мкл и точностью дозирования не более $\pm 2\%$		
Пробирки стеклянные, вместимостью 10 см ³ или 5 см ³		ГОСТ 1770
Колбы мерные, вместимостью	100 см ³	ГОСТ 1770
	1000 см ³	
Колбы конические со шлифом, вместимостью 50 см ³ или 100 см ³		ГОСТ 23932
Цилиндр мерный, вместимостью	100 см ³	ГОСТ 1770
Одноразовые наконечники для автоматических пипет-дозаторов		
Штатив для пробирок		

3.2 Вспомогательные устройства и оборудование

Микротитровальный планшет (6 стрипов по 8 лунок)		
Гомогенизатор тканей или блендер		ГОСТ 15906
Магнитная мешалка с подогревом		
Термостат, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 до плюс 25°C		
Шуттель-аппарат (шейкер), обеспечивающий скорость вращения 2000 об/мин		
Плитка электрическая ЭИЧ 1-1.2/220		ГОСТ 1493-83

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 до плюс 8°C

Стерильные фильтры, размер пор 0,2 мкм

Скотч

Бумага фильтровальная

ГОСТ 12026

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая центробежное ускорение 29400 м/с² (относительное центробежное ускорение до 3000 g) и по возможности охлаждение до 10°C

Допускается применение другой аппаратуры и посуды с аналогичными характеристиками.

3.3 Реактивы, материалы и растворы

Вода дистиллированная

ГОСТ 6709-72

Кислота соляная концентрации 0,1 Н

Тест-система «Ридаскрин® Fast PSP SC» (Ridascreen® Fast PSP SC) в стандартной комплектации, включающая:

Фирма
R-Biopharm
(Германия)

- микротитровальный планшет (6 стрипов по 8 лунок)

- градуировочный раствор сакситоксина концентрации 0 мкг/кг (нулевой градуировочный раствор)*

- концентрат конъюгата

- концентрат антител

- раствор субстрата/хромогена

- стоп-реагент (1н H₂ SO₄)

- буфер для разведения проб, концентрата конъюгата антител

*В наборе реагентов содержится только нулевой градуировочный раствор. Остальные необходимые для построения градуировочной кривой значения V/V₀ приводятся в сертификате, имеющемся в каждом отдельном наборе. Эти данные необходимо использовать для расчета результата измерения в соответствии с п. 10.2.

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства по точности, не уступающие рекомендуемым.

4 Метод измерения

Суть метода заключается в специфическом взаимодействии антигена (сакситоксина) с антителами, адсорбированными на планшете, приводящем к образованию комплекса антиген-антитело, последующей окраске комплекса с помощью субстрата и хромогена и измерении оптической плотности полученного раствора, которая зависит от наличия сакситоксина в исследуемом образце.

5 Требования безопасности

При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007, требования пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.018 и электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019, а также требования, указанные в технической документации на весы, спектрофотометр и вспомогательные устройства.

Стоп-реагент содержит серную кислоту, при работе с ним необходимо использовать средства индивидуальной защиты (очки и перчатки). При попадании стоп-реагента на кожу или слизистые оболочки – немедленно промыть их большим количеством воды.

6 Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалистов, имеющих высшее или среднее специальное образование, владеющих техникой постановки иммуноферментного анализа и освоивших метод в процессе стажировки.

7 Условия выполнения измерений

7.1 При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха от + 20 до + 25°C;
- атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C;
- напряжение питающей сети (220 ± 10) В;
- частота переменного тока (50 ± 1) Гц

7.2 Хранение реагентов, входящих в состав тест-системы «Ridascreen® Fast PSP SC» осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C. Не допускается замораживание реагентов.

7.3 Неиспользованные стрипы (лунки) следует хранить в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в плотно закрытом оригинальном фольгированном пакете вместе с имеющимся там осушителем.

7.4 Замена отдельных реагентов на реагенты из тест-наборов других партий не допускается.

7.5 Раствор субстрата/хромогена светочувствителен, поэтому следует избегать прямого попадания на него солнечных лучей.

7.6 Не следует использовать реагенты, имеющие следующие признаки распада:

- голубая окраска красновато окрашенного раствора субстрата/хромогена до внесения в лунки;
- оптическая плотность меньше 0,6 ($E_{450nm} < 0,6$) для нулевого градуировочного раствора.

8 Подготовка к проведению испытания

8.1 Отбор образцов

Отбор проб для исследования проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться при температуре от плюс 2 до плюс 8°C в течение 3-5 дней.

8.2 Предварительная подготовка тест-системы

Перед началом работы тест-систему извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25°C) в течение не менее 30 минут.

8.3 Приготовление раствора конъюгата

Поставляется в виде концентрата. Поскольку стабильность восстановленного раствора конъюгата ограничена, следует разводить только требуемое для реакции количество конъюгата. Перед отбором концентрата следует аккуратно перемешать концентрат. Для получения рабочего раствора необходимо перед использованием развести концентрат буфером в пропорции 1:11 (1 + 10) (напр., 200 мкл концентрата + 2,0 см³ буфера, достаточно для 4 стрипов).

8.4 Приготовление раствора антител

Поставляется в виде концентрата. Поскольку стабильность восстановленного раствора антител ограничена, следует разводить только требуемое для реакции количество антител. Перед отбором концентрата следует хорошо перемешать концентрат. Для получения рабочего раствора необходимо перед использованием развести концентрат буфером в пропорции 1:11 (1 + 10) (напр., 200 мкл концентрата + 2,0 см³ буфера, достаточно для 4 стрипов).

8.5 Подготовка проб моллюсков

8.5.1 Удалив раковины, промыть моллюски водой и гомогенизировать.

8.5.2 К 10 г гомогенизированных моллюсков добавить 10 см³ 0,1 Н HCl и гидролизовать (варить) при постоянном помешивании в течение 5 минут.

8.5.3 Центрифугировать в течение 10 мин при 3500 г и температуре 4°C (возможное помутнение надосадочного слоя не оказывает влияние на результат исследования).

8.5.4 Проверить и отрегулировать уровень pH. Уровень не должен превышать 4,0, при необходимости отрегулировать с помощью 5 н HCl.

8.5.5 100 мкл надосадочной жидкости разводят буфером для разведения проб до 1 см³ (разведение в пропорции 1:10).

*Для высоко загрязненных проб, находящимся не в линейной части графика, рекомендуется дальнейшее повторное разведение буфером для разведения в пропорции 1:10. Коэффициент разведения повышается таким образом с 20 до 200 и должен учитываться при подсчете результатов.

8.5.6 Полученный раствор используют для выполнения ИФА

8.6. Подготовка измерительной аппаратуры

8.6.1 По формуле 1 рассчитывают необходимое количество лунок (N)

$$N = C + П; \quad (1)$$

где С – количество градуировочных растворов,

П – количество исследуемых проб,

N – количество лунок, необходимое для исследования.

8.6.2 Извлекают микротитровальный планшет из фольгированного пакета, отделяют необходимое количество лунок и помещают их в рамку микротитровального планшета. Остальные лунки сразу помещают в фольгированный пакет с осушителем, закрывают и хранят в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

8.6.3 Размечают координаты рабочих градуировочных растворов и проб, используя приведенный ниже рисунок 1.

Рисунок 8.1 – Схема расположения лунок для рабочих градуировочных растворов и проб

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	С-1	П-8	П-16	П-24								
B	П-1	П-9	П-17	П-25								
C	П-2	П-10	П-18	П-26								
D	П-3	П-11	П-19	П-27								
E	П-4	П-12	П-20	П-28								
F	П-5	П-13	П-21	П-29								
J	П-6	П-14	П-22	П-30								
G	П-7	П-15	П-23	П-31								

где П-1, П-2,П-31 – исследуемые пробы,

1,2,3.....12 – номера стрипов в планшете,

A, B, C.....G – обозначения лунок в стрипах.

9 Выполнение измерений

9.1 Перед постановкой иммуноферментной реакции необходимо встряхнуть все компоненты тест-системы (градуировочный раствор, стоп-реагент) в течение 10-15 сек.

9.2 Вносят 50 мкл нулевого градуировочного раствора в соответствующую лунку микротитровального планшета.

9.3 Вносят 50 мкл растворов проб, подготовленных по п. 8.5, в соответствующие лунки микротитровального планшета. Для градуировочного раствора и каждой пробы следует использовать новый наконечник для пипет-дозатора.

9.4 В каждую лунку вносят по 50 мкл раствора конъюгата.

9.5 В каждую лунку вносят по 50 мкл раствора антител.

9.6 Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают содержимое. Встряхивание, постукивание планшетом по столу не допустимы.

9.7 Заклеивают планшет скотчем и инкубируют при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25°C) в течение 15 минут (± 1 минута) в темноте, накрыв планшет непрозрачным экраном или поместив в ящик стола, или любым другим способом, исключая попадание света на планшет во время инкубации. При невозможности соблюдения указанного температурного режима в помещении, инкубацию проводят в термостате при температуре от плюс 20 до плюс 25°C.

9.8 По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета, капельки жидкости, оставшиеся в лунках, удаляют путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой.

9.9 В каждую лунку вносят по 250 мкл дистиллированной воды (для этого желательно использовать многоканальный пипет-дозатор), и повторяют процедуру, описанную в п. 9.8. В процессе работы следует избегать высыхания лунок в перерывах между отдельными этапами работы и увеличения перерывов. Точность результатов тестов зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует точно соблюдать процесс промывки.

9.10 Процедуру промывки лунок (п.п.9.8 – 9.9) повторяют еще два раза. После чего планшет промокают на чистом листе фильтровальной бумаги.

9.11 В каждую лунку вносят из флакона-капельницы по 100 мкл раствора субстрата/хромогена, предварительно нагретого до комнатной температуры.

9.12 Аккуратными круговыми движениями перемешивают содержимое планшета.

9.13 Заклеивают планшет скотчем и инкубируют при комнатной температуре (от плюс 20 до плюс 25°C) в течение 15 минут (± 1 минута) в темноте (накрыв планшет непрозрачным экраном или поместив в ящик стола, или любым другим способом, исключая попадание света на планшет во время инкубации). При невозможности соблюдения указанного температурного режима в помещении инкубацию проводят в термостате при температуре от плюс 20 до плюс 25°C.

9.14 В каждую лунку вносят из флакона-капельницы по 100 мкл стоп-реактанта и аккуратно круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок планшета.

9.15 В течение не более 10 минут после добавления стоп-реактанта измеряют оптическую плотность в каждой лунке на автоматическом микропланшетном фотометре при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

10 Обработка результатов измерений

10.1 Построение градуировочного графика и расчет результата измерения следует проводить с помощью специального программного обеспечения «RIDA® Soft», разработанного

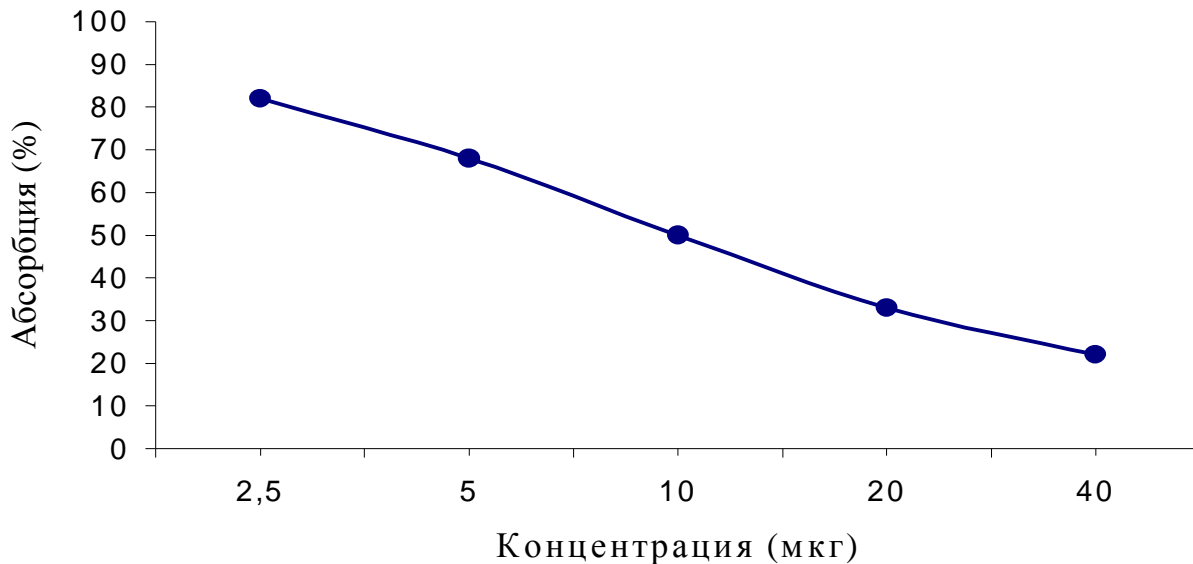
фирмой R-Biopharm (Германия) специально для обработки результатов измерений, полученных с помощью тест-систем «Ридаскрин®» («Ridascreen®»).

10.2 Для расчета результата измерений в программное обеспечение «RIDA® Soft» вводят значения оптической плотности, измеренные для нулевого градуировочного раствора, а также значения величин процентов связывания В/В₀ для градуировочных растворов 2-7 (с концентрацией 2,5; 5; 10; 20 и 40 мкг/л соответственно), представленные в сертификате, имеющемся в каждом отдельном наборе тест-системы «Ридаскрин® PSP SC». На основании этих данных программное обеспечение автоматически осуществляет расчет и построение градуировочного графика, пример которого представлен на рисунке 2, а также расчет содержания сакситоксина в исследуемой пробе.

Для получения действительной концентрации сакситоксина в пробе необходимо умножить полученное значение на соответствующий фактор разведения. При выполнении работ в соответствии с приведенной методикой фактор разбавления имеет следующие значения

Моллюски.....20 (либо 200)

Стандартная кривая



50 % ингибирования = 10,1

Рисунок 2 – Пример построения градуировочной прямой

Методика разработана лабораторией химии пищевых продуктов отдела физико-химических исследований ГУ «РНПЦ гигиены» МЗ РБ.

Разработчики:

Зав.отделом ФХИ ГУ «РНПЦ гигиены», к.х.н.

Н.И. Марусич

Зав. лабораторией ХПП ГУ «РНПЦ гигиены», к.х.н.

О.В. Шуляковская

Ст.н.с. лаборатории ХПП ГУ «РНПЦ гигиены», к.х.н.

Е.В. Вашкевич