

РОСКОММССИЯ ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНИКАМИ ПРИ МИНСЕЛЬХОЗЕ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МИКРОКОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ
В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

ЧАСТЬ XIV-я

Москва - 1984

Настоящие методические указания предназначены для санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских учреждений Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР и лабораторий других Министерств и ведомств, занимающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биоспрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

Срок действия временных методических указаний устанавливается до утверждения гигиенических регламентов.

Методические указания апробированы и рекомендованы в качестве официальных группой экспертов при Госкомиссии по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при МСХ СССР.

Методические указания согласованы и одобрены отделом перспективного планирования санэпидслужбы ИМПиТМ им. Марциновского Е.И. и лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ :

Л.Г. Александрова, Д.В. Гиренко, А.А. Калинина (секретарь),
М.А. Клисенко (председатель), Г.И. Короткова, Г.А. Ххолькова (зам. председателя), В.Е. Кривенчук.

"УТВЕРЖДА"**
**Заместитель Главного
Государственного
Санитарного врача СССР
А. И. Зайченко**
2798-83.
"2" мая 1983г.

ВРЕМЕННИК

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению остаточных количеств биопрепарата
вирин-КШ на растительных объектах иммунотиро-
центным методом

Настоящие методические указания распространяются на опре-
деление содержания во внешней среде полиэдров вириуса ядерного
полиэдрова кольчатого мелкокръпда (ВИП КШ), являющегося дейст-
вующим началом вириусного инсектицидного препарата вирин-КШ
при разработке санитарных регламентов, при санитарном контроле,
а также в научных исследованиях.

I. Основные положения

В основе иммунотироцентного метода выявления микроор-
ганизмов лежит специфическая реакция взаимодействия антигена с
антителами, которая при условии окраски ингредиентов реакции,
вывляется в виде специфического свечения комплекса антиген-
антитело в люминесцентном микроскопе.

Для выявления микроколичеств препарата вирин-КШ во внеш-
ней среде применяется непрямой вариант ИФ-метода с использова-
нием кроличьей специфической иммунной сыворотки и стандартной
меченой флуорохромом ослиной сыворотки против глобулинов кро-
лика.

Остаточные количества оакуловирусных инсектицидов во
внешней среде проводят выявлением полиэдров (телец-включения)
этих вириусов, поскольку непосредственно вириусные частицы весь-
ми лабильны, легко разрушаются под влиянием различных факторов.
Поэтому для выявления полиэдров (антигена) готовят специфиче-
скую антиполиэдровую иммунную сыворотку. Реакция выявляется под

микроскопом в виде ярко-зеленого свечения полиэдров, особенно их соодка.

1.1. Характеристика анализируемого инсектицида

Вирин-КШ - вирусный энтомопатогенный (инсектицидный) препарат. Предназначается для борьбы с гусеницами кольчатого шелкопряда. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдрова из семейства бакуловирусов, содержащийся в препарате в виде полиэдров. Полиэдры - вирусные тельца-включения, образуются в клетках тканей больных гусениц, представляют собой многогранники из кристаллизованного белка, содержащие от десятка до нескольких сотен вирусных частиц. Размеры полиэдров 1-3 мк. Препарата представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине с титром не менее 1·10⁶ полиэдров/мл. Применяется путем опрыскивания плодовых деревьев против гусениц разных возрастов. Норма расхода препарата 100-200 мл на 1 га сада с добавлением поверхносного активного вещества ОП-7 из расчета 0,6-4,0 г на 10 л воды.

1.2. Метрологическая характеристика метода

Данным методом можно определить количество полиэдров в субстрате в препаратах от 0,5·10⁶ и более в мл.

1.3. Избирательность метода

При условии применения качественной гипериммунной антиполиэдренной сыворотки и устранения неспецифического свечения в исследуемых препаратах метод расценивается как специфичный и высокочувствительный, а также как экспресс-метод. Метод можно использовать для выявления полиэдров ВЯП КШ на растительных объектах окружающей среды при разработке гигиенических регламентов, а также в научных исследованиях для целей идентификации этого вида вируса.

2. Отбор проб

Проводят согласно "Унифицированным правилам отбора проб сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и объектов

окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов", утвержденным МЗ СССР 21.03.1979 №2051-79, приложение 3 (3.4.1.7.2 - 3.4.7.2.5 способ отбора проб "ОШ" (отбор штук) и "ПД" (отбор по диагонали) различных видов древесной и травяной растительности). Для дальнейшей работы пробы хранят при температуре бытового холодильника +4°C.

С целью выявления полиэдров на поверхности объектов проводят смывы с них. Пинцетом берут из заранее приготовленных стерильных пакетов марлевую салфетку (5x5 см), смачивают ее в физиологическом растворе (0,15% NaCl) с pH 7,4-7,6, отжимают и тщательно протирают ее исследуемую площадь в 100 см², (т.е. смыв с поверхности плодов, листьев, коры деревьев и проч.), переносят салфетку в колбу со 100 мл физиологического раствора, энергично встряхивают 5 мин, отжимают салфетку пинцетом и удаляют ее. Смыв фильтруют через 3 слоя марли для удаления грунтовых частиц, после чего центрифугируют при 5 000 об/мин 30 минут. Осадок ресуспенсионируют в 1 мл дистиллированной воды. Если проба состоит из мелких объектов (трава, листья, ягоды и др.), в таком случае готовят навеску 200-300г, делают нарезку из мелких листьев, помещают в колбу или широкогорлые банки, добавляют 200-300 мл физиологического раствора с pH 7,6, ставят на магнитную мешалку или энергично встряхивают 10-15 мин, отстаивают 10 мин, надосадок центрифугируют при 5 000 об/мин 30 мин. Осадок ресуспенсионируют в 1 мл дистиллированной воды. Для дальнейших работ пробы хранят при +4°C до 3-х суток.

Площадь поверхности круглых плодов, например яблок, определяют по формуле $S = \pi D^2$, предварительно измерив диаметр яблок. Площадь поверхности листьев определяют следующим образом: обводят на бумаге контур листка, по крайним точкам контура строят прямоугольник и измеряют его площадь. Определяют вес прямоугольника и вырезанного контура. Из полученной пропорции вычисляют площадь листка.

3. Реактивы и материалы

1. Люминесцирующая ослиная сыворотка против глобулинов кролика, изготовленная институтом им. Гамалея г. Москва.
2. Иммунная специфическая кроличья сыворотка против полиэдров ВЯП ОШ.

3. Нефторесцирующее иммерсионное масло или диметилфталат.
4. Дистиллированная вода.
5. Физиологический раствор (0,15M NaCl) pH 7,4-7,6.
6. Апетон, ГОСТ 2603-71
7. Мертиолят натрия или борная кислота, ГОСТ 9656-61.
8. Синька Эванса.
9. Альбумин Трейнда.
10. Антибиотики (пенициллин, стрептомицин, 5-нигрооксихинолин).

4. Приборы и посуда

1. Лъминесцентный микроскоп марки МЛ-2 или МЛ-3.
2. Центрифуга ЦЛС-1 или ЦЛн-1 и др..
3. Пипетки градуированные на 1,0 и 5,0 мл, ГОСТ 1770-51.
4. Чашки Петри.
5. Предметные стекла.
6. Пробирки бактериологические.
7. Химические стаканы на 250 мл, ГОСТ 6236-52.
8. Пакеты марлевых салфеток 5x5 см.
9. Камера Горяева.

5. Подготовка к определению

Как указывалось выше основными реагентами, необходимыми для выявления антигена непрямым вариантом ИФ-метода, являются иммунные сыворотки, а именно - меченая ФИТЦ сыворотка против глобулинов кролика (изготовленная в институте им. Гамалея Г. Москва) и специфическая иммунная сыворотка против полиэдров в данном случае ВИП КШ. В настоящий момент антиполиэдральные сыворотки не изготавливаются пока централизованно. Для производства анализа их можно получить у авторов методик, у авторов препарата, а также Минздрав может заказать ее изготовление в институте им. Гамалея.

Для других лабораторий, работающих с бакуловирусами, рекомендуется самостоятельно изготовить антисыворотку к полиэдрам из препарата вирии-КШ по следующей схеме.

Получение антигенов для иммунизации животных проводили непосредственно из препарата инсектицида вирии-КШ, но лучше получать его из больных гусениц соответствующего вида. Очистку и

концентрацию вели по В.И.Барановскому и С.А.Бахвалову, 1974.*

За сутки до введения животным взвесь полиэдров обрабатывают антибиотиками из расчета 500-1000 ЕД стрептоцидина и пенициллина, 20 мкг/мл 5-нитрооксихинолина. Перед иммунизацией взвесь стерильно отмывают от антибиотиков, полиэдры ресусцидируют в стерильном физиологическом растворе. Титр инокулята обычно $1 \cdot 10^9$ пдр/мл.

Наличие специфической гипериммунной сыворотки является главным условием хорошего воспроизведения ИФ-метода.

Приготовленным антигеном иммунизируют беспородных крыс массой 2,5-3 кг. Высокотитрованные сыворотки получают по следующей схеме иммунизации: трехкратные с интервалом в три дня подкожные обкалывания с введением соответственно 2,0, 4,0, 6,0 мл антигена в смеси 1:1 с адьювантом Фрейнда. Через две недели реиммунизация 6,0 мл смеси подкожно. Забор крови через неделю после реиммунизации.

Сыворотку хранили с консервантом (мертиолят 1:10000) при -20°C , либо лиофилизировали. Высушившая сыворотка сохраняет активность до 5 лет при хранении $+4^{\circ}\text{C}$.

6. Проведение определения

Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечен прямоугольник площадью 4 см². Затем на стекло микропипеткой наносят 0,02 мл исследуемой супспензии, равномерно распределяют ее по отмеченной площади. Препарат подсушивают на воздухе и фиксируют в ацетоне 15 мин. Для гашения неспецифического свечения используют синьку Эванса в разведении 1:10000 дистиллированной водой. Время обработки препарата синькой 10 мин. Затем препарат промывают проточной водой и подсушивают, после чего препарат должен иметь слабо голубую окраску. Затем на препарат наносят иммунную сыворотку против полиэдров ВЯП КШ, преварительно разведенную 1:10 физиологическим раствором, помещают во влажную камеру на 20 мин при 37°C , затем смывают проточной водой, подсушивают на воздухе,

* Барановский В.И., Бахвалов С.А. в кн.: "Вирусы насекомых", "Наука", Новосибирск, 1974, 8-11

после чего наносят ослинью сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Выдерживают в термостате при 37°C 20 мин во влажной камере с последующей промывкой в проточной воде. Подсущенный препарат готов к просмотру в люминесцентном микроскопе. Препарат просматривают под иммерсией, используя нефлюресцирующее масло, объектив 90, окуляр 8.

Полиэдры в препарате выявляются по специальному яркому, желто-зеленому свечению их ободков на общем красноватом фоне препарата.

Контроли: а) препараты, приготовленные по той же схеме, но без обработки специфической иммунной сывороткой; б) препараты, обработанные обеими сыворотками, но заведомо не содержащие выявляемых полиэдров. В контрольных препаратах свечение полиэдров не выявляется.

7. Обработка результатов анализа

Кроме визуального определения полиэдров (качественный анализ), можно произвести количественный анализ, т.е. определение числа полиэдров на единицу изучаемой площади. Для этого необходимо преварительно определить площадь поля зрения при данном увеличении или площадь квадрата окулярной сетки (в случае использования окуляра с сеткой). Эти измерения проводят с помощью объект-микрометра.

Подсчет числа полиэдров ведется по формуле $\frac{a \cdot \sqrt{S}}{y \cdot \sqrt{f}}$,

где

M - количество полиэдров в 1 мл исследуемой суспензии (концентрат смыва со 100 см^2 поверхности);

a - среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

S - площадь исследуемого мазка в мм^2 ;

y - объем нанесенной суспензии в мл;

f - площадь квадрата окулярной сетки в мм^2 .

Подсчет ^и полиэдров проводят в 100 и более квадратах окулярной сетки.

Пример: для анализа взяли листья с обработанного препаратом дерева, определили среднюю площадь их поверхности - 100 см^2 .

Сделали смыв с листьев и обработали его способом, описанным в п.3. Приготовленный препарат покрасили по непрямому методу Кунса, как описано в п.7.

При просмотре препарата в люминесцентном микроскопе подсчитали общее количество полизадров в 150 квадратах окулярной сетки $\Sigma 150=320$, отсюда $a = \frac{320}{150} = 2,13$.

Площадь мазка известна $\delta = 20\text{мм} \times 20\text{мм} = 400\text{мм}^2$. Сторона квадрата окулярной сетки равна 0,0062 мм (определенна с помощью объектив-микрометра), т.о., площадь квадрата окулярной сетки $f = (0,0062)^2 = 0,00004 \text{мм}^2$. Объем нанесенной на стекло суспензии $u = 0,02 \text{ мл.}$

Таким образом $N = \frac{a \cdot \delta}{u \cdot f} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$,

т.е. на 100 см^2 обследованной площади приходится $1,1 \cdot 10^9$ полизадров, а на 1 см^2 площади $- 1,1 \cdot 10^7$.

9. Требования безопасности

Соблюдаются требования безопасности, обычно рекомендуемые для работы с микроорганизмами IV группы (условно патогенные).

9. Разработчики.

Васильева В.Л., Трусов В.И. - Киевский НИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В.Громашевского

СОДЕРЖАНИЕ

I. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИЗМЕРЕНИЮ КОНЦЕНТРАЦИЙ В
ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ:

	стр.
Агелона и ситрина	3
Актеллика и примисида	8
Алара	13
Бензоилпропиатла и этилового эфира N-3,4-дихлор- фенилаланина	17
Беномида и БМК	22
Бентазона	30
Биоресметрина	35
Болстара	40
Бронокота	48
Бутилкаптакса	52
Бутокарбоксима	59
Гидрела	63
ГМК-Na	66
Даконила	70
Диазинона, эптами, гамма-изомера ГХГ, фенмединифама, ленапила, фосфамида и пиразона	77
Дигидрела	89
Дикват	93
Зоокумагина	97
Карбофурана	100
Крочетона	104
Менида и 3-хлор-4-метиляпилина	108
Метазина и компонентов тиробицидной смеси "карагард" .	113
Митака	118
Офунака	124
Пликтрана	128
Ратиндана	132
Раундана	138
Роврала	143
Розалина	148
Синтетических пяретроидов (амбуш, декс, рипкорд, суминидин)	154
Стомпа	161

	стр.
Сумилекса	166
Томилона	173
Триморфамида	180
Фекама-трибуфона	186
Фталана	192
Препарата 242 и металлилхлорида (МХ)	200
Хостаквика	206
Эдила	210
 П. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЬЙ СРЕДЕ	
 Хлорогранические пестициды	
Методические указания по определению остаточных количество гексахлорана (линдана) в сушеном картофеле полярографическим методом	218
 Фосфорогранические пестициды	
Методические указания по определению дифоса (абата) в продуктах животного происхождения методом тонкослойной хроматографии	218
Методические указания по определению метафоса, фосфамида и хлорофоса в сушеных овощах и плодах (картофель, морковь, петрушка, яблоки, груши, слива) методами тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии	223
Временные методические указания по определению метилнитрофоса, фенитрооксона и п-нитрокрезола в лесной растительности и почве тонкослойной хроматографией	241
Методические указания по определению трихлорметафоса- З и его метаболитов в биоматериале методом газо- жидкостной хроматографии	252

Автоодержание пестицида	стр.
Методические указания по хроматографическому определению буторакбоксона в почве, воде и растительном материале	260
Методические указания по определению 1МК-На, гидрела, дигидрела методом спектрофотометрии в воде, растительном материале (томаты, блоки, свекла).	267
Временные методические указания по определению лонтре-ла в воде, почве и растениях методом газо-жидкостной хроматографии	275
Временные методические указания по определению павлана методом газо-жидкостной хроматографии в почве, табаке и в табачном дыме	285
Временные методические указания по определению розалина в растительных объектах, воде и почве хромато-спектрофотометрическим методом	296
Методические указания по определению трефлана в воде, почве, томатах и капусте методом УФ-спектро-Фотометрии с использованием тонкослойной хроматографии	305
Методические указания по фотометрическому определению эдина в воде, растительном масле, семенах подсолнечника, траве	311
Методические указания по определению остаточных количеств пинеба в сушених овощах и плодах фотометрическим методом	317
Биопрепараты	
Временные методические указания по определению остаточных количеств препарата вирин-диприона на растительных объектах ИФ-методом	325
Временные методические указания по определению остаточных количеств биопрепарата вирин-КШ на растительных объектах иммуно-флуоресцентным методом.	331