

ГОСКОМИССИЯ ПО ХИМИЧЕСКИМ СРЕДСТВАМ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ,  
БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ И СОРНЯКАМИ 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 биопрепаратов 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. Хохоль-  
кова ( зам. председателя), В.Е. Кривенчук.

**"УТВЕРЖДАЮ"**

Заместитель Главного  
Государственного  
Санитарного врача СССР  
А. И. Заиченко

2798-83.

"12" мая 1983г.

**ВРЕМЕННЫЕ****МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

по определению остаточных количеств биопрепарата  
вириин-КШ на растительных объектах иммунофлюорес-  
центным методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания во внешней среде полиэдров вируса ядерного полиэдроза кольчатого мелкопряда (ВМП КШ), являющегося действующим началом вирусного инсектицидного препарата вириин-КШ при разработке санитарных регламентов, при санитарном контроле, а также в научных исследованиях.

**I. Основные положения**

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

Для выявления микроколичеств препарата вириин-КШ во внешней среде применяется непрямой вариант ИФ-метода с использованием кроличьей специфической иммунной сыворотки и стандартной меченой флуорохромом ослиной сыворотки против глобулинов кролика.

Остаточные количества оокуловиральных инсектицидов во внешней среде подлежат выявлению полиэдров (телец-включений) этих вирусов, поскольку непосредственно вирусные частицы весьма лабильны, легко разрушаются под влиянием различных факторов. Поэтому для выявления полиэдров (антигена) готовят специфическую антиполиэдральную иммунную сыворотку. Реакция выявляется под



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  $+4^{\circ}\text{C}$ .

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 (0,15M NaCl) с pH 7,4-7,6, отжимают и тщательно протирают ею исследуемую площадь в  $100\text{ см}^2$ , (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 грубых частиц, после чего центрифугируют при 5 000 об/мин 30 минут. Осадок ресуспендируют в 1 мл дистиллированной воды. Если проба состоит из мелких объектов (травы, листья, ягоды и др.), в таком случае готовят навеску 200-300г, делают нарезку из мелких листьев, помещают в колоу 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 ресуспендируют в 1 мл дистиллированной воды. Для дальнейших работ пробы хранят при  $+4^{\circ}\text{C}$  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. Имунная специфическая кроличья сыворотка против полиэдров ВЯП КШ.

3. Нефтореспирующее 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. Адъвант Фрейнда.
10. Антибиотики (пенициллин, стрептомицин, 5-нигрооксихинолин).

#### 4. Приборы и посуда

1. Люминесцентный микроскоп марки МЛ-2 или МЛ-3.
2. Центрифуга ШЛС-1 или ШН-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 5х5 см.
9. Камеры Горяева.

#### 5. Подготовка к определению

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

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

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

концентрации вели по В.М.Барановскому и С.А.Бахвалову, 1974.\*

За сутки до введения животным взвесь полиэдров обрабатывают антибиотиками из расчета 500-1000 ЕД стрептомицина и пенициллина, 20 мкг/мл 5-нитрооксихинолина. Перед иммунизацией взвесь стерильно отмывают от антибиотиков, полиэдры ресуспендируют 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 кроликов 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  $-20^{\circ}\text{C}$ , либо лиофилизировали. Висушенная 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  $4 \text{ см}^2$ . Затем на стекло микропипеткой наносят 0,02 мл исследуемой суспензии, 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 обрасотки 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 ВП КШ, предварительно разведенную 1:10 физиологическим раствором, помещают во влажную камеру на 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ , затем смывают проточной водой, подсушивают на воздухе.

---

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

после чего наносят ослиную сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Выдерживают в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  20 мин. во влажной камере с последующей промывкой в проточной воде. Подсушенный препарат готов к просмотру в люминесцентном микроскопе. Препарат просматривают под иммерсией, используя нефлюоресцирующее масло, объектив 90, окуляр 8.

Полиэдры в препарате выявляются по специфическому 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 превратить 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 
$$M = \frac{a \cdot S}{y \cdot S_0},$$

где

$M$  — количество полиэдров в 1 мл исследуемой суспензии (концентрация смыва со  $100 \text{ см}^2$  поверхности);

$a$  — среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

$S$  — площадь исследуемого мазка в  $\text{мм}^2$ ;

$y$  — объем нанесенной суспензии в мл;

$S_0$  — площадь квадрата окулярной сетки в  $\text{мм}^2$ .

Подсчет полиэдров проводят в 100 и более квадратах окулярной сетки.

Пример: для анализа взяли листья с обработанного препаратом дерева, определили среднюю площадь их поверхности —  $100 \text{ см}^2$ .



Сделали срыв 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 полиаднов в 150 квадратах окулярной сетки  $\Sigma 150=320$ , отсюда  $a = \frac{320}{150} = 2,13$ .

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

Таким образом  $M = \frac{a \cdot f}{y \cdot f_s} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$ ,

т.е. на  $100\text{ см}^2$  исследованной площади приходится  $1,1 \cdot 10^9$  полиаднов, а на  $1\text{ см}^2$  площади —  $1,1 \cdot 10^7$ .

#### 9. Требования безопасности

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

#### 9. Разработки.

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

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

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

	стр.
Агелона и ситрина . . . . .	3
Актеллика и примипида . . . . .	8
Алара . . . . .	13
Бензоилпропэтила и этилового эфира N-3,4- дихлор- фенилаланина . . . . .	17
Беномила и БМК . . . . .	22
Бентазона . . . . .	30
Биоресметрина . . . . .	35
Болстара . . . . .	40
Бронокота . . . . .	48
Бутилкаптакса . . . . .	52
Бутокарбосима . . . . .	59
Гидрела . . . . .	63
ГМК-На . . . . .	66
Даконила . . . . .	70
Диазинона, эптама, гамма-изомера ГХЦ, фенмедетифама, ленашила, фосфамида и пиразона . . . . .	77
Дигидгела . . . . .	89
Диквата . . . . .	93
Зоокумапина . . . . .	97
Карбофурана . . . . .	100
Крочетона . . . . .	104
Менида и 3-хлор-4-метиленилина . . . . .	108
Метазина и компонентов гибридной смеси "карагард" . . . . .	113
Мятака . . . . .	118
Офунака . . . . .	124
Пликтрана . . . . .	128
Ратпидана . . . . .	132
Раундана . . . . .	138
Ровраля . . . . .	143
Розалина . . . . .	148
Синтетических пиретроидов (амбуш, депис, рипкорд, сумипридин) . . . . .	154
Стомпа . . . . .	161

	стр.
Сумилекса . . . . .	166
Томиллона . . . . .	173
Триморфамида . . . . .	180
Фекама-трибуфона . . . . .	186
Фталана . . . . .	192
Препарата 242 . . и металилхлорида (МХ) . . . . .	200
Хостаквика . . . . .	206
Эдила . . . . .	210

## II. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПЕСТИЦИДОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, КОРМАХ И ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

### Хлорорганические пестициды

Методические указания по определению остаточных количеств гексахлорана (линдана) в сушеном картофеле полярографическим методом . . . . .	213
--	-----

### Фосфорорганические 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, фенилтрооксона 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
---	-----

## Азотодержащие пестициды

стр.

Методические указания по хроматографическому определению бутараксоима в почве, воде и растительном материале . . . . .	260
Методические указания по определению ИМК-На, гидрела, дигидрела методом спектрофотометрии в воде, растительном материале (томаты, блоки, свекла). . .	267
Временные методические указания по определению лонтрела в воде, почве и растениях методом газо-жидкостной хроматографии . . . . .	275
Временные методические указания по определению паврлана 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-спектрофотометрии с использованием тонкослойной хроматографии . . . . .	305
Методические указания по фотометрическому определению эдила в воде, растительном масле, семенах подсолнечника, траве . . . . .	311
Методические указания по определению остаточных количеств пинбеа в сушеных овощах и плодах фотометрическим методом . . . . .	317

## Биопрепараты

Временные методические указания по определению остаточных количеств препарата вириин-диприона на растительных объектах ИФ-методом . . . . .	325
Временные методические указания по определению остаточных количеств биопрепарата вириин-КШ на растительных объектах иммуно-флюоресцентным методом. .	331