

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

2799-83

"12" мая 1983 г.

**ВРЕМЕННЫЕ****МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

по определению остаточных количеств препарата  
вирин-диприон на растительных объектах ИФ-методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания во внешней среде полиэдров вируса ядерного полиэдроза рыжего соснового пилильщика (ВЯП РСП), являющегося действующим началом вирусного инсектицидного препарата вирин-диприон.

**1. Характеристика анализируемого пестицида**

Вирусный препарат вирин-диприон предназначен для борьбы с личинками рыжего соснового пилильщика I-III возрастов. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза кишечного типа, содержащийся в тельцах-включениях (полиэдрах). Препарат жидкой формы представляет собой концентрат-суспензию полиэдров в 50% глицерине, темно-серого цвета с белватым осадком при отстае, состоящим главным образом из полиэдров. Размер полиэдров колеблется от 0,5 до 4 мк, в среднем 2 мк. Подсчет титра препарата производится по числу полиэдров в 1 мл в камере Горяева под световым микроскопом и составляет в среднем  $1 \times 10^{10}$ .

**1.1. Принцип метода**

ИФ-метод выявления остаточных количеств вирусного препарата основан на явлении иммунофлуоресценции (Кунс, 1941), широко используемом в медицинской вирусологии для идентификации микроорганизмов. В основе метода лежит специфическая реакция взаимодействия антигена (в данном случае полиэдров ВЯП РСП) с антите-

лами, меченными флуоресцирующим красителем (ФИЦ). Реакция выявляется при наблюдении в люминесцентном микроскопе в виде специфического свечения комплекса антиген-антитело - яркое желто-зеленое свечение полиэдров.

В данной методике используется непрямой вариант метода Кунса, где для выявления комплекса антиген-антитело применяют антиполиэдренную (против полиэдров ВЯП РСП) сыворотку и стандартную, меченую ФИЦ, ослиную сыворотку против глобулинов кролика, изготовленную Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Гамалея г. Москва.

### 1.2. Метрологическая характеристика метода

Данным методом можно определить количество полиэдров в субстрате от  $1 \cdot 10^2$  в мл и более.

### 1.3. Избирательность метода

При условии применения качественных гипериммунных антиполиэдренных сывороток и устранения неспецифического свечения в исследуемых препаратах метод расценивается как специфический и высокочувствительный, а также как экспресс-метод. Метод можно использовать для выявления полиэдров ВЯП РСП на различных объектах окружающей среды при разработке гигиенических нормативов, а также в научных исследованиях при идентификации полиэдров этого вида, при изучении эффективности применения препарата ви-рин-диприон и т.д.

## 2. Отбор проб

Производят согласно "Унифицированным правилам отбора проб с/х 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/.

С целью выявления полиэдров на поверхности объектов проводят смывы с них следующим образом. Пинцетом берут из заранее

приготовленных стерильных пакетов марлевую салфетку (5x5 см), смачивают ее в физиологическом растворе (0,15 М NaCl) с pH 7,4 - 7,6, отжимают и тщательно протирают ее исследуемую площадь 100 кв. см (смыв с поверхности плодов, листьев, коры деревьев и проч.). Переносят салфетку в колбу с 100 мл физ.раствора pH 7,6, энергично встряхивают 5 мин, отжимают салфетку пинцетом и удаляют. Смыв фильтруют через три слоя марли для удаления грубых частиц и центрифугируют 30 мин, при 5 тыс об/мин, осадок ресуспендируют в 1 мл дистиллированной воды.

Если проба состоит из мелких объектов (травы, листья, ягоды и проч.) в таком случае готовят навеску 200-300 г, помещают в широкогорлые банки, доливают 200-300 мл физ.раствора с pH 7,4-7,6, энергично встряхивают 10-15 мин, отстаивают 10 мин, надосадок центрифугируют при 5 тыс об/мин 30 мин, осадок ресуспендируют в 1 мл воды.

Для дальнейшей работы <sup>хранят</sup> пробу при температуре +4°C.

### 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 РСР
3. Нефлуоресцирующее иммерсионное масло или диметил-фтолат
4. Дистиллированная вода
5. Физиологический раствор (0,15 М NaCl) с pH 7,4-7,6
6. Ацетон, ГОСТ - 2603-71
7. Мертиолат натрия или борная кислота, ГОСТ 9656-61
8. Синька Эванса
9. Антибиотики - пеницилин, стрептомицин, 5-нитрооксихинолин

### 4. Приборы и посуда

1. Люминесцентный микроскоп марки МЛ-2 или МЛ-3
2. Центрифуга ЦС-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. Камера Горяева

### 5. Подготовка к определению

Основными реагентами в данном определении являются - иммунная сыворотка против ядерного полиэдроза рыжего соснового пилильщика, являющегося действующим началом препарата вирусного инсектицида вирин-диприон, а также меченая ФИТЦ сыворотка против глобулинов кролика. Последняя сыворотка изготавливается в институте им.Гамалея Н.Ф. г.Москва. Что касается иммунной сыворотки, то для проведения анализа в СЭС ее можно получить у авторов методик, или у авторов препарата, также Минздрав может заказать ее изготовление в институте им.Гамалея.

Для научных лабораторий, работающих с бакуловирусами, рекомендуется самостоятельно изготовить антисыворотку к полиэдрам из препарата вирин-д-прион по следующей схеме.

Полиэдры для иммунизации животных извлекали непосредственно из препарата инсектицида вирин-диприон, можно получать их и из больных гусениц соответствующего вида. Очистку и концентрацию полиэдров вели по В.И.Барановскому и С.А.Бахвалову (1974) методами дифференциального центрифугирования и в градиенте плотности сахарозн. \*

За сутки до введения животным взвесь полиэдров обрабатывали антибиотиками из расчета 500-1000 ед стрептомицина и пеницилина и 20 мкг/мл 5-нитрооксихинолина. Перед иммунизацией взвесь стерильно отмывали от антибиотиков, полиэдры ресуспендировали в стерильном физ.растворе. Титр инокулята обычно составлял  $1 \cdot 10^9$  пдр/мл. Приготовленным антигеном иммунизируют беспородных кроликов массой по 2,5- 3 кг. Высокотитрованные сыворотки получают по следующей схеме иммунизации: инъекции проводят внутривенно трижды с недельным интервалом по 1,5 - 2,0 - 2,5 мл, реиммунизация через 4 недели внутривенно 2,5 мл. Взятие крови через 10 дней после реиммунизации. Сыворотку хранить с добавлением консерванта /мертиолат 1:10000/ при  $-20^{\circ}\text{C}$ , лучше сыворотку лиофилизировать и

---

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

хранить при  $+4^{\circ}\text{C}$ . В этих условиях высушенная сыворотка сохраняет активность до 5 лет.

## 6. Проведение определения

Хорошо обезжиренное предметное стекло помещают на миллиметровую бумагу, на которой отмечен прямоугольник площадью 4 кв.см. Затем на стекло микропипеткой наносят 0,02 мл исследуемой суспензии, равномерно распределяя ее по отмеченной площади. Препарат подсушивают на воздухе, для фиксации опускают в ацетон на 15 мин, после чего окрашивают синькой Эванса 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 слабоголубую окраску. Затем на препарат наносят антиполиэдренную иммунную сыворотку против ВП РСII, предварительно разведенную 1:10 физ.раствором, помещают на 20 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  во влажную камеру, затем смывают проточной водой, подсушивают на воздухе, после чего наносят ослину, меченую ФТИЦ, сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Выдерживают в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  20 мин во влажной камере с последующим промыванием в проточной воде. Подсушенный препарат готов к просмотру в люминесцентный микроскоп. Препарат просматривают под иммерсией, используя нефлуоресцирующее масло, объектив 90, окуляр 8.

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

Контроли: а) препараты, приготовленные по той же схеме, но без обработки специфической иммунной сывороткой; б) препараты, обработанные обеими сыворотками, но заведомо не содержащие выявленных полиэдров.

В контрольных препаратах свечения полиэдров не выявляется.

## 7. Обработка результатов анализа

Подсчет числа полиэдров в исследуемом препарате ведется по формуле  $M = \frac{a \cdot S}{y \cdot S'}$ , где: М — количество полиэдров в 1 мл исследуемой суспензии (концентрат смыва со 100 кв.см поверхности);

$a$  — среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;  
 $S'$  — площадь исследуемого мазка в  $\text{мм}^2$ ;

$y$  — объем нанесенной на стекло суспензии в  $\text{мл}$ ;

$S_0$  — 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 препарата-  
 том дерева, определили среднюю площадь их поверхности —  $100 \text{ см}^2$ .  
 Сделали срез с листьев и обработали его способом, описанным в  
 п.3. Приготовили препарат, покрасили его по непрямому методу  
 Кунса, как описано в п.7. При просмотре препарата в люминесцент-  
 ном микроскопе подсчитали общее число полиэдров в 150 квадратах  
 окулярной сетки  $\sum 150 = 320$ , отсюда  $a = \frac{320}{150} = 2,13$

Площадь мазка известна  $S' = 20 \text{ мм} \times 20 \text{ мм} = 400 \text{ мм}^2$

Сторона квадрата окулярной сетки равна  $0,0062 \text{ мм}$  (определили с  
 помощью объектикометра), т.е. площадь квадрата окулярной сет-  
 ки  $S_0 = (0,0062)^2 = 0,00004 \text{ мм}^2$

Объем нанесенной на стекло суспензии  $y = 0,02 \text{ мл}$

Таким образом  $M = \frac{a \cdot S'}{y \cdot S_0} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$

т.е. на 100 кв. см обследованной площади приходится  $1,1 \cdot 10^9$   
 полиэдров, на 1 кв. см площади —  $1,1 \cdot 10^7$ .

## 8. Требования безопасности

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

## 9. Разработчики,

Васильева В.А., Трусев В.И. — Киевский НИИ эпидемиологии  
 и инфекционных болезней  
 им. Л.В.Громашевского МЗ УССР



## 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
Бутокарбоксима . . . . .	59
Гидрела . . . . .	63
ГМК-На . . . . .	66
Даконила . . . . .	70
Диазинона, эптама, гамма-изомера ГХЦ, фенмедетифама, ленашила, фосфамида и пиразона . . . . .	77
Дигидгела . . . . .	89
Диквата . . . . .	93
Зоокумагина . . . . .	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, сумипирдин) . . . . .	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
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## Азотосодержащие пестициды

стр.

Методические указания по хроматографическому определению бутаракбоксиа 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 вирия-диприона на растительных объектах ИФ-методом . . . . .	325
Временные методические указания по определению остаточных количеств биопрепарата вирия-КШ на растительных объектах иммуно-флюоресцентным методом. .	331