

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 шелкопряда (ВПШ 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 флюорохромом 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

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

1.1. Характеристика анализируемого инсектицида

Ирин-КШ - вирусный энтомопатогенный (инсектицидный) препарат. Предназначается для борьбы с гусеницами кольчатого шелкопряда. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза из семейства оакуловирусов, 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 I-Энк. Препарат представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине с титром не менее $1 \cdot 10^7$ полиэдров/мл. Применяется путем опрыскивания плодовых деревьев против гусениц разных возрастов. Норма расхода препарата 100-200 мл на 1 га сада с добавлением поверхностного 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 сустрате в препаратах от $0,5 \cdot 10^2$ 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 ВП КШ на растительных объектах окружающей среды при разраотке 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 (0,15M NaCl) с pH 7,4-7,6, отжимают и тщательно протирают ею 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 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 колоду 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°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 КИИ.

3. Нефлюоресцирующее 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 Фрейади.
10. Антибиотики (пенициллин, стрептомицин, 5-нигрооксихинолин).

4. Приборы и посуда

1. Люминесцентный микроскоп марки МЛ-2 или МЛ-3.
2. Центрифуга ШС-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. 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 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 антиполиэдральные сыворотки не изготавливаются пока централизованно. Для производства анализа их можно получить у авторов методики, у авторов препарата, а также Минздрав может заказывать ее изготовление в институте им. Гамалея.

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

Получение антигенов для иммунизации животных проводили непосредственно из препарата инсектицида вирус-КШ, но лучше получать его из больших 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°C , либо лиофилизировали. Высушенная 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 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 Званса 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 ВП КШ, предварительно разведенную 1:10 физиологическим раствором, помещают во влажную камеру на 20 мин при 37°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°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 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
$$M = \frac{a \cdot S}{u \cdot S_0}$$
,

где

M - количество полиэдров в 1 мл исследуемой суспензии (концентрация смыва со 100 см² поверхности);

a - среднее число полиэдров в одном квадрате окулярной сетки;

S - площадь исследуемого мазка в мм²;

u - объем нанесенной суспензии в мл;

S_0 - площадь квадрата окулярной сетки в мм².

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 см².

Сделали срез 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 полиядров 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 $f_1 = (0,0062)^2 = 0,00004 \text{ мм}^2$. Объем нанесенной на стекло суспензии $y = 0,02 \text{ мл}$.

Таким образом
$$M = \frac{a \cdot f}{y \cdot f_1} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$$

т.е. на 100 см^2 обследованной площади приходится $1,1 \cdot 10^9$ полиядров, 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.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
Бутилдиэптакса	52
Бутокарбоксима	59
Гидрела	63
ГМК-На	66
Даконила	70
Диавинона, эптама, гамма-изомера ГХЦ, феномедидифама, ленашила, фосфамида и пиразона	77
Дигидрела	89
Диквата	93
Зоокумарина	97
Карбофурана	100
Крочетона	104
Менида и 3-хлор-4-метилэнилина	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, сумицидин)	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, фенилтроексона 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
---	-----

Азотоудержающие пестициды

	стр.
Методические указания по хроматографическому определению бутораббоксима в почве, воде и растительном материале	260
Методические указания по определению . . . ИМК-Ма, 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 вирин-КШ на растительных объектах иммуно-флюоресцентным методом . . .	331