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 XIУ-я

Москва - 1984

gost.e-ecolog.ru

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. Хохолькова (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 вирин-КШ на растительных объектах иммунофлюоресцентным методом

Настоящие методические указания распространяются на определение содержания во внешней среде полиэдров вируса ядерного полиэдроза кольчатого мелкопряда (ВЯП КШ), являющегося действующим началом вирусного инсектицидного препарата вирин-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 вирин-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 бакуловирусных инсектицидов во внешней среде проводят выявлением полиэдров (телец-включений) этих вирусов, поскольку непосредственно вирусные частицы весьма лабильны, легко разрушаются под влиянием различных факторов. Поэтому для выявления полиэдров (антигена) готовят специфическую антиполиэдрозную иммунную сыворотку. Реакция выявляется под

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

1.1. Характеристика анализируемого инсектицида

Вирин-КШ - вирусный энтомопатогенный (инсектицидный) препарат. Предназначается для борьбы с гусеницами кольчатого шелкопряда. Действующим началом препарата является вирус ядерного полиэдроза 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 1-3мк. Препарат представляет собой суспензию полиэдров в 50% глицерине с титром не менее $1 \cdot 10^9$ 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 $0,5 \cdot 10^2$ и более в мл.

1.3. Избирательность метода

При условии применения качественной гиперимунной 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 ВНП 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°С.

С целью выявления полиэдров на поверхности объектов проводят смывы с них. Пинцетом берут из заранее приготовленных стерильных пакетов марлевую салфетку (5х5 см), смачивают ее в физиологическом растворе (0,15М NaCl) с pH 7,4-7,6, отжимают и тщательно протирают ею исследуемую площадь в 100 $см^2$, (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 (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 ресуспендируют в 1 мл дистиллированной воды. Для дальнейших работ пробы хранят при +4°С до 3-х суток.

Площадь поверхности круглых плодов, например яблок, определяют по формуле $S = ПД^2$, 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 КШ.

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

4. Приборы и посуда

1. Люминесцентный 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 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 ФИТЦ 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 изготовляются 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 вирин-КШ по следующей схеме.

Получение антигенов для иммунизации животных проводили непосредственно из препарата инсектицида вирин-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 стрептомицина и пенициллина, 20 мкг/мл 5-нитрооксихинолина. Перед иммунизацией взвесь стерильно отмывают от антибиотиков, полиэдры ресуспендируют в стерильном физиологическом растворе. Титр инокулята обычно 1.10^9 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 I:I с адъювантом Фрейнда. Через две недели реиммунизация 6,0 мл смеси подкожно. Забор крови через неделю после реиммунизации.

Сыворотку хранили с консервантом (мертиолят I:I0000) при -20^0С, либо лиофилизировали. Высушенная сыворотка сохраняет активность до 5 лет при хранении $+4^0$С.

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 I5 мин. Для гашения неспецифического свечения используют синьку Эванса в разведении I:I0000 дистиллированной водой. Время обработки препарата синькой I0 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, предварительно разведенную I:I0 физиологическим раствором, помещают во влажную камеру на 20 мин при 37^0С, затем смывают проточной водой, подсушивают на воздухе,

---

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

после чего наносят ослиную . . . сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Выдерживают в термостате при 37°С 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 предварительно 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 $M = \frac{a \cdot S}{y \cdot S_1}$,

где

M - количество полиэдров в I 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;

S_1 - площадь квадрата окулярной сетки в 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 - 100см^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 полиэдров в 150 квадратах окулярной сетки Σ 150=320, отсюда $a = \frac{320}{150} = 2,13$.

Площадь мазка известна S = 20мм x 20мм= 400мм^2. Сторона квадрата окулярной сетки равна 0,0062 мм (определили с помощью объект-микрометра), т.о. площадь квадрата окулярной сетки S_1=(0,0062)^2= 0,00004 мм^2. Объем нанесенной на стекло суспензии v= 0,02 мл.

Таким образом $N = \frac{a \cdot S}{v \cdot S_1} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$,

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

9. Требования безопасности

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

9. Разработчики.

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

С О 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	I3
Бензоилпропэтила и этилового эфира N-3,4- дихлорфенилаланина	I7
Беномила и БМК	22
Бентазона	30
Биоресметрина	35
Болстара	40
Бронокота	48
Бутилкаптакса	52
Бутокарбоксима	59
Гидрела	63
ГМК-Na	66
Даконила	70
Диазинона, эптама, гамма-изомера ГХЦГ, фенмедедифама, ленацила, фосфамида и пиразона	77
Дигидрела	89
Диквата	93
Зоокумарина	97
Карбофурана	I00
Крочетона	I04
Менида и 3-хлор-4-метиланилина	I08
Метазина и компонентов гербицидной смеси "карагард"	II3
Митака	II8
Офунака	I24
Пиктрана	I28
Ратиндана	I32
Раундана	I38
Ровраля	I43
Розалина	I48
Синтетических пиретроидов (амбуш, децис, рипкорд, сумицидин)	I54
Стомпа	I6I

стр.

Сумилекса 166
Томилона 173
Триморфамида 180
Фекама-трибуфона 186
Фталана 192
Препарата 242 и металлилхлорида (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 218

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, фенитрооксона и п-нитрокрезола в лесной растительности и почве тонкослойной хроматографией 241

Методические указания по определению трихлорметафоса-3 и его метаболитов в биоматериале методом газо-жидкостной хроматографии 252

Азотосодержащие пестициды

стр.

Методические указания по хроматографическому определению буторакбокоима в почве, воде и растительном материале 260

Методические указания по определению ,ІМК-Na, 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 паарлана 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 цинеба в сушеных 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-флюоресцентным методом. .331

gost.e-ecolog.ru