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
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.

I. 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 беловатым осадком при отстое, 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 I мл в камере Горяева под световым микроскопом и составляет в среднем 1×10^{10}.

I.I. Принцип метода

ИФ-метод выявления остаточных количеств вирусного препарата основан на явлении иммунофлюоресценции (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 (ФИТЦ). 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 ФИТЦ, ослиную сыворотку против глобулинов кролика, изготовленную Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Гамалея г.Москва.

I.2. Метрологическая характеристика метода

Данным методом можно определить количество полиэдров в субстрате от $I.IO^2$ в мл и более.

I.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 вирин-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 21.09.1979 № 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 (5х5 см), смачивают ее в физиологическом растворе (0,15 М NaCl) с pH 7,4 – 7,6, отжимают и тщательно протирают ею 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 (трава, 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 пробы хранят при температуре +4°С.

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 РСП
3. Нефлюоресцирующее 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 – пенициллин, стрептомицин, 5-нитроэксихинолин

4. Приборы и посуда

1. Люминесцентный микроскоп марки МЛ-2 или МЛ-3
2. Центрифуга ЦЛС-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 изготовляется 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-диприон 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 сахарозы. *

За сутки до введения животным взвесь полиэдров обрабатывали антибиотиками из расчета 500-1000 ед стрептомицина и пенициллина и 20 мкг/мл 5-нитрооксихинолина. Перед иммунизацией взвесь стерильно отмывали от антибиотиков, полиэдры ресуспендировали в стерильном физ.растворе. Титр инокулята обычно составлял 1.10^9 пдр/мл. Приготовленным антигеном иммунизируют беспородных кроликов массой по 2,5- 3 кг. Высокотитрованные сыворотки получают по следующей схеме иммунизации: инъекции проводят внутренно 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°С, лучше сыворотку лиофилизировать и

---

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

хранить при +4°С. 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 ВИП РСП, предварительно разведенную 1:10 физ.раствором, помещают на 20 мин при 37°С во влажную камеру, затем смывают проточной водой, подсушивают на воздухе, после чего наносят ослиную, [illegible] меченую ФИТЦ, сыворотку в рабочем разведении, указанном на ампуле. Выдерживают в термостате при 37°С 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 $M = \frac{a \cdot S}{y \cdot S_1}$, 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 мм^2;
v – объем нанесенной на стекло 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 – 100 см^2. Сделали смыв 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 люминесцентном микроскопе подсчитали общее число полиэдров в 150 квадратах окулярной сетки $\sum 150 = 320$, отсюда $a = \frac{320}{150} = 2,13$

Площадь мазка известна $S = 20$ мм x 20 мм = 400 мм^2
Сторона квадрата окулярной сетки равна 0,0062 мм (определили с помощью объектмикрометра), 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 $M = \frac{a \cdot S}{v \cdot S_1} = \frac{2,13 \cdot 400}{0,02 \cdot 0,00004} = 1,1 \cdot 10^9$
т.е. на 100 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.Л., Трусов В.И. – Киевский НИИ эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В.Громашевского МЗ УССР

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