



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Руководителя  
Россельхознадзора  
Н.А. Власов

2009 г.

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора для диагностики парвовирусной болезни свиней  
в реакции гемагглютинации (РГА)  
и реакции торможения гемагглютинации (РТГА)  
(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

### I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор для диагностики парвовирусной болезни свиней в реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

2. Состав набора и внешний вид компонентов

Набор рассчитан на исследование 50 проб и включает следующие компоненты:

- полистироловые 96-луночные планшеты для иммунологических реакций - 5 штук;
- антиген специфический инактивированный - лиофилизированная однородная мелкопористая масса светло-розового цвета, гемагглютинирующая активность должна быть не ниже 1:128,  $1,0 \text{ см}^3$  – 5 флаконов;
- сыворотка специфическая - лиофилизированная однородная мелкопористая масса светло-желтого цвета, активность в РТГА должна быть не ниже 1:256,  $1,0 \text{ см}^3$  – 3 флакона;
- сыворотка нормальная (отрицательный контроль) - лиофилизированная однородная мелкопористая масса светло-желтого цвета,  $1,0 \text{ см}^3$  -2 флакона;

3. Упаковка и маркировка.

Компоненты набора расфасовывают в стеклянные, герметично укупоренные флаконы. Полистироловые планшеты упаковывают в полиэтиленовые пакеты.

На флаконы с компонентами наклеивают этикетки с указанием: организации-производителя и разработчика и/или товарного знака, наименования компонента, количества во флаконе, номера серии и контроля, срока годности (месяц, год).

Флаконы с компонентами набора и планшеты упаковывают в картонные или пластиковые коробки.

На каждую коробку с диагностическим набором наклеивают этикетку, в которой указывают: страну, город, название и/или товарный знак организации-производителя и разработчика, полное название набора, номер серии и номер контроля, дату изготовления (месяц и год), срок годности (месяц и год), условия хранения, регистрационный номер, знак соответствия в системе ГОСТ Р, обозначение нормативного документа, надпись «для животных». В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

4. Срок годности компонентов набора – 2 года при условии хранения их в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8°C. После растворения компоненты набора можно хранить в замороженном состоянии не более 1 месяца, повторное замораживание не допускается. Запрещено применять набор по истечении срока годности.

5. Флаконы без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета подлежат выбраковке и обеззараживаются 3% раствором хлорамина.

### II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Реакция гемагглютинации (РГА) основана на склеивании взвешенных в

жидкости эритроцитов под воздействием гемагглютинирующих свойств вируса и образования рыхлого осадка в виде зонтика. РГА применяют для быстрого выявления вируса в исследуемом материале. Сущность РТГА заключается в нейтрализации гемагглютинирующих свойств вируса специфическими антителами, содержащимися в сыворотке крови, в результате чего склеивания эритроцитов не происходит и они оседают на дно, образуя плотный осадок в виде пуговки.

### III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

#### 7. Подготовка к исследованию

7.1 Для исследования в лабораторию доставляют из свиноводческих хозяйств абортирванные плоды длиной не более 15 см (до 65-го дня внутриутробного развития) и индивидуальные сыворотки крови без признаков гемолиза и бактериальной контаминации в объеме 2,0 – 3,0 см<sup>3</sup> от свиноматок с нарушением воспроизводительной способности, а также от новорожденных поросят до приема молозива. Патматериал и сыворотки крови можно хранить при температуре 4°C не более 3-х суток или при температуре минус 20°C в течение 50-60 суток. Не допускается многократное замораживание проб. Плоды старше 70-дневного возраста, длиной более 17 см не пригодны для выявления антигена парвовируса.

Примечание: Набор содержит все необходимые для проведения анализа компоненты. Дополнительно требуются микропипетки на 100, 200 и 1000 мкл, мерная лабораторная посуда, фосфатно-буферный раствор (ФБР), бытового холодильника, центрифуга.

#### 7.2 Подготовка материалов для исследования

##### 7.2.1 Получение эритроцитов морской свинки

Кровь у морской свинки берут стерильно из сердца, помещают в раствор Альсвера или цитрата натрия в соотношении 1:5, центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин, надосадочную жидкость осторожно удаляют, а осадок два-три раза отмывают фосфатно-буферным раствором (ФБР) до получения прозрачной жидкости над осадком эритроцитов. Осадок эритроцитов используют для сенсибилизации сыворотки крови и приготовления 0,75% суспензии. Не использованный осадок можно хранить при температуре (6 ± 2)<sup>0</sup>C в течение 2-3 суток.

7.2.2 Сыворотка крови - исследуемые и контрольные образцы (контрольные образцы сначала вскрывают и разводят в 1,0 см<sup>3</sup> ФБР или дистиллированной воды) перед постановкой реакции разводят в 16 раз ФБР, инактивируют в водяной бане при (56 ± 1)<sup>0</sup>C в течение 30 минут. Для адсорбции неспецифических гемагглютининов добавляют каолин (25% раствор в ФБР) в соотношении 1:1 и сенсибилизируют эритроцитами морской свинки (к 0,2 см<sup>3</sup> инактивированной сыворотки, обработанной каолином, добавляют 2 капли осадка эритроцитов), выдерживают при температуре (20 ± 1)<sup>0</sup>C в течение 1 часа. Эритроциты осаждают центрифугированием 10 минут при 2000 об/мин. Полученные образцы сыворотки используют для постановки РТГА.

7.2.3 Кусочки органов (печень, почки, легкие, кишечник) абортирванных плодов гомогенизируют в фосфатно-буферном растворе, готовят 30% суспензию, центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин, надосадочную жидкость используют в РГА.

7.3 Специфические антитела в сыворотке крови свиней и новорожденных поросят (до приема молозива) определяют в РТГА а парвовирусный антиген в суспензии внутренних органов абортирванных плодов в РГА. Реакции ставят микрометодом в лунках полистировых пластин с U-образным дном. Перед постановкой реакций определяют гемагглютинирующую активность контрольного антигена (ГАЕ) и его рабочее разведение (8 ГАЕ)

##### 7.3.1 Определение гемагглютинирующей активности контрольного антигена (ГАЕ)

Гемагглютинирующую активности антигена определяют в РГА. Содержимое флакона с антигеном растворяют в  $1,0 \text{ см}^3$  ФБР. В лунки полистироловых пластин с U образным дном вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  ФБР и готовят двукратные разведения антигена, начиная с разведения 1:2 до 1:4096. В каждую лунку добавляют  $0,05 \text{ см}^3$  0,75% суспензии эритроцитов морской свинки. Пластины осторожно встряхивают и выдерживают при температуре  $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение 2-3 час.

За титр гемагглютинирующей активности антигена принимают наибольшее его разведение, которое вызывает полную агглютинацию эритроцитов. Антиген должен обладать гемагглютинирующей активностью в разведении не ниже 1:128.

#### 7.3.2 Определение рабочего разведения антигена (8 ГАЕ)

В РТГА используют рабочее разведение антигена, содержащее в  $0,05 \text{ см}^3$  8 гемагглютинирующих единиц (8 ГАЕ). Рабочее разведение антигена рассчитывают путем деления наибольшего титра антигена, вызвавшего полную агглютинацию эритроцитов, на 8. Далее антиген разводят ФБР на полученную величину и получают рабочее разведение антигена.

Например, если титр антигена – 1: 1024, то  $1024/8 = 128$ , значит, антиген необходимо развести в 128 раз чтобы получить его рабочее разведение (8ГАЕ).

### 7.4 Проведение РТГА

7.4.1 В лунки пластины вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  фосфатно-буферного раствора. В первый ряд вносят  $0,05 \text{ см}^3$  сывороток, предварительно обработанных по п. 7.2.2. Готовят двукратные разведения проб. В каждую лунку добавляют по  $0,05 \text{ см}^3$  антигена в рабочем разведении (8 ГАЕ) и выдерживают 1 час при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Затем в каждую лунку вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  0,75% суспензии эритроцитов морской свинки, пластину осторожно встряхивают и выдерживают 2-3 часа при температуре  $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$ . За титр антител принимают предельное разведение сыворотки, полностью подавляющее гемагглютинирующую активность антигена в рабочем разведении (8 ГАЕ). При обнаружении в испытуемых сыворотках антител в титре 1:64 и выше, пробу считают положительной (следует учитывать, что при подготовке сывороток к проведению реакции мы уже развели их 1:32).

7.4.2 В РТГА ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию в ФБР, контроль рабочей дозы антигена и контроль специфичности антигена с положительной и отрицательной контрольными сыворотками.

*Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию.* В три лунки вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  ФБР и добавляют равный объем 0,75% суспензии эритроцитов. Эритроциты в фосфатно-буферном растворе не должны спонтанно агглютинировать.

*Контроль рабочей дозы антигена.* В пять лунок пластины вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  ФБР. В первую лунку добавляют  $0,05 \text{ см}^3$  рабочего разведения антигена (8 ГАЕ) и готовят двукратные разведения, удаляя из последней лунки  $0,05 \text{ см}^3$ . Затем во все лунки добавляют по  $0,05 \text{ см}^3$  0,75% суспензии эритроцитов морской свинки. При правильном приготовлении рабочего разведения антигена через 2 часа в первой, второй и третьей лунках, содержащих соответственно 4, 2 и 1 ГАЕ, должна быть полная агглютинация эритроцитов. В четвертой и пятой лунках агглютинация должна отсутствовать или быть незначительной.

*Контроль специфичности антигена с гипериммунной и нормальной сыворотками* ставят по п. 7.4.1. Гипериммунная (контрольная) сыворотка должна полностью подавлять гемагглютинирующую активность антигена в титре не ниже 1:256. Нормальная (отрицательная) сыворотка не должна подавлять гемагглютинирующую активность антигена.

### 7.5 Проведение РГА

7.5.1 В лунки пластины вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  ФБР, в первые лунки добавляют  $0,05 \text{ см}^3$  проб, приготовленных по п. 7.2.3 и готовят двукратные разведения исследуемого материала. Затем во все лунки вносят по  $0,05 \text{ см}^3$  0,75% суспензии эритроцитов морской

свинки. Пластину осторожно встряхивают и выдерживают 2-3 часа при температуре  $(6\pm 2)^{\circ}\text{C}$ . За титр антигена принимают наибольшее его разведение, вызывающее полную агглютинацию эритроцитов. Пробу считают положительной при гемагглютинирующем титре антигена 1:32 и выше.

7.5.2 В РГА ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию, контроль рабочей дозы антигена и контроль специфичности антигена (по п. 7.4.2).

7.5.3 Идентификацию гемагглютинирующего антигена проводят в РТГА с использованием гипериммунной сыворотки и специфического антигена, входящих в состав набора. Реакцию ставят с испытуемым гемагглютинирующим и специфическим антигенами в рабочей дозе (8 ГАЕ) как описано в п. 7.4.1. Готовят двукратные разведения гипериммунной сыворотки параллельно в двух рядах пластины и в лунки каждого ряда добавляют отдельный антиген. Если титр гипериммунной сыворотки с испытуемым гемагглютинирующим антигеном отличается не более чем в 2 раза от титра этой же сыворотки со специфическим антигеном, то результат идентификации считают положительным.

7.6 Диагноз на заболевание считают установленным при наличии парвовирусного антигена в суспензии внутренних органов абортированных плодов и специфических антител в сыворотке крови новорожденных поросят до приема молозива, а также при наличии характерных клинических признаков болезни у свиноматок (прохолосты, малоплодные пометы, мумифицированные плоды). Обнаружение антител к парвовирусу свиней в сыворотке крови только свиноматок и хряков-производителей недостаточно для постановки диагноза на парвовирусную болезнь и свидетельствует лишь о циркуляции вируса в хозяйстве.

#### **IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ**

8. Работу с компонентами набора следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. При попадании их на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

9. Запрещается прием пищи и воды, курение в помещении, где проводятся работы с компонентами набора.

10. Набор следует хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель - ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению набора для диагностики парвовирусной болезни свиней в реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА), утвержденная Россельхознадзором 29.06.2006 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГУ ВГНКИ.  
Регистрационный номер ПВР-1-2.1/00675