



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» для
выявления РНК вируса блютанга (Bluetongue virus, BTV) в биологическом
материале от жвачных методом реакции обратной транскрипции и
полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме
реального времени
(ОТ ПЦР РВ)**

ТУ 21.10.60-337-51062356-2022
Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора	4
2.1. Принцип действия.....	4
2.2. Состав набора реагентов	4
3. Аналитические и диагностические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование.....	7
6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб.....	8
6.1 Отбор материала для исследования	8
6.2 Подготовка исследуемого материала.....	9
7. Проведение анализа	10
7.1 Экстракция (выделение) НК из клинического материала	10
7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР.....	10
7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией	11
8. Интерпретация результатов анализа	11
9. Условия транспортирования	13
10. Условия хранения.....	13
11. Срок годности.....	13
Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций.....	14
Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).....	15
Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (Россия).....	20
Приложение 4. Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе CFX96.....	22
Приложение 5. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	25
Приложение 6. Лист вносимых изменений.....	32

Список сокращений

ВКО	внутренний контрольный образец
К-	отрицательный контроль
ВК-	отрицательный контроль этапа экстракции
К+	положительный контроль
ОКО	отрицательный контрольный образец
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР РВ	полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
ОТ	обратная транскрипция
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
ВТВ	Bluetongue virus, вирус блютанга
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для выявления РНК вируса блютанга (Bluetongue virus, BTV) в биологическом материале от жвачных (цельная кровь, сыворотка крови, фрагменты тканей и органов, лимфоузлы, сперма), а также в кровососущих насекомых (переносчиках вируса), культурах микроорганизмов, смывах с поверхностей методом совмещенной реакции обратной транскрипции и амплификации РНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в присутствии внутреннего положительного контроля.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Набор реагентов основан на использовании двух последовательных полимеразных реакций: реакции обратной транскрипции (ОТ) на матрице вирусной РНК для получения кДНК (комплементарная ДНК) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации полученной кДНК матрицы. Обе реакции проводятся последовательно в одной ПЦР-пробирке (one-tube), что сокращает и упрощает процедуру анализа, снижает риск контаминации и возможность ошибки при переносе кДНК в другую пробирку для постановки ПЦР. Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

2.2. Состав набора реагентов

Набор состоит из набора реагентов для проведения обратной транскрипции и мультимплексной ПЦР РВ (Комплект №1) и контрольных образцов (Комплект №2). Набор выпускается в двух вариантах:

- 1) Для анализа 55 клинических образцов (включая контрольные образцы)
- 2) Для анализа 110 клинических образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

Протокол выходного контроля доступен по запросу.

Таблица 1. Комплект №1 для проведения ПЦР:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Смесь для проведения ПЦР, ПЦР СМЕСЬ ВТV	прозрачная бесцветная жидкость*	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР ВТV	прозрачная бесцветная жидкость	550	1100	1
3	Смесь ферментов, RT PCR ENZ.	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	45	90	1
4	Буфер для разведения РНК, РНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1

Таблица 2. Комплект №2 контрольные образцы:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО М1	прозрачная бесцветная жидкость*	550	1100	1
2	Отрицательный контрольный образец, ОКО (ТЕ буфер) ¹	прозрачная бесцветная жидкость	1500	2000	1
3	Положительный контрольный образец, ПКО ВТV	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для выделения НК. Выделение РНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, наборов на

* Возможна легкая опалесценция

¹ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Для этих целей рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Показано отсутствие неспецифических положительных сигнала компонентов набора реагентов в отношении НК других микроорганизмов: *Aphthae epizooticae*, *Pararoxvirus*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Rotavirus*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов НК от здоровых животных, кошки, собаки и человека.

4. Меры предосторожности

Все работы по сбору, транспортированию и подготовке проб биологического материала от животных осуществлять в строгом соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» и с требованиями Приказа №706 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 25.11.2020 г. «Об утверждении ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов блютанга».

Исследование проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники с аэрозольным барьером.

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывают в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор (например, 0,2% натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

Рабочие поверхности в ПЦР помещениях облучают УФ светом в течение 30 минут до начала и после проведения работ. Также после окончания работ рекомендуется обрабатывать рабочие поверхности дезинфицирующим раствором.

5. Материалы и оборудование

5.1 Для зоны выделения НК из клинического материала:

- Настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия);
- Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл с диапазоном температур от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия);
- Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 20-200 и 200-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл (например, «Tarsons», Индия);
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл в штативах (например, «Tarsons», Индия);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- Емкость с дезинфицирующим средством;
- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С.;
- Халат лабораторный;
- Набор для выделения РНК (см. пункт 2.2).

5.2 Для зоны проведения ПЦР анализа:

- Амплификатор (например «Rotor-Gene Q», Qiagen; «ДТ-96», ДНК-технология; «CFX96», Biorad).
- ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», Ламинарные системы, Россия).
- Микроцентрифуга-вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- Пипетки автоматические одноканальные переменного объема 2- 20, 20-200 мкл и 100-1000 мкл; (например, «Ленпипет», Россия).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
- Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,2 мл (например, «SSI», США).

- Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °С;
- Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 20, 200 и 1000 мкл с аэрозольным барьером в штативах;
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 0,2 и 1,5 мл (например, «Axygen», США);
- Штативы для микропробирок на 0,2 и 1,5-2,0 мл (например, «SSI», США);
- Перчатки медицинские неопудренные латексные;
- Халат лабораторный.

При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования

Для исследования используют следующий материал:

- Цельная кровь во время лихорадки. Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.
- Сыворотка крови. Для получения сыворотки забирают кровь в пробирку без антикоагулянта
- Фрагменты тканей и органов (миндалины, селезенка, легкие, печень и др.) отбирают в стерильный контейнер.
- Лимфоузлы берут на исследование целиком
- Кровососущие насекомые, переносчики вируса (мокрецы), отбирают не менее 20 особей в контейнер.
- Сперму в объеме не менее 2 мл, в стерильную посуду.
- Культуры микроорганизмов в жидких средах отбирают в стерильную тару.
- Бактериальные колонии ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора.
- Питательные среды отбирают в стерильную тару (твердые ресуспендируют в физиологическом растворе).
- Смывы с поверхностей (внутрилабораторных, с поверхностей тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора.

Взятие клинического материала должно производиться в пробирки с транспортной средой.

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при комнатной температуре – в течение 48 часов;
- при температуре от 2 до 8 °С – в течение двух недель;
- при температуре не выше минус 20 °С – в течение месяца;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание клинических образцов.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемого материала

Пробы цельной крови, сыворотки крови, культуры микроорганизмов и питательные среды, смывы с поверхностей используют для выделения РНК без предварительной подготовки. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Исследуемые пробы тканей и органов происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5-10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

Пробу кровососущих насекомых (использовать 20-40 особей) растирают в 1 мл стерильного физиологического раствора с использованием автоматических гомогенизаторов. Полученные суспензии центрифугируют при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин. Для экстракции РНК используют 100 мкл надосадочной жидкости.

Образцы спермы смешивают в соотношении 1:4 с физиологическим раствором и центрифугируют пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин, после чего удаляют надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция). Полученный материал используют для выделения НК.

Для получения сыворотки пробирки с кровью (без антикоагулянта) отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 600–1600 g (3000 об./мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

7. Проведение анализа

Анализ с помощью набора реагентов «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» методом ОТ-ПЦР РВ состоит из трех этапов:

- экстракция НК;
- проведение реакции ОТ-ПЦР РВ;
- учет результатов анализа.

Примечание. Реакция ОТ-ПЦР РВ проводится в одной пробирке.

7.1 Экстракция (выделение) НК из клинического материала

Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный контроль выделения. Внести во все пробирки с исследуемыми образцами, включая пробирку для **ОКО**, по 10 мкл **ВКО М1**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции, к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО² (пробирку обозначить как ВК-)**.

Выделять НК из анализируемых и контрольных образцов согласно протоколу инструкции производителя набора для выделения НК.

7.2 Подготовка образцов к проведению ПЦР

Общий объем реакционной смеси - 25 мкл, объем РНК-пробы - 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО ВТВ, ВКО М1 и РНК буфера**.

Примечание. Допускается размораживание реагентов из набора перед работой при температуре не выше 40°C (с использованием термостата). **Прогревание пробирки RT PCR ENZ категорически запрещено.**

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию:

10 мкл **ПЦР БУФЕР ВТВ**

5 мкл **ПЦР СМЕСЬ ВТВ**

0,75 мкл **RT PCR ENZ**.

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций указан в приложении 1.

Отобрать необходимое количество пробирок исследуемых и контрольных проб для проведения ОТ-ПЦР РВ. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

² Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл РНК буфера;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую по 10 мкл НК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) внести в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) 10 мкл ПКОВТ.

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку (например, ДТ-96), **запрещается наносить маркировку на крышку пробирок!**

7.3 Проведение реакции ПЦР РВ с флуоресцентной детекцией

Параметры температурно-временного режима амплификации на приборах «Rotor-Gene Q», «ДТ-96», «CFX96» и LightCycler® 96 указаны в Приложениях 2, 3, 4 и 5 Инструкции соответственно.

Поместить подготовленные для проведения ПЦР пробирки в ячейки амплификатора. Программировать прибор согласно инструкции производителя и в соответствии с Приложениями 2, 3, 4 и 5 Инструкции.

В случае использования амплификаторов других моделей рекомендуется консультация со специалистом компании «ВЕТ ФАКТОР».

После завершения программы амплификации отработанные пробирки утилизируют в соответствии с МУ 1.3. 2569 -09.

8. Интерпретация результатов анализа

Полученные данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в соответствии с инструкцией производителя к прибору и в соответствии с приложениями 2, 3, 4 и 5 Инструкции.

Учет результатов ОТ-ПЦР РВ проводится по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца).

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции РНК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

Проба	Канал детекции		Результат
	FAM/Green	Cy5/Red	
	ВТV	ВКО	
ПКО К+	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно

Проба	Канал детекции		Результат
	FAM/Green	Cy5/Red	
	BTV	BKO	
РНК буфер К-	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	Сигнал отсутствует	Любое значение	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение $Ct > 35$	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	Любое значение от 1 до 31	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>РНК вируса блютанга присутствует</i>
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 35	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение $Ct > 35$	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- значение Ct для ВКО отсутствует или превышает граничное, а в К+ значение Ct для ВКО менее граничного (и в образцах Ct для ВКО менее граничного) – результаты можно считать достоверными. Также в случае если значение Ct для ВКО в К+ отсутствует или превышает граничное, а в ВК- и образцах менее граничного – результаты можно считать достоверными

Если для исследуемого образца по каналу FAM/GREEN значение Ct определяется позднее 31 цикла при корректном прохождении положительных и отрицательных контролей – он считается спорным и исследуется повторно с этапа выделения НК. Если при повторной постановке наблюдается схожий результат – образец считается положительным.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения Ct для отрицательного контроля этапа ПЦР К- (на любом из каналов) рекомендуется исследование смывов с поверхностей в лаборатории для исключения риска внутрилабораторной контаминации. Смывы с лабораторных поверхностей и оборудования используют в качестве матрицы для ПЦР (вносят в реакцию вместо исследуемых проб в количестве 10 мкл) – то

есть смывы исследуют без экстракции. Появление любого значения Ct на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Транспортирование набора «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8°C не более 5 суток.

10. Условия хранения

Длительное хранение комплектов набора «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°C. При начале работы с набором, набор следует разукomплектовать и далее хранить в соответствии со следующими требованиями:

Комплект №1(см. Табл. 1) хранить при температуре от -18 до -20°C;

Комплект №2 (см. Табл. 2) хранить при температуре от 2 до 8°C.

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Расчет объемов реагентов на различное количество реакций

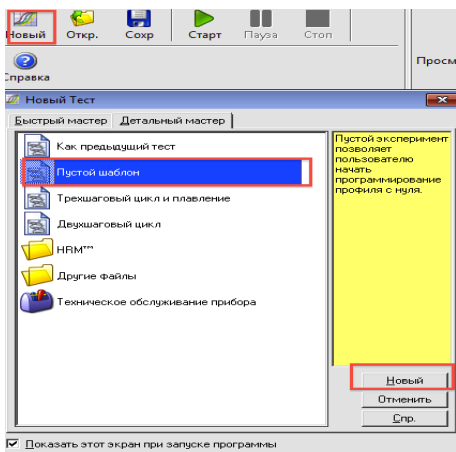
Количество реакций	Объем ПЦР БУФЕРА ВТВ, мкл	Объем ПЦР СМЕСИ ВТВ, мкл	Объем RT PCR ENZ, мкл
5	50	25	3,75
10	100	50	7,5
15	150	75	11,25
19	190	95	14,25
23	230	115	17,25
27	270	135	20,25
31	310	155	23,25
35	350	175	26,25
39	390	195	29,25
43	430	215	32,25
47	470	235	35,25
51	510	255	38,25
55	550	275	41,25
59	590	295	44,25
63	630	315	47,25
67	670	335	50,25
71	710	355	53,25
75	750	375	56,25
79	790	395	59,25
83	830	415	62,25
87	870	435	65,25
91	910	455	68,25
95	950	475	71,25
99	990	495	74,25
103	1030	515	77,25
107	1070	535	80,25

Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett research, Австралия) и Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия)

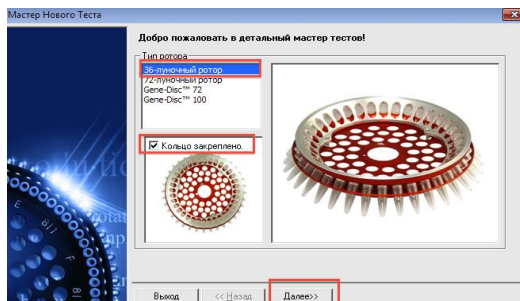
В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 (Q)/ для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 (Q).

1. Открыть программу «Rotor Gene Q».
2. Выбрать в основном меню программы значок «New»/«Новый В открывшемся окне выбрать «Пустой шаблон», нажать кнопку «New»/«Новый

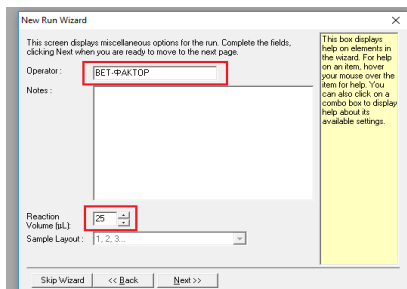


3. Выбрать тип ротора «36-Well Rotor»/«36-луночный ротор». Поставить отметку в окошке рядом с надписью «No Domed 0.2 ml Tubes»/«Locking ring attached»/«Кольцо закреплено». Нажать кнопку «Next»/«Далее».



4. Указать оператора, объем реакционной смеси «Reaction volume»/Объем реакции» – 25 мкл. Для Rotor-Gene 6000 должно быть

отмечено окошко «15 µl oil layer volume»/«15 µL объем масла/воска». Нажать кнопку «Next»/«Далее».



5. В верхней части окна нажать кнопку «Edit profile»/«Редактор профиля». В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 4. Нажать клавишу «ОК».

Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации на Rotor-Gene.

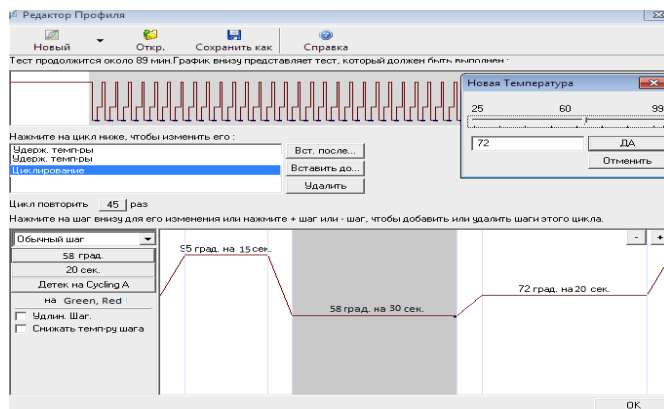
№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	56°C – 30 сек, детекция FAM/GREEN, Cy5/RED	
	72 °C– 30 сек	

Для этого требуется проделать следующие шаги:

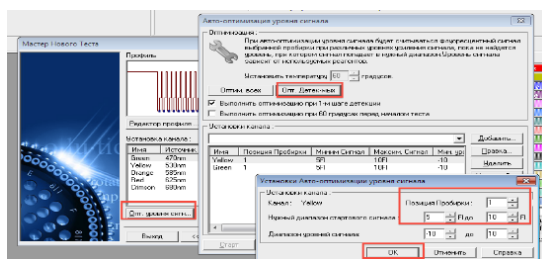
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры», установить температуру 50°C и время 30 мин;

-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New hold at temperature»/«Новое удержание температуры» установить температуру 95°C и время 5 мин.

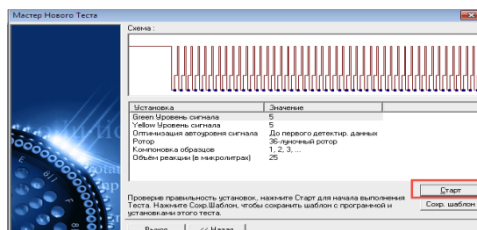
-Нажать клавишу «Insert after»/«Вставить после» и выбрать «New cycling»/«Новое циклирование», установить параметры циклирования в соответствии с таблицей 4.



6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку «Calibrate/Gain Optimisation...»/«**Опт.уровня сигн.**». В открывшемся окне нажать кнопку «Опт.детект-мых». Для обоих каналов указать нужный диапазон стартового сигнала: **Min Reading /минимальный сигнал - 5, Max Reading /максимальный сигнал — 10**. В графе «Позиция Пробирки» указать номер пробирки, по которой будет автоматически выбран параметр «усиления сигнала», по умолчанию это 1-я пробирка в роторе. Пометить галочкой строку Perform Calibration Before 1st Acquisition «**Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции**». Закрыть окно «Авто-оптимизация уровня сигнала». Нажать кнопку «Next»/«Далее».

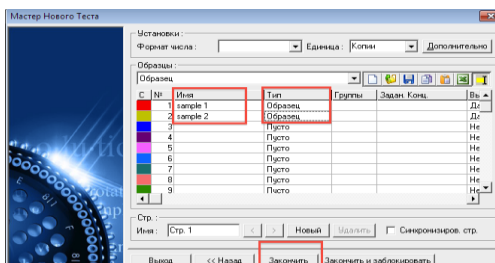


7. Запустить амплификацию кнопкой «Start run»/«**Старт**». Дать название эксперименту и сохранить его на диске.

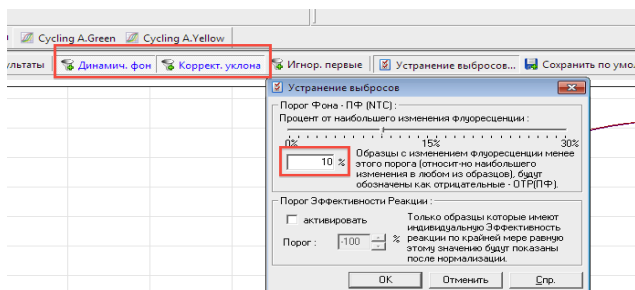


9. После завершения термоциклирования сохранить файл с результатами исследования.

10. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. FAM**»/«**Cycling A. Green**», далее «**Show**»/«**Показать**»



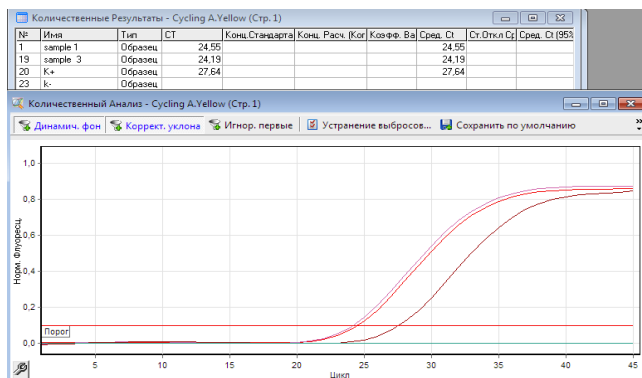
12. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки **«Dynamic tube»/«Динамич.фон»** и **Slope Correct/«Коррект. уклона»**. Установить More settings/Outlier Removal **«Устранение выбросов»** - 15 %³.



Версия 1.10 от 28.09.2022

13. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» выставить Threshold/Порог =0,05

В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.



Анализ результатов амплификации для канала Cy5/Red

14. Нажать в меню кнопку Analysis/Анализ, выбрать режим анализа Quantitation/Количественный, нажать кнопку Cycling A. Cy5/Cycling A. Red, далее нажать Show/Показать

15. Выбрать линейную шкалу графического изображения результатов, нажав кнопку Linear scale/Линейная шкала в нижней части окна справа (если эта шкала активна по умолчанию, вместо кнопки Linear scale/Линейная шкала видна кнопка Log scale/Логарифмическая шкала).

16. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «Dynamic tube»/«Динамич.фон» и Slope Correct/Коррект. уклона». Установить More settings/Outlier Removal «Устранение выбросов» - 15%⁴.

17. В меню «CT Calculation»/«Вычисление CT» выставить Threshold/Порог =0,05

В таблице результатов (окно «Quant. Results»/«Количественные Результаты») появятся значения Ct.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

⁴ Если для отрицательных контролей этапов экстракции или ПЦР (BK-, K-) на канале Cycling A. Red при учете результатов по п. 8 Инструкции наблюдается некоторое нарастание флуоресценции с пересечением пороговой линии, измените «Устранение выбросов» до 20% и оцените прохождение контрольных образцов повторно

Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (Россия)

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора ДТ-96 или переустановки программы необходимо создать протокол с названием «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

1. Открыть программу «RealTime PCR» для прибора ДТ-96.
2. В появившемся окне выбрать «Работа с прибором».
3. В верхней части окна открыть вкладку «Тест» и «Создать/Редактировать тест»:
4. Нажать на кнопку «Создать новый тест» и введите имя нового теста «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР». Нажмите «ОК».
5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Пороговый (Ct)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – Fam; Cy5

Создать программу амплификации «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выберете шаблон  и нажмите кнопку «Применить».

7. В появившемся окне в соответствии с инструкцией к прибору задать программу амплификации с параметрами, указанными в таблице 5.

Таблица 5. Температурно-временной режим амплификации на ДТ-96.

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	56°C – 30 сек, детекция FAM, Cy5	
	72 °C– 30 сек	

Нажмите «ОК» и сохраните программу под именем «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР». При дальнейшей работе использовать созданный метод.

Проведение анализа

1. Включите прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.
2. Запустите на компьютере программу «RealTime PCR» для прибора ДТ-96.

3. В появившемся окне выберете **«Работа с прибором»** и **«Добавить тест»**. В окне добавления теста выберете **«ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР»**.

4. В разделе **«1. Образцы»** введите количество образцов включая все контрольные образцы. В разделе **«3. Контроли»** поставьте нули и нажмите **«ОК»**.

5. Пользуясь инструкцией к прибору заполните **«Идентификатор пробирки»** и **«Тип»**, обратите внимание на порядок заполнения. Нажмите кнопку **«Применить»**.

6. Установить пробирки в реакционный блок согласно порядку заполнения и нажать кнопку **«Запуск программы»**. В появившемся окне набрать название протокола и **«Сохранить»**.

7. После окончания реакции отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лабораторий.

Анализ результатов амплификации

1. После завершения реакции можно сразу приступить к анализу результатов, либо при следующей загрузке нажать **«Просмотр архива»**.

2. Далее нажать на иконку с изображением папки  и выбрать файл в котором был сохранен протокол. Выбрать тип анализа **«Ct(Cp) для всех каналов»**. Метод – **«Пороговый (Ct)»**.

В окне справа отобразятся названия образцов и значения пороговых циклов. Выбрать 10%. В позиции **Критерии достоверности данных** ввести: Нижняя граница/порог положительного результата-5%, верхняя граница/порог нормализации данных -30%

Нажать кнопку **«Применить»**.

3. Для получения сводного отчета по протоколу необходимо нажать кнопку .

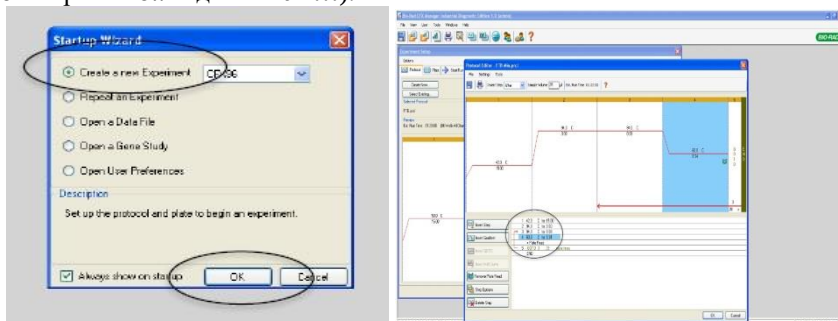
В верхней части окна нажать клавишу **«Печать»** или **«Сохранить»**, выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее **«Рабочий стол»** → **«ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР»** → **«Отчеты»** → **«Год»** → **«Месяц»**, в поле **«Имя файла»** ввести название в форме **«год.месяц.число-данные»**. Нажать **«Сохранить»**.

4. Закрыть или свернуть программу **«RealTime PCR»**.

Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 4. Порядок работы, учета и интерпретации результатов анализа на приборе CFX96

1. Включить прибор и запустить программу **Bio-Rad CFX Manager**.
2. В стартовом окне необходимо выбрать **Create a new Run** (или в меню **File** выбрать **New** и далее **Run...**).



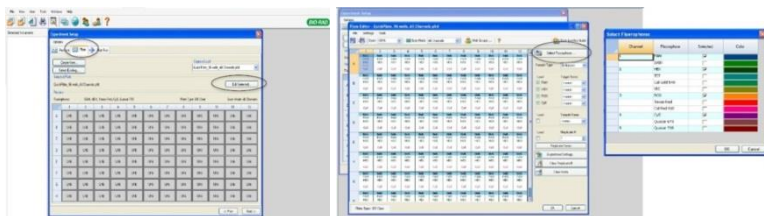
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии параметрами, указанными в таблице 6.

Таблица 6. Температурно-временной режим амплификации на CFX96.

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
3	95°C – 15 сек	45
	56°C – 30 сек, детекция FAM, Cy5	
	72 °C – 30 сек	

Задать объем реакционной смеси **Sample Volume – 25 мкл.**

4. Задать схему планшета – расположение пробирок и детекцию флуоресцентного сигнала во всех пробирках по нужным каналам в окне **Plate** модуля **Experiment Setup**. При использовании наборов реагентов для выявления одного микроорганизма в меню **Sample type** выбрать **Unknown**, нажав на кнопку **Select Fluorophores...**, выбрать галочками флуорофоры **FAM** и **Cy5** и нажать **OK**, затем задать галочками измерение флуоресцентного сигнала в выбранных пробирках по необходимым каналам. В окне **Sample name** задать название образцов. Сохранить схему планшета.



Открыть крышку прибора, нажав кнопку **Open Lid**. Поставить реакционные пробирки в ячейки амплификатора в соответствии с предварительно запрограммированной схемой планшета. Закрыть крышку прибора, нажав кнопку **Close Lid**.

5. Запустить выполнение выбранной программы «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» с заданной схемой планшета нажав кнопку **Start Run**.

6. После окончания выполнения программы можно приступить к анализу результатов.

Анализ результатов, полученных при использовании прибора CFX96

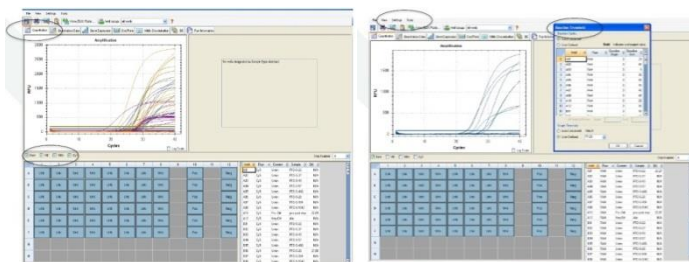
Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**. Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции данного образца с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла **Ct** в соответствующей графе в таблице результатов.

При использовании комплектов реагентов анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

- по каналу **FAM** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента **НК выявляемого микроорганизма**,
- по каналу **Sy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ВКО**.

Анализ результатов амплификации фрагмента НК выявляемого микроорганизма.

1. Выбрать в окне модуля **Data Analysis** во вкладке **Quantitation** данные по каналу **FAM**, выделив галочкой соответствующий бокс под графиком флуоресценции.



2. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «**K+**» в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой).
3. Чтобы выделить график образца «**K+**» (или другого желаемого образца) установить курсор в схеме планшета, либо в таблице результатов.
4. Чтобы установить уровень пороговой линии, необходимо либо перетащить ее с помощью левой кнопки мыши, либо выбрать меню **Baseline Threshold** (в ниспадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

Важно, чтобы график флуоресценции для образца «**K+**» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала.

В таблице результатов появится значение **Ct**.

Анализ результатов амплификации для Cy5/Red (ВКО).

Результаты интерпретируются следующим образом:

- А) НК микроорганизма **обнаружена**, если для данной пробы в таблице пороговых циклов по каналу **Cy5** определено значение **Ct**. При этом кривая флуоресценции данного образца должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.
- Б) НК микроорганизма **не обнаружена**, если для данной пробы в таблице в пороговых циклов по каналу **Cy5** в графе **Ct** указывается значение **N/A** (отсутствует пересечение графика флуоресценции с пороговой линией).
- С) Результат анализа **не валидный**, если для данной пробы отсутствует (не определено) значение порогового цикла **Ct** (т.е. указано **N/A**) по каналу **Cy5** и по каналу **FAM** значение **Ct** также отсутствует (**N/A**). В этом случае требуется повторно провести амплификацию с детекцией в режиме «реального времени» или повторить исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции НК.

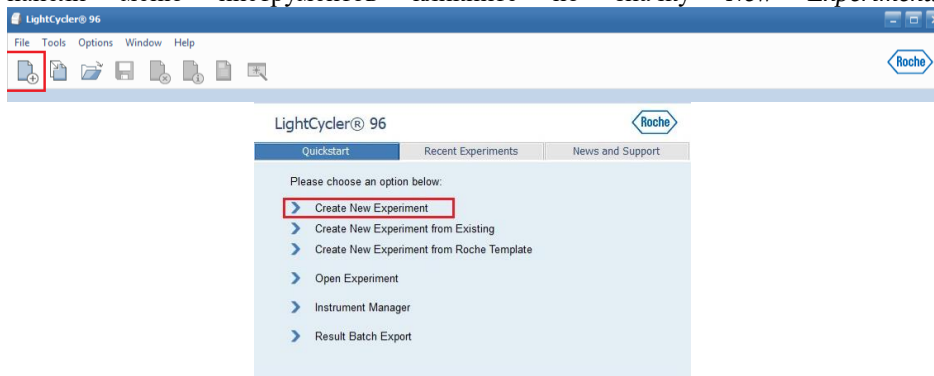
Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «**Ct**» для исследуемого образца).

Приложение 5. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

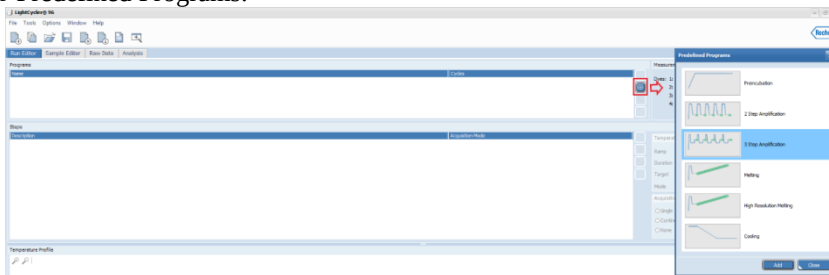
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

1. Откройте рабочую программу *LightCycler® 96*, для чего дважды кликните по значку запуска программы. Дождитесь загрузки меню и открытия основного окна после инициализации.

2. Выберите пункт *Create new Experiment (создать новый эксперимент)* либо в панели меню инструментов кликните по значку *New Experiment*.



3. В открывшемся окне выберите вкладку *Run Editor*, в боковой части окна *Programs* нажмите , после чего откроется окно *Predefined Programs*. В данном окне выберите *Preincubation*, нажмите кнопку *Add*, после чего в левой части экрана *Programs* появится стадия *Preincubation*. Аналогичным образом добавьте еще одну стадию *Preincubation* и стадию *3 step Amplification*, после чего закройте окно *Predefined Programs*.

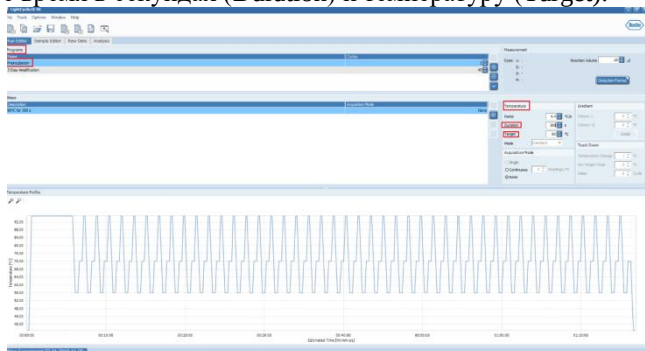


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

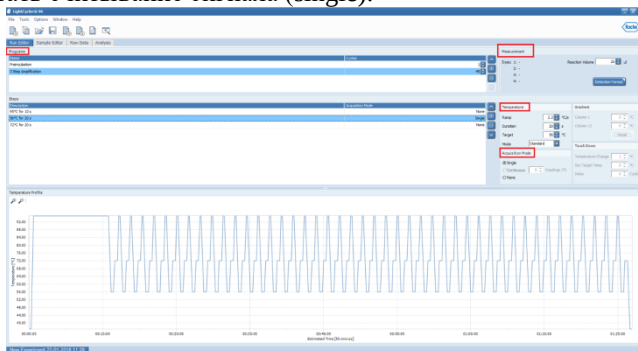
Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 1800 сек	1
2	95°C – 300 сек	1
3	95°C – 15 сек	45
	56°C – 30 сек, детекция FAM, Cy5	
	72 °C– 30 сек	

Для этого в левой верхней части окна в разделе Programs выберете Preincubation, далее в нижней правой части, в разделе Temperature задайте необходимое время в секундах (Duration) и температуру (Target).



Далее в левой верхней части окна в разделе Programs выберете 3 step Amplification и для каждого шага детекции аналогичным образом задайте необходимые время и температуру. Шаги детекции переключаются в левой нижней части окна в разделе Steps. В разделе Acquisition Mode на нужной стадии необходимо указать считывание сигнала (single).



В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

В окне Reaction Volume, в разделе Measurement (в правой части окна) укажите объем реакции равный 25 мкл.

Под Reaction Volume нажмите вкладку

Detection Format

и отметьте флуорофоры FAM и Cy5.

Detection Format

Channel 1, 470/214

Detected	Dye	Quant Factor	Heat Factor
☒	SYBR Green 1	20.00	1.20
☒	Hoechst	20.00	1.20
☒	Prop	20.00	1.20

Channel 2, 533/372

Detected	Dye	Quant Factor	Heat Factor
☒	VIC	20.00	1.20
☒	NTC	20.00	1.20
☒	Yellow-555	20.00	1.20

Channel 3, 577/820

Detected	Dye	Quant Factor	Heat Factor
☒	Red-640	20.00	1.20
☒	Texas Red	20.00	1.20

Channel 4, 645/687

Detected	Dye	Quant Factor	Heat Factor
☒	Cy5	20.00	1.20

Integration Time

☒ Dynamic ☐ Manual

OK Cancel

4. Перейдите на вкладку Sample Editor⁵ (правка образцов). Пустые лунки следует удалить, оставив только значимые данные, для чего выделите пустые ячейки с помощью левой кнопки мыши и нажмите кнопку в правой нижней части раздела Clear wells:

Sample Editor

Well: A1

Grid:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
B	Sample 13	Sample 14	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	Sample 21	Sample 22	Sample 23	Sample 24
C	Sample 25	Sample 26	Sample 27	Sample 28	Sample 29	Sample 30	Sample 31	Sample 32	Sample 33	Sample 34	Sample 35	Sample 36
D	Sample 37	Sample 38	Sample 39	Sample 40	Sample 41	Sample 42	Sample 43	Sample 44	Sample 45	Sample 46	Sample 47	Sample 48
E	Sample 49	Sample 50	Sample 51	Sample 52	Sample 53	Sample 54	Sample 55	Sample 56	Sample 57	Sample 58	Sample 59	Sample 60
F	Sample 61	Sample 62	Sample 63	Sample 64	Sample 65	Sample 66	Sample 67	Sample 68	Sample 69	Sample 70	Sample 71	Sample 72
G	Sample 73	Sample 74	Sample 75	Sample 76	Sample 77	Sample 78	Sample 79	Sample 80	Sample 81	Sample 82	Sample 83	Sample 84
H	Sample 85	Sample 86	Sample 87	Sample 88	Sample 89	Sample 90	Sample 91	Sample 92	Sample 93	Sample 94	Sample 95	Sample 96
I	Sample 97	Sample 98	Sample 99	Sample 100	Sample 101	Sample 102	Sample 103	Sample 104	Sample 105	Sample 106	Sample 107	Sample 108
J	Sample 109	Sample 110	Sample 111	Sample 112	Sample 113	Sample 114	Sample 115	Sample 116	Sample 117	Sample 118	Sample 119	Sample 120

Legend: Unknown, Standard, Positive control, Negative control, Non-specific transcription control

Clear wells

В окне Gene задайте наименования мишеней: Cy5 – vko, FAM – BTV

Gene

FAM: BTV

Cy5: Cy5

⁵ Образцы можно редактировать до или после поставки эксперимента: программа будет снимать данные флуоресценции по всем выбранным каналам детекции со всех 96 лунок по умолчанию

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control для положительных образцов, Type Negative control для отрицательных контрольных образцов, Type Unknown для исследуемых образцов и ВК- (ОКО)).

5. В панели инструментов кликните по значку *Save Experiment*, чтобы сохранить новый эксперимент.

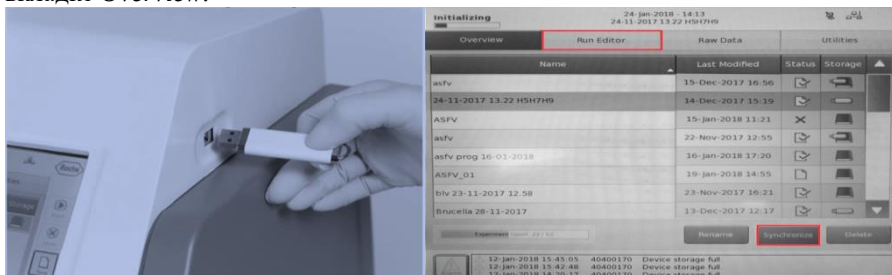


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла LightCycler® 96 (.lc96)

6. Эксперимент необходимо перенести в прибор: если прибор подключен через сетевой кабель (либо через WiFi) к компьютеру, то можно загрузить эксперимент через открытую рабочую программу LightCycler96, либо, если прибор автономен, можно воспользоваться USB носителем.

6.1 Перенос эксперимента в прибор с помощью USB носителя

Вставьте USB носитель с сохраненным на нем файлом эксперимента (.lc96) в порт USB, расположенный на правой панели прибора. Как только значок USB  появится на панели состояния программы прибора LightCycler® 96, файл эксперимента будет добавлен в таблицу экспериментов во вкладке *Overview*.

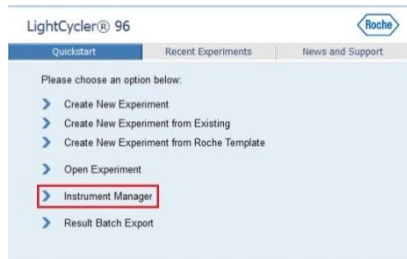


Файлы, сохраненные на USB носителе, обозначены значком . Файлы, сохраненные на приборе, обозначены значком , файлы, которые хранятся и на приборе и на USB носителе, обозначены двойным значком. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать *Synchronize*. Постановку эксперимента можно проводить напрямую с USB носителя, после ее

успешного завершения данные будут автоматически сохранены на USB носителе.

6.2. Перенос эксперимента в прибор с помощью рабочей программы LightCycler® 96

После сохранения эксперимента нажмите *Show Startup Wizard* . В появившемся окне выберите *Instrument Manager*:



В поле *Instrument* должен отобразиться прибор *LightCycler*. Затем перейдите на вкладку *Send/Receive Experiment* и в окне *You PC* выберите сохраненный эксперимент и нажмите . Эксперимент будет скопирован в память прибора. Дальнейший запуск программы необходимо производить с помощью сенсорной панели на самом приборе *LightCycler® 96*.

7. Запуск эксперимента

Эксперимент запускается с помощью сенсорного управления на передней части прибора.

Загрузите плашку либо пробирки с образцами в прибор *LightCycler® 96*. Нажмите *Start* на боковой панели общих команд основного окна программы прибора *LightCycler®*.



Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

9. Анализ и интерпретация результатов



Create: New Analysis

☒ Abs Quant

☐ Endpoint Genotyping

☐ High Resolution Melting

☐ Qualitative Detection

☐ Rel Quant

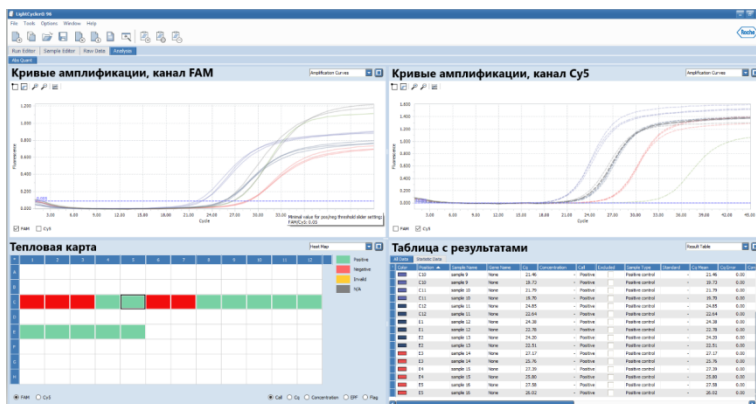
☐ Tm Calling

Analysis Name: Abs Quant

OK Cancel

Analysis

- Кривые амплификации
- Стандартные кривые⁶
- Тепловая карта
- Таблица с результатами



30

На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.

Внимание! Необходимо визуальнo оценить кривые амплификации как в сыром виде (вкладка Raw Date), так и после анализа (вкладка Analysis). Кривые должны иметь классическую s-образную форму. Образцы, форма которых не соответствует классической и для которых на канале Cy5(ВКО) наблюдается корректный результат необходимо исключить и считать отрицательными

Для образцов форма которых не соответствует классической и для которых на канале Cy5(ВКО) наблюдается некорректный или отрицательный результат необходимо провести повторный анализ с этапа экстракции.



Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 6. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 20.02.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 5 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»
Версия 1.2 от 25.07.2018	Пункт «6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб»	Добавлена сперма в качестве исследуемого материала
Версия 1.3 от 26.01.2021	стр. 15	Исправление по тексту
Версия 1.4 от 11.03.2021	стр. 11	Отредактирована интерпретация результатов для канала Cy5/RED
Версия 1.5 от 01.06.2021	стр. 5, стр. 9	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ- буфер, дистиллированную воду
Версия 1.6 от 17.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.7 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.8 от 18.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлен материал для исследования: сыворотка крови Отредактированы рекомендации по пробоподготовке образцов
Версия 1.9 от 28.04.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.10 от 28.09.2022	Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Сt)

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ПЦР-БЛЮТАНГ-ФАКТОР» либо других тест-систем нашего производства просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:

108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2

Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243

Email: vet@faktor.ru