



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР»
для типирования (идентификации субтипов Н5, Н7, Н9) вирусов гриппа А
(Influenza virus A) в биологическом материале методом реакции обратной
транскрипции и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной
детекцией в режиме реального времени (ОТ ПЦР РВ)**

ТУ 21.10.60-328-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Внимание!

Изменён температурно-временной режим амплификации!

Изменены каналы детекции!

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические и диагностические характеристики	6
4. Меры предосторожности	6
5. Материалы и оборудование.....	6
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) или Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	15
Приложение 3. Порядок работы на приборах ДТлайт и ДТпрайм (ДНК-технология, Россия)	19
Приложение 4. Порядок работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)	21
Приложение 5. Порядок работы на приборе LightCycler® 96	24
Приложение 6. Лист вносимых изменений	31

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 в режиме реального времени
ОТ	реакция обратной транскрипции
РНК	рибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор реагентов предназначен для типирования (идентификации) субтипов H5, H7, H9) вирусов гриппа А (Influenza virus A) в культурах вирусов гриппа, в биологическом материале, содержащем РНК вирусы гриппа А, 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

Типирование (идентификация) субтипов H5, H7, H9 проводится путем амплификации участков гена вируса гриппа А данных субтипов в присутствии трех флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов. Считывание флуоресцентного сигнала производится по трем каналам детекции приборов непосредственно в ходе ПЦР.

Детекция продуктов амплификации осуществляется в режиме реального времени с использованием принципа выщепления флуоресцентной метки на 5' конце олигонуклеотидного зонда.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения обратной транскрипции и мультиплексной 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 H5/H7/H9	прозрачная бесцветная жидкость *	275	550	1
2	Буфер для проведения ПЦР, ПЦР БУФЕР H5/H7/H9	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 М2	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 H5/H7/H9	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 основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Для этих целей рекомендуется использовать набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

* 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!

3. Аналитические и диагностические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении НК других микроорганизмов: вирусов *Parainfluenza 3 virus*, *Rotavirus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов НК от здоровых животных.

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 №158 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 24.03.2021 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 высокопатогенного гриппа птиц».

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, натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты, 0,2%).

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 РНК 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 -24 до -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; «ДТпрайм», 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 -24 до -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, «Ахуген», 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:

- Фекалии весом 5 г отбирают в стерильный пластиковый контейнер;
- Фрагменты внутренних органов (селезенка, легкие, плацента, кишечник) помещают в стерильный контейнер;
- Мазки со слизистой глотки и трахеи, соскобы из клоаки птиц берут сухими ватными зондами. Зонд с материалом помещают для транспортировки в пробирки со стерильным физиологическим раствором (конец отламывают, что бы пробирку можно было закрыть);
- Лимфоузлы берут целиком;
- Цельная кровь;
- Куриные эмбрионы, яйца;
- Мясо птицы, свинина, продукты переработки, субпродукты, корма;
- 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.

Отбор образцов продукции проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп сырья, пищевых продуктов и кормов. Транспортируют образцы в одноразовых стерильных контейнерах

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

- при температуре 2 - 8 °С - в течение 1 суток;
- при температуре не выше минус 16 °С - в течение 1 недели;
- при температуре не выше минус 68 °С - длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемого материала

Пробы цельной крови, консервированной ЭДТА, мазки и смывы со слизистой глотки и трахеи, соскобы из клоаки, 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.

Из фекалий/помета (1-5 г) готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе. Взвесь фекалий декантируют в течении 5-10 минут. Отбирают 1 мл надосадочной жидкости и переносят в чистую пробирку 1,5 мл, центрифугируют при 5000 об./мин² на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5 мин. Экстракцию РНК из осветленного экстракта фекалий проводят по возможности, сразу. При необходимости хранения замораживают.

Для получения сыворотки пробирки с кровью (без антикоагулянта) отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 4000 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.

Из тканей и органов вырезают небольшие кусочки до 1 г весом. Растирают пробы в отдельных фарфоровых ступках или гомогенизируют на автоматических гомогенизаторах. 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 на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, в течение 5-10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости (0,1 мл) используют для экстракции РНК.

При исследовании куриных эмбрионов в скорлупе прокалывают отверстие и отбирают стерильным шприцем в пробирку объемом 1,5 мл 1,0-1,5 мл аллантоисной жидкости.

От образцов кормов отбирают пробы согласно национальным стандартам и тщательно гомогенизируют. При использовании набора реагентов, не предназначенного для выделения НК из кормов (напр., «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»), допускается экстракция из 100 мкл 10% суспензии образца – в таком случае перед экстракцией суспензию необходимо центрифугировать при 2000 об./мин 5-10 мин.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

² Радиус ротора центрифуги «MiniSpin» «Eppendorf» составляет 6 см. При использовании роторов большего размера необходимо уменьшить обороты при центрифугировании, при использовании роторов меньшего радиуса – увеличивать. Например, при использовании ротора с радиусом 9 см необходимо снизить обороты до 4100 об/мин

7. Проведение анализа

Анализ с помощью набора реагентов «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-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 М2**.

Внести исследуемые пробы в объеме согласно инструкции, к набору для выделения НК, в пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО³ (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 Н5Н7Н9, ВКО М2 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 Н5Н7Н9

5 мкл ПЦР СМЕСЬ Н5Н7Н9

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.

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (К-) 10 мкл РНК буфера;

³ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

б) в ряд пробирок для исследуемых проб – в каждую внести по 10 мкл НК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);

в) в пробирку с положительным контролем ПЦР (К+) 10 мкл ПКО Н5Н7Н9.

Примечание. При использовании для работы амплификаторов с считыванием через крышку, **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», «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 к 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 НК в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Оценка результатов анализа.

	FAM/Green	JOE(HEX)/ Yellow	ROX/Orange	Cy5/Red	Результат
	<i>H9</i>	<i>H7</i>	<i>H5</i>	<i>BKO</i>	
ПКО (K+)	До 31	До 31	До 31	до 31	Реакции положительного и внутреннего контролем прошли успешно
РНК буфер (K-)	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Реакция прошла успешно
	Любое значение	Любое значение	Любое значение	Сигнал отсутствует	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Любое значение	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО (BK-)	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 32	Экстракция прошла успешно
	Любое значение	Любое значение	Любое значение	Сигнал отсутствует или любое значение	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >32	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	Любое значение от 1 до 33	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>РНК субтипа H9 вируса гриппа А присутствует</i>
	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 33	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>РНК субтипа H7 вируса гриппа А присутствует</i>
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 33	Сигнал отсутствует или любое значение	Результат анализа положительный. <i>РНК субтипа H5 вируса гриппа А присутствует</i>
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Любое значение от 1 до 32	Результат анализа отрицательный
	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует	Сигнал отсутствует или значение Ct >32	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

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

случае если значение C_t для ВКО в K^+ отсутствует или превышает граничное, а в ВК- и образцах менее граничного – результаты можно считать достоверными.

Результат анализа сомнительный, если для данной пробы значение порогового цикла C_t по соответствующему каналу превышает 33 цикл. В этом случае требуется повторить ПЦР-исследование соответствующего образца. При повторении результатов или получении значения C_t менее порогового цикла, образец следует считать положительным.

ВНИМАНИЕ! При получении сомнительных результатов, а также при появлении любого значения C_t 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 C_t на любом из каналов свидетельствует о внутрилабораторной контаминации.

9. Условия транспортирования

Транспортирование набора «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР» должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Длительное хранение набора «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20°С. 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°С;

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

11. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-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 H5/H7/H9, мкл	Объем ПЦР СМЕСИ H5/H7/H9, 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

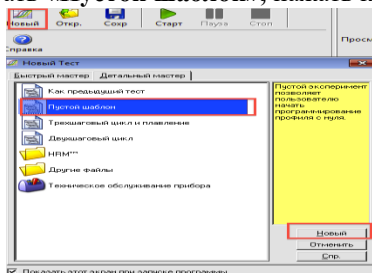
Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)

В случае первого использования ПЦР-набора на приборе необходимо создать протокол с названием «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР» (при дальнейшей работе используют созданный шаблон).

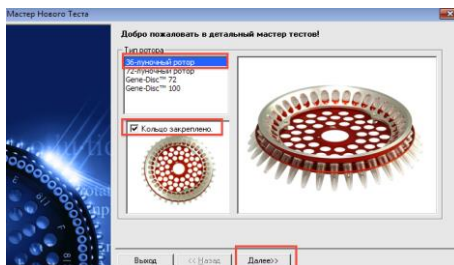
Термины, соответствующие разным версиям программного обеспечения, расположены по тексту в следующем порядке: для прибора «Rotor-Gene» 3000 / для англоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 (Q)/ для русскоязычной версии программы «Rotor-Gene» 6000 (Q).

1. Открыть программу «Rotor Gene Q».

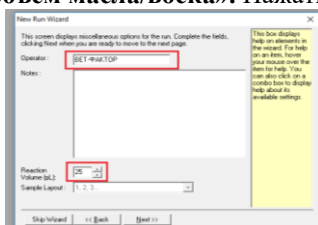
2. Выбрать в основном меню программы значок «New»/«Новый В открывшемся окне выбрать «Пустой шаблон», нажать кнопку «New»/«Новый



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 со следующими параметрами, указанными в таблице 4.

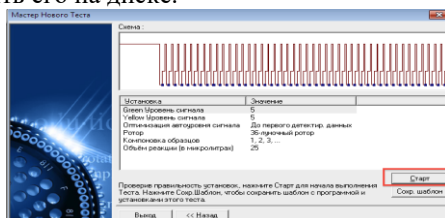
Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации на Rotor-Gene

№ п/п	Температурно-временной режим Rotor-Gene	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
	95°C – 5 мин	
2	95°C – 10 сек	10
	56°C – 15 сек	
	72°C – 20 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°C – 15 сек, детекция FAM/Green, Joe/Yellow, Rox/Orange, Cy5/Red	
	72°C – 20 сек	

Нажать клавишу **«OK»**.

6. В нижней части окна мастера тестов нажать кнопку **«Calibrate/Gain Optimisation...»/«Опт.уровня сигн.»**. В открывшемся окне нажать кнопку **«Опт.детек-мых»**. Для каждого канала 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»**. Заккрыть окно **«Авто-оптимизация уровня сигнала»**. Нажать кнопку **«Next»/«Далее»**.

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



8. После запуска программы необходимо запрограммировать положение пробирок в роторе. Все пробы и контроли обозначить в меню Тип как **Unknown «Образец»**.

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

2. Для канала **Hex/Yellow**

2.1. Нажать в меню кнопку «**Analysis**»/«**Анализ**», выбрать режим анализа «**Quantitation**»/«**Количественный**», нажать кнопку «**Cycling A. HEX**»/ «**Cycling A. Yellow**», далее «**Show**»/«**Показать**»

2.2. 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).

2.3. В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**/«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 20%.

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

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

3. Анализ результатов канала **Cy5/Red**

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

3.2 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).

3.3 В меню основного окна должны быть нажаты кнопки «**Dynamic tube**»/«**Динамич.фон**» и **Slope Correct**/«**Коррект. уклона**». Установить **More settings/Outlier Removal** «**Устранение выбросов**» - 10-20%.

3.4 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.

Приложение 3. Порядок работы на приборах ДТлайт и ДТпрайм (ДНК-технология, Россия)

Подготовка к работе

В случае первого использования прибора ДТ или переустановки программы необходимо создать протокол с названием **«ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР»**.

1. Открыть программу **«RealTime PCR»** для прибора ДТ.
2. В появившемся окне выбрать **«Работа с прибором»**.
3. В верхней части окна открыть вкладку **«Тест»** и **«Создать/Редактировать тест»**:
4. Нажмите на кнопку **«Создать новый тест»** и введите имя нового теста **«ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР»**:

Нажмите **«ОК»**.

5. В появившемся окне задать следующие параметры:

Тип – качественный

Метод – Геометрический (Ср)

Пробирки – образцы

Объем рабочей смеси в пробирке – 25 мкл

Флуорофоры – FAM, HEX, ROX, Cy5

Создать программу амплификации **«ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР»** нажав на иконку .

6. В редакторе программ амплификации выбрать  шаблон и нажать кнопку **«Применить»**.

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

Таблица №5 Температурно-временной режим амплификации на ДТлайт и ДТпрайм.

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
	95°C – 10 сек	10
	56°C – 15 сек	
	72°C – 20 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°C – 15 сек, детекция FAM, Hex, Rox, Cy5	
	72°C – 20 сек	

Детекцию осуществлять после стадии отжиг. Нажмите **«ОК»** и сохраните программу под именем **«ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР»**. При дальнейшей работе использовать созданную программу.

Проведение анализа

1. Включить прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

2. Запустить на компьютере программу «RealTime PCR» для прибора ДТ.
3. В появившемся окне выбрать «Работа с прибором» и «Добавить тест». В окне добавления теста выберете «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР».
4. В разделе «1. Образцы» ввести количество образцов включая контрольные образцы. В разделе «3. Контроли» поставить нули и нажать «ОК».
5. Пользуясь инструкцией к прибору заполнить «Идентификатор пробирки» и «Тип», обратить внимание на порядок заполнения. Нажать 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.

Расчет значений порогового цикла

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 

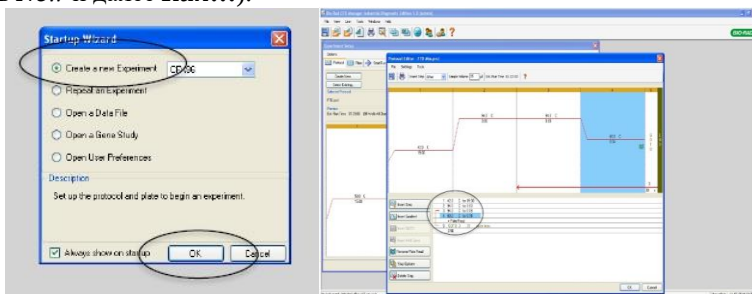
В верхней части окна нажать клавишу «Печать» или «Сохранить», выбрать расширение файла, например *.rtf MS Word, далее «Рабочий стол» → «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-ФАКТОР» → «Отчеты» → «Год» → «Месяц», в поле «Имя файла» ввести название в форме «год.месяц.число-данные». Нажать «Сохранить».

4. Нажать клавишу «Заккрыть».
5. Заккрыть 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 на приборе CFX96 (Bio-Rad, США)

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...**).



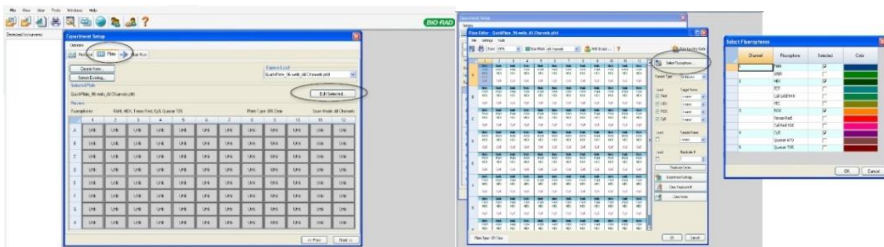
3. В окне **Run Setup** выбрать вкладку **Protocol** и нажать кнопку **Create new....** В появившемся окне **Protocol Editor – New** задать параметры амплификации в соответствии с данными из таблицы 7:

Таблица №7 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 – 10 сек	10
	56°C – 15 сек	
	72°C – 20 сек	
4	95°C – 10 сек	35
	56°C – 15 сек, детекция FAM, Hex, Rox, Cy5	
	72°C – 20 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, HEX, ROX, 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-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-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

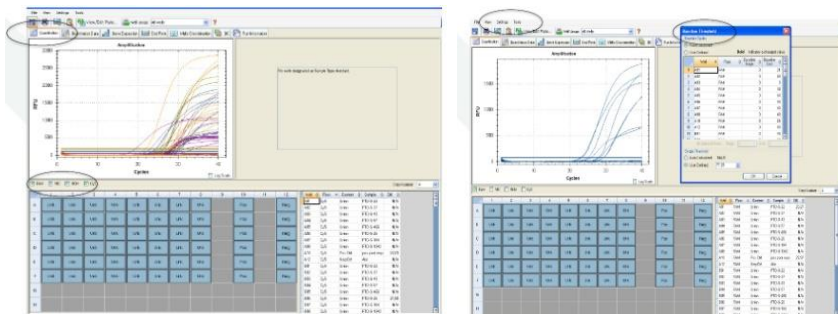
Полученные данные анализируются с помощью программного обеспечения прибора **CFX96**. Результаты анализируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения графика флуоресценции данного образца с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию)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

При использовании комплектов реагентов анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по 4каналам:

- по каналу для флуорофора FAM/Green регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинина вируса гриппа А субтип Н9,
- по каналу для флуорофора JOE/Hex регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинина вируса гриппа А субтип Н7,
- по каналу для флуорофора ROX/Orange регистрируется сигнал, свидетельствующий о продукте амплификации фрагмента кДНК гена гемагглютинина вируса гриппа А субтип Н5.
- по каналу **Sy5** регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации **ВКО**.

Анализ результатов амплификации для каналов FAM, HEX, ROX

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



2. Установить пороговую линию на уровне, соответствующем **10-20 %** от максимального уровня флуоресценции, полученного для образца «ПК» (ПКО) в последнем цикле амплификации (уровень флуоресценции считают равным ближайшему к нему делению шкалы, помеченному цифрой). При этом необходимо, чтобы график флуоресценции для образца «ПК» показывал характерное экспоненциальное нарастание флуоресцентного сигнала. Можно использовать автоматически выбираемый уровень пороговой линии (по умолчанию), если он попадает в указанный диапазон.

3. Чтобы выделить график образца «ПК» (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 выпадающем меню, вызываемом щелчком правой кнопки мыши по окну графиков флуоресценции), затем выбрать опцию **User Defined** и ввести нужное значение в текстовом поле.

5. Анализ результатов амплификации **ВКО**, регистрируемых по каналу **Cy5**. Выполнить аналогичные операции для данных по каналу **Cy5**.

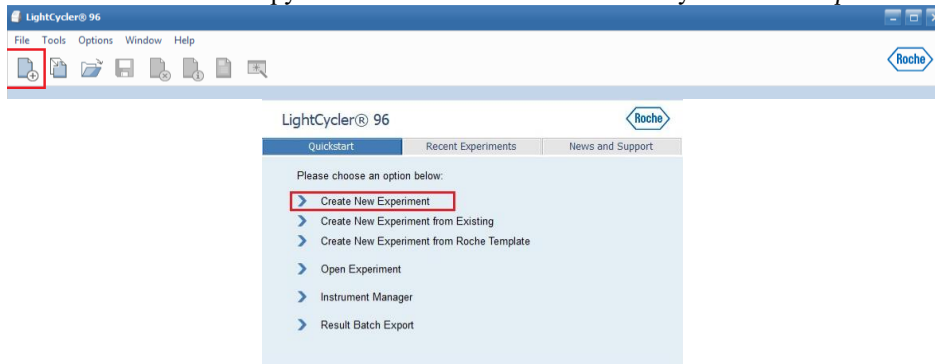
Учет результатов ПЦР-анализа проводится в соответствии с п.8 Инструкции по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» для исследуемого образца.

Приложение 5. Порядок работы на приборе LightCycler® 96

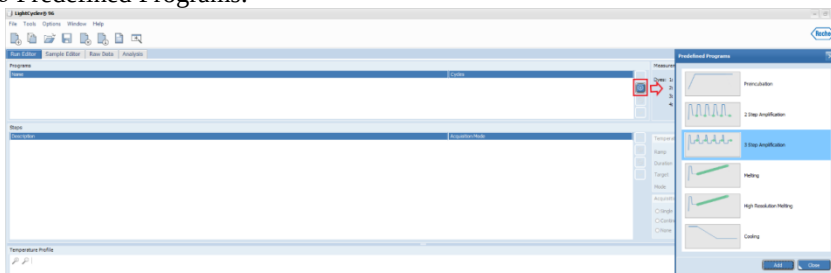
Перед началом работы включите прибор *LightCycler® 96* с помощью переключателя на задней панели прибора. Далее прибор проведет автоматическое тестирование (см. инструкцию к прибору), следует дождаться его окончания.

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*.

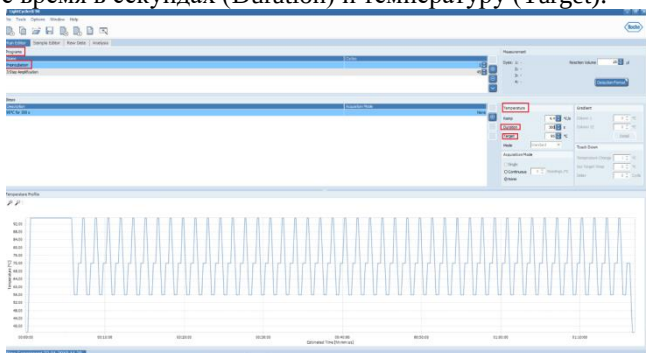


Задайте параметры амплификации в соответствии с параметрами, указанными в таблице 7.

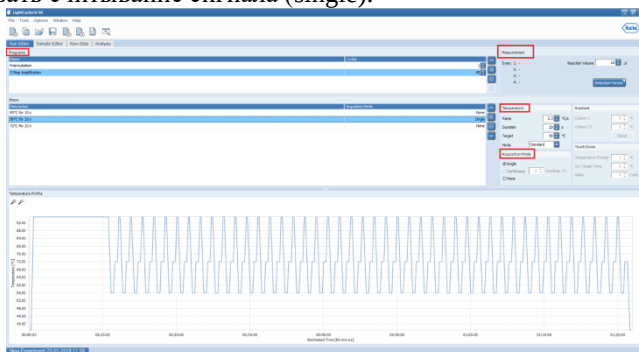
Таблица 7. Температурно-временной режим амплификации на LightCycler® 96

№ п/п	Температурно-временной режим	Число циклов
1	50°C – 30 мин	1
2	95°C – 5 мин	1
	95°C – 10 сек	10
	56°C –15 сек	
	72°C – 20 сек	
3	95°C – 10 сек	35
	56°C – 15 сек, детекция FAM, Hex, Texas Red, Cy5	
	72°C – 20 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).



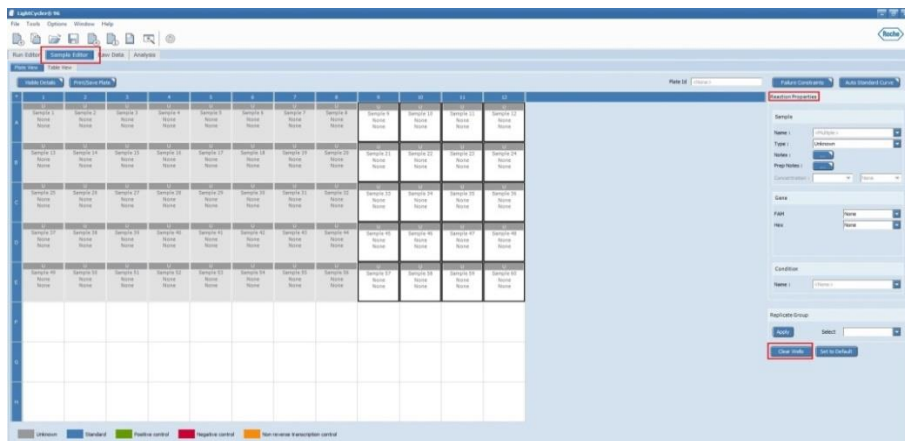
В столбце Cycles с помощью стрелок вверх и вниз задайте необходимое число циклов для каждого этапа.

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

Под Reaction Volume нажмите вкладку  и отметьте флуорофоры FAM, HEX, Texas Red и Cy5.



4. Перейдите на вкладку Sample Editor⁴ (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:



В окне Gene задайте наименования мишеней: FAM – H9, HEX - H7, Texas Red – H5, Cy5 - VKO.

В правой части, в разделе Reaction properties отредактируйте образцы: задайте названия и установите тип исследуемых образцов (Type Positive control

⁴ Образцы можно редактировать до или после поставки эксперимента: программа будет снимать данные флуоресценции по всем выбранным каналам детекции со всех 96 лунок по умолчанию.

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.

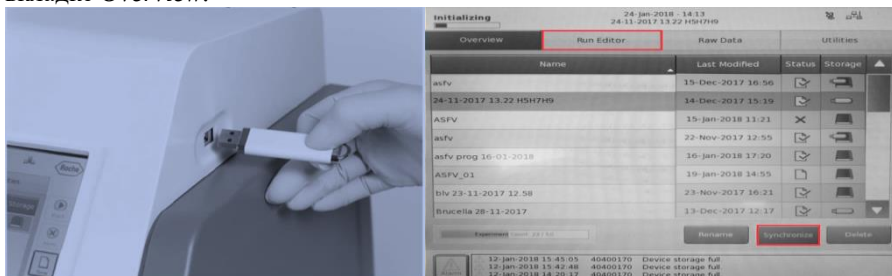


После открытия диалогового окна *Save As* выберите директорию, в которой хотите сохранить файл эксперимента. Введите имя файла эксперимента (латиницей) и нажмите *Save*. Диалоговое окно закроется, эксперимент сохранится в виде файла *LightCycler® 96 (.lc96)*

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*.

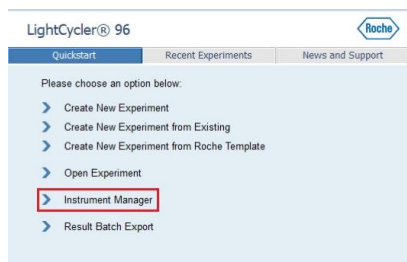


Файлы, сохраненные на USB носителе, обозначены значком . Файлы, сохраненные на приборе, обозначены значком , файлы, которые хранятся и на приборе, и на USB носителе, обозначены двойным значком. Для того чтобы перенести файл на прибор (и наоборот), необходимо нажать *Synchronize*. Постановку эксперимента 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®.

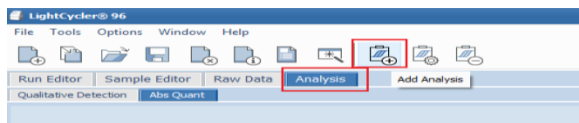


Выберите вкладку *Raw Data*, чтобы наблюдать процесс выполнения постановки.

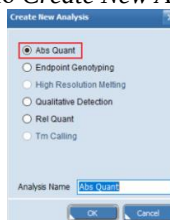
8. После завершения постановки необходимо перенести первичные данные, полученные программой прибора для проведения анализа в рабочую программу с помощью USB носителя либо с помощью сетевого подключения к прибору.

9. Анализ и интерпретация результатов

Откройте файл завершенного анализируемого эксперимента (со значком ) в рабочей программе LightCycler® 96. Откройте вкладку *Analysis*. На панели инструментов кликните по значку *Add Analysis*, чтобы добавить новый анализ.

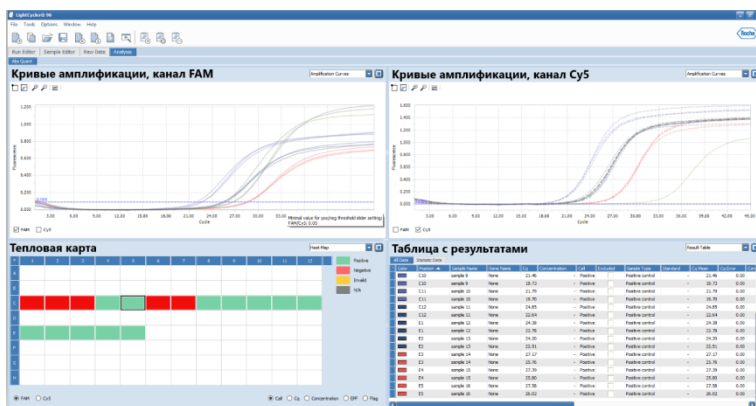


Откроется диалоговое окно *Create New Analysis*. Выберите *Abs Quant*



Нажмите *OK*. Во вкладке *Analysis* в соответствии с исходными настройками находятся четыре окна с результатами эксперимента:

- *Кривые амплификации*
- *Стандартные кривые⁵*
- *Тепловая карта*
- *Таблица с результатами*

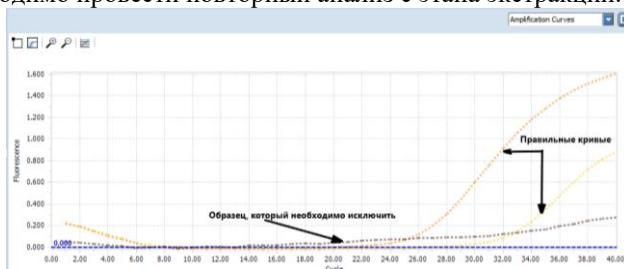


На тепловой карте (левое нижнее окно на рисунке) зеленым цветом обозначаются положительные образцы, красным цветом обозначаются отрицательные образцы.

Внимание! Необходимо визуально 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

⁵ окно Стандартные кривые не будет содержать никаких данных, поскольку в наборах не предусмотрен вариант количественного анализа

Для образцов, форма которых не соответствует классической и для которых на канале Су5(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 21.12.2017	Пункт 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлены куриные яйца, эмбрионы и цельная кровь как исследуемый материал
Версия 1.2 от 20.02.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Добавлено Приложение 5 «Порядок работы на приборе LightCycler® 96»
Версия 1.3 от 02.04.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Изменены параметры температурно-временных режимов амплификации
Версия 1.4 от 13.09.2018	Раздел «Приложения» Инструкции	Изменены параметры температурно-временных режимов амплификации
Версия 1.5 от 23.11.2020	Пункт 1 «Назначение»	По тексту
Версия 1.6 от 01.12.2020	Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	Устранение выбросов уменьшено до 10-15%
Версия 1.7 от 26.04.2021	Приложение 2. Порядок работы на приборах Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия) или Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия)	Увеличен параметр «Устранение выбросов» для канала Hex/Yellow до 20%

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.8 от 01.06.2021	стр. 5, стр. 9	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.9 от 31.08.2021	Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Изменен метод обработки данных: вместо «Пороговый (Ст)» - рекомендован «Геометрический (Ср)»
Версия 1.10 от 17.11.2021	По тексту	Добавлен материал: культуры микроорганизмов и питательные среды. Изменения по тексту
Версия 1.11 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.12 от 22.02.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке образцов
Версия 1.13 от 28.04.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала
Версия 1.14 от 15.07.2022	По тексту	Изменён состав набора: ВКО М1 заменён на ВКО М2
Версия 1.15 от 28.09.2022	Приложение 3. Порядок работы на приборе ДТ-96 (ДНК-технология, Россия)	Геометрический (Ср) метод обработки данных заменён на пороговый (Ст)

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.16 от 13.10.2022	Раздел 8. Интерпретация результатов анализа. Раздел «Приложения» Изменения по тексту	Изменены каналы детекции – теперь ROX для Н5, FAM для Н9. Изменен температурно-временной режим амплификации. Увеличено значение St для положительного результата. Добавлен прибор ДТлайт. Изменения по тексту
Версия 1.17 от 20.10.2022	Раздел «Приложения» Инструкции	Изменён температурно-временной режим амплификации

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ПЦР-ГРИПП-ТИП-Н5/Н7/Н9-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