

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 28.07.11 № 4583-Пр/11

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и
благополучия человека



В.И.Покровский

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК полиовирусов и
энтеровирусов группы С (*HEV-C*) с дифференцировкой
вакцинных штаммов полиовирусов (*Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3*) в
объектах окружающей среды и клиническом материале
методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с
гибридизационно-флуоресцентной детекцией
«АмплиСенс® Poliovirus-FL»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.....	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ...	8
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК	8
ВАРИАНТ FEP.....	10
СОСТАВ	10
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	11
РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ.....	11
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»	11
ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ».....	14
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	15
ВАРИАНТ FRT.....	19
СОСТАВ	19
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	20
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».....	20
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	22
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ВКО	- внутренний контрольный образец для наборов с гибридно-флуоресцентной детекцией
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ПКО	- положительный контрольный образец
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнад- зора	- федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
FEP	- детекция по «конечной точке»
FRT	- детекция в режиме «реального времени»

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «АмплиСенс® *Poliovirus-FL*» предназначен для выявления РНК полиовирусов и энтеровирусов группы С (*HEV-C*) с дифференцировкой вакцинных штаммов полиовирусов (*Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3*) в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией.

В соответствии с действующей в РФ нормативно-методической документацией клинический материал от пациентов с подозрением на полиомиелит, острыми вялыми параличами должен исследоваться в соответствии с МУК 4.2.2410-08. «Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)».

ВНИМАНИЕ! Результаты ПЦР-исследования учитываются в комплексной характеристике исследуемых образцов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод основан на одновременной амплификации в двух реакционных пробирках (формат «мультиплекс-ПЦР») и детекции в режиме «реального времени» или по окончании амплификации участков кДНК полиовирусов и энтеровирусов группы С (*HEV-C*), вакцинных штаммов полиовирусов (*Sabin 1, Sabin 2, Sabin 3*), а также участка внутреннего контрольного образца (ВКО). Реакционная смесь содержит

олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченные гибридизационные зонды (ФМ-зонды), которые комплементарны внутренним специфическим участкам амплифицируемого фрагмента. Флуоресцентный сигнал, испускаемый ФМ-зондом, детектируется оптическим блоком амплификатора непосредственно в процессе реакции в «режиме реального времени» (формат FRT) или флуоресцентным детектором по окончании амплификации (формат FEP). ФМ-зонды для каждой из мишеней имеют свою длину волны, что позволяет регистрировать сигнал по соответствующему каналу. Для детекции семи возбудителей и ВКО используется амплификатор или флуоресцентный детектор с оптическим блоком, имеющим 3 и более каналов.

ВАРИАНТЫ И ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 1 варианте.

Вариант FEP/FRT

Набор реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F.

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации участков кДНК полиовирусов и энтеровирусов группы С (*HEV-C*), вакцинных штаммов полиовирусов (*Sabin 1*, *Sabin 2*, *Sabin 3*) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке», либо в режиме «реального времени». Для проведения полного ПЦР-исследования необходимо использовать комплекты реагентов для экстракции (выделения) РНК и проведения реакции обратной транскрипции, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора («РИБО-сорб» или «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-L») или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Таблица 1

Аналитическая чувствительность набора реагентов «АмплиСенс® Poliovirus-FL»

Вид исследуемого материала	Комплект для выделения ДНК	Комплект для амплификации и детекции	Аналитическая чувствительность, ГЭ/мл
Концентрат воды	«РИБО-сорб»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	1x10 ³
Фекалии	«РИБО-преп»	«ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F	5x10 ³

Аналитическая специфичность

Специфичность набора реагентов проверялась на штаммах: энтеровирусов (*Coxsackie* B1, B2, B3, B4, B5, B6; *Polio (Sabin)* I, II, III), вирусов гриппа А (H13N2, H9N2, H8N4, H2N3, H4N6, H11N6, H12N5, H3N8, H1N1, H6N2, H10N7, H5N1), гриппа В, риновирусов, RS вирусов, аденовирусов человека - 3, 5, 7, 37, 40 типов. Специфичность оценивалась также на штаммах *N.meningitidis*, *St. pneumoniae*, *H.influenzae*, *Clebsiella* K 65 SW4, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 19, *Listeria monocytogenes* УСХЧ 52, *Proteus vulgaris* 115/98, *Pseudomonas aeruginosa* ДН с1, *Staphylococcus aureus* 653, *Staphylococcus aureus* 29112, *Morganella Morganii* 619 с 01, *Enterobacter faecalis* 356.

При проведении тестирования данных панелей, а также образцов ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР

материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III–IV групп патогенности».

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Спецификация по безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступна по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Комплект реагентов для выделения РНК – «РИБО-сорб» (ТУ 9398-004-01897593-2008), «РИБО-преп» (ТУ 9398-071-01897593-2008) или другие рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции

РНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения РНК.

3. Комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции - «РЕВЕРТА-L» (ТУ 9398-005-01897593-2008).
4. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
5. Центрифуга/вортекс.
6. Автоматические дозаторы переменного объема от 5 до 20 мкл и от 20 до 200 мкл.
7. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл и 200 мкл в штативах.
8. Штативы для микропробирок объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с используемыми комплектами реагентов).
9. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для выделенных проб ДНК.
10. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
11. Емкость для сброса наконечников.

При детекции «по конечной точке»:

12. Программируемый амплификатор (например, «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), Gradient Palm Cyclor (Corbett Research, Австралия), МахуGene (Ахуген, США), GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) или аналогичные).
13. Флуоресцентный ПЦР-детектор (например, ALA-1/4 (BioSan, Латвия), «Джин» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).
14. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР (плоская крышка, нестрипованные) на 0,2 или 0,5 мл:
 - а) объемом 0,2 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,2 мл (Gradient Palm Cyclor, GeneAmp PCR System 2700, МахуGene и др.);
 - б) объемом 0,5 мл (например, Ахуген, США) – для амплификаторов, адаптированных для ПЦР-пробирок 0,5 мл («Терцик» и др.).

При детекции в режиме «реального времени»:

14. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (например, Rotor-Gene 3000/6000 (Corbett Research, Австралия), iQ iCycler, iQ5 (Bio-Rad, США), Mx3000P

(Stratagene, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия) или аналогичные).

15. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР:

- а) на 0,2 мл (плоская крышка, нестрипованные), (например, Ахуген, США) для постановки в ротор на 36 пробирок – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через дно пробирки (например, Rotor-Gene);
- б) на 0,2 мл (куполообразная крышка) (например, Ахуген, США) – для приборов для ПЦР в реальном времени с детекцией через крышку (например, iQ5, Mx3000P).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г. Материалом для проведения ПЦР служат стерильные и нестерильные типы клинического материала и концентраты воды.

В соответствии с действующей в РФ нормативно-методической документацией клинический материал от пациентов с подозрением на полиомиелит, острыми вялыми параличами должен исследоваться в соответствии с МУК 4.2.2410-08. «Организация и проведение вирусологических исследований материалов от больных полиомиелитом, с подозрением на это заболевание, с синдромом острого вялого паралича (ОВП)».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ РНК

Все манипуляции, связанные с подготовкой проб, проводятся с использованием дозаторов переменных объемов, одноразовых полипропиленовых пробирок, наконечников с фильтрами и др. материалов в соответствии с документами, перечисленными в разделе «Меры предосторожности».

1. Образцы СМЖ и концентратов воды не требуют предварительной подготовки.
2. Фекалии: получение осветленного фекального экстракта, приготовление 10-20 % фекальной суспензии (фекалии

водянистой консистенции могут использоваться без приготовления суспензии).

- образцы проб фекалий объемом до 1,0 мл (по 0,4–1,0 г) отбирают стерильным шпателем и помещают в стерильный флакон;
- к образцу фекалий добавляют 4,0 мл физраствора до образования 10-20 % суспензии;
- взвесь фекалий интенсивно встряхивают на вортексе до образования суспензии;
- осветляют полученную суспензию путем центрифугирования в течение 20 мин при 3 тыс об/мин;
- надосадочная жидкость (осветленный экстракт фекалий) используют для выделения РНК. При необходимости хранения отбирают в одноразовую пробирку и замораживают;
- осветленный экстракт фекалий может храниться в течение 1 сут при температуре от 2 до 8 °С, при температуре не выше минус 16 °С – до 1 мес с глицерином, при температуре не выше минус 68 °С и с глицерином – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

**ВАРИАНТ FEP
СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации кДНК возбудителей *Poliovirus* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО кДНК HEV-C	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК Sabin 1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО STI-87-rec ¹	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов;
- проведение реакции обратной транскрипции;
- проведение амплификации;
- флуоресцентная детекция продуктов амплификации по

¹ В случае применения комплекта «РИБО-сорб» использовать ВКО STI-87-rec объемом 10 мкл на пробу.

- «конечной точке»;
- интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции РНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-гес). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

Реакцию обратной транскрипции провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов «РЕВЕРТА-Л» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией производителя. Допускается использование кДНК, полученной при использовании набора реагентов «АмплиСенс® *Enterovirus-FL*».

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ И ДЕТЕКЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (полимеразы (TaqF)), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. табл. 2). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого или контрольного

образца кДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+, ВК+), отрицательного контроля (К-) и двух пробирок «Фон»). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов кДНК и пробирок «Фон». Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от используемого прибора.
3. Для приготовления реакционных смесей и смесей для пробирок «Фон» необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать каждую из **ПЦР-смесей-1 (ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI, ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3)** с **ПЦР-смесью-2-FRT** и **полимеразой (TaqF)** согласно табл. 2. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

Таблица 2

**Схема приготовления реакционных смесей для
детекции по «конечной точке»**

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10.00	5.00	0.50
Число реакций ²	ПЦР-смесь-1-FL	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
10	100	50	4.0
12	120	60	5.0
14	140	70	6.0
16	160	80	7.0
18	180	90	8.0
20	200	100	9.0
22	220	110	10.0
24	240	120	11.0
26	260	130	12.0
28	280	140	13.0
30	300	150	14.0
32	320	160	15.0

² - при работе с ПЦР-смесью-1-FL HEV-C / STI - число исследуемых образцов, включая контроль этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+5+1);

- при работе с ПЦР-смесью-1-FL Sabin 1/2/3 - число исследуемых образцов, включая контроль этапа выделения ДНК (N), контроли этапа ПЦР и пробирки «Фон» с запасом на один образец (N+4+1).

ВНИМАНИЕ! Количество добавляемой в реакционную смесь полимеразы (TaqF), указанное в табл. 2, приведено с учетом уже отобранных **30 мкл** реакционной смеси для двух пробирок «Фон».

4. Приготовить 2 пробирки «Фон» для каждого наименования **ПЦР-смеси-1-FL**. Для этого внести по **15 мкл** приготовленной смеси (без полимеразы (TaqF)) в обе пробирки «Фон», добавить по **10 мкл ДНК-буфера**, перемешать пипетированием. Сверху раскапать по 1 капле **минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
5. В оставшуюся часть реакционной смеси добавить **полимеразу (TaqF)** в количестве, согласно табл. 2. Тщательно перемешать смесь на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.
6. Внести в оставшиеся пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей. Сверху раскапать по **1 капле минерального масла для ПЦР** (примерно 25 мкл).
7. Используя наконечники с фильтром, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.

ВНИМАНИЕ! При добавлении кДНК-проб необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

8. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл** ПКО кДНК *HEV-C* для ПЦР-смеси-1-FL *HEV-C / STI* или ПКО кДНК *Sabin 1/2/3* для ПЦР-смеси-1-FL *Sabin 1/2/3*;
 - б) **положительный контроль ПЦР (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл** ВКО *STI-87* (при использовании ПЦР-смеси-1-FL *HEV-C / STI*);
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К-)** – внести в пробирку **10 мкл** ДНК-буфера;
 - г) **контрольные образцы «Фон»** – в приготовленные пробирки внести **10 мкл** ДНК-буфера.
9. Подготовленные микропробирки «Фон», микропробирки с исследуемыми кДНК-образцами и контролями ПЦР готовы к проведению амплификации.

ВНИМАНИЕ! Пробы амплифицировать сразу после соединения реакционной смеси и ДНК-пробы и контролей. Время внесения проб в реакционную смесь и запуск реакции на приборе не должно превышать 10-15 минут.

10. Запустить на амплификаторе соответствующую программу термоциклирования (см. табл. 3).

11. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1-3 с).

Таблица 3

Программа амплификации кДНК

цикл	Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ³			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке) ⁴			Амплификаторы с матричным регулированием температуры ⁵		
	температура	время	циклы	температура	время	циклы	температура	время	циклы
0	95°С	пауза		95°С	пауза		95°С	пауза	
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	10 с	42	95 °С	10 с	42	95 °С	1 мин	42
	54 °С	10 с		54 °С	25 с		54 °С	1 мин	
	72 °С	10 с		72 °С	25 с		72 °С	1 мин	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение		10 °С	хранение	

12. По окончании выполнения программы приступить к флуоресцентной детекции.

ФЛУОРЕСЦЕНТАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПО «КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ»

Детекция проводится с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора (согласно инструкции к используемому прибору) путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала по каналам:

1. При использовании ПЦР-смеси-1-FL HEV-C/STI:

- по каналу для флуорофора **FAM** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК**

³ GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer), «Терцик» («ДНК-Технология»).

⁴ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), Gradient Palm Cyler (Corbett Research).

⁵ Uno-2 (Biometra), MiniCycler, PTC-100 (MJ Research).

ВКО;

- по каналу для флуорофора **HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации **кДНК HEV-C**.

2. При использовании ПЦР-смеси-1-FL Sabin 1/2/3:

- по каналу для флуорофора **FAM** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента **кДНК Sabin 2**;
- по каналу для флуорофора **HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации **кДНК Sabin 3**;
- по каналу для флуорофора **ROX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации **кДНК Sabin 1**.

ВНИМАНИЕ! До проведения детекции в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. методические рекомендации и вкладыш к ПЦР-комплекту).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты интерпретируют на основании данных об уровне флуоресцентного сигнала относительно фона по соответствующим каналам для контрольных образцов и проб кДНК, выделенных из клинических образцов. Интерпретация производится автоматически с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Принцип интерпретации результатов представлен в табл. 4, 5.

Таблица 4

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования
(ПЦР-смеси-1-FL HEV-C/STI)**

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал HEX	
<u>Выше</u> или <u>ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	В пробе выявлена кДНК HEV-C
<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена кДНК HEV-C
<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Результат невалидный - проба требует повторного выделения и тестирования

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал HEX	
Выше порогового значения	Выше порогового значения отрицательного результата и ниже порогового значения положительного результата	Результат сомнительный - проба требует повторного ПЦР-исследования

Таблица 5

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования
(ПЦР-смеси-1-FL *Sabin* 1/2/3)**

Результат по уровню флуоресценции			Результат
Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX	
Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin</i> 2
Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin</i> 3
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Выше порогового значения положительного результата	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin</i> 1
Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	Ниже порогового значения отрицательного результата	В пробе не выявлена кДНК <i>Sabin</i> 1/2/3 ⁶
Выше порогового значения отрицательного результата и ниже порогового значения положительного результата по любому каналу			Результат сомнительный - проба требует повторного ПЦР-исследования

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с табл. 6.

⁶ При уровне флуоресценции выше порогового значения по каналу FAM для ПЦР-смеси-1-FL HEV-C / ST1.

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа

ПЦР-смесь-1	Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Сигнал по каналу		
			FAM	HEX	ROX
<i>HEV-C/STI</i>	OK	Экстракция (выделение) РНК	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	K+ (ПКО <i>HEV-C</i>)	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	BK+	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	Не анализируется
<i>Sabin 1/2/3</i>	OK	Экстракция (выделение) РНК	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата
<i>Sabin 1/2/3</i>	K+ (ПКО <i>Sabin 1/2/3</i>)	ПЦР	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата	<u>Выше</u> порогового значения положительного результата
<i>Sabin 1/2/3</i>	K-	ПЦР	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата	<u>Ниже</u> порогового значения отрицательного результата

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (K+) сигнал флуоресценции по соответствующему каналу ниже порогового значения положительного результата, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех отрицательных клинических образцов.

2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К–) сигнал детекции возбудителя выше порогового значения положительного результата, необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружена РНК *данного возбудителя* начиная с этапа экстракции, чтобы исключить следствие возможной контаминации.

**ВАРИАНТ FRT
СОСТАВ**

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F – комплект реагентов для амплификации кДНК возбудителей *Poliovirus* с гибридационно-флуоресцентной детекцией – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	2 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	2 пробирки
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка
ПКО кДНК HEV-C	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ПКО кДНК Sabin 1/2/3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	2 пробирки
ВКО STI-87	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение 55 реакций амплификации, включая контроли.

К комплекту реагентов прилагаются контрольные образцы этапа выделения:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ВКО STI-87-rec ⁷	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	5 пробирок
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

ПЦР-исследование состоит из следующих этапов:

- экстракция (выделение) РНК из исследуемых образцов;
- проведение реакции обратной транскрипции;
- проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»;

⁷ В случае применения комплекта «РИБО-сорб» использовать ВКО STI-87-rec объемом 10 мкл на пробу.

- анализ и интерпретация результатов.

ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Экстракцию РНК провести в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов для экстракции РНК из клинического материала («РИБО-сорб», «РИБО-преп» или другие комплекты реагентов, рекомендованные ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Экстракция РНК из каждого клинического образца проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87-rec). В качестве отрицательного контроля экстракции (ОК) используют ОКО.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем пробы кДНК – 10 мкл.

Для внесения в пробирки реагентов, проб кДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (полимеразы (TaqF)), которая активируется при прогреве реакционной смеси при температуре 95 °С в течение 15 мин.

ВНИМАНИЕ! Компоненты реакционных смесей следует смешивать непосредственно перед проведением анализа из расчета на необходимое число реакций, включающее тестирование исследуемых и контрольных образцов, согласно расчетной таблице (см. табл. 7). Следует учитывать, что для тестирования даже одного исследуемого образца кДНК необходимо проводить постановку всех контролей этапа ПЦР (положительных контролей (К+), (ВК+) и отрицательного контроля (К-)). Рекомендуется смешивать реагенты для четного числа реакций с целью более точного дозирования.

1. До начала работы все реагенты набора разморозить, тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.
2. Отобрать необходимое количество пробирок с учетом количества исследуемых, контрольных образцов кДНК. Тип пробирок, стрипов или плашек выбрать в зависимости от

используемого прибора.

3. Для приготовления реакционных смесей необходимо в отдельных стерильных пробирках смешать каждую из **ПЦР-смесей-1-FL (ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI, ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3)** с **ПЦР-смесью-2-FRT** и полимеразой (**TaqF**) согласно табл. 7. Тщательно перемешать смеси на вортексе и осадить капли с крышек пробирок.

Таблица 7

Схема приготовления реакционных смесей для варианта FRT

Объем реагента на одну реакцию (мкл)	10.00	5.00	0.50
Число реакций ⁸	ПЦР-смесь-1-FL	ПЦР-смесь-2-FRT	Полимераза (TaqF)
8	80	40	4.0
10	100	50	5.0
12	120	60	6.0
14	140	70	7.0
16	160	80	8.0
18	180	90	9.0
20	200	100	10.0
22	220	110	11.0
24	240	120	12.0
26	260	130	13.0
28	280	140	14.0
30	300	150	15.0
32	320	160	16.0

4. Внести в отобранные пробирки по **15 мкл** готовых реакционных смесей.
 5. Используя наконечники с фильтрами, в пробирки с реакционной смесью добавить по **10 мкл кДНК-проб**, полученных в реакции обратной транскрипции РНК. Неиспользованные остатки реакционной смеси выбросить.
- ВНИМАНИЕ!** При добавлении кДНК-проб, выделенных с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В», необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь для ПЦР.
6. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) **положительный контроль ПЦР (К+)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО кДНК HEV-C** для **ПЦР-смеси-1-FL HEV-C / STI** или **ПКО кДНК Sabin 1/2/3** для **ПЦР-смеси-1-FL**

⁸ - при работе с ПЦР-смесью-1-FL HEV-C / STI - число клинических образцов, контроль этапа выделения ДНК (N) , контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+3+1);

- при работе с ПЦР-смесью-1-FL Sabin 1/2/3 - число клинических образцов, контроль этапа выделения ДНК (N) , контроли этапа ПЦР с запасом на один образец (N+2+1).

Sabin 1/2/3;

- б) **положительный контроль ПЦР (ВК+)** – внести в пробирку **10 мкл ВКО STI-87** (при использовании ПЦР-смеси-1-FL HEV-C/STI);
 - в) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**.
7. Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме «реального времени») для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (см. табл. 8).

Таблица 8

Программа амплификации

Цикл	Приборы роторного типа ⁹			Приборы планшетного типа ¹⁰		
	Температура, °С	Время	Число повторов циклов	Температура, °С	Время	Число повторов циклов
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	45	95	10 с	45
	54	20 с детекция флуоресц. сигнала		54	20 с детекция флуоресц. сигнала	
	72	10 с		72	10 с	

Детекция флуоресцентного сигнала назначается по каналам для флуорофоров FAM/Green, JOE/Yellow/HEX и ROX/Orange.

- 8. Установить пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.
- 9. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.
- 10. По окончании выполнения программы приступить к анализу и учету результатов.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- 1. **При использовании ПЦР-смеси-1-FL HEV-C/STI:**
 - по каналу для флуорофора **FAM/Green** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора)

⁹ например, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q или аналогичные.

¹⁰ например, iCycler, iQ5, Mx3000P, Mx3000, «ДТ-96» или аналогичные.

регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента **ДНК ВКО**;

- по каналу для флуорофора **JOE/Yellow/HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации **кДНК HEV-C**.

2. При использовании ПЦР-смеси-1-FL *Sabin 1/2/3*:

- по каналу для флуорофора **FAM/Green** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации фрагмента **кДНК *Sabin 2***;
- по каналу для флуорофора **JOE/Yellow/HEX** (или аналогичному, в зависимости от модели прибора) регистрируется сигнал о накоплении продукта амплификации **кДНК *Sabin 3*** и по каналу для флуорофора **ROX/Orange** – **кДНК *Sabin 1***.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы кДНК значения порогового цикла «*Ct*» в соответствующей графе в таблице результатов.

ВНИМАНИЕ! До проведения амплификации с детекцией в режиме «реального времени» в программное обеспечение ПЦР-детектора должны быть внесены и сохранены соответствующие настройки (см. методические рекомендации и вкладыш к ПЦР-комплекту).

Результаты интерпретируются в соответствии с табл. 9, 10.

Таблица 9

Интерпретация результатов ПЦР-исследования с ПЦР-смесью-1-FL HEV-C/STI

Результат по уровню флуоресценции		Результат
Канал FAM	Канал HEX	
Определено значение <i>Ct</i> более или менее граничного значения	Определено значение <i>Ct</i> менее граничного цикла	В пробе обнаружена кДНК <i>HEV-C</i>
Определено значение порогового цикла <i>Ct</i> меньше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	В пробе не обнаружена кДНК <i>HEV-C</i>
Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Результат невалидный - проба требует повторного тестирования с этапа выделения кДНК

**Интерпретация результатов ПЦР-исследования
с ПЦР-смесью-1-FL *Sabin 1/2/3***

Результат по уровню флуоресценции			Результат
Канал FAM	Канал HEX	Канал ROX	
Определено значение <i>Ct</i> менее граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin 2</i>
Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Определено значение <i>Ct</i> менее граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin 3</i>
Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Определено значение <i>Ct</i> менее граничного	В пробе выявлена кДНК <i>Sabin 1</i>
Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	Значение <i>Ct</i> отсутствует или больше граничного	В пробе не выявлена кДНК <i>Sabin 1/2/3</i> ¹¹

ВНИМАНИЕ! Граничные значения *Ct* указаны во вкладыше к ПЦР-комплекту.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (табл. 11).

Результаты для контролей различных этапов ПЦР-анализа.

ПЦР-смесь-1-FL	Контроль	Контролируемый этап анализа	результат амплификации по каналу		
			Green/FAM	Yellow/JOE	Orange/ROX
<i>HEV-C/STI</i>	ОКО	Выделение ДНК, ПЦР	Положительный ($Ct \leq \text{порог}$)	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$ или отсутствует)	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	К+ (ПКО <i>HEV-C</i>)	ПЦР	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$ или отсутствует)	Положительный ($Ct \leq \text{порог}$)	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	ВК+	ПЦР	Положительный ($Ct \leq \text{порог}$)	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$ или отсутствует)	Не анализируется
<i>HEV-C/STI</i>	К-	ПЦР	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$ или отсутствует)	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$ или отсутствует)	Не анализируется
<i>Sabin 1/2/3</i>	ОКО	Выделение ДНК, ПЦР	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$)	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$)	Отрицательный ($Ct > Ct \text{ порог.}$)

¹¹ При значении *Ct* менее граничного по каналу FAM для ПЦР-смеси-1-FL *HEV-C/STI*.

ВАРИАНТ FRT

ПЦР-смесь-1-FL	Контроль	Контролируемый этап анализа	результат амплификации по каналу		
			Green/FAM	Yellow/JOE	Orange/ROX
			или отсутствует)	или отсутствует)	или отсутствует)
Sabin 1/2/3	К+ (ПКО Sabin 1/2/3)	ПЦР	Положительный ($Ct \leq$ порог)	Положительный ($Ct \leq$ порог)	Положительный ($Ct \leq$ порог)
Sabin 1/2/3	К-	ПЦР	Отрицательный ($Ct > Ct$ порог. или отсутствует)	Отрицательный ($Ct > Ct$ порог. или отсутствует)	Отрицательный ($Ct > Ct$ порог. или отсутствует)

ВНИМАНИЕ!

1. Если для положительного контроля ПЦР (К+) сигнал по соответствующему каналу больше граничного значения, необходимо повторить амплификацию и детекцию для всех образцов, в которых не обнаружена кДНК.
2. Если для отрицательного контроля экстракции РНК (ОК) и/или отрицательного контроля ПЦР (К-) сигнал по соответствующему каналу меньше граничного значения необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена кДНК, начиная с этапа выделения (экстракции) РНК.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

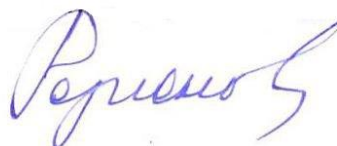
Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. «ПЦР-комплект» вариант FEP/FRT-50 F при получении разукмплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С. ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI и ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3 хранить в защищенном от света месте. ПЦР-смесь-1-FL HEV-C / STI, ПЦР-смесь-1-FL Sabin 1/2/3, ПЦР-смесь-2-FRT и полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «**АмплиСенс® Poliovirus-FL**» направлять на предприятие-изготовитель ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123 г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а) в отдел по работе с рекламациями и организации обучения (тел. (495) 974-96-46, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru)¹²

Заведующий НПЛ
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора



Е.Н. Родионова

Директор ФГУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н.Блохиной
Роспотребнадзора



Е.И.Ефимов

¹² Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя по адресу в сети интернет: www.amplisens.ru.