



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР»
для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) в
биологическом материале, кормах и объектах окружающей среды методом
полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией продуктов
амплификации в агарозном геле**

21.10.60-403-51062356-2022

Для диагностики *in vitro*

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение.....	4
2. Характеристика набора.....	4
2.1 Принцип действия.....	4
2.2 Состав набора	4
3. Аналитические 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	9
7.1. Экстракция (выделение) НК из клинического материала	10
7.2. Подготовка и проведение ПЦР	10
7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле	12
8. Интерпретация результатов анализа	12
9. Условия транспортирования	13
10. Условия хранения.....	14
11. Срок годности.....	14
Приложение 1. Приготовление реакционной смеси	14
Приложение 2. Лист вносимых изменений	15

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
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
НК	нуклеиновая кислота
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

1. Назначение

Набор предназначен для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) в биологическом материале (цельная кровь, истечения из носовой полости, молоко, паренхиматозные органы и лимфоузлы), объектах окружающей среды (почва, вода и др.) и кормах методом амплификации ДНК с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Набор позволяет специфически амплифицировать фрагмент генома *Bacillus anthracis* и ДНК внутреннего положительного контроля (бактериофага Т4) в мультиплексной полимеразной цепной реакции. Детекция продуктов амплификации осуществляется электрофоретически с разделением продуктов амплификации в агарозном геле.

2.2 Состав набора

Набор состоит из комплекта реагентов для проведения мультиплексной ПЦР (комплект № 1) и комплекта контрольных образцов (комплект № 2). Набор выпускается в двух вариантах:

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

Состав набора приведен в Таблицах 1 и 2.

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 Сиб. язва	прозрачная жидкость зеленого цвета	830	1660	1
2	ДНК Полимераза, TAQ POLYMERASE	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	17	33	1
3	Буфер для разведения ДНК, ДНК БУФЕР	прозрачная бесцветная жидкость	500	1000	1
4	Минеральное масло МИН. МАСЛО	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	2000	2000	1(2)

Таблица 2. Комплект №2, контрольные образцы:

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мкл		Кол-во
			На 55 реакций	На 110 реакций	
1	Внутренний контрольный образец, ВКО Т1	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 Сиб. язва	прозрачная бесцветная жидкость	100	200	1

В набор не входят реактивы для экстракции нуклеиновых кислот. Выделение ДНК может проводиться, например, с помощью наборов на основе сорбционного метода, в состав которых входит силика или микроцентрифужные колонки, и также наборов на основе фенол-хлороформной экстракции и т.п. Рекомендуется использовать набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» (при исследовании кормов) или «ДНК-РНК-С-ФАКТОР» либо аналогичный.

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

В набор не входят реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле. Для проведения электрофореза рекомендуется использовать набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР» или аналогичный.

3. Аналитические характеристики

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении ДНК других микроорганизмов: *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma sinovia*; *Brucella suis*; *Brucella abortus*; *Brucella ovis*; *Brucella canis*; *Leptospira interrogans*; *Listeria monocytogenes*; *Mycobacterium avium*; *Mycoplasma hyopneumoniae*; *Escherichia coli*; *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter fetus*; *Clostridium perfringens*; *Salmonella dublin*; *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus suis*; *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении образцов ДНК человека, свиньи, КРС, собаки, кошки, курицы.

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 №648 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 23.09.2021 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 сибирской язвы».

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 рабочие реагенты и расходные материалы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одной зоны в другую.

Процесс исследования является строго односторонним, работу следует начинать в зоне подготовки материала, продолжать в зоне экстракции нуклеиновых кислот, затем в зоне амплификации. Запрещается возвращать образцы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

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

Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) сбрасывать 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

Для зоны выделения ДНК из исследуемых проб:

- 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 99 °С (например, ТТ-2-«Термит» «НПО ДНК-Технология» Россия);
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 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 ДНК (см. пункт 2.2).

Для зоны электрофоретического анализа

- Реактивы для проведения электрофореза в агарозном геле по 2.2
- Камера для горизонтального электрофореза (например: «SE2», «Хеликон»);
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например: Эльф-4, «ДНК-технология»);
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например: «Vilber Lourmat»);

- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например: «Vilber Lourmat»), «Биотест-1»);
- Микроволновая печь для плавления агарозы;
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для приготовления агарозы;
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза;
- Штатив для микропробирок на 0,5 и 1,5 мл;
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-50 мкл;
- Одноразовые наконечники до 200 мкл;
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромистый этидий;
- Отдельный халат;
- Одноразовые перчатки.

6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб

6.1 Отбор материала для исследования

Вся работа с исследуемым материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I—II групп патогенности, проводится в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности».

Для исследования используют следующий материал:

- Пробы воды, почвы отбирают в стерильный контейнер, согласно МУ 1.3.2569-09.

- Фрагменты паренхиматозных органов (фрагменты печени, легких, селезенки, а также миндалины, лимфоузлы и др.) отбирают в стерильный контейнер.

- Целая кровь. Кровь забирается в пробирку с 6% ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

- Истечения из носовой полости отбираются в стерильные пробирки.

- Молоко, отбирают в объеме 10-30 мл в стерильную посуду.

- Отбор исследуемых образцов кормов/сырья проводят по ГОСТ ISO 6497-2014 «Корма. Отбор проб».

Полученные образцы можно транспортировать и хранить в следующих режимах:

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

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

6.2 Подготовка исследуемого материала

Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Пробы тканей и органов, а также пробы продуктов животного происхождения гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем обычно готовят 10-20% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2 тыс. об./мин в течение 5-10 минут. Для дальнейшей обработки используют надосадочную жидкость.

Молоко в объеме до 10 мл центрифугируют при 2,5-3 тыс. об./мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость осторожно отбирают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок тщательно ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и используют для дальнейшей обработки.

Исследуемые пробы кормов, сухих кормовых и пищевых добавок гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков или автоматических гомогенизаторов. Далее из гомогенизированных проб готовят 10% суспензию, тщательно перемешивают, после чего центрифугируют при 2000 об./мин 5-10 мин. Для дальнейшей обработки используют надосадочную жидкость.

При исследовании почвы к исследуемому материалу добавляют 0,9%-ный раствор натрия хлорида 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин. для оседания крупных частиц. Отстоявшуюся надосадочную жидкость (1 мл) центрифугируют 5 мин при 2,5-3 тыс. об./мин («MiniSpin», Eppendorf)². Для дальнейшей обработки используют надосадочную жидкость.

10-20 мл воды центрифугируют 15 мин на центрифуге при 8000 g. Надосадочную жидкость осторожно удаляют, оставив 100-200 мкл (при этом осадок может быть не видим). Осадок тщательно ресуспендируют в оставленном объеме и используют для дальнейшей обработки.

На усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала.

Обеззараживание материала

Обеззараживание проводят согласно нормативной документации по работе с возбудителем сибирской язвы (напр., МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп

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.

патогенности»; МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»).

Обеззараживание включает герминацию спор с обработкой пенициллином и прогреванием при 100°C в течение 10 мин. Исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера (мясо-пептонный бульон) pH 7,2-7,6 и инкубируют с перемешиванием при температуре 37°C в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин (1000 ед./мл) и инкубируют при 37°C 15 мин. Затем прогревают при температуре 100°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 10 мин.

Далее отбирают 100 мкл материала, добавляют 10 мкл ВКО и вносят 500 мкл лизирующего раствора (из набора ДНК/РНК-С-ФАКТОР) и инкубируют 15 мин при температуре 65°C.

После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным. Далее, начиная с этапа добавления преципитирующего раствора и сорбента, осуществляется процесс выделения ДНК сорбционным методом согласно инструкции к набору ДНК/РНК-С-ФАКТОР.

7. Проведение анализа

Исследование с помощью набора реагентов «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР» состоит из четырех этапов:

- экстракция НК (на этом этапе дополнительно используют реактивы для экстракции, например набор «ДНК/РНК-С-ФАКТОР»);
- проведение ПЦР;
- анализ продуктов амплификации методом электрофореза (на этом этапе дополнительно используют набор реагентов для электрофоретического анализа, например набор «ФОРЕЗ-ФАКТОР»);
- учет результатов анализа.

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 Т1**. В пробирку отрицательного контроля выделения вместо исследуемой пробы внести **ОКО³** (**пробирку обозначить как ВК-**).

Обеззаразить пробы в соответствии с МУ 3.5.5.1034-01 (см. пункт 6.2 Инструкции). После инкубирования проб с лизирующим раствором, содержащим гуанидин тиоционат (например, из набора ДНК/РНК-С-ФАКТОР) в течение 15 минут, провести выделение согласно инструкции производителя. Начинать следует с этапа внесения сорбента.

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

Выделенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2°C до 8°C или в течение года при температуре не выше минус 16°C.

7.2 Подготовка и проведение ПЦР

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

Успешное прохождение реакции контролируют использованием **ПКО Сиб. язва, ВКО Т1 и ДНК буфера**.

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

В отдельной пробирке смешать компоненты набора из расчета на каждую реакцию⁴:

- 15 мкл **ПЦР СМЕСЬ Сиб. язва**
- 0,3 мкл **TAQ POLYMERASE**

Перемешать смесь на вортексе и сбросить капли кратковременным центрифугированием.

Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб. Внести по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.

В случае использования амплификаторов без подогревающейся крышки (например, «Терцик», «ДНК технология») сверху в пробирки внести по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл).

Используя наконечники с фильтром в подготовленные пробирки внести:

- а) в пробирку отрицательного контроля ПЦР (**К-**) 10 мкл **ДНК буфера**;
- б) в ряд пробирок для исследуемых проб - в каждую внести по 10 мкл ДНК соответствующей пробы, полученной по п.7.1 (включая пробу ВК-);
- в) в пробирку положительный контроль ПЦР (**К+**) 10 мкл **ПКО Сиб. язва**.

Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-2 секунды). Установить пробирки в амплификатор. Режим термоциклирования приведен в Таблицах 3 и 4.

⁴ Объемы реагентов ПЦР СМЕСЬ Сиб. язва и TAQ POLYMERASE на различное количество образцов приведены в Приложении 1

Таблица 3. Температурно-временной режим амплификации («Терцик», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,5 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 10 сек	45
	60°C – 15 сек	
	72°C – 15 сек	
3	72°C – 2 мин	1

Таблица 4. Температурно-временной режим амплификации («ДТ 96», ДНК технология, ПЦР в пробирках объемом 0,2 мл)

№ п/п	Температурно-временной режим (точный)	Число циклов
1	95°C – 5 мин	1
2	95°C – 20 сек	45
	60°C – 30 сек	
	72°C – 30 сек	
3	72°C – 2 мин	1

После окончания реакции переставить пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР.

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре. Для длительного хранения требуется заморозка.

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле.

7.3 Детекция продуктов ПЦР амплификации методом электрофореза в агарозном геле

Внимание: Работа с амплифицированными продуктами должна производиться в отдельной комнате сотрудником, не производящим манипуляций в чистых помещениях.

Поставить электрофорез исследуемых и контрольных проб согласно инструкции производителя набора для детекции амплифицированной ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

8. Интерпретация результатов анализа

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной НК.

Результат считается достоверным в случае корректного прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и экстракции ДНК в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5. Оценка результатов анализа.

Проба	Полоса электрофореграмме		Результат
	200 п.н.	500 п.н.	
	Сиб. язва	ВКО	
ПКО К+	есть	есть	Реакции положительного и внутреннего контролей прошли успешно
ДНК буфер К-	нет	нет	Реакция прошла успешно
	есть	нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
	нет	есть	Контаминация ВКО! ТРЕБУЕТСЯ повторная постановка! Рекомендуется поставить смывы
ОКО ВК-	нет	есть	Экстракция прошла успешно
	есть	есть или нет	Специфическая контаминация! ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция! Рекомендуется поставить смывы.
	нет	нет	Результат недостоверный, возможно присутствие ингибиторов. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!
Образцы	есть	есть или нет	Результат анализа положительный. ДНК <i>Bacillus anthracis</i> обнаружена
	нет	есть	Результат анализа отрицательный
	нет	нет	Результат не достоверный. ТРЕБУЕТСЯ повторная экстракция!

В случае, если в ВК- отсутствует полоса ВКО, а в К+ и исследуемых образцах полоса ВКО присутствует – результаты можно считать достоверными. Также в случае полоса ВКО в К+ отсутствует, а в ВК- образцах присутствует – результаты можно считать достоверными.

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

Набор «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8 °С не более 5 суток.

10. Условия хранения

Хранение комплектов набора «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР» осуществляют при температуре от минус 18 до минус 20 °С.

11. Срок годности

Срок годности реагентов «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР» 12 месяцев.

Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Приготовление реакционной смеси

Количество реакций	Объем ПЦР СМЕСЬ Сиб. язва, мкл	Объем TAQ POLYMERASE, мкл
3	45	0,9
4	60	1,2
5	75	1,5
6	90	1,8
7	105	2,1
8	120	2,4
9	135	2,7
10	150	3
15	225	4,5
20	300	6
25	375	7,5
30	450	9
35	525	10,5
40	600	12
45	675	13,5
50	750	15
55	825	16,5

Приложение 2. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 26.05.2021	стр. 5, стр. 10	Добавлены сноски, поясняющие, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.2 от 28.12.2021	По тексту	Изменено название ВКО
Версия 1.3 от 24.02.2022	п. 6.2. Подготовка исследуемых проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке биоматериала
Версия 1.4 от 04.05.2022	Раздел 6. Взятие и обработка материала, транспортирование и хранение проб	Добавлено: на усмотрение ветеринарного врача допускается исследование других видов биоматериала
Версия 1.5 от 21.06.2022	Раздел 6.2. Подготовка исследуемых проб	По тексту

По вопросам качества набора реагентов «ПЦР-Ф-СИБИРСКАЯ-ЯЗВА-ФАКТОР» или по вопросам приобретения 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