«УТВЕРЖДЕНА»

Приказом Росздравнадзора
от«____» _____ 20__г. №_____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ Шнырев М.В.
«12» ноября 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ **ФЕРРИТИНА** В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА («**ИФА-ферритин**»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ИФА - ферритин» предназначен для количественного определения ферритина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Ферритин является растворимым, легко мобилизуемым депо железа, необходимого для эффективного эритропоэза. В то же время он защищает организм от токсического действия железа, связанного с катализом продукции свободных радикалов. Молекула ферритина состоит из железосодержащего ядра и белковой оболочки (апоферритина) с молекулярной массой около 450 000 Да, образованной 24 субъединицами — «тяжелыми» (H) и «легкими» (L). Каждая молекула способна удерживать до 4500 атомов железа в виде сложного комплекса гидроксидов и фосфатов.

Ферритин преимущественно находится в клетках селезенки, печени, красного костного мозга. В небольших количествах ферритин присутствует также в плазме крови. Его концентрация в большинстве случаев позволяет адекватно оценить общие запасы железа в организме.

Концентрация ферритина при рождении повышенная – до 600 нг/мл, за несколько месяцев она снижается примерно до 30 нг/мл, после чего начинает медленно возрастать и к 24–25 годам принимает значения, сохраняющиеся до старости.

Концентрация ферритина ниже 10 нг/мл свидетельствует о наличии железодефицитной анемии. Этот показатель имеет важное значение для дифференцирования железодефицитной анемии от других типов анемий, патогенез которых не связан с железом, мониторинга запасов железа в организме беременных женщин, доноров крови, пациентов, регулярно подвергающихся процедуре гемодиализа. В случае перегрузки организма железом концентрация ферритина превышает 400–500 нг/мл, а при ярко выраженном гемохроматозе достигает нескольких тысяч нг/мл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Концентрация ферритина в сыворотке крови возрастает при инфекционных, воспалительных процессах (остеомиелит, ревматоидный артрит), острых и хронических заболеваниях печени, лейкемии, болезни Ходжкина, раке молочной железы и некоторых других онкологических заболеваниях.

1.3. Набор «ИФА - ферритин» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

Примечание: *в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ИФА-ферритин» использован «сэндвич» - вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ферритину. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ферритин-пероксидаза во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ферритина, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ферритина в исследуемом образце (Рисунок 1).

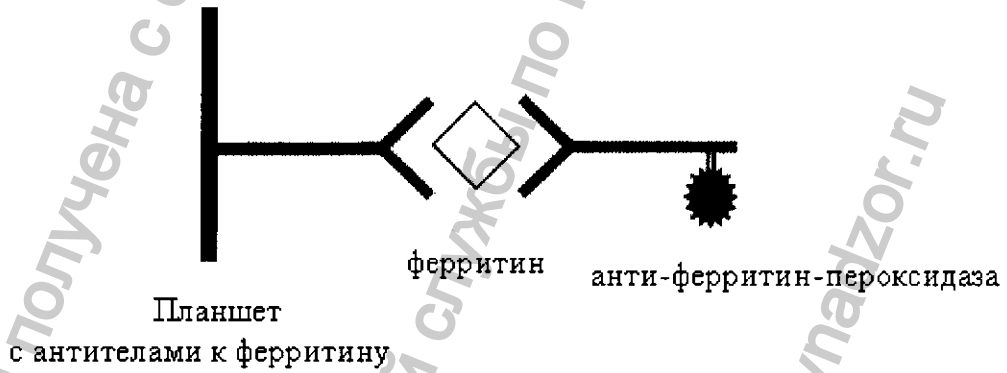

Рисунок 1. Схема анализа

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ферритина в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ферритина в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ферритину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ферритину» – 1 упаковка;

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

• калибровочные пробы (КП), аттестованные по Второму международному стандарту на ферритин WHO 80/578, содержащие известные количества ферритина. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентраций ферритина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов, ориентировочные – 0; 10; 30; 100; 300 и 1000 нг/мл – 6 флаконов (лиофилизованные препараты или жидкости по 0,5 мл);

• конъюгат анти-ферритин-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);

• концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);

• раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);

• стоп-реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);

• контрольная сыворотка с известным содержанием ферритина, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизованный препарат или жидкость 0,5 мл);

• прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с сывороточным альбумином, гемоглобином, трансферрином, альфа-фетопротеином и хлоридом железа.

3.2. Коэффициент вариации результатов определения ферритина в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора «ИФА-ферритин» не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ферритина в образцах сыворотки крови при разведении их калибровочной пробой №1 имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №2 - №6 и составляет 90-110%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ферритина — проверка соответствия значения определяемой концентрации ферритина расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия составляет 90–110 %.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ферритина в сыворотке крови человека не превышает 5 нг/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ИФА-ферритин» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ферритина 10 000 нг/мл.

3.7. Диапазон ожидаемых значений. Содержание ферритина измеряли в сыворотке крови, взятой у 184 здоровых мужчин в возрасте 21–45 лет, у 140 здоровых женщин в возрасте 19–43 лет и у 52 женщин в возрасте 20–34 лет на разных сроках беременности. Средняя концентрация ферритина у мужчин составила 158 нг/мл (22–346 нг/мл), у женщин – 73 нг/мл (10–147 нг/мл). В первом триместре беременности

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

средняя концентрация ферритина в сыворотке составила 61 нг/мл (55–90 нг/мл), во втором триместре – 32 нг/мл (25–74 нг/мл), в третьем – 12 нг/мл (10–16 нг/мл).

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 1.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре +2...8°С не более 2-х суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре –20°С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18…25°С) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18…25°С) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата Е на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.4. Промывочный раствор. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

5 мл Буфера Р+95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.5. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.6. Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

7.1.7. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°С).

В Приложении 1 приведена схема проведения анализа.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – №1 – для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 – №2 – для измерения величины оптической плотности КП №1;
C1, C2 – №3 – для измерения величины оптической плотности КП №2;
D1, D2 – №4 – для измерения величины оптической плотности КП №3;
E1, E2 – №5 – для измерения величины оптической плотности КП №4;
F1, F2 – №6 – для измерения величины оптической плотности КП №5;
G1, G2 – №7 – для измерения величины оптической плотности КП №6;
H1, H2 – №8 – для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.2. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: *общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации различных образцов будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.*

7.2.3. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл конъюгата E.

7.2.4. Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании **в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 500-800 об/мин**.

7.2.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. **7.1.4,** встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18…25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

Примечание: *максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.*

7.2.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, перемешать на шейкере в течение 1-2 минут при комнатной температуре (+18…25°С).

7.2.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. **7.2.7.**, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при температуре +18…25°С.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

Примечание: *среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.*

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации ферритина (нг/мл) в калибровочных пробах (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

Примечание 1: *для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер».*

Примечание 2: *для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.*

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B *– среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,*

B_T *— среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.*

9.2. Определить содержание ферритина в пробах по калибровочному графику.

9.3. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации ферритина, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6».

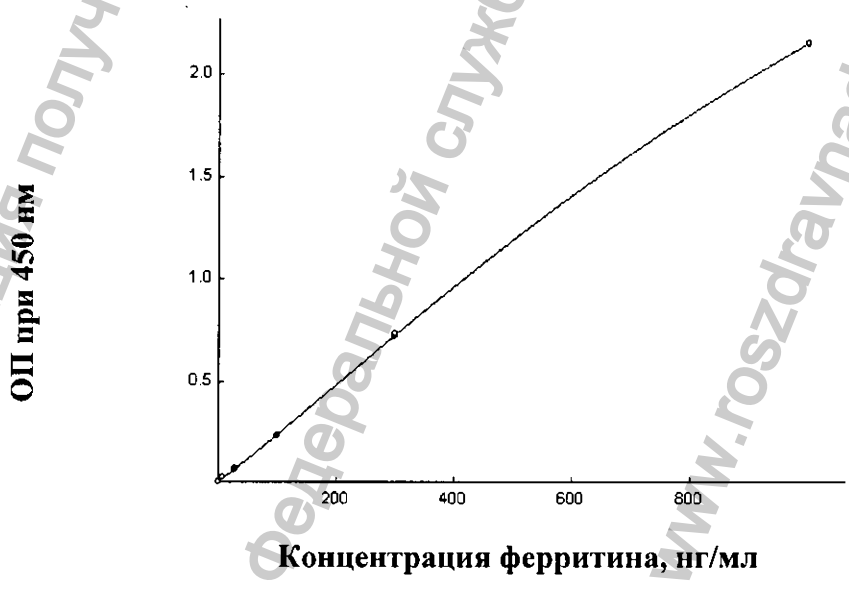

Рисунок 2. Типичный калибровочный график

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

Информация получена с официального сайта федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-ферритин» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°С не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизованных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре (+18…25°С) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ферритина в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

10.6. Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Информация получена с официального сайта федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам качества набора «ИФА-ферритин» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био» Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем
ООО «Компания Алкор Био» Сусорова А.С.

«СОГЛАСОВАНО»
Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава» д.м.н., профессор Долгов В.В.
«__» _____ 2010г.

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

№	Стадия (операция)	Реагенты	Темпера-тура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	**20 мкл** *КП и КС*	**КТ** +18 …25°С	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15’	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
2		**20 мкл** *исследуемых образцов*			
3		**100 мкл** *конъюгата* анти-ферритин-пероксидаза			
4	**Инкубация**	—	**+37°С**	30’	Термостатируемый **шейкер**, 500-800об/мин
5	Промывка	**300 мкл** в лунку *1*промывочного раствора* (5 раз)			**1***промывочный раствор = 14 мл буфера Р+266 мл H_2O
6	Внесение хромогена	**100 мкл** *ТМБ*			
7	**Инкубация с ТМБ**	—	**КТ**	15’ - 30’	В темноте
8	Остановка ферментной реакции	**100 мкл** *стоп-реагента*			
9	Перемешивание		**КТ**	1 - 2’	**шейкер**
10	Регистрация результатов	—		В течение 20’ после остановки ферментной реакции	**Фотометр,** 450 нм
11	Обработка результатов				Калькулятор и масштабная бумага/соответствующее ПО

Примечания: *КП — калибровочная проба; КС — контрольная сыворотка; ОП — оптическая плотность; КТ — комнатная температура (+18...25°С); ПО – программное обеспечение.*

Информация получена с официального сайта Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 20 (десять) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
_____ М.В. Швырев

Информация получена с официального сайта
федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения
www.roszdravnadzor.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru