

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО β -АМИЛОИДНОГО БЕЛКА (A β 42)

КНВ3441, КНВ3442, Human A β 42

Каталог. № : **КНВ3441, КНВ3442** Методика от **25-04-2013**
Количество : **96, 192**
Производитель: **Invitrogen, (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

**Только для использования в исследовательских целях
Не для использования в диагностических процедурах**

ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре 2 - 8°C.

РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Набор 96 тестов	Набор 192 теста
Стандарт человеческого A β 42: лиофилизированный синтетический пептид. На этикетке флакона указано количество и объем раствора для разведения	1 флакон	1 флакон
Буфер для разведения стандарта. Содержит 0,1% азид натрия; красный краситель; 60 мл во флаконе	1 флакон	2 флакона
Микропланшет, покрытый антителами к NH ₂ -концевому участку A β 42, 96 лунок в одном планшете	1 планшет	2 планшета
Детектирующие антитела к A β 42. Содержит 0,1% азид натрия; голубой краситель; 6 мл во флаконе	1 флакон	2 флакона
Конъюгат антител к кроличьим IgG с пероксидазой (анти-IgG-HRP), концентрат (100x). Содержит 3,3 мМ тимол; 0,125 мл во флаконе.	1 флакон	2 флакона
Буфер для разведения конъюгата анти- IgG-HRP. Содержит 3,3 мМ тимола; желтый краситель*; 25 мл во флаконе.	1 флакон	1 флакон
Буфер для промывок, концентрат (25x). 100 мл во флаконе.	1 флакон	1 флакон
Хромоген, стабилизированный раствор (ТМБ, тетраметилбензидин). 25 мл во флаконе	1 флакон	1 флакон
Стоп-раствор. 25 мл во флаконе	1 флакон	1 флакон
Плётки для заклеивания стрипов	2	4
* Растворы буфера для разведения стандарта, детектирующих антител, буфера для разведения конъюгата HRP поставляются окрашенными, с целью упрощения контроля процесса пипетирования, и снижения возможных ошибок при внесении реагентов в лунки. Это никаким образом не влияет на получаемые результаты.		

ЗАМЕЧАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Этот набор содержит материалы, содержащие небольшие количества азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом, медью или латунью с образованием взрывоопасных азидов металлов. Остатки реагентов следует смывать большим количеством воды для предотвращения образования азидов. Избегайте контакта с глазами, кожей и слизистыми оболочками, не принимайте пищу там, где проводится анализ. В случае контакта, обильно промойте поражённое место водой. Следуйте инструкциям, регулирующим деятельность лабораторий.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все компоненты крови и биологические материалы могут быть потенциально опасны. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор Human A β 42 ELISA предназначен для количественного определения *in vitro* человеческого β -амилоидного белка (A β 42) методом ИФА (ELISA) в образцах различных матриц (сыворотке, плазме, буферных растворах или культуральной среде, гомогенатах тканей, спинномозговой жидкости (СМЖ), и т.д.). Данным методом определяются как естественная, так и синтетическая форма человеческого A β 42. Антитела к человеческому A β 42, использованные в данном методе, могут специфически распознавать A β 42, а не A β 40/A β 43.

Данный набор был разработан только для исследовательских целей и не может быть использован для диагностики у людей или животных.

Внимательно прочитайте инструкцию перед использованием.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на «сэндвич» методе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Специфические моноклональные антитела к NH₂-концевому участку Hu A β сорбированы в лунках микропланшета.

На первом этапе стандарты с известной концентрацией Hu A β 42, контроли и образцы вносят в лунки микропланшета и инкубируют со специфическими кроличьими антителами к COOH-концевому участку последовательности 1-42 A β . Эта COOH-концевая последовательность образуется в результате расщепления предшественника.

Связавшиеся кроличьи антитела выявляют с помощью конъюгата антител к IgG кролика с пероксидазой (анти-IgG-HRP). После промывки вносят анти-IgG-HRP (фермент). После второй инкубации и промывки для удаления не связавшегося фермента, а лунки вносят раствор субстрата, взаимодействующий со связавшимся субстратом с образованием цветного окрашивания. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации Hu A β 42, присутствующего в образце.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Пептид бета амилоид (A β) состоит из 40 - 43 аминокислот, отщепляется от амилоидного предшественника ферментом β -секретазой (например, BACE) и предположительно γ (гамма) секретазой (3). Повышение релиза «удлиненных форм» пептида A β , A β 42 или A β 43, более склонных к агрегации, чем A β 40, происходит у людей при определенных мутациях, экспрессии определенных аллелей белка ApoE, или при участии других, пока неизвестных факторов. Многие исследователи обсуждают теорию, что такое повышение образования A β 42/A β 43 приводит к патологическому депонированию A β (4).

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Дистиллированная или деионизированная вода
2. Буфер для растворения стандарта [55 мМ натрий-бикарбонатный буфер (NaHCO₃, ультрачистый), pH 9.0]
3. 4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонил флуорид (AEBSF), или коктейль ингибиторов протеаз с AEBSF.
4. Микропланшетный ридер с возможностью измерений при длине волны 450 нм и необходимым программным обеспечением.
5. Ручное или автоматическое промывающее устройство
6. Микропланшетный шейкер (с возможностью шейкирования при низкой и средней скорости).
7. Калиброванные пипетки переменного объема с одноразовыми наконечниками.
8. Стеклопластиковые или полипропиленовые пробирки для разведения реагентов
9. Фильтровальная бумага
10. Калиброванные стаканы и градуированные цилиндры разных размеров.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

1. Храните все компоненты набора при 2-8°C. Не позволяйте реагентам находиться при комнатной температуре продолжительное время. Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием.

2. **Не открывайте пакет со стрипами сразу, достав его из холодильника: прежде чем вы откроете пакет со стрипами, он должен нагреться до комнатной температуры.** Выберите необходимое для анализа число стрипов. Оставшиеся стрипы немедленно верните в пакет, затем закройте пакет и поместите его в холодильник при температуре 2-8 °C для сохранения качества набора.
3. Образцы должны быть собраны апиригенно в свободные от эндотоксинов пробирки.
4. Добавьте в образцы коктейль ингибиторов с AEBSF (ингибитор сериновых протеаз), разведения стандарта выполняйте в том же буфере, который использован для подготовки образцов. Сериновые протеазы могут быстро разрушать пептид Аβ, следовательно использование AEBSF (водорастворимый ингибитор, менее токсичный чем PMSF) с конечной концентрацией 1 мМ очень важно. Храните образцы во льду до момента внесения в лунки микропланшета.
5. Если образцы не анализируются сразу, их необходимо заморозить. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов. Перед анализом полностью разморозьте и тщательно перемешайте образцы.
6. Матрикс образца оказывает очень сильное влияние на извлечение Аβ. Для гарантии точности измерения стандарт для построения калибровочной кривой необходимо разводить в том же буфере, который был использован для приготовления образцов.
7. Не используйте тимол или тимерозал в качестве консервантов для образцов. Эти агенты ингибируют измерение пептида Аβ.
8. Избегайте использования образцов с сильным гемолизом или липемией. Если образцы содержат большое количество частиц, центрифугируйте их или отфильтруйте до анализа.
9. Рекомендуется все стандарты, контроли и образцы анализировать в дубликатах.
10. Для воспроизводимых результатов очень важно, чтобы время реакции во всех лунках было одинаковым. Следовательно, внесение реагентов должно проводиться в одинаковой последовательности и с одинаковой скоростью от лунки к лунке.
11. **Не смешивайте разные лоты и не заменяйте реагенты реагентами из разных лотов.**
12. Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения.
13. Абсорбция в лунках должна быть считана немедленно, или не позднее 2-х часов после завершения анализа. При этом микропланшет должен быть закрыт и храниться в темноте.
14. Внутренний контроль необходимо ставить в каждой серии анализов. Если контроль оказался за пределами допустимого диапазона значений, правильность анализа сомнительна.
15. Полностью удалите промывочный буфер из ячеек аспирацией или вытряхиванием планшета на фильтровальную бумагу. **Никогда** не допускайте попадания фильтровальной бумаги в лунки.
16. Избегайте контакта раствора хромогена с прямым солнечным светом, т.к. он чувствителен к свету, и не допускайте его контакта с металлами, иначе раствор хромогена может окраситься и стать непригодным для анализа.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОМЫВКЕ

- **Неполная промывка негативно влияет на точность результатов.** Все операции промывки должны выполняться буфером для промывок, поставляемым в наборе.
- Рекомендуемый метод для ручной промывки: Полностью удалите жидкость из лунок аспирацией, аккуратно погружая наконечник пипетки на дно каждой лунки. Не поцарапайте внутреннюю поверхность лунок! После аспирации внесите не менее 0.4 мл готового (разведенного) буфера для промывок. Оставьте на 15 - 30 секунд (замачивание), затем аспирируйте жидкость из лунок. Повторите столько раз, сколько указано в разделе «Процедура метода». После окончания промывки переверните микропланшет и подсушите его на чистой фильтровальной бумаге.
- Альтернативно, готовый буфер для промывок может быть налит в сжимаемую бутылку. При использовании сжимаемой бутылки полностью заполняйте лунки микропланшета готовым буфером для промывок. После окончания промывки переверните микропланшет и подсушите его на чистой фильтровальной бумаге.
- При использовании автоматического вошера следуйте инструкции производителя прибора.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Растворение стандарта Аβ42

Растворите 2.31 грамма бикарбоната натрия в 500 мл деионизированной воды. Доведите pH до 9.0 с помощью 2 N гидроксида натрия. Профильтруйте раствор через фильтр 0.2 мкм.

Замечание: Этот буфер используется для растворения лиофилизированного стандарта. Не используйте этот буфер для разведения стандарта или образцов.

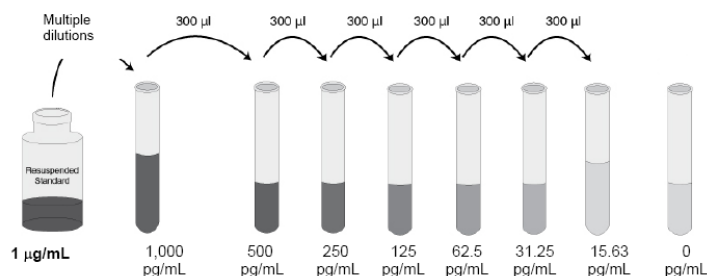
Разведение стандарта Аβ42

Замечание: Для разведения стандарта могут быть использованы полипропиленовые пробирки.

Стандарт Hu Аβ42 прокалиброван по высокочистому препарату Hu Аβ, и масса была скорректирована в соответствии с аминокислотной последовательностью.

1. Достаньте флакон со стандартом Hu Аβ42 и дайте ему нагреться до комнатной температуры (RT).
2. Растворите стандарт в буфере для разведения стандарта, до конечной концентрации 1.0 мкг/мл (55 мМ бикарбонат натрия, pH 9.0). Инструкции по разведению даны на этикетке флакона. Тщательно аккуратно перемешайте и оставьте на 10 минут для полного растворения. Коротко перемешайте на вортексе перед приготовлением разведений.
3. Приготовление разведений стандарта пептида Аβ должно быть выполнено с помощью тех же буферов, которые были использованы для приготовления образцов. Например, если экстракт мозга был разведен в 10 раз буфером для разведения стандарта, то буфер, используемый для разведения стандарта, должен состоять из 90% буфера для разведения стандарта и 10% буфера, использованного для экстракции (включая AEBSF с конечной концентрацией 1 мМ).
4. Внесите 0.1 мл растворенного стандарта в пробирку, содержащую 0.9 мл буфера для разведения стандарта. Надпишите эту пробирку «100,000 пг/мл» Hu Аβ42. Перемешайте.
5. Внесите 0.1 мл стандарта 100,000 пг/мл Hu Аβ42 во флакон, содержащий 1.9 мл буфера для разведения стандарта. Надпишите эту пробирку «10,000 пг/мл» Hu Аβ42. Перемешайте.
6. Внесите 0.2 мл 10,000 пг/мл стандарта в пробирку, содержащую 1.8 мл Буфера для разведения стандарта. Надпишите эту пробирку «1,000 пг/мл» Hu Аβ42. Перемешайте.
7. Внесите по 0.3 мл буфера для разведения стандарта в каждую из 6 пробирок, обозначенных как 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, и 0 пг/мл Hu Аβ42.
8. Выполните серийное разведение стандарта, как указано в схеме ниже. Тщательно перемешивайте между переносами из одной пробирки в другую.

Замечание: оставшийся растворенный неразведенный стандарт Hu Аβ42 может храниться замороженным при -80°C до 4х месяцев, в аликвотах. Без потерь иммунореактивности стандарт может быть заморожен и разморожен только один раз.



Приготовление вторых антител

Замечание: Приготовьте не ранее, чем за 15 минут до использования. Конъюгат анти-кроличьи IgG-HRP (100X) поставляется в 50% глицерина, это вязкая жидкость. Для выполнения правильного разведения анти-IgG-HRP (100X) должен достичь комнатной температуры. Аккуратно перемешайте. Пипетируйте анти-IgG-HRP (100X) медленно. Удалите избыток концентрата с наконечника с помощью чистой фильтровальной бумаги.

1. Разведите 10 мкл концентрата 100X в 1 мл буфера для разведения конъюгата HRP для каждого 8-ми луночного стрипа, используемого в текущей постановке. Надпишите полученный раствор как «рабочий раствор анти-IgG-HRP».
2. Верните неиспользованный конъюгат анти-IgG-HRP (100X) в холодильник.

Кол-во стрипов	Объем анти-IgG-HRP (100X)	Volume of Diluent
2	20 мкл раствора	2 мл
4	40 мкл раствора	4 мл
6	60 мкл раствора	6 мл
8	80 мкл раствора	8 мл
10	100 мкл раствора	10 мл
12	120 мкл раствора	12 мл

Разведение Буфера для промывок

1. Перед использованием концентрат буфера для промывок (25X) должен достичь комнатной температуры. Перемешайте концентрат перед разведением, убедитесь, что кристаллы соли, выпавшие в осадок, полностью растворились. Разведите 1 часть 25x концентрата буфера для промывок в 24 частях дистиллированной воды (например, 50 мл концентрата можно развести до 1,25 л дистиллированной водой, 100 мл концентрата можно развести до 2.5 л дистиллированной водой). Надпишите флакон с приготовленным раствором как «Готовый буфер для промывок».
2. Храните и концентрат буфера для промывок и готовый буфер для промывок в холодильнике. Готовый буфер для промывок должен быть использован в течение 14 дней.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Приготовьте одно или несколько разведений каждого образца. Эти разведения должны быть выполнены буфером для разведения стандарта, а коэффициент разведения подобран эмпирически (например, разведения в 2 и 10 раз дают разумный диапазон). Разведение необходимо выполнять, так как определенные компоненты, присутствующие в образце, могут влиять на определение пептидов Аβ, или для приведения концентраций Аβ в образце в диапазон измеряемых значений метода. АЕBSF должен быть добавлен в разведенные образцы и стандарты до конечной концентрации 1 мМ с целью предотвращения протеолитического расщепления пептидов Аβ.

Процедура гомогенизации ткани мозга человека или мыши описана в разделе «Использование β-амилоида».

Замечание: при анализе образцов плазмы может потребоваться предварительная подготовка образцов для разрушения взаимодействия Аβ и белков его маскирующих.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед выполнением анализа внимательно ознакомьтесь с разделом «ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ».

Все реагенты и образцы должны достичь комнатной температуры (18-25°) перед использованием. Все реагенты необходимо тщательно и осторожно перемешивать, не допуская образования пены.

Замечание: Калибровочная кривая должна строиться при каждой постановке анализа.

Методика

1. Достаньте требуемое для проведения анализа число стрипов. Неиспользованные стрипы храните в пакете с осушителем при 2-8°C. Поместите требуемое количество стрипов в держатель. Верните оставшиеся стрипы в пакет и пакет поместите в холодильник.
2. Внесите по 50 мкл буфера для разведения стандарта в лунки «Стандарт 0». Лунка для хромогенного Бланка должна оставаться пустой.
3. Приготовьте разведения образцов и стандарта в соответствующем буфере. Внесите по 50 мкл каждого стандарта Аβ, контроля и образцов в соответствующие лунки, кроме лунки бланка.
4. Внесите по 50 мкл Нu Аβ42 детектирующих антител во все лунки, кроме лунки бланка.
5. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 3 часа при комнатной температуре на шейкере или в течение ночи при 4 °C без шейкирования.
6. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием. Промойте лунки 4 раза, как это указано в разделе «РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОМЫВКЕ».

7. Внесите по 100 мкл рабочего раствора анти-IgG-HRP во все лунки, за исключением бланка.
8. Закройте планшет плёнкой и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
9. Полностью удалите содержимое лунок аспирацией или декантированием. Промойте лунки 4 раза, как это указано в разделе «РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОМЫВКЕ».
10. Внесите по 100 мкл Раствора Хромогена во все лунки. Цвет раствора должен измениться на голубой.
11. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре в темноте. **Замечание: Не накрывайте микропланшет алюминиевой фольгой или металлизированной магнитной плёнкой.** Время инкубации с хромогенным субстратом определяется типом используемого микропланшетного ридера. Многие ридеры способны считать оптическую плотность только до 2,0 Ед оптической плотности. Для подобных фотометров реакция должна быть остановлена до достижения ярко окрашенными лунками предела измерения инструмента. Определите оптическую плотность в лунках при 450 нм только после внесения стоп-раствора. Если у ридера верхний предел считывания 2,0 Ед оптической плотности, остановите реакцию через 15-20 минут инкубации с субстратным раствором.
12. Добавьте по 100 мкл стоп-раствора во все лунки. Постучите осторожно по держателю стрипов для перемешивания реагентов. Цвет раствора в лунках должен измениться с голубого на жёлтый.
13. Определите оптическую плотность в лунках при 450 нм против «хромогенного бланка», представляющего собой смесь 100 мкл Хромогенного раствора ТМБ и 100 мкл стоп-раствора. Определите оптическую плотность не позднее чем через 30 минут после внесения стоп-раствора.
14. Используйте специальное программное обеспечение для построения калибровочной кривой. Оптимальные результаты получаются при использовании 4-параметрической аппроксимации.
15. Определите концентрации в контролях и образцах из стандартной кривой. Для корректировки разведения, сделанного в процессе анализа необходимо умножить значения, полученные для образцов на соответствующий коэффициент разведения. Все образцы со значениями, большими, чем у самого высокого стандарта должны быть разведены буфером для разведения стандарта и проанализированы еще раз. При этом умножьте значение найденной концентрации на коэффициент разведения.

Пример результатов измерения стандартов Нu Аβ42 в диапазоне 0-1,000 пг/мл

Standard Нu Аβ42 pg/mL	Optical Density (450 nm)
1,000	3.060
500	1.848
250	1.018
125	0.510
62.5	0.266
31.25	0.187
15.63	0.146
0	0.199

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Чувствительность анализа

Минимально определяемая концентрация Нu Аβ42 составила < 10 пг/мл и была рассчитана по калибровочной кривой, как уровень, соответствующий сумме 2x стандартных отклонений и среднего значения ОП, полученного для стандарта 0 пг/мл в результате 64 определений.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

1. Воспроизводимость внутри одной серии

Воспроизводимость внутри одной серии определялась путем 16 определений каждого образца.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Среднее значение, (пг/мл)	63.0	293.7	884.6
Стандартное отклонение, (пг/мл)	3.1	7.8	26.7
Коэффициент вариации, (%)	5.0	2.7	3.0

2. Воспроизводимость между сериями

Воспроизводимость между сериями исследований определялась анализом образцов сыворотки 48 раз в независимых анализах.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Среднее значение, (пг/мл)	63.1	293.7	884.6
Стандартное отклонение, (пг/мл)	3.5	9.3	36.6
Коэффициент вариации, (%)	5.5	3.2	4.1

ЛИНЕЙНОСТЬ РАЗВЕДЕНИЯ

Образец человеческой CSF, содержащий $\text{Hu A}\beta 42$, был серийно разведен буфером для разведения стандарта в пределах диапазона измерения метода. Среда RPMI, содержащая 10% телячьей сыворотки, была обогащена нативным $\text{Hu A}\beta 42$ из CSF и серийно разведена буфером для разведения стандарта в пределах диапазона измерения метода. Линейный регрессионный анализ измеренных значений в образцах против ожидаемых концентраций дал коэффициент корреляции 0.99.

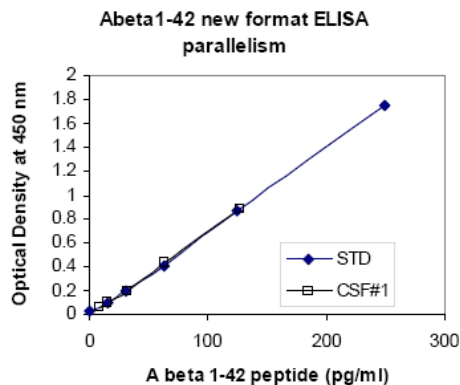
Разведение	Цереброспинальная жидкость		
	Измеренное, пг/мл	Ожидаемое, пг/мл	% от Ожидаемого
1/4	127	127	---
1/8	71	63.5	112
1/16	37	31.8	116
1/32	18.7	15.9	118
1/64	7.6	7.95	96

ИЗВЛЕЧЕНИЕ

Извлечение $\text{Hu A}\beta 42$, добавленного в СМЖ, составило в среднем 80%. Извлечение $\text{Hu A}\beta 42$, добавленного в культуральную среду, содержащую 10% телячьей сыворотки, составило в среднем 86%.

ПАРАЛЛЕЛИЗМ

Нативный $\text{Hu A}\beta 42$ был добавлен в буфер для разведения стандарта и измерен по отношению к стандарту, использованному в данном методе. Параллельность значений, полученных для нативного и рекомбинантного белков, показана на рисунке, приведенном ниже.



СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Серия буферных растворов, содержащих исследуемые на перекрестное влияние вещества, была проанализирована с помощью данного набора. Следующие вещества были проанализированы, и для вышеуказанной концентрации у них не была обнаружена перекрестная активность:

$\text{A}\beta$ [1-12] (100 нг/мл), $\text{A}\beta$ [1-20] (100 нг/мл), $\text{A}\beta$ [12-28] (100 нг/мл), $\text{A}\beta$ [22-35] (100 нг/мл), $\text{A}\beta$ [1-40] (100 нг/мл), $\text{A}\beta$ [1-43] (10 нг/мл), $\text{A}\beta$ [42-1] (100 нг/мл), α -Synuclein (200 нг/мл), APP (250 нг/мл), and Tau (40 нг/мл).

ХУК-ЭФФЕКТ

Образцы, обогащенные пептидом $\text{Hu A}\beta 42$ до уровня 1 мкг/мл, давали ответ выше самого высокого стандарта.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Не экстраполируйте результаты выше значения максимального стандарта, т.к. зависимость концентрация/оптическая плотность нелинейна в этом диапазоне, и точности измерения трудно достичь. В этом случае все образцы должны быть разведены буфером для

разведения стандарта и проанализированы ещё раз, а результат необходимо умножить на соответствующий коэффициент разведения. Влияние различных лекарств, aberrантных (отклоняющихся от нормы) сывороток (гемолиз, гиперлипидемия, желтуха и т.д.) и использование других биологических образцов не до конца исследовано. Степень деградации нативного $\text{Hu A}\beta 42$ в различных матриксах не исследована. В литературе, посвящённой иммуноанализу, часто содержатся ссылки на помехи сигнала в некоторых сыворотках, приписываемые влиянию гетерофильных антител. Хотя нами и не были замечены такие образцы, нельзя исключить возможность подобного воздействия.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com