

**НАБОР ИФА
ДЛЯ ПРЯМОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ
6-СУЛЬФАТОКСИМЕЛАТОНИНА В
ОБРАЗЦАХ МОЧИ ЧЕЛОВЕКА**

EK-M6S, 6-Sulfatoxymelatonin

Каталог. № : **EK-M6S**
Количество : **96**
Производитель: **BUHLMANN
LABORATORIES AG, (Швейцария)**

Методика от **17-11-2012**



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

НАЗНАЧЕНИЕ

В набор BUHLMANN 6-Sulfatoxymelatonin ELISA входят материалы для прямого количественного определения 6-сульфатоксимелатонина (6-SMT) в моче человека (1-7).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод BUHLMANN 6-SMT ELISA основан на конкурентном иммуноферментном анализе, с использованием захватывающих антител (8). Поликлональные антитела, специфичные к кроличьим иммуноглобулинам, сорбированы в лунках микропланшета, поставляемого в наборе. Во время первой 3-х часовой инкубации 6-SMT, присутствующий в предварительно разведенных образцах мочи, контроли и калибраторы, готовые к использованию, соответственно, конкурируют с биотинилированным 6-SMT за сайты связывания высокоспецифичных кроличьих анти-6-SMT антител, а образовавшиеся комплексы (биотинилированные) 6-SMT-антитело захватываются антителами, сорбированными в лунках. После промывки в лунки добавляется ферментная метка, стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP). Во время второй 30-ти минутной инкубации ферментная метка связывается с комплексами 6-SMT-биотин/антитело, захваченными в лунках микропланшета. Не связавшаяся ферментная метка удаляется при второй промывке и в лунки добавляется субстрат TMB (тетраметилбензидин). Во время третьей 30-ти минутной инкубации образуется окрашенный продукт, и интенсивность окрашивания обратно пропорциональна количеству 6-SMT, первоначально присутствовавшего в образце. После добавления стоп-раствора (кислоты) цвет жидкости в лунках меняется с голубого на желтый. Измерение оптической плотности проводят при длине волны 450 нм.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

Таблица 1

Реагенты	Количество	Кат. №	Разведение
Микропланшет, покрытый козыми антителами к Ig кролика	12x8 лунок	B-M6S-MP	Промыть 2 раза промывочным буфером
Пленка для заклеивания микропланшета	3 пленки		
Концентрат промывочного буфера (10x), с консервантами	1 флакон, 100 мл	B-M6S-WB	Развести 900 мл деионизированной воды
Инкубационный буфер, с консервантами	1 флакон, 100 мл	B-M6S-IB	Готов к использованию
Стандарты, от А до F ¹ 6-SMT в буферном матриксе, с консервантами	1 флакон 2мл 5 флаконов по 0.5 мл	B-M6S-CASET	Готов к использованию
Контроли низкого и высокого уровней ²⁾ разведенная человеческая моча, с консервантами	2 флакона по 0.5 мл	B-M6S-CONSET	Готов к использованию
Антисыворотка Кроличья анти-6-SMT в буферном матриксе, с консервантами	1 флакон 5.5 мл	B-M6S-AS	Готов к использованию (желтый раствор)
Биотиновый конъюгат 6-SMT, конъюгированный с биотином, в буферном	1 флакон 5.5 мл	B-M6S-BC	Готов к использованию (голубой раствор)

матриксе, с консервантами			
Ферментная метка, стрептавидин, конъюгированный с HRP, в белковом буфере с консервантами	1 флакон, 11мл	B-M6S-EL	Готов к использованию (желтый раствор)
Субстрат TMB, в цитратном буфере с перекисью	1 флакон, 11мл	B-TMB	Готов к использованию (бесцветный раствор)
Стоп-раствор, 0.25 М серная кислота	1 флакон, 11мл	B-SS	Готов к использованию Коррозийное вещество

1) стандарт А является нулевым стандартом и не содержит 6-SMT (2 мл во флаконе). Стандарты В, С, D, Е и F содержат 4, 10, 25, 62.5 и 200 пг/мл 6-SMT, соответственно (0.5 мл во флаконе). Так как для образцов мочи рекомендуется разведение 1 в 200, калибраторы В, С, D, Е и F помечены как: 0.8, 2, 5, 12.5 и 40 нг/мл, соответственно. Следовательно, разведение образцов уже учтено для окончательных расчетов.
2) Контроли содержат различные количества (зависит от лота) 6-SMT. Точные концентрации контролей указаны в сертификате качества, поставляемом с набором.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Таблица 2

Не вскрытые Реагенты	
Хранить при 2-8°C до истечения срока годности, указанного на этикетках.	
Открытые / Разведенные реагенты	
Микропланшет	Немедленно верните неиспользованные стрипы в пакет из фольги с осушителем и тщательно запечатайте пакет. Хранить при 2-8°C до двух месяцев.
Буфер для промывок	Хранить при 2-8°C до истечения срока годности, указанного на этикетке.
Стандарты	
Контроли	
Инкубационный буфер	
Антисыворотка	
Биотиновый конъюгат	
Ферментная метка	Хранить при 18-28°C до истечения срока годности, указанного на этикетке.
Раствор субстрата	
Стоп-раствор	

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Стандарты (B-M6S-CASET) и контроли (B-M6S-CONSET), поставляемые в данном наборе, содержат компоненты человеческого происхождения. Каждый донор сыворотки, использованной при приготовлении данных реагентов, был протестирован методами, одобренными FDA, с отрицательными результатами, на HBV поверхностный антиген, HCV и HIV1/2 антитела. Так как не существует метода, достаточно достоверного, гарантирующего отсутствие инфекций, то нельзя быть уверенным, что данные материалы не могут переносить гепатиты или ВИЧ. Следовательно, со всеми образцами крови пациентов, а также реагентами набора необходимо обращаться как с возможными переносчиками инфекций. Со всеми продуктами, содержащими компоненты человеческого происхождения, необходимо обращаться в соответствии с установленными правилами, соблюдая необходимые меры безопасности.

Субстрат и стоп-раствор: Раствор субстрата (B-TMB) содержит тетраметилбензидин (TMB), перекись и диметилформамид. Стоп-раствор (B-SS) содержит серную кислоту. Каждый из этих реагентов может вызвать раздражение глаз, кожи и слизистых поверхностей. Избегайте контактов с глазами, кожей и одеждой.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки со сменными наконечниками: 5, 50 мкл, 100 мкл и 1 мл.
- Одноразовые полистироловые или полипропиленовые пробирки для приготовления разведений образцов.
- Цилиндр на 1000 мл для разведения концентрата промывочного буфера.
- Промывающее устройство для микропланшетов или сжимаемая бутылка для промывочного буфера.

- Фильтровальная бумага
- Холодильник
- Орбитальный шейкер для микропланшетов.
- Микропланшетный ридер с возможностью измерений при длине волны 450 нм.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для анализа данным методом требуется <10 мкл мочи. Соберите мочу, центрифугируйте 1 минуту при 12000 x g или 5 минут при 2000 x g и перенесите аликвоты в чистые микропробирки. 6-SMT, содержащийся в моче, стабилен несколько недель даже при хранении при температуре окружающей среды. Однако, из-за возможного размножения микроорганизмов рекомендуется хранить образцы мочи замороженными при $\leq -20^{\circ}\text{C}$. При хранении замороженными при $\leq -20^{\circ}\text{C}$ образцы стабильны >1 года. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания. Перед использованием замороженные образцы должны полностью растаять и их необходимо тщательно перемешать.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА

- Для получения оптимальных результатов постановку анализа необходимо проводить во льду, охлажденными реагентами (см. раздел «Процедура метода», шаги 4-6 и 9).
- Фермент, использованный для метки, инактивирован кислородом и очень чувствителен к азиду натрия, тимерозалу, гипохлористой кислоте, и ароматическим хлоруглеводородам, часто присутствующим в водоснабжении лабораторий. Используйте только деионизированную воду высокого качества.
- Если исходная концентрация образца выше, чем концентрация наибольшего стандарта, образец мочи должен быть разведен инкубационным буфером и протестирован еще раз. Это дополнительное разведение необходимо учитывать при окончательных расчетах фактической концентрации 6-SMT, присутствовавшего в этом образце.
- Если исходная концентрация образца ниже, чем концентрация наименьшего стандарта, образец мочи должен быть разведен инкубационным буфером в меньшем соотношении, чем в первый раз (Например, в 20 раз вместо 200), и протестирован еще раз. Это меньшее разведение необходимо учитывать при окончательных расчетах фактической концентрации 6-SMT, присутствовавшего в этом образце.

ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

1. Разведите все образцы мочи пациентов в соотношении 1:200 инкубационным буфером (например, 5 мкл мочи + 1 мл инкубационного буфера).
2. Приготовьте микропланшет с необходимым для анализа количеством стрипов, с учетом количества лунок, необходимых для анализа стандартов, контролей и образцов. **Сразу же удалите неиспользуемые стрипы из держателя и поместите их в пакет из фольги, содержащий осушитель, Тщательно запечатайте пакет. Храните охлажденным. Внимание: Только при выполнении этапов с 3 по 9 используйте охлажденные реагенты!**
3. Промойте лунки микропланшета 2 раза, используя не менее чем по 300 мкл промывочного буфера на лунку. Удалите жидкость из лунок и сильно постучите перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге.
 4. a. Внесите по 100 мкл стандарта А, в дублях, в лунки А1 и А2.
 - b. Внесите по 50 мкл стандарта А (нулевой стандарт), в дублях, в лунки В1+В2.
 - Внесите по 50 мкл стандарта В, в дублях, в лунки С1+С2.
 - Внесите по 50 мкл стандарта С, в дублях, в лунки D1+D2.
 - Внесите по 50 мкл стандарта D, в дублях, в лунки E1+E2.
 - Внесите по 50 мкл стандарта E, в дублях, в лунки F1+F2.
 - Внесите по 50 мкл стандарта F, в дублях, в лунки G1+G2.
 - Внесите по 50 мкл контроля низкого уровня в лунки H1+H2.
 - Внесите по 50 мкл контроля высокого уровня, в дублях, в лунки A3+A4.
 - c. Внесите по 50 мкл каждого разведенного образца, в дублях, в соответствующие лунки.
5. Внесите по 50 мкл М6S-биотинового конъюгата (голубой раствор) во все лунки.
6. Внесите по 50 мкл антисыворотки (желтый раствор) во все лунки, **за исключением бланка** (лунки А1+А2). Закройте микропланшет пленкой, поставьте его на 60 секунд на орбитальный шейкер для микропланшетов, установленный на скорости 800-1000 об/минуту.
7. Инкубируйте в течение 3 часов (± 5 минут) при 2-8°C.
8. Удалите и выбросьте пленку. Удалите жидкость из лунок

и промойте их 4 раза, используя не менее чем по 300 мкл охлажденного промывочного буфера на лунку. Удалите жидкость из лунок и сильно постучите перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге.

9. Внесите по 100 мкл ферментной метки (желтый раствор) во все лунки.
10. Закройте микропланшет пленкой, и инкубируйте в течение 30 минут (± 5 минут) при 2-8°C.

Внимание: перед использованием раствор субстрата ТМВ должен достичь комнатной температуры, 18-28°C.
11. Удалите и выбросьте пленку. Удалите жидкость из лунок и промойте их 4 раза, используя не менее чем по 300 мкл промывочного буфера на лунку. Удалите жидкость из лунок и сильно постучите перевернутым микропланшетом по фильтровальной бумаге.
12. Внесите по 100 мкл раствора субстрата ТМВ в каждую лунку.
13. Закройте микропланшет пленкой, поставьте его на орбитальный шейкер для микропланшетов, установленный на скорости 800-1000 грп, защитите микропланшет от света, и инкубируйте в течение 15 минут ± 2 минуты при 18-28°C.
14. Внесите по 100 мкл стоп-раствора во все лунки. Удалите пузыри с помощью наконечника для пипетки. Переходите к шагу 15 не позднее, чем через 30 минут.
15. Считайте абсорбцию при 450 нм с помощью микропланшетного ридера. Если возможно, используйте длину волны сравнения. Установите ридер для измерения при двух длинах волн, базовая — 450 нм, и длина волны сравнения, для коррекции фона, 600 или 620 нм.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Калибровочная кривая: Запишите абсорбцию при 450 нм для каждого стандарта и бланка (NSB). Посчитайте среднее значение для каждого дубля, вычитите среднее значение бланка (NSB) и запишите полученные результаты (= скорректированная средняя абсорбция). Рассчитайте связывание (В) для пары лунок каждого стандарта, как процент от стандарта «0» (В0), используя NSB-скорректированную абсорбцию стандарта «0» как 100 %:

$B/V \text{ Во } (\%) = \text{процент связывания} = \text{чистая абсорбция} / \text{чистая абсорбция стандарта «0»} \times 100$

Для построения калибровочной кривой отложите значения процента связывания (вертикальная ось у) против концентраций М6S (в нг/мл) соответствующих стандартов (горизонтальная ось х), используя полулогарифмическую бумагу (lin/log). Проведите оптимальную кривую по построенным точками или рассчитайте калибровочную кривую используя 4х параметрическую регрессию.

Образцы и контроли: Запишите абсорбцию при 450 нм для каждого образца или контроля. Посчитайте среднее значение для каждого дубля, вычитите среднее значение бланка и запишите полученные результаты (= скорректированная средняя абсорбция). Рассчитайте, как описано выше, связывание для пары лунок каждого образца, как процент стандарта «0» (В0), принимая NSB-скорректированную абсорбцию стандарта «0» за 100%. Найдите значения, подсчитанные для образцов, на вертикальной оси, проведите горизонтальную прямую до пересечения с калибровочной кривой, а затем считайте соответствующее значение концентрации М6S (в нг/мл) на горизонтальной оси.

ЗАМЕЧАНИЕ: Если Микропланшетный спектрофотометр не может считывать абсорбцию выше 2 или выше абсорбции стандарта «0», рекомендуется провести повторное считывание при длине волны 490 или 492 нм (если возможно, использовать длину волны сравнения 600 или 620нм). В этом случае постройте вторую калибровочную кривую, используя абсорбцию, считанную при длине волны 490 или 492 нм для всех стандартов. Концентрацию образцов, значения ОП которых при длине волны 450 нм превышают предел считывания прибора, можно вычислить так, как это описано выше, используя новую калибровочную кривую. Значения, полученные при длине волны 490 или 492 нм, не должны заменять значений, полученных при 450 нм, если они не превышают предел определений прибора. В таблице 11 и на рисунке 1 приведен пример результатов и калибровочной кривой, полученных данным методом. *Данные результаты и калибровочная кривая приводятся только в демонстрационных целях и не должны использоваться для расчетов результатов. Калибровочная кривая должна быть построена для каждой постановки.*

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Полное понимание данной инструкции необходимо для успешного использования метода. Достоверные результаты будут

получены только при использовании точных лабораторных техник и аккуратного соблюдения данной инструкции. Так как не существует коммерчески доступных контрольных материалов 6-SMT в моче, рекомендуется использовать пул образцов мочи, содержащих различные количества 6-SMT для внутреннего контроля качества. Параметры воспроизводимости калибровочной кривой и контрольных значений должны укладываться в диапазон допустимых значений, принятых в лаборатории. Диапазон допустимых значений контролей может меняться от лота к лоту и указан в дополнительном сертификате, прилагаемом к набору. Если точность метода не коррелирует с установленными границами, и повторение исключает ошибки исполнения метода, проверьте следующие параметры: i) пипетирование, температурные условия, точность соблюдения времени ii) установки ИФА анализатора iii) срок годности реагентов iv) условия хранения и инкубаций v) раствор субстрата TMB должен быть бесцветным vi) чистоту воды.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Воспроизводимость внутри серии: 7.1%.

Воспроизводимость внутри серии рассчитывалась по результатам 24 пар измерений, полученных в одной постановке для 3 образцов мочи с различными количествами 6-SMT. Результаты представлены в таблице 12.

Воспроизводимость между сериями: 11.9%.

Воспроизводимость внутри серии рассчитывалась по результатам 10 пар измерений, полученных в 10 различных постановках для 6 образцов мочи с различными количествами 6-SMT. Результаты представлены в таблице 13.

Линейность разведения: 97.8 %. Образцы мочи с высокой концентрацией 6-SMT, были разведены инкубационным буфером и затем проанализированы с помощью данного метода. Результаты представлены в таблице 14.

Извлечение: 119%. 3 образца человеческой мочи были обогащены различными количествами 6-SMT и данным методом. Результаты представлены в таблице 15.

Аналитическая чувствительность: 0.14 нг/мл. 23 дубля инкубационного буфера (Стандарта А) были проанализированы в одной постановке. Были рассчитаны среднее значение абсорбции и стандартное отклонение. Минимально определяемое количество 6-SMT составило 0.14 нг/мл и было рассчитано добавлением двух стандартных отклонений среднему значению абсорбции, и получено из калибровочной кривой, построенной для этой постановки.

Функциональная чувствительность: 1.5 нг/мл. Минимальная функциональная определяемая доза (FLDD) для данного метода — это минимальная концентрация 6-SMT в моче, которая может быть измерена с коэффициентом вариации (C.V.) между сериями менее 15%. FLDD была определена для 7 различных образцов мочи, каждый из которых был измерен в дублях в 10 постановках. FLDD была рассчитана и составила 1.5 нг/мл (при разведении образцов 1:200).

Специфичность: При 50% связывании определяли перекрестную реактивность кроличьих анти-6-SMT антител для различных веществ. Результаты приведены в таблице 16.

Сравнение методов: 42 образца мочи были протестированы данным методом BUHLMANN 6-Sulfatoxymelatonin ELISA, и другим коммерчески доступным 125I-радиоиммунным методом (РИА), который считается «золотым стандартом» в научной литературе (9-11).

Линейный регрессионный анализ (рис.2) дал следующие результаты:

BUHLMANN ELISA = 0.75 x коммерчески доступный RIA + 1.70

нг/мл

$r = 0.964$ (n = 42)

Таблица 11

Пример результатов

	Конц. (нг/мл)	ОП	В/В ₀	Рассчит. Конц. (нг/мл)	Конц. CV (%)
Бланк		0,127			
Бланк		0,119			
Бланк, среднее		0,123			4,6
Стандарт А	0,0	2,213	100,0		
Стандарт А	0,0	2,176	100,0		
Стандарт А, среднее	0,0	2,194	100,0		1,2
Стандарт В	0,8	1,960	88,7	0,8	
Стандарт В	0,8	1,966	89,0	0,8	
Стандарт В, среднее	0,8	1,963	88,8	0,8	2,1
Стандарт С	2,0	1,699	76,1	2,0	
Стандарт С	2,0	1,705	76,4	2,0	
Стандарт С, среднее	2,0	1,702	76,2	2,0	1,0
Стандарт D	5,0	1,205	52,2	4,9	
Стандарт D	5,0	1,192	51,6	5,1	
Стандарт D, среднее	5,0	1,199	51,9	5,0	1,5
Стандарт E	12,5	0,719	28,8	12,2	
Стандарт E	12,5	0,697	27,7	12,8	

Стандарт E, среднее	12,5	0,708	28,2	12,5	3,7
Стандарт F	40,0	0,365	11,7	40,0	
Стандарт F	40,0	0,365	11,7	40,0	
Стандарт F, среднее	40,0	0,365	11,7	40,0	0,0
Низкий контроль		1,485		3,1	
Низкий контроль		1,444		3,3	
Низкий контроль, среднее		1,464		3,2	5,1
Высокий контроль		0,593		17,0	
Высокий контроль		0,579		17,7	
Высокий контроль, среднее		0,586		17,3	3,0
Образец 1		0,808		10,1	
Образец 1		0,794		10,3	
Образец 1, среднее		0,801		10,2	2,0
Образец 2		0,392		35,5	
Образец 2		0,411		32,8	
Образец 2, среднее		0,401		34,2	5,6

ED₂₀ = 20.2 нг/мл

ED₅₀ = 5.3 нг/мл

ED₈₀ = 1.6 нг/мл

Рисунок 1

Пример калибровочной кривой

нг/мл 6-SMT

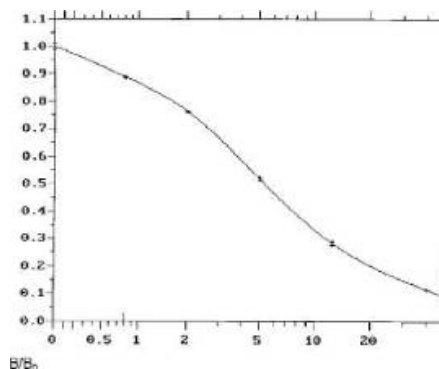


Таблица 12

Воспроизводимость внутри серии

Образцы мочи, разведение 1:200	Среднее, нг/мл	SD, нг/мл	CV(%)
1	3.09	0.30	9.7
2	11.29	0.70	6.2
3	34.65	1.82	5.3
Среднее:			7.1

Таблица 13

Воспроизводимость между сериями

Образцы мочи, разведение 1:200	Среднее, нг/мл	SD, нг/мл	CV (%)
5	1.58	0.28	17.4
6	1.54	0.24	15.3
7	2.03	0.27	13.2
8	3.16	0.30	9.6
9	10.62	0.79	7.5
10	32.10	2.71	8.4
Среднее:			11.9

Таблица 14

Линейность разведений

Образец	Базовое значение (нг/мл)	Козфф. разведения	Наблюдаемое значение (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Н/О (%)
11	29.7	1:200	29,7	---	---
		1:400	15,2	14,8	102
		1:800	7,3	7,4	98
		1:1600	3,7	3,7	100
		1:3200	2,0	1,9	110
12	26.7	1:50	26,7	---	---
		1:100	13,3	13,4	100
		1:200	6,4	6,68	96
		1:400	3,2	3,34	96
		1:800	1,5	1,67	90
13	16.9	1:1600	0,77	0,83	92
		1:12,5	16,9	---	---
		1:25	7,5	8,50	89
		1:50	3,8	4,23	89
		1:100	2,1	2,12	97
1:200	1,2	1,06	112		
Среднее					97.8

Таблица 15

Извлечение

Образец	Базовое значение (нг/мл)	Насыщенное (нг/мл)	Наблюдаемое значение (нг/мл)	Ожидаемое значение (нг/мл)	Н/О (%)
14	0.88	0,5	1.38	1.43	104
		1,0	1.88	1.89	100
		2,0	2.88	3.53	123
		4,0	4.88	3.76	77
		8,0	8.88	8.58	97
		16,0	16.88	17.32	103
		32,0	32.88	28.05	85
15	6.3	0,5	6.8	6.2	91
		1,0	7.3	6.87	94
		2,0	8.3	7.90	95
		4,0	10.3	10.25	100
		8,0	14.3	17.78	124
		16,0	22.3	28.23	127
		32,0	38.3	38.24	100
16	4.6	0,5	5.1	4.01	79
		1,0	5.6	5.15	92
		2,0	6.6	7.58	115
		4,0	6.6	10.44	122
		8,0	12.6	14.82	118
		16,0	20.6	25.75	125
		32,0	36.6	35.76	98
Среднее					119

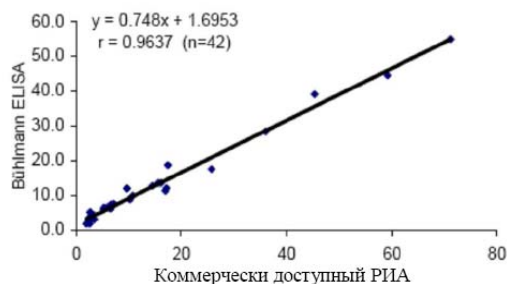
Таблица 16

Специфичность

6-сульфатоксимелатонин.....	100 %
N-ацетил-серотонин сульфат.....	0.01 %
Мелатонин.....	0.007%
6-гидроксимелатонин.....	0.001 %
Следующие перечисленные соединения:.....	< 0.001 %
5-сульфатокси-N-ацетилсеротонин, 5-глюкуронид-N-ацетилсеротонин, N-ацетилсеротонин, 6-глюкуронидмелатонин, 5-метоксииндол уксусная кислота, триптофан, N-ацетилтриптофан, 5-метокситриптофан, 5-гидрокситриптофан, N-ацетилтриптамин, N-метилтриптамин, 5-гидрокситриптамин, 5-метокситриптамин.	

Рисунок 2

Сравнение методов



Описание таблиц: см. "Расчет результатов", "Характеристики анализа".



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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