

НАБІР ІФА

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ІМУНОГЛОБУЛІНУ Е (IgE)

2525-300, Immunoglobulin E (IgE) Test System

Каталог. №: 2525-300

Кількість : 96

Виробник : Monobind Inc., (США)

Методика від 16-07-2019

Версія 4



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1.0 ВСТУП

Цільове використання: Кількісне визначення концентрації імуноглобуліну Е (IgE) в сироватці людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу, колориметричного.

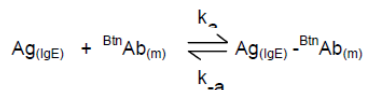
2.0 ПОЯСНЕННЯ (Див. оригінал інструкції).

3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

Імуноферментний послідовний аналіз (тип 4):

Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають в надлишку високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і біотинильовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок взаємодіють сорбовані в осередках стрептавідин і додані біотинильовані моноклональні антитіла анти-IgE.

При змішуванні біотинильованих антитіл і сироватки, що містить антиген СА 15-3, між СА 15-3 антигеном і антитілами відбувається реакція з утворенням комплексу антитіло-антиген. Послідовно біотин, зв'язаний з антитілом, взаємодіє зі Стрептавідином, нанесеним в лунки, що призводить до іммобілізації комплексу. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$B^{tn}Ab_{(m)}$ = Біотинильовані моноклональні антитіла (надлишкова кількість)

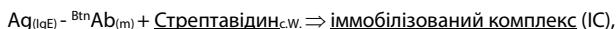
$Ag_{(IgE)}$ = Нативний антиген (змінна кількість)

$Ag_{(IgE)} - B^{tn}Ab_{(m)}$ = Комплекс антиген-антитіло (змінна кількість)

k_a = Константа швидкості асоціації

k_{-a} = Константа швидкості дисоціації

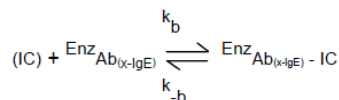
Одночасно в лунках утворюється комплекс при реакції високоафінного стрептавідину і біотинильованих антитіл. Ця взаємодія ілюструється так:



Стрептавідин_{с.в.} = Стрептавідин, нанесений в лунки

Іммобілізований комплекс = Імунний комплекс, зв'язаний з поверхнею лунок.

Після досягнення рівноваги фракція, пов'язана з антитілами, відділяється від незв'язаних антигенів декантациєю або аспірацією. На наступному етапі додаються інші антитіла (специфічні до іншого епітопу), мічені ферментом. В осередках утворюється комплекс [антитіло-антиген-біотинильоване антитіло]. Надмірна кількість ферментного кон'югату видаляється промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл визначається в реакції з відповідною кількістю субстрату, вона прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків.



де $EnzAb_{(x-IgE)}$ = фермент-мічені антитіла (надлишкова кількість);

$EnzAb_{(x-IgE)} - IC$ = комплекс антиген-антитіло

k_b = константа швидкості асоціації

k_{-b} = константа швидкості дисоціації

4.0 РЕАГЕНТИ

Матеріали, що постачаються:

A. IgE Калібратори – 1.0 мл/флакон

Шість (6) флаконів контрольних калібраторів на основі людської сироватки з концентрацією 0 (A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 150 (E) і 400 (F), МОД/мл. Зберігати при температурі 2-8 °С. Консервант був доданий. **Примітка:** Калібратори стандартизовані проти 2-го IRP 75/502 для IgE WHO3.

B. Біотиновий Реагент IgE - 13 мл/флакон

Один (1) флакон з біотинильованим реагентом mIgG анти-людського IgE, представлений в стабілізованій білком матриці. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

C. Ферментний реагент IgE - 13 мл/флакон

Один (1) флакон з анти-людським IgE-HRP вбудованим комплексом у білок-стабілізовану матрицю. Додано консервант. Зберігати при температурі 2-8 °С.

D. Планшет, покритий Стрептавідином, 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °С.

E. Концентрат розчину для промивання - 20 мл

Один флакон, що містить ПАР в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °С.

F. Субстрат А – 7.0 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить ТМБ (Тетраметилбензидин) в ацетатному буфері. Зберігати при температурі 2-8 °С.

G. Субстрат В – 7.0 мл/флакон

Один (1) флакон, що містить перекис водню (H₂O₂) в ацетатному буфері. Зберігати при температурі 2-8 °С.

H. Стоп-розчин - 8.0 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °С.

I. Інструкція

Зауваження 1: Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

Зауваження 2: Уникати впливу тепла та світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °С. Стабільність набору і компонентів зазначена на етикетці.

Зауваження 3: Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

4.1 Необхідні матеріали, які не поставляються з набором

1. Мікродозатори на 25 і 50 мкл з точністю вищою 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гіршою 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка пляшка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор (опційно) для кроків промивання.
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Набір призначений тільки для діагностики in-vitro.

Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна здійснюватися відповідно до місцевих нормативних вимог.

6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать сироватка крові за типом і слід дотримуватися звичайних застережних заходів в зборі зразків з вени руки. Для належного порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

У пацієнтів, які отримують терапію високими дозами біотину (тобто > 5 мг/добу), не слід брати зразок до принаймні 8 годин після останнього введення біотину, переважно протягом ночі, щоб забезпечити пробу натще.

Зразки можуть зберігатися при 2-8°C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання. Для аналізу в дублях потрібно 0.050 мл сироватки.

7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контролю з рівнями низьким, нормальним і високим для відстеження характеристик набору. Ці контролю повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що постачаються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або розкладанні реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

1. Промивний буфер

Розвести вміст промивного концентрату до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою у відповідному контейнері для зберігання. Зберігайте розведений буфер при 2-30 °C до 60 днів.

2. Робочий субстратний розчин - Стабільний протягом одного року
Вилийте вміст флакона розчину 'A' в пробірку з розчином 'B'. Помістіть жовтий ковпачок на флакон зі змішаним реагентом для полегшення ідентифікації. Змішайте і маркуйте відповідним чином. Зберігати при температурі 2-8 °C.

Примітка 1: Не застосовувати робочий субстрат, якщо він блакитного кольору.

Примітка 2: Не використовуйте реагенти, які забруднені або є ріст бактерій.

9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролю повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

****Процедура випробування повинна виконуватися кваліфікованим персоналом****

1. Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C.
2. Додайте піпеткою по 25 мкл стандартів, контролів та досліджуваних зразків у відповідні лунки.
3. Додайте по 100 мкл Біотинового реагенту IgE у кожен лунку. Дуже важливо додавати реагенти близько до дна лунок.
4. Добре перемішайте мікропланшет протягом 20-30 секунд і накрийте його.
5. Інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
6. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
7. Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
8. Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту IgE у кожен лунку.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТНОГО РЕАГЕНТУ

9. Накрийте і інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.

10. Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
11. Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка пляшка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.
12. Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.

НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

13. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
14. Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
15. Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.

10.0 РЕЗУЛЬТАТИ

Для визначення концентрації IgE в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

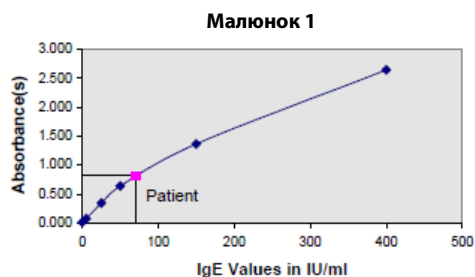
1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки зчитувача мікропланшетів, як зазначено в Прикладі 1.
2. Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних щільностей для кожного стандарту в залежності від концентрації IgE в МОд/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
3. Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
4. Визначте невідомі концентрації IgE в контролях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція (1.323) перетинає стандартну криву при 142 МОд/мл (див. мал.1).

Примітка: Програмне забезпечення може також бути використане для перетворення даних. Якщо таке програмне забезпечення використовується, перевірка програмного забезпечення повинна бути проведена.

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Значення (Од/мл)
Калібратор А	A1	0.014	0.015	0
	B1	0.016		
Калібратор В	C1	0.072	0.073	5
	D1	0.074		
Калібратор С	E1	0.364	0.345	25
	F1	0.326		
Калібратор D	G1	0.663	0.639	50
	H1	0.614		
Калібратор E	A2	1.340	1.364	150
	B2	1.388		
Калібратор F	C2	2.601	2.641	400
	D2	2.682		
Контроль 1	E2	2.575	2.562	375.3
	F2	2.549		
Контроль 2	G2	0.818	0.813	71.2
	H2	0.807		
Пацієнт 1	A3	1.322	1.323	142.0
	B3	1.324		

* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.



11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Поглинання (OD) калібратора 'A' повинно бути ≤ 0.05 .
2. Поглинання (OD) калібратора 'F' має бути ≥ 1.8 .
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

12.0 ОБМЕЖЕННЯ МЕТОДУ

MSDS та форма аналізу ризику для цього продукту доступні за запитом від компанії Monobind Inc.

12.1 Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

12.2 Інтерпретація результатів

1. Вимірювання та інтерпретація результатів повинні проводитись досвідченими професіоналами.
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедур тестової системи були розроблені для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів (Boscato LM, Stuart MC. "Гетерофільні антитіла: Проблема для всіх імунологічних аналізів" *Clin.Chem.* 1988; 34:27-33). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.

6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховувані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
7. Концентрація IgE сироватки залежить від безлічі факторів: у тому числі, якщо пацієнт сенсibilізований, скільки разів пацієнт піддався впливу алергену і т. д. Загальна концентрація IgE не є достатньою, щоб оцінити клінічний стан. Усі клінічні результати, особливо специфічні тестування на алергії, слід брати до уваги при визначенні клінічного стану пацієнта.
8. Оскільки всі атипові реакції не є IgE опосередковані, всі відповідні клінічні дані повинні бути прийняті до уваги, перш ніж робити висновки для пацієнтів, які можуть бути в нормальному діапазоні.

13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дослідження населення з різних вікових груп було проведено з метою оцінити тест-систему IgE AccuBind™ ELISA. Результати представлені в таблиці 1:

ТАБЛИЦЯ 1

Очікувані значення для тест-системи IgE AccuBind™ ELISA (в МОд/мл)

Вік (років)	Кількість (n)	Середнє	Діапазон
0-3	31	6.4	ND-46
3-16	43	25.0	ND-280
Дорослі	145	43	0-220

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даній популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

14.1 Точність

Точність набору всередині серії визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Отримано точність всередині аналізу 1.95 до 5.87%. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (МОд/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	20	48.9	2.87	5.87
Середній	20	160.5	6.47	4.03
Високий	20	297.6	5.81	1.95

Для того щоб перевірити точність між аналізами тест-системи ІФА IgE AccuBind™, один дублікат кожної з трьох об'єднаних сироваток (низький, середній і високий діапазони) аналізували в 10 аналізах, зроблених протягом шести місяців з використанням п'яти різних наборів реагентів і трьох різних фахівців. Отримано міжтестову точність 3.52 до 8.42%. Див. нижче таблицю 3.

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами* (МОд/мл)

Зразок	N	x	δ	C.V., %
Низький	10	46.3	3.9	8.42
Середній	10	157.0	7.3	4.64
Високий	10	301.0	10.6	3.52

14.2 Чутливість

Тест-система IgE AccuBind® ELISA має чутливість 0,125 МОд/мл. Чутливість з'ясували шляхом визначення варіабельності сироваткового калібратора 0 МОд/мл та використанням статистики 2σ (95% визначеності) для обчислення мінімальної дози.

14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з референсним ІФА методом. Були використані біологічні зразки з рівнем IgE в низькому, середньому та високому діапазонах. Значення варіювали від 0,8 до 3100 МОд/мл. Загальна кількість таких зразків становила 219. Для цього методу IgE AccuBind® ELISA було обчислено рівняння найменшого квадрату регресії та коефіцієнт кореляції порівняно з методом предикатів (табл. 4):

ТАБЛИЦЯ 4

Метод	Середнє (x)	Рівняння	Коефіцієнт кореляції
Цей метод	179	$x = -12.9 + 1.21 (y)$	0.967
Референсний	157		

Тільки незначні величини зміщення між цим методом та референсним методом позначаються близькістю середніх значень. Рівняння регресії найменших квадратів та коефіцієнт кореляції вказують на відмінну методичну узгоджуваність.

14.4 Специфічність

Специфічність тест-системи ІФА ІgЕ AccuBind™ до близьких імуноглобулінів оцінювалася шляхом додавання їх у вдвічі більших фізіологічних концентраціях в матрицю сироватки. Не було виявлено перехресної реактивності між антитілами, які використовувались, і пов'язаними з ними молекулами.

14.5. Ефект високої дози

Оскільки аналіз є послідовним, високі концентрації ІgЕ не демонструють хук-ефекту. Зразки пацієнтів мієломи ІgЕ з концентрацією понад 8 млн МОд/мл продемонстрували надзвичайно високий рівень поглинання.

14.6 Лінійність

Два пули пацієнтів аналізували розбавленими (в калібраторі А) і в нерозбавленому вигляді з тест-системою ІФА ІgЕ AccuBind™. Отримані і очікувані значення наведені нижче в таблиці 5:

ТАБЛИЦЯ 5

Sample	Observed (O) IU/ml	Expected (E) IU/ml	% Recovery (O/E)
Pool 1	106.8	-	-
Pool 1/2	50.8	53.4	95.1
Pool 1/4	25.3	26.7	94.8
Pool 1/8	13.4	13.3	100.6
Pool 1/16	6.6	6.7	98.5
Pool 2	395.9	-	-
Pool 2/2	189.5	197.9	95.8
Pool 2/4	106.1	98.9	107.2
Pool 2/8	48.0	49.5	96.9
Pool 2/16	25.8	24.7	104.2

14.7 Відновлення

В два пули пацієнтів вносили відомі кількості ІgЕ і аналізували з тест-системою ІgЕ AccuBind™ ELISA. Отримані і очікувані значення перераховані нижче в таблиці 6.

ТАБЛИЦЯ 6

Sample	Observed (O) IU/ml	Expected (E) IU/ml	% Recovery (O/E)
Pool 1	25.7	-	-
Pool 1+ 25	50.7	50.7	100.0
Pool 1+ 50	74.8	75.7	101.2
Pool 1+ 100	122.7	125.7	97.6
Pool 1+ 200	232.0	225.7	102.7
Pool 2	12.3	-	-
Pool 2 + 25	41.7	37.3	111.2
Pool 2+ 50	62.6	62.3	100.6
Pool 2+ 100	109.4	112.3	97.4
Pool 2+ 200	197.2	212.3	92.8



Monobind, Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 www.monobind.com



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

