МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

_____Б.Н. Андросюк
«____»_____20___ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

РЕАГЕНТА КЛЕТОЧНОГО КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ НА АКТИВАЦИЮ МОНОЦИТОВ

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
РУП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

_____М.И. Злотникова
«____»_____20___ г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских
биотехнологий»

_____Ф.Н. Карпенко
«____»_____2021 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
ГУ «Гомельский областной центр
трансфузиологии»

_____И.А. Козырь
«29»_07_____2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
ГУЗ «Гродненский областной центр
трансфузиологии»

_____К.Д. Маслаков
«21»_07_____2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
УЗ «Витебская областная
станция переливания крови»

_____А.В. Андрюшкин
«08»_07_____2022 г.

2021

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

1 НАЗНАЧЕНИЕ

Реагент клеточный криоконсервированный для испытания на активацию моноцитов (далее – реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ) предназначен только для *in vitro* использования в качестве стандартизированного источника моноцитов человека при проведении испытания на активацию моноцитов (далее – ИАМ) для определения пирогенности лекарственных препаратов.

До недавнего времени единственными методами контроля отсутствия пирогенов в лекарственных препаратах были тесты с использованием кроликов или лизата амебоцитов limulus (LAL). С 2010 года испытание на активацию моноцитов (ИАМ) стало официальным тестом на пирогенность Европейской фармакопеи (ЕР 6.7, глава 2.6.30). В 2012 г. тест ИАМ также регламентирован к применению на основании статьи Государственной Фармакопеи Республики Беларусь, том I., глава 2.6.30. ИАМ предназначен для использования в качестве альтернативного метода испытанию на пирогенность на кроликах и должен применяться ко всем новым продуктам, предназначенным для парентерального введения, которые должны испытываться на присутствие веществ, активирующих моноциты, в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Беларусь.

ИАМ позволяет количественно определить пирогенную активность исследуемого образца на основе анализа продукции провоспалительных цитокинов активированными моноцитами человека. ИАМ позволяет обнаружить пирогенные эндотоксины грамотрицательных бактерий, патогенно-ассоциированные молекулярные паттерны грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов, пирогенные биологические или химические вещества, характерные для продукта или образующиеся в процессе производства.

2 КОМПЛЕКТНОСТЬ

Реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ выпускают в виде пробирки с замороженным содержимым. После разморозки по внешнему виду содержимое пробирки представляет собой непрозрачную жидкость красного цвета.

В комплект поставки реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ входят:

– реагент клеточный криоконсервированный для испытания на активацию моноцитов – 2 пробирки с реагентом номинальным объемом не менее 2 мл каждая;

– инструкция по применению.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ приготовлен из сырья, прошедшего контроль и получившего отрицательный результат на наличие маркеров вирусов гепатита В, С, ВИЧ при обследовании методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), и возбудителя сифилиса (ИФА) в соответствии с требованиями постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19 мая 2011 г. № 36 «Об установлении перечня инфекционных заболеваний, на наличие которых исследуются кровь и ее компоненты».

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

Персонал, использующий реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь.

Меры предосторожности при выполнении работ с условно-патогенным биологическим материалом должны выполняться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11.

Утилизация брака и отходов от реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

4 СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

4.1 Принцип метода

Моноциты крови культивируют в присутствии калибровочного стандарта пирогена и тестируемых образцов, после чего методом иммуноферментного анализа исследуется содержание секретируемых моноцитами в культуральную среду провоспалительных цитокинов ИЛ-6/ИЛ-1β. Так как природа патогенного вещества, присутствующая в испытуемом лекарственном средстве, неизвестна, уровень содержания этих веществ выражается или в единицах эндотоксин-эквивалента, полученных путем сравнения с реакциями на стандарт эндотоксина (липополисахарида), или путем сравнения со стандартной партией лекарственного средства.

Для проведения ИАМ в одном 96-луночном микропланшете достаточно 4 мл реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ.

Существует 3 метода определения пирогенности лекарственных средств с использованием реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ:

– количественный метод (**Метод А**);

– полуколичественный метод (**Метод В**);

– метод сравнения со стандартной партией (**Метод С**).

На первом этапе всех методов используют 1 пробирку реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ минимального объема для предварительного определения количества стандарта эндотоксина, соответствующего середине линейного участка калибровочной кривой (количественный метод) или предела обнаружения пирогена (полуколичественный метод). Вторую пробирку (объемом 2-5 мл) используют на 2-м этапе непосредственно для определения пирогенности в исследуемых образцах.

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

4.2 Необходимое оборудование и реагенты

1. Шкаф ламинарный (2 класса биологической защиты).

2. Пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками (20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл).

3. Сменные наконечники для пипеток соответствующего объема стерильные апирогенные.

4. Перчатки резиновые.

5. CO_2 инкубатор для клеточных культур.

6. Пробирки, микропланшеты или аналоги (апирогенные).

7. Вортекс.

8. Стерильная апирогенная питательная среда (ПС) RPMI-1640 для культивирования моноцитов.

9. Калибровочный стандарт эндотоксина: E.coli O111:B4 или E.coli O55:B5 откалиброванные в соответствии с международным стандартом (например Lonza кат. E50-643L).

10. Тест-система для иммуноферментного анализа концентрации ИЛ-6 или ИЛ-1β.

4.3 Проведение процедуры тестирования.

ИАМ проводится в стерильных условиях ламинарного бокса 2-го класса защиты. Все растворы, расходные материалы и инструментарий, вступающий в контакт с клеточной культурой, должны быть стерильными и не содержать пирогенов.

1) Внести по 20 мкл предварительно прогретой до комнатной температуры ПС в каждую лунку стерильного апирогенного 96-луночного микропланшета для культивирования клеток.

2) Внести по 20 мкл/лунку различных концентраций калибровочного стандарта эндотоксина, разведений контрольных образцов, тестируемого образца (ТО), образцов для тестирования на мешающие факторы в соответствии с выбранной схемой анализа (4.7-4.9).

3) Замороженную пробирку с реагентом клеточным криоконсервированным для ИАМ извлечь из криохранилища, нагреть на водяной бане до образования одиночного кристалла льда, перенести содержимое в пробирку с пятикратным объемом ПС RPMI-1640, прогретой до комнатной температуры (общий объем должен составить 10 мл). Медленно перемешать пипетированием.

4) Внести по 200 мкл клеточной суспензии в каждую используемую лунку микропланшета.

5) Инкубировать планшет с закрытой крышкой 18-20 ч в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO_2.

6) После инкубации содержимое микропланшета ресуспензировать и подготовить супернатант для дальнейшего хранения при температуре не выше –24 °С, либо непосредственно использовать для постановки ИФА.

7) Провести ИФА на ИЛ-6 или ИЛ-1β согласно инструкции производителя используемого набора.

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

4.4 Подготовка калибровочного стандарта

Для количественного определения пирогена (метод А) или определения предела обнаружения (ПО) пирогена (полуколичественный метод В) необходимо получить калибровочную кривую зависимости активации моноцитов от внесенного стандарта эндотоксина (липополисахарида).

Имеющийся в наличии стандарт липополисахарида (ЛПС) развести согласно инструкции производителя. Приготовление различных разведений эндотоксина следует проводить в апирогенных пробирках, не адсорбирующих на поверхности липополисахариды. Для построения калибровочной кривой необходимо приготовить 5-6 разведений стандарта эндотоксина, охватывающих линейную область калибровки и предел обнаружения ИАМ. Для этого необходимое количество имеющегося стандарта следует развести таким образом, чтобы получилось 200 мкл стокового раствора с содержанием ЛПС 1,6 Ед/мл. В пустые пробирки внести по 100 мкл среды RPMI-1640 и выполнить последовательные двукратные разведения стандарта путем переноса 100 мкл раствора согласно рисунку 1. Приготовление калибровочных растворов требует тщательного перемешивания на вортексе в течение 3 мин стокового раствора, и в течение 30 с – каждого последующего разведения.

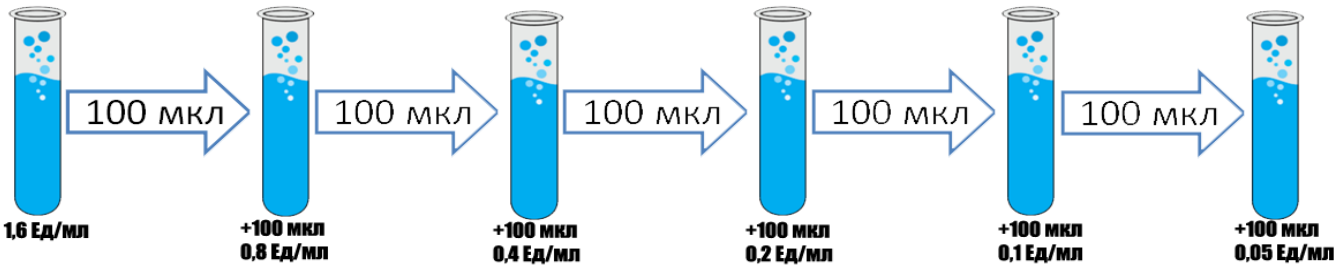


Рисунок 1 – Последовательные разведения калибровочного стандарта

Согласно требованиям Государственной фармакопеи Республики Беларусь калибровочная кривая рассчитывается исходя из минимум 4 повторностей каждой концентрации стандарта ЛПС и отрицательного контроля Ко (без добавления ЛПС). Мы рекомендуем использовать 6 известных концентраций ЛПС плюс контроль, в который вместо 20 мкл/лунку раствора ЛПС добавляется 20 мкл ПС, на что суммарно потребуется 28 лунок микропланшета (таблица 1).

Таблица 1 – Примерная схема расположения растворов 6 известных концентраций ЛПС в диапазоне 1,6 - 0,05 Ед/мл, и отрицательного контроля для построения калибровочной кривой

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко								
B	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко								
C	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко								
D	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко								
E	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл									
F	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл									
G	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл									
H	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл									

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

4.5 Построение калибровочной кривой, критерии ее достоверности/ приемлемости и определение предела обнаружения (ПО) пирогена

Калибровочная кривая представляет собой график зависимости значений оптической плотности ИФА супернатантов культур моноцитов, от присутствия известных концентраций стандарта пирогена. Для построения калибровочной кривой вычисляют среднее значение оптической плотности 4 повторностей каждого разведения и отрицательного контроля. Калибровочная кривая считается приемлемой для определения концентраций пирогена, если регрессионная зависимость ответов (соответственно преобразованных при необходимости) от логарифма концентрации статистически значима ($p < 0,01$). При этом регрессионная зависимость ответов от логарифма концентрации эндотоксина не должна существенно отличаться от линейности ($p > 0,05$).

ПО соответствует той концентрации ЛПС, при которой среднее вычисленное значение концентрации цитокина (или оптической плотности ИФА) выше среднего 4 повторностей в отрицательном контроле (при 0 Ед/мл ЛПС) на 3 стандартных отклонения значений этих же 4-х повторностей контроля.

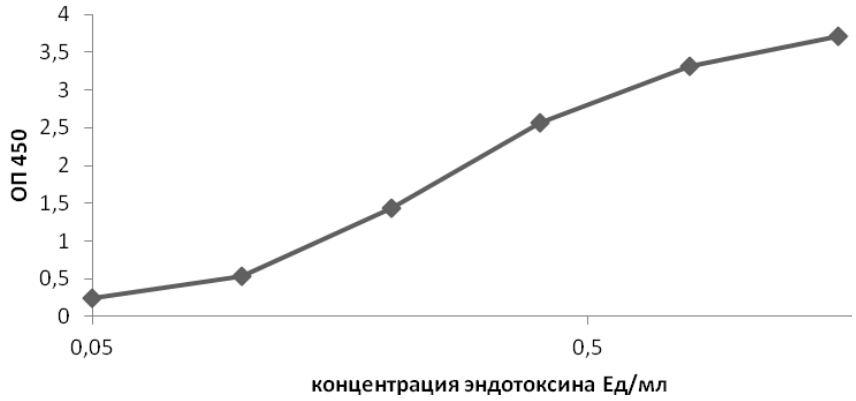


Рисунок 2 – Пример построения калибровочной кривой (в полулогарифмических координатах)

4.6 Расчет максимально допустимого разведения тестируемого образца

Перед испытанием фармацевтической субстанции необходимо рассчитать по формуле максимально допустимое разведение (МДР), то есть максимальное разведение тестируемого образца, при котором еще возможно определить предельно допустимое содержание пирогенного вещества, установленного для данного лекарственного средства:

$$МДР = \frac{Д * К}{М * ПО}$$

где Д – пороговая пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела (5 Ед/кг массы тела внутривенно, 2,5 Ед/кг внутривенно для радиофармацевтических препаратов, 0,2 Ед/кг – интратекально);

К – концентрация тестируемого раствора (г/мл);

ПО – предел обнаружения ИАМ (Ед/мл) (для описываемого метода 0,05-0,1 Ед/мл);

М – максимальная рекомендованная разовая доза лекарственного средства на килограмм массы тела (г/кг) или максимальная общая доза, введенная в течение одного часового периода при длительных инфузиях.

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

4.7 Количественное определение содержания пирогена в тестируемом образце (Метод А)

Для количественного определения пирогена используют калибровочную кривую стандарта ЛПС, с помощью которой вычисляют содержание пирогена в тестируемых образцах (ТО). Для этого параллельно с калибровкой (таблица 2) определяют значения активации моноцитов в присутствии ТО в серии разведений, не превышающих МДР. Например: МДР=1/16. Разведения образца для исследования – неразведенный ТО, ½ТО, ¼ТО, $^1/_8$ТО (таблица 2). Только при отсутствии факторов, мешающих (интерферирующих) количественному определению пирогена, допускается использование данного метода.

Чтобы выявить факторы, взаимодействующие с пирогенами, параллельно с тестированием образца проводят **тест на мешающие факторы**. Для этого готовят еще одну аналогичную серию разведений тестируемого образца, с добавлением одинакового количества ЛПС, соответствующего середине калибровочной кривой (например ТО + 0,2 Ед/мл – $^1/_8$ТО + 0,2 Ед/мл, таблица 2) и из полученных экспериментальным путем данных вычисляют концентрацию ЛПС в каждом из разведений. Разведения исследуемого образца, в которых количество добавленного извне эндотоксина определяется в пределах 50-200 % (т.е. отличается не более чем в 2 раза), считаются свободными от мешающих факторов. В свободных от мешающих факторов разведениях тестируемого образца количественно определяется содержание пирогена в отсутствие его добавления извне. Если ни одно из разведений, не превышающих МДР, не свободно от мешающих факторов, то для определения пирогенности следует использовать сравнительный тест эталонных партий (Метод С).

Таблица 2 – Схема расположения калибровочного стандарта (0 - 1,6 ед/мл) и тестируемого образца в 96-луночном планшете (включая 4 повторности для каждого измерения)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко	ТО	½ТО	¼ ТО	$^1/_8$ТО				
B	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко	ТО	½ТО	¼ ТО	$^1/_8$ТО				
C	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко	ТО	½ТО	¼ ТО	$^1/_8$ТО				
D	1,6 Ед/мл	0,4 Ед/мл	0,1 Ед/мл	Ко	ТО	½ТО	¼ ТО	$^1/_8$ТО				
E	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл		ТО +0,2 Ед/мл	½ТО +0,2 Ед/мл	¼ ТО +0,2 Ед/мл	$^1/_8$ТО +0,2 Ед/мл				
F	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл		ТО +0,2 Ед/мл	½ТО +0,2 Ед/мл	¼ ТО +0,2 Ед/мл	$^1/_8$ТО +0,2 Ед/мл				
G	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл		ТО +0,2 Ед/мл	½ТО +0,2 Ед/мл	¼ ТО +0,2 Ед/мл	$^1/_8$ТО +0,2 Ед/мл				
H	0,8 Ед/мл	0,2 Ед/мл	0,05 Ед/мл		ТО +0,2 Ед/мл	½ТО +0,2 Ед/мл	¼ ТО +0,2 Ед/мл	$^1/_8$ТО +0,2 Ед/мл				

ТО – тестируемый образец

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

Пример анализа результатов количественного теста представлен на рисунке 3.

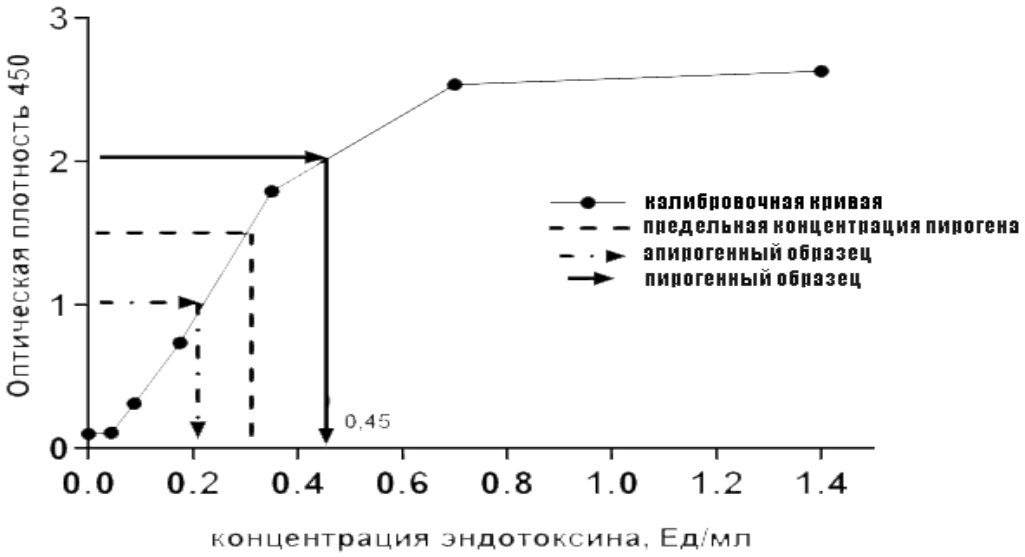


Рисунок 3 – Количественный анализ пирогенности лекарственного средства

Тестируемый образец (ТО) считается не пирогенным, если средние полученных значений концентраций эндотоксина, с учетом разведений, меньше предельной концентрации эндотоксина (Д/М).

На представленном примере показано, что максимальное значение оптической плотности тестируемого образца, при котором тест на пирогенность будет пройден, составляет 1,5, что соответствует 0,3 Ед эндотоксина (предельная концентрация пирогена). Образец, показавший значение ОП450 1 соответствует 0,2 Ед эндотоксина и является не пирогенным (апирогенный образец), образец со значением ОП450 2 – 0,45 Ед эндотоксина – пирогенным (пирогенный образец).

4.8 Полуколичественный метод определения пирогенности (Метод В)

По сравнению с количественным методом полуколичественный не позволяет производить точную количественную оценку содержания пирогена в исследуемом образце. Результат дает информацию о том, превышает ли содержание пирогенов в продукте допустимую предельную концентрацию или остается ниже ее. Предельная концентрация пирогена вычисляется как отношение Д/М (п. 4.6) или устанавливается специальной регламентирующей документацией, например, фармацевтической статьей. Полуколичественный анализ рекомендуют выполнять вместо количественного, главным образом, когда концентрация пирогена в анализируемом образце близка к пределу его обнаружения данным методом или ответы на разведения испытуемого средства не параллельны ответам на разведения стандарта эндотоксина.

Для выполнения исследований предварительно необходимо построить стандартную калибровочную кривую (аналогично методу А) и определить ПО. На следующем этапе приготовить серию разведений стандарта ЛПС, кратную ПО (таблица 3) и две серии одинаковых разведений ТО, к одной из которых добавить ЛПС в концентрации, равной 2 ПО. Пример серий разведений ТО также представлен в таблице 3. Важным аспектом является приготовление разведений таким образом, чтобы конечное разведение было близко к МДР.

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

Таблица 3 – Схема расположения (на одной плашке можно провести до 5 тестов)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8 ПО	2 ПО	0,5 ПО	ТО	¼ ТО	½ТО+2ПО						
B	8 ПО	2 ПО	0,5 ПО	ТО	¼ ТО	½ТО+2ПО						
C	8 ПО	2 ПО	0,5 ПО	ТО	¼ ТО	½ТО+2ПО						
D	8 ПО	2 ПО	0,5 ПО	ТО	¼ ТО	½ТО+2ПО						
E	4 ПО	1 ПО	Ко	½ ТО	ТО+2 ПО	¼ТО+2ПО						
F	4 ПО	1 ПО	Ко	½ ТО	ТО+2 ПО	¼ТО+2ПО						
G	4 ПО	1 ПО	Ко	½ ТО	ТО+2 ПО	¼ТО+2ПО						
H	4 ПО	1 ПО	Ко	½ ТО	ТО+2 ПО	¼ТО+2ПО						

ПО – предел обнаружения ИАМ;

ТО – тестируемый образец.

Учет результатов.

Для анализа пирогенности ТО подходят только те разведения, в которых количество добавленного извне эндотоксина (+2ПО) определяется в пределах 50-200 % (т.е. отличается не более чем в 2 раза), что свидетельствует об отсутствии в образце мешающих анализу факторов.

Если наибольшее из подходящих разведений ТО (равное или выше МДР) показывает среднее значение, превышающее значение ПО, ТО считается пирогенным. Если наименьшее из подходящих разведений ТО (ниже МДР) показывает среднее значение, не превышающее значение ПО, ТО считается апирогенным.

4.9 Сравнение со стандартной партией (Метод С)

Рекомендуется использовать данный метод в том случае, если при тестировании на мешающие факторы получены неудовлетворительные результаты. Исследование проводится в сравнительном тесте с образцами контрольной партии. Для проведения тестирования готовятся разные разведения образца, эквивалентные разведениям контрольных образцов стандартной партии (таблица 4).

Таблица 4 – Схема расположения (на одной плашке можно провести 3 теста)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ПК	СП	СП ¼	ТО ½								
B	ПК	СП	СП ¼	ТО ½								
C	ПК	СП	СП ¼	ТО ½								
D	ПК	СП	СП ¼	ТО ½								
E	ОК	СП ½	ТО	ТО ¼								
F	ОК	СП ½	ТО	ТО ¼								
G	ОК	СП ½	ТО	ТО ¼								
H	ОК	СП ½	ТО	ТО ¼								

ПК – положительный контроль, являющийся раствором стандарта ЛПС, дающим положительные значения, превышающие значения ПО в 2 и более раз. Выбирается по данным предварительно построенной калибровочной кривой;

ОК – отрицательный контроль, т.е. ПС, не содержащая добавленного ЛПС;

СП – стандартная партия;

ТО – тестируемый образец.

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

Учет результатов.

Результаты сравнительного теста соответствует требованиям апирогенности, если отношение суммы средних значений оптической плотности ТО к средним значениям оптической плотности СП, не превышает 2,5.

$$\frac{\text{сумма средних значений ОП каждого разведения тестируемого образца}}{\text{сумма средних значений ОП каждого разведения образца стандартной партии}} \leq 2.5$$

5 СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ – 6 месяцев от даты его изготовления при температуре не выше минус 80 °С.

6 УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Условия транспортирования реагента клеточного криоконсервированного для ИАМ должны соответствовать условиям его хранения.

Реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ транспортируют в термоконтейнере для перевозки биологического материала всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

Реагент клеточный криоконсервированный для ИАМ должен храниться в защищенном от света месте при температуре не выше минус 80 °С в течение всего срока годности.

7 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел. (8-017) 289-01-06; факс: (8-017) 289-87-45; тел.: 289-86-20;

e-mail: rnpc@blood.by; http://blood.by/

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