



СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА

Елена Омарова
к.б.н., менеджер по продукции ООО «биоМерье Рус»

PIONEERING DIAGNOSTICS

СЕПСИС — УГРОЖАЮЩАЯ ЖИЗНИ ОРГАННАЯ ДИСФУНКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ НАРУШЕНИЕМ РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА ХОЗЯИНА НА ИНФЕКЦИЮ



■ **Мировая статистика: 30 миллионов случаев сепсиса ежегодно**

СЕПСИС — УГРОЖАЮЩАЯ ЖИЗНИ ОРГАННАЯ ДИСФУНКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ НАРУШЕНИЕМ РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА ХОЗЯИНА НА ИНФЕКЦИЮ



- **Мировая статистика: каждые 3-4 секунды 1 человек умирает от сепсиса**

СЕПСИС — УГРОЖАЮЩАЯ ЖИЗНИ ОРГАННАЯ ДИСФУНКЦИЯ, ВЫЗВАННАЯ НАРУШЕНИЕМ РЕГУЛЯЦИИ ОТВЕТА ХОЗЯИНА НА ИНФЕКЦИЮ



- **Мировая статистика: 1 из 23 пациентов больницы имеет сепсис**

● При тяжелых инфекциях присутствие бактерий в кровотоке может различаться:

- От 30% до 40% при тяжелом сепсисе или септическом шоке;^{1, 2}
- От 50% до 80% при менингите;³
- От 5% до 30% при пневмонии;³
- От 30% до 50% при остеомиелите.³

● Клиническая диагностика

● Диагностика *in vitro*:

- Тест на прокальцитонин (ПКТ);
- Уровень С-реактивного белка (СРБ);
- Уровень лактата;
- Общий анализ крови;
- Количество тромбоцитов;
- билирубин;
- Креатинин;
- Образец на посев из очага инфекции (моча, спинномозговая жидкость, раневое отделяемое, отделяемое органов дыхания и другие жидкости организма);
- Посев крови на гемокультуру.

ДИАГНОСТИРОВАНИЕ СЕПСИСА

- **Для постановки точного диагноза:**
 - Чтобы определить **патоген, вызвавший инфекции** кровотока;
 - Чтобы установить **источник** инфекции.
- **Для изоляции возбудителя (-ей) инфекции с целью проведения идентификации и определения чувствительности к антибиотикам**
- **Для получения информации, которая поможет определить терапию**

Посев крови на гемокультуру — стандарт при диагностировании септицемии

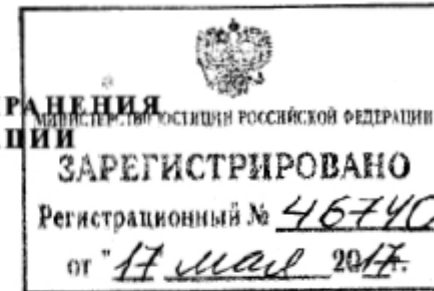
ПОСЕВ КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ (ГЕМОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ) «ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ» ДИАГНОСТИКИ



Нормативная база



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)



П Р И К А З

10 мая 2017г.

№ 2034

Москва

Об утверждении критериев оценки качества медицинской помощи

В соответствии с частью 2 статьи 64 Федерального закона от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2011, № 48, ст. 6724; 2013, № 48, ст. 6165) п р и к а з ы в а ю:

1. Утвердить критерии оценки качества медицинской помощи согласно приложению.

ПОСЕВ КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ (ГЕМОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ) «ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ» ДИАГНОСТИКИ



Нормативная база

3.1.18. Критерии качества специализированной медицинской помощи взрослым при септицемии (сепсисе) (коды по МКБ-10: A02.1; A39.2; A40; A41; A42.7; A49.9; B37.7; R57.2)

№ п/п	Критерии качества	Оценка выполнения
1.	Выполнена оценка состояния и степени тяжести заболевания по шкале SOFA не позднее 1 часа от момента установления диагноза	Да/Нет
2.	Выполнено исследование уровня лактата в крови не позднее 1 часа от момента установления диагноза	Да/Нет
3.	Выполнено исследование уровня С-реактивного белка и/или прокальцитонина в крови не позднее 1 часа от момента поступления в стационар	Да/Нет
4.	Выполнено исследование кислотно-основного состояния крови (pH, PaCO ₂ , PaO ₂ , BE, SB, BB, SO ₂ , HbO) не позднее 1 часа от момента поступления в стационар	Да/Нет
5.	Выполнено не менее двух заборов проб крови, взятых из вен разных верхних конечностей, с интервалом 30 минут для бактериологического исследования крови на стерильность с определением чувствительности возбудителя к антибиотикам и другим лекарственным препаратам не позднее 1 часа от момента поступления в стационар	Да/Нет
6.	Начата терапия антибактериальными лекарственными препаратами и/или противогрибковыми лекарственными препаратами и/или противовирусными лекарственными препаратами не позднее 1 часа от момента поступления в стационар (при септическом шоке, в зависимости от медицинских показаний и при отсутствии медицинских противопоказаний)	Да/Нет

ПОСЕВ КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ (ГЕМОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ) «ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ» ДИАГНОСТИКИ



III. Критерии качества по группам заболеваний (состояний)

3.1. Критерии качества при некоторых инфекционных и паразитарных болезнях

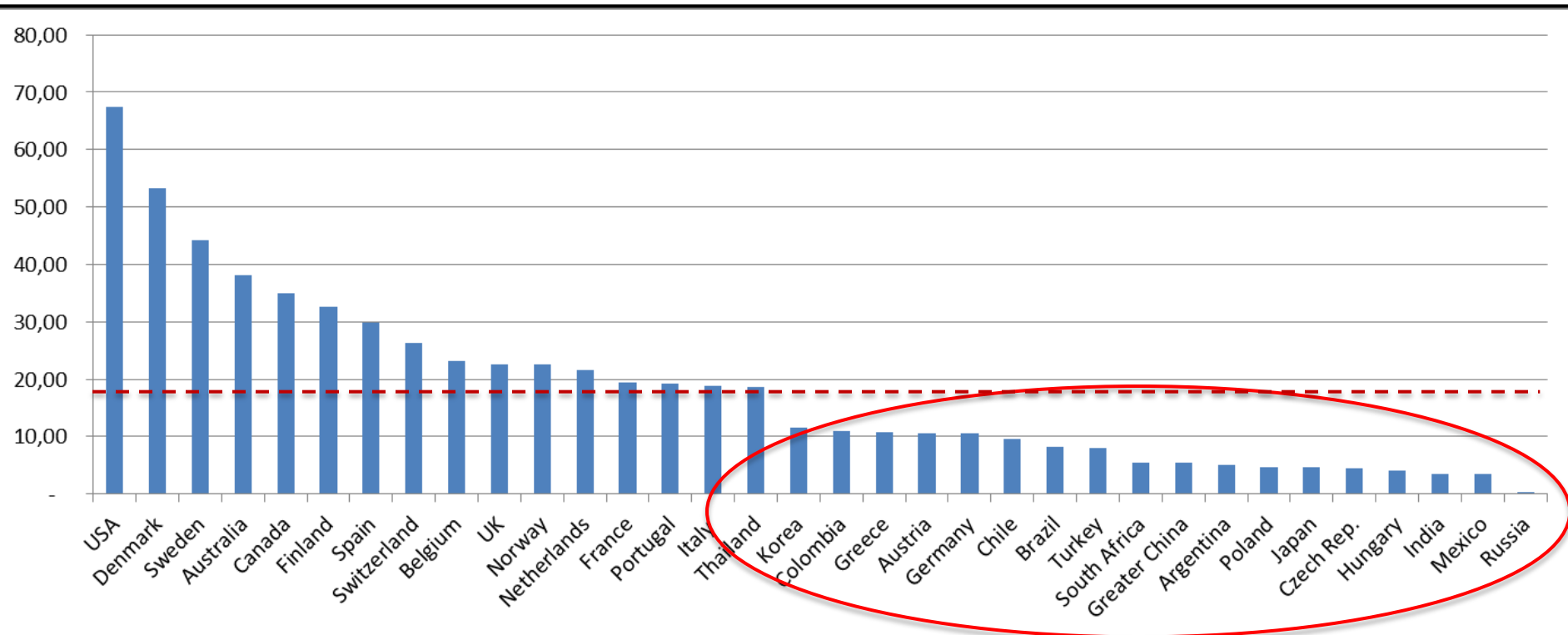
3.1.1. Критерии качества специализированной медицинской помощи детям при лихорадке без очага инфекции (коды по МКБ - 10: A49.8 - A49.9; R50.0 - R50.1)

N п/п	Критерии качества	Оценка выполнения
5.	Выполнено бактериологическое исследование крови на стерильность с определением чувствительности возбудителя к антибиотикам и другим лекарственным препаратам (при наличии лабораторных маркеров бактериальной инфекции)	Да/Нет

*«...лабораторная **диагностика бактериемии и фунгемии** остается одной из важнейших функций лабораторий клинической микробиологии...*

*Положительный результат посева крови позволяет установить или подтвердить **инфекционную этиологию** болезни пациента. Кроме того, он указывает на возбудителя и позволяет провести тест на определение чувствительности к антибиотикам для **оптимизации терапии**».*

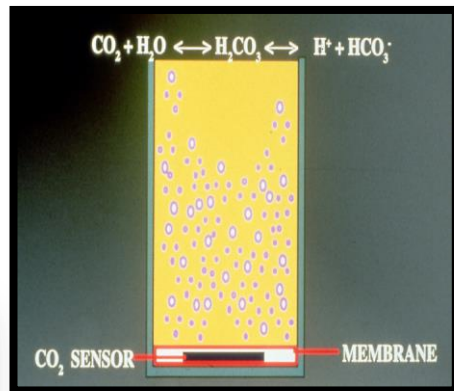
НАЗНАЧЕНИЯ ПОСЕВА КРОВИ НА КОЙКО-МЕСТО



АНАЛИЗАТОРЫ КУЛЬТУР КРОВИ ВАСТ/ALERT® 3D (ПРОИЗВОДСТВО BIOMERIEUX, ФРАНЦИЯ)



Образец крови



Через 9-12 часов!



Обнаружен
микроорганизм в
образце крови

АНАЛИЗАТОРЫ КУЛЬТУР КРОВИ BACT/ALERT® 3D



(ПРОИЗВОДСТВО BIOMERIEUX, ФРАНЦИЯ)



**60 флаконов
1-10 образцов в
день**



**120 флаконов
20-25 образцов в день**

**Подключение до 3
дополнительных
модулей для
инкубации
+ 240+240+240**



**240 флаконов
30-50 образцов в день**

**Подключение до 6
дополнительных
модулей для инкубации
+ 240+240+240
+ 240+240+240**

ВРЕМЯ ДО ДЕТЕКЦИИ ОСНОВНЫХ ПАТОГЕНОВ КРОВотоКА



Источник	Микроорганизм	Время до детекции, ч
Time to Detection with BacT/Alert FA Plus Compared to BacT/Alert FA Blood Culture Media Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2016) 35:1469–1473	<i>Enterococcus faecium</i>	12,6
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10,8
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	9,4
	<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	12,2
	<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	14,2
	<i>Escherichia coli</i>	9,8
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13,9
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9,6
Сайт FDA (Управление по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13,8
	<i>Enterobacter cloacae</i>	11,6
	<i>Candida glabrata</i>	43,5
	<i>Haemophilus influenzae</i>	14,4
	<i>Proteus mirabilis</i>	12,5

Comparison of BacT/Alert microbial detection system with conventional blood culture method in neonatal sepsis
Journal of Pediatric Infectious Diseases, vol. 3, no. 1, pp. 21-25, 2008

«Streptococci, which are important neonatal pathogens, were detected exclusively with the automated system.»

СЕПСИС – НЕОТЛОЖНОЕ СОСТОЯНИЕ

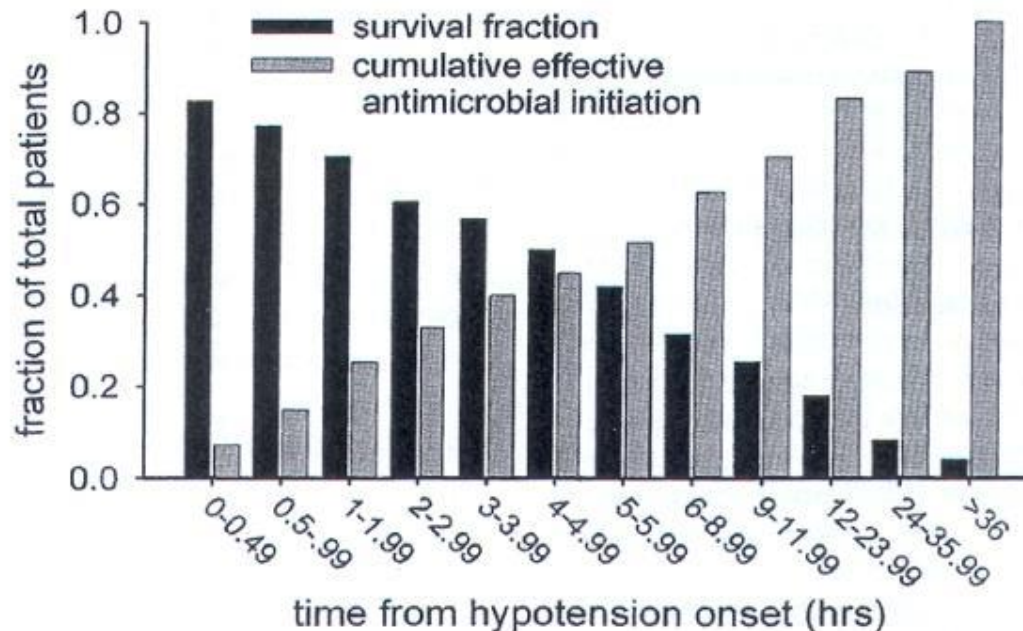
«КОГДА ВАЖНА КАЖДАЯ МИНУТА...»



Быстрое начало надлежащей антибактериальной терапии повышает шансы на выживание



«Золотые» часы...



Каждый час задержки введения антибактериальных препаратов был связан со средним снижением выживаемости на 7,6% в течение первых 6 часов после появления гипотензии.

Флаконе

Образец



•Атмосфера

Среда

- Витамины
- Белки
- Факторы роста

Полимерные гранулы

- Связывание
- Сродство

Микроорганизм

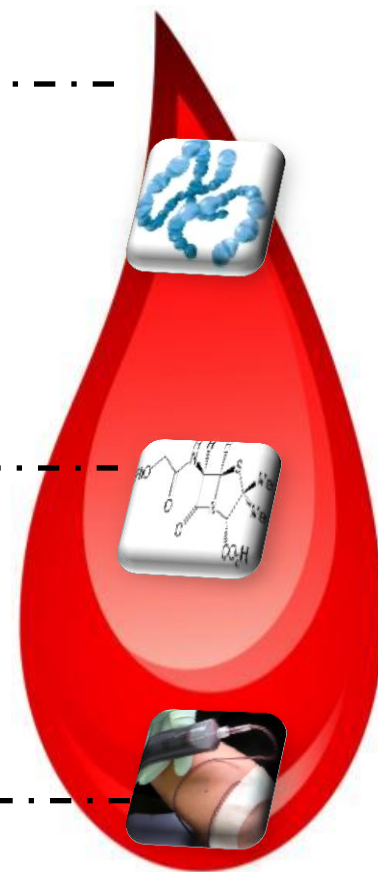
- МИК (дикий или резистентный)
- Метаболизм (аэробы/анаэробы)
- Скорость роста
- Метаболическая активность

Антибиотики

- Содержание в сыворотке
- Тип (бактериостатический/бактерицидный)
- Спектр активности (Г+/Г-)

Образец

- Объем
- Тип (кровь или ликвор)
- Связывание белков плазмы
- Время доставки в лабораторию



ФЛАКОНЫ BACT/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



FA Plus
аэробные



FN Plus
анаэробные



PF Plus
педиатрические



- Безопасные пластиковые
- Легкие
- Не бьющиеся
- Нейтрализация антибиотиков
- Отсроченная загрузка
- Детекция грибов в аэробном флаконе

ФЛАКОНЫ ВАСТ/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



Три типа полимерных гранул для нейтрализации антибиотиков

- **Гранулы APB1**
 - Ионные связи (например, ампициллин)
- **Гранулы APB2**
 - Ван-дер-Ваальсовы связи (например, ванкомицин)
- **Запатентованное вещество**
 - Ковалентные связи (например, карбапенемы)



ФЛАКОНЫ ВАСТ/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



Высокая аналитическая чувствительность

Таблица 1. Аналитическая чувствительность: предел обнаружения

Микроорганизм	Идентификационный номер штамма	Предел обнаружения (КОЕ/флакон)
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 14053™	6
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048™	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC 12697	5
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12923	4
<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC® 10211™	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	STL 104016	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 15313™	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	4
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC® 14028™	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC® 6305™	6



ФЛАКОНЫ BACT/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



**Валидированы производителем
для разных типов образцов**

Bact/ALERT FA Plus – Флаконы Bact/ALERT FA Plus со средой и адсорбентом для выделения аэробных микроорганизмов из крови и стерильных биологических жидкостей

- Кровь
- Спинномозговая жидкость
- Синовиальная жидкость
- Перикардальная жидкость
- Перитонеальная жидкость
- Околоплодные воды
- Плевральный выпот и др.



ФЛАКОНЫ ВАСТ/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



Отсроченная загрузка

Таблица 12. Отсроченная загрузка

Вводимый образец	Температура инкубации (°C)	Время хранения (часы)	% выделения
Тестовые флаконы, в которые произведен посев	Контрольная	Без задержки	100,0 (459/459)
	2–8	48	98,6 (292/296)
	20–25	24	98,0 (291/297)
	20–25	36	91,9 (272/296)
	35–37	8	98,9 (454/459)
	35–37	24	56,6 (259/458)*
Отрицательные контроли	Все условия		0,5 (1/221)†



ФЛАКОНЫ ВАСТ/ALERT FAN® PLUS С ПОЛИМЕРНЫМИ ГРАНУЛАМИ



Малые объемы образца

BacT/ALERT® PF Plus

9305130 C

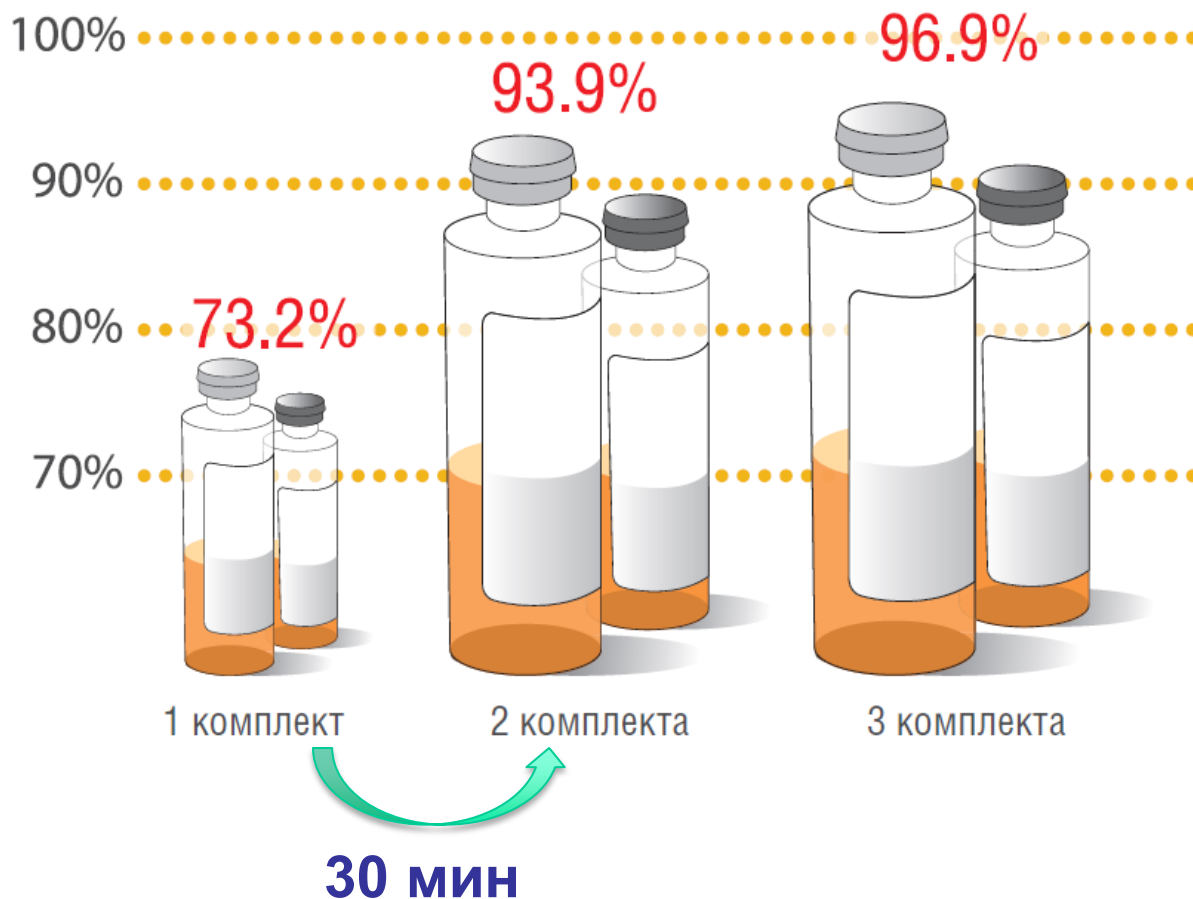
В клинических исследованиях микроорганизмы были выделены из образцов крови объемом более 0,1 мл. Среди них:

- $\geq 1,0$ мл для *Streptococcus pneumoniae*
- неферментирующие грамотрицательные палочки из образцов объемом $\geq 0,9$ мл; неидентифицированные грамотрицательные палочки из образцов объемом $\geq 0,6$ мл
- *Streptococcus* spp. групп А и В из образцов объемом $\geq 0,5$ мл
- $\geq 0,3$ мл для *S. aureus*
- $\geq 0,2$ мл для прихотливых микроорганизмов (*N. meningitidis* и *N. sicca*)
- дрожжевые грибы (*Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* и *C. lusitaniae*) из образцов объемом $\geq 0,2$ мл



2 НАБОРА:

ПЕРВЫЙ НАБОР = 1 АЭРОБНЫЙ + 1 АНАЭРОБНЫЙ
ВТОРОЙ НАБОР = 1 АЭРОБНЫЙ + 1 АНАЭРОБНЫЙ



2 забора крови (венепункция) = 2 набор = 4 флакона

ВРЕМЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТА

Инокуляция
образца и
инкубация



Посев на чашки

**Положительный
сигнал**



Через 9-12 часов!

День 0

День 1

День 2-3*

День 2-3*

**Выдача результата врачу-
клиницисту о наличии
микроорганизма в
кровотоке**

**Выдача результата врачу-
клиницисту о
чувствительности
микроорганизма**

Например, грамположительные кокки,
расположенные гроздьями

СООБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПО КУЛЬТУРАМ КРОВИ



- Окраска по Граму была и остается на первой линии диагностики инфекционных болезней
- Окраска по Граму положительных культур крови является наиболее важным фактором, влияющим на выбор
 - Чем раньше начата соответствующая терапия, тем лучше
- Несколько проведенных исследований (например, *Barenfanger, AJCP 2008 - Savinelli, DMID 2004*) свидетельствуют:
 - общая смертность = 10,1% когда результаты окраски по Граму имеются за < 1 ч, по сравнению с 19,2%, когда результаты окраски по Граму имеются > 1 ч (*Barenfanger, AJCP 2008*)

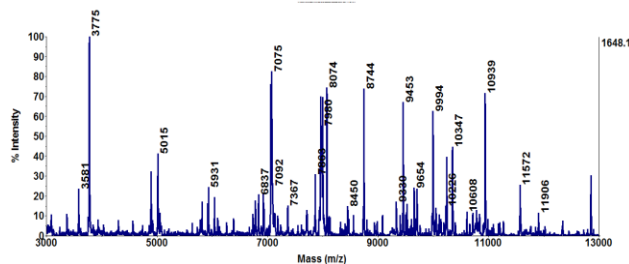
МАСС-СПЕКТРОМЕТР VITEK MS



Простая пробоподготовка



Быстрота исследования – 2 минуты



Высокая точность идентификации

VITEK MS V3:

1046 видов (882 бактерий, 164 грибов)

Низкая себестоимость исследования



НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ СЕПСИСА



Прямая идентификация образца из флаконов с положительной гемокультурой

30 мин – 1 час

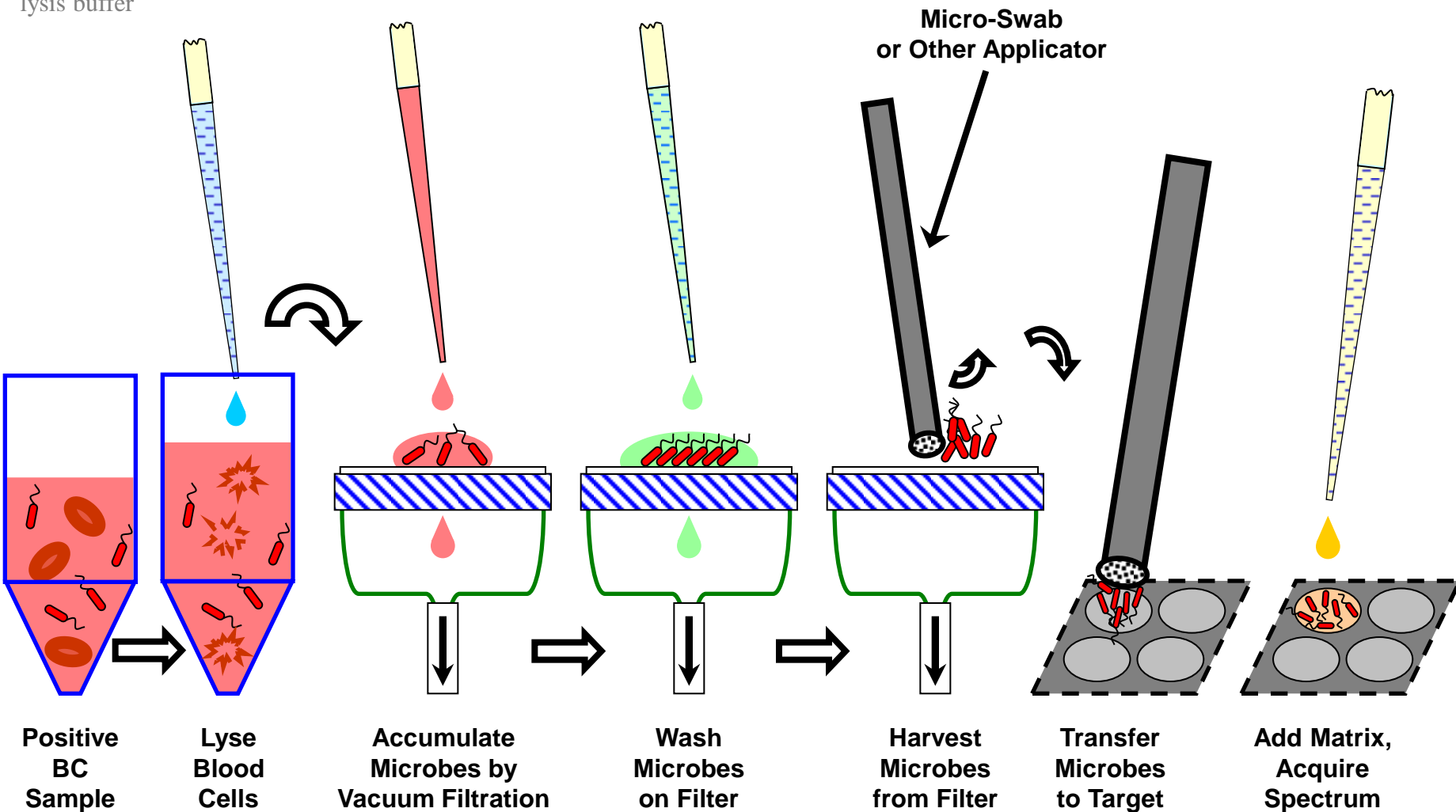


~~Более 18 часов~~

ПРОТОКОЛ «ЛИЗИС-ФИЛЬТРАЦИЯ»



lysis buffer



A. Fothergill

РОССИЙСКИЙ ОПЫТ ПРЯМОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ



D-220



Express identification of positive blood cultures using direct MALDI-TOF mass spectrometry

Popov D, Ovsenko S, Vostrikova T

Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia

135, Roublevskoe shosse, Moscow, 121552, Russia. E-mail: da_popov@inbox.ru



INTRODUCTION

Bloodstream infections and bacteremia are serious problem in modern intensive care. Current guidelines suggest to start early empirical antibiotic treatment in severe infection cases to prevent sepsis progression, development of serious complications and improve outcome.

Routinely positive blood cultures requires at least 18-24 hours to obtain identification results after the growth is detected, so new methods should be developed for shortening of identification time.

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a rapid, accurate, and sensitive tool for identification of bacteria and fungi. Usually this method is using for pathogens identification from solid media cultures, but it has great potential as a method of rapid diagnosis of bacteremia, favorably differing from traditional methods by quickness and cost effectiveness.

Direct use of samples from the blood culture broth is complicated by presence of many interfering substances (e.g. blood cells, charcoal or resin particles) in it, so extraction procedure for sample preparation should be implemented.

OBJECTIVES

To evaluate the effectiveness of direct identification of causative pathogens from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS in comparison with conventional method.

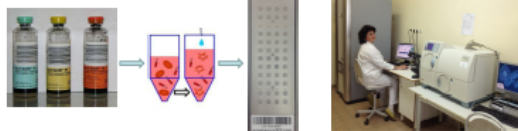
MATERIAL AND METHODS

A prospective study included 211 positive blood cultures obtained from 116 patients (108 adults and 10 children) aged from 2 weeks to 77 years, stayed in the ICU after cardiac surgery during Apr-Dec 2014. Blood cultures incubation was performed in aerobic charcoal-containing (n=55) and resin-containing (n=156) bottles with analyzer BacT/ALERT 3D 120 (bioMérieux, France).

Both types of bottles were used in a random manner. In parallel with routine cultivation on solid media with subsequent identification of pure cultures using MALDI-TOF MS (Vitek MS, bioMérieux, France) according to the standard recommendations, blood cultures after sample preparation (low-speed centrifugation to eliminate charcoal and resin particles, removing of cellular blood components by lysis with 5% saponine, washing and extraction with ethanol, 70% formic acid and acetonitrile) were identified directly by MALDI-TOF MS.



- #### Sample Preparation
- 5 mL of broth with positive blood culture was centrifuged for 30 s. at 400 g to eliminate charcoal and resin particles;
 - 1 mL of supernatant was placed in a microtube, then 200 µL of 5% aqueous solution of saponine was added for lysing erythrocytes. The lysate was centrifuged for 1 min at 12000 g, the supernatant was removed;
 - The pellet was washed with 1 mL of phosphate-buffered saline, then centrifuged for 1 min at 12000 g, the supernatant was removed;
 - 300 µL of distilled water and 900 µL of ethanol was added to the pellet, then centrifuged for 2 min at 12000 g, the supernatant was removed, the pellet was dried;
 - 20 µL of formic acid and 20 µL of acetonitrile were added to the pellet, then the microtube was vortexed for 10 s. and centrifuged for 2 min at 12000 g;
 - 1 µL of the supernatant was applied onto the target with the matrix solution in a ratio of 1:1. Mass spectra were recorded by MALDI-TOF MS.



RESULTS

The average time of blood cultures incubation was 18.2±7.4 h (3.75-51 h) – Tab. 1, Fig. 1.

Table 1. Time to the growth detection for the most common blood cultures

Groups of microorganisms	n	Incubation time, h	
		M±SD	Min-Max
Enterococci	20	10.8±4.1	3.8-14.9
Enterobacteriaceae	71	12.4±4.3	6.5-23
Non-fermentative Gram-negative bacteria	18	15.3±2.1	11.3-17.3
Staphylococci	81	20.3±8.6	6.3-51

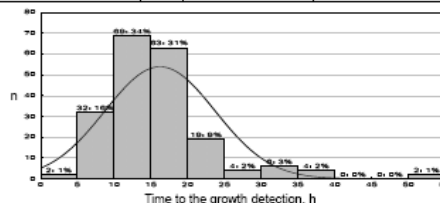


Fig. 1. Time to the growth detection during incubation

Fig. 2. Rate of successful identification by groups of microorganisms

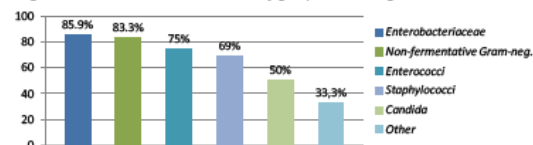


Table 2. Results of direct identification

Microorganism	n	Saponin ID, n (%)
Enterobacteriaceae	71	61 (85.9%)
K. pneumoniae	49	44
E. cloacae	11	8
S. marcescens	7	6
K. oxytoca	3	2
E. aerogenes	1	1
Non-ferm. negatives	18	16 (88.9%)
P. aeruginosa	8	8
A. baumannii	6	6
S. maltophilia	2	1
P. putida	1	0
Enterococci	20	16 (76%)
E. faecalis	15	12
E. faecium	4	2
E. hirae	1	1
Staphylococci	87	60 (69%)
S. enteritidis	43	23
S. haemolyticus	22	17
S. hominis	14	13
S. aureus	6	6
S. lugdunensis	1	1
S. epidermidis	1	0
Other	2	1 (50%)
Candida	2	1 (50%)
C. albicans	1	0
C. parapsilosis	1	1
Strept. parasanguinis	1	1 (100%)
Other	8	1 (12.5%)
Bacillus brevis	1	1
Micrococcus luteus	1	0
Strept. parasanguinis	1	0
Total	201	168 – 78.1%

Directly by MALDI-TOF MS it were successfully identified 153/201 monomicrobial cultures (78.1%). The proportion of successful identification of Gram-negatives was higher than Gram-positives (85.4 and 69.1%, respectively, p=0.01) – Fig. 2, Tab. 2. The rate of successful identification was higher from charcoal-containing (48/53; 88.8%) compared to resin-containing bottles (107/148; 72.3%), p=0.04. It may be related to higher proportion of Gram-negatives recovered from charcoal-containing bottles (34/53; 64.2% vs. 55/148; 37.2% respectively, p=0.001). The high degree of agreement in the results of conventional and direct methods was found (Cohen's kappa = 0.98, p<0.001). Unsuccessful direct identifications (n=48) in the majority (89.6%) were related to the inability to correlate of the sample mass spectrum with the library. In the remaining 5 cases, there were incorrect identification to the species level (*S. haemolyticus* (n=2) and *S. hominis* (n=1) by direct analysis and *S. epidermidis* in conventional method); in last two cases the microorganism was identified completely incorrect (*Mycobacterium kansasii* and *Burkholderia vietnamsis* by direct method instead of *S. epidermidis* and *S. hominis* by conventional method, respectively).

Among 211 samples included in this study there were 10 mixed cultures (association of two microorganisms), which were also analyzed directly by MALDI-TOF MS. In 7 cases one organism from association was identified to the species level, in 2 cases – to the genus level. One sample returned no results.

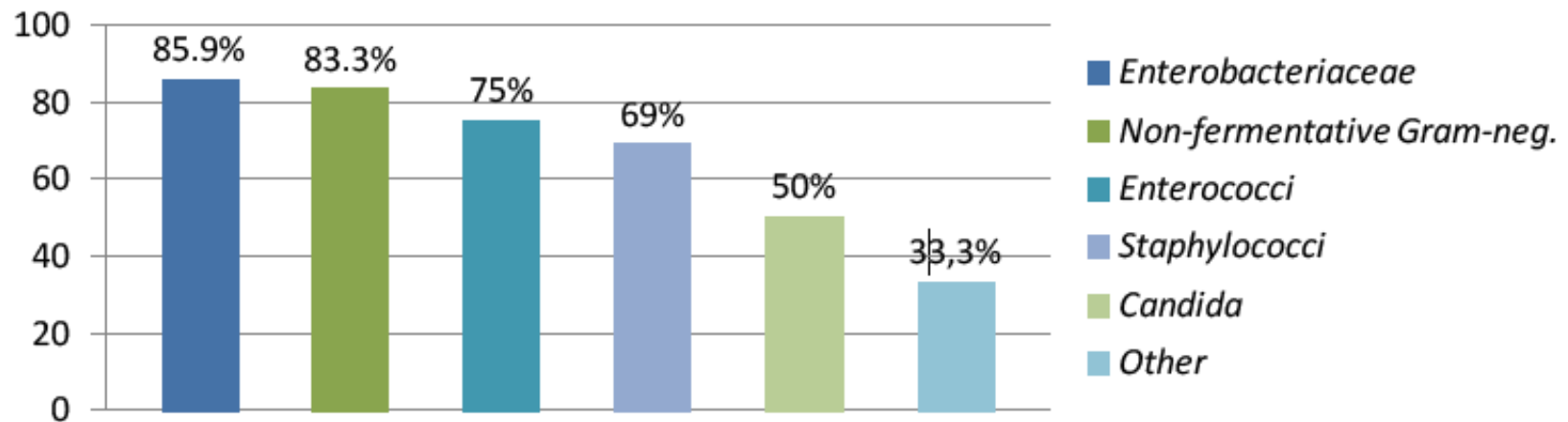
CONCLUSION

Direct MALDI-TOF MS is rapid and reliable method for blood cultures identification, which may contribute early appropriate antibiotic therapy. The time required to carry out the direct MALDI-TOF MS analysis including sample preparation is no more than 1 h.

РОССИЙСКИЙ ОПЫТ ПРЯМОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ



Fig. 2. Rate of successful identification by groups of microorganisms



Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery, Moscow, Russia

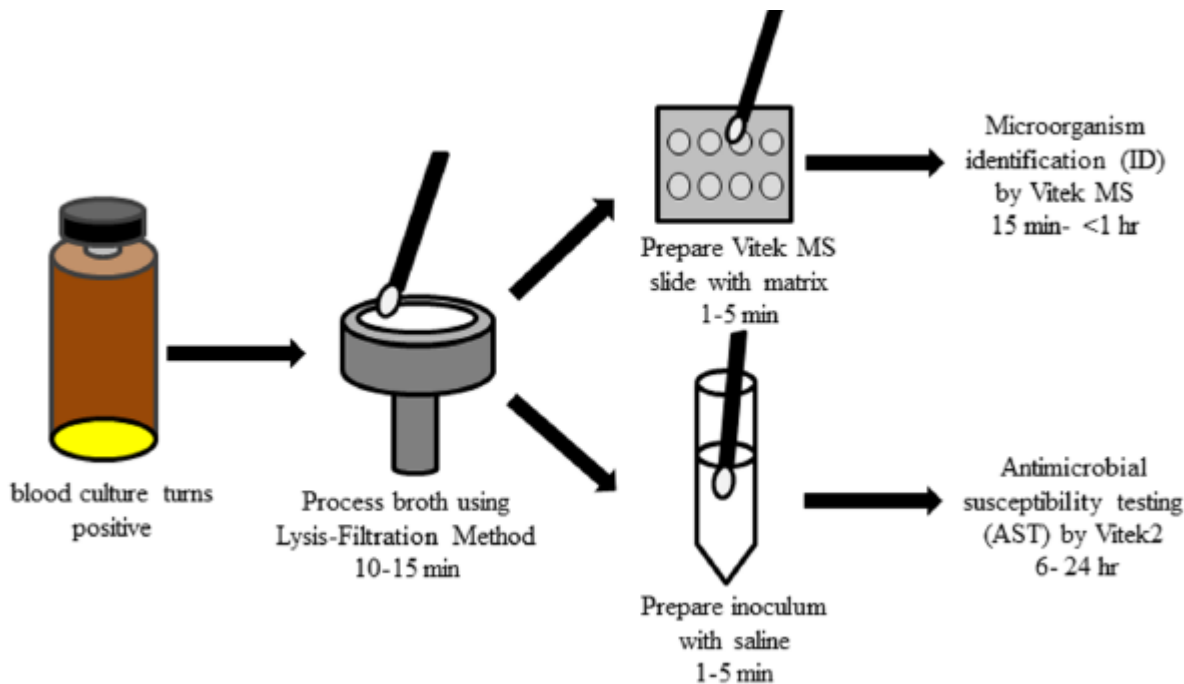
Popov D, Ovseenko S, Vostrikova T

Express identification of positive blood cultures
using direct MALDI-TOF mass spectrometry

Прямое определение чувствительности к АМП на VITEK 2 из флаконов Bact/ALERT

Same Day Identification and Full Panel Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles Made Possible by a Combined Lysis-Filtration Method with MALDI-TOF VITEK Mass Spectrometry and the VITEK2 System

Alexandra Machen¹, Tim Drake², Yun F. (Wayne) Wang^{1,2*}



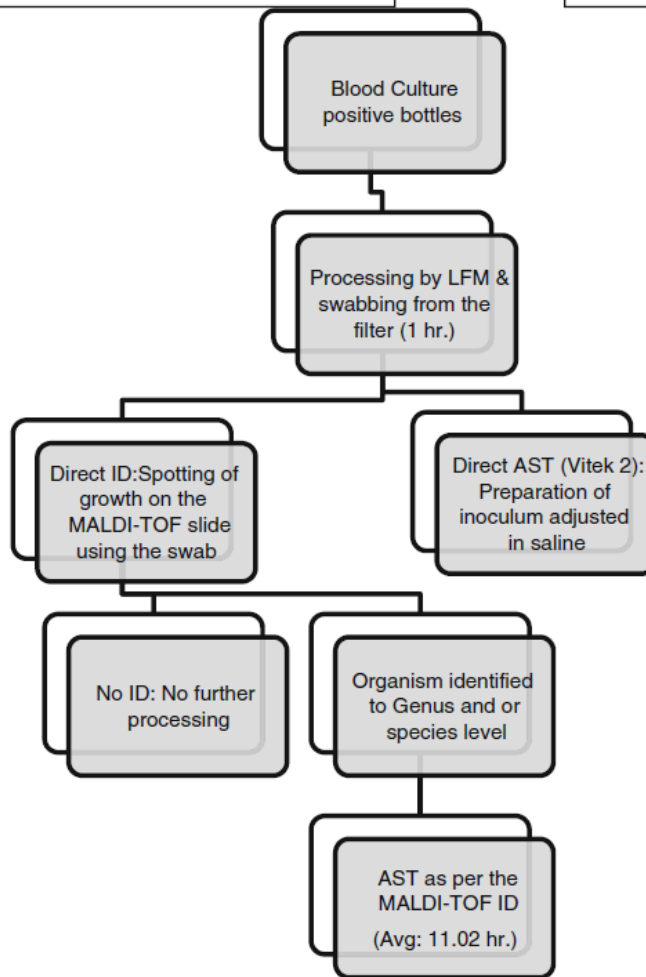
Ускорение микробиологической диагностики

Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2
 C. Wattal & J. K. Oberoi

BACT/ALERT 3D 60

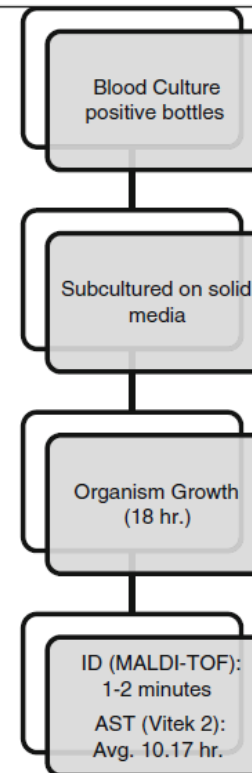


Lysis Filtration based approach for ID & AST



1-2 дня

Our Standard Approach for ID & AST



2-3 дня



**СПЕЦИАЛИСТЫ ПО ПРОДУКЦИИ
КОМПАНИИ БИОМЕРЬЕ РУС ОТВЕТАТ С ВАШИ ВОПРОСЫ**

ТЕЛЕФОН «ГОРЯЧЕЙ ЛИНИИ»

8 800 250 10 79

(БЕСПЛАТНО НА ТЕРРИТОРИИ РФ)