

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

 М.Д. Хусаинов

«26»  2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного количественного определения
аутоантител класса G к тканевой трансклутаминазе в сыворотке (плазме) крови
(IgG-Трансклутаминаза-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «IgG-Трансклутаминаза-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения концентрации аутоантител класса G (IgG) к тканевой трансклутаминазе (tTG) в сыворотке (плазме) крови человека методом иммуноферментного анализа.

1.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 48 образцов, включая калибровочные (6 образцов) и контрольный (1 образец). Возможны до 6 независимых постановок ИФА по 8 образцов в каждой (включая калибровочные и контрольный образцы).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известными концентрациями иммуноглобулинов класса G к тканевой трансклутаминазе и исследуемые образцы инкубируют в лунках с иммобилизованной на внутренней поверхности лунок тканевой трансклутаминазой. Затем планшет отмывают. На второй стадии связавшиеся в лунках IgG к tTG обрабатывают конъюгатом антител против IgG человека с пероксидазой хрена. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «tTG – IgG к tTG – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–655 нм.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству В.К. Ткачевым и начальником лаборатории бактериальных инфекций С.А. Кротовым

Степень окраски пропорциональна концентрации IgG к tTG в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgG к tTG в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный с иммобилизованной тканевой трансклутаминазой – 1 шт.;
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно набора реагентов «Anti-Tissue-Transglutaminase IgG» (фирма Orgentec Diagnostika GmbH, Германия), содержащие известные количества аутоантител класса G к тканевой трансклутаминазе: 0; 5; 10; 20; 60; 100 Ед/мл – 6 флаконов (по 1,5 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известной концентрацией IgG к тканевой трансклутаминазе – 1 флакон (1,5 мл);
- конъюгат (антитела к IgG человека, меченные пероксидазой хрена), лиофилизированный – 1 флакон или 2 флакона, или жидкий концентрат – 1 флакон, (1,5 мл);
- раствор для предварительного разведения (РПР) при комплектации набора лиофилизированным конъюгатом – 1 флакон, (3,0) мл;
- раствор для разведения конъюгата (РК) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РС) – 2 флакона (по 25,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) – 1 флакон (13,0 мл);
- или
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- и субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- стоп-реагент – 1 флакон (12,0 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 3 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- бланком диагностики – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG к tTG в контрольном образце не превышает 8%.

3.2.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» - отклонение от расчётной величины концентрации IgG к tTG при разведении калибровочных образцов, содержащих 100; 60; 20 и 10 Ед/мл IgG к tTG в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90-110%.

3.3.* Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgG к tTG предписанной в образце, полученном путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией IgG к tTG 10 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.4.* Чувствительность – минимально определяемая концентрация IgG к tTG, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 , плюс 2σ (σ - среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 2,5 Ед/мл.

3.5. Клиническая проверка. Концентрация IgG к tTG, измеренная в сыворотке крови у 500 условно здоровых доноров, не превышала 10 Ед/мл.

3.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить пороговые значения концентрации IgG к tTG у обследуемого контингента людей.

*по ГОСТ Р 51352-2013

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

При работе с исследуемыми сыворотками и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом:

- работать в резиновых перчатках;
- не пипетировать растворы ртом;
- все использованные материалы дезинфицировать в соответствии с требованиями СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.

- утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 – 655 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру $(2-8)^\circ\text{C}$;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 5 до 1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- пипетки полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкостей от 5 мкл до 350 мкл, аттестованная по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 5%);
- промывочное устройство для планшетов;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- дезинфицирующие средства, разрешенные к применению в соответствии с указанием СП 1.3.2322-08 и МУ 287-113.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа использовать образцы сыворотки и плазмы, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия. Допускается использование образцов, хранившихся при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ не более 5 суток, либо при температуре минус $(20 \pm 4)^\circ\text{C}$, если необходимо более длительное хранение.

Сыворотки, содержащие взвешенные частицы, могут дать неправильный результат. Такие образцы перед использованием следует центрифугировать в течение 10-15 мин при 3000 об./мин.

Нельзя использовать проросшие, гемолизированные, гиперлипидные сыворотки или подвергавшиеся многократному замораживанию и оттаиванию.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.

Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать не менее 30 мин при температуре $(18-25)^\circ\text{C}$.

Для приготовления растворов и проведения ИФА следует использовать чистую мерную посуду и автоматические пипетки с погрешностью измерения объемов не более 5 %.

При комплектации набора лиофилизированным конъюгатом, концентрированный раствор конъюгата должен быть приготовлен, как минимум, за 15 мин до его использования.

После отбора необходимого количества стрипов оставшиеся сразу упаковать в пакет с осушителем. Упакованные стрипы, плотно закрытые флаконы с исходными компонентами сразу после постановки реакции поместить в холодильник при температуре (2-8) °С.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить непосредственно перед использованием.

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина.

При промывке лунки (стрипа, планшета) заполнять полностью, не допуская переливания промывочного раствора через край лунок, и не касаясь лунок наконечником пипетки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 с.

При использовании автоматического или ручного промывателя необходимо следить за состоянием емкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть «заростов». Раз в неделю желательно емкость для промывочного раствора и шланги промывать 70% спиртом.

Не допускать высыхания лунок планшета между отдельными операциями.

При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, СБР, концентрат ТМБ, раствор ТМБ), которые взаимозаменяемы в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Наконечники для пипеток (автоматических дозаторов) следует использовать однократно.

Запрещается повторное использование планшета для предварительного разведения сывороток.

Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (*четвертичных аммониевых соединений*), спиртов, третичных аминов (МУ 231-113 от 29.10.98).

Посуду (ванночки), используемые для работы с растворами конъюгата и тетраметилбензидина, не обрабатывать дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

В случае повторного использования посуду (ванночки) для раствора конъюгата промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой, посуду (ванночки)

для раствора тетраметилбензидина сразу после работы необходимо промыть 50% раствором этилового спирта, а затем дистиллированной водой.

Пипетки и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин и т.д.

7.1. Приготовление реагентов.

7.1.1. Промывочный раствор

Взболтать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении осадка солей в концентрате прогреть его перед разведением до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов отобрать необходимое количество ФСБ-Т×25 (см. таблицу) и развести дистиллированной водой до указанного в таблице объёма или содержимое 1 флакона – до 700 мл.

Хранение: при температуре (2–8) °С до 5 суток.

7.1.2. Исследуемые образцы

Все образцы сыворотки (плазмы) должны быть разведены 1:100 раствором для разведения сывороток. В чистые пластиковые пробирки (по количеству обследуемых образцов) внести по 1000 мкл раствора для разведения сывороток.

Сыворотку или плазму пациента тщательно перемешать, отобрать 10 мкл, внести в подготовленную пробирку с раствором для разведения сывороток и снова тщательно перемешать.

Хранение: разведённые сыворотки при (2-8) °С до 8 часов.

7.1.3. Растворы конъюгата

Внимание! Для работы с конъюгатом рекомендуем использовать одноразовые накопечники для пипеток.

При комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом приготовить концентрированный раствор конъюгата путём растворения содержимого флакона с конъюгатом в 1,0 мл РПР.

Хранение: концентрированный раствор конъюгата – до 1 месяца при (2–8) °С или до 12 месяцев при минус (20±4) °С. Допускается 3-кратное замораживание концентрированного раствора конъюгата.

Внимание! Раствор конъюгата в рабочем разведении готовить в пластиковой ванночке, входящей в состав набора, непосредственно перед использованием!

Тщательно перемешать содержимое флакона с раствором для разведения конъюгата (РК). Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрированного раствора конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

При комплектовании набора концентратом конъюгата, перед приготовлением рабочего разведения необходимо тщательно взболтать содержимое флакона. Затем в ванночку для реагентов отобрать необходимое количество (см. таблицу) концентрата конъюгата, добавить соответствующее количество РК, тщательно перемешать пипетированием до получения равномерного окрашивания.

Хранение: раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить при температуре (18-25) °С не более 3 ч.

7.1.4. Раствор ТМБ.

При комплектовании набора концентратом ТМБ:
в пластиковую ванночку отобрать необходимое количество ТМБ (см. таблицу) и добавить к нему соответствующее количество СБР, тщательно перемешать.

Хранение: раствор стабилен в защищённом от света месте при (18-25) °С до 3 часов.

При комплектовании набора готовым раствором ТМБ:
необходимое количество раствора ТМБ отобрать в пластиковую ванночку для реагента.
В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Раствор ТМБ после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора.

Таблица расхода реагентов

	Количество используемых стрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Промывочный раствор												
ФСБ-Т×25, мл		4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Дистиллированная вода, мл		до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для лиофилизированной формы												
Концентрированный раствор конъюгата, мкл		2×α	3×α	4×α	5×α	6×α	7×α	8×α	9×α	10×α	11×α	12×α
РК, мл		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора конъюгата в рабочем разведении для жидкого концентрата												
Конъюгат, концентрат, мл		0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
РК, мл		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Приготовление раствора ТМБ в рабочем разведении для концентрата												
ТМБ (концентрат), мкл		100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600
СБР, мл		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0
Раствор ТМБ, готовый для использования												
Раствор ТМБ		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0

* α = ____ мкл (значение α указано в инструкции и в паспорте на данную серию наборов).

7.2. Проведение иммуноферментного анализа

7.2.1. Подготовить необходимое количество стрипов к работе. Оставшиеся – сразу упаковать во избежание губительного воздействия влаги. Для этого стрипы поместить в цефленовый пакет с влагопоглотителем, тщательно закрыть пакет пластиковой застёжкой. Упакованные таким образом стрипы хранить при (2-8) °С до конца срока годности набора.

Приготовить промывочный раствор (п. 7.1.1), разведённые образцы сывороток (п. 7.1.2) и концентрированный раствор конъюгата (п. 7.1.3).

7.2.2. Внести в соответствующие лунки в дублях по 100 мкл каждого калибровочного образца и по 100 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки крови, разведенных в 100 раз.

7.2.3. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (18-25) °С.

За 5 мин до окончания инкубации приготовить раствор конъюгата в рабочем разведении (п. 7.1.3).

7.2.4. По окончании инкубации содержимое лунок собрать в сосуд с дезинфицирующим раствором, промыть лунки 5 раз промывочным раствором и тщательно удалить влагу.

Внимание! Каждую лунку при промывке необходимо заполнять полностью (400 мкл рабочего промывочного раствора). Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек.

7.2.5. Внести во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении (п. 7.1.3).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре (18-25) °С.

7.2.6. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки, как указано в п. 7.2.4.

7.2.7. Приготовить раствор ТМБ в рабочем разведении или использовать готовый раствор ТМБ (п. 7.1.4). Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ.

Для внесения раствора ТМБ использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы поместить в защищенное от света место при температуре (18-25) °С на 25 мин.

7.2.8. Остановить реакцию добавлением в лунки по 100 мкл стоп-реагента и через 2-3 мин измерить оптическую плотность (ОП).

Следует избегать попадания стоп-реагента на одежду и открытые участки тела. При попадании – промыть большим количеством воды.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620-655 нм. Допустима регистрация результатов только с фильтром 450 нм.

Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществлять по воздуху.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. По результатам измерения вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации IgG к tTG в калибровочных образцах (Ед/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждой независимой постановки ИФА.

9.2. По построенному калибровочному графику определить содержание IgG к tTG в контрольном образце в Ед/мл. Полученное значение должно находиться в диапазоне значений, указанном в паспорте и на этикетке контрольного образца. Только в этом случае можно определять концентрацию IgG к tTG в исследуемых образцах. По калибровочному графику определить содержание IgG к tTG в исследуемых образцах по среднему арифметическому значению оптической плотности для каждой пары лунок.

9.3. Если концентрация IgG к tTG в анализируемом образце сыворотки крови превышает 100 Ед/мл, образец следует исследовать дополнительно, предварительно разведя его раствором для разведения сывороток (РС) ещё в 5 раз (конечное разведение образца – 1:500); полученный результат в таком случае следует умножить на 5.

9.4. В сыворотке крови здоровых людей IgG к tTG обычно определяются в концентрации от 0 до 10 Ед/мл. Повышенный уровень IgG к tTG (≥ 10 Ед/мл) наблюдается при глютенной энтеропатии (целиакии) и герпетиформном дерматите (болезни Дюринга).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при

температуре (2-8) °С в течение всего срока годности (12 мес).

10.3. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;
- калибровочные и контрольные образцы после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;
- концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для предварительного разведения, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата, субстратный буферный раствор и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;
- при комплектовании набора лиофилизированным конъюгатом приготовленный концентрированный раствор конъюгата можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение 1 месяца с момента приготовления или при температуре минус (20±4) °С до конца срока годности набора. Допускается 3-кратное замораживание концентрированного раствора конъюгата;
- при комплектовании набора концентратом конъюгата после вскрытия флаконов его можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности;
- раствор конъюгата в рабочем разведении можно хранить при температуре (18-25) °С не более 3 ч;
- раствор тетраметилбензидина в рабочем разведении можно хранить в защищенном от света месте при температуре (18-25) °С не более 3 ч;
- промывочный раствор можно хранить при температуре (2-8) °С не более 5 сут.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент, СБР, концентрат ТМБ, раствор ТМБ), которые взаимозаменяемы в наборах ЗАО «Вектор-Бест».

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

По вопросам, касающимся качества набора «IgG-Трансглутаминаза-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в **ЗАО «Вектор-Бест»** по адресу: 630128, г. Новосибирск-128, а/я 102, тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobik@vector-best.ru

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел. (383) 332-81-44.

Начальник лаборатории
бактериальных инфекций
ЗАО «Вектор-Бест»

С.А. Кротов

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

Зам. директора по научной работе ГБУЗ МО
«Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского»
д.м.н., профессор



А.В. Молочков

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью _____ листов.
Зав. лабораторией "СПИД" ГБУЗ МО
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского
_____ Куришцева Е.Н.

