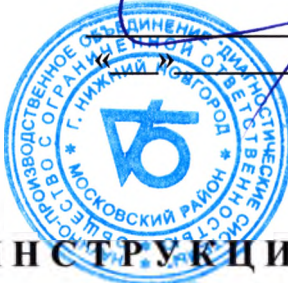


УТВЕРЖДАЮ

**Заместитель генерального директора
ООО «Научно-производственное
объединение «Диагностические системы»**

**О.Н. Шлюндин
2012 г.**



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

«ДС-ИФА-АФП»

**Тест-система иммуноферментная для количественного определения
альфа-фетопroteина**

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «ДС-ИФА-АФП» предназначен для количественного определения альфа-фетопroteина в сыворотке крови человека методом твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

1.2. Альфа-фетопroteин (АФП) - гликопротеин с молекулярной массой 70000 Да. АФП синтезируется во время эмбрионального развития, в основном, висцеральной энтодермой желточного мешка и печенью плода. На отдельных стадиях внутриутробного развития он в некоторой степени может синтезироваться эмбриональной почкой, поджелудочной железой и энтодермой желудочно-кишечного тракта. После рождения, концентрация АФП в сыворотке резко падает, а ко второму году жизни и в дальнейшем, в норме сохраняется лишь незначительное его количество (от 0 до 10МЕ/мл).

Повышение его концентрации связано с беременностью и некоторыми онкологическими заболеваниями. Определение АФП в сыворотке крови беременных в настоящее время рассматривается как основа скринирующих программ для обнаружения пороков развития плода. При наличии у плода таких пороков, как дефект нервной трубки, тератома, эмбриональная грыжа, отмечается резкое повышение концентрации АФП в крови матери. Низкое содержание АФП в материнской сыворотке связано с синдромом Дауна и другими хромосомными aberrациями.

АФП является онкологическим маркером. Повышение уровня АФП наблюдается при первичном раке и метастазах злокачественных опухолей в печень, раке яичника, яичка, желудка, толстой кишки, поджелудочной железы, молочной железы, а также бронхиальных опухолях. Определение уровня АФП может использоваться для контроля эффективности проведенной терапии.

Незначительное повышение уровня АФП наблюдается при заболеваниях печени нераковой природы, сопровождающихся интенсивной регенерацией ее тканей (цирроз печени, вирусные гепатиты).

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах: 40 неизвестных проб, одна проба контрольной сыворотки, шесть стандартных калибровочных проб и одна проба для определения оптической плотности ТМБ-Субстратного раствора при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

В случае дробного применения набора необходимо обязательное использование всех стандартных калибровочных проб при каждой постановке.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия.

В наборе «ДС-ИФА-АФП» применен «сэндвич»-вариант твердофазного ИФА. Для реализации его использованы два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам молекулы АФП: первые антитела иммобилизованы на твердой фазе, вторые (меченные пероксидазой хрена) входят в состав конъюгата. В лунках планшета во время инкубации происходит одновременное связывание содержащегося в исследуемом образце АФП с антителами, иммобилизованными на твердой фазе, и антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Количество связанного антителами конъюгата прямо пропорционально количеству АФП в образце сыворотки крови.

Во время инкубации с ТМБ-Субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству АФП в образце сыворотки крови. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация АФП в исследуемых образцах.

2.2. Состав набора реагентов «ДС-ИФА-АФП»

Таблица 1

Характеристики реагентов	Форма выпуска
Иммуносорбент - планшет полистироловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый, разборность до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к АФП.	1 шт.
Конъюгат - моноклональные антитела к АФП, конъюгированные с пероксидазой хрена; прозрачная или опалесцирующая розового цвета жидкость. В качестве консервантов содержит: 0,05% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	1 флакон 12,0 мл
Калибратор 0, Калибратор 1, Калибратор 2, Калибратор 3, Калибратор 4, Калибратор 5 – стандартные калибровочные пробы, содержащие известные концентрации АФП, аттестованные в соответствии с первым международным стандартом 72/225. Прозрачные или опалесцирующие светло-желтого цвета жидкости. Значения концентраций АФП указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,05% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	6 флаконов по 0,5 мл (Калибратор 0 – 2,0 мл)
Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием АФП. Прозрачная или опалесцирующая светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации АФП в сыворотке указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержит: 0,05% проклин 300, 0,004% гентамицина сульфат, 0,1% фенол.	1 флакон 0,5 мл
ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или слегка опалесцирующая, бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость.	1 флакон 50,0 мл
ТМБ-Субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 14,0 мл
Стоп-реагент/0,2М - серная кислота в концентрации 0,2 моль/л. Прозрачная бесцветная жидкость.	1 флакон 25,0 мл
Бланк для построения калибровочной кривой	1 шт.
Инструкция по применению	1 шт.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетами или защитная пленка для ИФА планшетов;
- одноразовые наконечники;
- пластиковые ванночки для жидких реагентов;
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или полиэтиленовый пакет с замком.

3. Аналитические и диагностические характеристики набора

3.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АФП в сыворотке крови человека составляет 1 МЕ/мл.

3.2. Специфичность. Для выявления кросс-реактивности в анализе тестировался человеческий сывороточный альбумин.

Таблица 2

Человеческий сывороточный альбумин	Получена интенсивность окраски, соответствующая содержанию АФП в сыворотке (МЕ/мл)
12,5 мг/мл	< 1,0
25,0 мг/мл	< 1,0
50,0 мг/мл	< 1,0
100,0 мг/мл	< 1,0

Не обнаружено перекрестной реакции компонентов системы с ниже перечисленными реагентами, при их добавлении в больших количествах в образец сыворотки с известной концентрацией АФП: ЛГ – 10 МЕ/мл, пролактин – 1 мкг/мл.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения АФП в одном и том же образце с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации АФП имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №1–№5. Значение «линейности» должно находиться в пределах от 90 до 110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» АФП – соответствие измеренной концентрации АФП предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №2. Процент открытия составляет от 90 до 110%.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. В иммуноферментном анализе, основанном на «сэндвич»-принципе, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной. При использовании набора «ДС-ИФА-АФП» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации 2000 МЕ/мл.

3.7. Клиническая проверка. Верхний предел содержания АФП в сыворотке здоровых доноров около 10МЕ/мл. В таблице 3 приведены ожидаемые медианные значения концентраций АФП у женщин с нормально протекающей беременностью на сроках с 14 по 21 неделю.

Таблица 3

Срок беременности, недель после зачатия	Медиана, МЕ/мл	Нормальные пределы, МЕ/мл
14	25,24	13 – 63
15	32,59	16 – 81
16	36,78	18 – 92
17	37,47	19 – 94
18	38,25	19 – 96
19	50,70	25 – 127
20	58,19	29 – 145
21	53,51	27 – 134

Правила пересчета результатов: МЕ/мл $\times$ 1,205 = нг/мл; нг/мл $\times$ 0,83 = МЕ/мл.

3.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций АФП, соответствующие нормальным значениям для конкретной территории.

4. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил лабораторной практики:

4.1. Постановку ИФА следует проводить в помещении с комнатной температурой от 18 до 24 °С.

4.2. Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме:

- неспецифических компонентов (ПР (концентрат $\times$ 25), ТМБ-Субстратный раствор, Стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах для исследования гормонов и онкомаркеров, производства ООО «НПО «Диагностические системы».

4.3. Нельзя использовать реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке.

4.4. Растворы готовить осторожно, исключая какое-либо загрязнение.

4.5. Нельзя проводить ферментную реакцию в присутствии реактивных паров (кислота, щелочь, альдегиды) или пыли, которые могут повлиять на активность конъюгата.

4.6. Лабораторная посуда должна быть тщательно промыта; предпочтительно применение материалов одноразового использования.

4.7. Ферментная реакция особо чувствительна к ионам металлов. Нельзя допускать контакта металлических предметов с растворами конъюгата или субстрата.

4.8. Необходимо использовать чистый наконечник для каждого образца или реагента.

4.9. Промывка лунок - важный этап проведения анализа: необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки и убедиться, что лунки полностью заполняются раствором. Не следует допускать остатка жидкости в лунках после промывки. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам.

4.10. Нельзя использовать одну и ту же ванночку для внесения конъюгата и ТМБ-Субстратного раствора.

4.11. Необходимо использовать только валидированные дозаторы и оборудование.

4.12. Нельзя изменять процедуру проведения анализа.

4.13. Нельзя подвергать реагенты воздействию высокой температуры или прямого солнечного света.

5. Инструкция по безопасности

5.1. Все реагенты набора предназначены для лабораторной диагностики.

5.2. Сыворотки крови человека, используемые при приготовлении Калибраторов и Контрольной сыворотки, не содержат антитела к вирусу гепатита С, антитела к ВИЧ-1,2, антиген вируса гепатита В (HBsAg), p24 ВИЧ-1 и антитела к возбудителю сифилиса.

5.3. В помещении с иммунодиагностическими материалами нельзя употреблять пищу, пить, курить, применять косметику.

5.4. Нельзя пипетировать ртом.

5.5. При работе с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально опасными материалами, т.к. ни один известный метод тестирования не может гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.6. При работе с любым оборудованием, которое контактирует с исследуемыми образцами и реагентами, необходимо обращаться как с инфекционными материалами.

5.7. При работе с набором реагентов и исследуемыми образцами необходимо использовать спецодежду и одноразовые перчатки, тщательно промывать руки после работы с ними.

5.8. Необходимо избегать расплескивания образцов или растворов, содержащих образцы. При расплескивании немедленно дезактивировать поверхность 3% раствором хлорамина Б.

5.9. Необходимо избегать контакта ТМБ-Субстратного раствора, стоп-реагента с кожей и слизистыми.

5.10. После проведения ферментной реакции необходимо нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, отходы или любые жидкости, содержащие биологические образцы до сброса в канализацию. Твердые отходы (использованные планшеты, наконечники к дозаторам, флаконы, лабораторная посуда, одноразовые перчатки и т.д.) должны быть обеззаражены погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства или в 3% раствор хлорамина Б. Длительность дезинфекции – не менее 1 ч. Допустимо применение другого разрешенного к применению дезинфицирующего средства. Твердые отходы также следует обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа). Жидкие отходы (промылочные воды) следует обеззараживать добавлением сухого хлорамина Б из расчета 30 г/л (длительность дезинфекции – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кгс/см² (0,15 МПа) при температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.



5.11. **Xi** Некоторые реагенты содержат 0,05% проклин 300. Проклин 300 0,05% - раздражающее вещество. Может вызвать сенсибилизацию при контакте с кожей. При контакте с кожей промыть область контакта большим количеством мыла и воды.

6. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- устройство для промывания планшетов (вошер);
- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание со скоростью 500 об/мин при температуре (37,0 ± 0,5) °С;
- дозаторы пипеточные полуавтоматические одноканальные с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл с наконечниками;
- дозатор пипеточный полуавтоматический восьмиканальный, позволяющий отбирать объемы жидкости до 300 мкл, с наконечниками;
- цилиндр мерный (200 мл, 500 мл);
- стакан стеклянный (500 мл);
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

7. Анализируемые образцы сывороток крови человека

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинаktivированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. **Недопустимо использование образцов с добавлением азида натрия в качестве консерванта!** Каждый образец исследуемой сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3-х суток. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут

подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Нельзя использовать образцы с бактериальным ростом, выраженным гемолизом и гиперлипидемией. Образцы сыворотки крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием при 1000-2000 об/мин в течение 15 мин при температуре от 4 до 8 °С.

8. Подготовка реагентов для анализа

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при комнатной температуре.

8.1. Иммуносорбент. **Внимание: во избежание конденсации влаги внутри лунок необходимо выдержать иммуносорбент при комнатной температуре в закрытом пакете не менее 30 минут.**

Вскрыть фольгированный пакет, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов, вставить стрипы в рамку.

Пакет с неиспользованными стрипами тщательно герметизировать с помощью скрепки для фольгированного пакета (не удаляя осушитель!). Для этого край пакета следует свернуть 2-3 раза и закрепить, надев сверху скрепку для фольгированного пакета. Или поместить вскрытый фольгированный пакет с иммуносорбентом в полиэтиленовый пакет с замком.

8.2. ПР – рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего ПР необходимое количество концентрата промывочного раствора развести в 25 раз водой дистиллированной (например, к 10 мл концентрата ПР добавить 240 мл воды). Полученный раствор тщательно перемешать.

8.3. Конъюгат – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

8.4. Стандартные калибровочные пробы - готовы к применению.

8.5. Контрольная сыворотка - готова к применению.

8.6. ТМБ-Субстратный раствор – готов к применению. Перед использованием отобрать необходимое количество в чистую ёмкость.

8.7. Стоп-реагент - готов к применению.

9. Проведение анализа

9.1. Внести пипеточным дозатором по 100 мкл конъюгата во все лунки планшета, кроме двух лунок, которые рекомендуется оставить пустыми для измерения ОП ТМБ-Субстратного раствора.

9.2. Стандартные калибровочные пробы, контрольную сыворотку, исследуемые образцы внести по 25 мкл в соответствующие лунки в двух повторях. Содержимое лунок тщательно перемешать пипетированием. **Внимание! Время внесения образцов не должно превышать 10 мин.!** Во время последующей инкубации стрипы планшета должны быть закрыты крышкой или защитной пленкой.

9.3. Возможны две процедуры инкубации планшета:

Процедура 1 (термостатируемый шейкер, $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$):

Планшет инкубировать 60 минут на термостатируемом шейкере при встряхивании со скоростью 500 об/мин и температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Процедура 2 (комнатная температура):

После внесения в лунки планшета конъюгата и образцов содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 120 минут при комнатной температуре (здесь $20-25^\circ\text{C}$).

9.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала, планшет промыть 5 раз рабочим ПР (см. п. 8.2), добавляя во все лунки планшета не менее 300 мкл рабочего ПР и удаляя рабочий ПР с помощью промывочного устройства в ёмкость для сбора инфицированного материала. После последнего промывания тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

9.5. Немедленно внести во все лунки планшета по 100 мкл ТМБ-Субстратного раствора и выдерживать при комнатной температуре в темноте:

Процедура 1: 20-30 мин.

Процедура 2: 30 мин.

9.6. Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд и провести учет результатов. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 мин.

9.7. **Спектрофотометрический контроль внесения сывороток и реагентов при постановке тест-системы «ДС-ИФА-АФП» на автоматических ИФА-анализаторах.** Контроль внесения образцов сыворотки и конъюгата рекомендуется проводить при длине волны 405 нм, критерий: ОП > 0,100.

10. Регистрация результатов

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

11. Учет результатов

Реакцию следует учитывать, если среднее значение оптической плотности (ОП) в лунках с контролем ТМБ-Субстратного раствора – не более 0,1.

На бланке построения калибровочной кривой в линейных координатах по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентрации АФП, выраженной в МЕ/мл, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят калибровочную кривую.

Для исследуемых образцов определяют концентрацию АФП по калибровочному графику. Для этого на оси ординат Y отмечают значение ОП исследуемого образца, проводят прямую до пересечения с калибровочной кривой, от полученной точки проводят перпендикуляр до оси абсцисс X. Точка пересечения покажет значение концентрации АФП в исследуемом образце, выраженную в МЕ/мл.

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные величины концентраций АФП в образцах считать достоверными, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации АФП в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона

Для образца с ОП выше, чем в калибровочной пробе №5, выдается результат: больше номинации «Калибратора 5» или этот образец должен быть протестирован в разведении (на «Калибраторе 0»). В случае разведения образца необходимо измеренную концентрацию АФП умножить на фактор разведения.

12. Ограничения теста

12.1. Все реагенты набора предназначены для определения альфа-фетопroteина (АФП) в сыворотке крови человека. Набор не предназначен для определения альфа-фетопroteина (АФП) в слюне, плазме и других образцах человеческого или животного происхождения.

12.2. Неправильное обращение с образцами и изменение процедуры теста могут повлиять на результаты.

12.3. Для разведения образцов сывороток с высоким содержанием АФП следует использовать «Калибратор 0». Применение других реагентов может привести к ложным результатам.

12.4. Заключение о клиническом диагнозе не может быть основано только на результатах данного теста. В диагностических целях результаты должны обязательно использоваться в сочетании с другими данными: симптомами, общей клинической картиной, результатами исследования другими тестами.

12.5. Наличие гетерофильных антител у пациентов, имеющих дело с животными или получавших моноклональные антитела в качестве лечения, может оказывать влияние на результаты иммунологических тестов.

12.6. Хук-эффект в данном тесте до 2000 МЕ/мл не наблюдался.

12.7. Набор не предназначен для тестирования образцов сывороток крови новорожденных.

13. Условия хранения и эксплуатации набора

13.1. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в защищённом от света месте в течение всего срока годности. Срок годности набора – 18 месяцев.

13.2. Транспортирование набора реагентов проводить при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 суток.

13.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- Иммуносорбент - пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- ПР (концентрат х 25) - после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ПР (концентрат х 25) хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С;

- Рабочий промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить в чистой плотно закрытой емкости в течение 14 сут. при комнатной температуре или 28 сут. при температуре от 2 до 8 °С.

- Конъюгат – после вскрытия флакона, оставшийся неиспользованным конъюгат хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стандартные калибровочные пробы - после вскрытия флакона оставшиеся неиспользованными калибровочные пробы хранить во флаконах, плотно закрытых винтовыми крышками, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Контрольная сыворотка - после вскрытия флакона оставшуюся неиспользованной контрольную сыворотку хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- ТМБ-Субстратный раствор – после вскрытия флакона оставшийся неиспользованным ТМБ-Субстратный раствор хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении двух месяцев при температуре от 2 до 8 °С.

- Стоп-реагент - после вскрытия флакона, оставшийся неиспользованным стоп-реагент хранить во флаконе, плотно закрытом винтовой крышкой, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

13.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Рекламации на специфические и физические свойства набора направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12.

14. Объяснение символов

	ЕС Маркировка (Европейская директива 98/79/CE по in vitro диагностическим МУ)
	Только для лабораторного использования (in vitro diagnostic)
	Производитель
	Каталожный номер
	Количество определений
	Номер партии (серии)
	Температурные пределы хранения
	Срок годности дата/месяц/год
	Смотрите инструкцию по применению
	Содержит раздражающее вещество

Директор по производству
 ООО «Научно-производственное объединение
 «Диагностические системы»



В.К. Пименов

СОГЛАСОВАНО
 Зав.кафедрой клинической
 лабораторной диагностики
 ГБОУ ДПО РМАПО
 Минздравсоцразвития России
 д.м.н, профессор




В.В. Долгов

28.06.2012

Подпись
 удостоверяю:
 Специалист по кадрам

Гос. у
Иркутску
Иркутск
Иркутск