

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200__ г. № _____

УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор

ЗАО «ДРГ ТехСистемс»



"24" марта 2009 г

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов тест-система иммуноферментная для количественного определения эстриола свободного "ДРГ Эстриол свободный ИФА".

Набор реагентов "ДРГ Эстриол свободный ИФА" представляет собой тест-систему для количественного определения свободного (неконъюгированного) эстриола методом иммуноферментного анализа на твердофазном носителе. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов предназначен для количественного определения свободного (неконъюгированного) эстриола в сыворотке крови человека.

Эстриол (Е3) – главный эстроген, образуемый фетоплацентарной единицей. Свободный эстриол проходит через плаценту в кровоток матери, где практически сразу переходит в соединения глюкуронид и сульфат и экскретируется с мочой. Период полураспада эстриола в материнском кровотоке составляет лишь 20-30 минут. Его измерение позволяет быстро и удобно оценить состояние плода. Эстриол в плазме крови монотонно увеличивается в течение беременности, и особенно резко возрастает в третьем триместре (28-40 недель). Внезапное понижение фетоплацентарной продукции Е3 приведет к резкому падению Е3 в сыворотке крови матери. Есть несколько преимуществ измерения свободного Е3 перед измерением общего Е3 в моче или сыворотке. Уровень свободного эстриола не зависит от эффектов, которые могут на него оказать печеночные или почечные дисфункции. Неконъюгированный Е3 более актуально отображает возможность выкидыша при беременности с диабетом. Так как не требуется гидролиза несвязанного Е3, то результат можно получить быстрее.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод определения основан на твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе с применением поликлональных антител.

На стенках лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к эстриолу. В лунках планшета эндогенный эстриол в образцах исследуемых сывороток пациентов и эстриол-конъюгат с пероксидазой из корня хрена вступают в конкурентное взаимодействие с иммобилизованными на твердом носителе антителами, и формируется иммуноферментный комплекс. После завершения инкубации избыток несвязавшегося конъюгата удаляют промывкой.

Образовавшиеся иммуноферментные комплексы выявляются в ходе инкубации с субстратом ТМБ: происходит окрашивание содержимого лунок в синий цвет. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации эстриола в образцах исследуемых сывороток. Останавливают ферментную реакцию добавлением стоп-раствора и измеряют оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. На основании калибровочного графика рассчитывают концентрацию свободного эстриола в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

1. Иммуносорбент - 96-луночный разборный планшет, для иммуноферментного анализа содержащий 12 стрипов по 8 лунок, на поверхности которых иммобилизованы поликлональные кроличьи антитела к эстриолу – 1 шт.;
2. Конъюгат ферментный (Кг)– эстриол, конъюгированный с пероксидазой из корня хрена, прозрачная розового или красного цвета жидкость, допускается опалесценция, 14 мл – 1 фл.;
3. Набор референс-стандартов – образцы сывороток крови человека, инактивированные, с содержанием эстриола 0; 0,3; 1,2; 4,0; 15; 40 нг/мл, прозрачная светло-желтого или розового цвета жидкость, допускается опалесценция, 1 мл – 6 фл.;
4. Субстрат-раствор с тетраметилбензидином* - прозрачная бесцветная или со светло-зеленым или светло-голубым оттенком жидкость, 14 мл – 1 фл.;
5. Стоп-раствор - 0,5М водный раствор серной кислоты, прозрачная бесцветная жидкость, 14 мл – 1 фл.;
6. Промывочный раствор (концентрат $\times 40$), прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение кристаллического осадка белого цвета, 30 мл – 1 фл.;

*Примечание: вместо субстратного раствора с тетраметилбензидином СБР-ТМБ-1 в состав набора могут входить:

- 4а. Субстратный буферный раствор СБР, прозрачная бесцветная жидкость, 14 мл – 1 фл.;
- 4б. Хромоген – тетраметилбензидин ТМБ, прозрачная бесцветная или светло- желтого цвета жидкость, 2 мл – 1 фл.

Набор содержит все необходимые для проведения анализа реагенты, кроме дистиллированной воды.

Дополнительный флакон референс-стандарта 0 для разведения образцов сывороток может поставляться дополнительно по предварительной заявке.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХРАКТЕРИСТИКИ.

4.1. Специфичность. Перекрестная реакция поликлональных антител к эстриолу с другими стероидами приведена в таблице.

Исследуемый стероид	Концентрация стероида нг/мл	Значение ОП 450	Измеренная концентрация нг/мл
Эстриол (Е3)	40	0,39	39,67
Тестостерон	16	1,758	0
Эстрадиол (Е2)	2	1,579	0
Эстрон (Е1)	2	1,712	0
Кортизол	800	1,775	0

4.2. Воспроизводимость.

Вариации при внутреннем контроле

Вариабельность «внутри» серии

Сыворотка	Кол-во	Значение, (нг/мл)	КВ (%)
1	20	2,13	4,66
2	20	6,22	3,17
3	20	14,58	3,01

Вариации при внешнем контроле

Вариабельность «между» сериями (интер-тест):

Сыворотка	Кол-во	Значение, (нг/мл)	КВ (%)
1	12	2,08	4,59
2	12	5,66	8,50
3	12	13,31	9,49

4.3. Линейность.

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3
Концентрация (нг/мл)	2,63	7,18	15,58
Средние значения «открытия»	98,2	99,7	100,2
Разброс % «открытия»	от 86,3	90,4	96,4
	до 107,9	106,8	103,7

4.4. Точность. К трем сывороткам крови пациентов были добавлены различные количества аналитов. Исследовали каждый образец (неразбавленный и разбавленный), и с помощью стандартной кривой подсчитали концентрацию аналитов. Путем сравнения ожидаемых и полученных результатов измерений был рассчитан процент «открытия».

	Сыворотка 1	Сыворотка 2	Сыворотка 3
Концентрация (нг/мл)	1,32	3,59	7,79
Средние значения точности	100,8	101,8	106,9
Разброс % точности	от 89,0	92,3	98,5
	до 103,8	109,8	112,3

4.5 Чувствительность.

Аналитическая чувствительность рассчитывалась по среднему значению за вычетом 2 стандартных отклонений 20 репликатов нулевого стандарта и равна 0,075 нг/мл.

4.6. Динамический диапазон.

Диапазон измерений метода 0–40 нг/мл.

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой диапазон нормальных и выходящих за пределы нормы значений.

Любое ненадлежащее обращение с образцами или модификация данного метода могут повлиять на результат.

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.125 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результат.

До настоящего времени не наблюдалось влияние каких-либо лекарств на измерение количества эстриола в образце.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Меры безопасности при работе с компонентами набора.

Набор реагентов “ДРГ Эстриол свободный ИФА” биологически безопасен, так как содержит инаktivированные образцы сывороток крови человека или лошади. Однако при работе с любыми реактивами, содержащими компоненты человеческой крови, в том числе с тестируемыми образцами, их следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, который может содержать вирусы гепатитов, ВИЧ и других возбудителей заболеваний. Поэтому все работы с набором необходимо проводить в резиновых перчатках, избегать контакта с кожей и слизистыми оболочками, не пипетировать ртом. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Стоп-раствор обладает раздражающим действием. Избегать попадания капель стоп-раствора на кожу, слизистые оболочки или в глаза. В случае попадания – необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.2. Предупреждения при работе с набором.

- Реагенты набора стабильны до истечения срока годности, указанного на этикетке, только при температуре хранения от 2 до 8°C.

- Категорически запрещается замораживать набор или его отдельные компоненты, так как это приведет к его порче.
- Не использовать реагенты после окончания срока годности, указанного на этикетке.
- Не использовать вместе реагенты разных производителей.
- Запрещается использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов.
- Не использовать вместе стрипы из разных серий. Не рекомендуется также использовать в одном анализе стрипы разных планшет даже из одной серии так как разные наборы могли храниться или транспортироваться при разных условиях, в результате чего связывающие свойства планшет могут немного различаться.
- Реагенты перед применением необходимо перемешать, избегая появления пены.
- Неиспользованные стрипы необходимо хранить в плотно закрытой исходной упаковке (фольгированном пакете с осушителем-силикагелем), удалив из него воздух. Иммунореактивность лунок после первого вскрытия пакета с планшетом сохраняется не более 6 недель при последующем хранении при температуре от 2 до 8°C в плотно запечатанном пакете с осушителем.
- Необходимо пользоваться новым одноразовым наконечником для каждого образца. Для отбора проб использовать калиброванные автоматические пипетки с погрешностью измерения не более 5%.
- Субстрат-раствор должен быть бесцветным или иметь светло-зеленый или светло-голубой оттенок. Если этот реагент имеет темно-синий цвет, то его нельзя использовать.
- Не допускать контакта субстрат-раствора с ТМБ и стоп-раствора с металлическими поверхностями и ионами металлов.
- Не путать колпачки реагентов во избежание кросс-контаминации.
- Плотнo закрывать флаконы с реагентами сразу после использования.
- Пипетировать стандарты и образцы на дно лунок. Для пипетирования ферментного конъюгата и стоп-раствора рекомендуется держать пипетку вертикально над лункой и раскапывать соответствующий раствор в центр лунки для достижения полного смешивания.

6. НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В НАБОР.

- спектрофотометр вертикального сканирования (ридер), позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 ± 10 нм (например, DRG Instruments Microtiter Plats Reader);
- ручное или автоматическое устройство для отмывания планшетов или 8-канальный полуавтоматический дозатор;

- термостат-инкубатор;
- лабораторный холодильник-морозильник;
- дозаторы переменного объема (одно- и многоканальные) с изменяемой емкостью и с погрешностью измерения не более чем указано в паспорте на данное оборудование;
- наконечники для дозаторов пипеточных одноразовые;
- пластиковые одноразовые ванночки для субстрат-раствора с ТМБ и стоп-раствора;
- цилиндры мерные;
- таймер;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые латексные;
- вода дистиллированная;
- линованная графическая (миллиметровая) бумага;
- дополнительные положительные контрольные сыворотки для повышения точности аналитических лабораторных процедур (например, контрольные сыворотки Lyphochek Immunoassay Plus Control Levels 1, 2 and 3 для ИФА, «Bio-Rad», кат. № № 371, 372, 373).

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1 Подготовка анализируемых образцов сывороток крови пациентов.

Кровь отобрать венопункцией, дать полностью свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Для свертывания крови пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, может потребоваться больше времени.

Не использовать гемолизированные или липидиемичные образцы, а также образцы сывороток крови, прошедших несколько циклов замораживания и оттаивания.

Не использовать растворы или образцы сывороток, содержащие добавки, особенно азид натрия.

7.2 Хранение образцов сывороток.

Образцы сывороток хранить до постановки анализа в закрытых пробирках при температуре от 2 до 8°C не более 24 ч.

Для более долгого хранения образцы сывороток необходимо заморозить (не более одного раза!) при температуре минус 20°C. Непосредственно перед проведением анализа образцы сывороток необходимо прогреть до комнатной температуры (от 20 до 25°C) и тщательно перемешать. Не допускать повторного замораживания образцов сывороток!

7.3. Разведение образцов сывороток.

Перед проведением анализа образцы, в которых концентрация оказалась больше самого высокого значения референс-стандарта, либо образцы с предполагаемой очень высокой концентрацией необходимо развести нулевым стандартом.

Пример:

- а) Разведение 1:10: 10 мкл исходного образца + 90 мкл «нулевого» стандарта (тщательно перемешать)
- б) Разведение 1:100: 10 мкл образца, разведенного, как указано в п. а) + 90 мкл «нулевого» стандарта (тщательно перемешать).

7.4. Приготовление дополнительных контрольных сывороток.

Лиофилизированные сыворотки контрольной панели разводить требуемым количеством дистиллированной воды и использовать в соответствии с инструкцией по их применению.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

8.1. Общие замечания.

Все реагенты и требуемое количество стрипов (или планшетов) до начала анализа выдерживать не менее 30 мин при комнатной температуре (от 20 до 25°C). Все реагенты необходимо перемешать, избегая появления пены. Упаковку планшета необходимо вскрывать только по истечении указанного времени прогрева, чтобы избежать конденсации влаги на охлажденной поверхности лунок, приводящей к их порче.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками. Для отбора проб использовать дозаторы пипеточные переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более той, которая указана в паспорте на данное оборудование.

Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять крышки, закрепить лунки в держателе и т. д. Это обеспечит равные промежутки времени при раскапывании и проведении анализа.

После начала анализа все этапы необходимо проводить без перерывов.

Во время инкубации с субстрат-раствором с ТМБ не допускать попадания на стрипы прямых солнечных лучей.

Как правило, ферментная реакция прямо пропорциональна времени и температуре, что дает возможность проводить интерполяцию для установленных физико-химических условий.

8.2. Приготовление рабочих растворов.

8.1.1. Промывочный рабочий раствор. При наличии в концентрате промывочного раствора осадка солей содержимое флакона прогреть перед разведением при температуре от 35 до 37°C до полного растворения осадка. Для приготовления промывочного рабочего раствора содержимое флакона с ПРк (промывочным раствором 40-кратным концентратом, содержит 30 мл) перенести в мерный цилиндр и довести объем раствора до 1200 мл дистиллированной водой. Полученный раствор тщательно перемешать. Хранить промывочный рабочий раствор не более 2 недель при комнатной температуре (от 18 до 25°C).

8.1.2. Рабочий субстратный буферный раствор с тетраметилбензидином. только при комплектации набора 2-х компонентным субстратом: (СБР и ТМБ). 10,5 мл субстратного

буферного раствора (СБР) перенести в чистую посуду из темного стекла или в одноразовую пластиковую посуду и добавить 1,5 мл хромогена - ТМБ, тщательно перемешать. Соблюдать последовательность внесения. Исключить контакт с металлической поверхностью или с ионами металлов. Избегать прямого солнечного света. Раствор хранению не подлежит, готовить непосредственно перед внесением в лунки планшета.

8.3. Проведение ИФА.

Перед проведением анализа необходимо составить план расположения для всех образцов и референс-стандартов, рассчитать и отобрать необходимое для анализа количество стрипов, закрепить их в держателе.

8.3.1. Внести, используя для каждого образца новый наконечник для пипеток, по 10 мкл референс-стандартов, контролей и исследуемых образцов сывороток крови в соответствующие лунки.

8.3.2. Внести в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата.

8.3.3. Тщательно перемешать в течение 10 сек. Важно добиться полного смешивания реагентов.

8.3.4. Инкубировать в течение 60 мин при комнатной температуре (от 20 до 25°C).

8.3.5. Вытряхнуть содержимое лунок в сосуд для сбора отработанных растворов (с последующей дезинфекцией содержимого сосуда).

Промыть лунки **4 раза** промывочным рабочим раствором, внося около 400 мкл на лунку, не допуская переливания раствора из лунки в лунку. Время между внесением раствора и его удалением из лунки должно быть не менее 30 сек. Для получения надежных результатов анализа очень важно следить за качеством промывки. Чувствительность и специфичность анализа напрямую зависят от качества отмывки лунок планшета.

Остатки раствора удалить и полностью осушить планшет, резко постукивая в перевернутом положении по сложенной в несколько раз чистой фильтровальной бумаге, помещенной в лоток.

8.3.7. Внести в каждую лунку по 100 мкл субстрат-раствора с тетраметилбензидином (СБР-ТМБ-1), а при комплектации набора 2-х компонентным субстратом: (СБР и ТМБ) - рабочего субстратного буферного раствора с тетраметилбензидином (см.п.7.1.2).

8.3.8. Инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (от 20 до 25°C) в защищенном от света месте.

8.3.9. Остановить ферментную реакцию, добавив в лунки по 100 мкл стоп-раствора.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Результаты ИФА регистрируют на спектрофотометре в течение **10 мин** после внесения стоп-раствора. Оптическую плотность всех лунок измеряют при длине волны **450±10 нм**. Рекомендуется использование референс-светофильтра с длиной волны 630 нм.

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА.

Определение концентрации свободного эстриола в каждом образце сыворотки крови пациента проводить следующим образом.

10.1. Рассчитать средние значения оптической плотности стандартов, контролей и сывороток пациентов.

10.2. Используя линованную графическую бумагу, построить стандартную кривую, поместив среднюю величину оптической плотности для каждого референс-стандарта на вертикальной оси (Y) против соответствующей концентрации в нг/мл на горизонтальной оси (X).

10.3. Использовать средние значения оптической плотности для каждого образца для определения соответствующей концентрации свободного эстриола путем простой интерполяции по стандартной кривой, при необходимости умножая на коэффициент разведения.

10.4. При использовании автоматического метода результаты анализа рассчитываются автоматически, используя логарифмическую логистическую модель с четырьмя параметрами (4PL).

10.5. Образцы с концентрациями более высокими, чем концентрация самого высокого референс-стандарта, необходимо развести (пример разведения см. п. 7.3.) и повторить исследование.

Программы DRG ELISA MAT 3000 и DRG Regression Program позволяют считывать и обрабатывать результаты с помощью компьютера.

Следующие данные приведены только для иллюстрации и не должны использоваться для вычисления результатов.

Стандарт	ОП (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	1,79
Стандарт 1 (0,3 нг/мл)	1,48
Стандарт 2 (1,2 нг/мл)	1,18
Стандарт 3 (4,0 нг/мл)	0,81
Стандарт 4 (15,0 нг/мл)	0,52
Стандарт 5 (40,0 нг/мл)	0,38

11. ОЖИДАЕМЫЕ НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ.

При исследовании образцов здоровых пациентов с использованием тест-системы «ДРГ Эстриол свободный ИФА» были получены следующие значения

население	Количество	5 %Перцентиль	95 %Перцентиль
-----------	------------	---------------	----------------

	испытуемых	нг/мл	нг/мл
мужчины	42	0,146	0,573
женщины (не беременные)	43	0,057	0,822

Клиническое значение.

Определение эстриола (Е3) в сыворотке крови используется для мониторинга и контроля развития плода, у женщин во второй половине беременности, особенно входящих в группу риска (при беременности с диабетом, привычное невынашивание, семейное носительство хромосомных болезней и т. д.).

Уровень свободного эстриола постоянно повышается до 20 недели и резко возрастает в третьем триместре. Однократное определение уровня свободного эстриола в плазме недостаточно информативно, так как диапазоны нормальных и патологических значений очень широки. Поэтому пациентам необходим постоянный контроль (мониторирование) для выявления индивидуальной предрасположенности.

Постоянное низкое значение или резкое падение уровня свободного эстриола в третьем триместре с большой точностью указывает на патологическое состояние плода или его возможную гибель. При получении таких результатов необходимо провести альтернативные методы оценки состояния плода.

Интерпретация результатов должна проводиться в сочетании с другими клиническими тестами и диагностическими процедурами, такими как амниоцентез и ультразвук. Отклонение от нормы уровня свободного эстриола встречается у пациентов, принимающих антибиотики или кортикостероиды или у пациентов со сниженной функцией печени.

Нормы в течение беременности:

Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	Неделя беременности	Ожидаемый диапазон (нг/мл)	многоплодная беременность (нг/мл)
12	0,3-1,0	22-23	2,7-16	3-18
13	0,3-1,1	24-25	2,9-17	3-20
14	0,4-1,6	26-27	3,0-18	4-21
15	1,0-4,4	28-29	3,2-20	4-22
16	1,4-6,5	30-31	3,6-22	5-25
17	1,5-6,6	32-33	4,6-23	6-39
18	1,6-8,5	34-35	5,1-25	7-39
19	1,9-11	36-37	7,2-29	9-38
20	2,1-13	38-39	7,8-37	13-40
21	2,6-14	40-42	8,0-39	-

12. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА.

Значения референс-стандартов и соответствующие результаты лаборатории контроля качества указаны в листе контроля качества (паспорте ОТК), вложенном в набор. Значения и диапазоны, указанные на листе контроля качества, всегда относятся к текущей серии набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.

Также рекомендуется использовать национальные и международные программы оценки качества для того, чтобы удостовериться в правильности получаемых результатов. Рекомендуется проводить контроли с каждой калибровочной кривой, используя Bio-Rad Lyphochek Immunoassay Plus Control Levels 1, 2 and 3 (кат. № № 371, 372, 373), которые также можно приобрести в компании DRG.

Соответствующие статистические методы также можно использовать для анализа контрольных значений и тенденций. Если результат анализа не укладывается в рамки установленных приемлемых диапазонов контрольных материалов, результат пациента считается недействительным. В этом случае необходимо проверить следующее: приборы для пипетирования – дозаторы пипеточные, наличие их поверки и калибровки, исправность и наличие поверки фотометра (ридера), сроки годности всех реагентов, условия хранения и инкубации, качество промывки.

В случае если проверка всех вышеупомянутых моментов не выявила никаких нарушений, необходимо обратиться к производителю - ЗАО «ДРГ Техсистемс».

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ НАБОРА.

13.1. Хранение - в соответствии с СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2 до 8°C, в сухом, защищенном от света месте и относительной влажности воздуха не более 70%. Не допускать замораживания. В недоступном для детей месте.

13.2. Транспортирование - в соответствии с СП 3.3.2.1248-03, при температуре от 2 до 8°C. Допускается транспортирование от 9 до 28 °C в течение 72 ч. На дальние расстояния – авиатранспортом.

Условия отпуска – только для диагностики *in vitro*, для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

По вопросам качества набора реагентов "ДРТ Эстриол свободный ИФА" следует обращаться по адресу предприятия-изготовителя: ЗАО «ДРТ Техсистемс»,
юридический адрес: 123610, г. Москва, Краснопресненская наб., 12;
почтовый адрес: 121248, г. Москва, наб. Тараса Шевченко, 3;
тел.: (499) 243-40-28/ 52-28/ 56-21, факс: (495) 258-83-80, (495) 232-02-11.

Генеральный директор
ЗАО «ДРТ Техсистемс»

Кекало Д.Ю. _____
« ____ » _____ 2009 г.

«СОГЛАСОВАНО»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО
«РМАПО Росздрава» Профессор, д.м.н.

Долгов В.В. _____
« 29 » _____ 2009 г.



Подпись В.В. Долгова
удостоверяю: специалист по
кадровой работе ГОУ ДПО
РМАПО Росздрава
подпись: Масис / Масис Г.В.