

01.06.2004

ІНСТРУКЦІЯ

з проведення цитогенетичного контролю племінних тварин

1. Загальні положення

1.1. Ця Інструкція, розроблена на виконання Закону України "Про племінну справу у тваринництві" ( 3691-12 ), визначає порядок проведення цитогенетичних досліджень у тваринництві, які є невід'ємною частиною генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин.

1.2. Цитогенетичний контроль - контроль стану хромосомного апарату тварини, його цілісності, наявності структурних та кількісних порушень каріотипу.

1.3. Мета цитогенетичного контролю - установлення відсутності або наявності хромосомних, хроматидних, геномних кількісних та якісних змін і порушень.

1.4. Цитогенетичний контроль проводять за необхідності.

1.5. Організацію та проведення відбору зразків крові для цитогенетичного контролю здійснюють ветеринарні спеціалісти господарств/власників тварин.

1.6. Цитогенетичний контроль здійснюють на підприємствах (лабораторіях) генетичного контролю атестовані фахівці із спеціальною освітою, які пройшли спеціальну підготовку щодо проведення цитогенетичних досліджень.

2. Визначення термінів

У цій Інструкції наведені нижче терміни вживаються в такому значенні:

- аберація - зміна в каріотипі;
- аутосоми - усі хромосоми каріотипу, крім статевих;
- геномні мутації - структурні й кількісні порушення хромосомного апарату тварин;
- генотип - сукупність генів організму;
- каріотип - хромосомний набір соматичних клітин організму, характерний для даного виду;
- каріотипування - ідентифікація кожної окремої хромосоми диплоїдного набору хромосом тварини;
- клітина - основна структурна одиниця організму, що забезпечує його відтворення, розвиток та життєдіяльність;
- метафазні платівки - сукупність хромосом, розташованих у вигляді платівки в екваторіальній площині клітини під час метафази мітозу або мейозу;
- мітоз - поділ соматичних клітин, за якого зберігається диплоїдний набір хромосом, основний спосіб поділу еукаріотичних клітин;

мозаїцизм - присутність в організмі клітин (точніше клонів) різного генотипу;

поділ - форма розмноження організмів та клітин, при якій відбувається поділ ядер та цитоплазми з подальшим утворенням нових дочірніх клітин;

поживні середовища - рідкі чи тверді середовища, на яких у лабораторних або промислових умовах вирощують бактерії, гриби, віруси, найпростіших, культури клітин та тканин;

хромосоми - органоїди клітинного ядра, носії генів, що визначають спадкові властивості клітин та організмів;

хромосомний набір - сукупність хромосом, властивих клітинам даного організму;

цитогенетика - наука про закономірності спадковості та мінливості на рівні клітин та субклітинних структур (хромосом).

### 3. Проведення цитогенетичного контролю

3.1. Для проведення цитогенетичних досліджень необхідна наявність лабораторії, що складається з двох кімнат (16-20 кв.м) з мийною, боксом і центрифужною, та необхідного оснащення.

Устаткування:

холодильник побутовий;

сушильна шафа;

термостат, що забезпечує температуру 37-38 град.С;

стерильний бокс (камера чи стіл з подачею стерильного повітря);

центрифуга, що забезпечує швидкість 1000 об/хв;

дистилятор;

витяжна шафа;

мікроскопи біологічні, які забезпечують високу якість зображення під збільшенням від 100 до 1000 разів;

автоклав;

стерилізатор для інструментів;

голки для взяття крові;

пальник спиртовий;

шприци на 1-20 мл;

звичайні та центрифужні пробірки;

мірні та пастерівські піпетки;

колби;

мірні циліндри;

флакони пеніцилінові;

предметні і покривні скельця;

обладнання для цифрового або аналогового фотографування.

Реактиви (для проведення цитогенетичного контролю 500 тварин):

фітогемаглютинін (типу Р - 5 мг, типу М - 50 мг) або конканавалін А - 50 мг;

колхіцин - 1 мг;

середовище 199 (Ерла, Ігла) або RPMI 1640 - 2,5 л;

сироватка крові людини IV групи АВ чи сироватка крові великої рогатої худоби - 0,5 л;

барвник Гімза - 1 г;

метиловий або етиловий спирт - 20 л;

крижана оцтова кислота - 7 л;

імерсійна олія - 50 г;

пеніцилін - 200 тис. од. зі стрептоміцином - 200 г або гентаміцин - 2,5 мл.

3.2. Матеріалом для одержання хромосомних препаратів слугує у:

великої рогатої худоби, овець, кіз та коней - кров, що відбирається з яремної вени тварини;  
свиней - кров з вушної вени.

Кров відбирають при дотриманні умов стерильності традиційним шляхом або через спеціальну систему одноразового використання для взяття крові (ВК - 10-01) у спеціальний посуд (пробірку, флакон тощо), оброблений 0,2-0,3 мл розчину гепарину (0,2 мл аптечного гепарину та 8 мл дистильованої води).

Відбір проб крові проводять у такій послідовності:

пункція яремної вени;

зрошення, обмивання кров'ю протягом 2-3 секунд внутрішньої поверхні голки;

пробивання коротким кінцем голки гумової пробки спеціального посуду (пробірки, флакона тощо).

Після відбору кров відстоюють у щільно закритому посуді в холодильнику при температурі 4 град.С протягом 2 годин.

3.3. Кров доставляють на підприємство (лабораторію) генетичного контролю протягом доби після відбору з формою N 1-ГЕН "Відомість зразків крові N\_\_\_", зазначеною в Положенні про порядок проведення генетичної експертизи походження та аномалій племінних тварин.

Доставку здійснюють у термосі, іншому посуді або пристосованні, яке здатне підтримувати тривалий час температуру 4 град.С. Транспортують, не допускаючи струшування крові.

Умови та терміни транспортування крові в лабораторію впливають на одержання метафазних платівок високої якості. Протягом 3 годин кров можна транспортувати за звичайних умов. При тривалішому транспортуванні проби крові перевозять у термосі з льодом або в портативному холодильнику. Час транспортування за таких умов може бути збільшено до 24-30 годин. У процесі транспортування можливе культивування клітин. У цьому разі кров за описаним методом уносять у флакони з поживним середовищем і поміщають у термос (компоратор), здатний підтримувати температуру до 38 град.С.

#### 3.4. Отримання цитогенетичних препаратів

Для взяття крові у тварин і культивування клітин використовують медичні флакони ємністю 30 мл з пластмасовими кришками, що загвинчуються, пеніцилінові флакони, стерильні бакпечатки.

3.4.1. Підготовка флаконів проводиться у послідовності:

флакони мийть гарячою водою, використовуючи пральний порошок, тринатрій фосфат чи суміш трилону Б (чда) - 1 частину, гідроксид натрію - 2 частини та дистильовану воду - 10 л;

ретельно ополіскують спочатку проточною гарячою водою, потім дистильованою водою та залишають замоченими у дистильованій воді на ніч;

висушують у сушильній шафі (температура 110 град.С);

кип'ятять протягом 2 годин;

висушують;

закривають ватно-марлевими пробками;

обертають пергаментом;

витримують при температурі 110 град.С близько 2 годин;

готові флакони закривають чистими, стерильними пеніциліновими пробками, зверху - пластмасовими кришками з невеликим отвором,

через який вводять за допомогою голки і шприца необхідні компоненти.

3.4.2. Постановку та культивування культури клітин проводять у стерильному боксі. За умови відсутності боксу ці операції проводяться у звичайній чистій кімнаті, яку опромінюють бактерицидними настінними лампами ОБН-150 протягом 2 годин перед початком роботи.

3.4.3. Постановка культури лімфоцитів периферійної крові

У флакони вводять 0,5 мл крові та поживне середовище такого складу:

5 мл середовища 199 (Ерла, Ігла) або RPMI 1640;

1 мл інактивованої сироватки крові великої рогатої худоби або людини IV групи (сироватку інактивують у водяній бані при 56 град.С протягом 1 години);

0,01 мл ФГА "Р" або 0,1 мл ФГА "М" чи конканаваліну А;

антибіотики в концентрації 100 од. пеніциліну та 100 мкг стрептоміцину або 0,001мл гентаміцину на 1 мл середовища.

Суспензію перемішують, ставлять у термостат при температурі 37 град.С на 48 годин.

За дві години до зняття культури в кожен флакон вводять колхіцин у кінцевій концентрації 0,05 мкг/мл. Маточний розчин колхіцину готують на дистильованій воді (10 мг сухого колхіцину на 100 мл води) та зберігають при температурі 4 град.С 1-2 місяці. Для одержання препаратів, збагачених клітинами на стадіях ранньої мета- та прометафази, за 2 години до фіксації (можна одночасно з колхіцином) додають розчин етидіум броміду в кінцевій концентрації 5-10 мкг/мл. Починаючи з цього етапу, допускається проведення робіт у нестерильних умовах.

3.4.4. Зняття культури лімфоцитів периферійної крові і отримання препаратів метафазних хромосом

По завершенні культивування:

уміст флаконів зливають у центрифужні пробірки та центрифугують протягом 10-20 хв при 1000 об/хв (режим центрифугування при всіх наступних обробках такий самий);

надосадову рідину відсмоктують або обережно зливають;

осад струшують, у пробірку додають підігрітий до температури 37 град.С гіпотонічний розчин (0,5%) KCl;

клітинну суспензію ретельно перемішують, використовуючи пастерівську піпетку з гумовою грушею;

інкубують 10 хв при температурі 37 град.С;

центрифугують;

видаляють надосадову рідину;

клітинну суспензію фіксують у свіжоприготовленому та охолодженому фіксаторі (метиловий спирт, крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1);

зафіксовану суспензію клітин залишають у холодильнику при температурі 4 град.С на термін від 20 хвилин до 20 годин;

клітинну суспензію проводять ще через 2-3 зміни фіксатора;

отриману клітинну суспензію розчиняють невеликою кількістю свіжого фіксатора до бажаної густини;

носять 3-4 краплі клітинної суспензії на знежирене предметне скло, препарат підпалюють чи висушують гарячим струменем повітря.

Якість отриманого препарату оцінюють під мікроскопом. Розкиданість хромосом контролюють у затемненому полі мікроскопа. Якщо розкиданість хромосом недостатня, суспензію проводять ще через одну зміну фіксатора, змінивши співвідношення компонентів на 2:1 чи додають у пробірку кілька крапель оцтової кислоти.

3.5. Рутинне забарвлення препаратів хромосом проводять за допомогою барвників азуру та еозину. Обидва барвники готуються на дистильованій воді у вигляді 0,15% розчину і зберігаються у суліях з темного скла. Розчини готують заздалегідь, тому що "дозрілі" розчини ефективніші.

Безпосередньо перед забарвленням готують робочий розчин: змішують 6 частин 0,15% ("дозрілого") розчину еозину і 9 частин дистильованої води. Для фарбування можна використовувати готовий барвник Гімза та готовий азур-еозин, приготовлений за методом Романовського. На 0,5-1 мл вихідного барвника беруть 10 мл дистильованої води.

Фарбування препаратів хромосом проводять у такій послідовності: готовий барвник наносять на предметне скло або предметне скло поміщають у склянку з барвником і витримують протягом декількох хвилин. Інтенсивність забарвлення визначають під мікроскопом.

3.6. При візуальному аналізі клітин під мікроскопом виявляють великі хромосомні порушення - центричні злиття аутосом, тандемні злиття, химеризм клітин за статевими хромосомами.

Для встановлення наявності центричного злиття досить позитивного висновку за 5-10 метафазними платівками. Для встановлення наявності химеризму клітин за статевими хромосомами необхідно знайти 2 X-хромосоми у 10 метафазних платівках.

Для визначення номерів хромосом, що беруть участь у центричному злитті, проводять морфометричний аналіз на фотографічних відбитках. Вибирають метафазні пластинки з оптимальною спіралізацією хромосом і без накладень. Зображення хромосом вирізають і розклеюють попарно. На кількох метафазних пластинках вимірюють довжину кожної хромосоми та визначають її відносну довжину до сумарної довжини всього гаплоїдного жіночого (X-хромосома) набору хромосом.

При діагностиці лейкозу наявність у цитологічних препаратах короткочасних гемокультур мітозів, відсутніх у здорової великої рогатої худоби, є першою ознакою можливого захворювання тварин на лейкоз.

Аналіз клітин під мікроскопом починають проводити під малим збільшенням мікроскопа в 100 разів, за координатами препаратів визначають розташування метафаз. Потім їх аналізують під імерсійним збільшенням мікроскопа у 1000 разів і мікрофотографують.

#### 4. Реєстрація хромосомних порушень

Пофарбовані препарати починають аналізувати під збільшенням мікроскопа в 100-200 разів, при цьому проводять їх загальну оцінку (мітотичний індекс та якість метафазних платівок). Метафази краще знаходити та вибирати при невеликому збільшенні. При доборі метафазних платівок для перегляду їх виключають через непридатність для аналізу за умов:

хромосоми накладені одна на одну, що заважає ідентифікувати та підраховувати їх загальне число;

усі хромосоми не вміщуються в поле зору мікроскопа під збільшенням у 900-1000 разів;

хромосоми занадто довгі чи дуже вкорочені;

у полі зору відмічається декілька випадкових хромосом;

хромосоми нерівномірно профарбовані, погана якість метафазної

платівки тощо.

## 5. Класифікація порушень каріотипу

При аналізі рівня хромосомної нестабільності враховують структурні й кількісні порушення (геномні мутації) хромосомного апарату тварин.

5.1. Геномні мутації - порушення, пов'язані зі зміною числа хромосом у клітинах організму.

5.1.1. Синдром бичачого гіпогонадизму (синдром Клайнфельтера) - каріотип 61,XXY при регулярних формах; 60,XY/61,XXY; 60,XX/61,XXY тощо при мозаїчних формах. Синдром призводить до різкого зниження відтворних функцій бугаїв. Частота повторюваності не з'ясована.

5.1.2. Химеризм за статевими хромосомами (фримартинізм) - каріотип з різним співвідношенням клітинних клонів. Матки-фримартини безплідні, у плідників знижений рівень спермопродуктивності. Зустрічається за умови вагітності різностатеву двійнею.

5.1.3. Анеуплоїдія - геномна мутація, яка полягає в зміні числа хромосом, що є некратним гаплоїдному, представлена двома типами:

Гіперплоїдія - збільшення числа хромосом, різні типи полісомій (трисомії  $(2n+1)$ , подвійні трисомії  $(2n+1+1)$ , тетрасомії  $(2n,+2)$  тощо).

Розрізняють:

синдром трисомії за X-хромосомами - явище, коли в каріотипі замість двох визначаються три X-хромосоми;

синдром трисомії за аутосомами - явище, коли в каріотипі замість двох визначаються три соматичні хромосоми.

Гіпоплоїдія - зменшення числа хромосом, різні типи моносомій  $(2n-1, 2n-2)$  тощо). Якщо кількість гіпоплоїдних клітин  $(2n=36)$  чи  $(37)$  досить велика, необхідно ідентифікувати хромосоми, оскільки не виключена наявність транслокації.

5.1.4. Поліплоїдія - геномна мутація, яка полягає в збільшенні числа хромосом, що є кратним гаплоїдному. При аналізі поліплоїдних клітин необхідно:

відрізнити їх від накладень декількох метафазних платівок;

аналізувати спіралізацію та забарвлення хромосом (у поліплоїдній клітині всі хромосоми однаково забарвлені і спіралізовані);

ураховувати цілісність (округлість) метафазної пластинки та рівномірний розподіл у ній хромосом.

5.2. Структурні аберації хромосом - порушення, пов'язані зі зміною структури хромосом у клітинах організму. Виділяють дві основні групи хромосомних аберацій:

аберації хромосомного типу - виникають на стадії передсинтезу ДНК (фаза G<sub>1</sub>);

1

аберації хроматидного типу - виникають на стадії двох хроматид (фази S та G<sub>2</sub>).

2

Серед аберацій обох типів розрізняють прості й обмінні аберації. В їх основі лежать пошкодження однієї чи декількох хромосом, що призводять до порушення їхньої цілісності, безперервності з утворенням вільних чи зв'язаних з нею фрагментів

або до перекомбінації ділянок в одній і тій самій хромосомі, або до рекомбінації ділянок між декількома хромосомами.

Обмінні аберації різноманітні, класифікуються на внутрішньохромосомні та міжхромосомні.

Обміни аберації можуть поділятися на прості та складні виходячи в одних випадках з кількості залучених до обміну хромосом, в інших - з незвичайності і складності конфігурації, які беруть участь в обміні лише декількох хромосом з великим числом пошкоджень у них.

5.2.1. Аберації хромосомного типу - порушення структури хромосом, які відбуваються синхронно в обох хроматидах.

5.2.1.1. Парні фрагменти - кінцеві, такі, що відокремилися, ацентричні утворення, що являють собою спарені ділянки двох хроматид, які розташовуються паралельно одна одній. Парні ацентричні фрагменти не викликають ускладнень при розпізнаванні, варіюють за розмірами від дуже маленьких до дуже довгих паличкоподібних структур.

5.2.1.2. Ацентричні кільця - структури, що являють собою спарені ділянки хроматид у формі кільця і не містять центромір. Ацентричні кільця легко розпізнаються за умови гарної розкиданості хромосом на препараті.

Можливе розташування кілець:

обидва кільця лежать поруч (унаслідок взаємного тяжіння сестриних хроматид);

накладаються одне на одне, створюючи враження єдиної структури, яка має вигляд вісімки (частіше);

розташовуються боком, за цих умов для них характерна овальна структура та відсутність просвіту.

При делеціях невеликих ділянок хроматид ацентричні кільця мають вигляд спарених хроматидних кульок.

5.2.1.3. Центричні кільця (кільцеві хромосоми) - замкнуті структури, у яких інтерстиціальний фрагмент хромосоми замкнений у кільце. Кільцеві хромосоми чітко відрізняються від ацентричних кілець за наявністю не лише центроміри, але й парних фрагментів, що, як правило, супроводжують кільцеву хромосому. Нерідко за великої кількості пошкоджень можуть утворюватись кільцеві структури з двох, трьох і більше хромосом.

5.2.1.4. Транслокації бувають:

тандемні - ділянки двох пліч однієї хромосоми переміщуються на обидва плеча іншої хромосоми, описані в поодиноких випадках;

транслокації за Робертсонівським типом (центричні злиття) - дві хромосоми зливаються в ділянці центромір, утворюючи одну субметацентричну хромосому. Поширені серед різних видів тварин;

реципрокні транслокації - аберація, що виникає в результаті взаємного обміну між двома хромосомами дистальними ацентричними ділянками. Реципрокні транслокації відносять до симетричних обмінів. Якщо транслокації піддаються дистальні ділянки хромосом, рівні за довжиною, то такий обмін практично не можна виявити без застосування диференційного забарвлення.

5.2.1.5. Поліцентричні хромосоми - міжхромосомні обміни, що включають дві і більше центроміри. Усі вони є симетричними обмінами. Одним з видів, який часто зустрічається, є дицентричні хромосоми (дицентрики). Дицентричні хромосоми легко розпізнаються. Слід відрізнити їх від накладення однієї хроматиди на іншу. Необхідно пам'ятати, що дицентрична хромосома завжди супроводжується парним ацентричним фрагментом, зрідка - двома.

5.2.1.6. Розриви хромосом - зустрічаються рідко і лише в окремих тварин досягають рівня 5-10%.

5.2.1.7. Пробіли - наявність незабарвленої ділянки по довжині хроматиди. Механізми виникнення та селекційне значення не з'ясоване.

5.2.2. Аберації хроматидного типу - порушення структури хромосом, які відбуваються в одній з хроматид.

5.2.2.1. Поодинокі фрагменти - кінцеве пошкодження однієї хроматиди. На метафазах представлені поодинокими паличкоподібними структурами, які лежать поруч з гомологічною ділянкою непошкодженої хроматиди.

5.2.2.2. Інверсії - поворот ділянки хромосоми на 180 град., який викликає зміну послідовності генів у хромосомі. Передаються потомству, призводять до зниження відтворних функцій.

5.2.2.3. Обміни - перебудова хроматидного походження вкрай різноманітна. Можуть бути між хроматидами однієї, двох чи більше хромосом. Крім того, розрізняють повні та неповні чи симетричні та асиметричні обміни. Конфігурація хроматидних обмінів часто буває дуже складною, за цих умов для ідентифікації проводять каріотипування метафазної платівки.

Для визначення загального рівня хромосомної нестабільності достатня класифікація хроматидного обміну - простий чи складний.

5.2.2.4. Ізохроматидні пробіли (синоніми: щілини, гепи, ахроматичні пошкодження, фрагільні ділянки) - незабарвлені ділянки за довжиною хромосоми. Можуть бути поодинокі або подвійні в залежності від того, в одній чи в гомологічних ділянках двох хроматид вони перебувають.

Необхідно диференціювати пробіли від наявності поодиноких і парних фрагментів.

Фрагмент - фрагмент, зсунутий за довжиною, чи перевернутий або зсунутий з осі.

5.2.3. Пульверизація хромосом (синоніми: розпилення, фрагментація) - порушення цілісності структури всіх хромосом метафазної платівки, що призводить до їх повного руйнування (розпилення). Порушення зустрічається за умови вірусних інфекцій та після вакцинацій.

## 6. Оформлення результатів цитогенетичних досліджень

Результати цитогенетичних досліджень тварини заносяться до форми N 6-ГЕН "Протокол цитогенетичних досліджень" (додаток).

У формі вказують:

вид тварин - у графі "Вид тварин";

ідентифікаційний номер - у графі "Ідентифікаційний N";

марку і номер у Державній книзі племінних тварин (за наявності) - у графі "Марка і N у ДКПТ";

повну назву породи, до якої належить тварина, - у графі "Порода";

породність тварини - у графі "Породність";

кличку тварини - у графі "Кличка";

стать тварини - у графі "Стать";

число, місяць та рік народження тварини - у графі "Дата народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Місце народження";

назву господарства/власника та поштову адресу - у графі "Власник".

У розділі "Результати досліджень" зазначають:

номер препарата - у графі "Препарат N\_\_";

число досліджених метафаз - у графі "Число досліджених

метафаз";

відсоток аберантних клітин - у графі "Аберантні клітини, %";  
наявність клітин з асинхронним розходженням хромосом - у графі "Клітини з асинхронним розходженням хромосом, %";

наявність анеуплоїдних клітин, % - у графі "Анеуплоїди, %";

наявність поліплоїдних клітин, % - у графі "Поліплоїди, %";

наявність гаплоїдних клітин, % - у графі "Гаплоїди, %";

наявність клітин з розривами хромосом, % - у графі "Розриви хромосом, %";

наявність клітин з парними фрагментами, % - у графі "Парні фрагменти, %";

наявність клітин з розривами хроматид, % - у графі "Розриви хроматид, %";

наявність клітин з поодинокими фрагментами, % - у графі "Поодинокі фрагменти, %";

наявність клітин з кільцевими хромосомами, % - у графі "Кільцеві хромосоми, %";

наявність клітин з транслокаціями, % - у графі "Транслокації, %";

висновки щодо результатів цитогенетичних досліджень - у графі "Висновок".

У графі "Підприємство (лабораторія) генетичного контролю" зазначають повну назву підприємства (лабораторії) генетичного контролю, яке видає протокол.

Форма N 6-ГЕН підписується керівником підприємства (лабораторії) генетичного контролю та завіряється печаткою підприємства.

Начальник Департаменту ринків  
продукції тваринництва з Головною  
державною племінною інспекцією

Д.М.Микитюк

Додаток  
до розділу 6 Інструкції  
з проведення цитогенетичного  
контролю племінних тварин

Форма N 6-ГЕН

#### ПРОТОКОЛ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вид тварини \_\_\_\_\_

Ідентифікаційний N	Марка і N у ДКПТ	Порода	Породність
Кличка			Стать
Дата народження	Місце народження	Власник	

Результати досліджень:

Препарат N \_\_\_\_\_  
Число досліджених метафаз \_\_\_\_\_  
Аберантні клітини, % \_\_\_\_\_  
Клітини з асинхронним  
розходженням хромосом, % \_\_\_\_\_  
Анеуплоїди, % \_\_\_\_\_  
Поліплоїди, % \_\_\_\_\_  
Гаплоїди, % \_\_\_\_\_

Розриви хромосом, % \_\_\_\_\_  
Парні фрагменти, % \_\_\_\_\_  
Розриви хроматид, % \_\_\_\_\_  
Поодинокі фрагменти, % \_\_\_\_\_  
Кільцеві хромосоми, % \_\_\_\_\_  
Транслокації, % \_\_\_\_\_

Висновок:

---

---

---

Підприємство (лабораторія)  
генетичного контролю \_\_\_\_\_  
(повна назва підприємства, поштова адреса)

М.П.

Підпис \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)