

## О КАЧЕСТВЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА В ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С.В. РОТАНОВ, Н.В. ФРИГО, А.А. КУБАНОВ, Е.Л. ВАСИЛЬЕВА

### On quality of serological diagnostics of syphilis in dermatovenerological institutions of the Russian Federation

S.V. ROTANOV, N.V. FRIGO, A.A. KUBANOVA, YE.L. VASILYIEVA

Об авторах:

С.В. Ротанов — ведущий научный сотрудник отделения лабораторной диагностики сифилиса отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., доцент

Н.В. Фриго — главный научный сотрудник, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н.

А.А. Кубанов — заместитель директора по научной работе ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва, д.м.н., профессор

Е.Л. Васильева — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и болезней кожи ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», г. Москва

Приведены результаты цикла внешнего контроля качества серологических исследований для диагностики сифилитической инфекции, проведенного ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» в 2009 г. в 125 серологических лабораториях дерматовенерологических учреждений субъектов Российской Федерации. Оценено качество проведения серологических исследований (РМП, RPR, РПГА, РИФ и ИФА) четырех контрольных образцов сыворотки по формальным и существенным признакам. Процент неудовлетворительных результатов исследования набора контрольных сывороток в нетрепонемных тестах (РМП и RPR) составил по 10,9%; в трепонемных тестах: в ИФА — 1,4%, в РПГА — 1,2%, в РИФ — 0,9%. Наиболее значимые различия результатов были выявлены при исследовании контрольных образцов сыворотки с низким содержанием антител (слабоположительных), а также не содержащих антитела к возбудителю сифилиса.

*Ключевые слова:* сифилис, внешний контроль качества, серологические исследования.

The article presents the results of a cycle of external quality control of serological tests for diagnostics of the syphilitic infection conducted by FGU GNTsD Rosmedtekhnoyiy (State Research Center for Dermatology and Venereology of the Federal Agency for High-Technology Medical Aid) in 2009 in 125 serology laboratories of dermatovenerological institutions in different subjects of the Russian Federation. The authors evaluated the quality of serological tests (microprecipitation test, RPR, passive hemagglutination test, immunofluorescence test and immune-enzyme assay) of four reference serum samples based on formal and essential characteristics. The percentage of non-satisfactory results of studies for a set of reference serum samples in non-treponemal tests (microprecipitation test and RPR) was 10.9%; in treponemal tests: in immune-enzyme assay — 1.4%, in passive hemagglutination test — 1.2%, in immunofluorescence test — 0.9%. The most significant differences in the results were revealed in studies of reference serum samples with the low content of antibodies (weakly positive) as well as those that contained no antibodies to the syphilis causative agent.

*Key words:* syphilis, external quality control, serological tests.

Контроль качества диагностики инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), в том числе и сифилитической инфекции, является одним из важных разделов организационной работы по ограничению распространения ИППП в Российской Федерации [1, 2]. На повышение качества диагностики сифилиса были направлены мероприятия, предусмотренные федеральными целевыми программами «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002—2006 гг.)» и «Предупреждение

и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2011 гг.)» [3, 4]. Начиная с 2004 г. основным координатором выполнения мероприятий указанных программ является ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», где в течение 2002—2009 гг. проводилась и проводится исследовательская и научно-практическая работа по разработке и внедрению Системы внутрилабораторного и внешнего контроля качества серодиагностики сифилиса в Российской Федерации, методологии проведения контрольных мероприятий, стандартизации методов современных серологических исследований, созданию и регистрации необходимых для осуществления контроля качества лабораторной диагностики сифилиса контроль-

ных материалов. В период 2004—2008 гг. В серологических лабораториях дерматовенерологических учреждений субъектов Российской Федерации под руководством ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» были проведены 5 циклов внешнего контроля качества (ВКК<sub>сифилис</sub>), позволивших существенно расширить число участников внешнего контроля качества (с 31 лаборатории в 2004 г. до 125 — в 2009 г.) и внедрить в практику серологических лабораторий технологию внутрилабораторного контроля качества [5—9].

Целью настоящего исследования явилась оценка качества проведения серологических исследований, применяемых для диагностики сифилиса, в дерматовенерологических учреждениях Российской Федерации в 2009 г.

### Материал и методы

К участию в мероприятиях ВКК<sub>сифилис</sub> в 2009 г. были привлечены 148 дерматовенерологических учреждений здравоохранения 83 субъектов Российской Федерации.

Все участники контрольного цикла ВКК<sub>сифилис</sub> были обеспечены сборниками стандартных операционных процедур (СОП), включавших:

- описание стандартизованных процедур выполнения регламентированных серологических тестов для диагностики сифилитической инфекции;
- методологию осуществления внутрилабораторного контроля качества;
- методологию внешнего контроля качества, ВКК<sub>сифилис</sub>.

В 2009 г. для проведения ВКК<sub>сифилис</sub> были применены 4 контрольных образца сыворотки из состава набора реагентов «ЭП СИФИЛИС», разрешенного к применению в учреждениях здравоохранения Российской Федерации [10]: две из них, образцы С-1 и С-2, не содержали антител к возбудителю сифилиса *T. pallidum*, образец контрольной сыворотки С-3 содержал антитела к *T. pallidum* в низкой, а С-4 — в высокой концентрации. При этом образцы С-1 и С-2 представляли собою идентичные сыворотки; их применение в составе контрольного задания было направлено на оценку качества диагностических исследований по параметру внутрисерийной аналитической сходимости.

Контрольные образцы сыворотки и необходимые сопроводительные информационные материалы (письма к руководителям учреждений, инструкции по проведению контрольных исследований, бланки протоколов для внесения результатов исследований) были направлены в серологические лаборатории в виде почтовых бандеролей.

В соответствии с требованиями ВКК<sub>сифилис</sub> исследование контрольных образцов сыворотки (контрольное задание) рекомендовалось провести в течение 7 дней не менее чем в трех регламентированных тестах для серодиагностики сифилиса. В число

контролируемых тестов были включены реакции: микропреципитации (РМП), быстрого определения реакинов плазмы (RPR), пассивной гемагглютинации (РПА), иммунофлюоресценции (РИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА) с определением антител к бледной трепонеме класса IgG (ИФА<sub>IgG</sub>) или IgM и IgG суммарно (ИФА<sub>IgM+IgG</sub>).

При осуществлении оценки качества выполнения серологических исследований в региональных лабораториях использовались два вида критериев:

- формальные критерии оценки качества выполнения исследований, которые оценивались по двум показателям: оперативности (все исследования было необходимо выполнить в течение 7 дней) и полноте или комплексности выполнения контрольного задания (исследование контрольных материалов было необходимо провести не менее чем в трех регламентированных тестах на сифилис);
- существенным (неформальным) критерием качества выполнения контрольного задания цикла ВКК<sub>сифилис</sub> являлось совпадение результатов тестирования контрольных материалов, проведенного в контролируемой лаборатории, с их аттестационными характеристиками, полученными в контролирующей лаборатории ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий». Качество исследования оценивалось как неудовлетворительное при несовпадении результатов тестирования контрольных материалов в контролируемой и контролирующей лабораториях. При определении титров антител допустимым считалось отклонение положительного результата исследования контрольного материала на одно разведение в большую или в меньшую сторону.

### Результаты исследования

Помимо дерматовенерологических учреждений субъектов Российской Федерации, участвовавших в циклах ВКК<sub>сифилис</sub> в 2007—2008 гг., при организации контрольных мероприятий в 2009 г. в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» был проведен отбор 65 новых участников, которые по уровню своего ресурсного и кадрового обеспечения соответствовали требованиям, предъявляемым к лабораториям, осуществляющим серодиагностику сифилиса [11]. Сведения о лабораториях дерматовенерологических учреждений, вновь включенных в ВКК<sub>сифилис</sub>, были получены из информационной базы данных «Лечебно-профилактические учреждения субъектов Российской Федерации, осуществляющие серологические исследования с целью диагностики сифилитической инфекции», разработанной в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» [12].

Протоколы с результатами проведенных исследований были предоставлены в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий» 125 (84,5%) из 148 серологических лабораторий семи федеральных округов Российской

Федерации в виде почтовых (109; 87,2%), электронных (12; 9,6%) или факсимильных (4; 3,2%) отправок.

В числе 125 дерматовенерологических учреждений, в лабораториях которых были проведены исследования контрольных материалов в цикле ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г., были представлены: 3 научно-исследовательских учреждения, 18 республиканских, 7 краевых, 7 автономных окружных, 42 областных и 48 городских кожно-венерологических диспансеров.

Сведения об участии серологических лабораторий разных федеральных округов (ФО) Российской Федерации в контрольном цикле ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г. представлены на рис. 1. Наибольшую активность по участию в контрольных мероприятиях проявили лаборатории дерматовенерологических учреждений Сибирского ФО (95,0%) и Северо-Западного ФО (93,3%), наименьшую — Уральского ФО (66,7%) и Южного ФО (76,7%).

#### Оценка результатов ВКК<sub>сифилис</sub> по формальным критериям

Предложенные сроки проведения контрольных исследований нарушили 9 (7,2%) из 125 серологических лабораторий, при этом задержки в отправлении протоколов с результатами проведенных исследований составляли от 8 до 20 дней. Качество проведения исследований по критерию оперативности в этих лабораториях было оценено как неудовлетворительное. Недостаточно оперативно представили информацию о полученных результатах 5 лабораторий Центрального ФО, одна — Северо-Западного ФО, одна — Южного ФО и две — Сибирского ФО.

Нарушение сроков выполнения контрольного задания свидетельствовало о существенных проблемах с оказанием медицинской помощи населению в данных лабораториях и возможности необоснованно длительного проведения исследований на сифилис при обследовании пациентов.

В 5 (4,0%) из 125 лабораторий не было обеспечено комплексное (полное) исследование контрольных сывороток, что привело к неудовлетворительной оценке их участия в цикле ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г. по критерию полноты (комплексности) выполнения контрольного задания. По данному критерию неудовлетворительную оценку проведения исследований получили лаборатории Центрального ФО, Северо-Западного ФО и Дальневосточного ФО (по одной лаборатории) и две лаборатории Южного ФО. Неудовлетворительное выполнение требований ВКК<sub>сифилис</sub> в данных лабораториях свидетельствовало об отсутствии в них условий для комплексности диагностики сифилитической инфекции, которая подразумевает одновременное выявление антител к разным антигенам *T. pallidum* и способствует установлению точного диагноза.

#### Оценка результатов ВКК<sub>сифилис</sub> по существенным (неформальным) критериям

В результате анализа предоставленных из контролируемых лабораторий сведений было установлено, что процент неудовлетворительных результатов тестирования контрольных материалов в РМП в среднем по Российской Федерации составил 10,9% (см. табл.). Наибольшее количество неудовлетворительных результатов в РМП было получено из лабораторий Северо-Западного ФО (18,8%), Южного ФО



Рис. 1. Участие клиничко-диагностических лабораторий дерматовенерологических учреждений семи федеральных округов Российской Федерации в цикле ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г.

Таблица

Количество лабораторий, показавших неудовлетворительные результаты исследования контрольных материалов в цикле ВКК<sub>сифилис</sub> в 2009 году

Регион	РМП ( <i>n</i> = 112)	RPR ( <i>n</i> = 16)	РПГА ( <i>n</i> = 104)	ИФА ( <i>n</i> = 111)	РИФ ( <i>n</i> = 55)
РФ в целом	10,9	10,9	1,2	0,7	0,9
Центральный ФО	6,8	16,7	0	0	0
Северо-Западный ФО	18,8	0	7,7	0	0
Южный ФО	15,0	7,3	1,6	4,7	12,5
Приволжский ФО	5,7	15,0	0	3,0	0
Уральский ФО	12,5	18,3	0	0	0
Северный ФО	10,5	25,0	0	0	0
Дальневосточный ФО	13,6	—	0	0	0

Примечание. Исследования не проводили; *n* — число участников цикла.

(15,0%), Дальневосточного ФО (13,6%), Уральского ФО (12,5%) и Сибирского ФО (10,5%); наименьшее — от лабораторий Приволжского ФО (5,7%) и Центрального ФО (6,8%).

Количество неудовлетворительных ответов в RPR по Российской Федерации в целом составило 10,9% (см. табл.); при этом наибольшее число неудовлетворительных результатов было получено из лабораторий Сибирского ФО (25,0%), Уральского ФО (18,3%), Центрального ФО (16,7%) и Приволжского ФО (15,0%). Лаборатории Южного ФО предоставили 7,3% неудовлетворительных результатов, а из лабораторий Северо-Западного ФО неудовлетворительных результатов получено не было. В лабораториях Дальневосточного ФО методику RPR для исследования контрольных материалов в цикле ВКК<sub>сифилис</sub> не применяли.

Наибольшее количество (50—65%) неудовлетворительных результатов нетрепонежных тестов в контролируемых лабораториях было получено при исследовании контрольной сыворотки С-3, содержащей реактивные антитела в низкой концентрации; при этом результаты с меньшими значениями титра (в сравнении с аттестованными характеристиками сыворотки С-3) составили 55—60% ошибок, с более высокими значениями титра — 40—45% ошибок. Значительная часть ошибочных результатов в РМП и RPR (30—35%) была связана с «гипердиагностикой» и получением ложноположительных результатов с контрольными материалами С-1 и С-2, не содержащими антител к *T. pallidum*. Расхождения в оценке титров реактивных антител в контрольном материале С-4 (с высоким уровнем антител к *T. pallidum*) наблюдали реже (в 8—10% случаев).

Анализ частоты использования наборов реагентов для постановки реактивных тестов (РМП) показал, что наиболее часто для этой цели приме-

нялись наборы НПО «Микроген» (Москва) — в 42% и ЗАО «ЭКОлаб» (Электрогорск) — в 32% случаев, реже — наборы ЗАТ «БИОЛЕК» (Харьков, Украина) — в 6% и НПО «Диагностические системы» (Н. Новгород) — в 10% случаев. Данные о производителе диагностикума не были указаны в 10% случаев.

Таким образом, по данным цикла ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г., процент правильных ответов при постановке РМП и RPR — наиболее часто применяемых тестов для определения реактивных антител при серодиагностике сифилиса — составил по каждому тесту 89,1%; процент неудовлетворительных результатов соответственно по 10,9%.

Получение столь высокого (10,9%) процента неудовлетворительных результатов свидетельствует о существенных проблемах качества серологической диагностики сифилиса, связанных с использованием в лабораториях нетрепонежных тестов, приводящих к гипердиагностике либо невыявлению больных с сифилитической инфекцией. Эти проблемы могут быть связаны как с ошибками, допускаемыми на преаналитической, аналитической и постаналитической стадиях лабораторной диагностики, так и с недостаточно высоким качеством выпускаемых производителями наборов реагентов. Меры по исправлению сложившейся ситуации и улучшению качества диагностики сифилиса с применением нетрепонежных тестов должны быть направлены на создание в лечебно-диагностических учреждениях систем менеджмента качества, обеспечивающих оптимизацию взаимодействия сотрудников лабораторий и лечебных подразделений, развитие внутрилабораторного контроля качества, а также повышение чувствительности и специфичности выпускаемых производителями наборов реагентов. Одной из мер повышения качества выполнения нетрепонежных тестов может также являться проводимый на регу-

лярной основе внешний контроль качества серодиагностики сифилиса с применением расширенного спектра контрольных материалов и постоянным усложнением контрольных заданий.

Исследование контрольных материалов в ИФА было осуществлено в подавляющем большинстве серологических лабораторий (в 111 (91,0%) из 125). Указанный метод в настоящее время является наиболее широко используемым трепонемным тестом для диагностики сифилиса, так как многие этапы его проведения автоматизированы, методика выполнения стандартизована и для выполнения исследования имеется большой выбор наборов реагентов, разрешенных к применению.

При выполнении ИФА в рамках ВКК<sub>сифилис</sub> в целом по Российской Федерации было получено наименьшее количество неудовлетворительных результатов исследования контрольных материалов — 0,7%; при этом все неудовлетворительные результаты касались образцов, не содержащих антител к *T. pallidum*, и являлись ложноположительными, что могло быть обусловлено низкой специфичностью используемых тест-систем для ИФА-диагностики сифилиса. Неудовлетворительные результаты в ИФА в цикле 2009 г. были получены только в серологических лабораториях Южного ФО (4,7%) и Приволжского ФО (3,0%).

Одним из стандартизуемых тестов для выявления антител к *T. pallidum* является РПГА, для ее выполнения не требуется специальное измерительное оборудование. Количество неудовлетворительных результатов РПГА в целом по Российской Федерации по данному циклу ВКК<sub>сифилис</sub> составило 1,2% (см. таблицу). Подавляющая часть неудовлетворительных результатов была обусловлена несовпадением титров антитрепонемных антител с аттестованными данными в контрольных материалах, содержащих антитела к *T. pallidum* в низкой (С-3) и высокой (С-4) концентрации.

Неудовлетворительные результаты РПГА в цикле 2009 г. были получены только в серологических лабораториях Северо-Западного ФО (7,7%) и Южного ФО (1,6%).

При оценке качества выполнения РИФ в серологических лабораториях Российской Федерации в ходе проведения цикла ВКК<sub>сифилис</sub> было получено 0,9% результатов, не удовлетворявших критериям качества. Структура неудовлетворительных результатов РИФ включала ложноположительные результаты, полученные с образцами контрольных материалов, не содержащими антител к *T. pallidum*, и результаты с более низкой позитивностью (оцениваемой в условиях плюсах) по сравнению в аттестованными характеристиками в образце С-3, содержавшем антитела к *T. pallidum* в низкой концентрации. Неудовлетворительные результаты РИФ были получены только из лабораторий Южного ФО (12%).

Таким образом, как показали результаты ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г., при исследовании контрольных материалов в трепонемных тестах было допущено значительно меньшее число ошибок (в РИФ — 0,9%; в РПГА — 1,2%; в ИФА — 0,7%), чем в нетрепонемных тестах (по 10,9% в РМП и RPR). Данное обстоятельство свидетельствует о необходимости широкого использования этих методов диагностики (в особенности ИФА и РПГА) как для скрининга, так и для подтверждения наличия сифилитической инфекции.

### Выводы

1. Развитие Системы контроля качества серологических исследований для диагностики сифилитической инфекции, разработанной и реализуемой ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий», позволило при проведении цикла ВКК<sub>сифилис</sub> в 2009 г. оценить качество диагностических исследований в 125 серологических лабораториях дерматовенерологических учреждений Российской Федерации.

2. По формальным критериям оценки качества работы серологических лабораторий (показатели оперативности предоставления данных и комплексности проведения серологических исследований) контрольное задание выполнили соответственно 116 (92,8%) и 120 (96,0%) лабораторий и не выполнили 9 (7,2%) и 5 (4,0%) лабораторий дерматовенерологических учреждений. Нарушение сроков выполнения контрольного задания и принципа комплексности серологических исследований на сифилис свидетельствует о существенных проблемах с оказанием медицинской помощи большим сифилисом в данных учреждениях.

3. По итогам проведения цикла ВКК<sub>сифилис</sub> 2009 г. в серологических лабораториях дерматовенерологических учреждений субъектов Российской Федерации:

- установлен высокий (10,9%) процент неудовлетворительных результатов нетрепонемных тестов (РМП, RPR), обусловленный преимущественно тестированием контрольных материалов с низким уровнем антител к *T. pallidum* и контрольных материалов, не содержащих антител к *T. pallidum*, что может быть связано с низкой чувствительностью и специфичностью выпускаемых диагностикумов и ошибками, допускаемыми на преаналитическом и аналитическом этапах исследования;
- процент неудовлетворительных результатов трепонемных тестов был значительно ниже, чем при постановке нетрепонемных тестов (в РИФ, РПГА и ИФА соответственно 0,9, 1,2% и 0,7% неудовлетворительных результатов), что свидетельствует о необходимости широкого использования этих методов (в особенности ИФА и РПГА) как для скрининга, так и для подтверждения диагноза сифилитической инфекции.

4. Меры по повышению качества серодиагностики сифилиса должны быть направлены на:

- создание систем менеджмента качества в лечебно-диагностических учреждениях здравоохранения, осуществляющих исследования с целью диагностики сифилиса;
- повышение чувствительности и специфичности выпускаемых промышленных наборов реагентов для серологических исследований на сифилис;
- разработку разрешенных к применению расширенных панелей контрольных материалов, позволяющих усложнять контрольные задания в циклах ВКК<sub>сифилис</sub> и ставить перед лабораториями новые задачи, направленные на повышение качества серологических исследований для диагностики сифилиса.

#### Литература

1. Приказ Минздрава Российской Федерации № 87 от 26 марта 2001 г. «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».
2. Приказ Минздрава РФ № 291 от 30 июля 2001 г. «О мерах по предупреждению распространения инфекций, передаваемых половым путем».
3. Подпрограмма «О мерах по предупреждению дальнейшего распространения заболеваний, передаваемых половым путем» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002—2006 гг.)». Утверждена Постановлением Правительства Российской Федерации от 13 ноября 2001 г. № 790.
4. Подпрограмма «Инфекции, передаваемые половым путем» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2011 гг.)». Утверждена Постановлением Правительства Российской Федерации от 10 мая 2007 г. № 280.
5. Ротанов С.В. Разработка и опыт проведения внешнего контроля качества серологических исследований для диагностики сифилиса в дерматовенерологических учреждениях Российской Федерации. Вестн. дерматол., 2007; 3: 22—26.
6. К оценке качества серологических исследований в диагностике сифилиса. Росс. журн. кожн. венерич. болезней, 2008; 1: 52—56.
7. Ротанов С.В. Мероприятия внешнего контроля качества серологических исследований, направленных на серодиагностику сифилиса. Вестн. дерматол., 2008; 4: 9—16.
8. Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В и др. Опыт организации системы контроля качества серологических исследований для диагностики сифилиса в Российской Федерации. Вестн. дерматол., 2009; 4: 27—34.
9. Ротанов С.В., Фриго Н.В., Лесная И.Н. Ресурсное обеспечение и качество диагностики сифилиса в дерматовенерологических учреждениях Российской Федерации. Росс. журн. кожн. венерич. болезней, 2009; 5: 44—49.
10. Изделие медицинского назначения — Набор реагентов «Экспертная панель контрольных сывороток для серодиагностики сифилиса «ЭП СИФИЛИС» по Техническим условиям ТУ 9398-001-01897647-2007 производства ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий». Разрешен к применению Приказом Росздравнадзора № 2797-Пр/07 от 18 сентября 2007 г.; РУ № ФСР-2007/00695.
11. Кубанова А.А. и др. Стандартные требования к организации деятельности лабораторий, осуществляющих диагностику ИППП. Изд. 2-е, исправленное и дополненное. М.: ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития России», 2008.
12. База данных «Лечебно-профилактические учреждения субъектов Российской Федерации, осуществляющие серологические исследования с целью диагностики сифилитической инфекции». Авторы: Кубанова А.А., Ротанов С.В., Фриго Н.В. и др. Регистрационный № 2009620269 от 18 мая 2009 г. по заявке № 2009620152 от 27.03.2009.