ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 70296— 2022

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Метод полуколичественной оценки содержания ДНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади в мясной продукции, в том числе из мяса птицы

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 августа 2022 г. № 794-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения, сокращения и обозначения 2
4 Условия выполнения испытаний и требования безопасности 3
5 Средства измерений, оборудование, реактивы и материалы 3
6 Сущность метода 5
7 Отбор и подготовка проб 5
8 Выделение ДНК 5
9 Приготовление калибровочных стандартных образцов 5
10 Постановка ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени . . . 6
11 Анализ и интерпретация результатов исследования 10
Библиография 15

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Метод полуколичественной оценки содержания ДНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади в мясной продукции, в том числе из мяса птицы

Food products. The method for semi-quantitative assessment of the content of chicken, bovine, pig, horse DNA in meat products, including poultry

Дата введения — 2022—12—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на мясную продукцию, в том числе из мяса птицы (мясо, мясо птицы, сырье для производства мясной продукции на всех этапах переработки, колбасные и кулинарные изделия, полуфабрикаты), в том числе подвергавшуюся термической обработке, и устанавливает метод полуколичественной оценки содержания ДНК кур (*Gallus gallus*), быка домашнего (*Bos taurus*), свиньи (*Sus scrofa*), лошади (*Equus caballus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц с использованием полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Стандарт не распространяется на консервированную продукцию и не предназначен для качественного выявления видоспецифичной ДНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади. Исследование в соответствии с настоящим стандартом проводится только после подтверждения наличия ДНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади в исследуемом образце с использованием качественных методов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 7702.2.0 Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям

ГОСТ 26678 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 30363 Продукты яичные жидкие и сухие пищевые. Технические условия

ГОСТ 31719 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

ГОСТ 31985 Услуги общественного питания. Термины и определения

ГОСТ 32951 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия

ГОСТ 33102 Продукция мясной промышленности. Классификация

Издание официальное

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 52427 Промышленность мясная. Продукты пищевые. Термины и определения

ГОСТ Р 52833 (ИСО 22174:2005) Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

ГОСТ Р 58144 Вода дистиллированная. Технические условия

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если изменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения, сокращения и обозначения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52833, ГОСТ 7702.2.0, ГОСТ 33102, ГОСТ 32951, ГОСТ Р 52427, ГОСТ 31985, ГОСТ 31719 и ГОСТ 30363, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **адрес ячейки:** Буквенно-цифровой код, который определяется именем столбца и номером строки, на пересечении которых находится ячейка электронной таблицы.

3.1.2 **амплификация ДНК:** Процесс, многократно увеличивающий число копий фрагмента ДНК, например, участка генома какого-либо организма.

3.1.3 **анализируемая проба** (**проба для анализа):** Проба, подготовленная для проведения испытаний или анализа, которую полностью и единовременно используют для проведения испытания или анализа.

3.1.4 **встроенная функция:** Заранее написанная процедура преобразования данных в электронной таблице.

3.1.5 **диапазон ячеек:** Группа последовательно расположенных ячеек.

3.1.6 **ДНК-зонд для ПЦР в режиме реального времени:** Олигонуклеотид, меченный флуоресцентным красителем и использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК.

3.1.7 **ДНК-полимераза:** Термостабильный фермент (ДНК-зависимая ДНК-полимераза), катализирующий синтез ДНК на ДНК-матрице.

3.1.8 **коэффициент вариации *RSD*:** Отношение стандартного отклонения к среднему значению, показывающее степень изменчивости по отношению к среднему показателю выборки.

3.1.9 **коэффициент корреляции Пирсона R^2:** Значение, характеризующее существование линейной зависимости между двумя величинами.

Примечание — Коэффициент корреляции Пирсона может принимать значения от 0 до 1. При наличии линейной зависимости коэффициент стремится к единице.

3.1.10 **лабораторная проба:** Проба, предназначенная для лабораторных исследований или испытаний.

3.1.11 **мастермикс:** Смесь реагентов, необходимых для амплификации ДНК в ПЦР, включающая специфические праймеры и дНТФ.

3.1.12 **нуклеотидная последовательность:** Порядок чередования нуклеотидных остатков в ДНК.

3.1.13 **отрицательный контроль ПЦР (К-):** Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо не содержащая целевой нуклеиновый материал.

3.1.14 **полимеразная цепная реакция;** ПЦР: Циклический ферментативный синтез ДНК, позволяющий амплифицировать фрагмент ДНК *in vitro*.

3.1.15 **положительный контроль ПЦР (К+):** Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо содержащая целевой нуклеиновый материал (положительный контрольный образец).

3.1.16 **смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;** дНТФ: Раствор, содержащий дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксицитидинтрифосфат, дезоксигуанинтрифосфат, дезокситимидинтрифосфат, являющиеся «строительными блоками» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

3.1.17 **специфичность:** Способность применяемого метода распознавать исключительно целевую последовательность и отличать ее от сходных последовательностей и загрязняющих примесей.

3.1.18 **среднеквадратичное отклонение;** СКО: Статистический показатель, характеризующий разброс измеряемых значений вокруг среднего значения.

3.1.19 **электронная таблица:** Компьютерная программа, позволяющая проводить вычисления с данными, представленными в виде двумерных массивов.

3.1.20 **ячейка электронной таблицы:** Область, определяемая пересечением столбца и строки электронной таблицы, имеющая свой уникальный адрес.

3.2 В настоящем стандарте применены следующие сокращения и обозначения:

ВК — внутренний контроль;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

п. н. — пара нуклеотидов;

Ct — значение порогового цикла ПЦР, т. е. значение цикла амплификации, на котором флуоресценция от расщепленного зонда превысила значение фоновой флуоресценции;

dCt — разница значений пороговых циклов *Ct* для видоспецифичной последовательности и внутреннего контроля;

LG(%) — десятичный логарифм значения процентного содержания ДНК животного в пробе.

4 Условия выполнения испытаний и требования безопасности

4.1 Общие требования, предъявляемые к компетентности испытательной лаборатории и проведению испытаний — по ГОСТ ISO/IEC 17025.

Общие требования и организация работы лаборатории, использующей методы амплификации ДНК для молекулярно-генетических испытаний, устройство и оснащение лаборатории — по [1].

4.2 Общие требования к персоналу лаборатории — по ГОСТ ISO/IEC 17025 и [1]. Персонал должен знать правила работы в лаборатории, использующей методы амплификации ДНК, санитарно-гигиенические нормы, правила охраны труда, пожарной и электробезопасности. Персонал, выполняющий испытания, должен владеть методами выделения ДНК, ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

4.3 При работе с электроустановками следует соблюдать требования электробезопасности, установленные в ГОСТ 12.1.019.

4.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004, быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5 Средства измерений, оборудование, реактивы и материалы

При проведении испытаний оборудование следует обслуживать в соответствии с инструкциями производителя и требованиями ГОСТ ISO/IEC 17025.

5.1 Для проведения испытаний применяют следующие средства измерений и оборудование:

- амплификатор для проведения ПЦР в режиме реального времени[1)];
- набор автоматических дозаторов одноканальных лабораторных по ГОСТ 28311 с варьируемыми объемами доз;
- термостат твердотельный с диапазоном температур от 25 °С до 100 °С для микропробирок;
- флуориметр или спектрофотометр для измерения концентрации ДНК[2)];

---

1) Примером подходящего оборудования может служить амплификатор Rotor-Gene Q (Qiagen Германия) или Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd. Австралия). Данная информация не является рекламой и рекомендована для удобства пользователей настоящего стандарта.

2) Примером подходящего оборудования может служить анализатор NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) или флуориметр Quantus (Promega, США). Данная информация не является рекламой и рекомендована для удобства пользователей настоящего стандарта.

- бокс ламинарный с вертикальным потоком воздуха класса защиты II типа А со встроенной бактерицидной лампой для выделения ДНК;
- ПЦР-бокс со встроенной бактерицидной лампой;
- микроцентрифуга-встряхиватель (вортекс) с ротором для микропробирок, скоростью вращения не менее 2400 об/мин и максимальным ускорением до 700 g;
- микроцентрифуга с угловым ротором со скоростью вращения до 14 800 об/мин, максимальным ускорением 21 100 g;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой;
- холодильник бытовой по ГОСТ 26678, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры не выше минус 16 °С.

5.2 Для проведения испытаний применяют следующие реактивы:
- набор реагентов для выделения ДНК сорбционным методом[1)];
- вода деионизованная для молекулярной биологии класса чистоты I, свободная от РНКаз, ДНКаз;
- растворы олигонуклеотидов и зондов, меченых флуоресцентными красителями, с молярной концентрацией 100 мкмоль/дм^3, позволяющие амплифицировать соответствующие фрагменты генов млекопитающих и птиц;
- смесь дНТФ (концентрация каждого нуклеотида 25 мМ или концентрация каждого нуклеотида 10 мМ);
- Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активность фермента антителами[2)];
- ПЦР-буфер для Taq ДНК-полимеразы;
- ТЕ-буфер;
- раствор плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент гена *Rarres1,* видоспецифичный для кур[3)];
- раствор плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент гена *RPL6,* видоспецифичный для быка домашнего;
- раствор плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент гена *Pop1,* видоспецифичный для свиньи;
- раствор плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент гена *RPS6,* видоспецифичный для лошади;
- раствор плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент геномного элемента *VE1800,* консервативного у птиц и млекопитающих;
- дезинфицирующее средство для обработки рабочего места по [1];
- спирт этиловый 96 % ректификованный по ГОСТ 5962;
- вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144.

5.3 Для проведения испытаний применяют следующие материалы:
- пробирки одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся, вместимостью 0,6 и 1,5 см^3;
- тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой вместимостью 0,2 см^3;
- наконечники одноразовые универсальные с фильтром и без фильтра для автоматических дозаторов с варьируемыми объемами доз;
- штативы пластиковые для пробирок и наконечников разного объема;
- перчатки одноразовые латексные или нитриловые без пудры;
- пластиковые контейнеры для сбора и дезинфицирующей обработки расходных материалов, перчаток и ветоши, емкости для сброса наконечников.

5.4 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования, материалов и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных.

5.5 Допускается использование готовых наборов реагентов или тест-систем для полуколичественной оценки содержания ДНК методом ПЦР в режиме реального времени, основанных на сравнении количества ДНК целевого животного и ДНК птиц и млекопитающих.

[1)] Примером может служить набор «Сорб-ГМО-Б» (Синтол, Россия), или «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) или «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» (ВЕТ ФАКТОР, Россия). Данная информация не является рекламой и рекомендована для удобства пользователей настоящего стандарта.

[2)] Примером может служить «SynTaq ДНК-полимераза» (Синтол, Россия) Данная информация не является рекламой и рекомендована для удобства пользователей настоящего стандарта.

[3)] Примером может служить типовой плазмидный вектор с клонированным фрагментом соответствующего гена, произведенный в биотехнологической компании.

6 Сущность метода

6.1 Сущность метода заключается в применении ПЦР в режиме реального времени для сравнения количества ДНК животного (кур, быка домашнего, свиньи, лошади) и ДНК, которым служит высококонсервативный у птиц и млекопитающих участок генома (геномный элемент *VE1800*). Оба участка геномной ДНК детектируют в одной пробирке в двух независимых ПЦР с использованием специфичных праймеров и зондов, меченых разными флуоресцентными красителями.

6.2 Параллельно с анализируемой пробой проводят ПЦР с тремя калибровочными стандартными образцами, которые представляют собой смеси рекомбинантных плазмид с участком соответствующего видоспецифичного гена (*Rarres1*, *RPL6*, *Pop1* или *RPS6*) и элемента *VE1800.* В калибровочных стандартных образцах 10,0 %, 1,0 % и 0,1 % содержание плазмиды с соответствующим участком видоспецифичного гена составляет 10,0 %, 1,0 % и 0,1 % от количества плазмиды с участком элемента *VE1800* соответственно. На основании разницы значений *Ct* для видоспецифичной последовательности (кур, быка домашнего, свиньи, лошади) и ВК (млекопитающие и птицы) калибровочных стандартных образцов рассчитывают относительное содержание ДНК искомого животного (% ДНК) в анализируемых пробах при помощи электронной таблицы.

6.3 Испытание состоит из следующих этапов:

- выделение и очистка ДНК;
- мультиплексная ПЦР с использованием специфических праймеров и зондов, меченных флуоресцентным красителем;
- анализ и интерпретация результатов испытаний.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб проводят в соответствии с нормативными документами, устанавливающими порядок отбора проб для конкретных групп мясной продукции, в том числе из мяса птицы.

7.2 Подготовку анализируемой пробы проводят в соответствии с ГОСТ 31719. Анализируемые пробы в закрытых пробирках передают на выделение ДНК.

8 Выделение ДНК

Выделение ДНК из анализируемой пробы проводят набором реагентов для выделения ДНК сорбционным методом по 5.2 в соответствии с инструкцией к набору.

9 Приготовление калибровочных стандартных образцов

9.1 Для предотвращения контаминации концентрированные растворы плазмидной ДНК по 5.2 разводят в 10 раз. В предварительно промаркированные одноразовые пробирки вместимостью 1,5 см^3 добавляют по 9 мм^3 ТЕ-буфера, затем вносят по 1 мм^3 соответствующего раствора плазмидной ДНК. Далее измеряют концентрацию плазмидной ДНК в нг/мкл на спектрофотометре по 5.1. Проводят расчет числа копий плазмид N в растворе по формуле

$$N = \frac{\text{количество ДНК} \cdot 6{,}022 \cdot 10^{23}}{\text{размер плазмиды} \cdot 10^{9} \cdot 650}, \quad (1)$$

где количество ДНК — масса ДНК в растворе, выраженная в нг;

размер плазмиды — сумма длины вектора и длины клонированного фрагмента в п. н.

9.2 Используя расчетное значение числа копий плазмиды в растворе, каждый раствор плазмидной ДНК в отдельности доводят ТЕ-буфером до одинаковой концентрации $X \cdot 10^6$ копий в мм^3, где X — одно и то же число для всех плазмид.

9.3 Для приготовления стандартных калибровочных образцов готовят десятикратные серийные разведения растворов плазмидной ДНК, содержащие соответствующие клонированные фрагменты видоспецифичных генов (*Rarres1*, *RPL6*, *Pop1* или *RPS6*). Для каждого фрагмента ДНК в отдельности готовят серию из трех растворов с концентрациями $X \cdot 10^5$, $X \cdot 10^4$ и $X \cdot 10^3$ копий в мм^3.

9.4 В предварительно промаркированные три одноразовые пробирки вместимостью 1,5 $см^3$ добавляют по 90 $мм^3$ ТЕ-буфера. Для приготовления раствора с концентрацией $X \cdot 10^5$ копий в $мм^3$ в первую пробирку добавляют 10 $мм^3$ соответствующего раствора плазмидной ДНК с концентрацией $X \cdot 10^6$ копий в $мм^3$ и перемешивают на вортексе в течение нескольких секунд.

9.5 Осаждают капли с крышки первой пробирки кратким центрифугированием, отбирают из нее 10 $мм^3$ раствора плазмидной ДНК и переносят во вторую пробирку, перемешивают содержимое пробирки на вортексе в течение нескольких секунд. Вторая пробирка в результате содержит $X \cdot 10^4$ копий плазмиды фрагмента ДНК в $мм^3$.

9.6 Осаждают капли с крышки второй пробирки кратким центрифугированием, отбирают из нее 10 $мм^3$ раствора плазмидной ДНК и переносят в третью пробирку. Перемешивают содержимое пробирки на вортексе в течение нескольких секунд. Третья пробирка в итоге содержит $X \cdot 10^3$ копий плазмиды фрагмента ДНК в $мм^3$.

9.7 Для приготовления калибровочных стандартных образцов с 10,0 %, 1,0 % и 0,1 % содержанием плазмиды соответствующего видоспецифичного гена (*Rarres1*, *RPL6*, *Pop1* или *RPS6*) смешивают полученные серийные разведения соответствующих плазмид с плазмидой *VE1800* в соотношениях, указанных в таблице 1.

Таблица 1 — Алгоритм приготовления калибровочных стандартных образцов

Калибровочный стандартный образец (содержание ДНК животного, %)	Концентрация плазмидной ДНК, содержащей фрагмент видоспецифичного гена, копий в $мм^3$	Объем плазмидной ДНК, содержащей фрагмент видоспецифичного гена, $мм^3$	Объем раствора плазмидной ДНК, содержащей фрагмент элемента *VE1800* с концентрацией $X \cdot 10^6$ копий в $мм^3$, $мм^3$	Объем ТЕ-буфера, $мм^3$
10,0	$X \cdot 10^5$	100	100	800
1,0	$X \cdot 10^4$	100	100	800
0,1	$X \cdot 10^3$	100	100	800

9.8 Полученные по 9.7 калибровочные стандартные образцы хранят при температуре не выше минус 16 °С не более шести месяцев.

10 Постановка ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

10.1 Для выявления ДНК кур (*Gallus gallus*) используют комплект из пары праймеров и зонда, позволяющий амплифицировать фрагмент гена *Rarres1* длиной 106 п. н. (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Праймеры и зонд для выявления ДНК кур с целью полуколичественной оценки содержания

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
Rarres-F	Прямой праймер	GTGAATGAGATCCACGGAAAGA	22150529
Rarres-Z	Зонд	R6G-CAGCAAAGGGTGAAGGAGGGAT-CA-BHQ1	22150587
Rarres-R	Обратный праймер	CTGCCCTAACTCTGCTGAAA	22150634
Примечание — Указаны позиции первого нуклеотида соответствующего олигонуклеотида в последовательности генома кур (*Gallus gallus*) с номером NC_052540.1 в базе данных GenBank.			

10.2 Для выявления ДНК быка домашнего (*Bos taurus*) используют комплект из пары праймеров и зонда, позволяющий амплифицировать фрагмент гена *RPL6* длиной 98 п. н. (см. таблицу 3).

Таблица 3 — Праймеры и зонд для выявления ДНК быка домашнего с целью полуколичественной оценки содержания

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
RPL6-F	Прямой праймер	CACAGAGGCAAGGTGAGTTC	61840058
RPL6-Z	Зонд	ROX-TACTGCGTCCGAATACGTTTG-CACT-BHQ2	61840091
RPL6-R	Обратный праймер	TGCTAGATGCAGTTAACACAGG	61840155
Примечание — Указаны позиции первого нуклеотида соответствующего олигонуклеотида в последовательности генома быка домашнего (*Bos taurus*) с номером NC_037344.1 в базе данных GenBank.			

10.3 Для выявления ДНК свиньи (*Sus scrofa*) используют комплект из пары праймеров и зонда, позволяющий амплифицировать фрагмент гена *Pop1* длиной 93 п. н. (см. таблицу 4).

Таблица 4 — Праймеры и зонд для выявления ДНК свиньи с целью полуколичественной оценки содержания

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
Pop1-F	Прямой праймер	GAATGTAAACTAGCACAGCCTCTA	38640961
Pop1-Z	Зонд	FAM-TGGAAACAGCATGATGGTTCCTCA-BHQ1	38640985
Pop1-R	Обратный праймер	GGAGTGAAATCGCTGGATCAT	38641053
Примечание — Указаны позиции первого нуклеотида соответствующего олигонуклеотида в последовательности генома свиньи (*Sus scrofa*) с номером NC_010446.5 в базе данных GenBank.			

10.4 Для выявления ДНК лошади (*Equus caballus*) используют комплект из пары праймеров и зонда, позволяющий амплифицировать фрагмент гена *RPS6* длиной 105 п. н. (см. таблицу 5).

Таблица 5 — Праймеры и зонд для выявления ДНК лошади с целью полуколичественной оценки содержания

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
Horse-F	Прямой праймер	ATACTAGGGAACAGGTGTTTGG	38294805
Horse-Z	Зонд	R6G-AGCAGGTATATTTATTAGGCACTGTAACTCATC-BHQ1	38294761
Horse-R	Обратный праймер	GAGCACTGCTGTCAAAGATTTC	38294701
Примечание — Указаны позиции первого нуклеотида соответствующего олигонуклеотида в последовательности генома лошади (*Equus caballus*) с номером NC_009166.3 в базе данных GenBank.			

10.5 Для выявления ДНК позвоночных используют комплект из пары праймеров и зонда, позволяющий амплифицировать фрагмент геномного элемента *VE1800* длиной 89 п. н. (см. таблицу 6).

Таблица 6 — Праймеры и зонд для выявления ДНК позвоночных для внутреннего контроля

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
VE1800-F	Прямой праймер	GCTGCTTGCCTCATTTCATATC	52219688
VE1800-Z	Зонд	Cy5-TTATGACAGGGCTGCAGCCAAGAT-BHQ2	52219723

Окончание таблицы 6

Наименование	Роль	Нуклеотидная последовательность	Положение
VE1800-R	Обратный праймер	AACTTGCACACTAATTCCCTTTG	52219776
Примечание — Указаны позиции первого нуклеотида соответствующего олигонуклеотида в последовательности генома лошади (*Equus caballus*) с номером NC_009152.3 в базе данных GenBank.			

10.6 Приготовление мастермикса «ПЦР-смеси-1»

10.6.1 Для амплификации фрагментов *Rarres1, RPL6, Horse* и *VE1800* готовят соответствующие мастермиксы «ПЦР-смесь-1». В отдельных предварительно промаркированных одноразовых пробирках вместимостью 1,5 см^3 смешивают следующие реагенты в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7 — Приготовление мастермиксов «ПЦР-смесь-1-*Rarres1*» «ПЦР-смесь-1-*RPL6*» и «ПЦР-смесь-1-*Horse*»

Реагенты		Объем на 100 реакций, мм^3
Вода деионизованная		950
Праймеры на видоспецифичный ген, 100 мкмоль/дм^3	прямой праймер F	6
	обратный праймер R	6
Зонд на видоспецифичный ген, 100 мкмоль/дм^3		3
Праймеры на элемент *VE1800*, 100 мкмоль/дм^3	прямой праймер F	6
	обратный праймер R	6
Зонд на элемент *VE1800*, 100 мкмоль/дм^3		3
Смесь дНТФ 25 ммоль/дм^3		20
Общий объем		1000
Примечание — При использовании смеси дНТФ с другой концентрацией, ее объем на реакцию и объем деионизованной воды меняется пропорционально.		

10.6.2 Для амплификации фрагментов *Pop1* и *VE1800* готовят мастермикс «ПЦР-смесь-1». В отдельной предварительно промаркированной одноразовой пробирке вместимостью 1,5 см^3 смешивают следующие реагенты в соответствии с таблицей 8.

Таблица 8 — Приготовление мастермикса «ПЦР-смесь-1-*Pop1*»

Реагенты		Объем на 100 реакций, мм^3
Вода деионизованная		935
Праймеры на ген *Pop1*, 100 мкмоль/дм^3	прямой праймер F	12
	обратный праймер R	12
Зонд на ген *Pop1*, 100 мкмоль/дм^3		6
Праймеры на элемент *VE1800*, 100 мкмоль/дм^3	прямой праймер F	6
	обратный праймер R	6
Зонд на элемент *VE1800*, 100 мкмоль/дм^3		3

Окончание таблицы 8

Реагенты	Объем на 100 реакций, мм^3
Смесь дНТФ 25 ммоль/дм^3	20
Общий объем	1000
Примечание — При использовании смеси дНТФ с другой концентрацией, ее объем на реакцию и объем деионизованной воды меняется пропорционально.	

10.6.3 Срок хранения готовой «ПЦР-смеси-1» при температуре не выше минус 16 °С — не более шести месяцев.

10.7 Постановка ПЦР

10.7.1 Постановка реакций амплификации ДНК каждой анализируемой пробы, производится не менее чем в двух повторах. Калибровочные стандартные образцы должны быть протестированы в двух повторах. В отдельной пробирке вместимостью 1,5 см^3 смешивают из расчета на каждую реакцию следующие реагенты: 10 мм^3 ПЦР-смеси-1,5 мм^3 ПЦР-буфера и 0,5 мм^3 Taq ДНК-полимеразы по 5.2[1)].

10.7.2 Перемешивают смесь на вортексе, кратковременно центрифугируют на микроцентрифуге для сброса капель с крышки пробирок. Затем вносят по 15 мм^3 приготовленной смеси с полимеразой в тонкостенные пробирки вместимостью 0,2 см^3.

10.7.3 Используя наконечники с фильтром в пробирки вносят по 10 мм^3 ДНК, выделенной в соответствии с разделом 8. Общий объем реакционной смеси составляет 25 мм^3.

10.7.4 В качестве ПКО используют смесь в равной пропорции растворов плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент соответствующего видоспецифичного гена (*Rarres1, RPL6*, *Pop1* или *RPS6*), и плазмидной ДНК, содержащей клонированный фрагмент *VE1800*, с концентрацией каждой плазмиды $X \cdot 10^7$ копий в см^3, где X — одно и то же число для всех плазмид.

10.7.5 Ставят контрольные реакции:

- отрицательный контроль ПЦР (К–) — вместо ДНК-пробы вносят в пробирку 10 мм^3 ТЕ-буфера;
- положительный контроль ПЦР (К+) — вместо ДНК-пробы вносят 10 мм^3 соответствующего ПКО;
- калибровочные стандартные образцы 10,0 %, 1,0 %, 0,1 % — вместо ДНК-пробы вносят по 10 мм^3 соответствующих калибровочных стандартных образцов по 9.7.

10.8 Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени»

10.8.1 Помещают пробирки в амплификатор по 5.1 для проведения ПЦР в режиме реального времени и программируют прибор в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Программы амплификации приведены в таблицах 9—12[2)].

Таблица 9 — Программа амплификации при проведении полуколичественной оценки содержания ДНК кур

Стадия	Температура, °С	Время, с	Число циклов	Детекция
Удерживание	95	900	1	—

[1)] Расчет объема Taq ДНК-полимеразы и ПЦР-буфера на реакцию проводят в соответствии с инструкцией производителя данных реагентов в зависимости от концентрации.

[2)] Приведенные режимы ПЦР оптимизированы на амплификаторах Rotor-Gene Q (Qiagen Германия) или Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd. Австралия) При использовании данных амплификаторов необходимо установить оптимизацию уровня флуоресцентного сигнала: выбрать функцию «Выполнить оптимизацию при 1-м шаге детекции», установить параметры Минимальный Сигнал — 5FI, Максимальный Сигнал — 10FI.

Окончание таблицы 9

Стадия	Температура, °С	Время, с	Число циклов	Детекция
Циклирование	95	15	35	—
	62	45		По каналам Yellow и Red

Таблица 10 — Программа амплификации при проведении полуколичественной оценки содержания ДНК быка домашнего

Стадия	Температура, °С	Время, с	Число циклов	Детекция
Удерживание	95	900	1	—
Циклирование	95	15	35	—
	62	45		По каналам Orange и Red

Таблица 11 — Программа амплификации при проведении полуколичественной оценки содержания ДНК свиньи

Стадия	Температура, °С	Время, с	Число циклов	Детекция
Удерживание	95	900	1	—
Циклирование	95	15	40	—
	62	45		По каналам Green и Red

Таблица 12 — Программа амплификации при проведении полуколичественной оценки содержания ДНК лошади

Стадия	Температура, °С	Время, с	Число циклов	Детекция
Удерживание	95	900	1	—
Циклирование	95	15	35	—
	62	45		По каналам Yellow и Red

11 Анализ и интерпретация результатов исследования

11.1 Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют с помощью программного обеспечения амплификатора по 5.1[1)].

11.2 Результаты интерпретируют на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции *S*-образной формы с установленной на соответствующем уровне пороговой лини-

[1)] При использовании амплификаторов Rotor-Gene Q или Rotor-Gene 6000 должны быть установлены следующие настройки: в меню основного окна «Количественный анализ» должны быть активированы кнопки «Динамич. Фон» и «Коррек. Уклона», установлено значение «Порог Фона», равное 10 %, выставлен «Threshold/Порог», равный 0,05.

ей, что определяет наличие или отсутствие для данной пробы значения *Ct* в соответствующей графе таблицы результатов.

11.3 Учет результатов ПЦР начинают с оценки результатов амплификации ДНК контрольных образцов в соответствии с таблицей 13. Результаты ПЦР исследования считаются достоверными, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК.

Таблица 13 — Необходимые показатели результатов анализа контролей

Контролируемый этап анализа	Значение порогового цикла *Ct* по каналу, соответствующему				
	фрагменту гена курицы *Rarres1* (канал Yellow)	фрагменту гена быка домашнего *RPL6* (канал Orange)	фрагменту гена свиньи *Pop1* (канал Green)	фрагменту гена лошади *RPS6* (канал Yellow)	внутреннему контролю (канал Red)
Выделение ДНК, Кв	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ПЦР, К–	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
ПЦР, К+	≤ 26	≤ 26	≤ 31	≤ 26	≤ 26

11.4 Результаты анализа считаются недостоверными в следующих случаях:

- для положительного контроля ПЦР (К+) среднее значение *Ct* отсутствует или превышает значение, указанное в таблице 11. Это происходит в случае неправильного выбора программы амплификации и/или других ошибок, допущенных на этапе постановки ПЦР. При таких результатах необходимо повторить амплификацию для всех образцов;
- для отрицательного контроля выделения ДНК (Кв) и/или для отрицательного контроля ПЦР (К–) на любом из каналов появление значения *Ct*. Вероятна контаминация лаборатории продуктами амплификации или контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить ПЦР-исследование для всех образцов, начиная с этапа выделения ДНК;
- для анализируемой пробы среднее значение *Ct* в таблице результатов составляет более 31 для внутреннего контроля, более 31 для видоспецифичных генов *Rarres1, RPL6*, и *RPS6*, более 35 для видоспецифичного гена *Pop1*. Необходимо повторить ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа выделения ДНК. При повторном получении аналогичного результата содержание ДНК млекопитающих или птиц в образце признается ниже предела аналитической чувствительности данного метода.

11.5 При проведении полуколичественной оценки содержания ДНК кур может отсутствовать значение *Ct* в таблице результатов по каналу Yellow (*видоспецифичный ген Rarres1*). Отсутствие значений *Ct* по каналу Yellow для анализируемых проб, в которых ранее качественно подтверждено наличие ДНК кур, свидетельствует о возможном присутствии в образце яиц или яичных продуктов. Мясо кур (продукты убоя) отсутствует.

11.6 Расчет содержания ДНК животного (курица, бык домашний, свинья, лошадь) в анализируемых пробах

11.6.1 Расчет содержания ДНК животного (% ДНК) относительно общего количества ДНК в анализируемых пробах проводят при помощи электронной таблицы[1)].

11.6.2 В первую графу электронной таблицы вносят условные обозначения каждой пробирки. Каждая строка соответствует отдельной пробирке.

[1)] В качестве электронной таблицы допускается использовать Microsoft Excel, OpenOffice Calc, таблицы Google. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта. Допускается использование для расчета готовых файлов-шаблонов.

11.6.3 В ячейки двух следующих граф электронной таблицы вносят значения пороговых циклов *Ct*, полученные по 11.2. Одна графа содержит значения *Ct* для видоспецифичной ДНК, другая графа — значения для ВК. В соответствующие ячейки каждой строки вносят значения *Ct*, полученные в отдельной пробирке.

11.6.4 В следующей графе в каждой ячейке вычисляют разницу значений *dCt* между *Ct* видоспецифичной последовательности и *Ct* ВК. Для этого в ячейке вводят знак «=», после этого указывают адрес ячейки той же строки, в которой содержится значение *Ct* видоспецифичной последовательности, затем ставят знак «–», далее указывают адрес ячейки той же строки, содержащей значение *Ct* ВК.

11.6.5 Затем в трех следующих столбцах для каждой пары повторностей, сделанных для калибровочных и испытуемых образцов, в каждой ячейке вычисляют среднее значение *dCt*, среднеквадратичное отклонение (СКО) и коэффициент вариации (*RSD*). Среднее значение и среднеквадратичное отклонение вычисляют при помощи соответствующих встроенных функций электронной таблицы, «AVERAGE» и «STDEV»[1)]. Для выполнения вычисления в ячейку ставят знак «=», затем обозначение встроенной формулы, далее в скобках указывают диапазон ячеек, в которых находятся значения *dCt* для повторностей. Коэффициент вариации *RSD* является модулем отношения стандартного отклонения к среднему значению *dCt.* Для вычисления модуля используют встроенную функцию «ABS» электронной таблицы.

11.6.6 Для калибровочных стандартных образцов создают отдельную дополнительную таблицу на том же листе электронной таблицы. Данная таблица содержит 4 графы и 4 строки, включая заголовок. Первые три графы содержат информацию о наименовании каждого калибровочного стандарта, цифровом значении содержания ДНК животного (кур, быка домашнего, свиньи, лошади) в процентах каждого стандарта, десятичным логарифмом этого значения *LG(%)*. Десятичный логарифм вычисляют при помощи встроенной функции «LOG10» электронной таблицы. В четвертую графу вносят рассчитанные по 11.6.5 средние значения *dCt* для каждого калибровочного стандартного образца.

11.6.7 По двум графам дополнительной таблицы для калибровочных стандартных образцов, содержащих значения *LG(%)* и средних значений *dCt*, в отдельной ячейке вычисляют квадратичный коэффициент корреляции Пирсона R^2. Для этого используют соответствующую встроенную функцию «RSQ» электронной таблицы.

11.6.8 Для каждого среднего значения *dCt* испытуемых образцов в отдельной графе вычисляют десятичный логарифм *LG (% ДНК)*, используя встроенную функцию «TREND» электронной таблицы. Функция «TREND» вычисляет эти значения по методу наименьших квадратов в соответствии с линейным трендом, используя два массива калибровочных значений из дополнительной таблицы, где в качестве зависимой переменной *y* служат значения *LG(%)*, а в качестве зависимой переменной *x* служат средние значения *dCt.*

11.6.9 В отдельной графе на основании полученных значений *LG(% ДНК)* для каждого среднего значения *dCt* испытуемых образцов вычисляют значение содержания ДНК животного в процентах, возведя 10 в степень, равную *LG(% ДНК)*. Для этого используют встроенную функцию «POWER» электронной таблицы, где в качестве степени служит значение *LG(% ДНК)*, а число, возводимое в степень, равно 10.

11.6.10 Результаты полуколичественной оценки считаются достоверными, если:

- коэффициент корреляции R^2 не менее 0,97. Если коэффициент корреляции R^2 менее 0,97, необходимо повторить амплификацию всех испытуемых проб и калибровочных стандартных образцов;
- коэффициент вариации (*RSD*) для двух повторов не должен превышать 25 % от среднего значения *dCt.* Если *RSD* для пробы превышает 25 %, необходимо повторить амплификацию таких анализируемых проб в сочетании с калибровочными стандартными образцами. Если *RSD* для калибровочных стандартных образцов превышает 25 %, необходимо повторить амплификацию всех проб в сочетании с калибровочными стандартными образцами.

11.7 Интерпретация результатов

11.7.1 Интерпретацию результатов полуколичественной оценки содержания ДНК кур проводят согласно таблице 14.

[1)] Обозначение встроенных формул приведено для электронной таблицы OpenOffice Calc. Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Таблица 14 — Интерпретация результатов полуколичественной оценки содержания ДНК кур

Полученный результат, % ДНК кур	Интерпретация результатов
Рассчитанное значение содержания ДНК более 10,0 %	Содержание ДНК кур (*Gallus gallus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц более 10,0 %
Рассчитанное значение содержания ДНК менее 0,1 %	Содержание ДНК кур (*Gallus gallus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц менее 0,1 %
Рассчитанное значение содержания ДНК не менее 0,1 %, но не более 1,0 % 0,1 % ≤ % ДНК ≤ 1,0 %	Содержание ДНК кур (*Gallus gallus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне от 0,1 % до 1,0 % включ.
Рассчитанное значение содержания ДНК более 1,0 %, но не более 10,0 % 1,0 % < % ДНК ≤ 10,0 %	Содержание ДНК кур (*Gallus gallus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне св. 1,0 % до 10,0 % включ.
Отсутствие результата (значения *Ct* по каналу видоспецифичного гена *Rarres1* отсутствуют) для проб, в которых ранее качественно подтверждено наличие ДНК кур	Мясо кур (продукты убоя) отсутствует, возможно присутствие в образце яиц или яичных продуктов

11.7.2 Интерпретацию результатов полуколичественной оценки содержания ДНК быка домашнего проводят согласно таблице 15.

Таблица 15 — Интерпретация результатов полуколичественной оценки содержания ДНК быка домашнего

Полученный результат, % ДНК быка домашнего	Интерпретация результатов
Рассчитанное значение содержания ДНК более 10,0 %	Содержание ДНК быка домашнего (*Bos taurus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц более 10,0 %
Рассчитанное значение содержания ДНК менее 0,1 %	Содержание ДНК быка домашнего (*Bos taurus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц менее 0,1 %
Полученный результат, % ДНК быка домашнего	Интерпретация результатов
Рассчитанное значение содержания ДНК не менее 0,1 %, но не более 1,0 % 0,1 % ≤ % ДНК ≤ 1,0 %	Содержание ДНК быка домашнего (*Bos taurus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне от 0,1 % до 1,0 % включ.
Рассчитанное значение содержания ДНК более 1,0 %, но не более 10,0 % 1,0 % < % ДНК ≤ 10,0 %	Содержание ДНК быка домашнего (*Bos taurus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне св. 1,0 % до 10,0 % включ.

11.7.3 Интерпретацию результатов полуколичественной оценки содержания ДНК свиньи проводят согласно таблице 16.

Таблица 16 — Интерпретация результатов полуколичественной оценки содержания ДНК свиньи

Полученный результат, % ДНК свиньи	Интерпретация результатов
Рассчитанное значение содержания ДНК более 10,0 %	Содержание ДНК свиньи (*Sus scrofa*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц более 10,0 %
Рассчитанное значение содержания ДНК менее 0,1 %	Содержание ДНК свиньи (*Sus scrofa*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц менее 0,1 %
Рассчитанное значение содержания ДНК не менее 0,1 %, но не более 1,0 % 0,1 % ≤ % ДНК ≤ 1,0 %	Содержание ДНК свиньи (*Sus scrofa*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне от 0,1 % до 1,0 % включ.
Рассчитанное значение содержания ДНК более 1,0 %, но не более 10,0 % 1,0 % < % ДНК ≤ 10,0 %	Содержание ДНК свиньи (*Sus scrofa*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне св. 1,0 % до 10,0 % включ.

11.7.4 Интерпретацию результатов полуколичественной оценки содержания ДНК лошади проводят согласно таблице 17.

Таблица 17 — Интерпретация результатов полуколичественной оценки содержания ДНК лошади

Полученный результат, % ДНК лошади	Интерпретация результатов
Рассчитанное значение содержания ДНК более 10,0 %	Содержание ДНК лошади (*Equus caballus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц более 10,0 %
Рассчитанное значение содержания ДНК менее 0,1 %	Содержание ДНК лошади (*Equus caballus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц менее 0,1 %
Рассчитанное значение содержания ДНК не менее 0,1 %, но не более 1,0 % 0,1 % ≤ % ДНК ≤ 1,0 %	Содержание ДНК лошади (*Equus caballus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне от 0,1 % до 1,0 % включ.
Рассчитанное значение содержания ДНК более 1,0 %, но не более 10,0 % 1,0 % < % ДНК ≤ 10,0 %	Содержание лошади (*Equus caballus*) относительно общей ДНК млекопитающих и птиц находится в диапазоне св. 1,0 % до 10,0 % включ.

Библиография

[1] МУ 1.3.2569—09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности

УДК 577.21:637.5:006.354

ОКС 67.050
67.120.10
67.120.20

Ключевые слова: мясная продукция, *Gallus gallus*, ДНК кур, *Bos taurus*, ДНК быка домашнего, *Sus scrofa*, ДНК свиньи, *Equus caballus*, ДНК лошади, полуколичественная оценка содержания ДНК, ПЦР в режиме реального времени

Редактор *Е.В. Якубова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 22.08.2022. Подписано в печать 25.08.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru