

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ
ИМЕНИ В.М. ГОРБАТОВА» РАН
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

УДК
№ госрегистрации
Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН,
д-р техн. наук
Кузнецова О.А.
« ____ » _____ 2022 г.

Отчет

о выполнении научно-исследовательской работы для официального
использования Евразийской экономической комиссией

по теме:

«Исследование международного опыта по установлению предельно
допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции и
применению термина «технологически неустранимая примесь» и подготовка
предложений об установлении схожих правил регулирования в рамках
технических регламентов Евразийского экономического союза»
(этап 1)

Москва, 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководители темы:

Заведующий лабораторией
«Молекулярной биологии и
биоинформатики», канд. техн. наук

Минаев М.Ю.

И.о. руководителя отдела
«Технического регулирования
и систем управления качеством», канд. техн. наук

Кузлякина Ю.А.

Руководитель отдела
«Научно-прикладных и
технологических разработок», канд. техн. наук

Насонова В.В.

Исполнители:

Старший научный сотрудник, канд. биол. наук

Коноров Е.А.

Научный сотрудник, канд. техн. наук

Хвостов Д.В.

Ведущий инженер

Крюченко Е.В.

Ведущий инженер, канд. техн. наук

Замула В.С.

Соисполнители от Республики Казахстан:

Профессор кафедры
«Технология продуктов
питания» АО «Алматинский
технологический
университет», д-р техн. наук

Я.М. Узаков

Сениор-лектор кафедры
«Технология продуктов
питания» АО «Алматинский
технологический
университет», д-р PhD

М. А.-А. Калдарбекова

РЕФЕРАТ

Ключевые слова: ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР), ФАЛЬСИФИКАЦИЯ, НЕЗАЯВЛЕННЫЕ ПРИМЕСИ, КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР, ЛИНЕЙНЫЙ ДИАПАЗОН, ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕАКЦИИ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ, ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, АУТЕНТИФИКАЦИЯ СЫРЬЯ, МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК, ГЕНОМНАЯ ДНК, СТАНДАРТНЫЕ МАТРИЧНЫЕ ОБРАЗЦЫ, ПИЩЕВАЯ ПРОДУКЦИЯ, ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ, ДЕГРАДАЦИЯ ДНК

Отчет составлен на 147 страницах, включая 2 таблицы, 8 рисунков, 226 источников

Объектами исследования являлись образцы пищевой продукции, изготовленной из сырья животного и растительного происхождения.

Цель работы: разработка научно обоснованных предложений по установлению в соответствующих технических регламентах Евразийского экономического союза (далее по тексту – Союз) требований по предельно допустимому уровню ДНК компонентов состава мясной продукции и термина «технологически неустраняемая примесь».

Научная новизна: проведен анализ научной информации по применяемым подходам к определению ДНК сырья животного происхождения в составе пищевой продукции.

Научно оценены подходы к нормированию количества компонентов, содержащихся в продукте, но не выносимых в маркировку.

По результатам исследований:

В результате проведенных работ были проанализированы литературные данные по количественным методам исследований видового состава мяса и мясной продукции. Основным количественным методом является ПЦР в реальном времени с использованием аттестованных стандартных образцов. Перспективным количественным методом является так называемая цифровая

ПЦР с прямым подсчетом количества копий целевой ДНК в аналитической пробе.

Была подготовлена историография по проблематике фальсификации мясной продукции незаявленными видами мяса, а также проведен анализ экономического аспекта этого вопроса и проблем, связанных с безопасностью такой продукции.

Были проанализированы работы, связанные с нормированием незаявленных примесей в мясной продукции. Установлено, что этот вопрос в целом не имеет однозначного решения, поэтому на уровне законодательства эти нормы не приняты.

На уровне контролирующих органов приняты методические рекомендации по нормам отбора продукции от исследуемой партии и пороговые значения отсекающие положительные результаты ПЦР анализа [129]. В Великобритании установлены самые жесткие нормы по незаявленным примесям, не более 0,1%. В ЕС на уровне законодательства установлена норма по идентификации продукции, выработанной с использованием конины, для ее проверки на содержание фенилбутазона и по другим показателям безопасности. Определен уровень содержания конины более 1,0%. В подавляющем количестве стран вопрос о признании продукции фальсифицированной с экономической целью (ЕМА) решается индивидуально.

С учетом того, что многие случаи фальсификации с подменой мяса при изготовлении мясной продукции связаны с проблемой безопасности, при импорте продукции следует применять наиболее жесткие нормы по лимитированию незаявленных примесей.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	2
РЕФЕРАТ	4
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	8
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	11
ВВЕДЕНИЕ	14
1. Историография в области выявления незаявленных примесей в мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК содержащих компонентов состава мясной продукции	17
1.1. Выявление незаявленных примесей в мясной продукции и уровней их нормирования	17
1.2. Аналитические методы, применяемые в идентификационном анализе пищевых продуктов.	28
1.2.1. Методы на основе ДНК	30
1.2.2. Методы изотермической амплификации.....	31
1.2.3. Спектрометрические методы	33
1.2.4. Спектроскопические методы	34
1.2.5. Иммуноанализ с латеральным потоком.....	36
1.2.6. Хроматографические методы	37
1.2.7. Методы ядерного анализа (НАТ) на основе нейтронов и протонов.....	38
2. Анализ научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части установления предельно допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК компонентов состава мясной продукции.	40
2.1. Актуальные примеры фальсификации пищевой продукции в международной практике	44
2.2. Сравнительный обзор и последние достижения в области методологии обнаружения фальсификации мясной продукции	55
2.2.1. Технологии на основе ДНК.....	55
2.2.1.1 Прямая ПЦР	62
2.2.1.2 ПЦР в реальном времени	63
2.2.1.3 Полимеразная цепная реакция – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.....	69
2.2.1.4 Петлевая изотермическая амплификация	70
2.2.1.5 ПЦР в реальном времени с анализом кривых плавления (PCR HRM) ...	72
2.2.1.6 Цифровая ПЦР (Digital PCR).....	73
2.2.1.7 Капельная цифровая ПЦР	74
2.2.1.8 Штрих-кодирование ДНК и секвенирование нового поколения	76
2.2.1.9 ARMS (амплификация рефракторной мутационной системы)	82
2.2.1.10 PCR-SSCP (конформационный полиморфизм оцДНК)	83
2.2.1.11 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)	84

2.2.1.12 Штрих-кодирование ДНК и секвенирование нового поколения (NGS).....	85
2.2.1.13 Мультиплексная ПЦР	90
2.2.1.14 Мультиплексная PCR по конечной точке.....	95
2.2.1.15 Мультиплексная ПЦР в конечной точке в сочетании с другими методами	98
2.2.1.16 Мультиплексная ПЦР в реальном времени.....	100
2.2.1.17 Мультиплексный полиморфизм длины рестрикционных фрагментов-ПЦР.....	103
2.2.2. Выявление содержания свинины	108
2.2.3. Утвержденные методы ЕС для определения компонентов животного происхождения	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	118

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Ароматизатор пищевой (ароматизатор) – не употребляемые человеком непосредственно в пищу вкусоароматическое вещество или вкусоароматический препарат, или термический технологический ароматизатор, или коптильный ароматизатор, или предшественники ароматизаторов, или их смесь (вкусоароматическая часть), предназначенные для придания пищевой продукции аромата и (или) вкуса (за исключением сладкого, кислого и соленого), с добавлением или без добавления других компонентов.

Безопасность пищевой продукции – состояние пищевой продукции, свидетельствующее об отсутствии недопустимого риска, связанного с вредным воздействием на человека и будущие поколения.

Компонент пищевой продукции (пищевой ингредиент) – продукт или вещество (включая пищевые добавки, ароматизаторы), которые в соответствии с рецептурой используются при производстве (изготовлении) пищевой продукции и являются ее составной частью.

Контаминация (загрязнение) пищевой продукции – попадание в пищевую продукцию предметов, частиц, веществ и организмов (контаминантов, загрязнителей) и присутствие их в количествах, несвойственных данной пищевой продукции или превышающих установленные уровни, вследствие чего она приобретает опасные для человека свойства.

Маркировка пищевой продукции – информация о пищевой продукции, нанесенная в виде надписей, рисунков, знаков, символов, иных обозначений и (или) их комбинаций на потребительскую упаковку, транспортную упаковку или на иной вид носителя информации, прикрепленного к потребительской упаковке и (или) к транспортной упаковке, или помещенного в них либо прилагаемого к ним.

Мясная продукция – пищевая продукция, изготовленная путем переработки (обработки) продуктов убоя, без использования или с использованием ингредиентов животного и (или) растительного, и (или) минерального, и (или) микробиологического, и (или) искусственного происхождения.

Мясной ингредиент – составная часть рецептуры пищевого продукта, который является продуктом убоя или продуктом, полученным в результате переработки продуктов убоя, и который не содержит кость в процессе изготовления колбасных изделий (за исключением колбасных изделий из термически обработанных ингредиентов, технологические особенности производства которых допускают варку мяса на кости с последующим отделением кости и использование бульона), либо содержит костные включения (при использовании мяса механической обвалки (дообвалки)), либо содержит кость (при изготовлении продукции из анатомически целого куска мяса на кости).

Мясо – продукт убоя в виде туши или части туши, представляющий совокупность мышечной, жировой, соединительной тканей, с включением костной ткани или без нее.

Пищевая продукция – продукты животного, растительного, микробиологического, минерального, искусственного или биотехнологического происхождения в натуральном, обработанном или переработанном виде, которые предназначены для употребления человеком в пищу, в том числе специализированная пищевая продукция, упакованная питьевая вода (в том числе природная минеральная вода, купажируемая питьевая вода, обработанная питьевая вода, природная питьевая вода, питьевая вода для детского питания, искусственно минерализованная питьевая вода), алкогольная продукция (в том числе пиво и напитки на основе пива), безалкогольные напитки, биологически активные добавки к пище (БАД), жевательная резинка,

закваски и стартовые культуры микроорганизмов, дрожжи, пищевые добавки и ароматизаторы, а также продовольственное (пищевое) сырье.

Потребитель – физическое лицо, имеющее намерение заказать или приобрести либо заказывающее, приобретающее или использующее пищевую продукцию исключительно для личных, семейных, домашних и иных нужд, не связанных с осуществлением предпринимательской деятельности.

Продовольственное (пищевое) сырье – продукты животного, растительного, микробиологического, минерального, искусственного или биотехнологического происхождения и питьевая вода, используемые для производства (изготовления) пищевой продукции.

Продукт убоя – переработанная пищевая продукция животного происхождения, полученная в результате убоя в промышленных условиях продуктивных животных и используемая для дальнейшей переработки (обработки) и (или) реализации, включающая мясо, субпродукты, жир-сырец, кровь, кость, мясо механической обвалки (дообвалки), коллагенсодержащее и кишечное сырье.

Рецептура мясной продукции – документально установленный изготовителем полный перечень использованных в процессе производства мясной продукции компонентов с указанием количества мясных и немясных ингредиентов, включая поваренную соль, пряности, пищевые добавки и добавляемую воду (в том числе в виде льда, бульонов, рассолов), по которому устанавливается принадлежность мясной продукции к группам мясных, мясосодержащих, мясорастительных или растительно-мясных продуктов.

Субпродукты – продукты убоя в виде внутренних органов, головы, хвоста, конечностей (или их частей), мясной обрести, зачищенные от кровоподтеков, без серозной оболочки и прилегающих тканей, а также шкурки и межсосковой части свиней.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

CFIA – Канадское Агентство по инспекции пищевых продуктов (Canadian Food Inspection Agency);

cyt b, 12S rRNA и COI – митохондриальные гены животных;

DAFF – Департамент сельского, лесного и рыбного хозяйства ЮАР (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries);

DART-MS – Прямой анализ в масс-спектрометрии в режиме реального времени;

DEFRA – Департамент окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства Великобритании (The Department for Environment, Food and Rural Affairs);

DTI – Министерство торговли и промышленности ЮАР (The Department of Trade, Industry);

EMA – Экономически мотивированные фальсификации (Economically motivated adulteration);

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration);

FMIA – Закон о федеральной инспекции мяса (Federal Meat Inspection Act);

FSA – Управление по пищевым стандартам Великобритании (Food Standards Agency);

FT-IR – Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье;

GFSI – Глобальная инициатива по безопасности пищевых продуктов (Global Food Safety Initiative);

GMP – Надлежащая производственная практика (Good manufacturing practices);

ICP-MS – Масс-спектрометрия с сопряженной плазмой;

IMSOC – Система управления информацией для официального контроля для обеспечения соблюдения правил агропродовольственной цепочки ЕС (Information management system for official controls);

IRMS – Масс-спектрометрия изотопных отношений;

LAMP – Петлевая изотермическая амплификация;

LFIA – Иммуноанализ с латеральным потоком;

NAA – Нейтронно-активационный анализ;

NGS – Секвенирование нового поколения (Next-generation sequencing);

OLAF – Европейское бюро по борьбе с мошенничеством (The European Anti-Fraud Office);

PIGE – Индуцированный частицами гамма-анализ.

RASFF – Система быстрого оповещения о продуктах питания и кормах ЕС (Rapid Alert System for Food and Feed);

RPA – Амплификация рекомбиназной полимеразы);

SERS – Поверхностно усиленная рамановская спектроскопия;

АТФ – Аденозинтрифосфорная кислота;

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГХ – Газовая хроматография;

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЕАЭС – Евразийский экономический союз;

ЕС – Европейский союз;

ЕЭК – Евразийская экономическая комиссия;

ЖХ-МС – Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия;

ИФА (ELISA) – Иммуноферментный анализ;

МС – масс-спектрометрия);

ОТ-ПЦР – ПЦР в реальном времени;

ПЦР – Полимеразная цепная реакция;

ТР ЕАЭС 051/2021 – Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности мяса птицы и продукции его переработки»;

ТР ТС 021/2011 – Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»;

ТР ТС 034/2013 – Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции»;

ТСХ – тонкослойная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Мошенничество с пищевыми продуктами (ЕМА), как правило, считается скорее экономической проблемой, чем проблемой безопасности пищевых продуктов, но задокументированные во всем мире скандалы показали, что они могут представлять серьезную опасность для здоровья населения.

Законодательство многих стран мира, в том числе Российской Федерации, обязывает производителей пищевой продукции информировать потребителя о ее составе. В Федеральном законе США об инспекции мяса (FMIA) и Регламенте Европейского парламента (ЕС) № 178/2002, прямо установлено, что фальсификация мясных продуктов незаявленными видами мяса не допускается [1]. Однако, как показал международный скандал с обнаружением незаявленной конины в бургерах и фрикадельках в ряде крупных сетей общественного питания в 2013г., подмена исходного сырья может произойти на любом этапе логистической цепи от убоя и первичной переработки животных до прилавка. При этом суть скандала заключалась даже не в самом факте обнаружения незаявленной конины, а в том, что она не была задекларирована как пищевое сырье. В продукции, выработанной с кониной, обнаружили запрещенное вещество фенилбутазон, т. е. она не могла использоваться при производстве мясной продукции. Фенилбутазон-нестероидный противовоспалительный ветеринарный препарат, используемый у лошадей при лечении скелетно-мышечных нарушений и травм мягких или твердых тканей [2]. Это соединение было запрещено FDA и Европейским агентством по лекарственным средствам для лошадей, предназначенных для убоя, из-за его токсичности для костного мозга, вызывающей лейкопению, агранулоцитоз, апластическую анемию и тромбоцитопению [3].

Однако, стоит отметить, что технические регламенты Евразийского экономического союза, устанавливающие требования безопасности в отношении пищевой продукции животного происхождения, в том числе ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 034/2013 «О

безопасности мяса и мясной продукции», ТР ЕАЭС 051/2021 «О безопасности мяса птицы и продукции его переработки» в настоящее время не устанавливают обязательных требований по качественному и количественному определению в мясной продукции, продукции из мяса птицы фрагментов видоспецифичной ДНК не заявленных в маркировке пищевых компонентов животного происхождения, а также не устанавливают соответствующих допустимых уровней их содержания в продукции и определения «технологически неустраняемая примесь» (или иного аналогичного термина) [4, 5, 6].

Кроме того, перечни стандартов к ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013 (а также проект перечней стандартов к ТР ЕАЭС 051/2021), содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований указанных регламентов и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования, не включают в себя документов по определению ДНК компонентов состава пищевой продукции [7, 8, 9].

Наиболее перспективным методом выявления незаявленных примесей в мясной промышленности является ПЦР. Он широко распространен в лабораторной практике практически всех стран мира, хорошо масштабируется и воспроизводится.

Научная новизна

Проведен анализ научной информации по применяемым подходам в мировой практике к определению ДНК сырья животного происхождения в составе пищевой продукции.

Научно оценены подходы к нормированию количества компонентов, содержащихся в продукте, но не выносимых в маркировку.

Целью работы является разработка научно обоснованных предложений по установлению в соответствующих технических регламентах Евразийского экономического союза (далее по тексту – Союз) требований по предельно

допустимому уровню ДНК компонентов состава мясной продукции и термина «технологически неустраняемая примесь».

Для достижения поставленных целей **решались следующие задачи:**

1. Подготовить историографию по исследуемой проблематике в области части установления предельно допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК компонентов состава мясной продукции.

2. Провести анализ научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части установления предельно допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК компонентов состава мясной продукции.

1. Историография в области выявления незаявленных примесей в мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК содержащих компонентов состава мясной продукции

1.1. Выявление незаявленных примесей в мясной продукции и уровней их нормирования

Мясо и мясная продукция потребляются во всем мире в качестве одного из диетических источников белка. Потребление животного белка составляет 40% от общего мирового потребления белка. Как следствие, общее мировое потребление мяса растет одновременно с быстрым увеличением численности населения в мире [10, 11].

Чтобы справиться со стремительно растущим спросом населения, особенно в развивающихся странах, производители продуктов питания сталкиваются с проблемами, связанными с поддержанием рыночного спроса как на сырую, так и на переработанную мясную продукцию, договорных обязанностей по поставке в розничные сети определенных объемов товара [12]. Таким образом, в связи с постоянным ростом потребительских цен на мясную продукцию, глобализацией торговли продуктами питания и значительной глубиной переработки мяса с целью получения продукции с высокой добавленной стоимостью случаи подмены видов, фальсификации состава и фальсификации маркировки мясных продуктов стали обычным явлением для получения незаконных финансовых выгод [13]. Одним из крупнейших мясных скандалов, потрясших мир с точки зрения безопасности пищевых продуктов, стало обнаружение конины во многих готовых пищевых продуктах, которые в 2013 году продавались в Европе как 100% говядина [14].

В странах ЕС был организован мониторинг мясной продукции на предмет наличия незаявленных продуктов убоя лошадей. Выяснилось, что ДНК лошади выявлялось в 29-69% продукции, выработанной из говядины [15].

Как показывает анализ литературных данных, состав готовой продукции на наличие незаявленных ингредиентов проводился и до скандала с обнаружением конины в бургерах и фрикадельках. Среди мясной продукции около 19.4 % в США [16], 22 % в Турции [17], 15 % в Швейцарии и 8 % в Великобритании были неправильно маркированы [18]. В странах Персидского залива из 105 образцов, заявленных как 100% говядина в 7% образцах, была обнаружена конина, а в четверти – свинина [19].

Масштабный мониторинг пищевой продукции, проведенный в ходе расследования скандала с обнаружением конины, выявил множество фактов обнаружения самых неожиданных видов животного сырья в мясных продуктах – не только из-за мошенничества, но и из-за перекрестного загрязнения различными видами мяса во время производства мясных продуктов. Многие предприятия игнорировали эти риски из-за необходимости внедрения стандартов надлежащей производственной практики (далее – GMP), высокой степени эффективности производства, использования дорогостоящего оборудования для санитарной обработки, недостаточных рекомендаций по контролю за процессами, связанными с предотвращением загрязнений незаявленными видами.

Европейская комиссия опубликовала Рекомендацию Комиссии 2013/99/ЕС о скоординированном плане контроля пищевых продуктов, продаваемых и/или маркированных как содержащие говядину, конину, предназначенных для потребления человеком, с целью обнаружения остатков фенилбутазона [20]. Лошади могут относиться как к продуктивным видам животных, так и непродуктивным. Фенилбутазон является ветеринарным препаратом, применение которого разрешено только у непродуктивных животных в соответствии с Регламентом Комиссии (ЕС) № 37/2010 от 22 декабря 2009 г. о фармакологически активных веществах и их классификации в отношении максимально допустимых уровней остаточного содержания в пищевых продуктах животного происхождения [21].

Соответственно, лошади, которых в какой-то момент жизни лечили фенилбутазоном, не имеют право попасть в пищевую промышленность. Учитывая мошенническую практику, связанную с немаркированным присутствием конины в некоторых пищевых продуктах, целесообразно в профилактических целях установить, не попали ли в пищевую цепочку непродуктивные лошади, получавшие лечение фенилбутазоном. Фенилбутазон исследуют во всех мясных продуктах, когда обнаруженное присутствие конины превышает 1 %.

Затем Рекомендацией Комиссии 2014/180/ЕС был установлен второй набор скоординированных мер контроля с целью оценки распространенности мошеннических практик, т. е. наличия конины в промышленно упакованных пищевых продуктах или упакованных в торговых точках по просьбе потребителей и маркированные как содержащие говядину в качестве основного ингредиента [22, 23].

Другим примечательным событием, которое привлекло внимание мировых СМИ и вызвало сильное возмущение общественности, особенно из мусульманских стран, стало выявление ДНК свинины в шоколадных конфетах Cadbury в Малайзии в 2014 году [24].

Российскую Федерацию не обошла проблема с контаминацией говядины кониной. Кони́на обнаруживалась как в говядине отечественного производства, так и в зарубежной, в т.ч. из Латинской Америки. При этом надо отметить, что ряд стран этого региона числились неблагополучными по заболеванию сапом лошадей. При этом, как показали исследования в период 2013-2014 годов, проведенные во ВНИИ мясной промышленности, уровень примеси недекларируемой конины достигал в отдельных случаях 40%. Более расширенный мониторинг блочного сырья показал факт подмены говядины буйволятиной. Надо отметить, что основной регион поставщиков буйволятины – Индия, которая по сегодняшний день неблагополучна по ящуру КРС.

Тем не менее, количественная оценка видового состава является спорным вопросом в научном сообществе, где много дискутируют о том, какой тип ДНК является мишенью для количественного определения (ядерная или митохондриальная), и способ выражения содержания (весовые проценты, или соотношение геном/геном) [25]. Уровень детектирования положительной реакции также является предметом дискуссии.

Инцидент с присутствием конины и свинины в обработанных продуктах из говядины вызвал ряд вопросов, в том числе о том, происходит ли перенос, то есть случайное загрязнение другими видами мяса, при промышленном производстве мясных продуктов, приготовленных в соответствии с надлежащей производственной практикой.

Управление по пищевым стандартам Великобритании, Департамент по вопросам окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства (Defra) заказали в 2014г. исследование, чтобы оценить, происходит ли и на каком уровне перенос видов мяса во время промышленного производства мясного фарша.

Проект осуществлялся в два этапа:

фаза 1 была проведена на экспериментальном промышленном предприятии в контролируемых условиях

фаза 2 испытания были проведены на трех действующих коммерческих предприятиях Великобритании - в общей сложности было проанализировано 1032 образца говядины и 390 образцов мазков.

Для проверки эффективности режимов очистки, используемых на коммерческих мясокомбинатах (полная санитарная обработка и промывка водой под давлением), были взяты три типа мазков: аденозинтрифосфат (АТФ) (АТФ присутствует во всех органических материалах), белковые и ДНК-мазки. После глубокой очистки все три мазка дают эквивалентные отрицательные результаты, демонстрирующие, что для проверки эффективности очистки можно использовать любой из трех методов взятия мазка.

Было установлено, что при производстве сырого говяжьего фарша в соответствии с GMP, либо глубокая очистка с применением моющих средств, либо промывка водой под высоким давлением при смене ассортиментного перечня выпускаемой продукции эффективны для предотвращения попадания сырой свинины в сырую говядину с соответствующим пределом обнаружения (LOD) менее 0,1% по массе. Заинтересованные стороны теперь имеют доказательства, позволяющие провести различие между случайным загрязнением говяжьего фарша свиним. Результаты этого проекта основаны на определении содержания сырой свинины только в сырой говядине. Хотя было бы разумно предположить, что результаты будут аналогичными для других видов мяса, работа, необходимая для подтверждения этого предположения, не входила в рамки указанного проекта.

В результате проведенных исследований Управление по пищевым стандартам Великобритании (FSA) и Департамент окружающей среды, продовольствия и сельского хозяйства (DEFRA) рекомендуют установить пороговый уровень в 0,1% незадекларированных видов мяса для переработанного мяса, что будет указывать на отсутствие остатков предыдущей партии продукции и в том числе на соблюдение надлежащей производственной практики.

На заседании правления в 2015 году [25], проведенном FSA, обсудили необходимость установления еще двух пороговых уровней: первый - порог для корректирующих мероприятий, при котором требуется расследовать причины контаминации незаявленными видами сырья, обнаруженными на уровнях от 0,1% до 1%; и второй, это порог декларирования, при достижении которого о результатах необходимо сообщать в FSA в случаях, когда результаты показывают содержание незаявленных видов мяса в переработанной продукции, от 1% или выше по массе.

Департаменты, управляющие продуктами питания в Южной Африке (DAFF и DTI) так же проводили исследования на эту тему, однако, на

сегодняшний день не стали устанавливать какие-либо пороговые значения. По их мнению, существует множество факторов, которые необходимо учитывать при определении порогового значения, таких как потенциальные риски для здоровья и права отдельных лиц на выбор продуктов, независимо от того, обусловлены они религиозными и/или этическими убеждениями или нет.

Canadian Food Inspection Agency (CFIA) Food Safety Science Directorate, Science Branch, Ottawa в 2017 г провели анализ научных публикаций по изучению видового состава мясной продукции [26]. Исследования по идентификации видового состава коммерческих мясных продуктов проводились с использованием методов, основанных на ДНК, в нескольких странах, включая Таиланд [27], Турцию [28], Иран [29], США [30, 31], Южную Африку [32, 33], Испанию [34], Китай [35], Германию и Нидерланды [36, 37], Объединенные Арабские Эмираты [38] и Ирландию [39]. Основным объектом исследований была промышленно переработанная мясная продукция, такая как мясной фарш или колбаса, где вероятность неправильной маркировки выше. Эти исследования выявили уровни неправильной маркировки до 70%, когда продукты полностью или частично заменялись видами, не указанными на этикетке, включая свинину, конину, курицу и другие. И хотя были обнаружены продукты с незначительными нарушениями в маркировке и без таковых, продукты с незадекларированными ингредиентами были обнаружены почти во всех опубликованных исследованиях.

Агентство провело собственное исследование 100 образцов полуфабрикатов, которые были помечены как продукты из одного вида мяса (говядина, свинина, мясо кур или мясо индейки). Они были собраны в торговых заведениях по всей Канаде и были исследованы на наличие группы неуказанного вида сырья. Преобладающие виды мяса были определены с помощью штрих-кодирования ДНК, а контаминирующие виды мяса были обнаружены с помощью цифровой капельной ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров и зондов. Для неуказанных в составе видов сырья

использовалось пороговое значение в 1% (по массе ДНК), чтобы отличить образцы, в которых обнаружение незаявленных видов сырья может быть связано с случайным загрязнением, а не с целенаправленной заменой. Там, где количество незадекларированных видов составляло более 1%, для определения доли образца, содержащего эти виды, использовались два диапазона (1-5% и более 5%). Предоставление диапазонов, а не точных процентных соотношений, помогло смягчить некоторые потенциальные проблемы, связанные с числом копий в разных типах тканей, которые могут возникнуть при использовании митохондриального маркера для количественной оценки [36].

Все образцы также были протестированы на наличие конины с помощью ПЦР в реальном времени. Все образцы содержали преобладающие виды сырья, соответствующие видам сырья, указанным на этикетке, за исключением пяти образцов колбасы из индейки, в которых преобладал куриный вид. Во-вторых, этот анализ показал, что 6% говяжьих колбас также содержали свинину, 20% куриных колбас содержали индейку, а 5% содержали говядину, и 5% свиных колбас также содержали говядину. В пяти образцах, помеченных как колбаса из индейки, не было индейки, а в одном образце свинины была обнаружена конина. Общий уровень неправильной маркировки, обнаруженный в этом исследовании, составил 20%.

Основой для идентификации с помощью методов на основе ПЦР является правильный выбор генетического маркера, участка ядерного или митохондриального генома, а также праймеров к нему. От этого будет зависеть чувствительность и специфичность методики, результат, объективность полученных результатов. Так, например, использование митохондриальных маркеров уменьшит предел обнаружения, поскольку митохондриальный геном представлен гораздо большим числом копий в клетке, чем ядерный. В случае видоспецифичной ПЦР необходимо подобрать такую пару праймеров, чтобы длина получившегося фрагмента у близких видов сырья была отличимой на электрофорезе или реакция происходила только у анализируемого вида. В

случае методов ампликонного высокопроизводительного секвенирования, наоборот, необходимо использовать универсальные для группы организмов праймеры. В основном, для животных ДНК штрихкодирование с использованием NGS производится на митохондриальных маркерах *cyt b*, *12S rRNA* и *COI*, а также на ядерных *16S rDNA* [40]. Данные гены обладают как консервативными, так и с участками с большим количеством замен, что позволяет подбирать праймеры достаточного уровня разрешения как универсальные для всех животных, так и специфичные для отдельных групп, например, рыб или птиц. Для растений митохондриальные маркеры не подходят в качестве универсального ДНК баркода, поскольку они накапливают слишком мало замен, чтобы отличить даже близкие семейства. Поэтому для растительного сырья используются в качестве маркеров различные участки хлоропластного генома или их комбинация [40, 41].

Вторым по важности после правильного выбора маркера и праймеров к нему фактором для увеличения чувствительности методов являются оптимизации условий выделения ДНК и последующего метода детекции. Применение более подходящего набора для конкретного типа продукции может повысить чувствительность метода на порядок [42].

Техники ДНК-штрихкодирования, основанные на ПЦР, помимо метабаркодинга, включают в себя RAPD (случайная амплификация полиморфной ДНК), RAPD-SCAR (sequence characterized amplified regions), SSR (simple sequence repeat) анализ, ISSR (inter simple sequence repeat) анализ, RFLP-ПЦР, ARMS (amplification refractory mutation system). Все данные техники подразумевают идентификацию при помощи детекции фрагментов ДНК разной длины при электрофорезе. По сравнению с идентификацией с помощью наличия или отсутствия продукта при видоспецифической ПЦР, они могут обладать своими преимуществами и недостатками, но все они требуют дополнительного усложнения протокола ПЦР [43].

Как следствие, мошенничество с продуктами питания оказывает как краткосрочное, так и долгосрочное воздействие, затрагивая не только потребителей, но и производителей, регулирующие органы, промышленность, местных или международных торговых партнеров, вызывая недоверие к цепочке поставок продуктов питания и, следовательно, приводя к сбоям на рынке и в торговле [44].

Более того, фальсификация пищевых продуктов также подвергает потребителей серьезному риску для здоровья из-за наличия определенных незадекларированных ингредиентов, вызывающих аллергию у определенных людей, или наличия вредных микроорганизмов в мясных продуктах, которые вызывают зоонозные заболевания, такие как пищевые заболевания и некоторые хронические заболевания (рак и сердечно-сосудистые заболевания), даже приводящие к смерти в нескольких случаях [45, 46]. Сообщалось, что примерно 75% новых и возникающих заболеваний человека вызываются патогенами, носителями которых являются животные и выявляемые из продуктов животного происхождения [45]. Кроме того, религия также определяет потребление мяса и/или мясных продуктов посредством ограничений, налагаемых на определенную мясную продукцию. Например, свинина или продукты из свинины запрещены мусульманам, в то время как ингредиент животного происхождения должен соответствовать кошерным законам еврейской общины [47]. С другой стороны, в то время как говядина и продукты питания из говядины являются законными для мусульманских, еврейских и христианских общин, они строго запрещены последователям индуизма [48].

С культурной точки зрения вегетарианцы и веганы полностью запрещают употребление всех видов мясных продуктов. Аналогичным образом, культурный и социальный образ жизни оказывают значительное влияние на выбор продуктов питания или модели потребления. Поэтому с мультикультурной точки зрения фальсификация, мошенничество или подмена мяса являются чувствительным вопросом с точки зрения культурных,

социальных и религиозных перспектив, который может разрушить социальную гармонию [49].

Следовательно, чрезвычайно важно следить за тем, чтобы мясо и мясная продукция не были фальсифицированы, правильно упакованы, маркированы и продавались на благо общественного здравоохранения, в соответствии с религиозной честностью и справедливыми экономическими практиками в пищевом бизнесе.

В то же время и сами компании производителей должны иметь возможность сертифицировать состав и происхождение своей продукции с целью защиты потребителя от мошенничества и фальсификаций. В этом сценарии прослеживаемость и аутентификация являются фундаментальными инструментами для убеждения потребителей в прозрачности и безопасности пищевых продуктов и позволяют производителям получить представление о ценности своей продукции. Прослеживаемость позволяет отслеживать источник продукта питания в любой точке производственной цепочки, что позволяет осуществлять процессы контроля качества и сокращать производство небезопасных или некачественных продуктов питания [50]. Аутентификация продуктов питания — это процесс, посредством которого продукт тестируется на соответствие описанию, содержащемуся на его этикетке [51].

Прослеживаемость и аутентификация являются неотъемлемыми компонентами системы безопасности и защиты пищевых продуктов и представляют собой фундаментальные компоненты цепочки поставок продуктов питания. Надежная система аутентификации и отслеживания может стать важным инструментом защиты потребителей, снижая вероятность употребления людьми фальсифицированных или загрязненных пищевых продуктов, а также повышая контроль поставщиков и безопасность процесса. Потребители продемонстрировали ограниченные знания о важности аутентификации и прослеживаемости пищевых продуктов [52, 53], что делает необходимым распространение потенциала и надежности методов

отслеживания с целью повышения осведомленности людей о роли надзора за пищевыми продуктами в охране здоровья и достоверности информации о прослеживаемости.

В этом контексте идентификация видов мяса становится важной областью интересов, и поэтому необходимо разработать точный, идеальный, простой, селективный и чувствительный метод обнаружения видов мяса для предотвращения и/или обнаружения фальсификации пищевых продуктов. Идентификация видов мяса в коммерчески обработанном мясе является одним из наиболее важных вопросов в пищевой промышленности [54].

Во всем мире были проведены многочисленные исследования с целью разработки идеального, простого, селективного и чувствительного метода качественного и / или количественного определения видов животных в связи с растущей мошеннической практикой в мясной промышленности [55]. Морфологические и гистологические (микроскопические) тесты в настоящее время рассматриваются как устаревшие/неподходящие для дифференцирования видов мяса, особенно в обработанных мясных продуктах, а также из-за невозможности определить точные биологические виды животных в пищевых продуктах [56, 57]. Однако сообщалось о различных аналитических методах, основанных на липидных, белковых и ДНК-биомаркерах, для определения видового происхождения мяса и мясных продуктов. Среди существующих способов обнаружения, методы на основе выявления белков или ДНК обычно используются для идентификации видов мяса, в том числе в обработанных мясных продуктах. Однако методы анализа на основе выявления специфических липидов и белков не всегда могут не подходить для мясных продуктов, прошедших глубокую переработку. Методы, основанные на белках, включают хроматографию, хроматографию-масс-спектрометрию, иммуноанализ и исследование пептидов [54]. Поскольку белки очень чувствительны и легко денатурируются при высокой температуре во время

обработки, эти методы не способны дифференцировать очень близкородственные виды животных [58].

Напротив, методы обнаружения на основе ДНК показали большой успех и считаются наиболее приемлемыми альтернативами из-за высокой стабильности, точности и эффективности даже в экологически неблагоприятных и сильно обработанных образцах [59, 60]. Среди методик обнаружения, основанных на ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее распространенным методом и считается в настоящее время золотым стандартом [61]. Методы, основанные на ПЦР, включают видоспецифичную ПЦР, полиморфизм длины рестрикционного фрагмента ПЦР (PCR-RFLP), случайно амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD), ПЦР в реальном времени (RT-PCR), цифровую ПЦР (dPCR). Технологии, основанные на ДНК, считаются более стабильными методами по сравнению с анализами на основе белка. Именно по этой причине молекулярные методы, основанные на ПЦР, широко используются для выявления наличия фальсификаций в пищевых продуктах [62].

1.2. Аналитические методы, применяемые в идентификационном анализе пищевых продуктов

Пищевая криминалистика — это научная область, занимающаяся определением подлинности, обнаружением фальсификации и любыми другими юридическими вопросами, связанными с пищевым продуктом. Пищевая криминалистика исследует применение потенциальных аналитических методов для определения подлинности и прослеживаемости пищевых продуктов. Потребность в точных и надежных аналитических методах для судебно-медицинских исследований пищевых продуктов возрастает в связи с ростом мошенничества с пищевыми продуктами во всем мире [63, 64]. Несколько аналитических методов, включая методы на основе ДНК, спектроскопические методы, спектрометрические методы, хроматографические методы, иммуноанализы с латеральным потоком и ядерные методы на основе нейтронов

и протонов, обычно используются для анализа пищевых продуктов для судебно-медицинских исследований. Применение этих методов показано на рисунке 1.

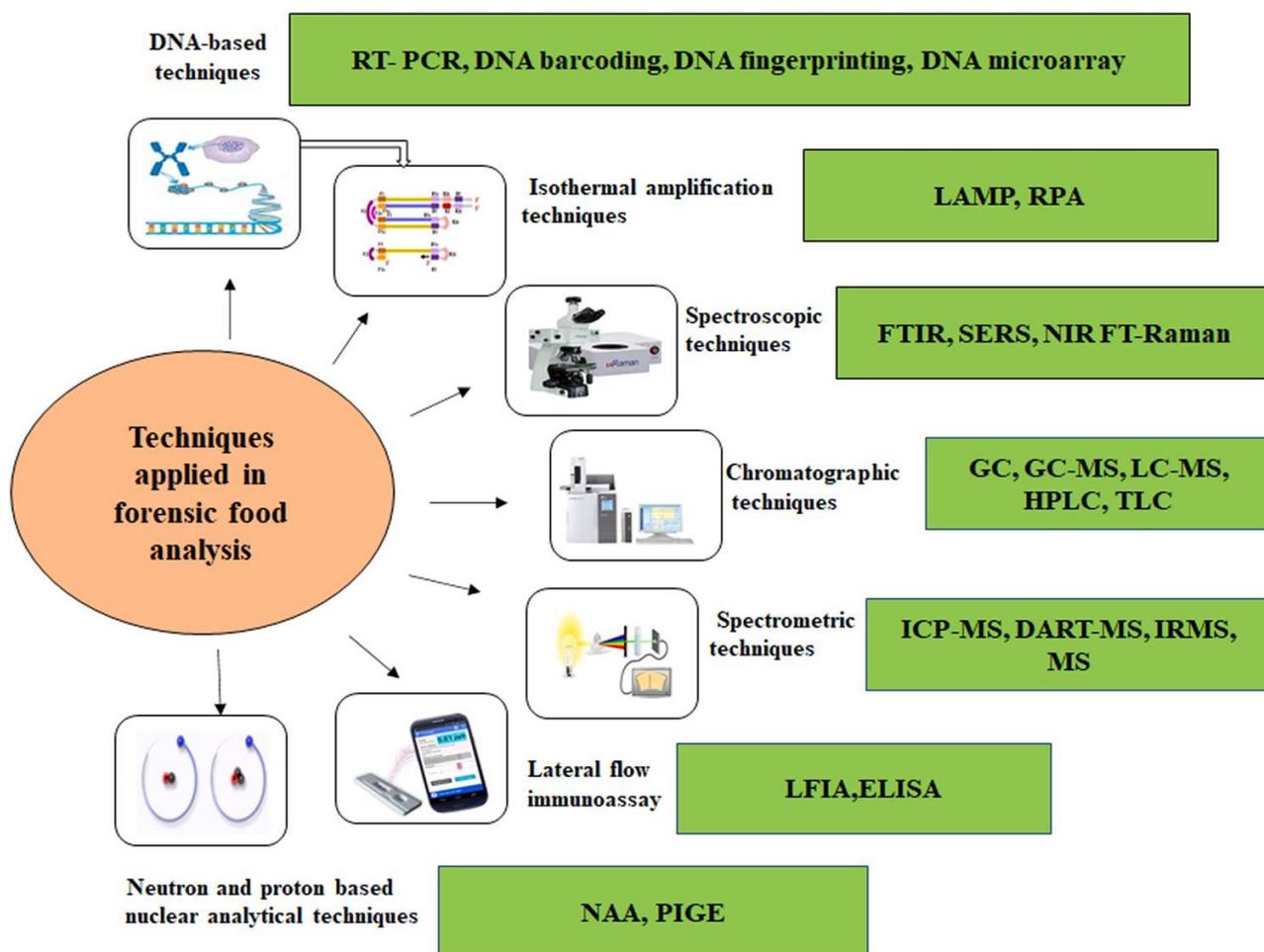


Рисунок 1 – Применение различных аналитических методов для идентификационного анализа пищевых продуктов (ОТ-ПЦР (ПЦР в реальном времени); LAMP (петлевая изотермическая амплификация); RPA (амплификация рекомбиназной полимеразы); FT-IR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье); SERS (поверхностно усиленная рамановская спектроскопия); ГХ (газовая хроматография); МС (масс-спектрометрия); ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия); ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография); ТСХ (тонкослойная хроматография); ICP-MS (масс-спектрометрия с сопряженной плазмой); DART-MS (прямой анализ в масс-спектрометрии в режиме реального времени; IRMS (масс-спектрометрия изотопных отношений); LFIA (иммуноанализ с

латеральным потоком); ELISA (иммуноферментный анализ); NAA (нейтронно-активационный анализ); PIGE (индуцированный частицами гамма-анализ).

1.2.1. Методы на основе ДНК

Методы на основе ДНК весьма эффективны для аутентификации пищевых продуктов из-за их высокой устойчивости к деградации, лучшей специфичности и высокой чувствительности. В методах на основе ДНК процедура начинается с выделения ДНК, вторым этапом является полимеразная цепная реакция (ПЦР), за которой следует амплификация и, наконец, выполняется обнаружение видов. В области контроля пищевых продуктов методы ПЦР для аутентификации зависят от актуальности баз данных, так называемых, фингерпринтов, видоспецифических последовательностей ДНК.

Методы ПЦР могут обнаруживать следовые различия в последовательности пар оснований, также известные как полиморфизм. Эти методы включают полиморфизм одиночных нуклеотидов (PCR-SNP), полиморфизм длины рестриционных фрагментов (PCR-RFLP), случайную амплифицированную полиморфную ДНК (PCR-RAPD), полиморфизм длины амплифицированного фрагмента (AFLP), полиморфизм длины простой последовательности (SSLP) и случайный полиморфизм. Амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD) для аутентификации пищевых продуктов рассматривается в другом месте [65, 66, 67]. Например, мультиплексная ПЦР в реальном времени применялась для анализа различных видов для аутентификации обработанных пищевых продуктов [68], а прямая пентаплексная ПЦР использовалась для идентификации видов мяса в азиатских пищевых продуктах. Прямая ПЦР чувствительна и воспроизводима и, следовательно, может найти потенциальное применение для идентификации нескольких видов мяса в судебно-медицинских исследованиях пищевых продуктов [69].

Помимо ПЦР, другие методы на основе ДНК, такие как метод секвенирования следующего поколения (NGS), также применялись для проверки подлинности пищевых продуктов [70]. Например, ДНК-штрихкодирование использовалось для идентификации видов в молочных продуктах и съедобной рыбе [71]. Применение ДНК-штрихкодирования и ДНК-метабаркодирования для анализа пищевых продуктов рассмотрено в нескольких исследованиях [72]. Этот метод является быстрым, доступным и чувствительным, но он не всегда подходит для пищевых продуктов с высокой степенью обработки из-за потери целостности ДНК [73].

В пищевой криминалистике основное внимание уделяется идентификации видов животных и растений [74]. Аутентификация пищевых продуктов требует различных аналитических методов в зависимости от типа образца, чтобы предоставить удовлетворительные доказательства в ходе юридических расследований. Акутис и др. утвердил набор MEAT 5.0 Aggra для обнаружения видов животных. Набор был протестирован на различных следах молока и мяса (сырых, пастеризованных и подогретых) и показал высокую чувствительность и специфичность, поэтому он может быть применен для обнаружения общего загрязнения пищевых продуктов животного происхождения и, следовательно, может быть полезен в пищевой судебно-медицинской экспертизе [75]. Другой метод ДНК-микрочипов, основанный на зондах, полученных из цитохрома b, был разработан для идентификации исчезающих видов позвоночных в пищевых продуктах. Этот метод может быть использован для идентификации мяса для судебно-медицинских исследований [73].

1.2.2. Методы изотермической амплификации

Петлевая изотермическая амплификация ДНК (LAMP) и рекомбиназно-полимеразная амплификация (RPA) — это изотермические методы, которые были разработаны для устранения определенных проблем, присущих тестам на основе ДНК. LAMP является чрезвычайно специфичным методом и

увеличивает количество амплифицированной ДНК до миллиарда копий в течение 60 минут, в то время как ПЦР может сделать только миллион копий за этот период. Изотермическую амплификацию можно проводить на водяной бане, не требуя сложного лабораторного оборудования. LAMP может использовать около шести праймеров, которые могут различать около шести конкретных мест на ДНК-матрице, тогда как ПЦР может различать только пару мест [76, 77]. Thangsunan et al. разработали колориметрический метод LAMP для аутентификации содержания курицы как в сыром, так и в переработанном мясе. Этот метод получил одобрение за его высокую специфичность для идентификации цыплят для судебно-медицинских исследований. LAMP является быстрым, дешевым, и полученные результаты этого анализа можно наблюдать с помощью pH-чувствительного индикатора, который приводит к изменению цвета. В другом исследовании сообщалось о применении LAMP в сочетании с боковым потоком для быстрого обнаружения сои и кукурузы [78]. Помимо LAMP, RPA также является очень полезным методом для определения географического происхождения различных пищевых продуктов, таких как яйца и растительная пища. Поскольку каждый образец пищи имеет свою уникальную химическую характеристику, измерение соотношения изотопов некоторых элементов, таких как углерод (C), водород (H), азот (N) и кислород (O), в этих образцах пищи может связать их с географическим положением источника. В процессе RPA участвуют три фермента, а именно рекомбиназа, одноцепочечный ДНК-связывающий белок (SSB) и полимеразы, замещающая цепь. Первоначально рекомбиназа объединяется с олигонуклеотидными праймерами, присутствующими в реакционной смеси, и помогает этим праймерам найти гомологичную последовательность на дуплексной ДНК. При спаривании праймерной и дуплексной ДНК образуется D-петля, которая стабилизируется с помощью SSB. Наконец, полимеразы связывается с D-петлей, имеющей гомологичную последовательность и праймер, и удлиняет нити в противоположном направлении, добавляя дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

(dNTP) [79, 80]. Сотело и др. разработали новый метод RPA для обнаружения *Octopus vulgaris* в пищевых продуктах. Этот метод прошел валидацию в нескольких испытаниях во многих европейских лабораториях и подтвердил свою полезность для контроля подлинности пищевых продуктов [81]. Точно так же RPA в сочетании с биосенсором бокового потока (LFB) использовался для быстрой аутентификации баранины, и, следовательно, этот метод может использоваться для аутентификации мяса для судебно-медицинских исследований [82].

1.2.3. Спектрометрические методы

Применение нескольких спектрометрических методов, включая масс-спектрометрию изотопных отношений (IRMS) и масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS), плазменную оптическую эмиссионную спектрометрию (ICP-OES), масс-спектрометрию изотопных отношений (IRMS), ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) для аутентификации нескольких пищевых продуктов, таких как мясо [83], молочные продукты, фрукты/овощи, масла и мед, рассматривается в нескольких исследованиях. Это полезные аналитические методы для обнаружения микроэлементов и определения географического, химического и биологического происхождения пищевых материалов. Эти методы стали более распространенными для судебно-медицинского анализа мясных и растительных продуктов, особенно в области судебно-медицинской токсикологии пищевых продуктов [83, 84]. Перес-Альварес и др. применили ИСП-МС для анализа основных, второстепенных и микроэлементов в винах [85]. В нескольких других исследованиях ИСП-МС использовалась для определения токсичных элементов, таких как As, Cd, Hg, Li, Ti, Rb, Ge, Ba, Cu, Cr, V, Li и Pb, в растениях. на основе пищевых продуктов [86, 87]. Этот метод является быстрым, чувствительным и точным и имеет возможность одновременного многоэлементного обнаружения и низкие пределы обнаружения. Одним из других преимуществ этого метода является предоставление информации в

нескольких образцах без требований стандартов, и поэтому этот метод подходит для судебно-медицинского анализа пищевых продуктов [88]. IRMS также является полезным методом для определения подлинности и атрибуции пищевых продуктов по ряду правовых вопросов [89]. Например, Пенг и др. использовали IRMS для анализа бразильского кофе на предмет соотношения изотопов (C, O, H и N) [90], а Парк и др. использовали этот метод для анализа соотношения изотопов. (C, H, O, N и S) для оценки географического происхождения лука [91]. Среди перечисленных выше методов в последнее время интерес вызывает MS благодаря его высокой чувствительности, селективности и аналитической гибкости. В последнее время MS используется для обнаружения прионов (инфекционных белков) и шига-токсинов (белковых токсинов), которые могут содержаться в пищевых продуктах. Во время обработки этот инструмент инактивирует прионы и шига, затем эти белки расщепляются протеазой с образованием пептидов, пригодных для анализа с помощью масс-спектрометрии [92, 93]. УФ-видимое излучение и ЯМР также использовались для аутентификации многих пищевых продуктов, включая соевые бобы, мед, пищевые масла, фруктовые соки и специи [94].

1.2.4. Спектроскопические методы

Неразрушающие спектроскопические методы становятся предпочтительными аналитическими методами для судебно-медицинских исследований из-за их высокой чувствительности, поскольку в большинстве судебных дел можно получить следовые количества образца. Быстрота, чувствительность, количественный анализ и неразрушающий характер этих методов открывают путь к сохранению аналитических подходов, что также помогает при повторном анализе в случаях спорных аналитических результатов. Таким образом, неразрушающие спектроскопические методы, такие как рамановская спектроскопия с усилением поверхности (SERS) и инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FT-IR), предпочтительнее, чем деструктивные методы, такие как GC-MS [95, 96].

Применение нескольких спектроскопических методов, включая Рамановская спектроскопия с преобразованием Фурье, ГКР, БИК-Фурье-рамановская спектроскопия, видимая микро-рамановская спектроскопия, ультрафиолетовая и видимая спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия, ближняя инфракрасная (БИК) спектроскопия и ИК-Фурье-спектроскопия для анализа пищевых продуктов были рассмотрены в других источниках [84, 97, 98, 99]. Спектроскопический анализ подразделяется на количественный и качественный анализ. Основное применение спектроскопии в анализе пищевых продуктов — определение концентрации различных компонентов в пищевых продуктах. Это приложение зависит от связи между количеством электромагнитного излучения, связанного с образцом, и концентрацией химических компонентов, имеющих в образце. Среди всех других методов спектроскопии ИК-Фурье является одним из наиболее предпочтительных методов судебно-медицинского анализа пищевых продуктов, поскольку все химические компоненты, присутствующие в образце, имеют свои уникальные спектральные характеристики. Когда инфракрасное излучение проходит через образец, часть излучения поглощается образцом, а часть передается. Достигнутый детектором сигнал представляет собой ИК-Фурье-спектр, соответствующий молекулярной сигнатуре образца. FTIR — это подходящий метод для обнаружения фальсификации и определения подлинности некоторых пищевых продуктов, включая мед, говядину, масло, специи и травы. Благодаря высокому разрешению и низкой цене анализа ИК-Фурье стал излюбленным инструментом для судебно-медицинской экспертизы пищевых продуктов. Таким образом, этот инструмент может быть полезен как для пищевой промышленности, так и для государственных органов. Помимо FTIR, SERS также может предоставлять информацию о химическом составе образцов пищевых продуктов с помощью комбинационного рассеяния световых молекул, имеющих в образце пищевых продуктов. Он использует источник лазерного излучения, который облучает образец пищи и производит достаточное

количество рамановского рассеянного света, откуда он детектируется в виде рамановских спектров с использованием ПЗС-камеры [99, 100, 101, 102, 103]. В исследовании SERS применялся для обнаружения трех алкалоидов тропана в пищевых продуктах для судебно-медицинских исследований [102]. Лим и др. применили рамановскую спектроскопию для обнаружения диоксида титана в нескольких пищевых продуктах, включая йогурт, закуски, леденцы и сливки для кофе. Спектроскопия комбинационного рассеяния света подтвердила наличие наноразмерного диоксида титана во всех этих пищевых продуктах на уровне 100 частей на миллион и выше [104].

1.2.5. Иммуноанализ с латеральным потоком

Иммуноанализ с латеральным потоком (LFIA) и твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) являются важными аналитическими методами, способными выполнять обнаружение целевых элементов на месте. Применение LFIA и ELISA в анализе пищевых продуктов рассмотрено в некоторых других исследованиях [105, 106]. Устройство бокового потока (LFD) представляет собой особый вид биосенсора, в котором слой распознавания структурирован на поверхности пористой мембраны. Мембрана поддерживает поток образца за счет капиллярности и содержит определенные элементы распознавания, которые распознаются как места обнаружения. Иногда элементами распознавания могут быть определенные антитела, где биосенсор зависит от иммунологических анализов, что приводит к иммунохроматографическим полоскам, также называемым LFIA. LFIA стали известными диагностическими инструментами благодаря своей простоте, портативности и доступности. Хорошо известным примером может быть полоска для теста на беременность, в которой антитела, покрытые наночастицами золота, используются для колориметрического определения хронического гонадотропного гормона человека. Включение спектроскопии лазерно-индуцированного пробоя (LIBS) для анализа LFIA и модифицированного лантаноидов LFIA обеспечивает быстрое и портативное

обнаружение биомолекул. Этот тип обнаружения удобен при судебной инспекции пищевых продуктов, где решающее значение имеют быстрота, точность и мобильность. Несмотря на отличные характеристики, LFIA способен обнаруживать один целевой аналит одновременно, в то время как мультиплексная способность требуется для многих приложений, таких как безопасность пищевых продуктов. Кроме того, мультиплексная LFIA повышает эффективность теста, а также снижает его стоимость [106, 107, 108, 109, 110]. Чен и др. разработала иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления остатков флуниксина (опасных для здоровья человека) в молоке. Сообщается, что в этом методе предварительная обработка образцов проще, чем в традиционных методах анализа большого количества образцов в течение нескольких минут, поэтому этот анализ может быть полезен для судебно-медицинских исследований, связанных с пищевыми продуктами, без необходимости сложных методов [111]. В другом исследовании был разработан LFIA для обнаружения фипронила в яйцах и огурцах. Этот метод подходит для обнаружения химических веществ в пищевых продуктах для судебно-медицинских исследований [112].

1.2.6. Хроматографические методы

Есть несколько возможных применений хроматографических методов в пищевой криминалистике. Применение методов жидкостной хроматографии с дефисом и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым излучением (ЖХ-УФ), масс-спектрометрии высокого разрешения (ЖХ-МСВР) для определения подлинности различных пищевых продуктов, обнаружения фальсификация, а также идентификация токсичных материалов, таких как российский VX (VR), в мясных и растительных продуктах с судебно-медицинской точки зрения хорошо объяснены во многих исследованиях [113, 114, 115, 116, 117]. Газовая хроматография (ГХ) может быть очень полезным аналитическим методом при анализе пищевых продуктов, особенно в случае летучих соединений. Этот

метод позволяет оценить качество пищевых продуктов с точки зрения вкуса и аромата. Многочисленные количества этих соединений являются хиральными, и поэтому для анализа жидких пищевых продуктов, таких как молоко, чай, масло и напитки, такие как пиво, были установлены подходы энантиоселективной ГХ. Соотношение энантиомеров имеет решающее значение для определения происхождения эфирных масел и ароматизаторов во фруктах. Более того, энантиоселективные методы ГХ можно использовать для оценки качества и аутентичности пищевых продуктов посредством анализа вкуса и аромата, и соотнесения их с их географическим происхождением [110, 118]. Чан и др. разработала новый метод ЖХ-МС/МС для обнаружения аристоксовых кислот (нефротоксичных и канцерогенных соединений) в пищевом зерне. Этот метод может превращать аристоксовые кислоты в их аристоксамиды, что приводит к их аналитической чувствительности, и, следовательно, этот метод может быть полезен для обнаружения этих кислот в пищевых зернах для судебно-медицинских исследований [119]. В другом исследовании для количественного обнаружения ветеринарных препаратов в молоке, меде и яйцах был разработан многоостаточный метод с использованием наножидкостной хроматографии с масс-спектрометрией высокого разрешения (nanoLC-HRMS). Разработанный метод показал высокую чувствительность, однако этот метод обладает некоторыми недостатками, такими как требование предварительной обработки образца, но метод добавления стандарта не является обязательным, поэтому он может быть полезен в приложениях для судебной экспертизы пищевых продуктов [120].

1.2.7. Методы ядерного анализа (НАТ) на основе нейтронов и протонов

Нейтронно-активационный анализ (НАА) широко используется в судебно-медицинской экспертизе пищевых продуктов. Поскольку образцы пищевых продуктов требуют высокой точности и правильных методов определения их элементного состава, предпочтительны неразрушающие

аналитические методы. Образцы продуктов питания могут быть проанализированы с помощью NAA неразрушающим образом как на качественный, так и на количественный элементный состав. NAA применялся для определения как низких, так и высоких концентраций йода в присутствии интрузивных элементов, таких как марганец, натрий, калий, хлор и бром. С помощью этого метода была проанализирована концентрация йода в пищевых продуктах, таких как молоко и порошок для лечебных напитков [121]. Текущий нормализованный метод гамма-излучения, индуцированного частицами (PIGE), *in situ* использовался для определения следовых концентраций фтора в пищевых продуктах [122]. В исследовании Datta et al. Анализ NAA с использованием реактора Апсара-У использовался для определения микроэлементов в сырых, а также в марочных образцах куркумы, которые могут быть полезны для судебно-медицинских исследований. Было определено около 13 микроэлементов, таких как хром, диапазон концентраций обоих образцов куркумы сравнивался с безопасными предельными значениями ВОЗ [123]. В связи с обширным обнаружением пер- и полифторалкильных веществ (PFAS) и его распространением по всему миру, для обнаружения PFAS необходимо применять особые правила и методы, важные с судебной точки зрения. Доступные методы, такие как PIGE, могут характеризовать следовые количества PFAS, и поэтому был разработан новый подход к судебной экспертизе PFAS, основанный на стандартных методах. Этот подход состоит из трех разделов, включая метод проверки для оценки общих свойств массовой сигнатуры PFAS. Стандартный чувствительный метод для измерения содержания ПФАС и третий метод определения изомеров соответствующих ПФАВ. Эти методы могут быть применимы для нескольких материалов из разных источников, таких как водная пленка, различные материалы, контактирующие с пищевыми продуктами [124].

2. Анализ научно-информационных источников и результатов теоретических и экспериментальных исследований в части установления предельно допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции, а также применяемых методов и методик по количественному определению уровня ДНК компонентов состава мясной продукции

Мошенничество с пищевыми продуктами представляет собой экономическую и потенциальную проблему безопасности пищевых продуктов для промышленности, потребителей и правительств во всем мире. Даже если не существует общепризнанного определения, это считается преднамеренным актом искажения информации о продуктах питания для получения экономической выгоды и часто включает в себя модификации продуктов питания и/или связанной с ними документации. Согласно Директиве (ЕС) № 2017/1371 мошенничеством считается любое действие или бездействие, связанное с использованием или представлением ложных, неверных или неполных заявлений, или документов либо с неразглашением информации в нарушение конкретного обязательства, и любая другая незаконная деятельность, затрагивающая финансовые интересы Европейского Союза (ЕС) [125].

Мошенничество с пищевыми продуктами может нанести экономический и репутационный ущерб пищевым компаниям, которые принимают непосредственное участие, а также промышленным ассоциациям, но и компетентные органы, отвечающие за обеспечение безопасности пищевых продуктов, могут потерять общественное доверие из-за реальной угрозы здоровью потребителей. Потребителей всегда больше беспокоят многие опасности, связанные с пищевыми продуктами, такие как патогенные микроорганизмы или химические остатки, а также мошенничество с пищевыми продуктами. Кажется, что самое низкое доверие к пищевой промышленности, поскольку хорошо известно, что основная ответственность за безопасность пищевых продуктов лежит на операторах пищевого бизнеса. Этим плохим

практикам способствуют многие факторы, такие как различия в законодательстве о пищевых продуктах между странами, устаревание средств контроля, отсутствие прослеживаемости, легкость фальсификации пищевых продуктов и трудности в отслеживании и обнаружении мошенничества. Кроме того, мошеннические действия наказываются не столь строгими санкциями, как за другие нарушения, даже если они могут осуществляться мошенником-одиночкой или небольшой группой преступников, а также входить в состав организованных преступлений.

Существуют различные информационные базы данных, которые можно использовать для оценки случаев мошенничества с пищевыми продуктами. База данных по экономически мотивированным фальсификациям (ЕМА) находится в Центре защиты пищевых продуктов в Соединенных Штатах (США) и предоставляет информацию о пищевом продукте, стране происхождения и годе, типе мошенничества, последствиях для здоровья и способах неправильной маркировки. Эта база данных увеличилась на 14,3% с 2015 г. по 2019 г., тогда как остальные виды показали в те же годы противоположную тенденцию, начиная с 22,2 до 15% для документов и с 33,3 до 20% для замены. Категории продуктов, наиболее затронутые нарушениями, включали рыбу и рыбопродукты, жиры и масла, а также мясо и мясную продукцию, кроме мяса птицы и продукции его переработки.

Мошеннические действия вызывают недобросовестную конкуренцию и искажение торговли с потенциальным воздействием на местную или даже международную экономику. Тем не менее, некоторые виды мошенничества также могут повлиять на потребителей, вызывая инциденты с пищевыми продуктами в глобальном масштабе и, как следствие, приводя к внедрению системы управления оповещениями на международном уровне, такой как Глобальная инициатива по безопасности пищевых продуктов (GFSI), которая была принята примерно 65% мировых партнеров по торговле продуктами питания [126]. Согласно GFSI, уязвимость к мошенничеству с пищевыми

продуктами — это восприимчивость или подверженность риску мошенничества, который может повлиять на здоровье потребителей, если его не устранить. На него влияют многие факторы, такие как цена и спрос на определенные продукты питания, идентификация страны происхождения и сложность обнаружения мошеннических действий. Более того, важными детерминантами такой уязвимости являются мотивация, возможности и отсутствие или недостаточность систем контроля [127]. Оценка уязвимости групп продукции к экономически мотивированным фальсификациям ключевой показатель для Департамента управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, США) в Законе о модернизации безопасности пищевых продуктов с целью защиты пищевых продуктов от преднамеренной фальсификации и предотвращения действий, направленных на создание широкомасштабных рисков для здоровья населения [128]. Европейское бюро по борьбе с мошенничеством (OLAF) проводит расследования с целью борьбы с мошенничеством, коррупцией и любой другой незаконной деятельностью, затрагивающей финансовые интересы ЕС, и компетентные органы государств-членов могут заключать административные соглашения с OLAF в отношении передачи информации, проведение расследований и любые последующие действия. В Регламенте (ЕС) № 2017/625 об официальном контроле указано, что компетентные органы должны выявлять возможные преднамеренные нарушения его правил путем мошенничества или обмана [129]. В частности, они собирают любую информацию, указывающую на то, что потребители могут быть введены в заблуждение в отношении характера, идентичности, свойств, состава, количества, срока годности, страны происхождения или места происхождения, способа изготовления или производства продуктов питания. Затем Исполнительный регламент Комиссии (ЕС) № 2019/1715 установил правила обмена информацией, данными и документами в Системе управления информацией для официального контроля (IMSOC) [130]. Согласно данному Регламенту, сеть RASFF включает

компетентный орган государства-члена, Комиссию, компетентный орган третьей страны или любую другую международную организацию, которая может иметь доступ к электронной системе, интегрированной в IMSOC. Различают разные категории уведомлений:

- оповещение и информация, связанные с прямыми или косвенными рисками в пищевых продуктах или кормах, которые требуют или не требуют быстрых действий со стороны другого члена сети RASFF;

- информация для последующего наблюдения, связанная с продуктом, размещенным на рынке другого члена сети RASFF;

- информация, требующая внимания, относящаяся к продукту, представленному только в уведомляющей стране-члене сети, или который не был размещен или больше не находится на рынке;

- отказ на границе, связанный с отказом от партии, контейнера или груза пищевых продуктов или кормов компетентным органом на пограничном посту в пределах ЕС.

Кроме того, в странах Южной Америки и Азиатско-Тихоокеанского региона есть свои собственные национальные агентства по безопасности пищевых продуктов, в то время как в менее развитых странах отсутствие мер контроля часто ослабляет защиту, которую следует принимать от пищевых опасностей. Фактически, они, как правило, чаще встречаются в продуктах питания, поступающих из стран, где национальные нормы и системы надзора менее строгие [131].

Увеличение числа случаев мошенничества с продуктами питания можно частично объяснить появлением новых рынков с разными ценами на продукты питания по всему миру. Сегодня международная торговля пищевыми продуктами предлагает большое разнообразие продуктов, но, как следствие, инциденты с пищевыми продуктами могут затрагивать весь земной шар. Продовольственный кризис можно рассматривать как случайное или преднамеренное событие, представляющее серьезную опасность для здоровья

населения и требующее неотложных действий. Многие эпизоды характерны для последних десятилетий, например, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота или коровье бешенство, вызвавшие гибель около 200 000 голов крупного рогатого скота в Европе, или заражение домашней птицы диоксином из-за потребления фальсифицированных кормов [131].

2.1. Актуальные примеры фальсификации пищевой продукции в международной практике

Мошенничество с пищевыми продуктами, как правило, считается скорее экономической проблемой, чем проблемой безопасности пищевых продуктов, но задокументированные во всем мире скандалы показали, что они могут даже представлять серьезную опасность для здоровья населения.

Важная фальсификация продуктов питания была обнаружена в 2013 году и названа СМИ скандалом с кониной. Присутствие конины в переработанных пищевых продуктах, маркированных как говядина, было впервые обнаружено в Соединенном Королевстве и Ирландии во время рутинных контрольных анализов, но настоящую озабоченность вызывала возможность обнаружения фенилбутазона, нестероидного противовоспалительного ветеринарного препарата, используемого у лошадей, пораженных скелетно-мышечные нарушения и травмы мягких или твердых тканей [2]. Это соединение было запрещено FDA и Европейским агентством по лекарственным средствам для лошадей, предназначенных для убоя, из-за его токсичности для костного мозга, вызывающей лейкопению, агранулоцитоз, апластическую анемию и тромбоцитопению [3]. Затем Европейская комиссия опубликовала Рекомендацию Комиссии 2013/99/ЕС о скоординированном плане контроля пищевых продуктов, продаваемых и/или маркированных как содержащие говядину, и конины, предназначенной для потребления человеком, с целью обнаружения остатков фенилбутазона [132]. Результаты этого плана контроля подтвердили только отказы, связанные с маркировкой мясных продуктов в большинстве государств-членов, но наличие исследуемого фармакологически

активного вещества не показало широко распространенного повторяющегося несоблюдения. Затем Рекомендацией Комиссии 2014/180/ЕС был установлен второй набор скоординированных мер контроля с целью оценки распространенности мошеннических практик, т. е., например, наличия конины в расфасованных пищевых продуктах или упакованных в торговых точках для потребителей, на в составе которых говядина указана в качестве основного ингредиента [133].

Другими скандалами, связанными с цепочкой поставок мяса, были скандал с тухлым мясом, когда около 150 тонн тухлого мяса было распространено в немецких ресторанах в 2006 году, и операция «Карна Фрака» на бразильском рынке в 2017 году, характеризующаяся распространением тухлого мяса из-за плохой гигиены и коррупции государственных чиновников, включая инспекторов, политиков и даже президента [23].

В коммерческих махинациях, как правило, присутствует обман или неполная и вводящая в заблуждение информация, а также потеря качества товара. Конкретными элементами, характеризующими такое мошенничество, являются несоблюдение пищевого законодательства, умышленное введение потребителя в заблуждение и получение финансовой выгоды. Примерами коммерческого мошенничества являются фальсификация, подделка, неправильная маркировка, фальсификация, перенаправление и имитация, но мошенническими действиями могут считаться и другие виды недобросовестной практики, такие как неправильная температура хранения или отсутствие срока годности на этикетке пищевых продуктов.

Фальсификация. Одним из наиболее распространенных видов мошенничества является фальсификация, определяемая FDA как мошенническая и преднамеренная замена или добавление внутрь продукта с целью увеличения его кажущейся ценности или снижения себестоимости производства. Это включает также разбавление повышенным количеством уже присутствующего ингредиента, а также добавление или замену веществ для

маскирующего разбавления. Последствия, которые фальсификация пищевых продуктов может иметь для общественного здравоохранения, зависят от того, какая примесь используется и представляет ли она непосредственный риск, например, токсичное или смертельное загрязняющее вещество. Действительно, он часто остается незамеченным из-за различий в мерах контроля и регулирующих учреждениях в разных странах.

Замена. В мясной промышленности мошенничество с заменой особенно касается производных продуктов, состоящих из мясного фарша, смешанного с другими ингредиентами для приготовления колбас, салями, колбасок, кебабов, а также гамбургеров, мясных шариков и макаронных изделий с начинкой. Когда используется сырое мясо, принадлежащее к разным видам животных, оно должно быть правильно указано на этикетке, в противном случае это становится подделкой. Упомянутый выше скандал с кониной является лишь примером, но и другие части забитых животных, такие как жир, коллаген, субпродукты или внутренние органы, могут быть добавлены в мясной фарш в процессе производства, чтобы конечный продукт получился редкого качества [134]. Типичными мясными продуктами, потребляемыми в некоторых альпийских регионах Швейцарии, Австрии, Германии и Италии, являются сырые колбасы или ветчина, полученные из диких животных, таких как серна, благородный олень или косуля. Малая численность серны, а также большие трудности в охотничьей деятельности из-за высокогорных местообитаний делают такое мясо более дорогим и поэтому легко поддаются замене, так как очень похожи на другую дичь по вкусу, цвету и внешнему виду [135]. Алейра — это традиционный копченый и естественно ферментированный мясной продукт Португалии, который получают из смеси ингредиентов, то есть свинины и сала, мяса птицы, пшеничного хлеба, оливкового масла, соли, чеснока и специй. Вариант, приготовленный из мяса дичи (благородный олень, заяц, дикий кролик, кабан, фазан и куропатка), называется Alheira de caça, но он дороже, и по этой причине его можно подвергнуть мошеннической замене

мясом. Добавление коровьего мяса или отсутствие заявленных видов дичи (благородный олень, заяц и кролик) в образцах мяса дичи колбасных изделий Alheira было обнаружено с помощью видоспецифических ПЦР-анализов [136].

Замена молока, полученного от одного вида, другим из-за более низкой стоимости и доступности в течение всего года также распространена в производстве молочных продуктов. Добавление коровьего молока для производства моцареллы из буйволиного молока не только приводит к изменению органолептических характеристик конечного продукта, но и представляет риск для потребителей с непереносимостью или аллергией на коровье молоко.

Аналогичное мошенничество касается использования бычьей сыворотки для производства рикотты, заявленной как полученная из буйволиного молока. Вместо этого часто проводят частичную замену козьего молока коровьим молоком, потому что первое имеет меньшие жировые шарики и разные казеины, и поэтому оно предпочтительнее для младенцев, пожилых людей и людей с аллергией на коровье молоко.

Разбавление, добавление или улучшение. Воду можно добавлять и к мясу, определяя ее стандартным методом по соотношению вода/белок. Добавление других источников белка или солей, таких как хлорид натрия и фосфат, и других неингредиентов (каррагинан, ксантановая камедь, мальтодекстрин и коллаген) может увеличить влагоудерживающую способность мяса (WHC), что представляет собой экономическое мошенничество, связанное с набором веса. Более того, увеличение WHC повышает сочность мяса за счет расслабления мышечных волокон, что приводит к большей нежности. Даже если добавление солей снижает соотношение вода/белок, более высокое содержание воды восстанавливает это соотношение, близкое к нормальным значениям [137].

В мясных продуктах должно быть указано количество каждого ингредиента, и такая информация известна как декларация количества ингредиентов. Определение мяса ограничивает термин скелетными мышцами, а

избыток жира и/или соединительной ткани должен указываться отдельно на этикетке. В отношении этого аспекта Регламентом (ЕС) № 1169/2011 установлено, что максимальное содержание жира для млекопитающих составляет 25 %, за исключением свиней, у которых оно может достигать 30 %, а у кроликов и птиц оно соответствует 15 % [138]. У последних категорий животных соотношение коллаген/белок составляет 10%, в отличие от млекопитающих и свиней, где это значение составляет 25%. Действительно, в мясных продуктах и мясных полуфабрикатах, содержащих белки различного животного происхождения, а также при добавлении воды в процентном содержании выше 5%, на этикетке должно присутствовать указание на такие вещества. При этом соотношение коллаген/мясной белок фарша из говядины и других видов должно быть $\leq 15\%$, за исключением нежирного фарша и фарша из свинины, где такое соотношение составляет ≤ 12 и $\leq 18\%$ соответственно. Содержание жира в нежирном фарше составляет $\leq 7\%$, в говядине, других видах и фарше, содержащем свинину, ≤ 20 , 25 и 30% соответственно.

Однако, если вместо мышечной ткани используются более дешевые субпродукты/органы, их обнаружение может быть затруднено, поскольку все ткани одного вида имеют одинаковую последовательность ДНК. Недавно Вишнурадх и соавторы описали основанный на микроРНК метод qRT-PCR для быстрого обнаружения присутствия куриной печени, сердца и желудка в продуктах из куриного фарша с хорошей воспроизводимостью и простой интерпретацией результатов [134]. Jiang, Cheng, and Shi (2020) описали применение гиперспектральной визуализации (HSI) в сочетании с хемометрикой для количественной оценки и визуализации добавления более дешевого мяса челюсти в свиной фарш для подачи в качестве начинки в пищу [139].

Использование окиси углерода (CO) в упаковке мяса и рыбы до сих пор вызывает споры. В то время как некоторые страны, т.е. США, Канада, Австралия и Новая Зеландия, одобряют его применение в пищевой

промышленности, в государствах-членах ЕС он запрещен из-за возможной опасности для здоровья, из-за образования карбокси-гемоглобина вместо оксигемоглобина, но также для потенциального мошенничества, вводящего в заблуждение потребителей, поскольку СО может маскировать явления порчи, происходящие в продукте. Его часто используют в мясе тунца, поскольку он повышает стабильность красного цвета за счет прочного связывания с железопорфириновым участком миоглобина, но его можно использовать и в мясе говядины, поскольку он задерживает образование метмиоглобина, ответственного за коричневый цвет [140].

Подделки. Подделки — это репродукции или заменители пищевых продуктов, очень похожие или идентичные оригиналу. Они влияют на подлинность продуктов питания, а также могут касаться упаковки, маркировки и товарных знаков. Итальянская пищевая промышленность представляет собой одного из крупнейших производителей продуктов питания в ЕС с большими объемами экспорта, но она также подвергается многим мошенничествам с продуктами питания. Что касается мясной цепочки, мошенничество с аутентификацией можно разделить на следующие основные области: происхождение мяса (т. е. порода, географическое происхождение, дикие и фермерские животные, органическое или традиционное производство, кормление и мясные отрубы), обработка мяса (например, свежее или размороженное мясо) и немясные ингредиенты, такие как вода или добавки. Кроме того, важен возраст убоя, так как мясо молодых животных часто дороже, чем мясо старых животных [18].

Потребители считают органическую продукцию более выгодной, чем традиционную, и поэтому готовы платить за ее продукцию высокие цены. Однако во многих странах были продовольственные скандалы, когда некоторые товары продавались как органические, но не производились в соответствии с органическими стандартами. В 2011 году итальянская финансовая полиция обнаружила, что обычные продукты из Восточной Европы (Молдавия и

Румыния) продавались как органические как в Италии, так и в других странах, и эта операция получила известность как «Кот в сапогах». Мошенничеством, вызвавшим скандал, стала подделка сертификатов на органическое производство [141].

В 2019 году Комиссия ЕС начала целенаправленные действия в отношении продуктов, ложно заявленных как органические, но не соответствующих стандартам такого производства. В общей сложности было изъято 24 тонны, 162 тонны были понижены до обычного статуса, и было проведено 19 уголовных расследований и 105 административных процедур, в результате которых были арестованы 20 человек [142].

Неправильная маркировка. Другие виды мошенничества, которые изменяют не продукт, а его атрибуты, такие как неправильная маркировка или фальсификация, могут вызвать серьезные проблемы со здоровьем у людей, проявляющих чувствительность к некоторым аллергенам, поскольку они не указаны на этикетке. Точная маркировка пищевых продуктов необходима для обеспечения безопасности пищевых продуктов и правильного выбора для потребителей. В общей сложности 134 (49,1%) из 273 уведомлений о неправильной маркировке различных категорий пищевых продуктов, описанных RASFF за 2015–2020 годы (по содержанию аллергенов) были оповещениями, из них 42 (15,38%) относились к готовым блюдам и закускам, а еще 25 (9,15%) и 23 (8,42%) относились к крупам и рыбе и рыбопродуктам, кондитерским изделиям соответственно. Наиболее уведомляющими странами были Нидерланды, за которыми следуют Дания, Италия и Великобритания, тогда как среди стран происхождения были Нидерланды, Германия, Бельгия и Великобритания.

Некоторые примеры неправильной маркировки уведомлений в период 2015-2020 гг описанные в RASFF включают:

- незадекларированные ингредиенты или аллергены (кунжут, миндаль, молоко, яйцо, соя, горчица, глютен, пшеница, фундук, рыба, моллюски, альбумин, разные красители);

- неверная маркировка (неверная страна происхождения, охлажденная рыба указана как замороженная, дата заморозки, номер разрешения на этикетке не совпадает с номером в сертификате);

- отсутствие/недостаточная маркировка (отсутствие предупреждения);

- неправильная или неполная маркировка.

Ненадлежащие, отсутствующие или даже поддельные санитарные сертификаты и/или заверенные аналитические отчеты, подтверждающие неправильную маркировку, а также ошибочные импортные декларации могут стать причиной отказа от ввозимых пищевых продуктов на пограничном посту. Наиболее репрезентативными категориями продуктов питания, включенными в 544 уведомления об отклонении на границе, о которых сообщило RASFF с 2015 по 2020 год, были орехи, продукты из орехов и семена (35,11%), за ними следуют фрукты и овощи (15,63%), травы и специи (15,44%), а также рыба и рыбопродукты (12,69%). Великобритания была самой часто уведомляющей страной: 158 (46,2%) уведомлений по последней категории и 133 (83,1%) из 160 уведомлений о попытках незаконного ввоза.

Декларация об аллергенах: от скрытой к предупредительной формулировке «может содержать». Оценки потребителей, страдающих пищевой аллергией, варьируются от 1 до 2% взрослых и 5–8% детей в западных странах, и строгий отказ от аллергенных продуктов питания является единственной профилактической мерой [143]. Неадекватная маркировка аллергенных ингредиентов представляет серьезную опасность для здоровья потребителей, страдающих аллергией. Наиболее распространенными симптомами аллергической реакции являются боль в животе, рвота, экзема, крапивница, астма и опасный для жизни анафилактический шок. Расследование, проведенное скандинавскими контрольными органами в

отношении пищевых компаний, производящих хлебобулочные изделия, шоколад/конфеты, готовые блюда, мясные и рыбные продукты, показало, что некоторые аллергены, такие как белок молока (казеин), белок яичного белка, фундук, арахис и глютен не были заявлены как ингредиенты. Молоко и фундук обычно обнаруживались в шоколаде/конфетах и хлебобулочных изделиях в количестве 12 и 1,9% соответственно, без каких-либо указаний в списке ингредиентов. Что касается белка яичного белка и глютена, то между продуктами, маркированными такими аллергенными ингредиентами, и продуктами, не содержащими их, не было выявлено существенных различий. Самые высокие концентрации (550 мг яичного белка/кг и 18500 мг фундука/кг) были обнаружены в продуктах, в которых аллергены не были правильно расшифрованы [144].

Потребители-аллергики полагаются на информацию, представленную на этикетке пищевого продукта, чтобы определить, содержит ли он аллерген. Список аллергенов, требующих обязательного указания на этикетке, одинаков для многих стран, т. е. государств-членов ЕС, Канады и США, а также Австралии и Новой Зеландии, включая злаки с глютеном, рыбу, ракообразных, молоко, яйца, соевые бобы, арахис, лесные орехи и сульфиты в концентрациях ≥ 10 мг/кг. Кроме того, другие аллергены (например, моллюски, кунжут, горчица, сельдерей и люпин) указаны в списке, установленном Регламентом (ЕС) № 1169/2011, в то время как кунжут и моллюски вместе с пчелиной пылью являются дополнительными обязательными требованиями для маркировка пищевых продуктов в соответствии с пищевыми стандартами Австралии и Новой Зеландии [138, 143].

Сульфиты широко используются в качестве пищевых добавок благодаря многим свойствам: они действуют как ингибиторы как ферментативных реакций, так и роста микробов, уменьшая порчу продуктов, а также как усилители цвета или отбеливатели, а также как антиоксиданты и поглотители кислорода. Однако они могут иметь несколько побочных и/или токсических

эффектов, таких как астматические реакции и бронхоспазм, крапивница, гиперемия, брадикардия и дисбактериоз микробиоты полости рта и кишечника. Они могут вызывать дефицит витаминов (например, тиамина, фолиевой кислоты, пиридоксаля и никотинамида), способствуя их деградации [145].

В соответствии с законодательством ЕС (Регламент (ЕС) № 1333/2008 и последующие поправки) они разрешены в качестве диоксида серы и его солей во многих категориях пищевых продуктов с различными максимальными уровнями, например, в свежих фруктах и овощах в пределах от 10 мг/кг [146]. виноград, свежие личи и черника до 800 мг/кг для мякоти хрена, сушеные фрукты и овощи от 50 мг/кг (сушеный кокос) до 2000 мг/кг (курага, персики, виноград, чернослив и инжир), фруктовые соки от 50 мг/кг (апельсиновый, грейпфрутовый, яблочный и ананасовый сок) до 2000 мг/кг (концентрированный виноградный сок для домашнего виноделия), алкогольные и безалкогольные напитки, полученные из фруктов (200 мг/кг), а некоторые морепродукты, в частности, свежие, замороженные и приготовленные головоногие моллюски и ракообразные с более низкими максимальными пределами (150 мг/кг), чем ракообразные, принадлежащие к семействам Penaeidae, Solenoceridae и Aristaeidae (300 мг/кг, более 120 единиц на кг), и сушено-соленые рыба семейства тресковых (200 мг/кг). Что касается мясных продуктов, то только сосиски для завтрака, мясо для гамбургеров с минимальным содержанием овощей и/или злаков, смешанных с мясом, а также некоторые другие традиционные испанские и португальские полуфабрикаты из свинины для колбасных изделий (*salsicha fresca*, *longaniza fresca* и *butifarra fresca*) можно производить с добавлением этих добавок при максимальной концентрации 450 мг/кг. И наоборот, сульфиты нельзя использовать в свежем мясе, так как они могут уменьшить образование слизи и посторонних привкусов, а также деградацию других структурных компонентов, придавая продукту ложный и опасный вид свежести и даже увеличивая срок его хранения. Кроме того, в других странах, таких как Канада и США, их

использование в мясных продуктах запрещено, в то время как в Австралии и Новой Зеландии они разрешены в переработанном мясном фарше, продуктах из птицы и дичи, а также в мясной выпечке и замороженных сырых готовых мясных продуктах, или ферментированные не подвергнутые термической обработке измельченные продукты из мяса и птицы в Южной Африке и Индии, соответственно [147]. Тем не менее, как сообщают Carrabs et al., их можно обманным путем добавлять в продукты из свежего мясного фарша (гамбургер из свинины и сосиски) в концентрациях от 13,3 до 1278,9 мг/кг [145]. Действительно, Томашевич и др. отметили, что внедрение НАССР сербскими производителями мяса сократило их незаконное использование в мясных полуфабрикатах и свежих переработанных мясных продуктах, снизив уровни с 33,6 до 19,3 мг/кг за 10 лет мониторинга [148]. Даже если последние значения были намного ниже, чем найденные Carrabs et al. их наличие представляло собой пока непропорциональное действие, так как сульфиты разрешены только в вышеупомянутых мясных продуктах [145].

2.2. Сравнительный обзор и последние достижения в области методологии обнаружения фальсификации мясной продукции

2.2.1. Технологии на основе ДНК

ДНК является основным структурным элементом для хранения, репликации и передачи генетической информации. ДНК существует во всех тканях животных и гораздо более консервативна, чем белки [149]. Что еще более важно, фрагменты ДНК показали лучшую термостабильность, чем белки в переработанном мясе, поэтому их можно выбрать в качестве маркеров для определения подлинности переработанного мяса [59]. Содержание ДНК в различных органах и тканях животного может варьировать, что может повлиять на количественный анализ состава мясной продукции. Нуклеотидная последовательность ДНК одинакова во всех органах и тканях животного, что не позволяет дифференцировать продукты убоя в рамках одного вида животного. Тем не менее, ПЦР и производные от нее технологии, основанные на ДНК, являются наиболее часто используемыми методами обнаружения фальсификации мяса и мясных продуктов благодаря их чувствительности, простоте и надежности. (Таблица 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ распространенных методов фальсификации мяса

Метод	Специфичность*	Подготовка проб	Время обнаружения	Требования к оператору**	Стоимость** *	Коммерческая доступность
Прямая ПЦР Direct PCR	Высокая и уязвимая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная оценка	+++++++	Профессиональный	Высокая	Доступны коммерческие комплекты
ПЦР в реальном времени Real-time PCR	Высокая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная	+++++++	Профессиональный	Высокая	Доступны коммерческие комплекты

		оценка				
полиморфизм длины рестрикционных фрагментов PCR-RFLP	Высокая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная оценка	+++++++	Профессиональный	Высокая	Доступны коммерческие комплекты
Петлевая изотермическая амплификация LAMP	Высокая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная оценка	+++	Профессиональный	Высокая	Доступны коммерческие комплекты
Цифровая капельная ПЦР ddPCR	Высокая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная оценка	+++	Профессиональный	Высокая	Нет
ДНК штрихкодирование DNA barcoding	Высокая	Отбор проб → измельчение или дробление → экстракция ДНК → очистка → количественная оценка	+++	Профессиональный	Высокая	Общедоступные базы данных
ИФА ELISA	Высокая	Образец измельчен → экстракция белка → количественный анализ	+++	Простое обучение	Низкая	Доступны коммерческие комплекты
Белковые биосенсоры Protein immunosensor	Высокая	Образец измельчен → экстракция белка → количественный анализ	+++	Простое обучение	Низкая	Нет
Протеомный анализ Protein mass	Высокая	Образец земли → экстракция белка → очистка → ферментный гидролиз	+++++++	Профессиональный	Высокая	Нет

Метаболомный анализ Metabolite profiling	Низкая и уязвимая	Метаболомика: измельчение образца → экстракция метаболитов → очистка; электронный нос: нет или мало	+++++++	Профессиональный	Высокая	Нет
Инфракрасная спектроскопия IRS	Низкая и уязвимая	Нет или мало	+	Простое обучение	Низкая	Доступно коммерческое портативное устройство
Спектроскопия комбинационного рассеяния света RS	Низкая и уязвимая	Нет или мало	+	Простое обучение	Низкая	Доступно коммерческое портативное устройство
Гиперспектральная визуализация HSI	Низкая и уязвимая	Нет или мало	+	Профессиональный	Низкая	Нет
Спектроскопия лазерно-индуцированного пробоя LIBS	Высокая	Нет или мало	+	Профессиональный	Низкая	Нет

*Специфичность: Высокая – 85-100%; Высокая и уязвимая – 70-85%; Низкая и уязвимая – 35-70%.

**Требования к оператору: Профессиональный – квалификация: высшее образование, специализация лабораторное дело. Исполнение — аттестованная лаборатория; Простое обучение – квалификация на уровне освоения бытовой техники Исполнение — производственный цех.

***Стоимость: Высокая — подразумевают затраты на вспомогательное оборудование и постоянные затраты на коммерческие тест-системы. Низкая — подразумевает использование базовой реактивы или вообще без нее

Гены-мишени и фрагменты ДНК, используемые в качестве маркеров для идентификации фальсификации мясных продуктов, в основном были получены из митохондриальной ДНК (мтДНК) (рисунок 2), такой как область митохондриальной D-петли, цитохром b (CytB) гены, гены субъединицы I, II и III цитохром-с-оксидазы (COI, COII и COIII), субъединицы 6 и 8 АТФазы (АТФаза 6 и АТФаза 8), 12SrRNA и 16SrRNA, поскольку мтДНК обладает рядом преимуществ по сравнению с геномной ДНК, такими как, большей устойчивостью к внешнему воздействию, многокопийностью и не подвергается рекомбинации [149] и т.д. Данные гены обладают как консервативными, так и с участками с большим количеством замен, что позволяет подбирать праймеры достаточного уровня разрешения как универсальные для всех животных, так и

специфичные для отдельных групп, например, рыб или птиц. Для растений митохондриальные маркеры не подходят в качестве универсального ДНК баркода, поскольку они накапливают слишком мало замен, чтобы отличить даже близкие семейства. Поэтому в качестве маркеров используются различные участки хлоропластного генома или их комбинация [40,150].

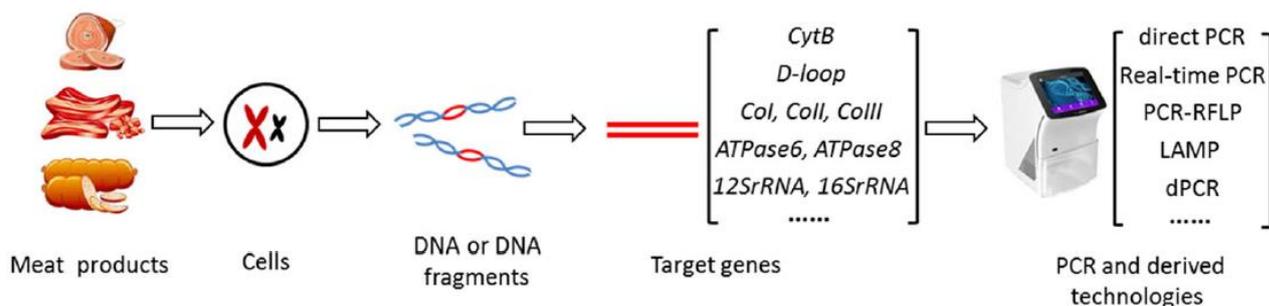


Рисунок 2 – Блок-схема технологий обнаружения фальсификации мяса на основе ДНК

Вторым по важности после правильного выбора маркера и праймеров к нему фактором для увеличения чувствительности методов являются оптимизации условий выделения ДНК и последующего метода детекции. Применение более подходящего набора для конкретного типа продукции может повысить чувствительность метода на порядок [42]. Для разного типа образцов определённые методы выделения дают лучший результат, например, фенол-хлороформный метод менее эффективен для рыб, чем для мяса млекопитающих и птиц [151], что может потенциально сказаться на количественном анализе. В свою очередь системы капиллярного электрофореза позволяют автоматизировать процесс визуализации результатов ПЦР-реакции и более объективно оценивать длины получившихся фрагментов, как это было сделано и для ПЦР реакции на участки контрольного региона и цитохрома b свиньи в протоколе PCR-QIAxcel. Системы капиллярного электрофореза также позволяют качественные методы такие как ПЦР-RFLP и RAPD сделать полуколичественными [152].

Техники ДНК-штрихкодирования, основанные на ПЦР, помимо метабаркодинга, включают в себя RAPD (случайная амплификация полиморфной ДНК), RAPD-SCAR (sequence characterized amplified regions), SSR (simple sequence repeat) анализ, ISSR (inter simple sequence repeat) анализ, RFLP-ПЦР, ARMS (amplification refractory mutation system). Все данные техники подразумевают идентификацию при помощи детекции фрагментов ДНК при электрофорезе. По сравнению с идентификацией с помощью наличия или отсутствия продукта при обычной видоспецифической ПЦР, они могут обладать своими преимуществами и недостатками, но все они требуют дополнительного усложнения протокола ПЦР. На электрофорезе ПЦР получившиеся фрагменты обычно визуализируются в агарозном геле согласно их длине, не давая информации о концентрации ДНК, так что все перечисленные методы являются качественными

RAPD, случайная амплификация полиморфной ДНК, не требует выбора какого-то определённого маркера. Вместо этого данная техника в результате ПЦР с вырожденными праймерами амплифицирует случайные фрагменты генома разной длины, давая видоспецифичный паттерн на геле электрофорезе. Данная техника до развития секвенирования нового поколения широко использовалась как для различения разных видов, так и пород, и отдельных особей внутри него. Изменяя праймер на один нуклеотид возможно получить полностью иной паттерн для всех видов. Используя большое число таких праймеров, можно создать систему идентификации свиньи, коровы, кенгуру, лошади, кабана, кролика, собаки и кошки [153]. При этом воспроизводимость данного метода на видовом уровне относительно низкая, потому что из-за внутривидовых различий в геноме отдельные особи могут демонстрировать отдельный паттерн. Метод потерял в популярности с развитием секвенирования, но продолжает использоваться для идентификации внутривидовых различий, например, для различения пород КРС [154]. Модификацией метода является RAPD-SCAR, при котором на основании

секвенирования амплифицированных вырожденными праймерами фрагментов разрабатываются специфичные для дискриминируемых групп праймеры. Комбинация вырожденных и специфических праймеров позволяет разрабатывать системы для идентификации локальных пород, как это было сделано, например, для определения происхождения молока в сыре Серра де Эстрелла [155] или при замене традиционных локальных сортов паприки в иберийских колбасах на другие [156].

ПЦР-анализ микросателлитных маркеров (SSR или STR, короткие tandemные повторы) также используется для определения отдельных пород скота в мясе или молочной продукции [157]. Недостатком является использование сразу большого количества микросателлитных маркеров для того, чтобы сначала определить пригодность, т.е., варибельность и дифференциацию каждого для пары пород, чтобы отобрать 4-5, которых будет достаточно для их различения [158]. Микросателлитные тест-системы позволяют определить, как то, из скольких особей бралось мясо для образца, так и его породу, и происхождения [159].

ARMS (амплификация рефракторной мутационной системы) подразумевает подбор праймера, в котором специфическая для вида замена, лежит на 3'-конце, что исключает его отжиг на ДНК другого вида. Можно использовать такую систему праймеров для видоспецифичной ПЦР, а также мультиплексируя с подобранными под другие виды праймерами и универсальным. Такая система является точной и простой в использовании, но подбор соответствующего маркера с подбором праймеров с заменами на 3'-конце для каждого вида является трудной задачей. Но, как и в случае с RFLP-ПЦР созданы специальные программные средства, позволяющие подбирать как праймеры с заменой для ARMS, так и нужную рестриктазу для ампликона RFLP [160]. Метод ARMS идеален для различения сортов и пород, характеризующейся одной заменой, определяющей их полезные свойства, как в случае с мутацией их восковидного сорго [161]. Данный метод при

мультиплексировании и правильном подборе праймеров является менее времязатратный и дорогим, чем другие методы, основанные на ПЦР с последующим электрофорезом [162].

PCR-SSCP (конформационный полиморфизм оцДНК) также является методологически простым методом определения даже однонуклеотидного полиморфизма. Он основан на использовании неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле одноцепочечной ДНК после ПЦР. Одноцепочечная ДНК даже при небольших отличиях может существенно поменять свою конформацию и быть различимой на фореze при использовании короткого маркера у близких видов [163]. Использование данного метода определяло незаявленные виды в мясной продукции и сырах с той же точностью, что и секвенирование [164]

Для методов, использующих ПЦР возможен такой подход, как мультиплексирование, — добавление в реакционную смесь сразу двух и более пар праймеров для одного образца для амплификации сразу нескольких фрагментов. Разработать подобную систему мультиплексированных праймеров тяжелее из-за необходимости соблюдения одинаковой температуры отжига, а также появления дополнительных неспецифичных ампликонов. Но если разработать такую систему всё же удаётся, то это ускоряет процесс идентификации и за одну реакцию позволяет определить нахождение сразу нескольких видов. Мультиплексирование может применяться вместе с другими вышеперечисленными методиками, а также для ПЦР в реальном времени. Обычно системы праймеров рассчитаны на 4-6 разных видов животных и успешно применяются в качестве тест-систем для быстрого обнаружения фальсификации мяса [165, 166, 167, 168]. Для более простого подбора условий ПЦР и детекции применяется подход мультиплексной End-point ПЦР, при котором прямой праймер является общим для всех объектов, а обратный — видоспецифическим. Для идентификации состава мясных продуктов при этом используются обычные митохондриальные маркеры: цитохром b [169, 170,

171], 12S и 16S рРНК [172, 173, 174, 175, 176, 177, 178] и D-петля контрольного региона [179, 178, 180]. При удачном подборе праймеров можно различить до 18 видов млекопитающих в смеси в одной реакции [171].

2.2.1.1 Прямая ПЦР

Метод прямой ПЦР характеризуется высокой чувствительностью, высоким разрешением и специфичностью, поэтому он широко используется для проверки подлинности мяса и отслеживания происхождения [50, 54] разработали видоспецифичные методы ПЦР митохондриальной D-петли для обнаружения фальсификации свинины в коммерческих продуктах из говядины и/или курицы, и эти методы позволили обнаружить всего 1% свинины в термообработанных смесях свинина-говядина-курица. Однако традиционный метод ПЦР для одного вида позволяет обнаружить только один конкретный вид примеси в продуктах, что имеет низкую коммерческую ценность, поскольку в продуктах может быть много других примесей [149].

Мультиплексные ПЦР-анализы с несколькими видоспецифичными праймерами получили широкое развитие, поскольку они обеспечивают обнаружение нескольких целей в одной реакции. Али и др. разработали пять пар видоспецифичных праймеров, нацеленных на митохондриальный ND5, ген АТФазы 6 и CytB, для одновременного обнаружения мяса кошек, собак, свиней, обезьян и крыс в исламских продуктах питания [181]. Пределы обнаружения составляли от 0,01 до 0,02 нг ДНК в сыром продукте и 1% предполагаемого мяса в фрикадельках, что показало потенциальную ценность для халяльной пищевой промышленности и халяльных регулирующих органов. Кроме того, авторы успешно применили этот метод для идентификации коммерческих образцов. Также были разработаны технологии мультиплексной ПЦР для других видов мяса, таких как курица, баранина, страус, лошадь, крыса, буйвол, лиса и т. д. [27, 79, 166).

Однако в методе мультиплексной ПЦР обычно используются ДНК-матрицы сравнительно большей длины и переменной длины [182], которые

нестабильны в суровых условиях обработки пищевых продуктов, таких как автоклавирование и выпечка при высоких температурах [49]. Кроме того, некоторые близкородственные виды не могут быть дифференцированы с помощью технологий прямой ПЦР [183]. Кроме того, прямой метод ПЦР по-прежнему требует много времени, сложной операции и гель-электрофореза и не может быть точно определен количественно с помощью спектрофотометрических методов, поскольку продукты ПЦР легко подвергаются вмешательству в одноцепочечную ДНК, РНК, белки и т. д. [59], что ограничивает его применение в промышленности и коммерческих условиях [57, 152]. Поэтому в последние годы была разработана усовершенствованная технология ПЦР, связанная с биочипами. Технологии биочипов ДНК обладают преимуществами высокой чувствительности и одновременного обнаружения нескольких видов по сравнению с методами простой ПЦР. В 2019 году Ли и др. разработали два независимых метода мультиплексной ПЦР на основе 12S рРНК, 16S рРНК, ND2 и COI [79]. Используя электрофорез с микрочипом вместо традиционного гель-электрофореза, можно одновременно обнаружить 14 видов животных с пределом обнаружения всего 0,02 нг ДНК. Это исследование является хорошим ориентиром для улучшения традиционных методов ПЦР для обнаружения фальсификации мяса (таблица 2).

2.2.1.2 ПЦР в реальном времени

По сравнению с прямой ПЦР, ПЦР в реальном времени показала более высокую специфичность, более высокую чувствительность и возможности для автоматизации, и она может эффективно уменьшить контаминацию ПЦР. Что еще более важно, методы ПЦР в реальном времени позволяют проводить количественный анализ за счет линейной зависимости между количеством ДНК и значением Ct. Технология ПЦР в реальном времени применялась для идентификации свинины, говядины, индейки, курицы и баранины в количествах менее 0,1% даже в мясных продуктах, прошедших тепловую обработку.

ПЦР в реальном времени проводится путем мониторинга флуоресцентного сигнала, что позволяет определить начальное количество генов-мишеней без дополнительных шагов. В количественных методах обычно используются технологии SYBR Green и TaqMan. Технология SYBR Green может обнаруживать только один вид, но стоимость обнаружения была ниже, чем у технологии TaqMan. В 2019 году Ли, Джалбани и др. разработали новую митохондриальную 12S рРНК на основе эталонных праймеров для количественного определения козьего мяса, фальсифицированного свининой, с помощью ПЦР в реальном времени. Метод показал высокую специфичность и чувствительность для козлятины, смешанной со свининой, в диапазоне уровней смеси от 10% до 100%. Технология Taq-Man обладает более высокой специфичностью и чувствительностью, чем технология SYBR Green. Что еще более важно, ее можно использовать для обнаружения нескольких видов. В 2015 году Пегельс и др. выбрали 12S рРНК из 73 пар оснований ДНК лошади в качестве гена-мишени для разработки праймеров и амплифицировали их с помощью ПЦР в реальном времени TaqMan. Праймер обладал высокой специфичностью и чувствительностью и не имел перекрестной реакции с другими видами. Предел обнаружения составил 1 пг/мг ДНК лошади. С помощью специфических праймеров и дизайна зонда TaqMan на основе гена CytB можно было идентифицировать менее 1 пг ДНК на реакцию и 0,1% мышинового загрязнения в баранине.

ПЦР в реальном времени является одним из самых распространенных — более 2000 статей базы данных MEDLINE посвящено анализу фальсификации мясных продуктов с помощью данного метода. При этом мета-анализ данных статей показал, что чувствительность данного метода составляет 100% (95% CI 93,3 – 100%, гетерогенность 0%), а специфичность — 99,4% (95% CI 98,2 – 99,9%, гетерогенность 0%) [185]. ПЦР в реальном времени ПЦР в реальном времени — это метод, который основан на мониторинге в реальном времени увеличения интенсивности флуоресценции за счёт связывания метки с

двухцепочечной ДНК. ПЦР в реальном времени позволяет проводить количественный анализ на основании скорости увеличения флуоресценции. Однако ПЦР в реальном времени позволяет работать только с короткими фрагментами (до 150 пар оснований).

Для связи с ДНК используются неспецифичные и специфичные для конкретной последовательности флуорофоры. Неспецифичные представляют собой интеркалирующий краситель, который связывается с двухцепочечной молекулой ДНК. Их преимущество состоит в том, что нет необходимости знать точную последовательность, а также в их дешевизне по сравнению с зондами. Наиболее распространены красители SYBR Green и EvaGreen. Потенциально SYBR Green может вступать в реакцию с ПЦР-смесью, EvaGreen является более стабильна и чувствительна [185]. Специфичные для последовательности олигонуклеотидные зонды Taqman содержат краситель на 3'-конце зонда и гаситель на 5'-конце. Когда полимеразы с нуклеазной активностью доходит до зонда, при деградации его краситель освобождается от гасителя. Таким образом, детекция в отличие от неспецифичных красителей происходит кратно амплифицированным молекулам ДНК. В случае работы с мясными смесями лошади, осла и свиньи, ПЦР в реальном времени, использующий TaqMan зонд смог определить до 0,0001 нг в сыром мясе.

Для того, чтобы определить концентрацию исходной ДНК в образце применяется метод определения порогового цикла C_t . Для этого нужно правильно выбрать нулевой уровень флуоресценции, который обычно наблюдается на циклах с 3 по 15. На данном этапе реакции не происходит существенного изменения флуоресценции за счёт амплификации целевого участка, основные колебания происходят за счёт фона и артефактов. Нулевой уровень выбирается эмпирически для каждой реакции, вручную либо автоматически программой обработки кривой амплификации. При сравнении разных ПЦР реакций и экспериментов нулевой уровень должен быть выбран одинаковым. Правильный выбор нулевого уровня обеспечит точную

идентификацию порогового цикла. Нулевой уровень не должен включать первые циклы, где влияние фона наиболее существенно, но должен исключить те циклы, где кривая начинает расти выше нулевого уровня.

Пороговый уровень ПЦР-реакции — это уровень, в котором флуоресцентный сигнал становится статистически значимо выше, чем таковой в нулевом уровне, то есть тот, в котором наблюдается сигнал от амплификации достоверно отделимый от фона. Пороговый цикл реакции (C_t) — цикл ПЦР-реакции, на котором флуоресцентный сигнал реакции превышает пороговый уровень. C_t обратно пропорционален изначальному количеству ДНК в образце, что позволяет рассчитать его. Если C_t одного образца ниже другого на один, это означает, что в первом образце содержалось в два раза больше ДНК, чем во втором (если мы считаем, что эффективность реакции 100%).

Стандартная кривая для анализа обычно строится на основании серии кратных разведений исследуемого фрагмента. При этом при смене объекта и условий его обработки необходимо строить отдельную калибровку, то есть строить свою кривую. Например, в исследованиях по детекции свинины в мясе коэффициент детерминации между C_t и долей свинины в смеси из сырой говядины и свинины 0,9628 отличается от такового в случае стерилизованной смеси — 0,9579 [34]. Таким образом, для точного обнаружения свинины в продукте необходимо знать способ её приготовления для правильного использования стандартных кривых. Особенно это касается длинных ампликонов: при использовании фрагмента длиной до 120 п.о. наблюдаемые C_t не отличаются значимо между автоклавированными, варёными и сырыми образцами, в то время как при использовании фрагментов длиннее 300 п.о. ПЦР на образцах автоклавированного мяса выходило на пороговый цикл значительно позже (на 10), чем образцы сырого мяса [186].

Есть несколько подходов построения стандартных кривых, отличающихся по тому, на основании чего рассчитывается доля исследуемой ДНК в образце. Применение разных подходов определяется в момент

подготовки эксперимента и подбора праймеров и может приводить к разной итоговой количественной оценке. Первый подход предполагает подготовку серии разведений ДНК известной концентрации, выделенной из образца (в частности, из мяса), и соответствующих им контрольных образцов, а затем на основании них расчёте доли ДНК исследуемого вида в тестовом образце.

$Q_{\text{sample}} (\%) = (10^{[(Cq - b)/a]} / DNA_{\text{total}}) * 100$, где Q_{sample} — доля исследуемого вида в тестовом образце, b — точка пересечения стандартной кривой, a — коэф-т наклона стандартной кривой, DNA_{total} — измеренная общая масса ДНК образца

Второй подход предполагает построение двух разных стандартных кривых отдельно для маркера исследуемого вида (например, цитохрома b свиньи) и отдельно для маркера на всех млекопитающих или позвоночных (например, 18S рРНК). Они также строятся на основании серий кратно разведенных контрольных образцов

$Q_{\text{sample}} (\%) = (Q_{\text{target}} / Q_{\text{total}}) \times 100$, где Q_{sample} — доля исследуемого вида в тестовом образце, Q_{target} — концентрация ДНК маркера исследуемого вида, а Q_{total} — концентрация ДНК маркера общего для млекопитающих (или другой группы высокого ранга).

Другие подходы предполагают нормализацию полученных значений C_t . Построение стандартных кривых и расчёт доли в таком случае происходит с учётом нормализации

$C_{\text{pork-cytb normalized}} = C_{\text{18S average}} \times C_{\text{pork-cytb}} / C_{\text{q18S}}$, где $C_{\text{pork-cytb normalized}}$ — нормализованное значение C_t , $C_{\text{18S average}}$ — среднее значение C_t для стандартных образцов общего маркера, C_{q18S} — значение C_t для общего маркера в исследуемом образце, $C_{\text{pork-cytb}}$ — значение C_t для ДНК маркера исследуемого вида в исследуемом образце.

Наиболее точной и воспроизводимой считается нормализация кривых относительно ΔCq ($\Delta Cq = C_{\text{q pork-cytb}} - C_{\text{q 18S}}$) и расчёт доли относительно

данного параметра (Kang, Tanaka, 2018). Применение нормализации существенно повышает достоверность идентификации.

Как и в случае с классической ПЦР, ПЦР в реальном времени будет давать разные результаты в зависимости от использования разных реакционных смесей и оборудования, и не только от типа флуоресцентного красителя и детекции, но и от их производителя. Например, смеси фирмы Invitrogen и New England Biolabs в экспериментах по детекции ДНК свиньи дают неспецифическую амплификацию при использовании на платформе CFX Connect, но не на платформе StepOnePlus [187]. Эффективность ПЦР в упомянутом эксперименте варьировали от 84% до 108% при использовании разных комбинаций семи коммерческих ПЦР смесей и двух платформ, а предел обнаружения зависел от платформы и варьировал от 0,5 до 5 пг.

Из-за большой чувствительности ПЦР в реальном времени может определить даже небольшие количества ДНК, но делать ошибки в количественном анализе из-за разницы в количестве ядерной и митохондриальной ДНК в разных клетках. Например, в случае с жировой тканью ПЦР в реальном времени, как и другие методы, основанные на анализе ДНК, будут уменьшать относительную долю исследуемого вида в продукте [188]. Также важны отличия в разном количестве митохондрий в разных тканях и у разных организмов, поэтому иногда предпочтительнее тест-системы, основанные на однокопийных ядерных генах [189].

При проектировании ПЦР в реальном времени ключевое значение имеет качество матричной ДНК и праймеров. В 2006 году Рейниссон и др. доказали, что комбинация заблокированных нуклеиновых кислот с зондами TaqMan может увеличить сигнал флуоресценции. Основываясь на этих результатах, в 2018 году Xu et al. разработали мультиплексный анализ полимеразной цепной реакции TaqMan с заблокированными нуклеиновыми кислотами в режиме реального времени для одновременного обнаружения нескольких источников мяса (утка, свинина, говядина и курица). Предел обнаружения достиг 0,01%

(масс./масс.) для каждого вида, и метод показал точность на 2% выше, чем у обычного метода ПЦР в реальном времени. Чистота ДНК матриц также оказывает большое влияние на результаты ПЦР в реальном времени. Одноцепочечная ДНК, РНК и ДНК-полимераза могут привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Кроме того, на количественные результаты ПЦР в реальном времени большое влияние оказывает концентрация матричной ДНК. Недавно Канг и Танака сравнили два распространенных метода количественного определения матричной ДНК, спектрофотометрический и спектрофлуориметрический методы, и результаты показали, что метод спектрофлуориметрического количественного определения ДНК больше подходит для количественной ПЦР для обработанных пищевых продуктов, поскольку спектрофлуориметрические методы измеряют только двойные измерения -цепочечной ДНК в экстрактах ДНК, что устранило интерференцию одноцепочечной ДНК, РНК, белков и органических загрязнителей [59]. Однако текущее исследовательское применение ПЦР в реальном времени ограничено относительно высокой стоимостью реагентов и оборудования по сравнению с обычной ПЦР.

2.2.1.3 Полимеразная цепная реакция – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Полимеразная цепная реакция - полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) — это метод анализа вариаций с использованием расщепления рестрикционными эндонуклеазами для идентификации конкретных последовательностей консервативных областей ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР. ПЦР-ПДРФ — это чувствительный, точный и универсальный метод проверки подлинности мяса [16], более простой и быстрый, чем ПЦР в реальном времени. В 2015 году Рахман и др. использовали ПЦР-ПДРФ в сочетании с платформой обнаружения «лаборатория на чипе» для обнаружения собачьего мяса в рецептурах бургеров и разработали праймеры для CytB, способные обнаруживать 0,01% (мас./мас.)

собачьего мяса в куриных и говяжьих бургерах. Используя вариационную последовательность в определенной области ДНК, можно было идентифицировать дифференциацию даже близкородственных видов х16ь. Размер ПЦР-амплификации с видоспецифичными олигонуклеотидными праймерами и сегментами мтДНК как ослa, так и лошади совершенно одинаков, поэтому прямую ПЦР нельзя использовать для различения этих двух видов. В 2014 году Дусти и др. использовали ПЦР-ПДРФ в сочетании с рестрикционным ферментом AluI для успешной идентификации видов ослов и лошадей в халяльных продуктах питания [183]. Кроме того, крупный рогатый скот-буйволы и овцы-козы, крупный рогатый скот, яки и буйволы, свиньи и кабаны и курица, говядина и баранина также были успешно дифференцированы с использованием технологий ПЦР-ПДРФ [190].

Однако техника ПЦР-ПДРФ является сложной и требует соответствующим образом оборудованной лаборатории и дорогих ферментов, а ферментативный процесс подвержен неполному перевариванию и приводит к ненадежным результатам. Кроме того, некоторые недостатки прямых видоспецифичных технологий ПЦР также могут повлиять на ПЦР-ПДРФ, например, невозможность их использования для количественного определения [191]. Поэтому некоторые исследователи взяли на себя обязательство улучшить этот подход с помощью комбинированных методов. В 2016 году Хоссейн и др. разработали мультиплексную ПЦР в сочетании с ПДРФ для одновременной количественной и качественной дифференциации мяса крупного рогатого скота, буйвола и свинины путем рестрикции продуктов ПЦР ND5 и CytB ферментами AluI, EciI и FatI и 0,1% (масс./масс.) фальсифицированные виды могут быть обнаружены в автоклавированных сосисках. Этот метод не только обеспечил точность, но также улучшил чувствительность обнаружения и количественное определение.

2.2.1.4 Петлевая изотермическая амплификация

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) — это недавно разработанная технология идентификации фальсификации мяса, основанная на ДНК-маркерах [192]. Для анализа LAMP требуется от четырех до шести различных праймеров для распознавания от шести до восьми точных последовательностей генов, а амплификация ДНК выполняется ДНК-полимеразой *Bst* или *Gsp* с активностью смещения цепи [193], что наделяет технологию высокой чувствительностью и специфичностью. Кроме того, амплификация проводится в изотермических условиях (60–65 °С) в течение 30–60 мин и не требует сложных и дорогих инструментов [193]. Что еще более важно, результаты реакции LAMP можно было наблюдать непосредственно невооруженным глазом, поскольку во время реакции происходило осаждение ионов белого пирофосфата. Добавление флуоресцентных красителей для цветных реакций могло бы улучшить чувствительность и обеспечить мониторинг реакции в реальном времени.

Ряд исследований продемонстрировал, что LAMP может быть быстрым, эффективным и экономичным методом обнаружения фальсификации мяса [193]. Используя LAMP в сочетании с колориметрической технологией обнаружения гена *COI*, можно было обнаружить 0,1% конины из переработанного мяса, и этот метод имел очевидные преимущества в мясных продуктах промышленной переработки. Однако технология LAMP предъявляет высокие требования к дизайну грунтовок. Праймеры не могут подвергаться образованию димеров, комплементации самого праймера и образованию шпилечной структуры 3'-концов. В 2019 году Сул и соавт. разработали пять праймеров гена 16S рРНК куриной митохондрии, включая два внешних праймера (прямой праймер F3 и обратный праймер B3), два внутренних праймера (прямой внутренний праймер FIP и обратный внутренний праймер VIP) и праймер с одной петлей (обратная петля праймер LB) для идентификации цыплят в переработанном мясе; с помощью методов LAMP можно было определить 0,1% куриного мяса в образце сырого мяса и 1% куриного мяса в образце мяса,

подвергнутом термообработке и давлению, время обнаружения составляло всего около 30 минут, и этот метод был успешно применен в коммерческих целях.

2.2.1.5 ПЦР в реальном времени с анализом кривых плавления (PCR HRM)

Анализ кривой плавления стал применяться для проверки специфичности праймеров и условий для ПЦР в реальном времени. Он основан на том, что двуцепочечная ДНК при плавлении диссоциирует на одноцепочечную при разной температуре в зависимости от длины ампликона и его GC% состава. Детекция в данном случае происходит по снижению флуоресценции от интеркалирующего красителя из-за уменьшения числа двуцепочечной ДНК. При данном анализе стало возможно обнаружить димеры праймеров и неспецифические ампликоны. При стандартном анализе кривых плавления с SYBR Green невозможно дифференцировать небольшие различия в последовательности ДНК. Однако при использовании высококонцентрированного насыщенного красителя (Eva Green, SYTO9 и др.) и оборудования с лучшим разрешением это стало возможным и получило название ПЦР в реальном времени с анализом кривых плавления высокого разрешения (Real-time PCR with high resolution melting) [194].

К настоящему времени уже разработаны тест-системы праймеров для последующего HRM-анализа. В частности, система, позволяющая определить происхождение мяса 10 видов млекопитающих [195]. Особенностью данного метода является совместное применение общего маркера, который позволяет определить наличие ДНК эукариот/млекопитающих, с несколькими видоспецифическими праймерами на отдельные виды. Такой подход позволяет определить наличие ДНК видов, не входящих в панель для дальнейшего определения состава редких видов с помощью секвенирования. Преимущество метода ПЦР-HRM заключается в том, что он позволяет анализировать и выявлять виды по их T_m (температура, при которой 50% ДНК находится в

одноцепочечной форме), анализируя соответствующие пики на кривой плавления за один запуск, позволяя идентифицировать виды в трёх- и четырёхкомпонентных смесях [196]. Метод является менее точным, чем ПЦР в реальном времени с применением TaqMan-зондов, но более быстрым и дешевым, а также подходящим для скрининга незаявленных видов [197].

2.2.1.6 Цифровая ПЦР (Digital PCR)

Цифровая ПЦР представляет из себя множество ПЦР одного исходного образца, происходящих в большом количестве микрореакторов. В каждый из таких микрореакторов может попасть ни одной молекулы ДНК, а может одна или несколько. Когда начинается фаза выхода на плато, микрореакторы, в которых была ДНК, дают сигнал, а в тех, которых не было, его не показывают. Количество ДНК в исходном образце в таком случае можно рассчитать, используя распределение Пуассона:

$\lambda = -\ln(1 - p)$, где λ — среднее число молекул фрагмента ДНК в каждом микрореакторе, p — доля микрореакторов с прошедшей ПЦР-реакцией.

На основании полученного значения λ вместе с объёмом одной реакционной повторности и общего их числа можно рассчитать исходное количество исследуемой ДНК (Vogelstein, Kinzler, 1999). С увеличением числа микрореакторов, увеличивается точность определения исходного количества ДНК.

Существует несколько подходов к цифровой ПЦР. Один основан на микрожидкостных чипах, которые упрощают постановку реакции, но для которых тяжело добиться большей пропускной способности, чем нескольких сотен нанолитровых микрореакторов. Второй основан на подходе BEAMing, представляет собой эмульсионную ПЦР на образцах, которые клонально амплифицированы на магнитных частицах. Постобработка, ограниченная производительность и сложный протокол ограничивают применение данного подхода.

Более новый подход получил название digital droplet PCR (ddPCR, цифровая капельная ПЦР). Она основана на использовании водно-масляной эмульсии в микрожидкостном чипе, что позволяет разделить 20мкл реакционной смеси на ~ 20 тысяч отдельных капель-микрореакторов. В каждой такой капле проходит отдельная ПЦР-реакция, которая поддерживает как интеркалирующие красители, так и зонды такие, как TaqMan.

В исследованиях по сравнению эффективности цифровой капельной ПЦР и ПЦР в реальном времени для идентификации состава мясных продуктов, цифровая капельная ПЦР показывал значительно меньшее среднее отклонение измеренного значения от истинного [198, 182]. Отклонение от истинного значения количественной оценки возрастает при доле исследуемого вида в продукте менее 5%, что характерно и для других молекулярно-генетических методов. Точность определения цифровой капельной ПЦР не зависит от термической обработки пока она не превышает 100 °С, однако даже при термической обработке она даёт лучший результат, чем ПЦР в реальном времени [182]. Таким образом, цифровая ПЦР точнее, чем ПЦР в реальном времени, но требует более дорогого оборудования и расходных материалов.

2.2.1.7 Капельная цифровая ПЦР

Капельная цифровая ПЦР (ddPCR) — это новый метод обнаружения и количественного определения нуклеиновых кислот. Принцип этого метода заключается в проведении независимой ПЦР на большом количестве небольших реакторов в виде капель, содержащих или не содержащих по одной копии шаблона целевой молекулы в каждом реакторе (рисунок 3), для достижения «одномолекулярного шаблона». Амплификация ПЦР». После амплификации количество копий целевой последовательности можно подсчитать по количеству положительных реакторов на основе сигнала флуоресценции (рисунок 3). Метод ddPCR обеспечивает абсолютное количественное определение ДНК, и стандартная кривая не требуется. Кроме того, поскольку был принят принцип капельного распределения, каждая ПЦР-

система содержала только одну матрицу, что уменьшало интерференцию чужеродных генов и повышало точность и чувствительность обнаружения. Основываясь на этих преимуществах, метод ddPCR использовался в области контроля безопасности пищевых продуктов, таких как генетически модифицированные продукты, болезни пищевого происхождения и фальсификация пищевых продуктов (или содержание пищевых ингредиентов) [26]. С помощью ddPCR может быть достигнута прямая относительная количественная оценка, поскольку матрицы с низкой концентрацией могут быть обнаружены в большом количестве нецелевых нуклеиновых кислот [36], что очень часто встречается в переработанных мясных продуктах. В 2017 году Шехата и др. разработали метод ddPCR для обнаружения фальсификаций в переработанном мясе; всего 0,05% и 0,01% (вес./вес.) мишеней крупного рогатого скота и индейки, а также мишеней свинины и курицы, соответственно, и этот метод постепенно внедряется в коммерческие приложения [26].

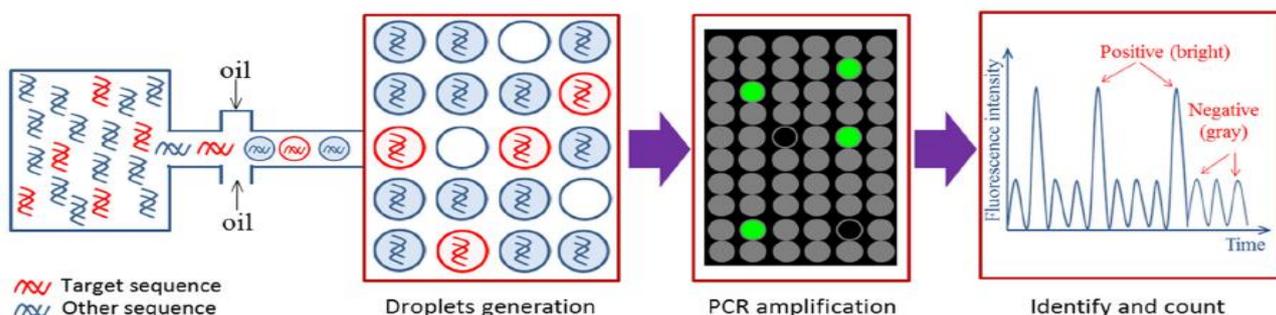


Рисунок 3 – Принцип обнаружения капельной цифровой ПЦР

Тем не менее, ddPCR все еще имеет много проблем в практическом применении. Например, некоторые из существующих методов ddPCR не могут быть преобразованы из количества копий гена в отношении массы мяса, а некоторые этапы преобразования сложны, поскольку плотность клеток, размер генома и количество копий генов-мишеней в геномной ДНК различаются у разных видов животных [18, 198]. Кроме того, экспериментальный процесс ddPCR требует очень точной работы, поскольку разделение и объем капель могут повлиять на результаты обнаружения. Эти недостатки ограничивают

применение данного метода. Следовательно, необходимо создать простую, удобную и точную цифровую систему количественного обнаружения ПЦР для повышения стабильности и коммерческой применимости обнаружения фальсификации мяса.

2.2.1.8 Штрих-кодирование ДНК и секвенирование нового поколения

Рассмотренные выше технологии на основе ДНК в основном представляют собой целевые методы обнаружения, но при обнаружении фальсификации мяса следует идентифицировать многие неизвестные виды мяса [199]. Следуя этой потребности, была разработана технология нецелевого обнаружения, называемая штрих-кодированием ДНК [199, 200]. Путем ПЦР-амплификации и секвенирования определенных фрагментов генов, а затем их поиска в системе Barcode of Life Data (BOLD) и в базе данных Национального центра биотехнологической информации США можно было идентифицировать фальсифицированные виды мяса. Поскольку метод штрих-кодирования ДНК обеспечивает быструю и точную идентификацию неизвестных видов, он считается многообещающим методом обнаружения фальсификации мяса и уже используется для идентификации мяса животных [199, 200, 201, 202] и аутентификация рыбы.

Ранняя технология штрих-кодирования ДНК в основном основывалась на секвенировании ДНК по Сэнгеру для области COI и гена Cytb длиной примерно 650 п.н. у видов животных [202]. Однако при наличии нескольких фальсифицированных ингредиентов в мясных продуктах традиционное секвенирование по Сэнгеру будет генерировать несколько или перекрывающихся пиков секвенирования, что приведет к ложной информации о последовательности. Поэтому был разработан метод метабаркодирования ДНК для реализации многовидовой идентификации в сложных образцах с использованием технологии секвенирования следующего поколения (NGS). Кроме того, в переработанных мясных продуктах ДНК может расщепляться до

небольших фрагментов (<200 п.н.) в зависимости от обработки [199]. Таким образом, метод мини-кодирования, ориентированный на более короткие фрагменты ДНК (от 100 до 200 п.н.), был разработан с использованием технологии NGS. По сравнению с ранней технологией штрих-кодирования ДНК преимущества мини-штрих-кодирования заключаются в более высокой пропускной способности и более высокой чувствительности. Кроме того, он применим для идентификации мяса даже на мясных продуктах с высокой степенью переработки при нацеливании на мелкие фрагменты [199]. В 2020 году Cottenet et al. успешно применили коммерческий рабочий процесс NGS Food Authenticity Workflow для выявления нецелевых видов мяса, были успешно протестированы 46 видов чистого и смешанного мяса, включая некоторые близкородственные виды, такие как бизон в сравнении с говядиной и благородный олень в сравнении с северным оленем [199]. Кроме того, метод также пригоден для идентификации обработанных (измельченных, приготовленных и консервированных) образцов. Однако технология штрих-кодирования ДНК также имеет некоторые недостатки, такие как высокая стоимость секвенирования, затраты времени и образцов. Между тем, разработка более уникальных кандидатов на штрих-код также должна быть сосредоточена в будущих исследованиях.

В дополнение к технологиям, рассмотренным выше, некоторые другие технологии обнаружения фальсификации мяса на основе ДНК, такие как латеральный поток ДНК, случайным образом амплифицируются. полиморфная ДНК-полимеразная цепная реакция, плавление с высоким разрешением и так далее, также были разработаны в последние годы [203]. Поскольку эти технологии широко не используются, в этом обзоре они не рассматриваются.

ДНК-штрихкодирование — метод идентификации, позволяющий определить наличие и таксономическую принадлежность, используя методы ПЦР и секвенирования коротких фрагментов ДНК. Данный подход был предложен П. Хебертом [200], который утверждал, что последовательности

первой субъединицы цитохром-оксидазы (COI) длиной 600 п.о. достаточно для идентификации и разделения видов животных. С момента опубликования статьи Хеберта с соавторами в 2003 г. число статей, посвященных ДНК-штрихкодированию, выросло до 100 статей в год к 2009 году и с 2015 по 2018 годы не опускалось ниже 300 статей в год.

До получения своего названия подход ДНК-штрихкодирования с помощью COI успешно применялся для различения близких видов в разных крупных таксонах животных [204, 205]. Впоследствии были предложены другие маркеры для баркодинга, например, из-за низкой скорости эволюции митохондриальных геномов у растений используются различные участки хлоропластного генома [150].

Требования к маркерам для ДНК-штрихкодирования заключаются в лёгкости выравнивания (одинаковая длина маркера у всех исследуемых организмов) и подбора праймеров, достаточная скорость эволюции для различения таксонов выбранного уровня, отсутствие множественных и обратных замен [206], схожий GC состав у всех исследуемых организмов [207].

Секвенирование, то есть определение последовательности ДНК, по методу Сэнгера в целях баркодинга является неэффективным, поскольку в случае множественных ингредиентов в образце, не позволяет секвенировать за одну реакцию несколько разных последовательностей.

Методы высокопроизводительного секвенирования позволяют параллельно секвенировать огромное число видов в одном образце, а также несколько образцов за один раз. ДНК-баркодинг с использованием технологий высокопроизводительного секвенирования даёт возможности для определения множества видов в составе пищи, а также обнаружить нестандартные незаявленные виды, предположить наличие которых было затруднительно. В частности, возможно определить до вида фальсификации куриного мяса рыбой или дичью других курообразных [208].

Основой для идентификации с помощью методов на основе ПЦР является правильный выбор генетического маркера, участка ядерного или митохондриального генома, а также праймеров к нему. От этого будет зависеть чувствительность и специфичность. Так, например, использование митохондриальных маркеров уменьшит предел обнаружения, поскольку митохондриальный геном представлен гораздо большим числом копий в клетке, чем ядерный. В случае видоспецифичной ПЦР необходимо подобрать такую пару праймеров, чтобы длина получившегося фрагмента у близких видов была отличимой на электрофорезе или реакция происходила только у анализируемого вида. В случае методов ампликонного высокопроизводительного секвенирования, наоборот, необходимо использовать универсальные для группы организмов праймеры. В основном, для животных ДНК штрихкодирование с использованием NGS производится на митохондриальных маркерах *cyt b*, 12S rRNA и COI, а также на ядерных 16S рРНК [40]. Данные гены обладают как консервативными, так и с участками с большим количеством замен, что позволяет подбирать праймеры достаточного уровня разрешения как универсальные для всех животных, так и специфичные для отдельных групп, например, рыб или птиц. Для растений митохондриальные маркеры не подходят в качестве универсального ДНК баркода, поскольку они накапливают слишком мало замен, чтобы отличить даже разные семейства. Поэтому в качестве маркеров используются различные участки хлоропластного генома или их комбинация [40, 41].

Вторым по важности после правильного выбора маркера и праймеров к нему фактором для увеличения чувствительности методов являются оптимизации условий выделения ДНК и последующего метода детекции. Применение более подходящего набора для конкретного типа продукции может повысить чувствительность метода на порядок [42]. Для разного типа образцов определённые методы выделения дают лучший результат, например, фенол-хлороформный метод менее эффективен для рыб, чем для мяса млекопитающих

и птиц [151], что может потенциально сказаться на количественном анализе. В свою очередь системы капиллярного электрофореза позволяют автоматизировать процесс визуализации результатов ПЦР-реакции и более объективно оценивать длины получившихся фрагментов, как это было сделано и для ПЦР реакции на участки контрольного региона и цитохрома b свиньи в протоколе PCR-QIAxcel. Системы капиллярного электрофореза также позволяют качественные методы такие как ПЦР-RFLP и RAPD сделать полуколичественными.

Техники ДНК-штрихкодирования, основанные на ПЦР, помимо метабаркодинга, включают в себя RAPD (случайная амплификация полиморфной ДНК), RAPD-SCAR (sequence characterized amplified regions), SSR (simple sequence repeat) анализ, ISSR (inter simple sequence repeat) анализ, RFLP-ПЦР, ARMS (amplification refractory mutation system). Все данные техники подразумевают идентификацию при помощи детекции фрагментов ДНК при электрофорезе. По сравнению с идентификацией с помощью наличия или отсутствия продукта амплификации при обычной видоспецифической ПЦР, они могут обладать своими преимуществами и недостатками, но все они требуют дополнительного усложнения протокола ПЦР. На электрофорезе ПЦР получившиеся фрагменты обычно визуализируются в агарозном геле согласно их длине, не давая информации о концентрации ДНК, так что все перечисленные методы являются исключительно качественными.

RAPD, случайная амплификация полиморфной ДНК, не требует выбора какого-то определённого маркера. Вместо этого данная техника в результате ПЦР с вырожденными праймерами амплифицирует случайные фрагменты генома разной длины, давая видоспецифичный паттерн на гель-электрофорезе. Данная техника до развития секвенирования нового поколения широко использовалась как для различения разных видов, так и пород, и отдельных особей внутри него. Изменяя праймер на один нуклеотид возможно получить полностью иной паттерн для всех видов. Используя большое число таких

праймеров, можно создать систему идентификации свиньи, коровы, кенгуру, лошади, кабана, кролика, собаки и кошки [153]. При этом воспроизводимость данного метода на видовом уровне относительно низкая, потому что из-за внутривидовых различий в геноме отдельные особи могут демонстрировать отдельный паттерн. Метод потерял в популярности с развитием секвенирования, но продолжает использоваться для идентификации внутривидовых различий, например, для различения пород КРС [154]. Модификацией метода является RAPD-SCAR, при котором на основании секвенирования амплифицированных вырожденными праймерами фрагментов разрабатываются специфичные для дискриминируемых групп праймеры. Комбинация вырожденных и специфических праймеров позволяет разрабатывать системы для идентификации локальных пород, как это было сделано, например, для определения происхождения молока в сыре Серра де Эстрелла [209] или при замене традиционных локальных сортов паприки в иберийских колбасах на другие [156].

ПЦР-анализ микросателлитных маркеров (SSR или STR, короткие tandemные повторы) также используется для определения отдельных пород скота в мясе или молочной продукции [180]. Недостатком является использование сразу большого количества микросателлитных маркеров для того, чтобы сначала определить пригодность, т.е., вариабельность и дифференциацию каждого для пары пород, чтобы отобрать 4-5, которых будет достаточно для их различения [158]. Микросателлитные тест-системы позволяют определить как то, из скольких особей бралось мясо для образца, так и его породу и происхождения [159, 210].

Метод PCR-RFLP для детекции видов использует отличия в паттернах полос на электрофореze при добавлении рестриктаз к ампликону. Обычно используются стандартные митохондриальные маркеры (cyt b, 12S рРНК и другие) с различными рестриктазами, что позволяет различить широко-встречающиеся типы мяса с одной тест системой [152, 190]. Метод

успешно применяется и для термически обработанной животной продукции, в том числе в фармакологии для определения происхождения желатина капсул [213]. Недостатком данного метода является то, что при выборе полиморфного или невариабельного сайта для рестрикции анализ может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Например, при неправильном подборе рестриктазы и/или выбранного участка возможна ситуация, когда будет незамечена межвидовая изменчивость, например, тест-система не различит дикую свинью от домашней [201]. С другой стороны, при выборе рестрикционного сайта с полиморфизмом внутри вида, ПЦР-RFLP не будет идентифицировать правильно некоторых особей одного вида. Также для работы фермента нужен относительно длинный участок ДНК, что потенциально ограничивает работу с очень сильно деградированной ДНК [215].

2.2.1.9 ARMS (амплификация рефракторной мутационной системы)

ARMS (амплификация рефракторной мутационной системы) подразумевает подбор праймера, в котором специфическая для вида замена, лежит на 3'-конце, что исключает его отжиг на ДНК другого вида. Можно использовать такую систему праймеров для видоспецифичной ПЦР, а также мультиплексируя с подобранными под другие виды праймерами и универсальным. Такая система является точной и простой в использовании, но подбор соответствующего маркера с подбором праймеров с заменами на 3'-конце для каждого вида является трудной задачей. Но, как и в случае с RFLP-ПЦР созданы специальные программные средства позволяющие подбирать как праймеры с заменой для ARMS, так и нужную рестриктазу для ампликона RFLP [43]. Метод ARMS идеален для различения сортов и пород, характеризующейся одной заменой, определяющей их полезные свойства, как в случае с мутацией *wx* восковидного сорго [161]. Данный метод при мультиплексировании и правильном подборе праймеров является менее затратным и дорогим, чем другие методы, основанные на ПЦР с последующим электрофорезом [162].

2.2.1.10 PCR-SSCP (конформационный полиморфизм оцДНК)

PCR-SSCP (конформационный полиморфизм оцДНК) также является методологически простым методом определения даже однонуклеотидного полиморфизма. Он основан на использовании неденатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле одноцепочечной ДНК после ПЦР. Одноцепочечная ДНК даже при небольших отличиях может существенно поменять свою конформацию и быть различимой на фореze при использовании короткого маркера у близких видов [163]. Использование данного метода определяло незаявленные виды в мясной продукции и сырах с той же точностью, что и секвенирование [164].

Для методов, использующих ПЦР возможен такой подход, как мультиплексирование — добавление в реакционную смесь сразу двух и более пар праймеров для одного образца для амплификации сразу нескольких фрагментов. Разработать подобную систему мультиплексированных праймеров тяжелее из-за необходимости соблюдения одинаковой температуры отжига, а также появления дополнительных неспецифичных ампликонов. Но если разработать такую систему всё же удаётся, то это ускоряет процесс идентификации и за одну реакцию позволяет определить нахождение сразу нескольких видов. Мультиплексирование может применяться вместе с другими вышеперечисленными методиками, а также для ПЦР в реальном времени. Обычно системы праймеров рассчитаны на 4-6 разных видов животных и успешно применяются в качестве тест-систем для быстрого обнаружения фальсификации мяса [165, 166, 167, 168]. Для более простого подбора условий ПЦР и детекции применяется подход мультиплексной End-point ПЦР, при котором прямой праймер является общим для всех объектов, а обратный — видоспецифическим. Для идентификации состава мясных продуктов при этом используются обычные митохондриальные маркеры: цитохром b [169, 170, 171], 12S и 16S рРНК [172, 173, 174, 175, 176, 177, 178] и D-петля контрольного

региона [178, 179, 180]. При удачном подборе праймеров можно различить до 18 видов млекопитающих в смеси в одной реакции [171].

2.2.1.11 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) — альтернативный ПЦР метод амплификации ДНК, отличающийся тем, что он проходит без постоянных изменений температуры, поэтому не требует дополнительных приборов, как термоциклер. В отличие от ПЦР используются не одна, а две или три пары праймеров, а также ДНК-полимераза, обладающая сильной вытесняющей активностью. Вместе с dNTP они инкубируются при постоянной температуре около 60 °С для одновременной амплификации и детекции НК [149]. LAMP подходит для амплификации больших последовательностей с достаточной чувствительностью и селективностью. Визуализировать результаты реакции можно напрямую по мутности, изменению цвета или флуоресценции или многими другими способами, включая электрофорез, иммуно-детекцию, по концентрации ионов магния в реакции.

Преимуществами LAMP перед ПЦР является простота проведения реакции, отсутствие необходимости в оборудовании для амплификации и детекции, быстрота и гораздо большая специфичность реакции, которая обеспечивается за счёт нескольких специфичных для исследуемого участка праймеров, а также отсутствие необходимого шага для денатурации ДНК. Существуют специфичные системы праймеров LAMP для идентификации свинины в одной пробирке за время около 20 минут, подходящие для термически обработанных продуктов и не показывающих кросс-реакции на 22 других вида животных [192].

Есть и серьёзные недостатки, ограничивающие широту применения LAMP для детекции. В основном, они заключаются в сложности подбора сразу двух или трёх пар праймеров, поэтому точное знание последовательности исследуемого участка абсолютно необходимо. Некоторые системы праймеров LAMP, разработанные для детекции свинины, не работают для отдельных

пород свиней из-за однонуклеотидных замен [216], в то время как на большинстве пород работают эффективно. Из-за сложной системы праймеров найти подходящий маркер будет трудозатратно или почти невозможно для некоторых объектов.

Вторым недостатком является крайне низкая возможность для мультиплексирования, то есть определения нескольких видов в одной реакции, что тоже связано с несколькими парами праймеров, разработать которые на один и тот же участок у нескольких видов является ещё более тяжёлой задачей.

Как и для ПЦР модификации метода LAMP позволяют анализировать изменение флуоресценции или анализа плавления в реальном времени, что находило применения для анализа состава мясной продукции [193].

2.2.1.12 Штрих-кодирование ДНК и секвенирование нового поколения (NGS)

Штрих-кодирование ДНК использует стандартизированный генетический регион для идентификации биологических образцов. Штрих-код ДНК обычно состоит из центральной варибельной части, которая различает интересующие виды, и консервативных областей, граничащих с варибельной частью, что позволяет использовать универсальную пару праймеров для амплификации последовательности штрих-кода у разных видов. Этот метод обычно основан на использовании отличительной генетической мишени, которая для большинства видов животных представляет собой область ~ 650 п.н. митохондриального гена COI.

В ходе исследования различные образцы (включая свинину) были идентифицированы на уровне видов с использованием базы данных Barcode of Life (BOLD). Штрих-кодирование ДНК показало, что уровень неправильной маркировки составляет 21%. Обычный полноразмерный штрих-код ДНК нацелен на ~ 650 п.н. гена COI, в то время как «мини-штрих-код» включает использование универсального набора праймеров, нацеленного на короткую область ДНК в полноразмерном штрих-коде. Мини-штрихкодирование

показало несколько меньшую вероятность успеха (66,7%) по сравнению с полным штрих-кодированием (77,8%). Более того, мини-штрихкодирование также оказалось безуспешным для продуктов, маркированных как свиная колбаса и свиная чоризо, которые были сырыми и идентифицировались с помощью полного штрихового кодирования [30].

Комбинация методов на основе ДНК, включая штрих-кодирование ДНК, dPCR и RT-PCR, применялась для идентификации незаявленных видов в мясных продуктах. Штрих-кодирование ДНК показало, что 100% сырых мясных колбас имеют высококачественные последовательности без неправильной маркировки. Однако анализ ddPCR показал, что 7 из 27 говяжьих колбас также содержали свинину, причем две из них содержали > 5% свинины. Этот результат был подтвержден после множественных кПЦР-тестов исходного экстракта ДНК и новых экстрактов ДНК, взятых из гомогенизированных новых образцов ткани из исходного образца колбасы [26].

За последние годы технологии NGS произвели революцию в способах анализа ДНК, секвенирования и количественного определения ДНК за один шаг с высокой пропускной способностью. Гибкость NGS достигается за счет анализа данных последовательности с помощью соответствующих инструментов биоинформатики. Недавняя и быстрая разработка настольных секвенаторов следующего поколения, таких как 454 GS Junior (Roche), Ion Torrent (Promega) и MiSeq® (Illumina), сделала технологии NGS широко применимыми для определения состава мяса. В недавно опубликованной статье были рассмотрены различные платформы NGS, доступные для аутентификации пищевых продуктов, и их ограничения, а также требуемый контроль качества [70].

Несмотря на возможности NGS для идентификации видов, для этой цели было проведено всего несколько исследований. Метод ДНК-типирования был разработан для определения видов свиней с использованием целевого массивно-параллельного секвенирования (MPS) короткой последовательности

мт-ДНК. Применяя химический секвенатор 454 GS Junior, они показали, что использование требований к качеству не менее 20 прочтений для второстепенного компонента ДНК достаточно надежно для обнаружения второстепенного компонента до 1% от общей ДНК. Однако этот метод достаточно чувствителен, чтобы также быть уязвимым к загрязнению. Кроме того, проверочные эксперименты ограничивались смесями искусственных ДНК. Точно так же в 2014 году Рипп и соавт. выполнили моделирование данных последовательности и секвенирование ДНК Illumina в реальном случае на эталонных сосисках, состоящих из видов млекопитающих (35% крупного рогатого скота, 1% лошадей, 9% свиней, 55% овец). Они показали, что количественная оценка видов может быть достигнута на уровне дискриминации 1% с помощью подхода подсчета прочтений.

Мета-штрих-кодирование ДНК, комбинация штрих-кодирования ДНК с NGS, позволяет мультиплексировать и, следовательно, является даже более мощным, чем традиционное штрих-кодирование ДНК. Используя короткие искусственные олигонуклеотиды для индексации ДНК, ампликоны, полученные из разных образцов, можно объединять и секвенировать одновременно за один прогон. Недавно на платформе MiSeq® был разработан метод метабаркодирования ДНК, нацеленный на область 16S рДНК, и он использовался для анализа экстрактов ДНК из мышечного мяса и примесей ДНК из модельных колбасных изделий. Это позволило параллельно упорядочить образцы и выделить интересующие виды мяса до доли 0,1%. Аналогичным образом, метод метабаркодирования, включающий секвенирование Illumina HiSeq короткого сегмента того же гена 16S рРНК, выявил неправильную или потенциально неправильную маркировку в 18 из 27 секвенированных образцов (67%). Показания, полученные из бараньей колбасы, показали, что этот продукт содержит только мясо свинины (на долю которого приходится 99,50% показаний) [202].

В другом исследовании три области штрих-кода были проверены на способность распознавания с использованием полупроводниковой платформы Ion Torrent. Продукты ПЦР, амплифицированные с использованием пар праймеров, которые амплифицируют гены 12S и 16S рРНК мт-ДНК, использовали для приготовления библиотек из 13 видов (включая свинью) или из смесей ДНК в соотношении 1:10 или 1:50 для ДНК свиньи. Частота ошибок, рассчитанная после подтверждения полученных последовательностей секвенированием по Сэнгеру, колебалась от 0,0003 до 0,02 для разных видов. Секвенирование целевых областей мт-ДНК с использованием той же платформы дало в общей сложности 1 363 351 отфильтрованное прочтение. Они определили свинину в «донер-кебабе», которая обычно не должна присутствовать [71]. Недавно первый коммерческий рабочий процесс NGS Food Authenticity Workflow (Thermo Fisher Scientific), основанный на платформе ионного потока, Ion GeneStudio™ S5 Food Protection System, был оценен как нецелевая платформа для идентификации видов мяса. Свинина была обнаружена в 19 из 20 образцов говядины с добавлением 1% (вес/вес) свинины, что делает чувствительность этого инструмента NGS близкой к 1%.

Штрих-кодирование ДНК в настоящее время не позволяет идентифицировать несколько видов в одном и том же продукте. Это связано с несколькими причинами, такими как потребность в высококачественных экстрактах ДНК из мясных матриц для амплификации и секвенирования геномных фрагментов размером не менее 500 пар оснований (п. биоинформатического анализа и потребности в специализированных лабораториях и квалифицированном персонале. NGS стал мощным инструментом для обнаружения различных источников ДНК в одном анализе; однако следовые количества ДНК чужеродных видов и возникновение систематической ошибки амплификации ПЦР могут привести к неточной оценке видового состава и вводящим в заблуждение результатам. Более того, определение неизвестных последовательностей, полученных в NGS, требует

хорошо разработанных справочных библиотек ДНК для сопоставления последовательностей [66].

Одной из самых острых тем идентификации состава в связи с необходимостью определения халяльной продукции является идентификация свинины в мясной продукции. В качестве одного из первых маркеров Meyer et al. успешно использовали митохондриальный цитохром b при заявленной чувствительности определения свинины в 1% в смесях с разными соотношениями говядины и свинины [217].

Для определения свинины используются в основном митохондриальные маркеры, в числе которых уже упомянутый цитохром b, 12S rRNA [218, 219], ND5 [220] а также высокоспецифичный для свиньи участок контрольного региона [221]. Согласно обзору Verti et al. более 90% исследований с использованием ПЦР для поиска свинины в разных типах пищевой продукции использовали цитохром b, иногда в комбинации с лептином и 16/18S rRNA. Полуколичественный анализ с использованием ПЦР также возможен с точностью обнаружения до 0.005% в сыром мясе и до 0,1% в обработанном при использовании в качестве маркера многокопийных мобильных элементы SINE [222]. Ядерные маркеры используются гораздо реже в силу того, что они обладают меньшей копийностью и, как следствие, хуже сохраняются при термической и химической обработке, однако в некоторых случаях их использование может быть полезным. Так, например, ПЦР реакция на участок гена меланокортинового рецептора 1 позволяют отличить дикого кабана от домашней свиньи [215].

Помимо методов, основанных на ПЦР разрабатываются также методики на основании нанобиосенсоров, чувствительных к Alu-повторам митохондриального цитохрома b, которые хотя и менее чувствительны, но позволяют лучше обнаруживать высокодеградированную ДНК свиньи [55].

Хотя такие методы являются избирательными, чувствительными и повторяющимися, они не являются самыми идеальными вариантами из-за

затрат времени, трудоемких, сложных лабораторных протоколов, высокой стоимости и непригодны для мониторинга «в поле». Чтобы улучшить их, наиболее желательными методами обнаружения являются более дешевые, высокочувствительные, миниатюрные, легко применимые и применимые на месте методы. Стратегии биосенсорирования ДНК на основе наноматериалов в настоящее время являются наиболее прибыльными стратегиями и привлекают огромное внимание со стороны научных сообществ, исследователей, клинической диагностики, а также промышленного применения из-за большей селективности, чувствительности, низкой стоимости, возможности миниатюризации и возможности применения на месте. Методы биосенсорирования ДНК на основе наночастиц включают колориметрическое детектирование, электрохимическое, флуоресцентное, поверхностный плазмонный резонанс (SPR) и биосенсоры с поверхностным комбинационным рассеянием (SERS).

2.2.1.13 Мультиплексная ПЦР

В традиционной ПЦР набор видоспецифичных праймеров используется для амплификации ДНК-мишени, которая затем выявляется на агарозном геле и может быть подтверждена либо секвенированием амплифицированного продукта, либо рестрикционным перевариванием и анализ **RAPD** [57]. В этом процессе матричная ДНК одного вида амплифицируется одновременно; поэтому для обнаружения различных целевых видов требуется несколько прогонов, что приводит к дополнительным затратам и времени. Это привело к разработке мультиплексной ПЦР для амплификации нескольких видов-мишеней в одной реакции. В этом анализе можно амплифицировать более одной последовательности-мишени, используя несколько наборов праймеров для каждого вида-мишени. Таким образом, мультиплексная ПЦР сокращает количество реакций, необходимых для идентификации различных мишеней, а также помогает сохранить матричную ДНК, экономя время и деньги. Уменьшение количества пробирок или реакций также снижает вероятность

загрязнения и перепутывания проб во время настройки реакции. Мультиплексная ПЦР особенно полезна, когда необходимо выбрать большие мишени или когда требуется анализ нескольких локусов. Желательно амплифицировать все интересующие последовательности все вместе в реакции мультиплексной ПЦР, а не проводить одиночную ПЦР для каждого локуса. Система мультиплексной ПЦР была впервые использована для выявления делеционных мутаций в локусе гена дистропина. Впоследствии мультиплексная ПЦР использовалась в медико-биологических исследованиях, клинической диагностике и лабораториях судебной экспертизы в качестве многоцелевого метода обнаружения за один прогон.

Разработка успешной мультиплексной ПЦР требует сфокусированного экспериментального дизайна и оптимизации, чтобы избежать плохой чувствительности, специфичности и способствовать предпочтительной амплификации определенных целевых групп. Экспериментальный дизайн сложный, а оптимизация представляет собой утомительный и трудоемкий процесс для мультиплексной ПЦР, чем для одиночной ПЦР. Эффективность мультиплексной ПЦР зависит от нескольких факторов, включая концентрацию праймера, Mg^{2+} , полимеразы и dNTP, а также состав буфера. Дизайн праймеров/зондов и их совместимость также требуют тщательного рассмотрения перед оптимизацией реакции. Размер ампликона должен быть таким же и небольшим, желательно с таким же содержанием GC. Температура плавления (T_m) праймеров и зондов должна быть одинаковой, а длина праймеров должна составлять 18–30 п.н. Следует проверять специфичность каждого набора праймеров, а наборы праймеров/зондов не должны содержать шпилек, гомо- и гетеродимерных взаимодействий. Оценка каждого набора праймеров и зондов необходима для индивидуальной ПЦР с использованием серийных разведений ДНК-мишени перед их объединением в мультиплексной ПЦР. Тест динамического диапазона мультиплексной ПЦР следует проводить, делая разведения одной ДНК-мишени, сохраняя концентрации других

постоянными. Из-за того, что в мультиплексной ПЦР-реакции присутствует более одного набора праймеров, образуются праймеры-димеры, увеличивающие вероятность получения ложных продуктов амплификации. Отношение праймера к матричной ДНК должно быть оптимальным, поскольку слишком высокое соотношение способствует образованию праймер-димера, а слишком низкое отношение ингибирует процесс амплификации. Кроме того, во избежание образования праймер-димеров праймеры, используемые в мультиплексной ПЦР, должны иметь одинаковые оптимальные температуры отжига и не должны иметь значительной гомологии друг с другом. Основная цель оптимизации мультиплексной ПЦР состоит в том, чтобы получить такую же эффективность, как и в одиночной реакции, даже при различном количестве мишеней, и свести к минимуму неспецифические амплификации. Другой серьезной проблемой в мультиплексной ПЦР является предпочтительная амплификация одной мишени по сравнению с другой из-за дрейфа и отбора ПЦР. В мультиплексной ПЦР следует избегать использования вложенных праймеров, чтобы избежать переноса загрязнения. Чувствительность и специфичность мультиплексной ПЦР необходимо систематически оценивать и подтверждать с использованием стандартизированных нуклеиновых кислот.

Проектирование праймеров. Обычно праймеры для ПЦР разрабатываются с использованием ручного процесса проектирования праймеров, но поиск хорошего праймера занимал много времени, что иногда приводило к более низкой точности и ненадежным результатам. Поэтому для преодоления этих проблем в настоящее время используются компьютерные программы для оптимизации дизайна, выбора и размещения олигонуклеотидных праймеров. Успех мультиплексной ПЦР зависит от скорости, с которой видоспецифичные праймеры отжигаются со своими целевыми последовательностями, и от скорости, с которой отоженные праймеры удлиняют целевые последовательности, не мешая друг другу. Следовательно, разработка праймеров для нескольких мишеней может быть

сложным и важным шагом в случае множественных ПЦР-анализов. Важным шагом в успешной мультиплексной реакции ПЦР является разработка оптимальной комбинации набора праймеров. Хорошо известно, что в традиционной системе ПЦР наборы праймеров обладают следующими свойствами: 1) размер праймеров должен составлять 18–30 п.н.; 2) размер ампликона или продукта должен быть 100–500 п.н.; 3) температура плавления (Тпл) как прямого, так и обратного праймеров должна быть в пределах 58–65 °С, с разницей температур не более 3 °С; 4) содержание GC в праймерах должно быть 40–60 %; 5) Свободная энергия Гиббса (ΔG) последних пяти остатков праймеров на 3'-конце должна быть ≥ 9 ккал/моль; и др. Однако для мультиплексной ПЦР необходимо учитывать несколько дополнительных критериев, таких как: 1) наборы праймеров не должны содержать димеров праймеров или других вторичных структур; 2) должно быть сходство Тпл каждого праймера; 3) праймер должен быть специфичным, чтобы избежать перекрестного загрязнения или неправильного заполнения; и 4) не должно быть ограничений электрофоретической подвижности различных ампликонов для легкого обнаружения и визуализации фрагментов ДНК во время электрофореза в агарозном геле. Кроме того, амплификация одной мишени по сравнению с другой является обычным явлением в мультиплексной ПЦР, если одна мишень намного более распространена, чем другая. В таких ситуациях более многочисленная мишень может истощать dNTP и эффективно превосходить малочисленную мишень. Таким образом, оптимизация мультиплексной ПЦР необходима для минимизации или уменьшения таких неспецифических взаимодействий.

Существует около 70 различных программ для создания праймеров. Это программы с открытым исходным кодом и коммерческие программы дизайна. **Primer3** — это наиболее широко используемая программа разработки праймеров для обычных ПЦР-анализов. Это проект с открытым исходным кодом для развития сообщества, размещенный на GitHub. **Primaclade** — это

веб-программное обеспечение, которое берет файл выравнивания нуклеотидов нескольких видов и идентифицирует набор праймеров, которые связываются через выравнивание. Он основан на приложении Primer3 для каждой последовательности выравнивания, создает HTML-страницу результатов и предоставляет согласованную последовательность и списки праймеров для каждой области выравнивания. **PanelPlex™** обеспечивает полностью автоматизированный дизайн мультиплексной ПЦР с беспрецедентным охватом, чувствительностью и специфичностью. Это экономит 6–9 месяцев итеративной экспериментальной оптимизации и может обрабатывать большие списки воспроизведения, такие как геном человека. **Primique** — это бесплатное, доступное в Интернете и удобное в использовании программное средство, которое проектирует определенные праймеры для каждой последовательности, а различные свойства праймеров отображаются графически. **BatchPrimer3** — это программа разработки веб-праймеров, которая используется для разработки различных типов праймеров с высокой производительностью. **PrimerPlex** — это эффективный и сложный инструмент для разработки олигонуклеотидов для мультиплексных анализов. **MPprimer** основан на Primer3 и программе оценки специфичности праймеров MFEprimer для разработки и оценки праймеров-кандидатов. Он использует базу данных геномной или транскриптовой ДНК, чтобы избежать димеризации праймеров. Он также предоставляет виртуальную электрофотограмму, помогающую пользователям выбрать наилучшие комбинации наборов праймеров с ограниченным размером ампликонов для мультиплексных ПЦР-анализов. Он доступен в веб-версии и в автономной версии, чтобы помочь пользователям разработать высоконадежные наборы праймеров для мультиплексной ПЦР. Обычно продукты мультиплексной ПЦР выделяют по размеру, очищают и секвенируют независимо друг от друга, но сочетание мультиплексной ПЦР со штрихкодированием и секвенированием следующего поколения требует наборов праймеров, которые отжигаются в одном месте генома и объединяют эти праймеры в совместимые группы. Эти

совместимые праймеры имеют сходное содержание GC, Tm, размер ампликона и ампликоны, которые не нацелены на перекрывающиеся области. Поэтому разработано программное обеспечение **Multiplex PCR Design (MPD)**, которое состоит из C-библиотеки и программ для разработки и объединения совместимых праймеров. Это программное обеспечение предоставляет высококачественные праймеры, подходящие для целевого секвенирования нового поколения. Программа **openPrimeR** представляет собой удобный для пользователя инструмент для оценки и разработки мультиплексных праймеров, который можно использовать для 1.) оценки существующих наборов праймеров для мультиплексной ПЦР и 2.) разработки новых и высокоэффективных наборов мультиплексных праймеров. OpenPrimeR используется для обеспечения быстрой оценки для прогнозирования производительности установленных праймеров *in silico* и, таким образом, для отслеживания охвата больших библиотек шаблонов. Кроме того, прогнозы можно использовать для сравнения эффективности различных наборов праймеров на целевых последовательностях матрицы. Режим проектирования openPrimeR отличается высокой гибкостью и позволяет настраивать большое количество свойств праймера. Следует проверить специфичность наборов праймеров для мультиплексной ПЦР, чтобы оценить степень перекрестной реактивности у разных видов животных и близкородственных видов животных. Для этого необходимо проверить наборы видоспецифичных праймеров в реакциях одиночной ПЦР в идентичных условиях ПЦР. Высокоспецифичная ПЦР будет генерировать только один продукт амплификации, который представляет собой предполагаемую последовательность-мишень.

2.2.1.14 Мультиплексная PCR по конечной точке

Мультиплексная ПЦР с несколькими видоспецифичными праймерами была признана надежным, экономически эффективным, надежным и разумным методом, поскольку они обеспечивают обнаружение нескольких целей в одной реакции [181]. Мультиплексная ПЦР с конечной точкой похожа на обычную

систему ПЦР с вариантами использования нескольких наборов праймеров для амплификации различных мишеней в одной реакции. Эта система дает качественные результаты и включает этап после ПЦР для обнаружения или визуализации ДНК на электрофореze в агарозном геле и разрешается по размеру с помощью электрофореза. Специфичность каждого праймера, разработанного для системы мультиплексной ПЦР, проверяется с помощью одиночной ПЦР или обычной системы ПЦР перед запуском их в мультиплексной ПЦР. Кроме того, межвидовая специфичность также проверяется методами *in silico* и *in vitro*. Применение мультиплексной ПЦР для аутентификации мяса приобретает все большее значение из-за скрининга большого количества образцов за короткое время. Кроме того, применялись различные подходы для мультиплексирования, а также для повышения специфичности и чувствительности обнаружения. Наиболее широко используемыми митохондриальными генами в этих исследованиях являются цитохром b (Cytb), 12S рибосомная РНК (рРНК), гены D-петли, субъединица АТФазы 6/8, ND2, ND5, COI, 16S рРНК, транспортная РНК (тРНК) -Lys, тРНК-Val, t-Glu, субъединица 4 НАДН-дегидрогеназы (НАД4) и т. д. Наиболее часто используемым ядерным геном является 18 S рРНК. Прусакова и др. разработали видоспецифические праймеры, нацеленные на субъединицу 8 митохондриальной АТФазы, для обнаружения говядины, свинины, овец, курицы, индейки, собаки, кошки, домашней мыши, крысы и эукариот для одновременной идентификации пяти обычно потребляемых и пяти обычно запрещенные виды мяса в мясных продуктах. Разработанный метод мультиплексной ПЦР оказался специфичным, чувствительным до 30 пг ДНК на реакцию. Методы дуплексной ПЦР (крупный рогатый скот-буйвол и курица-свинья) были разработаны с использованием праймеров, нацеленных на видоспецифический митохондриальный ген Cyt b. Для обнаружения собак, уток, буйволов, коз и овец была разработана прямая пентаплексная ПЦР, нацеленная на ген митохондриальной цитохромоксидазы I (COI) (рис. 4) [69].

Гептаплексная ПЦР, нацеленная на более короткие ампликоны, с использованием семи пар наборов видоспецифичных праймеров (Cytb и ND5) была разработана для обнаружения говядины, буйвола, курицы, утки, козы, овцы и свинины. Метод был специфичен при тестировании среди 25 нецелевых видов и был стабилен в экстремальных условиях обработки (кипячение, микроволновая печь и автоклавирование). Он имел чувствительность 0,01–0,005 нг ДНК из сырого мяса и 0,5% (вес/вес) мяса в смесях. Мультиплексная ПЦР с секвенированием 12 S рДНК использовалась для идентификации компонентов жвачных животных, домашней птицы, свинины и ослов в продуктах из переработанного красного мяса (колбасные изделия) [165]. Метод показал чувствительность 0,01 нг/мкл для говядины, птицы и осла и 0,1 нг/мкл для свинины. ПЦР-секвенирование короткого фрагмента гена 12 S рРНК позволило детектировать образцы замороженной говяжьей печени как вида крупного рогатого скота (*Bos taurus*). Аналогичным образом был разработан метод мультиплексной ПЦР с использованием последовательностей генов 12 S рРНК для обнаружения кур, коров/буйволов, овец/коз, лошадей/ослов, свинины и собак. В другом исследовании видоспецифичная ядерная ДНК была нацелена на разработку мультиплексной ПЦР для обнаружения ингредиентов овец/коз, крупного рогатого скота, курицы, утки и свиньи в мясных продуктах с пределом обнаружения до 0,5 нг ДНК [189]. Лю и др. использовали универсальные праймеры для разработки метода мультиплексной ПЦР для одновременного обнаружения собак, кур, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, ослов, лис и кроликов с чувствительностью всего 0,05 нг/мкл ДНК. Использование универсального праймера уменьшило требуемую концентрацию праймеров, а также улучшило поток обнаружения.

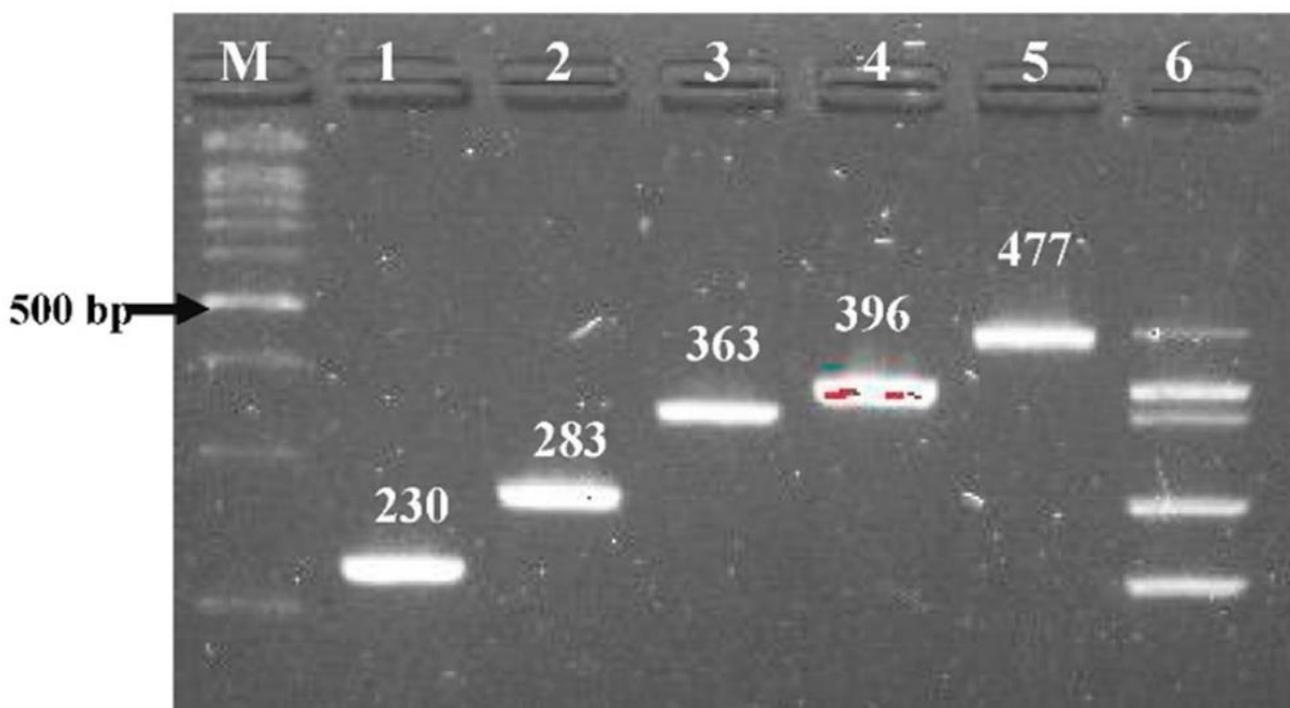


Рисунок 4 – Мультиплексная ПЦР-идентификация по конечной точке (дорожка 6) собак (230 п.н.), уток (283 п.н.), коз (363 п.н.), буйволов (396 п.н.) и овец (477 п.н.) [69].

2.2.1.15 Мультиплексная ПЦР в конечной точке в сочетании с другими методами

Был разработан простой, быстрый и комплексный метод обнаружения мясных видов на месте путем сочетания ПЦР с полосками LFA. Меченые (последовательность тегов и биотин) видоспецифические митохондриальные гены были нацелены во время амплификации ПЦР для обнаружения видов обезьян, собак, крыс, свиней и кошек (рис. 5). Продукты ПЦР анализировали на полосках ДНК с чувствительностью 0,01–1 м.д. (собаки 1 м.д., кошки 0,1 м.д., свиньи 0,01 м.д., обезьяны 0,01 м.д., крысы 0,01 м.д.).

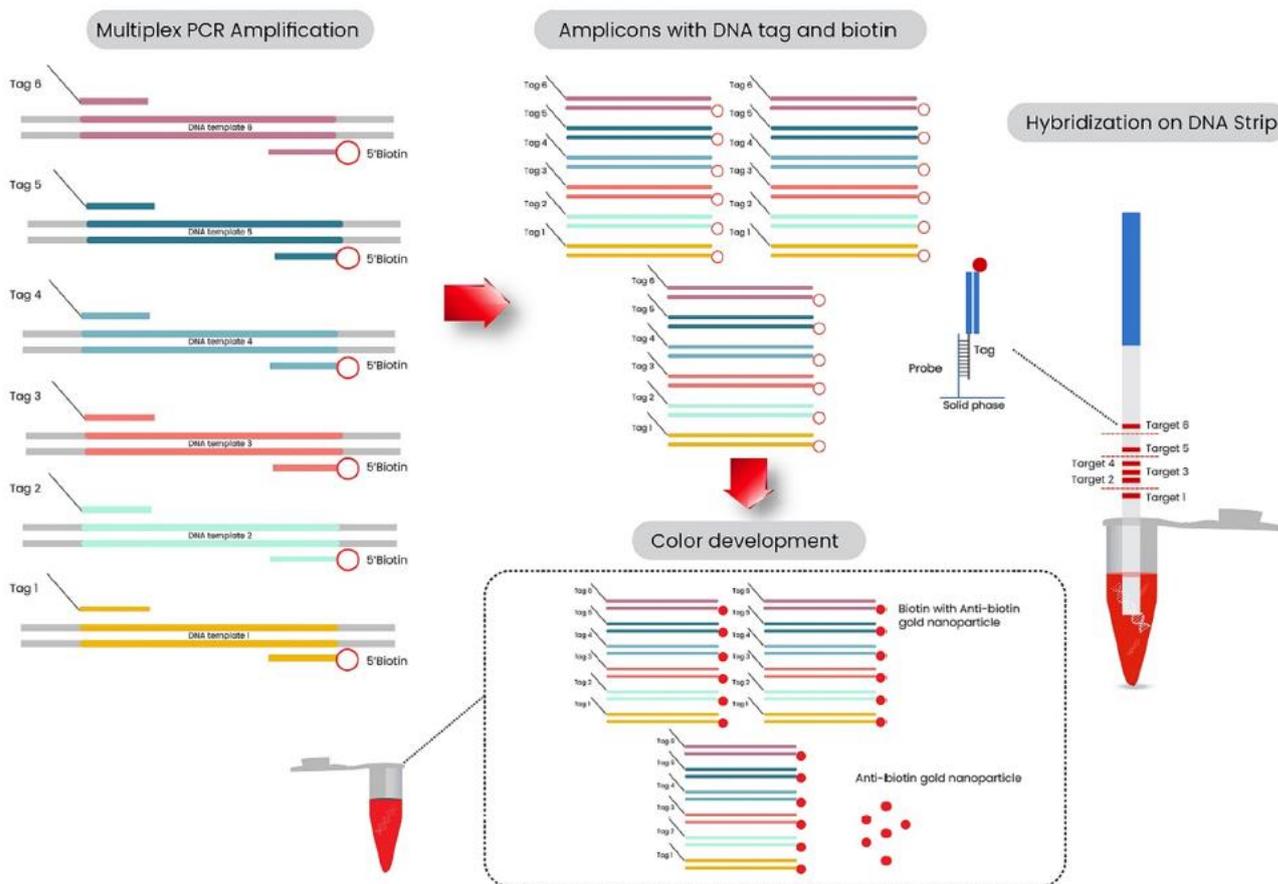


Рисунок 5 – Схематический обзор мультиплексной ПЦР в сочетании с полосками LFA. Множественные наборы праймеров помечены определенной последовательностью метки (метка 1 обезьяна, метка 2 собака, метка 3 крыса, метка 4 свинья, метка 5 кошка и метка 6 положительный контроль) и биотин. Ампликоны со специфической последовательностью метки и мечеными биотином праймерами гибридизуются с комплементарной последовательностью метки, напечатанной на полоске LFA.

Был разработан мультиплексный метод, сочетающий две независимые мультиплексные ПЦР с электрофорезом на микрочипах для идентификации четырнадцати домашних животных (рис. 6). В этом методе использовали десять пар праймеров (12S рРНК, 16S рРНК, ND2 и CO I), включая три вырожденных праймера. Чувствительность метода составила 0,02–0,2 нг ДНК для разных видов животных. Метод мультиплексной ПЦР и капиллярного электрофореза был разработан для идентификации благородного оленя (*Cervus elaphus*), косули (*Capreolus capreolus*) и водяного оленя (*Hydropotes inermis*) Метод имел

чувствительность 0,1 пг ДНК благородного оленя и косули и 1 пг ДНК водяного оленя при 0,1% ткани в мясных смесях. Было высказано предположение, что капиллярный электрофорез улучшает разрешение и точность идентификации. Для идентификации свинины, курицы и утки в продуктах из говядины была разработана быстрая прямая мультиплексная ПЦР с лизисом в течение 90 минут с чувствительностью 0,1% ткани (вес/вес). В этом методе для выделения ДНК использовали метод прямого лизиса, а амплификацию проводили с использованием четырех пар высокоспецифичных праймеров, нацеленных на область D-петли митохондрий.

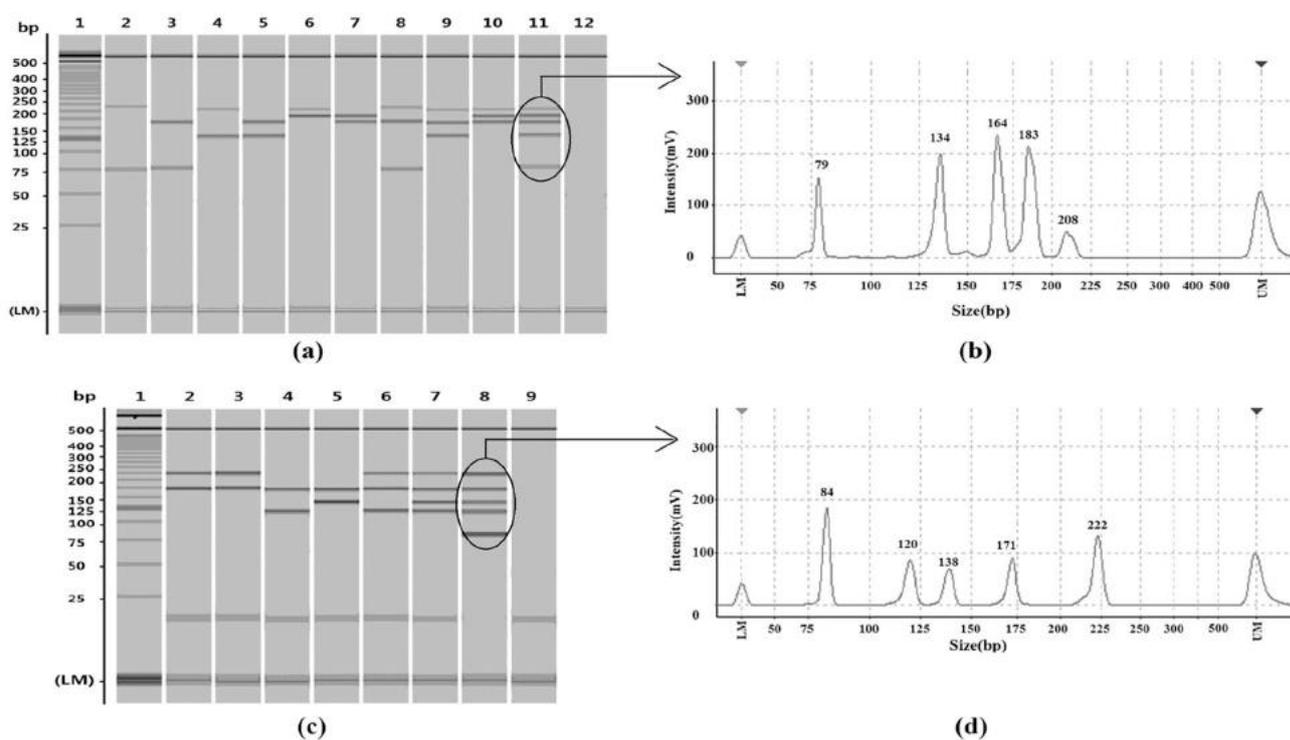


Рисунок 6 – Изображение геля и электрофореграммы двух продуктов мультиплексной ПЦР, амплифицированных из различных комбинаций матриц. (Дорожки показывают продукты ПЦР мультиплексной ПЦР различных видов; электрофореграммы (b) показывают соответствующие пятикратные ПЦР крупного рогатого скота, ослов, лисиц, оленей и лошадей; электрофореграммы (d) показывают соответствующие пятикратные ПЦР кошек, свиней, мышей, овец и уток.

2.2.1.16 Мультиплексная ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени основана на обнаружении флуоресценции репортерной молекулы, которая усиливается по мере протекания реакции в реальном времени. Эти флуоресцентные сигнальные молекулы включают неспецифический флуоресцентный краситель, такой как SYBR® Green, или специфичные для последовательности ДНК-зонды (зонды в виде шпилек, т.е. молекулярные маяки, или экзонуклеазные зонды, т.е. зонды TaqMan®) [188]. Мультиплексная ПЦР в реальном времени использует набор видоспецифичных праймеров и зондов, которые помечены разными флуоресцентными красителями для каждого целевого вида, так что приблизительно от двух до пяти видов могут быть обнаружены одновременно в одной реакции ПЦР в реальном времени [56]. Мультиплексная ПЦР с конечной точкой дает только качественную информацию о наличии генов-мишеней в образце. Системы мультиплексной ПЦР в реальном времени отслеживают ход реакции ПЦР в режиме реального времени и предоставляют качественную, а также количественную информацию о генах-мишенях. Флуоресцентные красители недороги, но их главный недостаток заключается в том, что они не специфичны к последовательности, и мультиплексирование по цвету невозможно.

Таким образом, цветовое мультиплексирование перспективно с олигонуклеотидными зондами, помеченными разными флуоресцентными группами. Эти зонды специфичны для последовательности и могут быть легко мультиплексированы по цвету. Была разработана тройная ПЦР в реальном времени, нацеленная на митохондриальный рибосомный ген 12 S для обнаружения ДНК верблюда и коровы в различных пищевых продуктах, которая может точно определять 0,1% мяса (рис. 7). Мультиплексная ПЦР в реальном времени была разработана для различения овец/коз (237 п.н.), лисиц (211 п.н.) и мышей (160 п.н.) с чувствительностью 0,05 нг. Метод использовал последовательности ядерной ДНК и показал хорошую точность (RE от 1,64% до 18,43%) и прецизионность (RSD от 0,51% до 12,70%). Аналогичным образом компоненты крупного рогатого скота и лошади были обнаружены в мясном

фарше с использованием последовательностей ядерной ДНК с чувствительностью 0,05 нг как в традиционной ПЦР, так и в режиме реального времени, а предел количественного определения снизился до 5%. В этом исследовании мультиплексная ПЦР в реальном времени показала более высокую точность ($R.E. \leq 9,35\%$) и воспроизводимость ($RSD \leq 8,88\%$) в пяти бинарных смесях ДНК крупного рогатого скота и лошади.

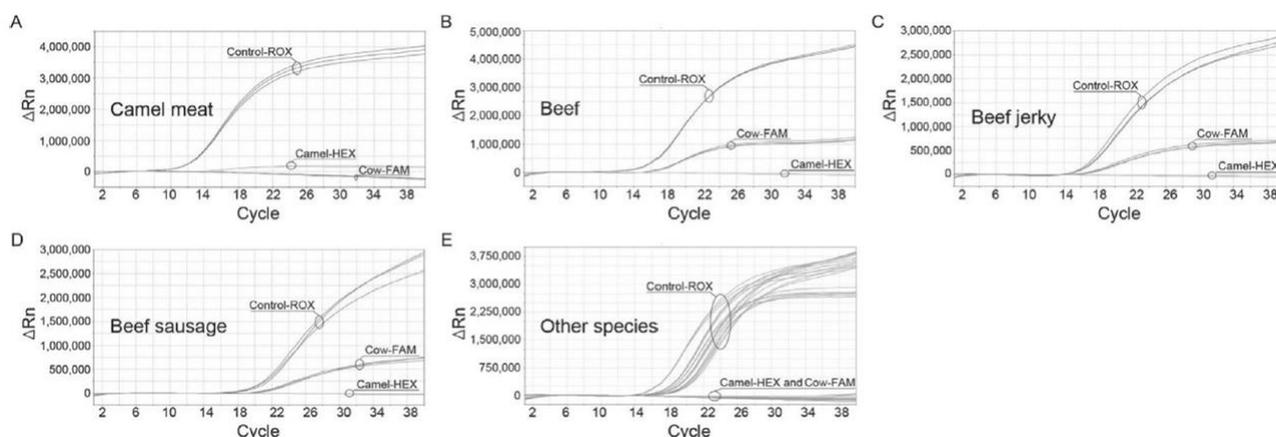


Рисунок 7 – Кривые амплификации триплексной ПЦР в реальном времени для обнаружения ДНК верблюда и коровы в мясных продуктах.

Дуплексная ПЦР в реальном времени на основе зондов была разработана для обнаружения замши в переработанных мясных продуктах с чувствительностью 1,25 пг/мкл ДНК или 0,05% ткани [135]. Для идентификации свинины, курицы и говядины в образцах переработанного мяса в течение 40 минут был разработан экспресс-метод ПЦР в реальном времени на основе мультиплексных зондов TaqMan®. Для мультиплексной детекции на 5'-конце зондов использовали метки FAM, VIC и NED. Метод показал более высокую специфичность для свинины, курицы и говядины среди 20 видов животных и хорошую чувствительность 0,1 пг ДНК и 0,5% в эталонных мясных смесях. Для идентификации ДНК кур, уток и гусей в мясе была разработана триплексная ПЦР в реальном времени. Три независимые пары праймеров и три зонда использовали для амплификации, в то время как эндогенный контроль использовали, чтобы избежать ложноотрицательных результатов. Метод имел чувствительность 0,001–0,00025 нг, 0,0025–0,0001 нг и 0,001–0,00001 нг для

ДНК курицы, утки и гуся соответственно. Уровень обнаружения составил 0,1% в мясных смесях.

Мультиплексная ОТ-ПЦР на основе анализа кривой плавления была разработана для одновременного обнаружения одиннадцати видов мяса. В методе использовались шесть пар праймеров, и ампликоны однозначно соответствовали шести различным пикам плавления при $71,69 \pm 0,60$ °C (овцы/козы), $74,47 \pm 0,34$ °C (лошади), $78,87 \pm 0,33$ °C (крупный рогатый скот), $80,75 \pm 0,15$ °C (свинья), $83,36 \pm 0,08$ °C (осел) и $85,10-87,16$ °C (птица: курица, утка, гусь, дикий гусь и перепел) соответственно. Метод показал более высокую специфичность с пределом обнаружения 0,01–0,1 нг ДНК и 0,1–1% мяса в настоящих мясных смесях. Недавно был разработан метод тройной ПЦР в реальном времени и анализа кривой плавления для одновременного обнаружения трех видов мяса с чувствительностью 0,001–0,1 нг ДНК. В методе использовались праймеры, специфичные для семейства, несмотря на традиционный праймер, и один праймер, специфичный для семейства, позволял идентифицировать несколько видов мяса в группе определенных видов.

2.2.1.17 Мультиплексный полиморфизм длины рестрикционных фрагментов-ПЦР

Метод мультиплексной ПДРФ-ПЦР прост, обладает высокой пропускной способностью, высокой скоростью обработки и более экономичен для рутинной идентификации мяса в пищевых продуктах [57]. Ali et al. разработали метод ПЦР-ПДРФ для обнаружения кроликов, крыс и белок в одном анализе в сырых и обработанных пищевых продуктах. Специфичность анализа была подтверждена в отношении 45 видов и 22 нецелевых видов. Во-первых, они использовали целевые гены *Cytb* и *ATPase6*, чтобы получить ампликоны размером 123, 108, 243 и 141 п.н. для кролика, крысы, белки и всех эукариот соответственно. Продукты ПЦР дополнительно расщепляли рестрикционными ферментами *BtsIMutI* и *BtsCI* для получения характерных отпечатков пальцев для этих видов. Этот метод хорошо подходит для проверки предела

обнаружения фальсификации до 0,1% мяса в коммерческих образцах. Аналогичным образом, Guan et al. [212] разработали анализ ПЦР-ПДРФ с использованием пары универсальных праймеров и рестрикционного фермента *SspI* для одновременной идентификации восьми видов мяса, включая коз, овец, оленей, буйволов, крупного рогатого скота, яков, свиней и верблюдов. Этот метод позволял различать все целевые виды с пределом обнаружения от 0,01 до 0,05 нг. Этот метод относительно прост, быстр, специфичен, чувствителен, надежен, не требует дорогостоящего оборудования и может применяться в большинстве лабораторий для выявления мошеннических и неправильно маркированных заменителей в мясных продуктах. Точно так же Хоссейн и соавт. использовали мультиплексный ПЦР-анализ с нацеливанием на два гена, чтобы различать замены говядины, буйвола и свинины в сырых и переработанных мясных продуктах. Этот анализ нацелен на два разных сайта генов для каждого целевого вида с использованием митохондриальных генов *Cytb* и *ND5*, а продукты ПЦР дополнительно расщепляли рестрикционными ферментами *AluI*, *EciI*, *FatI* и *CviKI-1*. Предел обнаружения этого анализа был достаточным для идентификации говядины, буйволиного мяса и свинины в сырых и обработанных продуктах с фальсификацией всего 0,1%. Гептаплексная ПЦР-ПДРФ, нацеленная на митохондриальные гены *Cytb* и *ND5*, была разработана для идентификации видов животных (корова, буйвол, коза, овца, курица, утка и свинья) в пищевых продуктах. Продукты ПЦР подвергали рестрикционному расщеплению ферментами *FatI*, *VfaI* и *HPY188I* и идентифицировали с помощью автоматизированной системы электрофореза с чувствительностью 0,5% (вес/вес) мяса в смешанных матрицах и пищевых продуктах. Метод мультиплексной ПЦР-ПДРФ был разработан для обнаружения видов кур, собак и кошек в мясе. Амплификацию гена *Cytb* с помощью ПЦР проводили с помощью универсального праймера, а для расщепления использовали рестрикционные ферменты *SspI*, *TaaI* и *BsmAI*.

Ограничения и перспективы на будущее. Метод аутентификации, используемый для определения видов мяса в сырых и переработанных мясных продуктах, должен давать точные и конкретные результаты с обнаружением следовых количеств фальсификации в любой форме. Поэтому ДНК-методы получили наибольшее распространение благодаря их универсальности, чувствительности, термостабильности и т. д.. Методы, основанные на ПЦР, наиболее подходят, поскольку они обеспечивают доступность мишени за счет амплификации даже одной копии последовательности-мишени. По сравнению с традиционными системами одиночной ПЦР, мультиплексная ПЦР является более быстрым и надежным инструментом для одновременного обнаружения нескольких видов, присутствующих в мясных продуктах, и экономии средств и времени. Мацунага и др. [169] впервые использовали мультиплексную ПЦР с конечной точкой для идентификации шести видов мяса. После этого несколько исследователей использовали мультиплексную ПЦР с конечной точкой, создав видоспецифичные праймеры, нацеленные на *Cytb*, митохондриальные 12 S рРНК, 16 S рРНК, ND5, 5 S рДНК, D-петлю, тРНК-Val и т. д. гены для обнаружения фальсификации в мясных продуктах. Хотя мультиплексная ПЦР с конечной точкой является надежным, чувствительным, быстрым и эффективным методом идентификации видов мяса, но из-за использования более длинных ампликонов ДНК-мишень разрушается при сильном нагревании и обработке, что снижает эффективность и чувствительность ПЦР (Арслан и др., 2005). Кроме того, разница в длине амплифицированных продуктов ПЦР должна быть адекватной (40–50 п.н.), поскольку электрофорез в агарозном геле не позволяет дифференцировать амплифицированные продукты, имеющие разницу в длине менее 10 п.н. Кроме того, эффективность мультиплексной ПЦР с конечной точкой сильно страдает из-за предпочтительной амплификации наиболее распространенных локусов. Следовательно, этот метод не подходит для обнаружения более низких уровней ДНК в коммерческих мясных продуктах.

Мультиплексная ПЦР в реальном времени разработана для преодоления недостатков мультиплексной ПЦР в конечной точке. Эта самоавтоматизированная ПЦР обеспечивает количественное определение с высокой чувствительностью без необходимости проведения утомительного электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. В мультиплексной ПЦР в реальном времени используется сигнальный зонд с флуоресцентной меткой или репортерные красители, такие как SYBR Green (Li et al., 2021; Wu et al., 2018), EvaGreen и зонд TaqMan для идентификации мясных видов. Краситель SYBR Green неспецифичен, что ограничивает амплификацию ПЦР при высоких концентрациях, а при низких концентрациях он распределяется неравномерно, что приводит к плохому сигналу при анализе кривой плавления. Из-за сложности праймеров, используемых в процедуре EvaGreen, наиболее предпочтительны ПЦР в реальном времени на основе зондов TaqMan. Мультиплексная ПЦР в реальном времени на основе TaqMan позволяет проводить дополнительный скрининг мишеней с использованием видоспецифичных праймеров и зондов.

Существуют различные препятствия при разработке мультиплексной ПЦР в реальном времени, такие как разделение максимумов эмиссии репортерных красителей не менее чем на 15 нм и перекрытие спектров поглощения гасителя со спектром флуоресценции репортера для предотвращения повторного поглощения излучаемого света. Поэтому необходима оптимизация концентрации зонда, репортер-гасителя флуоресценции и поглощения. Кроме того, использование нескольких зондов TaqMan в одной реакции приводит к значительному фоновому сигналу, и для уменьшения фонового сигнала каждый зонд следует титровать до минимально возможной концентрации, а второй гаситель (зонд ZEN) может быть использован в зонде для повышения отношения сигнал/шум [57]. Тем не менее, выбор комбинации репортер-гаситель должен быть совместим с оборудованием, используемым для считывания флуоресценции. Кроме того,

метод видообразования должен обнаруживать широкий спектр аналитов, а системы ПЦР должны быть экономически эффективными, чтобы поддерживать расходы на лабораторию на разумном уровне. Несмотря на некоторые недостатки, ожидается, что в ближайшем будущем системы мультиплексной ПЦР в реальном времени на основе зондов TaqMan получат широкое распространение для определения идентичности многих видов на одной тестовой платформе.

В связи с растущим спросом на мясную продукцию и животный белок и растущей настороженностью потребителей и регулирующих органов в отношении состава мяса крайне важно установить подлинность источника мяса. В прошлом исследователи разработали несколько методов идентификации видов мяса, но они требуют много времени, денег и труда. Таким образом, анализ нескольких целей на одной аналитической платформе является технической проблемой в мясной промышленности. Спектроскопические методы генерируют большой объем данных и требуют сложных хемометрических моделей для различения видов мяса, что делает их непрактичными для приложений в реальном времени. Белковые методы имеют ряд недостатков, таких как денатурация белка во время обработки и неспособность антител различать близкородственные виды мяса. Мультиплексная ПЦР обеспечивает одновременную амплификацию и обнаружение нескольких последовательностей-мишеней за один прогон. Объединение нескольких анализов в одной реакционной смеси может привести к экономии средств и позволить исследователям получить исчерпывающие данные из ограниченного количества исходного материала. Использование наборов видоспецифичных праймеров и зондов (Molecular Beacon, EvaGreen, TaqMan, SYBR Green) в мультиплексной ПЦР в реальном времени обеспечивает дополнительный скрининг мишеней, подтверждая обнаружение точных мишеней с высокой чувствительностью. Однако мультиплексная ПЦР имеет ряд недостатков: 1) образование праймеров-димеров; 2) низкая

эффективность усиления; и 3) не одинаковая эффективность на разных шаблонах.

2.2.2. Выявление содержания свинины

В 2016 году Бургиба-Хашеми и Фатхаллах исследовали розничный рынок продуктов из говядины на наличие свинины с использованием количественной ПЦР. Из образцов, положительных на свинину, лишь немногие показали фальсификацию выше 1% порога; в то время как в большинстве этих продуктов были обнаружены следы свинины (<1%). Предел обнаружения в 1%, как сообщают некоторые другие, не гарантирует отсутствие фальсификации мяса, т.к. могут использоваться компоненты животного происхождения с низким содержанием ДНК. Более того, его отвергают такие общины, как мусульмане, евреи и другие, для которых неприемлем любой уровень потребления свинины, даже в незначительных количествах. Присутствие следов ДНК видов, отличных от тех, что указаны на этикетке продукта (до 1%), обычно связывают с переносом в результате последовательных производственных процессов с использованием одного и того же промышленного оборудования.

Несколько методов ПЦР в реальном времени основаны на обнаружении небольших участков D-петли мт-ДНК. Так, D-loop686 (Maryam, Sismindari, Sudjadi, & Rohman, 2016) и D-loop22 (Rahmawati, Sismindari, Raharjo, Sudjadi, & Rohman, 2016) использовались для обнаружения загрязнения свининой в денденг (тонко нарезанное сушеное мясо) в индонезийской кухне) и абон (рубленое мясо) соответственно, с пределом обнаружения 0,05 % мяса, а также 10 пг для измельченной свинины и 0,5 % для смеси свинины и говядины. Тот же участок ДНК использовали для количественного определения свинины в переработанных мясных продуктах с пределом обнаружения 0,1 пг в термообработанной свинине и 0,1% (в весовом отношении) в мясных примесях. Еще одна быстрая кПЦР с использованием ДНК D-петли успешно определила количество свинины до 0,5% в мясных продуктах промышленной переработки в течение 40 минут. С другой стороны, анализ qPCR на основе лептина Primer-

AJ865080 также был успешно использован для амплификации ДНК свинины, особенно в фрикадельках. Кроме того, в 2017 году Аль-Кахтани, Исмаил и Ахмед обнаружили ДНК свинины в девяти из 75 коммерческих образцов пищевых продуктов с помощью ПЦР в реальном времени (с использованием ДНК элемента 12S рРНК–тРНК-Val и PRE-1 SINE), но не методом ПЦР.

ПЦР в реальном времени на основе красителя был проведен на нескольких мясных экстрактах. ПЦР в реальном времени на основе SG выявила 0,05% пикового уровня ДНК свинины в примесях сырого мяса с пороговым значением цикла отсечки (Ct), равным 30 циклам. В другом анализе SG-qPCR можно было использовать специфические праймеры, полученные из *cyt-b*, с 1 пг в качестве LOD, тогда как значение коэффициента детерминации (R²) составляло 0,956 для коммерческих фрикаделек. В улучшенном методе выделения геномной ДНК с сокращенным временем экстракции использовался анализ SGqPCR на основе повторяющихся элементов LINE-1. Этот метод был проверен на специфичность, чувствительность (0,001% по весу) и надежность для создания готового к использованию набора для быстрого обнаружения примесей свинины в переработанных мясных продуктах.

Для обнаружения фальсификации свинины в мясных продуктах использовали краситель EvaGreen с чувствительностью 0,001% в колбасе. Идентификация геномов была выполнена по характерному пику плавления, который для свинины составил 87,5 °С. В другом исследовании 2017 года Амарал, Сантос, Оливейра и Мафра успешно разработали и оптимизировали нормализованный, специфичный и высокочувствительный анализ количественной ПЦР EvaGreen на основе метода Δ Ct, что позволило обнаруживать и количественно определять уровни до 0,0001% и 0,01% (мас./мас.) мяса свинины, как в сыром, так и в термически обработанном мясе, соответственно. Тот же краситель использовался для обнаружения ДНК свиньи в 35 образцах пищевых продуктов с использованием наборов праймеров, нацеленных на ген *cyt-b*, с чувствительностью до 0,001% примеси свиньи в

бинарной смеси сырой свинины с курицей. Канг и Танака [59] сравнили два распространенных метода количественного определения ДНК выделенной ДНК свиньи и пять подходов количественного определения (с использованием SYBR Green) продуктов количественной ПЦР для оценки фальсификации свинины в продуктах из переработанной говядины. Было обнаружено, что разведение ДНК, основанное на результатах спектрофлуориметрии, показывает лучшие результаты количественной ПЦР, чем результаты, основанные на спектрофотометрии, с точки зрения линейной корреляции, эффективности амплификации и линейного динамического диапазона. Методы нормализации гена 18S рРНК продемонстрировали лучшую точность (от -11,79% до -6,73%), чем методы, использующие абсолютные и относительные стандартные кривые (от -28,52% до -18,64%) в модельном бургере.

Пороговый уровень ПЦР-реакции — это уровень, в котором флуоресцентный сигнал становится статистически значимо выше, чем таковой в нулевом уровне, то есть тот, в котором наблюдается сигнал от амплификации достоверно отделимый от фона. Пороговый цикл реакции (C_t) — цикл ПЦР-реакции, на котором флуоресцентный сигнал реакции превышает пороговый уровень. C_t обратно пропорционален изначальному количеству ДНК в образце, что позволяет рассчитать его. Если C_t одного образца ниже другого на один, это означает, что в первом образце содержалось в два раза больше ДНК, чем во втором (если мы считаем, что эффективность реакции 100%).

2.2.3. Утвержденные методы ЕС для определения компонентов животного происхождения

ПОСТАНОВЛЕНИЕ КОМИССИИ (ЕС) № 51/2013 от 16 января 2013 года о внесении изменений в Регламент (ЕС) № 152/2009 в отношении методов анализа для определения компонентов животного происхождения для официального контроля кормов [223].

Принимая во внимание Постановление (ЕС) № 882/2004 Европейского парламента и Совета от 29 апреля 2004 года об официальном контроле,

проводимом для обеспечения проверки соблюдения законодательства о кормах и продуктах питания, правил охраны здоровья и благополучия животных и, в частности, его статьи 11 были разработаны новые методы идентификации видового состава [224].

Новый метод определения компонентов животного происхождения, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР), был одобрен референс-лабораторией ЕС по животным белкам в кормах. Исследование внедрения, организованное с национальными референс-лабораториями государств-членов, показало, что новый метод достаточно надежен для использования в качестве официального метода контроля в ЕС. Этот новый метод способен обнаруживать присутствие компонентов животного происхождения в корме, а также способен определять видовое происхождение этих компонентов. Использование этого нового метода в сочетании с микроскопическим методом или в качестве замены, в зависимости от обстоятельств, позволило улучшить контроль за правильным выполнением запретов на кормление, изложенных в Правилах (ЕС) № 999/2001 [225] и (ЕС) № 1069/2009 [226].

Определение компонентов животного происхождения в кормах проводится с помощью световой микроскопии и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в соответствии с положениями, изложенными в методике.

Эти два метода позволяют определять наличие компонентов животного происхождения в кормовых материалах и комбикормах. Однако они не позволяют рассчитать точное количество таких компонентов в кормовых материалах и комбикормах. Оба метода имеют предел обнаружения ниже 0,1% (масс%).

Метод ПЦР позволяет идентифицировать таксономическую группу компонентов животного происхождения, присутствующих в кормовых материалах и комбикормах.

Эти методы должны применяться для контроля за применением запретов, изложенных в статье 7(1) и Приложении IV к Регламенту (ЕС) № 999/2001 и в статье 11(1) Регламента (ЕС) № 1069/2009 [225, 226].

В зависимости от типа тестируемого корма, эти методы могут использоваться в рамках одного операционного протокола либо сами по себе, либо в сочетании друг с другом в соответствии со стандартными операционными процедурами (SOP), установленными референтной лабораторией ЕС по животным белкам в кормах (EURL-AP) и опубликованными на ее веб-сайте.

Пример одной из таких методик приведен на рисунке 8.



European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs

Wallon Agricultural Research Centre, Herestraat Building
 Knowledge and Valorisation of Agricultural Products Department (S13)
 Chaussée de Namur 24, B – 5030 GEMBLOUX

☎ +32 (0) 81 87 52 28 ☎ +32 (0) 81 87 40 09
 e-mail ap@eur-lab.eu Internet: <http://eur-lab.eu>

EURL-AP Standard Operating Procedure

Detection of poultry (chicken and turkey) DNA

in feed using real-time PCR

Method development:
EURL-AP

Method assessment and validation:
EURL-AP

Experts for edition and revision	
Version 1.0	Last major revision
EURL-AP	

DISCLAIMER

This SOP includes the use of the PCR test validated for the detection of poultry DNA.
 Its full application is on the condition that poultry calibrants are available.

Version 1.0
Page 1 on 15
Publication date 10.09.2021
Applicable on 15.09.2021

Рисунок 8 – Валидированная методика выявления ДНК сельскохозяйственной птицы в кормах для животных

Данная методика является количественной с точки зрения определения аналита, т.е. ДНК, т.к. используется стандартный образец количества копий целевой ДНК. Однако, с ее помощью нельзя количественно определить содержание той или иной рецептурной закладки, т.к. сырьевые компоненты кормов не стандартизированы, проходят через разную глубину технологической обработки и, соответственно, белки и ДНК, содержащиеся в нем, имеют разную степень деградации.

Для количественного определения ДНК убойных видов животных в Европе нет утвержденных официальных методов. Имеются множество сертифицированных коммерческих тест систем и утвержденные матричные стандартные образцы состава.

Шесть новых эталонных материалов для мясных смесей, разработаны LGC (Подразделение национального института измерений Великобритании для химических и биоаналитических измерений) для защиты потребителей от мошенничества с продуктами питания. Мясные матричные смеси позволяют лабораториям по тестированию пищевых продуктов оценивать качество своих измерений и обеспечивать возможность обнаружения замен в мясных продуктах в заданном диапазоне измерений. Материалы были проанализированы с использованием трех различных подходов – секвенирования ДНК, метода на основе ПЦР и метода иммуноанализа – для подтверждения предполагаемого вида мяса в образцах и отсутствия возможного перекрестного загрязнения видами. Предел количественного обнаружения метода составляет менее 1% одного вида мяса в присутствии другого. Эти эталонные материалы были выпущены непосредственно в ответ на инцидент с кониной и последующие сообщения о замене более дешевого мяса в пищевой цепочке. Гилл Холкомб, руководитель отдела производства эталонных материалов, сказал: «Отчет FSA в отношении целостности и надежности

цепочек поставок продуктов питания» выявил масштабы мошенничества с продуктами питания. Это подчеркнуло необходимость в эталонных материалах, которые помогут лабораториям идентифицировать виды, присутствующие в образцах мяса, и гарантировать, что потребители не будут обмануты. В марте 2013 года мы выпустили эталонные материалы для идентификации и количественного определения конины в говядине и свинины в говядине, и теперь мы добавили мясо овцы и дополнительные смеси в наш каталог эталонных материалов».

В Великобритании в соответствии со статьями 14 и 15 Закона о безопасности пищевых продуктов 1990 года продажа продуктов, которые «не соответствуют по происхождению, составу или качеству заявленному», или «ложное или вводящее в заблуждение описание или представление продуктов питания» является преступлением. Расследование Агентства по пищевым стандартам (FSA), опубликованное в апреле 2014 года, показало, что в некоторых блюдах из баранины из ресторанов навывнос по всей Великобритании содержится более дешевое мясо, такое как курица и говядина. Из 145 протестированных образцов 43 содержали мясо, отличное от баранины, а в 25 из этих образцов была обнаружена только говядина. Среди других выявленных видов мяса были курица и индейка. Ни в одном образце не было обнаружено конины. LGC также выпустила эталонные материалы для отдельных видов мяса, подготовленные в соответствии с аккредитацией LGC по стандарту ISO Guide 34, для мяса индейки, курицы, овцы, конины, говядины и свинины.

Новые эталонные материалы:

- 5% мас.% говядины в овечьем мясе (LGC7249)
- 1% мас.% говядины в овечьем мясе (LGC7248)
- 5% мас.% индейки в овечьем мясе (LGC7247)
- 1% мас.% индейки в овечьем мясе (LGC7246)
- 5% от массы курицы в овечьем мясе (LGC7245)

- 1% от массы курицы в овечьем мясе (LGC7244)

Эталонными материалами для отдельных видов мяса являются:

- Мясо индейки (LGC7225)
- Куриное мясо (LGC7224)
- Мясо овцы (LGC7223)
- Конина (LGC7220)
- Говядина (LGC7221)
- Мясо свинины (LGC7222)

LGC также предлагает схемы проверки подлинности мяса и рыбы, которые дополняют ассортимент эталонных материалов. Таким образом, лаборатории могут подтвердить аналитический метод с использованием эталонных материалов, а затем продемонстрировать свою способность обнаруживать загрязнение при слепом тестировании с помощью стандартизированной схемы.

Данная схема исследований применяется как надзорными органами ЕС для контроля мясного сырья на наличие незаявленных примесей, так и при производственном контроле на самих предприятиях. С учетом того, что в странах ЕС и США основной упор делается на контроль исходных компонентов, сырья и вспомогательных материалах, то использование в качестве стандартных матричных образцов сырого фарша, позволяет в достаточной степени достоверности определить содержание незаявленной примеси.

В колбасных изделиях, где в качестве исходных компонентов могут использоваться различные мясные ингредиенты, не только мышечные, данная методология будет давать лишь приблизительную оценку сырьевого состава продукции. С нашей точки зрения, такой подход может использоваться при расчете именно незаявленных примесей, т.е. того, чего в продукте быть не должно. Для подтверждения сырьевого состава мясной необходимо использовать комплексный подход с использованием

различных методов исследований и составление экспертного заключения.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных работ были проанализированы литературные данные по количественным методам исследований видового состава мяса и мясной продукции. Основным количественным методом является ПЦР в реальном времени с использованием аттестованных стандартных образцов. Перспективным количественным методом является так называемая цифровая ПЦР с прямым подсчетом количества копий целевой ДНК в аналитической пробе. Была подготовлена историография по проблематике фальсификации мясной продукции незаявленными видами мяса, а также проведен анализ экономического аспекта этого вопроса и проблем, связанных с безопасностью такой продукции.

Были проанализированы работы, связанные с нормированием незаявленных примесей в мясной продукции. Установлено, что этот вопрос в целом не имеет однозначного решения, поэтому на уровне законодательства эти нормы не приняты.

На уровне контролирующих органов приняты методические рекомендации по нормам отбора продукции от исследуемой партии и пороговые значения отсечения положительных результатов ПЦР анализа. В Великобритании установлены самые жесткие нормы по незаявленным примесям, не более 0,1%. В ЕС на уровне законодательства установлена норма по идентификации продукции, выработанной с использованием конины для ее проверки на содержание фенилбутазона и по другим показателям безопасности. Определен уровень содержания конины более 1,0%. В подавляющем количестве стран вопрос о признании продукции фальсифицированной с экономической целью (ЕМА) решается индивидуально.

С учетом того, что многие случаи фальсификации с подменой мяса при изготовлении мясной продукции связаны с проблемой безопасности, в качестве ориентиров для разработки соответствующих требований в сфере технического

регулирования в отношении пищевой продукции животного происхождения следует применять наиболее жесткие нормы по лимитированию незаявленных примесей.

Учитывая результаты исследования международного опыта по установлению предельно допустимого уровня ДНК компонентов состава мясной продукции в целях установления схожих правил регулирования в рамках технических регламентов Евразийского экономического союза целесообразно рекомендовать включить в ТР ТС 034/2013:

- понятие «следовые количества», диапазон которых в отношении мясных ингредиентов определяется пределом чувствительности методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) (предварительно 0,1 %), а также понятие «технологическая примесь» взамен понятия «технологически неустраняемая примесь», так как на предприятиях по изготовлению мясной продукции является возможным практическое устранение примеси (незаявленные в составе мясной продукции мясные ингредиенты) до следовых количеств, и такое «устранение» указанных примесей, в настоящее время, способно сделать производство определенных видов мясной продукции экономически невыгодным и повлечь значительное сокращение одновременно выпускаемого ассортимента продукции и объемов его производства;

- допустимые диапазоны остаточного содержания технологических примесей (свыше следовых количеств предварительно 0,1 %) различных видов пищевого сырья животного происхождения, значения которых будут установлены в ходе проведения НИР и согласованы рабочей комиссией. В случае, если технологическая примесь превышает допустимый диапазон, то такой мясной ингредиент должен быть включен в маркировку состава мясной продукции.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety
2. Annunziata L., Visciano P., Stramenga A., Colagrande M. N., Campana G., Scortichini G., et al. Investigation of phenylbutazone and its metabolite oxyphenbutazone in horse meat products during years 2013-2017 // Drug Testing and Analysis. – 2018. – Vol. 10, P. 1251–1257.
3. Dodman N., Blondeau N., Marini A. M. Association of phenylbutazone usage with horses bought for slaughter: A public health risk // Food and Chemical Toxicology. – 2010. – Vol. 48. P. 1270–1274.
4. ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». – URL: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/tr/Documents/TR%20TS%20PishevayaProd.pdf> (дата обращения: 15.06.2022).
5. ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции». – URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/0043629/cncd_11102013_68 (дата обращения: 15.06.2022).
6. ТР ЕАЭС 051/2021 «О безопасности мяса птицы и продукции его переработки». – URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01430504/err_16112021_110 (дата обращения: 15.06.2022).
7. Решение Коллегии ЕЭК от 24 декабря 2019 г. № 236 «О перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011), и перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, содержащих правила и методы

исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011) и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования». – URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01428492/clcd_27122019 (дата обращения: 15.06.2022).

8. Решение Коллегии ЕЭК от 19 ноября 2019 г. № 198 «О перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013), и перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013) и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования». – URL: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01423886/clcd_22112019_198 (дата обращения: 15.06.2022).

9. Проект решения Коллегии ЕЭК «О перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, в результате применения которых на добровольной основе обеспечивается соблюдение требований технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности мяса птицы и продукции ее переработки», и перечне международных и региональных (межгосударственных) стандартов, а в случае их отсутствия – национальных (государственных) стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов,

необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности мяса птицы и продукции ее переработки» и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования». – URL: https://docs.eaeunion.org/pd/ru-ru/0103817/pd_26032019 (дата обращения: 15.06.2022).

10. Leinonen I., Iannetta P. P. M. et al. Lysine Supply Is a Critical Factor in Achieving Sustainable Global Protein Economy // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. – 2019. – Vol. 3. Article 27. doi:10.3389/fsufs.2019.00027

11. Lynch H., Berardy A. et al. Food production and dietary patterns // *Environmental Nutrition*. – 2019. – P. 101–122.

12. Henchion M., McCarthy M. et al. Meat consumption: Trends and quality matters // *Meat Science*. – 2014. – 98(3). P. 561–568.

13. Mori C., Matsumura S. (2020). Current issues for mammalian species identification in forensic science: a review. *International Journal of Legal Medicine*.

14. Risch P.K. The horsemeat scandal: the unknown victims of economically motivated crime // *Revista De Victimol*. – 2017. – 5. P. 63–84.

15. The Guardian. Burger scandal: new tests at factory reveal more horse DNA. — URL: <https://www.theguardian.com/world/2013/jan/18/burger-scandal-tests-horse-dna> (дата обращения 2022-06-09).

16. Hsieh Y. H. P., Woodward B. B., Ho S. H. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays // *Journal of food protection*. – 1995. – Vol. 58. – No. 5. – P. 555-559.

17. Ayaz Y., Ayaz N. D., Erol I. Detection of species in meat and meat products using Enzyme- Linked Immunosorbent Assay // *Journal of Muscle Foods*. – 2006. – Vol. 17. – No. 2. – P. 214-220.

18. Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H. Species determination–Can we detect and quantify meat adulteration? // *Meat science*. – 2009. – Vol. 83. – No. 2. – P. 165-174.

19. Bourguiba-Hachemi S., Fathallah M. D. DNA testing of meat foods raises issues beyond adulteration //Sky Journal of Food Science. – 2016. – Т. 5. – №. 1. – P. 1-7.

20. Regulation (EU) No 99/2013 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2013 on the European statistical programme 2013-17 Text with relevance for the EEA and for Switzerland. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32013R0099> (дата обращения: 15.06.2022).

21. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037&qid=1657873363264> (дата обращения: 15.06.2022).

22. 2014/180/EU: Commission Recommendation of 27 March 2014 on a second coordinated control plan with a view to establishing the prevalence of fraudulent practices in the marketing of certain foods Text with EEA relevance. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32014H0180&qid=1657873516773> (дата обращения: 15.06.2022).

23. Robson K., Dean M., Brooks S., Haughey S., Elliott, C. A 20-year analysis of reported food fraud in the global beef supply chain // Food Control. – 2020. – Vol. 116, p. 107310.

24. Ahmad A. N., Ungku Zainal Abidin U. F. et al. Overview of the halal food control system in Malaysia // Food Control. – 2018. – Vol. 90. P. 352–363.

25. MEAT SPECIES – REGULATIONS AND ANALYSIS. — URL: <https://www.factssa.com/news/meat-species-regulations-and-analysis/> (дата обращения 2022-06-09).

26. Naaum A. M. et al. Complementary molecular methods detect undeclared species in sausage products at retail markets in Canada //Food Control. – 2018. – Vol. 84. – P. 339-344.
27. Kitpipit T., Sittichan K., Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products //Food Chemistry. – 2014. – Vol. 163. – P. 77-82.
28. Ulca P., Balta H., Çağın İ., Senyuva H. Z. Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods //Meat Science. – 2013. – Vol. 94. – No. 3. – P. 280-284.
29. Mehdizadeh M., Mousavi S. M., Rabiei M., Moradian K., Eskandari S., Abbasi Fesarani M., et al. Detection of chicken meat adulteration in raw hamburger using polymerase chain reaction //Journal of food quality and hazards control. – 2014. – Vol. 1. – No. 2. – P. 36-40.
30. Kane D. E., Hellberg R. S. Identification of species in ground meat products sold on the US commercial market using DNA-based methods //Food Control. – 2016. – Vol. 59. – P. 158-163.
31. Quinto C. A., Tinoco R., Hellberg R. S. DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the US commercial market //Food Control. – 2016. – Vol. 59. – P. 386-392.
32. Cawthorn D. M., Steinman H. A., Hoffman L. C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa //Food control. – 2013. – Vol. 32. – No. 2. – P. 440-449.
33. D'Amato M. E., Alechine E., Cloete K. W., Davison S., Corach D. Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study //Investigative genetics. – 2013. – Vol. 4. – No. 1. P. 1-13.
34. Rodriguez M. A., Garcia T., Gonzalez I., Asensio L., Mayoral B., López-Calleja I., et al. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51. – No. 6. – P. 1524-1529.

35. Cai Y., Li X., Lv R., Yang J., Li J., He Y., Pan L. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR //BioMed research international. – 2014. – Vol. 2014. P. 1-6.
36. Floren C., Wiedemann I., Brenig B., Schütz E., Beck J. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) //Food chemistry. – 2015. – Vol. 173. P. 1054-1058.
37. von Barga C., Brockmeyer J., Humpf H. U. Meat authentication: a new HPLC–MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62. – No. 39. – P. 9428-9435.
38. Premanandh J., Sabbagh A., Maruthamuthu M. Misdescription of packaged foods: a case study from the United Arab Emirates //Food Additives & Contaminants: Part A. – 2013. – Vol. 30. – No. 12. – P. 2022-2026.
39. O'mahony P. J. Finding horse meat in beef products—a global problem //QJM: An International Journal of Medicine. – 2013. – Vol. 106. – No. 6. – P. 595-597.
40. Staats M., Arulandhu A.J., Gravendeel B. et al. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification //Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2016. – Vol. 408, No. 17. P. 4615-4630.
41. Hollingsworth P. M. Refining the DNA barcode for land plants //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 49. – C. 19451-19452.
42. Yayla M. E. A., Ekinçi Doğan C. Development of a new and sensitive method for the detection of pork adulteration in gelatin and other highly processed food products //Food Additives & Contaminants: Part A. – 2021. – T. 38. – №. 6. – C. 881-891.
43. Collins A., Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR //The Open Bioinformatics Journal. – 2012. – T. 6. P. 55-58.

44. Esteki M., Regueiro J. et al. Tackling Fraudsters with Global Strategies to Expose Fraud in the Food Chain // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2019. P 1-16.
45. Nizar N. N. A., Zainal I. H. et al. DNA and nanobiosensor technology for the detection of adulteration and microbial contamination in religious food // *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods*. – 2018. – P. 409–431. doi:10.1016/b978-0-08-101892-7.00022-5
46. Bansal S., Singh A. et al. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2018. – Vol. 57(6). P. 1174–1189.
47. Regenstein J.M. Kosher and Halal: How They Affect Muslim and Jewish Dietary Practices. In: Meiselman H. (eds) *Handbook of Eating and Drinking* // Springer, Cham. – 2020.
48. Meyer-Rochow V. Food taboos: their origins and purposes // *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. – 2009. – Vol. 5(1), p. 18. doi:10.1186/1746-4269-5-18
49. Al Amin M., Mahfujur Rahman M. et al. Screening of commercial meat products from supermarket chains for feline derivatives using SP-PCR-RLFP and lab-on-a-chip // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2018. Article 103565.
50. Bhatt P. V., Pandey G. et al. Nanotechnology and Taggant Technology in Forensic Science // *Technology in Forensic Science*. – 2018. – P. 279–301.
51. Claude R., Weyermann C. (2021) From research integrity to research relevance to advance forensic science // *Forensic Sciences Research*. – 2021. – Vol. 6:4, P. 292-294.
52. Elshafei A. M. Forensic Microbiology, an Important Tool in Crime Investigation // *South Asian Journal of Research in Microbiology*. – 2020. – 6(2). P. 33-38.

53. Ahmed Y.A., Ali S. et al. Hair histology as a tool for forensic identification of some domestic animal species // *EXCLI J.* – 2020. – Vol. 17. P. 663–670,
54. Ha J., Kim S., Lee J., Lee S., Lee H., Choi Y., ... Yoon Y., Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products Using the Developed Mitochondrial DNA-Based Primers // *Korean Journal for Food Science of Animal Resources.* – 2017. – Vol. 37(3). P. 464–468.
55. Ali M. E. et al. Nanobiosensor for the detection and quantification of pork adulteration in meatball formulation // *Journal of Experimental Nanoscience.* – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. 152-160.
56. Cammà C., Di Domenico M., Monaco F. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures // *Food Control.* – 2012. – Vol. 23(2). P. 400–404.
57. Ali M. E., Hashim U., Mustafa S., Che Man Y. B., Dhahi T. S., Kashif M., Abd Hamid S. B. Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction // *Meat Science,* – 2012. – Vol. 91(4). – p. 454–459.
58. Rahmati S., Julkapli N. M., Yehye W. A., Basirun W. J. Identification of meat origin in food products—A review // *Food Control.* – 2016. – Vol. 68. P. 379–390.
59. Kang T. S., Tanaka, T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 269. P. 549–558.
60. Zhang J., Song S., Wang L., Pan D., Fan C. A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA // *Nature Protocols.* – 2007. – Vol. 2(11). P. 2888–2895.
61. Ngo H. T., Wang H.-N., Fales A. M., Vo-Dinh T. Plasmonic SERS biosensing nanochips for DNA detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* – 2015. – Vol. 408(7). P. 1773–1781.

62. Erwanto Y., Rohman A., Arsyanti L., Pranoto Y. Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication-a review // *Int. Food Resear. J.* – 2018. – Vol. 25 (4). P. 1322–1331.
63. Teletchea F., Maudet C., Hänn, C. Food and forensic molecular identification: update and challenges // *Trends in Biotechnology.* – 2005. – Vol. 23(7). P. 359–366.
64. Rossi Scalco A., Miller Devós Ganga G., Cristina De Oliveira S., Baker G. Development and validation of a scale for identification of quality attributes of agri-food products in short chains // *Geoforum.* – 2020.
65. Abbas O., Zadavec M., Baeten V., Mikuš T., Lešić T., Vulić A., ... Pleadin J. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 246, No 6 P. 17.
66. Lo Y.-T., Shaw P.-C. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements // *Food Chemistry.* – 2018. – Vol. 240. P. 767–774.
67. Radović B.V., Dejan Lazić M.N. Application of Molecular Methods and Raman Microscopy // *Spectroscopy in Agricultural Sciences and Food Technology.* – 2019.
68. Silva A.J., Hellberg R.S. DNA-Based Techniques for Seafood Species Authentication, first ed. // Elsevier Inc. – 2021.
69. Thanakiatkrai P., Dechnakarín J., Ngasaman R., Kitpipit T. Direct pentaplex PCR assay: an adjunct panel for meat species identification in Asian food products // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 271. P. 767–772.
70. Haynes E., Jimenez E., Pardo M.A., Helyar S.J. The future of NGS (next generation sequencing) analysis in testing food authenticity // *Food Control.* – 2019. – Vol. 101. P. 134–143.
71. Ribani G., Schiavo V.J., Utzeri F., Bertolini C., Geraci S., Bovo L. Fontanesi, Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification in dairy products // *Food Chem.* – 2018. – Vol. 246, p. 90–98.

72. Raclariu A.C., M. Heinrich, M.C. Ichim, H. de Boer, Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication // *Phytochem. Anal.* – 2018. – Vol. 29, p. 123–128.
73. Galimberti F. De Mattia, Losa A., Bruni I., Federici S., Casiraghi M., Martellos S., Labra M. DNA barcoding as a new tool for food traceability // *Food Res. Int.* – 2013. – Vol. 50, p. 55–63.
74. Isabel Mafra, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, M. Beatriz P.P. Oliveira, Food authentication by PCR-based methods // *Eur. Food Res. Technol.* – 2008. – Vol. 277, pp. 649–665.
75. Beltramo C., Riina M.V., Colussi S., Campia V., Maniaci M.G., Biolatti M., Trisorio S., Modesto P., Peletto S., Acutis P.L. Validation of a DNA biochip for species identification in food forensic science // *Food Control.* – 2017. – Vol. 78. P. 366–373.
76. Salazar F.M. Ochoa-Corona J.L., Talley B.H. Noden. Recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow detection for three *Anaplasma* species of importance to livestock health // *Sci. Rep.* – 2021. – Vol. 11, p. 1–13.
77. Soroka M., Wasowicz B., Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): the better sibling of pcr? // *Cells.* – 2021. – Vol. 10.
78. Takabatake R., Kagiya Y., Minegishi Y., Futo S., Soga K., Nakamura K., Kondo K., Mano J., Kitta, K. Rapid screening detection of genetically modified crops by loop-mediated isothermal amplification with a lateral flow dipstick // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol. 66, p. 7839–7845.
79. Li J., Macdonald J., Von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification // *Analyst.* – 2019. – Vol. 144, p. 31–67.
80. Zhong J., Zhao X. Isothermal amplification technologies for the detection of foodborne pathogens // *Food Anal. Methods.* – 2018. – 11, p. 1543–1560.
81. Velasco G. Ramilo-Fernández F., Denis L., Oliveira P., Shum H., Silva

C.G. Sotelo. A new rapid method for the authentication of common octopus (*Octopus vulgaris*) in seafood products using recombinase polymerase amplification (rpa) and lateral flow assay (lfa) // *Foods*. – 2021. – Vol. 10, <https://doi.org/10.3390/foods10081825>

82. Mukama O., Nie C., J. de Habimana D., Meng X., Ting Y., Songwe F., Al Farga A., Mugisha S., Rwibasira P., Zhang Y., Zeng L. Synergetic performance of iso-thermal amplification techniques and lateral flow approach for nucleic acid diagnostics // *Anal. Biochem.* – 2020. – Vol. 600, p. 113762,

83. de Lima M.D., Barbosa R. Methods of authentication of food grown in organic and conventional systems using chemometrics and data mining algorithms: a review // *Food Anal. Methods*. – 2019. – Vol. 12, p. 887–901.

84. Karabagias I.K. Advances of spectrometric techniques in food analysis and food authentication implemented with chemometrics // *Foods*. – 2020. – Vol. 9, p. 10–13.

85. Pérez-Álvarez E.P., Garcia R., Barrulas P., Dias C., Cabrita M.J., Garder-Cerdán T. Classification of wines according to several factors by ICP-MS multi-element analysis // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 270. P. 273–280.

86. Cui H., Guo W., Jin L., Peng Y., Hu S. Elemental screening of plant-based foods by slurry nebulization ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2020. – Vol.35, p. 592–599.

87. Fu L., Shi S.Y., Chen X.Q. Accurate quantification of toxic elements in medicine food homologous plants using ICP-MS/MS // *Food Chem.* – 2018. – 245, p. 692–697.

88. Zhang N., Shen K., Yang X., Li Z., Zhou T., Zhang Y., Sheng Q., Zheng J. Simultaneous Determination of Arsenic, Cadmium and Lead in Plant Foods by ICP-MS Combined with Automated Focused Infrared Ashing and Cold Trap. – 2018.

89. Matos M.P.V., Jackson G.P., Isotope ratio mass spectrometry in forensic science applications // *Forensic Chem.* – 2019. – Vol. 13, p. 100154.

90. Peng C.-Y., Zhang Y.-L., Song W., Cai H.-M., Wang Y., Granato D.

Characterization of Brazilian coffee based on isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$, and $\delta^{15}\text{N}$) and supervised chemometrics // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 297 P. 124963.

91. Park J.H., Choi S.H, Bong Y.S. Geographical origin authentication of onions using stable isotope ratio and compositions of C, H, O, N, and S // *Food Control.* – 2019. – 101, p. 121–125.

92. Yuan T.Z. Food Forensics: Can Non-targeted Mass Spectrometry be a Simple and Robust Solution for Detecting Food Adulteration? – 2020.

93. Silva C.J. Food forensics: using mass spectrometry to detect foodborne protein contaminants, as exemplified by shiga toxin variants and prion strains // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol. 66/ P. 8435–8450.

94. Schieber. Introduction to Food Authentication, second ed. // Elsevier Inc. –2018, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00001-3>

95. Zhou L., Zhang C., Qiu X., He Y. Information fusion of emerging non-destructive analytical techniques for food quality authentication: a survey // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2020. – Vol. 127, p. 115901.

96. Yadav V.K., Nigam K., Srivastava A., Forensic investigation of arson residue by infrared and Raman spectroscopy: from conventional to non-destructive techniques // *Med. Sci. Law.* – 2020. – Vol. 60, p. 206–215.

97. He H., Sun D.W., Pu H., Chen L., Lin L. Applications of Raman spectroscopic techniques for quality and safety evaluation of milk: a review of recent developments // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2019. – Vol. 59, p. 770–793.

98. Sun T., Wang X., Cong P., Xu J., Xue C., Mass spectrometry-based lipidomics in food science and nutritional health: a comprehensive review // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* – 2020. – Vol. 19, p. 2530–2558.

99. Kazlagic E. Omanović-Miklićanin, Application of raman spectroscopy in food forensics: a review // *IFMBE Proc.* – 2020. – Vol. 73, p. 257–263.

100. Ravindran F.P., Nesamani N. De. A study on the use of spectroscopic techniques to identify food adulteration, in: *Proceedings of the International*

Conference on Circuits and Systems in Digital Enterprise Technology // ICCSDET. – 2018. – pp. 1–6.

101. Zhang W., Ma J., Sun D.W., Raman spectroscopic techniques for detecting structure and quality of frozen foods: principles and applications // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2021. – Vol. 61, p. 2623–2639,

102. Lu J., Cai Z., Zou Y., Wu D., Wang A., Chang J., Wang F., Tian Z., Liu G. Silver nanoparticle-based surface-enhanced Raman spectroscopy for the rapid and selective detection of trace tropane alkaloids in food // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2019. – Vol. 2, p. 6592–6601.

103. Valand R., Tanna S., Lawson G., Bengtström L. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations // *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* – 2020. – Vol. 37, p. 19–38.

104. Lim J., Bae D., Fong A. Titanium dioxide in food products: quantitative analysis using ICP-MS and Raman spectroscopy // *J. Agric. Food Chem.* – 2018. – Vol. 66, p. 13533–13540.

105. Berlina A.N., Zherdev A. V., Dzantiev B.B. ELISA and lateral flow immunoassay for the detection of food colorants: state of the art // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2019. – Vol. 49. P. 209–223

106. Di Nardo F., Chiarello M., Cavalera S., Baggiani C., Anfossi L., Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: trends, challenges and future perspectives // *Sensors* 21. – 2021. – Vol. 21(15), Article 5185.

107. Mishra P., Nordon A., Tschannerl J., Lian G., Redfern S., Marshall S. Near-infrared hyperspectral imaging for non-destructive classification of commercial tea products // *J. Food Eng.* – 2018. – Vol. 238, p. 70–77.

108. Anfossi L., Di Nardo F., Cavalera S., Giovannoli C., Baggiani C., Multiplex lateral flow immunoassay: an overview of strategies towards high-throughput point-of-need testing // *Biosensors.* – 2018. – Vol. 9.

109. Gondhalekar, E. Biela, B. Rajwa, E. Bae, V. Patsekin, J. Sturgis, C.

Reynolds, I.J. Doh, Diwakar, P., Stanker, L., Zorba, V., Mao, X., Russo, R., Robinson, J.P., Detection of *E. coli* labeled with metal-conjugated antibodies using lateral-flow assay and laser-induced breakdown spectroscopy // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2020. – Vol. 412, p. 1291–1301.

110. Ribeiro R., Gonçalves M.E. Tiritan, Separation of enantiomers using gas chromatography: application in forensic toxicology, food and environmental analysis // *Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2020. – Vol. 0, p. 1–25.

111. Chen X., Peng S., Liu C., Zou X., Ke Y., Jiang W. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting flunixin and 5- hydroxyflunixin residues in bovine muscle and milk // *Food Agric. Immunol.* – 2019. – Vol. 30, p. 320–332.

112. Yao J., Wang Z., Guo L., Xu X., Liu L., Kuang H., Xu C. Lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of fipronil and its metabolites in food samples // *Food Chem.* – 2021. – Vol. 356, p. 129710.

113. Stachniuk A., Sumara M., Montowska E. Fornal, Liquid chromatography–mass spectrometry bottom-up proteomic methods in animal species analysis of processed meat for food authentication and the detection of adulterations // *Mass Spectrom. Rev.* – 2019. – p. 1–28.

114. Kalogiouri N.P., Aalizadeh R., Dasenaki M.E., Thomaidis N.S. Application of high resolution mass spectrometric methods coupled with chemometric techniques in olive oil authenticity studies – a review // *Anal. Chim. Acta.* – 2020. – Vol. 1134, P. 150–173.

115. Greer B., Chevallier O., Quinn B., Botana L.M., Elliott C.T. Redefining dilute and shoot: the evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2021. – Vol. 141, p. 116284, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116284>

116. Núñez O., Lucci P. Application of liquid chromatography in food analysis // *Foods.* – 2020. – Vol. 9, p. 10–13.

117. Pauk V., Lemr K. Forensic applications of supercritical fluid chromatography – mass spectrometry // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2018. – Vol. 1086. P. 184–196.

118. Osmani S. The role of chromatography in the food industry // *Int. J. Res. Appl. Sci. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 8.

119. Chan C.K., Pavlović C.N., Chan W. Development of a Novel Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric Method for Aristolochic Acids Detection: Application in Food and Agricultural Soil analyses // Elsevier Ltd. – 2019.

120. Alcántara-Durán J., Moreno-González D., Gilbert-López B., Molina-Díaz A., García-Reyes J.F. Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry // *Food Chem.* – 2018. – Vol. 245. P. 29–38.

121. Acharya R., Pujari P.K. Potential of conventional and internal monostandard NAA and PGNA and PIGE in forensic sciences: an overview // *Forensic Chem.* – 2019. – Vol. 12, p. 107–116.

122. Dhorge P.S., Acharya R., Rajurkar N.S., Chahar V., Tuli V., Srivastava A., Pujari P.K. Quantification of trace fluorine concentrations in soil and food samples from fluoride affected region by in situ current normalized particle induced gamma- ray emission method // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 2017. – Vol. 311, p. 1803–1809.

123. Datta A.N., Sharma G.V., Quantification of minor and trace elements in raw and branded turmeric samples using instrumental neutron activation analysis utilizing apsara-U reactor for possible applications to forensic science // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 2020. – Vol. 325. P. 967–975.

124. Benotti M.J., Fernandez L.A., Peaslee G.F., Douglas G.S., Uhler A.D., Emsbo-Mattingly S. A forensic approach for distinguishing PFAS materials, *Environ // Forensics.* – 2020. – Vol. 0, P. 319–333.

125. Directive (EU) 2017/1371 of the European Parliament and of the Council of 5 July 2017 on the fight against fraud to the Union's financial interests by

means of criminal law. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32017L1371&qid=1657878442622> (дата обращения: 15.06.2022).

126. Cadieux B., Goodridge L. D., & Spink, J. (2019). Gap analysis of the Canadian food fraud regulatory oversight and recommendations for improvement. *Food Control*– 2018. – Vol.102/ P. 46–55.

127. van Ruth S. M., Huisman W., Luning P. A. Food fraud vulnerability and its key factors // *Trends in Food Science & Technology*. – 2017. – Vol. 67. P. 70–75.

128. Ulberth F. Tools to combat food fraud – a gap analysis // *Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 330. P. 127044.

129. Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products, amending Regulations (EC) No 999/2001, (EC) No 396/2005, (EC) No 1069/2009, (EC) No 1107/2009, (EU) No 1151/2012, (EU) No 652/2014, (EU) 2016/429 and (EU) 2016/2031 of the European Parliament and of the Council, Council Regulations (EC) No 1/2005 and (EC) No 1099/2009 and Council Directives 98/58/EC, 1999/74/EC, 2007/43/EC, 2008/119/EC and 2008/120/EC, and repealing Regulations (EC) No 854/2004 and (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Council Directives 89/608/EEC, 89/662/EEC, 90/425/EEC, 91/496/EEC, 96/23/EC, 96/93/EC and 97/78/EC and Council Decision 92/438/EEC (Official Controls Regulation)Text with EEA relevance. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32017R0625> (дата обращения: 15.06.2022).

130. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/1715 of 30 September 2019 laying down rules for the functioning of the information management system for official controls and its system components (the IMSOC Regulation) (Text with EEA relevance). – URL: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/1715/oj (дата обращения: 15.06.2022).

131. Chammem N., Issaoui M., D'amaso De Almeida A. I., Martins Delgado A. Food crises and food safety incidents in European Union, United States, and Maghreb Area: Current risk communication strategies and new approaches // Journal of AOAC International. – 2018. – Vol. 101(4). P. 923–938.

132. Regulation (EU) No 99/2013 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2013 on the European statistical programme 2013-17 Text with relevance for the EEA and for Switzerland. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32013R0099> (дата обращения: 15.06.2022).

133. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/1715 of 30 September 2019 laying down rules for the functioning of the information management system for official controls and its system components (the IMSOC Regulation) (Text with EEA relevance). – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32019R1715> (дата обращения: 15.06.2022).

134. Vishnuraj M. R., Devatkal S., Vaithuyanathan S., Uday Kumar R., Mendiratta S. K. Development and validation of miRNA based method for rapid identification of offal meats in processed chicken meat products // Food Control. – 2021. – Vol. 121. P. 107593.

135. Derz W., Pavlovic M., Huber I., Schalch B., Gerdes, L. Food fraud in the alps? — detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) in firm raw sausages, ham, and meat via qualitative duplex real-time PCR // Food Control. – 2021. – Vol. 123. Article 107764.

136. Amaral J. S., Santos C. G., Melo V. S., Oliveira M. B. P. P., Mafra I. Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats // Food Research International. – 2014. – Vol. 60, P. 140–145.

137. Nunes K. M., Andrade M. V. O., Almeida M. R., Fantini C., Sena, M. M. Raman spectroscopy and discriminant analysis applied to the detection of frauds

in bovine meat by the addition of salts and carrageenan // *Microchemical Journal*. – 2019. – Vol. 147. P. 582–589.

138. Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004 Text with EEA relevance. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1169&qid=1657879468363> (дата обращения: 15.06.2022).

139. Jiang H., Cheng F., Shi M. Rapid identification and visualization of jowl meat adulteration in pork using hyperspectral imaging // *Foods*. – 2020. – Vol. 9(2). P.154.

140. Djenane D., Roncal´es, P. Carbon monoxide in meat and fish packaging: Advantages and limits // *Foods*. – 2018. – Vol. 7(12). P. 1–34.

141. Dabbert S., Lippert C., Zorn A. Introduction to the special section on organic certification systems: Policy issues and research topics // *Food Policy*. – 14. – Vol. 49. P. 425–428.

142. EU-FFN. Annual report. The EU food fraud network and the administrative assistance and cooperation system. Luxembourg // Publications Office of the European Union. – 2020.

143. Soon J. M., Manning L. “May Contain” allergen statements: Facilitating or frustrating consumers? // *Journal of Consumer Policy*. – 2017. – Vol. 40. P. 447–472.

144. Bolin Y. S., Lindeberg I. Undeclared allergens in food. Food control, analyses and risk assessment // Nordic Council of Ministers, Denmark, TemaNord. – 2016. – P. 528.

145. Carrabs G., Smaldone G., Carosielli L., Girasole M., Iammarino M., Chiaravalle E. Detection of sulfites in fresh meat preparation commercialised at retail in Lazio Region // *Italian Journal of Food Safety*. – 2017. – Vol. 6(2). P. 93-95.

146. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives (Text with EEA relevance). – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1333&qid=1657879904468> (дата обращения: 15.06.2022).

147. D'Amore T., Di Taranto A., Berardi G., Vita V., Chiaravalle A. E., Iammarino M. Sulfites in meat: Occurrence, activity, toxicity, regulation, and detection. A comprehensive review // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2020. P. 1-20.

148. Tomasevic I., Dodevska M., Simić M., Raicevic S., Matovic V., Djekic I. A decade of sulphite control in Serbian meat industry and the effect of HACCP // *Food Additives & Contaminants: Part B*. – 2017. – Vol. 11(1). P. 49–53.

149. Kumar Y., Bansal S., Jaiswal P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2017. – T. 16. – №. 6. – C. 1359-1378.

150. Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L., Hajibabaei M., Ratnasingham S., ... Fazekas, A. J. A DNA barcode for land plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 31. – P. 12794-12797.

151. Muhammed M. A. et al. Evaluation of different DNA extraction methods for the detection of adulteration in raw and processed meat through polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // *Journal of Food Science and Technology*. – 2015. – T. 52. – №. 1. – C. 514-520.

152. Ali M. E. et al. Swine-specific PCR-RFLP assay targeting mitochondrial cytochrome B gene for semiquantitative detection of pork in commercial meat products // *Food Analytical Methods*. – 2012. – T. 5. – №. 3. – C. 613-623.

153. Koh M. C. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species //Meat Science. – 1998. – T. 48. – №. 3-4. – C. 275-285.
154. Lin C. C., Tang P. C., Chiang H. I. Development of RAPD-PCR assay for identifying Holstein, Angus, and Taiwan Yellow Cattle for meat adulteration detection //Food Science and Biotechnology. – 2019. – T. 28. – №. 6. – C. 1769-1777.
155. Cunha J. T. et al. RAPD and SCAR markers as potential tools for detection of milk origin in dairy products: Adulterant sheep breeds in Serra da Estrela cheese production //Food chemistry. – 2016. – T. 211. P. 631-636.
156. Hernandez A. et al. Efficiency of DNA typing methods for detection of smoked paprika “pimenton de la Vera” adulteration used in the elaboration of dry-cured iberian pork sausages //Journal of agricultural and food chemistry. – 2010. – T. 58. – №. 22. – C. 11688-11694.
157. Sardina M. T. et al. Application of microsatellite markers as potential tools for traceability of Girgentana goat breed dairy products //Food Research International. – 2015. – T. 74. – C. 115-122.
158. Dalvit C. et al. Genetic traceability of meat using microsatellite markers //Food Research International. – 2008. – T. 41. – №. 3. P. 301-307.
159. Gvozdanović K. et al. Multiallelic marker system for traceability of Black Slavonian pig meat //Food Control. – 2020. – T. 109. – C. 106917.
160. Collins A., Ke X. Primer1: primer design web service for tetra-primer ARMS-PCR //The Open Bioinformatics Journal. – 2012. – T. 6. P. 55-58.
161. Zhu X. et al. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR for waxy sorghum authentication with single-nucleotide resolution //Foods. – 2021. – T. 10. – №. 9. – C. 2218.
162. Waqas M., Hussain Z., Ihsan A. Meat Species Identification: Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction–Based Assay //Food Analytical Methods. – 2019. – T. 12. – №. 12. – C. 2813-2822.

163. Han M., Robinson M. A. PCR-SSCP Analysis of Polymorphism //PCR Protocols. – Humana Press, 2003. – C. 327-333.
164. Csikós Á. et al. Species identification in meat and cheese products by PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing //Animal Welfare, Ethology and Housing Systems. – 2015. – T. 11. – №. 2. P. 78-83.
165. Galal-Khallaf A. Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets // Gene. – 2021. – T. 764. – Article 145062.
166. Wang L., Hang X., Geng R. Molecular detection of adulteration in commercial buffalo meat products by multiplex PCR assay //Food Science and Technology. – 2018. – T. 39. – C. 344-348.
167. Parchami Nejad F. et al. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages //European Food Research and Technology. – 2014. – T. 239. – №. 3. – C. 533-541.
168. Kothalawala S. D. et al. Optimization of monoplex and multiplex PCR assays to detect meat species and adulteration of meat products in the Sri Lankan market. – Research Symposium on Pure and Applied Sciences // Faculty of Science, University of Kelaniya, Sri Lanka. – 2018.
169. Matsunaga T. et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay //Meat science. – 1999. – T. 51. – №. 2. – C. 143-148.
170. Lin W. F., Hwang D. F. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito //Food Control. – 2008. – T. 19. – №. 9. – C. 879-885.
171. Tobe S. S., Linacre A. M. T. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene //Electrophoresis. – 2008. – T. 29. – №. 2. – C. 340-347.
172. Dalmaso A. et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs //Molecular and cellular probes. – 2004. – T. 18. – №. 2. P. 81-87.

173. Trotta M. et al. Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – T. 53. – №. 6. – C. 2039-2045.
174. Luo J. Q. et al. Development and application of a PCR approach for detection of bovis, sheep, pig, and chicken derived materials in feedstuff //Agricultural Sciences in China. – 2008. – T. 7. – №. 10. – C. 1260-1266.
175. Yin R. H. et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique //Meat science. – 2009. – T. 83. – №. 1. – C. 38-44.
176. Ghovvati S. et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay //Food control. – 2009. – T. 20. – №. 8. – C. 696-699.
177. Zha D., Xing X., Yang F. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products //Food Control. – 2010. – T. 21. – №. 10. – C. 1402-1407.
178. Zha D. M., Xing X. M., Yang F. H. Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay //Food chemistry. – 2011. – T. 129. – №. 4. – C. 1904-1908.
179. Catanese G. et al. A multiplex-PCR assay for the authentication of mackerels of the genus *Scomber* in processed fish products //Food chemistry. – 2010. – T. 122. – №. 1. P. 319-326.
180. Kim E. S. et al. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of deer species from antlers //African Journal of Biotechnology. – 2012. – T. 11. – №. 13. – C. 3179-1386.
181. Ali M. E., Razzak M. A., Hamid S. B. A. Multiplex PCR in Species Authentication: Probability and Prospects—A Review. Food Analytical Methods. – 2014. – Vol. 7(10), p. 1933–1949. doi:10.1007/s12161-014-9844-4
182. Köppel R. et al. Duplex digital PCR for the determination of meat proportions of sausages containing meat from chicken, turkey, horse, cow, pig and sheep //European Food Research and Technology. – 2019. – T. 245. – №. 4. – C. 853-862.

183. Doosti A., Ghasemi Dehkordi P., Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products //Journal of food science and technology. – 2014. – Vol. 51. – No. 1. P. 148-152.
184. Iskakova A. N. et al. Meta-analysis data of the accuracy of tests for meat adulteration by real-time PCR //Data in brief. – 2022. – T. 41. – C. 107972.
185. Mao F., Leung W. Y., Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications //BMC biotechnology. – 2007. – T. 7. – №. 1. – C. 1-16.
186. Hird H. et al. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction //Food additives and contaminants. – 2006. – T. 23. – №. 7. – C. 645-650.
187. Kang S. J. et al. Comparison of seven commercial TaqMan master mixes and two real-time PCR platforms regarding the rapid detection of porcine DNA //Food Science of Animal Resources. – 2021. – T. 41. – №. 1. – C. 85.
188. Soares S. et al. A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products //Meat Science. – 2013. – T. 94. – №. 1. – C. 115-120.
189. Wang Z. et al. Real-time PCR based on single-copy housekeeping genes for quantitative detection of goat meat adulteration with pork //International Journal of Food Science & Technology. – 2020. – T. 55. – №. 2. – C. 553-558.
190. Girish P. S. et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene //Meat science. – 2005. – T. 70. – №. 1. – C. 107-112.
191. Ali M. E., Razzak M. A., Hamid S. B. A. Multiplex PCR in Species Authentication: Probability and Prospects—A Review. Food Analytical Methods. – 2014. – Vol. 7(10). P. 1933–1949.

192. Lee S. Y. et al. Development of a rapid on-site detection method for pork in processed meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification //Food Control. – 2016. – T. 66. – C. 53-61.
193. Cho A. R., Dong H. J., Cho S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA //Korean journal for food science of animal resources. – 2014. – T. 34. – №. 6. P. 799.
194. Druml B., Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA–Its role and potential in food analysis //Food chemistry. – 2014. – T. 158. P. 245-254.
195. Dalsecco L. S. et al. A fast and reliable real- time PCR method for detection of ten animal species in meat products //Journal of food science. – 2018. – T. 83. – №. 2. P. 258-265.
196. Gholamnezhad P. et al. Real-time PCR High-resolution Melting Analysis for the Species Identification of Meat Products: Focusing on Food Safety and Detection of Meat Adulterations //Thrita. – 2021. – T. 10. – №. 1.
197. Lopez-Oceja A. et al. Species identification in meat products: A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene //Food chemistry. – 2017. – T. 237. – C. 701-706.
198. Ren J. et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food //PLoS One. – 2017. – T. 12. – №. 3. – C. e0173567.
199. Cavin C., Cottenet G. et al. Meat Vulnerabilities to Economic Food Adulteration Require New Analytical Solutions // CHIMIA International Journal for Chemistry. – 2018. – 72(10). P. 697–703.
200. Hebert P. D. N. Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes //Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 2003. – T. 270. – №. 1512. – C. 313-321.

201. Ahmed Y.A., Ali S. et al. Hair histology as a tool for forensic identification of some domestic animal species // EXCLI J . – 2020. – Vol. 17. P. 663–670,
202. Xing R. R. et al. Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach //Food Control. – 2019. – T. 101. – C. 173-179.
203. Lopez-Oceja A. et al. Species identification in meat products: A new screening method based on high resolution melting analysis of cyt b gene //Food chemistry. – 2017. – T. 237. – C. 701-706.
204. Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates //Mol Mar Biol Biotechnol. – 1994. – T. 3. – №. 5. – C. 294-9.
205. Carrera E. García T., Céspedes A., González I., Fernández A., Hernández P. E., Martín R. PCR- RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: a simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1999. – T. 79. – №. 12. – P. 1654-1658.
206. Patwardhan A., Ray S., Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies-a review //Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology. – 2014. – T. 2014.
207. Som A. Causes, consequences and solutions of phylogenetic incongruence //Briefings in Bioinformatics. – 2014. – T. 16. – №. 3. – C. 536-548.
208. Pan Y. et al. Combining a COI Mini-Barcode with Next-Generation Sequencing for Animal Origin Ingredients Identification in Processed Meat Product //Journal of Food Quality. – 2020. – T. 2020.
209. Cunha J. T. et al. RAPD and SCAR markers as potential tools for detection of milk origin in dairy products: Adulterant sheep breeds in Serra da Estrela cheese production //Food chemistry. – 2016. – T. 211. P. 631-636.

210. Shackell G. H. et al. Evaluation of microsatellites as a potential tool for product tracing of ground beef mixtures //Meat science. – 2005. – T. 70. – №. 2. – C. 337-345.
211. Abdel-Rahman S. M. et al. Detection of adulteration and identification of cat's, dog's, donkey's and horse's meat using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques //Australian Journal of Basic and Applied Sciences. – 2009. – T. 3. – №. 3. – C. 1716-1719.
212. Guan F. et al. A PCR method that can be further developed into PCR-RFLP assay for eight animal species identification //Journal of Analytical Methods in Chemistry. – 2018. – T. 2018.
213. Sultana S. et al. Novel multiplex PCR-RFLP assay discriminates bovine, porcine and fish gelatin substitution in Asian pharmaceuticals capsule shells //Food Additives & Contaminants: Part A. – 2018. – T. 35. – №. 9. – C. 1662-1673.
214. Maede D. A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences //European Food Research and Technology. – 2006. – T. 224. – №. 2. – C. 209-217.
215. Fajardo V. et al. Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (MC1R) genes //Meat Science. – 2008. – T. 78. – №. 3. P. 314-322.
216. Yang L. et al. Identification of pork in meat products using real-time loop-mediated isothermal amplification //Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2014. – T. 28. – №. 5. – C. 882-888.
217. Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food // Journal AOAC International. – 1995. – Vol. 78. P. 1542–1551.

218. Aida A.A., Che Man Y.B., Wong C.M.V.L., Raha A.R. and Son, R. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication // Meat Science – 2005. – Vol. 69: 47– p. 52.

219. Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R. and Son R. Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification // Food Control. – 2007. – Vol. 18. P. 885–889.

220. Kesmen Z. et al. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay // Meat science. – 2009. – T. 82. – №. 4. – С. 444-449.

221. Montiel-Sosa J.F., Ruiz-Pesini E., Montoya J., Roncales P., Lopez-Perez M.J. and Perez-Martoz. A. Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat product by PCR amplification of mitochondrial DNA // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2000. – Vol. 38. P. 497- 501.

222. Calvo J. H., Osta R., Zaragoza, P. Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – Vol. 50. P. 5265–5267.

223. Commission Regulation (EU) No 51/2013 of 16 January 2013 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed Text with EEA relevance. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0051&qid=1657902670851> (дата обращения: 15.06.2022).

224. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32004R0882&qid=1657902778777> (дата обращения: 15.06.2022).

225. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication

of certain transmissible spongiform encephalopathies. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32001R0999&qid=1657902840505> (дата обращения: 15.06.2022).

226. Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation) – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1069&qid=1657902903617> (дата обращения: 15.06.2022).