



Convention on  
Biological Diversity



# Лабораторная идентификация видов животных в сырье, продуктах и кормах

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И ПРАКТИЧЕСКИЙ  
УЧЕБНЫЙ СЕМИНАР

ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ВИДОВ, СКРИНИНГУ ЖИВЫХ  
ИЗМЕНЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ И  
ОБНАРУЖЕНИЮ ПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ  
г. Минск, 12 - 16 февраля 2024 г.

Научный сотрудник Национального  
координационного центра биобезопасности  
Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Дробот Надежда Игоревна

# Laboratory identification of animal species in raw materials, products and feeds

*Theoretical and Practical Training  
Workshop*

*on Laboratory Identification of Species,  
Screening of Living Modified Organisms  
and Detection of Plant Pathogens  
Minsk, February 12 - 16, 2024*

Researcher at the National Coordination Biosafety  
Centre  
Institute of Genetics and Cytology of the NAS of  
Belarus  
Drobot Nadezhda Igorevna

# Актуальность видовой идентификации

## The importance of species identifications

- ▶ Идентификация видовой принадлежности биологического материала в сырье, продуктах питания и кормах - гарант качества и безопасности импортируемой продукции
- ▶ Фальсифицированный продукт может приводить к экономическим потерям у потребителя (повышение денежных затрат), представлять опасность для здоровья (подмены мясом животных, пораженных прионами или вирусами), наносить моральный урон в религиозном или национальном аспекте (запрет на употребление отдельных видов мяса животных и птицы)
- ▶ Identification of species identity of biological material in raw materials, food and feed is a guarantee of quality and safety of imported products
- ▶ A falsified product may cause economic losses for the consumer (increased money costs), risk to health (substitution of meat from animals affected by prions or viruses), cause moral damage in religious or national aspects (ban on consumption of certain types of animal meat and poultry).



*Важность испытаний определяется тем, что продукция, как правило состоит из ряда ингредиентов, что делает возможным их непреднамеренное или умышленное загрязнение неразрешенными составляющими*

*The importance of testing is determined by the fact that products are typically composed of a number of ingredients, which makes it possible for them to be inadvertently or intentionally contaminated with unauthorized components*

# Фальсификация Falsification

**Фальсификация** (лат. от falsifico — подделываю) — действия, направленные на обман покупателя и/или потребителя путём подделки конечного продукта с корыстной целью.

В зависимости от того, какие характеристики товара подвергаются подделке, фальсификация может быть:

- **Ассортиментной**
- **Количественной**
- **Квалиметрической**



**Falsification** (Latin from falsifico - falsify) - actions aimed at deceiving the buyer and/or consumer by falsifying the final product for personal gain.

Depending on what characteristics of the goods are subjected to counterfeiting, falsification can be:

- **Assortment**
- **Quantitative**
- **Qualimetric**

## Виды фальсификации Types of falsification:

### Ассортиментная Assortment

- Полная замена продукта заменителями другого сорта, вида или наименования с сохранением сходства
- Замена высококачественных продуктов низко ценным заменителем, имеющим сходные признаки (дорогостоящие виды мяса заменяются более дешевыми: баранина – говядиной или свиной, говядина – кониной, индейка – курицей)
- Complete replacement of a product with substitutes of a different grade, type or name while maintaining similarity
- Substitution of high quality products by a low-value substitute with similar characteristics (expensive meat is replaced by cheaper meat: lamb by beef or pork, beef by horse meat, turkey by chicken).

### Квалиметрическая Qualimetric

- Осуществляется за счет добавления пищевых/непищевых добавок или нарушений рецептур с целью изменения качественных показателей органолептических и др. свойств продуктов (добавление или замена продукта чужеродными добавками, введение консервантов, антиокислителей и антибиотиков)
- It is carried out by adding food/non-food supplements or violations of recipes in order to change the quality of organoleptic indicators and other properties of products (addition or replacement of the product with foreign supplements, introduction of preservatives, antioxidants and antibiotics).

### Количественная Quantitative

- Значительные отклонения параметров товара (массы, объема, длины) от предельно допустимых норм отклонений в следствии применения неточных измерительных технических устройств или неправильного измерения товара, использование поддельных средств измерений
- Significant deviations of goods parameters (weight, volume, length) from the maximum permissible deviation norms due to the use of inaccurate measuring technical devices or incorrect measurement of goods, use of fake measuring instruments

# Фальсификация кормов

## Falsification of feed

Изменение качественного состава кормовых средств ведет к снижению и/или потере продуктивности животных, в худшем случае - к нанесению вреда здоровью и гибели.

Changes in the qualitative composition of feedstuffs lead to reduced and/or lost animal performance, in the worst case - to health damage and death.



Цену кормового средства определяют по большей мере в зависимости от содержания протеина: чем его больше, тем корм дороже, и наоборот. Именно поэтому чаще всего фальсифицируют высокобелковые корма (корма животного происхождения, рыбная мука, шрот и жмых).

The price of a feed product is mostly determined by its protein content: more protein, the more expensive the feed, and conversely. That is why high-protein feeds (animal origin feeds, fish flour, meal and oilcake) are more often falsified.

Натуральную рыбную муку фальсифицируют путем добавления перьевой, мясокостной муки, шкур и щетины свиней, также встречаются синтетические аминокислоты

Natural fishmeal is falsified by adding feather meal, meat and bone meal, pork skins and bristles. Synthetic amino acids are also found



# Подделки кормов, сырья и продуктов: как распознать?

## Feed, raw material and product fakes: how to recognize?

Визуальных методов определения фальсификата не существует. Нарушения могут выявить только исследования, проведенные в лабораторных условиях

There are no visual methods for determining falsification. Violations can only be detected by tests carried out in the laboratory



*Методы органолептического, физико-химического и микробиологического контроля дают возможность определить свежесть и безопасность в инфекционном отношении мясного сырья и готовых мясных изделий. Но с их помощью нельзя установить видовой состав мяса в продуктах, особенно если количество примесей незначительно по отношению к основному сырью*

*Methods of organoleptic, physicochemical and microbiological monitoring make it possible to determine the freshness and safety in terms of infection of raw meat and finished meat products. But with their help it is impossible to determine the species composition of meat in products, especially if the amount of admixtures is insignificant in comparison to the main raw material*

## Классификация методов

идентификации видового состава (животного происхождения) сырья, кормов и продуктов питания

Classification of methods for identification of species composition (animal origin) of raw materials, feeds and foodstuffs

Основными методами идентификации мясного сырья являются:

1. **Органолептические**
2. **Гистологические**
3. **Иммунологические**
4. **Молекулярно-генетические**

The main methods of identification of meat raw materials are:

1. **Organoleptic**
2. **Histological**
3. **Immunological**
4. **Molecular-genetic**

### **Органолептические :**

Визуальное определение видовых показателей мяса, определение цвета, запаха и др.

### **Гистологические :**

Идентификация состава видов мясного сырья и продуктов при микроскопическом исследовании окрашенных срезов

### **Иммунологические :**

Метод основан на обнаружении антител, которые связываются с определенными белками и позволяют установить присутствие или отсутствие определенного вида животного

### **Молекулярно-генетические :**

Одним из наиболее достоверных методов идентификации мяса и мясных продуктов является полимеразная цепная реакция (ПЦР), с помощью которой на уровне генотипа можно определить видовую принадлежность любых тканей, сохранивших биохимическую структуру

### **Organoleptic :**

Visual determination of the species indices of meat, determination of color, odor, etc.

### **Histologic :**

Identification of the composition of types of meat raw materials and products by microscopic examination of stained sections

### **Immunological :**

The method is based on the detection of antibodies that bind to certain proteins and make it possible to establish the presence or absence of a particular animal species

### **Molecular genetic :**

One of the most reliable methods for the identification of meat and meat products is the polymerase chain reaction (PCR), which can be used to determine, at the genotype level, the species identity of any tissue that has kept biochemical structure



# Преимущества метода ПЦР перед другими методами (ИФА, физико-химические методы):

## Advantages of the PCR method over other methods (ELISA, physicochemical methods):

- ▶ Возможность идентификации сырьевых составляющих мясных полуфабрикатов и готовых мясных изделий
- ▶ Возможность дифференциации мяса близкородственных животных и птицы (в отличие от ИФА)
- ▶ Высокая чувствительность (от нескольких копий ДНК) и высокая воспроизводимость результатов
- ▶ С помощью ПЦР можно определить не только видовую принадлежность мяса, но и выявить примеси мясного сырья разных видов животных и птицы

The ability to identify the raw material components of semi-finished and finished meat products

The ability to differentiate meat from closely related animals and poultry (unlike ELISA)

High sensitivity (from a few copies of DNA) and high reproducibility of results

Using PCR it is possible to determine not only the species identity of meat, but also to detect impurities of meat raw materials of different species of animals and poultry.

«Ветеринарно-санитарные правила обеспечения безопасности в ветеринарно-санитарном отношении кормов и кормовых добавок», утвержденные Постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 10.02.2011 г № 10, в редакции постановления Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 23.02.2018 № 33, гл. 3, п. 8.14

▶ О безопасности мяса птицы и продукции его переработки (ТР ЕАЭС 051/2021

Технический регламент Таможенного союза "О безопасности мяса и мясной продукции"  
(ТР ТС 034/2013)

Veterinary and Sanitary Rules for Ensuring Safety in Veterinary and Sanitary Regard to Feeds and Feed Additives", approved by the Resolution of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus of 10.02.2011 № 10, as amended by the Resolution of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus of 23.02.2018 № 33, Ch. 3, p. 8.14

On the safety of poultry meat and poultry products (TR EAEU 051/2021

Technical Regulations of the Customs Union "On the Safety of Meat and Meat Products" (TR CU 034/2013)

# ТНПА в области видовой идентификации

## TNPA in species identification

Межгосударственный стандарт ГОСТ 31719-2012

### ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ И КОРМА

#### Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

- ▶ Стандарт допускается к применению при контроле кормов, сырья и продуктов питания для выявления фальсификаций сырья, пищевой продукции и детекции несанкционированных примесей в кормах
- ▶ Распространяется на пищевые продукты, продовольственное сырье растительного, животного происхождения, корма и устанавливает экспресс-метод качественного определения видовой принадлежности содержащихся в них мясных и растительных ингредиентов
- ▶ Стандарт предназначен для идентификации видоспецифичной ДНК крупного рогатого скота (Bos taurus), свиньи (Sus scrofa), курицы (Gallus gallus), сои (Glycine max), кукурузы (Zea mays), картофеля (Solanum tuberosum) и др. в составе кормов, сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Interstate standard GOST 31719-2012

### FOOD AND FEED PRODUCTS

#### Express method for determining the raw material composition (molecular)

The standard is allowed for use in the control of feed raw materials and food products to detect falsification of raw materials, food products and detection of unauthorized admixtures in feeds

Applies to food products, food raw materials of plant, animal origin, feed and establishes an express method for qualitative determination of species affiliation of meat and plant ingredients contained in them.

The standard is intended for the identification of species-specific DNA of cattle (Bos taurus), pig (Sus scrofa), chicken (Gallus gallus), soybean (Glycine max), corn (Zea mays), potato (Solanum tuberosum), etc. in the composition of feed, raw materials, semi-finished products, finished foods by polymerase chain reaction (PCR).

# Отбор (пробоподготовка) сухих сыпучих материалов Sampling (sample preparation) of dry bulk materials

Отбирают: комбикорм,  
мясокостная мука,  
рыбная мука, яичный порошок,  
белковый изолят,  
пищевые белковые добавки и  
др.

- От исследуемого образца отбирают не менее 10 проб (5-10 г каждая) в объединенную пробу (50-100 г)
- От объединенной пробы отбирают 10 г средней пробы
- Для получения лабораторной пробы отбирают от гомогенной средней пробы 75 - 100 мкл материала
- одноразовую микропробирку, 5 см<sup>3</sup>
- для выделения ДНК)

Sampling: combined fodder, meat and bone meal, fish meal, egg powder, protein isolate, food protein supplements, etc.



At least 10 samples (5-10 g each) shall be taken from the analyzed sample in a composite sample (50-100 g)  
From the composite sample, 10 g of the average sample is collected  
For the laboratory sample, 75-100 μl is taken from the homogeneous average sample of material into a disposable microtube 1.5 cm<sup>3</sup> (for DNA extraction)

# Отбор (пробоподготовка) жидких и полужидких материалов Sampling (sample preparation) of liquid and semi-liquid materials

Отбирают: молочные продукты,  
соусы,  
пасты, майонезы и др.

Select: milk products,  
sauces, pastes, mayonnaise  
etc.



От исследуемого образца отбирают не менее 10 проб

(1000 мкл каждая) в объединенную пробу (15 мл)

От объединенной пробы отбирают 1 мл средней пробы

Для получения лабораторной пробы отбирают от гомогенной средней пробы 75 -100 мкл материала в одноразовую микропробирку 1,5 см<sup>3</sup>

объединённая проба 15 мкл  
Composite sample

средняя проба 1 мл  
Average sample

лабораторная проба 100-150 мкл  
Laboratory sample

At least 10 samples (1000 µl each) are taken from the sample under test into a composite sample (15 ml).

From the pooled sample, 1 ml of the average sample is taken

To obtain a laboratory sample, a sample is taken from a 75 -100 µl of material from the homogeneous average sample into a disposable microtube 1.5 cm<sup>3</sup> (for DNA extraction)

# Выделение ДНК DNA extraction

Выделение ДНК осуществляется сорбентным методом с помощью набора реагентов  
Рекомендуемый вес пробы в зависимости от типа образца

DNA extraction is performed by sorbent method using a kit of reagents  
Recommended sample weight depending on sample type

Характеристика образца Sample characteristics	Вес, мг Weight, mg
Сухие образцы Dry sample	50-60 мг
Сухие неоднородные образцы, образцы сложного состава Dry heterogeneous samples, samples of complex composition	50-100 мг
Влажные образцы Wet samples	50-200 мг
Жидкие образцы	100-300 <u>мкл</u>



**!! Перед выделением ДНК: убедиться в отсутствии осадка в Лизирующем растворе (р.№1), Растворе для сорбента (р.№3) и Промывочном растворе А (р. №5)**

**!! Before DNA extraction: make sure that there is no precipitate in the Lysis Solution (r. 1), Sorbent solution (r. 3) and Washing solution A (r. 5)**

# Этапы выделения ДНК

## Stages of DNA extraction

Добавление 800 мкл.  
Лизирующего раствора (р. №  
1) , 15 мкл. Протеиназы К (р.  
№2)  
Перемешивание и  
инкубирование 30 мин. 60 °С

Добавление 200 мкл.  
Осаждающего раствора (р.  
№3) и 40 мкл. Сорбента (р.№4)  
Инкубирование при комнатной  
температуре 10 мин. с  
встряхиванием каждые 2 мин.  
Центрифугирование 2 мин. 7  
тыс. об. мин.

Лизис  
Lysis



Сорбция  
Sorption

- Addition of 800  $\mu$ l. Lysing solution (р. №1) , 15  $\mu$ l. Proteinase K (р. № 2).
- Shaking and incubation for 30 min. 60 °C

- Addition of 200  $\mu$ l. Precipitation solution (р. №3) and 40  $\mu$ l. Sorbent (р. №4)
- Incubation at room temperature for 10 min with shaking every 2 min.
- Centrifugation for 2 min. 7000 rpm. min.



# Этапы выделения ДНК

## Stages of DNA extraction

Промывка ДНК в три этапа:

Добавление 300 мкл.  
Промывочного раствора А (р.  
№5)  
Центрифугирование 30 сек. 7  
тыс. об. мин  
Добавление 500 мкл.  
Промывочного раствора Б (р.  
№6) и центрифугирование 30  
сек. 7 тыс. об. мин. - 2 раза  
Сушка сорбента 10 мин. 60 °С  
до полного высыхания сорбента  
(сорбент должен стать белого  
цвета)

Добавление 200 мкл.  
Элюирующего раствора (Р.  
№7)  
Инкубирование 10 мин. 60 °С  
с встряхиванием каждые 2  
мин.  
Центрифугирование 2 мин. 12-  
14 тыс. об. мин.

Промывка  
Washing



Элюция  
Elution

DNA Washing in 3 steps:

- Addition of 300  $\mu$ l. Washing solution A (р. №5).
  - Centrifugation for 30 sec. 7,000 rpm
  - Addition of 500  $\mu$ l. Washing solution B (р. №6) and centrifugation for 30 sec. 7,000 rpm. 7 thousand rpm - 2 times
  - Drying of sorbent 10 min. 60 °C until the sorbent is completely dry (the sorbent should become white).
- 
- Addition of 200  $\mu$ l. Elution solution (Р. № 7)
  - Incubation for 10 min. 60 °C with shaking every 2 min.
  - Centrifugation 2 min. 12000-14000 rpm.



Качественное определение фрагментов видоспецифичной ДНК животных с использованием наборов реагентов для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени

## Qualitative determination of species-specific animal DNA fragments using kits for real-time PCR

Существует большое количество Тест-систем, предназначенных для выявления ДНК животных в биологическом материале (кровь, сыворотка, ткани и др.), пищевых продуктах (колбасы, сосиски, сардельки, фарши и т.д.) и кормах для животных методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) : курица (*Gallus gallus*), индейка (*Meleagris gallopavo*), свинья (*Sus scrofa*), жвачные животные рода *Bos* (Настоящие быки) и рода *Ovis* (Бараны)

Лимит детекции -5 геном-эквивалентов *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Sus scrofa*, *Bos* и *Ovis*

Many test systems are available for the detection of animal DNA in biological material (blood, serum, tissues, etc.), food products (sausages, wieners, minced meat, etc.) and animal feed by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) detection: chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*), pig (*Sus scrofa*), ruminants of the genus *Bos* (*True cattle*) and genus *Ovis* (rams).

Detection limit -5 genome equivalents of *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Sus scrofa*, *Bos* and *Ovis*.

## Этапы проведения ПЦР-анализа

### Steps of PCR analysis

Подготовка ПЦР-смеси, ПКО, ОКО, ОКЭ, образцы

Preparation of PCR mix, PCOs, NCO, NEC, samples



Постановка реакции амплификации

Bio-Rad CFX96

Amplification reaction



Оценка результатов анализа

(валидность ПЦР-реакции)

Assessment of assay results (PCR validity)



Интерпретация результатов анализа

Interpretation of analysis results

! В каждую постановку амплификации кроме исследуемых образцов должны быть включены положительный контроль (ПКО), отрицательный контроль (ОКО), отрицательный контроль выделения (ОКЭ)

*!! Внутренний контроль амплификации (ВКО) необходимо добавить в каждый образец на этапе выделения ДНК согласно инструкции, если это предусмотрено фирмой-производителем Тест-систем*

! Each amplification run must include a positive control (PCO), negative control (NCO), negative extraction control (NEC) in addition to the test samples

*!! Internal amplification control (IAC) must be added to each sample at the DNA extraction stage according to the instructions, if it is provided by the manufacturer of the Test Systems*



## Параметры амплификации: Amplification program:

Шаг step	Температура, °C Temperature	Время time	Кол-во циклов Number of cycles
Начальная денатурация Initial denaturation	95	2 мин	1
Денатурация Denaturation	95	5 сек	5
Отжиг/Элонгация Annealing/Elongation	60	15 сек	
<u>Денатурация</u> Denaturation	95	5 сек	40
Отжиг/Элонгация/ <u>Детекция по каналам</u> (Fam/Green, Hex/Yellow/ROX/Orange, Cy5/Red) Annealing/Elongation/Detection	60	15 сек	

# Интерпретация результатов анализа

## Interpretation of analysis results

Результат образца Sample result	Значение «СТ» по каналу Value Ct FAM	Значение «СТ» по каналу Value Ct HEX	Значение «СТ» по каналу Value Ct ROX	Знач. «СТ» по каналу Value Ct CY5
ДНК птицы обнаружена Bird DNA detected	+/-	+	-	-
ДНК свиньи обнаружена Pig DNA detected	+/-	-	+	-
ДНК КРС/МРС обнаружена Cattle/small cattle DNA detected	+/-	-	-	+
Отрицательный Negative	+	-	-	-
<u>Невалидный</u> Invalid	-	-	-	-

«-» значение «СТ»  $\geq 30$ , «+» значение «СТ»  $< 30$

«+/-» значение «СТ» для данного канала не анализируется

! В случае невалидного образца требуется повторно провести ПЦР-исследование начиная с этапа выделения ДНК

"-" value "CT"  $\geq 30$ , "+" value "CT"  $< 30$ , "+/-" "CT" value for this channel is not analyzed

! In case of invalid sample, it is necessary to repeat the PCR starting from the DNA extraction

# Заключение

## Conclusion

Лабораторная идентификация видов животных в сырье, продуктах питания и кормах играет важную роль в обеспечении безопасности, контроле качества продуктов и предотвращении подделки. Использование современных методов анализа позволяет точно идентифицировать различные виды животных и обеспечивать соответствие продукции установленным стандартам.

Laboratory identification of animal species in raw materials, foods and feeds is important for ensuring safety, controlling product quality and preventing falsification. The use of modern analytical techniques allows the accurate identification of different animal species and ensures that products meet established standards.

**Спасибо за внимание!**  
**Thanks for attention!**