ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

Τμήμα Επιστήμης Και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

ΤΣΟΛΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ - ΗΛΙΑΣ

Α.Μ: 19684107

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Χούχουλα Δήμητρα

Αθήνα, 2024

Μέλη εξεταστικής επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι επιτροπή:

1. Όνομα επιβλέπουσας: Χούχουλα Δήμητρα Καθηγήτρια Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων ΠΑΔΑ	Dimitra Houhoula Digitally signed by Dimitra Houhoula Date: 2024.02.16 10:35:30 +02'00'
2. Όνομα μέλους επιτροπής: Αντωνόπουλος Διονύσιος Καθηγητής Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων ΠΑΔΑ	DIONYSIOS ANTONOPOULOS Digitally signed by DIONYSIOS ANTONOPOULOS Date: 2024.02.18 22:43:45 +02'00'
3. Όνομα μέλους επιτροπής: Κανέλλου Αναστασία Καθηγήτρια Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων ΠΑΔΑ	Anastasia Kanellou Digitally signed by Anastasia Kanellou Date: 2024.02.16 16:27:40 +02'00'

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Τσόλης Φίλιππος – Ηλίας του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου 19684107 φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Τσόλης Φίλιππος-Ηλίας

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη

Η νοθεία των τροφίμων είναι ένα σημαντικό πρόβλημα, το οποίο απασχολεί εδώ και χρόνια τόσο τους καταναλωτές όσο και τους αρμόδιους φορείς. Οι επιχειρήσεις, προκειμένου να αυξήσουν το κέρδος τους χρησιμοποιούν δόλιες πρακτικές που τις περισσότερες φορές σχετίζονται είτε με την αντικατάσταση ενός συστατικού υψηλής αξίας με άλλο χαμηλότερης αξίας είτε με απουσία συστατικών από το προϊόν τα οποία σύμφωνα με τον τύπο του προϊόντος και την επισήμανσή του θα έπρεπε να είναι παρόντα. Η νοθεία έχει ως αποτέλεσμα την εξαπάτηση του καταναλωτή και την οικονομική ζημία του, με αποτέλεσμα την έλλειψη εμπιστοσύνης των καταναλωτών σε ορισμένους παραγωγούς. Ακόμη, για ορισμένες ομάδες καταναλωτών, οι εν λόγω απάτες μπορούν να οδηγήσουν σε προβλήματα υγείας.

Στην παρούσα εργασία, αφού δίνεται ο ορισμός της νοθείας, γίνεται αναφορά στην Ελληνική και Ευρωπαϊκή νομοθεσία όσον αφορά την απάτη των τροφίμων και την σωστή επισήμανση. Κατόπιν γίνεται μνεία σε μερικές περιπτώσεις νοθείας οι οποίες απασχόλησαν την κοινή γνώμη και που πολλές από αυτές συνέβαλαν στην αύξηση της επαγρύπνησης των ελεγκτικών αρχών. Τέλος, αναλύονται οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στον εντοπισμό της νοθείας στα τρόφιμα και αναφέρονται διάφορες έρευνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεκριμένες μέθοδοι σε ένα εύρος κατηγοριών τροφίμων και ζωοτροφών μαζί με τα αποτελέσματά τους.

Abstract

Food adulteration is a major problem, which has been of concern for years to both consumers and regulators. In order to increase their profits, businesses use fraudulent practices, most often involving either the substitution of a high value ingredient for a lower value ingredient or the absence of ingredients which, according to the type of the product and its labelling, should be present in the product. Adulteration results in consumer deception and financial loss, leading to a lack of consumer confidence in certain producers. Furthermore, for certain groups of consumers, such fraud may lead to health problems.

In this paper, after giving the definition of adulteration, reference is made to the Greek and European legislation regarding food fraud and proper labelling. It then refers to some cases of adulteration which have been of public concern and many of which have contributed to the increased vigilance of the control authorities. Finally, the molecular methods most commonly used in the detection of food adulteration are analyzed and several studies in which these methods have been used in a range of food and feed categories are reported together with their results.

Κεφάλαιο 1: Νομοθεσία και γνωστές περιπτώσεις νοθείας

1.1 Ορισμός νοθείας

Σύμφωνα με τον Ενιαίο Φορέα Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ):

Η **Απάτη στον τομέα των τροφίμων (Food Fraud)** αποτελεί ένα φαινόμενο που περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα δόλιων και παραπλανητικών πρακτικών, οι οποίες δεν περιορίζονται αποκλειστικά και μόνο στο τρόφιμο, αλλά αναφέρονται σε όλο το φάσμα της αγροτοδιατροφικής αλυσίδας. Σε αυτές περιλαμβάνονται πρακτικές, όπως η παραχάραξη, η νόθευση εγγράφων ή προϊόντων, η χρήση μη εγκεκριμένων μεθόδων ή διαδικασιών παραγωγής, η αντικατάσταση (ποιοτικά ή ποσοτικά), η διάλυση, η προσθήκη ή η αφαίρεση ενός συστατικού που οδηγούν στην ποσοτική διαφοροποίηση της σύστασης του τροφίμου οδηγώντας σε παραπλανητική επισήμανση.

Δεδομένης, πλέον, της διεθνοποιημένης αγοράς τροφίμων (παγκοσμιοποιημένο εμπόριο), η εφοδιαστική αλυσίδα γίνεται ολοένα και πιο σύνθετη. Έτσι, οι δόλιες πρακτικές έχουν, αφενός διασυνοριακό χαρακτήρα και αφετέρου απειλούν την ακεραιότητα κάθε σταδίου της αγροτοδιατροφικής αλυσίδας.

1.2 Νομοθεσία

1.2.1 Εθνική νομοθεσία

Στο πλαίσιο της υφιστάμενης Εθνικής Νομοθεσίας (Ν. 4235/2014) νοθευμένα τρόφιμα ορίζονται ως: «αυτά στα οποία προστέθηκαν ύλες συνήθως ευτελέστερης αξίας για κερδοσκοπία ή για καλύτερη εμφάνιση των προϊόντων, στην οποία δεν ανταποκρίνονται πραγματικά».

Επίσης, ο παρών νόμος προβλέπει ότι « όποιος παράγει, εισάγει, αποθηκεύει, διακινεί, διαθέτει τρόφιμα τα οποία κατά τη διαπίστωση αρμόδιας αρχής είναι νοθευμένα, σύμφωνα με τον ορισμό της παραγράφου 10 του άρθρου 1, τιμωρείται με την ποινή που προβλέπεται στην περίπτωση α΄ της παραγράφου 2 του άρθρου 19 του Νόμου 4177/2013 (Α΄ 173) », σύμφωνα με τον οποίο « Όποιος παράγει, διακινεί ή διαθέτει τρόφιμα μη ασφαλή ή ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση ή νοθεύει τρόφιμα τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών (3) μηνών ».

Ο Παλαιός Ποινικός Κώδικας Ελλάδος, στο Άρθρο 281 περί νοθείας ανέφερε ότι:

1. Όποιος κατασκευάζει ή επεξεργάζεται τρόφιμα, ποτά, φάρμακα ή άλλα αντικείμενα έτσι που η χρήση τους να μπορεί να προκαλέσει βλάβη στην υγεία ή κίνδυνο για τη ζωή ανθρώπου, καθώς και όποιος θέτει σε κυκλοφορία τέτοια πράγματα, τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών.

2. Αν κάποια από τις προαναφερόμενες πράξεις τελέστηκε από αμέλεια, επιβάλλεται φυλάκιση μέχρι ενός έτους ή χρηματική ποινή.

Ο Νόμος 4619/2019 κατήργησε το παραπάνω Άρθρο.

Οι αρμόδιες εθνικές ελεγκτικές αρχές στον τομέα των τροφίμων είναι ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ), το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων και το Γενικό Χημείο του Κράτους.

Στο νέο οργανόγραμμα του ΕΦΕΤ, όπως αυτό καθορίζεται στο ΠΔ 71/2018 (ΦΕΚ Α΄134), το Τμήμα Δόλιων Πρακτικών & Νοθείας της Διεύθυνσης Προστασίας Καταναλωτών της Κεντρικής Υπηρεσίας έχει - μεταξύ άλλων - την αρμοδιότητα:

- της μέριμνας λειτουργίας & διαχείρισης - ως εθνικό σημείο επαφής – του Συστήματος Αμοιβαίας Διοικητικής Συνδρομής & Συνεργασίας (AAC) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, καθώς και
- της μέριμνας λειτουργίας & διαχείρισης - ως εθνικό σημείο επαφής – του Δικτύου για την Απάτη στα Τρόφιμα (FFN) της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.
- Της οργάνωσης και του σχεδιασμού των επισήμων ελέγχων των τροφίμων στον τομέα των δόλιων πρακτικών και νοθείας.

1.2.2 Ευρωπαϊκή νομοθεσία

Εναρμονισμένος ενωσιακός ορισμός για την απάτη τροφίμων δεν υφίσταται επί του παρόντος. Ωστόσο, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η έννοια της απάτης σχετίζεται με τις περιπτώσεις που ενυπάρχει παραβίαση της ισχύουσας περί τροφίμων νομοθεσίας, η οποία διαπράττεται σκόπιμα (δόλος) με σκοπό τον προσπορισμό κέρδους ή άλλου οικονομικού οφέλους και με ταυτόχρονη εξαπάτηση του καταναλωτή.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή υιοθετεί τέσσερα (4) λειτουργικά κριτήρια για την προσέγγιση της απάτης στα τρόφιμα:

1. *Παραβίαση της Ενωσιακής Νομοθεσίας περί Τροφίμων*
2. *Πρόθεση / Σκοπιμότητα*

[Η παραβίαση της νομοθεσίας που διαπράττεται σκόπιμα. Η σκοπιμότητα είναι το μόνο κριτήριο στο οποίο βασίζεται η διαφοροποίηση της «πράξης» από το «σφάλμα» μικρό ή μεγάλο που δεν τελέστηκε σκόπιμα. Στη σκοπούμενη ενέργεια περιλαμβάνεται και η από πρόθεση απόκρυψη γεγονότων.]

3. *Οικονομικό Όφελος*

[Ο τελών την απάτη προσβλέπει, έχει κίνητρο την αποκόμιση οικονομικού οφέλους ή «κέρδους» με την ευρύτερη έννοια.]

4. *Εξαπάτηση του Καταναλωτή*

Η απάτη, ενδέχεται, να εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία όταν οδηγεί σε μη ασφαλή τρόφιμα. Σε κάθε περίπτωση, όμως, επιφέρει οικονομικές απώλειες, τόσο για τους καταναλωτές, όσο και τις επιχειρήσεις (business-to business διακίνηση τροφίμων

/πρώτων υλών υποκείμενων σε απάτη). Η απάτη κλονίζει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών, απειλεί την εύρυθμη λειτουργία της αγοράς και έχει σοβαρές επιπτώσεις στο νόμιμο εμπόριο και τις νόμιμα λειτουργούσες επιχειρήσεις.

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1169/2011 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα επιδιώκεται υψηλό επίπεδο προστασίας της υγείας και των συμφερόντων των καταναλωτών, αυτή αποτελεί δε τη βάση για να επιλέγουν οι τελικοί καταναλωτές ενήμεροι και να κάνουν ασφαλή χρήση των τροφίμων, με ιδιαίτερη έμφαση στους υγειονομικούς, οικονομικούς, περιβαλλοντικούς, κοινωνικούς και δεοντολογικούς παράγοντες. Οι πληροφορίες για τα τρόφιμα είναι « πληροφορίες που αφορούν ένα τρόφιμο και διατίθενται στον τελικό καταναλωτή μέσω επισήμανσης, άλλου συνοδευτικού υλικού ή οιουδήποτε άλλου μέσου, συμπεριλαμβανομένων των εργαλείων της σύγχρονης τεχνολογίας ή των προφορικών ανακοινώσεων ».

Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός 625/2017 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, ορίζει την νοθεία τροφίμων ως « κάθε πληροφορία που υποδεικνύει ότι οι καταναλωτές ενδέχεται να παραπλανηθούν, ιδίως ως προς τη φύση, την ταυτότητα, τις ιδιότητες, τη σύνθεση, την ποσότητα, τη διατηρησιμότητα, τη χώρα καταγωγής ή τον τόπο προέλευσης, τη μέθοδο παρασκευής ή παραγωγής του προϊόντος ».

Η Ευρωπαϊκή Ένωση δίνει επίσης μεγάλη σημασία στην ιχνηλασιμότητα των τροφίμων. Σύμφωνα με τον CODEX ALIMENTARIUS η ιχνηλασιμότητα ορίζεται επίσημα ως « Η ικανότητα παρακολούθησης της διακίνησης ενός τροφίμου κατά τις φάσεις της παραγωγής, επεξεργασίας και διανομής ».

Η ιχνηλασιμότητα διακρίνεται σε:

- **Προς τα εμπρός (DOWNSTREAM) ιχνηλασιμότητα:** Μπορούμε να εντοπίσουμε όλα τα LOT Number των προϊόντων που παρήχθησαν με τη χρησιμοποίηση ενός συγκεκριμένου LOT Number πρώτης ύλης.
- **Εσωτερική ιχνηλασιμότητα:** Μπορούμε να παρακολουθήσουμε το προϊόν σε όλα τα στάδια μεταποίησής του μέσα στην παραγωγική διαδικασία.
- **Προς τα πίσω (UPSTREAM) ιχνηλασιμότητα:** Γνωρίζοντας το LOT Number του προϊόντος, μπορούμε να γνωρίζουμε όλα τα δεδομένα για τις πρώτες ύλες και τις συνθήκες παραγωγής.

Το άρθρο 18 του Ευρωπαϊκού Κανονισμού 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου αναφέρει τα εξής:

1. Η ανιχνευσιμότητα των τροφίμων, των ζωοτροφών, των ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων και οποιασδήποτε άλλης ουσίας που προορίζεται για ενσωμάτωση σε ένα τρόφιμο ή σε μια ζωοτροφή ή αναμένεται ότι θα ενσωματωθεί σε αυτά, διασφαλίζεται σε όλα τα στάδια παραγωγής, μεταποίησης και διανομής.
2. Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών είναι σε θέση να αναγνωρίζουν κάθε πρόσωπο από το οποίο έχουν προμηθευτεί ένα τρόφιμο, μια ζωοτροφή, ένα ζώο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τροφίμων ή οποιαδήποτε άλλη ουσία που προορίζεται για ενσωμάτωση σε ένα τρόφιμο ή

σε μια ζωοτροφή ή αναμένεται ότι θα ενσωματωθεί σε αυτά. Για το σκοπό αυτό οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων εγκαθιδρύουν συστήματα και διαδικασίες που καθιστούν τις πληροφορίες αυτές διαθέσιμες στις αρμόδιες αρχές, εάν αυτές το ζητήσουν.

3. Οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων και ζωοτροφών καθιερώνουν συστήματα και διαδικασίες για την αναγνώριση των άλλων επιχειρήσεων στις οποίες προμηθεύουν τα προϊόντα τους. Αυτές οι πληροφορίες είναι διαθέσιμες στις αρμόδιες αρχές, εάν αυτές το ζητήσουν.
4. Τα τρόφιμα ή οι ζωοτροφές που διατίθενται ή ενδέχεται να διατεθούν στην αγορά της Κοινότητας πρέπει να φέρουν κατάλληλη επισήμανση ή σήμα αναγνώρισης ώστε να διευκολύνεται η ανιχνευσιμότητά τους, μέσω κατάλληλων εγγράφων ή πληροφοριών, σύμφωνα με τις σχετικές απαιτήσεις των ειδικότερων διατάξεων.

Στις 22 Σεπτεμβρίου του 2003, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο εξέδωσαν τον Κανονισμό 1830/2003, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ τον Νοέμβριο του 2004, και αναφέρεται στην ιχνηλασιμότητα και επισήμανση γενετικώς τροποποιημένων οργανισμών, τροφίμων και ζωοτροφών.

Τέλος, έχουν εκδοθεί και άλλοι Κανονισμοί και Οδηγίες που σχετίζονται με τη νοθεία και την ιχνηλασιμότητα, όπως η Οδηγία 2000/13 για την επισήμανση, παρουσίαση και διαφήμιση των τροφίμων (που μεταξύ άλλων δίνει έμφαση στην ονομασία πώλησης του προϊόντος και στον κατάλογο και ποσότητα των συστατικών), ο Κανονισμός 1760/2000 για την αναγνώριση και επισήμανση βοοειδών και προϊόντων βόειου κρέατος, ο Κανονισμός 2065/2001 (ισχύει από 31/03/2002) σχετικά με την ενημέρωση των καταναλωτών στον τομέα των προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας (με έμφαση στην εξακρίβωση της προέλευσης, της ορθής εμπορικής και επιστημονικής ονομασίας του αλιεύματος, της μεθόδου παραγωγής και της ζώνης αλίευσης), ο Κανονισμός 1536/92 (αναφέρει ότι οι κονσέρβες τόνου και παλαμίδας απαιτούν μόνο εμπορικές ονομασίες, αλλά πρέπει να παρασκευάζονται αποκλειστικά από ένα είδος, ενώ η ανάμειξη ειδών δεν επιτρέπεται, εκτός εάν ο μυϊκή δομή έχει εξαφανιστεί και τα παραπάνω είδη αποτελούν τουλάχιστον το 25% του καθαρού βάρους) και ο Κανονισμός 1379/2013 (παρέχει ορισμούς όπως π.χ. για τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας και αλιείας και θέτει τις υποχρεωτικές πληροφορίες για την επισήμανση των προϊόντων θαλασσινών γενικά, στις οποίες, μεταξύ άλλων, πρέπει να παρέχονται οι εμπορικές και οι επιστημονικές ονομασίες).

Οι αρμόδιες ελεγκτικές αρχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης στον τομέα των τροφίμων είναι, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, η Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Καταπολέμησης της Απάτης (OLAF) και το Δίκτυο Απάτης Τροφίμων (Food Fraud Network).

1.3 Γνωστές περιπτώσεις απάτης/νοθείας

Δυστυχώς οι περιπτώσεις νοθείας στα τρόφιμα και ποτά δεν είναι ένα σπάνιο φαινόμενο, καθώς αρκετοί είναι οι παραγωγοί που αναζητούν εύκολους τρόπους να αυξήσουν τα περιθώρια κέρδους τους. Ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις οι συνέπειες περιορίζονται στην εξαπάτηση και οικονομική επιβάρυνση του καταναλωτή, δεν είναι λίγες οι φορές που οι εν λόγω αθέμιτες πρακτικές προκάλεσαν σοβαρά προβλήματα υγείας σε μεγάλες ομάδες καταναλωτών. Παρακάτω, αναφέρονται ορισμένες από τις πιο γνωστές περιπτώσεις νοθείας που έχουν απασχολήσει τους ελεγκτικούς φορείς και τους καταναλωτές.

1.3.1 Γενικά για τη νοθεία στο γάλα

Το γάλα είναι ένα προϊόν που μπορεί να νοθευτεί με διάφορους τρόπους. Εκτός από την ανάμιξη ενός είδους γάλακτος με γάλα διαφορετικών ειδών και την αφαίρεση λίπους και αντικατάστασή του με φυτικά έλαια, σύνηθες είναι να προστίθενται νερό, άμυλο, γλυκαντικές ουσίες, χρωστικές και σκόνη γάλακτος (Singh & Gandhi, 2015) (Singuluri & Sukumaran, 2014). Συνήθως, οι νοθείες αυτές δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία. Παρόλα αυτά, υπάρχει περίπτωση να αποτελέσουν δυνητικά κίνδυνο για ορισμένες ομάδες καταναλωτών.

Για παράδειγμα, το νερό που προστίθεται για αύξηση του όγκου του προϊόντος, μειώνει τη θρεπτική αξία του γάλακτος και εάν είναι μολυσμένο μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας κυρίως σε βρέφη και παιδιά (Singuluri & Sukumaran, 2014). Επίσης, το άμυλο που χρησιμοποιείται για την αύξηση της πυκνότητας του γάλακτος, μπορεί, σε μεγάλες ποσότητες, να προκαλέσει διάρροια λόγω των επιδράσεων του άπεπτου αμύλου στο παχύ έντερο και η συσσώρευσή του στο σώμα μπορεί να αποβεί ακόμα και θανατηφόρα για άτομα που πάσχουν από διαβήτη (Singh & Gandhi, 2015).

Μια πιο επικίνδυνη μέθοδος νόθευσης του γάλακτος, είναι η προσθήκη χημικών ουσιών όπως παρασιτοκτόνα, συντηρητικά, ορμόνες και αντιβιοτικά (Fischer et al., 2011).

Στα πιο κοινά παρασιτοκτόνα συγκαταλέγονται το π,π΄-διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (DDT), η εντρίνη και το εξαχλωροβενζόλιο (HCB) τα οποία ανήκουν στην ομάδα των οργανοχλωριωμένων. Λόγω της μεγάλης αντοχής τους στην βιοαποικοδόμηση και την λιποφιλικότητά τους, συσσωρεύονται στην βιόσφαιρα και μπορούν να βρεθούν σε πολλά τρόφιμα όπως τα γαλακτοκομικά σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Έτσι, τα παραπάνω παρασιτοκτόνα έχουν αντικατασταθεί πλέον από τα οργανοφωφσορικά (Fischer et al., 2011).

Στα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στο γάλα συγκαταλέγονται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το σαλικυλικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, το σορβικό οξύ, το διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$) και ο χλωριούχος υδράργυρος ($HgCl_2$). Οι συγκεκριμένες ενώσεις είναι τοξικές για τον άνθρωπο όταν υπερβαίνουν ορισμένες συγκεντρώσεις προκαλώντας άπνοια, ναυτία, κώμα, λήθαργο, καρδιακή ανακοπή, ακόμα και θάνατο (Singh & Gandhi, 2015).

Τέλος, τα αντιβιοτικά χορηγούνται στα γαλακτοφόρα ζώα σε αυστηρά καθορισμένες ποσότητες όταν πάσχουν από κάποια ασθένεια όπως η μαστίτιδα. Η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών τα καθιστά ανιχνεύσιμα και στο γάλα με εξαιρετικά σοβαρές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία, καθώς μπορούν να προκαλέσουν αλλεργίες και συμβάλουν στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία. Επιπροσθέτως, τα αντιβιοτικά προκαλούν και τεχνολογικά προβλήματα κατά την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων με κύριο παράδειγμα τη γιαούρτη, όπου θανατώνουν τους μικροοργανισμούς που είναι απαραίτητοι για τη ζύμωση του γάλακτος (Fischer et al., 2011).

1.3.2 Μελαμίνη σε βρεφική σκόνη γάλακτος το 2008

Η μελαμίνη είναι μια χημική ουσία που εμπορικά συντίθεται από την ουρία και χαρακτηρίζεται από υψηλό περιεχόμενο αζώτου (66%). Χρησιμοποιείται στην παραγωγή πλαστικών, υφασμάτων, οικιακών ειδών, κόλλας και επιβραδυντικών πυρκαγιάς (Kai-ching Hau et al., 2009). Λόγω της περιεκτικότητας αυτής σε άζωτο, προστίθεται σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το υγρό γάλα, η σκόνη γάλακτος, το παγωτό, η παγωμένη γιαούρτη και η βρεφική σκόνη γάλακτος, με σκοπό να αυξήσει φαινομενικά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του γάλακτος. Η προσθήκη 1 g μελαμίνης σε 1 L γάλακτος, αυξάνει ψευδώς το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κατά 0,4% (Singh & Gandhi, 2015). Η μελαμίνη προκαλεί μια πληθώρα τοξικών επιδράσεων όπως, νεφρολιθίαση, χρόνια φλεγμονή στα νεφρά και καρκίνο στην ουροδόχο κύστη, σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα (Kai-ching Hau et al., 2009).

Στις 11 Σεπτεμβρίου του 2008, η κινεζική κυβέρνηση ανακοίνωσε την ανάκληση προϊόντων βρεφικής σκόνης γάλακτος στα οποία εντοπίστηκε μελαμίνη. Η κατανάλωση μελαμίνης από βρέφη είχε ως συνέπεια την εμφάνιση πέτρας στα νεφρά, όπου χωρίς την κατάλληλη θεραπεία προκαλούσε νεφρική ανεπάρκεια και κατά επέκταση θάνατο. Περισσότεροι από 290.000 άνθρωποι (οι περισσότεροι από αυτούς βρέφη και παιδιά) δηλητηριάστηκαν και τουλάχιστον έξι μωρά επιβεβαιώθηκε ότι πέθαναν από την κατανάλωση του μολυσμένου με μελαμίνη βρεφικού γάλακτος. Τα προβλήματα στη γαλακτοκομική βιομηχανία της Κίνας ήταν αποτέλεσμα της ταχείας ανάπτυξης που τροφοδοτήθηκε από μεγάλες επενδύσεις από πολυεθνικές γαλακτοβιομηχανίες και την ανάπτυξη ενός ιδιαίτερα σύγχρονου και συγκεντρωτικού μεταποιητικού τομέα που έπαιρνε τις πρώτες ύλες του από εκατομμύρια μικρούς, φτωχούς και αμόρφωτους αγρότες με την στήριξη της κυβέρνησης και με ενθάρρυνση της ανάπτυξης, αλλά με μικρή έμφαση στην επιθεώρηση σε θέματα ασφάλειας.

Η κρίση της μελαμίνης ώθησε την κινεζική κυβέρνηση να εισαγάγει νέο νομοθετικό πλαίσιο για την ασφάλεια των τροφίμων που προβλέπει τακτικές επιθεωρήσεις όλων των εταιρειών που εμπλέκονται στον τομέα των τροφίμων χωρίς εξαιρέσεις και καθορίζει νέες επιτρεπόμενες ανοχές για τη μελαμίνη στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Changbai Xiu & K.K. Klein, 2010).

1.3.3 Το σκάνδαλο με το αλογίσιο κρέας του 2013

Στις 15 Ιανουαρίου 2013, η Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων της Ιρλανδίας εντόπισε DNA αλόγου και χοίρου σε κατεψυγμένα μπιφτέκια βοείου κρέατος που πωλούνταν σε ιρλανδικά και βρετανικά σούπερ μάρκετ και ταχυφαγεία. Στις 16 Ιανουαρίου, το διατροφικό σκάνδαλο έγινε κορυφαία είδηση στα μέσα ενημέρωσης του Ηνωμένου Βασιλείου. Διαπιστώθηκε ότι η προέλευση του κρέατος αλόγου και χοίρου οφειλόταν σε τρεις προμηθευτές. Οι λιανοπωλητές τροφίμων Tesco, Aldi, Lidl, Iceland και Dunnes Stores απέσυραν τα προϊόντα τους. Στις 23 Ιανουαρίου, η Irish Burger King, η οποία ανακάλυψε ότι είχε επίσης αγοράσει κρέας από έναν από τους εμπλεκόμενους προμηθευτές, άλλαξε προμηθευτές και έστειλε δείγματα για ανάλυση. Στις 31

Ιανουαρίου, τα αποτελέσματα από το την ανάλυση των χάμπουργκερ της Burger King έδειξαν ότι περιείχαν κρέας αλόγου. Άλλοι Ιρλανδοί λιανοπωλητές τροφίμων βρήκαν επίσης κρέας αλόγου στα προϊόντα τους. Το σκάνδαλο εξαπλώθηκε και σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες, με τη συμμετοχή διαφόρων παραγόντων (Falkheimer & Heide, 2015).

Μία από τις χώρες που ενεπλάκησαν στο σκάνδαλο ήταν η Σουηδία, όπου αρκετές εταιρείες τροφίμων αναφέρθηκε ότι πωλούσαν και σέρβιραν κρέας αλόγου σε πιάτα όπως κατεψυγμένα λαζάνια και κεφτεδάκια. Η Findus Nordic, που ανήκει στη βρετανική εταιρεία ιδιωτικών κεφαλαίων Lion Capital, ήταν μία από τις εταιρείες στη Σουηδία που επλήγησαν από το σκάνδαλο. Η Findus Nordic είναι μέρος της Findus Group, η οποία αποτελείται επίσης από δύο εταιρικά clusters στη Γαλλία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Η Findus Nordic (με έδρα το Bjuv της Σουηδίας) παράγει και πωλεί κυρίως κατεψυγμένα λαχανικά, ψάρια και έτοιμα γεύματα. Στις 6-7 Φεβρουαρίου, έσκασε η είδηση στη Σουηδία ότι τα κατεψυγμένα λαζάνια της Findus, με προέλευση από τον Γάλλο προμηθευτή της, την εταιρία Comigel, περιείχαν κρέας αλόγου. Η Βρετανική Υπηρεσία Προτύπων Τροφίμων ανέφερε ότι τα λαζάνια της Findus στο Ηνωμένο Βασίλειο περιείχαν σχεδόν 100% αλογίσιο κρέας και δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στη Σουηδία έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα. Κρέας αλόγου (και σε μικρότερο βαθμό χοιρινό κρέας) βρέθηκε επίσης σε προϊόντα άλλων Σουηδών λιανοπωλητών τροφίμων και παραγωγών όπως οι Axfood, ICA, IKEA, Dafgårds και Coop. Όλες αυτές οι εταιρείες απέσυραν αυτά τα προϊόντα (κυρίως λαζάνια αλλά και ορισμένα άλλα προϊόντα, π.χ. κεφτεδάκια από την Dafgårds, τα οποία πωλούνται παγκοσμίως από την IKEA) από την εθνική και διεθνή αγορά. Στα σουηδικά μέσα ενημέρωσης και τη δημόσια συζήτηση, η Findus (λαζάνια) και η Dafgårds/IKEA (κεφτεδάκια) έλαβαν τη μεγαλύτερη προσοχή (Falkheimer & Heide, 2015).

Η Σουηδική Εθνική Υπηρεσία Τροφίμων δήλωσε στα μέσα ενημέρωσης ότι επρόκειτο να καταγγείλει την Findus Nordic στην αστυνομία, αλλά ποτέ δεν το έκανε. Η Findus Nordic ανακοίνωσε ότι θα προχωρούσε σε καταγγελία του προμηθευτή της Comigel, αλλά επίσης ποτέ δεν το έκανε. Μήνες αργότερα η Σουηδική Εθνική Υπηρεσία Τροφίμων εξήγησε ότι η υπόθεση ήταν περίπλοκη και ότι ο όμιλος Findus δεν ήταν υπεύθυνος για ό,τι συνέβη. Στο ίδιο άρθρο, η Findus Nordic κατέληξε στο συμπέρασμα ότι είχε καταγγείλει όλες τις συμβάσεις με την Comigel, αλλά ότι η ευθύνη κοινοποιήθηκε σε άλλους προμηθευτές, δεδομένου ότι η Comigel είχε πολλούς προμηθευτές. Η Findus Nordic αποφάσισε να μην κινήσει νομικές διαδικασίες, καθώς αυτό θα ήταν πολύ περίπλοκο και θεώρησε πως δεν άξιζε τον κόπο. Η Comigel είχε αγοράσει το κρέας από έναν άλλο Γάλλο παραγωγό κρέατος, την εταιρία Spanghero, η οποία με τη σειρά της είχε αγοράσει το κρέας από έναν Κύπριο έμπορο κρέατος με διασυνδέσεις με έναν Ολλανδό έμπορο κρέατος με πιθανή σχέση με σφαγεία στη Ρουμανία. Ωστόσο, οι εταιρείες τροφίμων στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη Γαλλία υπέστησαν δίωξη. Το σκάνδαλο συζητήθηκε στην ΕΕ και ο Επίτροπος Υγείας, Tonio Borg, πρότεινε νέους κανονισμούς για ασφαλέστερα τρόφιμα στις 6 Μαΐου 2013(Falkheimer & Heide, 2015).

1.3.4 Περιπτώσεις νοθείας στη Βραζιλία την περίοδο 2007-2017

Η Βραζιλία είναι ένας από τους μεγαλύτερους παραγωγούς τροφίμων στον κόσμο. Σύμφωνα με στον Παγκόσμιο Οργανισμό Εμπορίου, είναι ο τρίτος μεγαλύτερος εξαγωγέας γεωργικών προϊόντων μετά από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Ο άφθονος ήλιος, το νερό και η γη στη Βραζιλία δημιουργούν γεωργικές συνθήκες που δεν είναι μόνο βιώσιμες αλλά και έτοιμες να ανταποκριθούν στην αυξανόμενη ζήτηση τροφίμων στον πλανήτη (Tibola et al., 2018). Οι ευκαιρίες για απάτη και νοθεία στον τομέα των τροφίμων είναι μεγάλες λόγω της μεγάλης ποσότητας τροφίμων που παράγονται, εξάγονται και εισάγονται, και την υψηλή προστιθέμενη αξία συγκεκριμένων προϊόντων.

Σύμφωνα με τη Φαρμακοποιία των Ηνωμένων Πολιτειών (USP,2016), η γεωγραφικές περιοχές με υψηλή ευπάθεια στην απάτη στον τομέα των τροφίμων και στη νοθεία είναι συχνά αναπτυσσόμενες περιοχές με πολιτική και κοινωνική αστάθεια και με έναν μεγάλο και αυξανόμενο πληθυσμό. Η Βραζιλία πληροί πολλά από αυτά τα κριτήρια και, ως εκ τούτου, είναι επιρρεπής σε απάτη και νοθεία στον τομέα των τροφίμων (Tibola et al., 2018).

Την περίοδο μεταξύ 2007 και 2017 σημειώθηκε πληθώρα περιστατικών απάτης και νοθείας με σκοπό το κέρδος στην Βραζιλία. Το γάλα και τα προϊόντα με βάση το γάλα ήταν οι κύριοι στόχοι των νοθεύσεων στη Βραζιλία. Η πιο κοινή απάτη σε αυτά τα προϊόντα ήταν η προσθήκη νερού. Άλλες νοθεύσεις αφορούσαν την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε χύμα κατσικίσιο γάλα, κατσικίσιο τυρί και βουβαλίσιο τυρί. Επιπλέον, την αραίωση του γάλακτος σε σκόνη με την προσθήκη μη γαλακτοκομικών λιπαρών. Ωστόσο, η αξιολόγηση σε παρμεζάνα δεν εντόπισε απάτη.

Ο δεύτερος συνηθέστερος στόχος για απάτη και νοθεία στον τομέα των τροφίμων ήταν φυτικά έλαια. Αραίωση και υποκατάσταση ελαιόλαδου με εξευγενισμένα ελαιόλαδα και άλλα φυτικά έλαια, όπως σογιέλαιο, ήταν η κύρια απάτη που αναφέρθηκε.

Τα ψάρια και τα προϊόντα θαλασσινών αποτέλεσαν επίσης στόχους απάτης στον τομέα των τροφίμων. Οι πιο συνηθισμένες απάτες είναι η υποκατάσταση ειδών υψηλότερης αγοραίας αξίας, που αναγράφονται στη ετικέτα της συσκευασίας, με είδη χαμηλότερης αξίας, η αύξηση του βάρους του προϊόντος με την προσθήκη περίσσειας νερού σε κατεψυγμένα προϊόντα, η ψευδής δήλωση χώρας καταγωγής και η χρήση παράνομων χημικών ουσιών στην παραγωγή.

Επιπροσθέτως, η υποκατάσταση των ζωικών ή οπωροκηπευτικών ειδών με παρόμοια με μικρότερη οικονομική αξία αποτελεί συνήθη πρακτική απάτης. Για παράδειγμα, η υποκατάσταση χοιρινού με κοτόπουλο σε λουκάνικα ή η υποκατάσταση βόειου μπιφτεκιού με πρωτεΐνη σόγιας.

Η Βραζιλία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός καφέ στον κόσμο. Στον τομέα αυτό, η κύρια απάτη που αναφέρθηκε ήταν η προσθήκη κριθαριού, καλαμποκιού, ρυζιού και φλοιού καφέ. Άλλες απάτες που αναφέρθηκαν σε ποτά, συμπεριλαμβάνουν την μπύρα και τους χυμούς φρούτων. Στην παραγωγή μπύρας, οι ετικέτες και τα καπάκια μπουκαλιών της λιγότερο ακριβής μπύρας αντικαταστάθηκαν με τις ετικέτες και τα καπάκια των ακριβότερων ηγετικών μαρκών της αγοράς. Επίσης, εντοπίστηκε προσθήκη χυμού μήλου σε χυμό σταφυλιών. Επιπλέον, η δόλια προσθήκη σακχαρόζης αναφέρθηκε σε ποτά πορτοκαλιού και ποτά φρούτων του πάθους.

Τέλος, το μέλι και τα γλυκά ήταν άλλοι στόχοι οικονομικής απάτης και νοθείας στον τομέα των τροφίμων. Έχει αναφερθεί η προσθήκη μελιτώματος και μελιού ξηρών καρπών σε μέλι μέλισσας. Ακόμη, αναφέρθηκε προσθήκη αλεύρου σίτου και γλυκοπατάτας σε γλυκά φυστικιών και κολοκύθας αντίστοιχα (Tibola et al., 2018).

1.3.5 Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια Βοοειδών 1986

Οι περιπτώσεις απάτης και νοθείας στον τομέα των τροφίμων δεν αφορούν μόνο προϊόντα διατροφής του ανθρώπου, αλλά και ζωοτροφές. Το γεγονός αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου μετά από την κατανάλωση των άρρωστων ζώων. Τέτοιου είδους περιπτώσεις έχουν καταγραφεί σε αρκετές περιοχές του πλανήτη με μια από τις πιο γνωστές να είναι η επιδημία των «τρελών αγελάδων» που ξέσπασε στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1986.

Μια προηγουμένως μη αναγνωρισμένη νευρολογική ασθένεια σε βοοειδή αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1986, με βάση έναν συνδυασμό συμπτωμάτων που σχετίζονται με χαρακτηριστικές παθολογικές αλλοιώσεις στον εγκέφαλο. Κλινικά, υπήρξε η ύπουλη έναρξη της μεταβαλλόμενης συμπεριφοράς (είτε φόβος είτε επιθετικές αντιδράσεις), αταξία (ασυντόνιστο βάδισμα, πτώση, τρόμος) και δυσαισθησία (μη φυσιολογικές αντιδράσεις στην αφή και στον ήχο). Η αδιάκοπη εξέλιξη αυτών των συμπτωμάτων καθιστούσε αδύνατο τον χειρισμό των ζώων και απαιτούσε το σφάξιμο των αγελάδων μέσα σε 1-6 μήνες. Ιστολογικά, ο εγκέφαλος παρουσίαζε σπογγώδεις αλλοιώσεις, αστρογλοίωση και νευρική πτώση. Αναγνωρίστηκε αμέσως ότι οι βλάβες ήταν παρόμοιες με τις χαρακτηριστικές της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλοπάθειες (ΜΣΕ) ή ασθένειες prion σε άλλα είδη, συγκεκριμένα την τρομώδη νόσο των προβάτων, το πρωτότυπο της ΜΣΕ.

Τα prions αποτελούνται από μία μόνο πρωτεΐνη, που ονομάζεται PrP (prion protein ή πρωτεΐνη ανθεκτική στην πρωτεάση), η οποία συνδέεται στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών από μια άγκυρα, την γλυκοσυλφωσφατιδυλινοσιτόλη (GPI). Η μολυσματικότητα των prions είναι γνωστό ότι είναι ανθεκτική στη θερμότητα (συμπεριλαμβανομένου του ατμού υπό πίεση) και την επεξεργασία με κάποιους σκληρούς παράγοντες μετουσίωσης, όπως η φορμαλδεΰδη, αλλά μπορούν να αδρανοποιηθούν από λιπιδικούς διαλύτες. Μπορεί να υποστηριχθεί ότι εάν χρησιμοποιούνταν αποστάγματα πετρελαίου για την παρασκευή MBM, θα μείωναν σημαντικά τη μολυσματικότητα των τυχόν prions στους ακατέργαστους ιστούς που χρησιμοποιούνται από τις μονάδες επεξεργασίας.

Εκ των υστέρων, διαπιστώθηκε ότι τα κρούσματα ΣΕΒ είχαν παρατηρηθεί στην Αγγλία ήδη από το 1985, αλλά πιθανότατα όχι πριν από αυτό το έτος (Nathanson et al., 1997). Το 1985, ο δόκτωρ Colin Whitaker, ένας κτηνίατρος στο Κεντ, παρατήρησε την πρώτη περίπτωση ΣΕΒ, αλλά απέδωσε την ασταθή συμπεριφορά της αγελάδας σε κύστες. Όταν η αγελάδα τελικά πέθανε, δόθηκε στο τοπικό εργοστάσιο επεξεργασίας για να μετατραπεί σε γεύμα κρέατος και οστών (Jana Telfer, 1999). Αυτή η νέα ασθένεια κοινοποιήθηκε και οι αριθμοί των περιπτώσεων συνέχιζαν να αυξάνονται κάθε μήνα, υποδεικνύοντας την έναρξη μιας επιδημίας (Nathanson et al., 1997).

Η εμφάνιση μιας νέας ασθένειας prion σε επιδημική μορφή οδήγησε σε λεπτομερή διερεύνηση της πιθανής αιτίας της. Μια σειρά μελετών περιπτώσεων διερεύνησε πολυάριθμες πιθανές πηγές και πρότεινε ότι μία κοινή έκθεση ήταν η χρήση μιας διαιτητικής πρωτεΐνης, αλεύρι από κρέας και οστά (MBM), που ταϊζόταν τακτικά σε βοοειδή στην αρχή του απογαλακτισμού (Nathanson et al., 1997). Το φαινόμενο αυτό δεν ήταν πρωτόγνωρο. Ήδη από την δεκαετία του 1920 οι αγρότες στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπως και σε πολλές άλλες χώρες, είχαν υιοθετήσει την πρακτική να συμπληρώνουν την τροφή των βοοειδών με πρωτεΐνη. Συνήθως, η πρωτεΐνη προερχόταν από εγκεφάλους, οστά και απόβλητα σφαγείων, μετατρέποντας έτσι τα εν λόγω φυτοφάγα ζώα σε κανιβάλους. Μάλιστα, στη Βρετανία το σιτηρέσιο των βοοειδών αποτελούνταν κατά 5% από οστά, το μεγαλύτερο ποσοστό από οποιαδήποτε άλλη χώρα. Το εν λόγω φαινόμενο προέκυψε από την ανάγκη που υπήρχε στη Βρετανία, μια κοινωνία βασισμένη στις πόλεις, να θρέψει τον πληθυσμό της λαμβάνοντας υπόψιν ότι μόνο το 2,1% του εργατικού δυναμικού απασχολούταν στον τομέα της γεωργίας. Αντιμέτωπη με έναν αυξανόμενο πληθυσμό σε συνδυασμό με μια φθίνουσα γεωργική παραγωγή, η Βρετανία, όπως και άλλες ανεπτυγμένες χώρες, έψαχνε τρόπους να αυξήσει την παραγωγή στις φάρμες (Jana Telfer, 1999).

Το MBM κατασκευάζεται σε εργοστάσια επεξεργασίας, από τα οποία υπήρχαν περίπου 45 στο Ηνωμένες Βασίλειο στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Αυτά τα εργοστάσια μετατρέπουν τα απορρίμματα σφαγείου (εντόσθια) σε δύο προϊόντα, το λίπος και το απαλλαγμένο από λίπος μείγμα του MBM.

Η πιθανή μετάδοση της ΣΕΒ στον άνθρωπο από την κατανάλωση βόειου κρέατος ή προϊόντων που παρασκευάζονται από βοοειδή με τη νόσο είχε εξεταστεί από την αρχή της επιδημίας. Ίσως η πιο πειστική ήταν μια σειρά από προσεκτικά διεξαχθείσες επιδημιολογικές μελέτες που απέτυχαν να αποδείξουν συσχέτιση μεταξύ σποραδικών περιπτώσεων της ασθένειας Creutzfeldt-Jakob (CJD) (ή άλλων ανθρώπινων prion ασθενειών) και κατανάλωσης αρνιού, πρόβειου κρέατος, ή άλλων πρόβειων ιστών συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου.

Έγιναν διάφορες ενέργειες για την ελαχιστοποίηση του θεωρητικού κινδύνου της μετάδοσης του ΣΕΒ. Πρώτον, η ΣΕΒ έγινε δηλωτέα ασθένεια, με αποζημίωση των αγροτών για το ζώα που καταστράφηκαν λόγω της ασθένειας. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, δημιουργήθηκε μια διαγνωστική υπηρεσία για τον έλεγχο όλων των ύποπτων περιπτώσεων με νευροϊστολογική εξέταση του εγκεφάλου. Επίσης, το 1989, η "απαγόρευση συγκεκριμένων παραπροϊόντων βοοειδών" ήταν που απαγόρευε την είσοδο στην τροφική αλυσίδα ορισμένων ιστών βοοειδών (συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου και της σπλήνας) που ενδέχεται να περιέχουν τον παράγοντα ΣΕΒ (Nathanson et al., 1997).

Κεφάλαιο 2: Μοριακές μέθοδοι

Όπως έχει γίνει ήδη κατανοητό, η νοθεία των τροφίμων είναι ένα παγκόσμιο φαινόμενο και αποτελεί μείζον πρόβλημα που απασχολεί τις αρμόδιες ελεγκτικές αρχές σε κάθε περιοχή του πλανήτη. Έτσι, κρίθηκε αναγκαία η ανάπτυξη ποικίλων και νέων τεχνικών ανίχνευσης της απάτης στα τρόφιμα, με σκοπό την προστασία του καταναλωτή τόσο από οικονομικής πλευράς, όσο και από πλευράς υγείας. Αυτό, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων, δηλαδή μεθόδων που βασίζονται στο DNA για την εξακρίβωση της ορθότητας των πληροφοριών που παρέχονται στους καταναλωτές για προϊόντα τροφίμων.

2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.1.1 Ιστορική αναδρομή

Η προέλευση της PCR, όπως την ξέρουμε σήμερα, προήλθε από μια έρευνα κλειδί που διεξήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στην Cetus Corporation στην Καλιφόρνια. Την άνοιξη του 1983, ο Kary Mullis είχε την αρχική ιδέα για την PCR ενώ ταξίδευε με ένα Honda Civic στον αυτοκινητόδρομο 128 από το Σαν Φρανσίσκο στο Mendocino. Αυτή η ιδέα αποτέλεσε την προέλευση της σύγχρονης τεχνικής PCR που χρησιμοποιείται σήμερα σε όλο τον κόσμο και αποτελεί το θεμέλιο των βασικών διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας PCR. Τα αποτελέσματα για τον Mullis δεν ήταν λιγότερο ικανοποιητικά: μετά από ένα αρχικό μπόνους 10.000 δολαρίων από την Cetus Corporation, του απονεμήθηκε το 1993 το βραβείο Νόμπελ χημείας.

Η αρχική ιδέα για την PCR, όπως πολλές καλές ιδέες, ήταν ένα κράμα διαφόρων στοιχείων που υπήρχαν ήδη: Η σύνθεση μικρού μήκους μονοκλωνικού DNA (ολιγονουκλεοτίδια) και η χρήση του για την σύνθεση νέων ειδικών αντιγράφων DNA με τη χρήση DNA πολυμερασών ήταν ήδη συνήθη εργαλεία των μοριακών βιολόγων της εποχής. Η καινοτομία στην ιδέα του Mullis ήταν η χρήση της παράθεσης δύο ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών σε αντίθετες αλυσίδες του DNA, για να ενισχυθεί ειδικά η περιοχή μεταξύ τους και να επιτευχθεί αυτό με έναν επαναλαμβανόμενο τρόπο, έτσι ώστε το προϊόν ενός γύρου δραστηριότητας της πολυμεράσης να προστίθεται στη δεξαμενή του προτύπου για τον επόμενο γύρο, εξ ου και η αλυσιδωτή αντίδραση (John M.S. Bartlett & David Stirling, 2003).

Στην πραγματικότητα, αν και η αρχική εφεύρεση της PCR αποδίδεται στον Mullis, η επιτυχής εφαρμογή της, όπως την ξέρουμε σήμερα, απαιτούσε σημαντική περαιτέρω ανάπτυξη από τους συναδέλφους του στην Cetus Corp, συμπεριλαμβανομένου του συναδέλφου του Henry Erlich, και την έγκαιρη απομόνωση ενός θερμοσταθερού ενζύμου πολυμεράσης από ένα θερμόφιλο βακτήριο που απομονώθηκε από ιαματικές πηγές. Επιπλέον, υπήρξαν προκλήσεις για τις πατέντες PCR που κατέχει η Hoffman La Roche που έχουν ισχυριστεί τουλάχιστον μία περίπτωση "προγενέστερης τέχνης", δηλαδή ότι η αρχική εφεύρεση της PCR ήταν γνωστή πριν από την εργασία του Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Η αμφισβήτηση αυτή βασίζεται σε πρώιμες μελέτες των Khorana et al. στα τέλη της δεκαετίας του 1960 και στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Η εργασία του Khorana χρησιμοποίησε μια μέθοδο που ονόμασε επιδιόρθωση αντιγραφής και η ομοιότητά της με την PCR φαίνεται στα ακόλουθα βήματα:

1. ανόπτηση των εκκινητών στα πρότυπα και επέκταση των προτύπων
2. διαχωρισμός των νεοσυντιθέμενων κλώνων από το πρότυπο
3. εκ νέου ανόπτηση του εκκινητή και επανάληψη του κύκλου.

Όποιο και αν είναι το τελικό αποτέλεσμα, είναι σαφές ότι μεγάλο μέρος της εργασίας που έχει καταστήσει την PCR τόσο ευρέως διαδεδομένη μεθοδολογία προέκυψε από τα εργαστήρια των Mullis και Erlich στην Cetus στα μέσα της δεκαετίας του 1980 (John M.S. Bartlett & David Stirling, 2003).

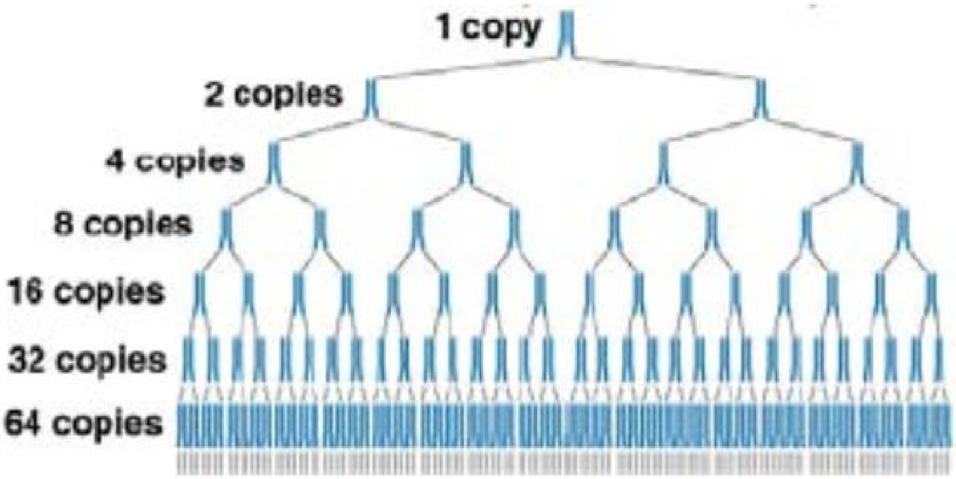
Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την PCR εξήχθη από το βακτήριο *Escherichia coli*. Παρόλο που το ένζυμο αυτό αποτελούσε πολύτιμο εργαλείο για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και επέτρεψε την έκρηξη των τεχνολογιών αλληλούχισης του DNA στην προηγούμενη δεκαετία, είχε σαφή μειονεκτήματα στην PCR. Για την PCR, η αντίδραση πρέπει να θερμανθεί για να μετουσιωθεί το δίκλωνο προϊόν DNA μετά από κάθε γύρο σύνθεσης. Δυστυχώς, η θέρμανση αδρανοποιούσε επίσης μη αναστρέψιμα την πολυμεράση του DNA της E. coli, και επομένως έπρεπε να προστίθενται με το χέρι νέες ποσότητες ενζύμου στην αρχή κάθε κύκλου. Αυτό που χρειαζόταν ήταν μια DNA πολυμεράση που θα παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του στάδιο μετουσίωσης του DNA στους 95°C περίπου. Η λύση βρέθηκε όταν το βακτήριο *Thermophilus aquaticus* απομονώθηκε από θερμές πηγές, όπου επέζησε και πολλαπλασιάστηκε σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες και παρήγαγε μια DNA πολυμεράση που δεν αδρανοποιείται γρήγορα σε υψηλές θερμοκρασίες. Ο Gelfand και οι συνεργάτες του στο Cetus καθάρισαν και στη συνέχεια κλωνοποίησαν αυτή την πολυμεράση, επιτρέποντας μια πλήρη διαδικασία PCR χωρίς να ανοίγει το σωληνάριο της αντίδρασης. Επιπλέον, επειδή το ένζυμο απομονώθηκε από θερμόφιλο οργανισμό, λειτουργούσε βέλτιστα σε θερμοκρασία περίπου 72°C, επιτρέποντας το στάδιο της σύνθεσης του DNA να εκτελείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ό,τι ήταν δυνατό με το ένζυμο της E. coli, γεγονός που εξασφάλιζε ότι το πρότυπο DNA μπορούσε να αντιγραφεί με μεγαλύτερη πιστότητα ως αποτέλεσμα μιας μεγαλύτερης αυστηρότητα της δέσμευσης του εκκινητή, εξαλείφοντας τα μη ειδικά προϊόντα που είχαν ταλαιπωρήσει προηγούμενες προσπάθειες ενίσχυσης με PCR.

Ωστόσο, ακόμη και με αυτή τη βελτίωση, η τεχνική PCR ήταν επίπονη και αργή, απαιτούσε χειροκίνητη μεταφορά μεταξύ των υδατόλουτρων σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η πρώτη μηχανή θερμοκυκλοφορίας, "Mr Cycle", η οποία αναπαρήγαγε τις αλλαγές θερμοκρασίας που απαιτούνταν για την αντίδραση PCR χωρίς την ανάγκη χειροκίνητης μεταφοράς, αναπτύχθηκε από την Cetus για τη διευκόλυνση της προσθήκης φρέσκων θερμοδιαλυτών πολυμερασών. Μετά τον καθαρισμό της Taq πολυμεράσης, η Cetus και η Perkin-Elmer εισήγαγαν τους κλειστούς θερμικούς κύκλους DNA που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα.

Η PCR έχει γίνει ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εργαλεία στη μοριακή βιολογία. Τεχνικές της έχουν αναπτυχθεί σε τομείς τόσο διαφορετικούς όπως οι εγκληματολογικές έρευνες, η επιστήμη των τροφίμων, οικολογικές μελέτες πεδίου και διαγνωστική ιατρική. Οι τεράστιες πρόοδοι που σημειώθηκαν στην κατανόηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (και πολλών άλλων ειδών), δεν θα ήταν δυνατή, αν δεν υπήρχε η αξιοσημείωτα απλή και συνάμα εξαιρετικά προσαρμόσιμη τεχνική που είναι η PCR (John M.S. Bartlett & David Stirling, 2003).

2.1.2 Αρχή λειτουργίας

Η PCR εκτελείται σε ένα πρότυπο DNA, το οποίο μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο. Χρειάζονται επίσης δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που πλαισιώνουν την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, dNTPs, τα οποία είναι τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, μια θερμοσταθερή πολυμεράση, και ιόντα μαγνησίου στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η αντίδραση πραγματοποιείται με κυκλική εναλλαγή θερμοκρασίας. Εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για να διαχωριστούν οι αλυσίδες της διπλής έλικας DNA, στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται για να μπορέσουν οι εκκινητές να συνδεθούν με το πρότυπο και τελικά η θερμοκρασία ρυθμίζεται γύρω στους 72°C, η οποία είναι η βέλτιστη για την πολυμεράση που επεκτείνει τους εκκινητές ενσωματώνοντας τα dNTPs (Kubista et al., 2006).



Εικόνα 1: Σχεδιάγραμμα της αρχής λειτουργίας της PCR (K.B. Mullis, 1994)

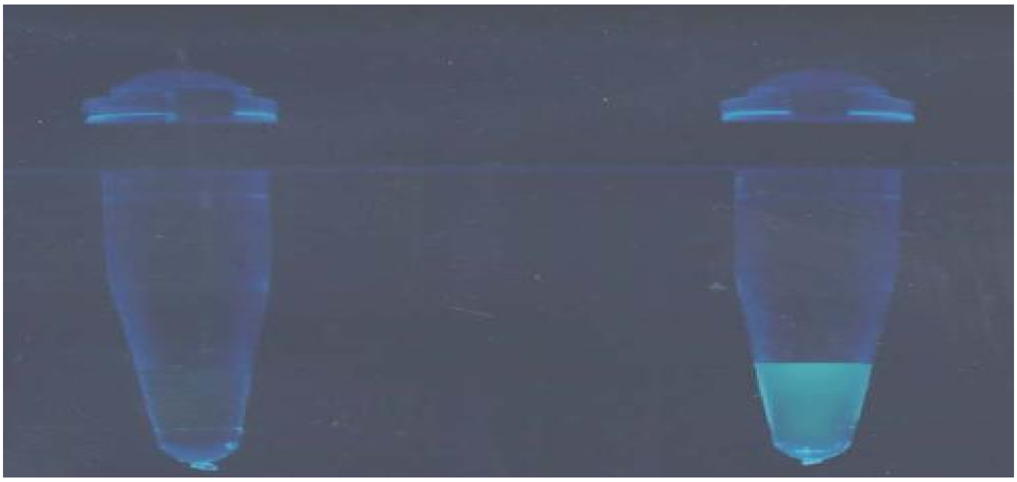
Η τήξη πρέπει να είναι επαρκής για τον πλήρη διαχωρισμό των κλώνων του προτύπου, επειδή οι μερικώς διαχωρισμένες δομές θα επανασυνδεθούν γρήγορα όταν η θερμοκρασία πέσει. Η απαιτούμενη θερμοκρασία τήξης και η διάρκειά της εξαρτάται από το μήκος και μερικές φορές από την αλληλουχία του προτύπου και επίσης από το όργανο και τα δοχεία αντίδρασης που χρησιμοποιούνται. Με σύντομες ενισχυμένες αλληλουχίες, που ονομάζονται επίσης αμπλικόνια, και δοχεία με ταχεία μεταφορά θερμότητας, όπως γυάλινα τριχοειδή, μπορεί να είναι σκόπιμο η θερμοκρασία να ανέλθει στους 95°C και στη συνέχεια να αρχίσει αμέσως η ψύξη. Μπορεί να είναι απαραίτητο να θερμαίνεται πιο διεξοδικά κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων, επειδή το αρχικό πρότυπο είναι συνήθως πολύ μακρύτερο από τα αμπλικόνια που κυριαρχούν αργότερα. Επίσης, ορισμένες πολυμεράσες θερμής εκκίνησης απαιτούν εκτεταμένη θερμική ενεργοποίηση.

Η θερμοκρασία ανόπτησης εξαρτάται από τους εκκινητές. Θεωρητικά πρέπει να είναι λίγους βαθμούς κάτω από τη θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών (οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι να έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης), ώστε να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τις στοχευόμενες αλληλουχίες αλλά όχι με άλλες αλληλουχίες. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την πολυμεράση Taq είναι περίπου 72°C, η οποία είναι η θερμοκρασία επιμήκυνσης που χρησιμοποιείται στα περισσότερα πρωτόκολλα PCR τριών βημάτων. Αλλά δεν φαίνεται πολύ σημαντική, και ορισμένα πρωτόκολλα, ιδίως εκείνα που βασίζονται σε ανιχνευτές Taqman επιμηκύνονται στους 60°C. Χρήση αυξημένης θερμοκρασίας επιμήκυνσης είναι πιθανώς πιο σημαντική για να λιώσουν τυχόν δευτερογενείς δομές που μπορεί να σχηματιστούν στο πρότυπο και να εμποδίσουν την επιμήκυνση. Στην PCR πραγματικού χρόνου (ενότητα 2.2) τα αμπλικόνια είναι συνήθως μικρά με περιορισμένη ικανότητα αναδίπλωσης. Αλλά οι διαδοχικές διαδρομές γουανινών, ακόμη και μόνο 2-3 διαδοχικές γουανίνες, μπορούν να αναδιπλώσουν το πρότυπο σε μια τέτραπλεξ δομή, η οποία είναι εξαιρετικά σταθερή και δεν μπορεί να μεταγραφεί από την πολυμεράση. Τα τετραπλέγματα γουανίνης σχηματίζονται αποκλειστικά παρουσία ιόντων K^+ και το πρόβλημα μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PCR ελεύθερο από K^+. Οι αυτοσυμπληρούμενες περιοχές στο πρότυπο μπορούν επίσης να προκαλέσουν προβλήματα με την αναδίπλωση τους σε άλλες δομές που μπορεί να παρεμποδίσουν την επέκταση. Τα ίδια χαρακτηριστικά της αλληλουχίας προκαλούν επίσης προβλήματα εάν υπάρχουν στους εκκινητές. Συμπληρωματικότητα μεταξύ των εκκινητών, ιδίως στα 3΄-άκρα, προκαλεί επιπλοκές σχηματίζοντας ανώμαλα προϊόντα PCR που ονομάζονται εκκινητές-διμερή (primer-dimers). Η αποφυγή σχηματισμού εκκινητών-διμερών είναι πολύ σημαντική για την ποσοτική ανάλυση δειγμάτων PCR που περιέχουν μόνο λίγα μόρια-στόχους, επειδή η PCR του στόχου και η PCR που σχηματίζει εκκινητές-διμερή ανταγωνίζονται μεταξύ τους (Kubista et al., 2006).

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί ένα ακόμη τεχνολογικό άλμα που έχει προσφέρει νέες και ισχυρές εφαρμογές για τους ερευνητές σε όλο τον κόσμο. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην τεράστια ευαισθησία της PCR η οποία συνδιάζεται με την ακρίβεια που παρέχεται από την παρακολούθηση σε "πραγματικό χρόνο" των προϊόντων της PCR κατά τη δημιουργία τους. Ο Higuchi και οι συνεργάτες του στη Roche Molecular Systems και στη Chiron πραγματοποίησαν την πρώτη επίδειξη PCR πραγματικού χρόνου. Περιλαμβάνοντας μια κοινή χρωστική φθορισμού που ονομάζεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) στην PCR και την εκτέλεση της αντίδρασης κάτω από υπεριώδες φως, το οποίο προκαλεί τον φθορισμό του EtBr, μπόρεσαν να απεικονίσουν και να καταγράψουν τη συσσώρευση του DNA με μια βιντεοκάμερα. Είναι γνωστό από το 1966 ότι το EtBr αυξάνει τον φθορισμό του κατά τη δέσμευση νουκλεϊκών οξέων, αλλά μόνο με το συνδυασμό αυτής της χημείας φθορισμού με PCR και βιντεοσκόπηση σε πραγματικό χρόνο θα μπορούσε να γεννηθεί η PCR πραγματικού χρόνου, όπως έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Όργανα για την PCR πραγματικού χρόνου έγιναν για πρώτη φορά διαθέσιμα στο εμπόριο από την Applied Biosystems το 1996, και στη συνέχεια αρκετές άλλες εταιρείες προσέθεσαν νέα μηχανήματα στην αγορά (Mark A. Valasek & Joyce J. Repa, 2005).

Σήμερα, οι μέθοδοι πραγματικού χρόνου περιλαμβάνουν γενικά φθορογόνους ανιχνευτές που "ανάβουν" για να δείξουν την ποσότητα του DNA που υπάρχει σε κάθε κύκλο της PCR. Η "κινητική PCR" αναφέρεται επίσης σε αυτή τη διαδικασία. Η "ποσοτική PCR" αναφέρεται στη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της αρχικής ποσότητας μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Ο όρος αυτός προϋπήρχε της PCR πραγματικού χρόνου, διότι μπορεί να αναφέρεται σε οποιαδήποτε διαδικασία PCR, συμπεριλαμβανομένων των προγενέστερων δοκιμών τελικού σημείου με βάση πηκτής, που επιχειρούν να ποσοτικοποιήσουν την αρχική ποσότητα νουκλεϊκού οξέος. Σπάνια, μπορεί κανείς να δει τον όρο "ποσοτική φθορίζουσα PCR" για να δηλώσει ότι η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται μέσω της μέτρησης της εξόδου από έναν φθορίζον ανιχνευτή, αν και αυτό είναι περιττό, διότι όλες οι σημερινές χημικές μέθοδοι για PCR πραγματικού χρόνου είναι φθορίζουσες (Mark A. Valasek & Joyce J. Repa, 2005).



Εικόνα 2: Φθορισμός από υβριδισμένο ανιχνευτή. Και τα δύο σωληνάρια PCR περιέχουν DNA και ανιχνευτή. Στο αριστερό σωληνάριο ο ανιχνευτής και το DNA δεν είναι συμπληρωματικά και ο ανιχνευτής δεν δεσμεύεται, ενώ στο δεξί σωληνάριο ο ανιχνευτής και το DNA είναι συμπληρωματικοί (Kubista et al., 2006).

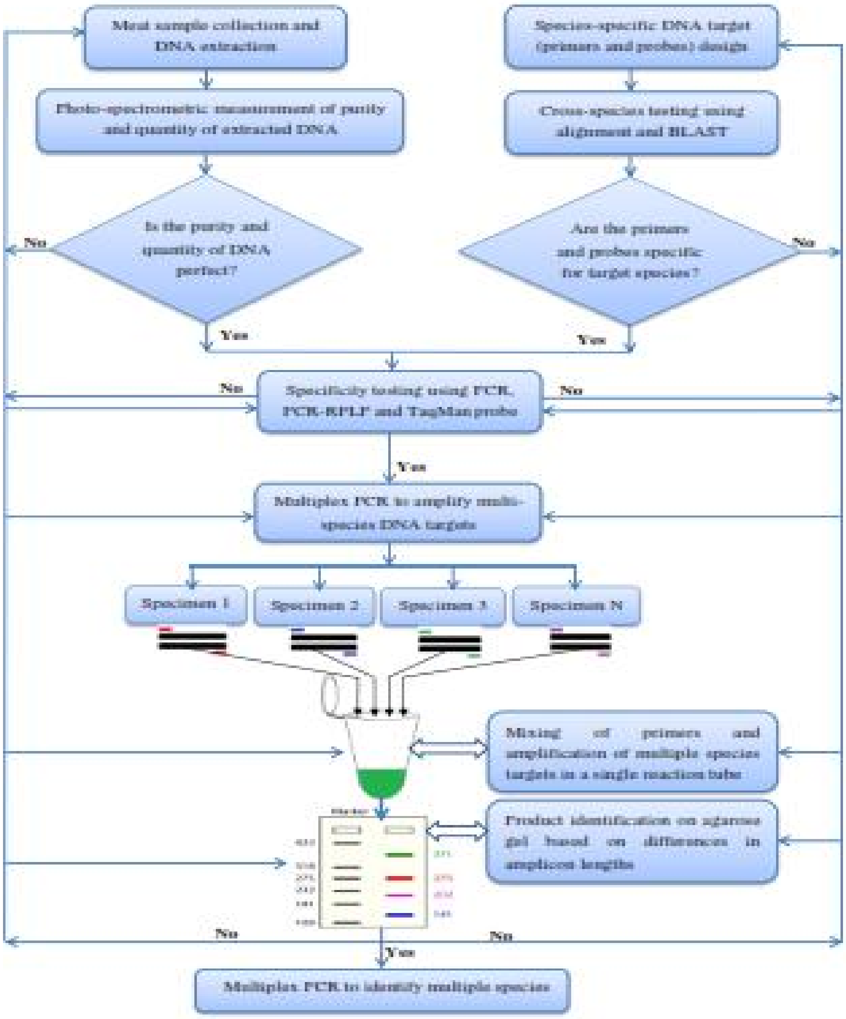
Ο βασικός στόχος της PCR πραγματικού χρόνου είναι η ακριβής διάκριση και η μέτρηση ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε ένα δείγμα, ακόμη και αν υπάρχει μόνο μια πολύ μικρή ποσότητα. Η PCR πραγματικού χρόνου πολλαλασιάζει μια ειδική αλληλουχία-στόχο σε ένα δείγμα και στη συνέχεια παρακολουθεί την πρόοδο του πολλαπλασιασμού με τη χρήση τεχνολογίας φθορισμού. Κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού, το πόσο γρήγορα το σήμα φθορισμού φτάνει σε ένα οριακό επίπεδο συσχετίζεται με την ποσότητα της αρχικής ακολουθίας στόχου, επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση. Επιπλέον, το τελικό προϊόν μπορεί να χαρακτηριστεί περαιτέρω υποβάλλοντάς το σε αυξανόμενες θερμοκρασίες για να προσδιοριστεί πότε το δίκλωνο προϊόν "λιώνει". Αυτό το σημείο τήξης είναι μια μοναδική ιδιότητα που εξαρτάται από το μήκος του προϊόντος και τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Για να επιτευχθούν αυτές οι εργασίες, η συμβατική PCR έχει συνδυαστεί με όργανα της τελευταίας λέξης της τεχνολογίας και με φθορίζουσες χημικές ουσίες για να γίνει PCR πραγματικού χρόνου (Mark A. Valasek & Joyce J. Repa, 2005).

2.3 Πολυπλεκτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Οι Chamberlain et al. (1988) ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν μια μέθοδο πολλαπλής PCR για την ανάλυση διαφόρων διαγραφών στον τόπο της μυϊκής δυστροφίας Duchenne. Έκτοτε, η Multiplex PCR έχει λάβει τεράστια προσοχή, η οποία την έχει καταστήσει μια εξαιρετική τεχνική ανίχνευσης πολλαπλών στόχων σε μια ενιαία πλατφόρμα ανάλυσης (Eaqub et al., 2014). Η πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια παραλλαγή της PCR στην οποία μπορούν να ενισχυθούν δύο ή περισσότερες αλληλουχίες-στόχοι συμπεριλαμβάνοντας περισσότερα από ένα ζεύγη εκκινητών στην ίδια αντίδραση. Η Multiplex PCR έχει τη δυνατότητα να παρέχει σημαντική εξοικονόμηση χρόνου και κόπου στο εργαστήριο (Markoulatos et al., 2002).

Η βελτιστοποίηση της Multiplex PCR μπορεί να δημιουργήσει αρκετές δυσκολίες, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας ή/και του επιλεκτικού πολλαπλασιασμού ορισμένων ειδικών στόχων. Η παρουσία περισσότερων του ενός ζεύγους εκκινητών στην Multiplex PCR αυξάνει την πιθανότητα λήψης λανθασμένων προϊόντων πολλαπλασιασμού, κυρίως λόγω του σχηματισμού διμερών εκκινητών. Μια από τις σημαντικότερες έννοιες στην PCR είναι αυτή της βέλτιστης αναλογίας εκκινητή προς το πρότυπο. Εάν η αναλογία είναι πολύ υψηλή, οι εκκινητές-δημερή σχηματίζονται, όπως επίσης συμβαίνει σε συνθήκες πολύ αραιωμένου προτύπου ή περίσσειας εκκινητή. Οι εκκινητές πρέπει συνήθως να είναι σε 10^7 μοριακή περίσσεια σε σχέση με το πρότυπο. Για τις περισσότερες εφαρμογές, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του προτύπου, η συγκέντρωση του εκκινητή δεν μπορεί να αυξηθεί πολύ υψηλότερα από 0,5 μM λόγω σχηματισμού εκκινητή-διμερούς. Επομένως, αυτό που καθορίζει την αναλογία εκκινητή προς το πρότυπο είναι η ποσότητα και η πολυπλοκότητα του προτύπου που παρέχεται στην αντίδραση (Markoulatos et al., 2002).

Όπου είναι δυνατόν, οι Multiplex PCR θα πρέπει να αποφεύγουν τη χρήση φωλιασμένων εκκινητών που απαιτούν δεύτερο γύρο πολλαπλασιασμού. Το τελευταίο συμβάλλει σημαντικά στα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μόλυνσης, αν και τα πρωτόκολλα κατά της μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων PCR (αντίδραση και εκχύλιση δειγμάτων control), πρέπει να εφαρμόζονται σε όλα τα πρωτόκολλα PCR. Ομοίως, οι προφυλάξεις και οι μεθοδολογίες για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω αποτυχίας της αντίδρασης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Multiplex PCR που πολλαπλασιάζουν τις αλληλουχίες στόχους μαζί με την παρουσία εξωτερικού ή εσωτερικού στόχου control νουκλεϊκών οξέων για να υποδείξουν αποτυχία της αντίδρασης έχουν αναπτυχθεί. Πριν από την εκτέλεση της Multiplex PCR, η ειδικότητα των σχεδιασμένων γονιδιακών στόχων (εκκινητές και ανιχνευτές) θα πρέπει να δοκιμαστούν με τη χρήση συμβατικής PCR και PCR-RFLP. Επιπροσθέτως, διενεργείται η ειδικότητα μεταξύ των ειδών μέσω προσεγγίσεων in silico και in vitro (Markoulatos et al., 2002).



Εικόνα 3: Σχηματική παρουσίαση των διαφόρων βημάτων σε μια Multiplex PCR. Στο διάγραμμα, το Yes υποδηλώνει ικανοποιητικά αποτελέσματα και No υποδηλώνει μη ικανοποιητικό αποτέλεσμα που χρειάζονται βελτιστοποίηση ή επανάληψη προηγούμενων βημάτων όπως φαίνονται με τα βέλη (Eaqub et al., 2014).

Με την πάροδο του χρόνου, οι δοκιμασίες Multiplex PCR έχουν αναγνωριστεί ως ισχυρή, οικονομικά αποδοτική, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος για ανίχνευση ειδών κρέατος. Οι Matsunaga et al. (1999) ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν μια δοκιμασία πολλαπλής PCR για την ανίχνευση ειδών. Χρησιμοποιώντας κοινούς εμπρόσθιους αλλά διαφορετικούς αντίστροφους εκκινητές για μιτοχονδριακό γονίδιο του κυτοχρώματος b (*cytb*), εντόπισαν πέντε είδη κρέατος: κατσίκα, βοοειδή, πρόβατο, χοίρο και άλογο. Έχει πραγματοποιηθεί επίσης multiplex PCR σε επεξεργασμένα βιομηχανικά προϊόντα κρέατος για να διασφαλιστεί η εφαρμοσιμότητα της ανάλυσης και ελήφθησαν άριστα αποτελέσματα με καλό όριο ανίχνευσης. Τα πιο συχνά στοχευόμενα μιτοχονδριακά γονίδια είναι το κυτόχρωμα b (*cytb*), το 12S ριβοσωμικό RNA (rRNA), το 16S rRNA, το γονίδιο D-loop, το transfer RNA (tRNA)-Val, το *ND5*, το *ND2*, και το *ATPase6/ATPase8*. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πυρηνικά γονίδια είναι το 18S rRNA, το βραχύ διάσπαρτο πυρηνικό στοιχείο (SINE), και το μακρύ διάσπαρτο πυρηνικό στοιχείο (LINE).

Η Multiplex PCR τελικού σημείου (multiplex end-point PCR) μοιάζει πολύ με την αρχική με την παραλλαγή της ανάμειξης πολλαπλών ζευγών εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό πολλαπλών ολιγο-στόχων σε ένα μόνο σωληνάριο αντίδρασης και ταυτοποίηση του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης με βάση τις διαφορές στα μήκη των αμπλικονίων. Η αποτυχία της multiplex end-point PCR να παρέχει ποσοτικές πληροφορίες για τα γονίδια-στόχους που υπήρχαν αρχικά στο δείγμα, ώθησε τους επιστήμονες να αναπτύξουν αυτοματοποιημένη PCR πραγματικού χρόνου. Ξεπερνά αποτελεσματικά τους περιορισμούς της end-point PCR μέσω της άμεσης και ανεξάρτητης παρακολούθησης του πολλαπλασιασμού από κύκλο σε κύκλο, προσφέροντας ένα ποσοτικό αποτέλεσμα με βάση τη μέτρηση της έντασης φθορισμού μιας μη ειδικής φθορίζουσας χρωστικής όπως η SYBR Green ή ενός ειδικού για την αλληλουχία ανιχνευτή DNA που ονομάζεται TaqMan probe. Με την πάροδο των ετών, τόσο η απλή όσο και η Multiplex PCR πραγματικού χρόνου έχουν τεκμηριωθεί για την ανίχνευση ειδών κρέατος (Eaqub et al., 2014).

2.4 DNA Barcoding

Το πρώτο διεθνές συνέδριο με θέμα «Barcoding Life» πραγματοποιήθηκε στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Λονδίνου από τις 12-19 Ιουνίου του 2005 (David E. Schindel, 2005). Σε αυτό έλαβαν μέρος πάνω από 200 συμμετέχοντες από περίπου 50 χώρες. Όμως, ο «πατέρας της DNA Barcoding» θεωρείται ο καθηγητής Paul Hebert, ο οποίος το 2003 μαζί με μια ομάδα επιστημόνων του Πανεπιστημίου του Γκελφ στον Καναδά, ανέπτυξε τη χρήση μέρους ενός μιτοχονδριακού γονιδίου ως καθολικό δείκτη «ταυτοποίησης» για είδη ζώων (Savolainen et al., 2005).

Η DNA Barcoding είναι μια διαγνωστική τεχνική κατά την οποία σύντομες αλληλουχίες DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των ειδών (Savolainen et al., 2005). Η ταυτοποίηση των ειδών, πραγματοποιείται με τη χρήση τυποποιημένων περιοχών γονιδίων ως εσωτερική ετικέτα είδους. Από την αρχή της ανάπτυξής της θεωρείται ως μια λύση για την επιτάχυνση του ρυθμού ανακάλυψης των ειδών. Η αλληλούχιση DNA έχει καθιερωθεί ως ένα ώριμο πεδίο των επιστημών της βιοποικιλότητας, αρχειοθετώντας το εννοιολογικό χάσμα μεταξύ παραδοσιακής ταξινόμησης και διαφόρων τομέων της μοριακής συστηματικής. Αρχικά, προτάθηκε ως εργαλείο για την ταυτοποίηση ειδών, όμως η DNA Barcoding έχει επίσης εφαρμοστεί σε ταξινομικές ρουτίνες για την αυτοματοποιημένη περιγραφή ειδών. Ωστόσο, η ταυτοποίηση ειδών και η σκιαγράφηση ειδών, θα πρέπει να θεωρηθούν ως διακριτές δραστηριότητες που βασίζονται σε διαφορετικό θεωρητικό και μεθοδολογικό υπόβαθρο (Nicolas Hubert & Robert Hanner, 2015).

Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιεί τις κανονικές τεχνικές αλληλούχισης γονιδίων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μοριακές ταξινομικές μελέτες για δεκαετίες: εκχύλιση DNA, πολλαπλασιασμός PCR, αντιδράσεις αλληλούχισης και τριχοειδή αλληλούχιση. Το νέο σχετικά με την DNA Barcoding είναι η τυποποίηση και η μεγάλη κλίμακα με την οποία εφαρμόζεται. Στο παρελθόν, ένας ερευνητής μπορούσε να επιλέξει οποιοδήποτε γονίδιο ή γονίδια ενδιαφέροντος για ταξινομική μελέτη μιας συγκεκριμένης ομάδας. Διαφορετικοί ερευνητές μπορούσαν να επιλέξουν διαφορετικές γονιδιακές περιοχές. Αν κάποιος ήθελε να εντοπίσει έναν άγνωστο οργανισμό χρησιμοποιώντας μεθόδους αλληλούχισης γονιδίων, θα έπρεπε να αλληλουχίσει όλες τις περιοχές που είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως. Εστιάζοντας σε μία ή μερικές τυποποιημένες περιοχές, γίνεται δυνατή η ταχεία και οικονομική ταυτοποίηση δειγμάτων (David E. Schindel, 2005).

Η DNA Barcoding αποτελεί βασικό εργαλείο για τον έλεγχο της ποιότητας των προϊόντων τροφίμων, για την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων, τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας, την ελαχιστοποίηση της απάτης τροφίμων και την αξιοποίηση των τοπικών και τυπικών αγροδιατροφικών συστημάτων παραγωγής. Γενικά, η DNA Barcoding βασίζεται στον πολλαπλασιασμό μικρών τμημάτων DNA που ανήκουν στο μιτοχονδριακό (ζωικά τρόφιμα) ή στο χλωροπλαστικό (φυτικά τρόφιμα) γονιδίωμα, τα οποία είναι συντηρημένα σε επίπεδο είδους και διατηρούνται στα περισσότερα από τα επεξεργασμένα τρόφιμα. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε νωπά όσο και σε ακατέργαστα υλικά για την πιστοποίηση των ειδών, την οριοθέτηση των ειδών και την ταυτοποίηση από διαφορετικά επιμέρους τμήματα, όπου άλλες μέθοδοι χαρακτηρισμού συνήθως αποτυγχάνουν. Επιπλέον, η DNA Barcoding μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά προϊόντα τροφίμων και μήτρες που προέρχονται από μεμονωμένα ή μεικτά είδη, παράγοντας αλληλουχίες DNA που προσδιορίζουν το είδος (δηλαδή, barcodes). Με τον τρόπο αυτό, η μεθοδολογία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη εκούσιων ή τυχαίων αντικαταστάσεων που σχετίζονται με λανθασμένη επισήμανση τροφίμων και εμπορικές απάτες (Barcaccia et al., 2015).

Οι περιοχές DNA barcode και οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό του DNA είναι καθολικοί. Δεδομένων αυτών των υποθέσεων, οι ενισχύσεις PCR που πραγματοποιούνται σε δείγματα DNA που προέρχονται από μικτές μήτρες τροφίμων παράγουν διάφορα θραύσματα DNA barcode, τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικά είδη. Ως εκ τούτου, η αλληλούχιση Sanger, αν και είναι αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται για DNA Barcoding, δεν είναι μια εφικτή προσέγγιση για μικτά τρόφιμα, εκτός εάν προηγηθεί κλωνοποίηση, η οποία θα μπορούσε να εισάγει μεροληψίες, λόγω του συν-πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA από διαφορετικά άτομα ή ταξινομικές ομάδες. Αρκετές τεχνικές, όπως η πέψη με ειδικά ένζυμα περιορισμού (π.χ. RFLP) ή ηλεκτροφορητική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό διαφορετικών θραυσμάτων DNA πριν από τη διαδικασία αλληλούχισης. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές είναι αποτελεσματικές μόνο όταν η μήτρα του τροφίμου αποτελείται από λίγα είδη, και όταν έχουν σχετικά σημαντικές διαφορές στους DNA barcodes τους (π.χ. διαφορετικές περιοχές-στόχους για τα ένζυμα περιορισμού και αλληλουχίες διαφορετικού μήκους). Σε άλλες περιπτώσεις, τα αμπλικόνια πρέπει να κλωνοποιούνται σε πλασμιδικούς φορείς και να εισάγονται σε ικανά βακτηριακά κύτταρα, προκειμένου να ληφθούν μεμονωμένα θραύσματα.

Μια πιθανή αποτελεσματική προσέγγιση για την εφαρμογή της DNA Barcoding σε πολύπλοκες μήτρες τροφίμων θα μπορούσε να είναι η μεθοδολογία πυροαλληλούχισης 454, η οποία παράγει αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες αλληλουχίες ανά εκτέλεση, που αντιστοιχούν στο σύνολο των μορίων DNA που εξάγονται από τη μήτρα. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ταυτοποίηση όλων των πρώτων υλών, συμπεριλαμβανομένων των προσμίξεων ή των στοιχείων που εμφανίζονται μόνο σε ίχνη. Ο περιορισμός αυτής της προσέγγισης είναι το μειωμένο μήκος των barcode αλληλουχιών, οι οποίες κυμαίνονται από 250 έως 400 bp (ζεύγη βάσεων). Το εμπόδιο αυτό έχει επιλυθεί εν μέρει με τη χρήση μικρών barcodes (minibarcodes): μικρότερα θραύσματα του *cox1* περίπου 150 bp, τα οποία μπορούν επίσης να ληφθούν μέσω της πυροαλληλούχισης 454. Η προσέγγιση του minibarcode παρέχει αρκετές πληροφορίες για την ταυτοποίηση των ειδών από διαφορετικές μήτρες, καθώς και για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των προϊόντων θαλασσινών. Ωστόσο, το μειωμένο μήκος των ακολουθιών minibarcode μπορεί να μην είναι αρκετά πληροφοριακό για τον εντοπισμό στενά συγγενικών ειδών (Galimberti et al., 2013).

Συχνά ένας παράγοντας κινδύνου για τον εντοπισμό της λανθασμένης επισήμανσης ή της απάτης τροφίμων είναι η έλλειψη επαρκών προτύπων και η διαθεσιμότητα υψηλής ποιότητας αποθετηρίων αλληλουχιών αναφοράς, που μπορεί να αποτελέσουν κρίσιμο σημείο. Οπότε η διεθνής πλατφόρμα BOLD (Barcode of Life Database) που υποστηρίζει τη συλλογή DNA barcodes, αποτελεί μια ισχυρή και ακριβή βιβλιοθήκη αναφοράς για όλα τα ζώντα είδη. Ακόμη, σαν βιβλιοθήκη αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η GenBank.

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) επιλέχθηκε ως πηγή δεικτών για το barcoding ζωικών ειδών διότι, σε αντίθεση με τα γονίδια του πυρήνα, τα μιτοχονδριακά γονίδια ανήκουν σε απλοειδές γονιδίωμα, παρουσιάζουν υψηλό αριθμό αντιγράφων, δεν έχουν ιντρόνια, παρουσιάζουν χαμηλό ανασυνδυασμό και κληρονομούνται από τη μητέρα. Από τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που υπάρχουν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των ζώων, η χρήση της υπομονάδας 1 της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (*cox1* ή COI) προτάθηκε ως τυπικός δείκτης barcode για τα ζωικά είδη για δύο βασικούς λόγους: (1) οι καθολικοί εκκινητές δημιουργούν ένα θραύσμα 648 bp στο 5΄άκρο αυτού του γονιδίου εύκολα για να πολλαπλασιαστεί σε ένα ευρύ φάσμα φυλών, και (2) το ποσοστό νουκλεοτιδικής υποκατάστασης επιτρέπει όχι μόνο στενά συγγενικά είδη να διαφοροποιηθούν αλλά, σε ορισμένες ταξινομικές ομάδες, και διαφορετικούς πληθυσμούς, βιοτύπους ή φυλές του ίδιου είδους. Άλλα μιτοχονδριακά γονίδια προτάθηκαν ως δείκτες barcode, συμπεριλαμβανομένου του *cob*, το οποίο κωδικοποιεί για το αποκυτόχρωμα b, των *cox2* και *cox3*, τα οποία κωδικοποιούν για την οξειδάση του κυτοχρώματος τις υπομονάδες 2 και 3 αντίστοιχα, το *nad1*, που κωδικοποιεί την υπομονάδα 1 της αφυδρογονάσης NADH, και το μιτοχονδριακό γονίδιο *16S-rDNA* (Barcaccia et al., 2015).

Η έρευνα για ένα ανάλογο του *cox1* στα χερσαία φυτά έχει επικεντρωθεί στο πλαστιδικό γονιδίωμα. Αρκετά πλαστιδικά γονίδια, όπως τα πιο συντηρημένα *rpoB*, *rpoC1 και rbcL* ή ένα τμήμα του *matK*, το οποίο παρουσιάζει ταχύ ρυθμό εξέλιξης, έχουν προταθεί ως περιοχές barcode. Διαγονιδιακά μεσοδιαστήματα όπως τα *trnH-psbA*, *atpF-atpH* και *psbK-psbI* δοκιμάστηκαν επίσης, λόγω του γρήγορου εξελικτικού ρυθμού τους. Το 2009, η κοινοπραξία CBoL (Consortium for the Barcode of Life) Plant Working Group, πρότεινε τη χρήση του συνδυασμού 2 τόπων των *rbcL* και *matK* ως βασικές περιοχές barcode, λόγω του απλού ρυθμού ανάκτησης των *rbcL* και της υψηλής ανάλυσης του *matK*. Δυστυχώς, το *matK* είναι δύσκολο να πολλαπλασιαστεί με τη χρήση ενός μόνο ζεύγους εκκινητών. Αντίθετα, παρά την περιορισμένη ανάλυση, το *rbcL* είναι λιγότερο προβληματικό όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό, την αλληλούχιση και την ευθυγράμμιση και παρέχει μια χρήσιμη ραχοκοκαλιά για τη δημιουργία συνόλων δεδομένων barcode φυτικού DNA. Μεταξύ άλλων αλληλουχιών, διαγονιδιακός διαχωρισμός *trnH-psbA* είναι εύκολο να πολλαπλασιαστεί και έχει υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ στενά συγγενικών ταξινομικών ομάδων. Η πυρηνική περιοχή ITS αναφέρθηκε επίσης ως συμπληρωματική περιοχή DNA barcode. Παρόλο που εξακολουθεί να υπάρχει συζήτηση σχετικά με την αποτελεσματικότητα αυτών των δεικτών, ιδίως όταν οι χρήστες έχουν να κάνουν με στενά συγγενικές ταξινομικές ομάδες, η DNA Barcoding έδειξε συνεπή αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση άγνωστων δειγμάτων με βάση την σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς (Galimberti et al., 2012).

2.5 Τυχαίως Πολλαπλασιαζόμενα Πολυμορφικά Τμήματα (RAPD)

RAPD (προφέρεται "rapid"), για το Random Amplification of Polymorphic DNA, είναι ένας τύπος της αντίδρασης PCR, αλλά τα τμήματα του DNA που πολλαπλασιάζονται είναι τυχαία. Δεν απαιτείται καμία γνώση της αλληλουχίας του DNA για το γονίδιο στόχο, καθώς οι εκκινητές θα βρουν κάπου στην αλληλουχία, αλλά δεν είναι βέβαιο πού ακριβώς. Αυτό καθιστά τη μέθοδο δημοφιλή για σύγκριση του DNA βιολογικών συστημάτων που δεν είχαν την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας ή σε ένα σύστημα στο οποίο συγκρίνονται σχετικά λίγες αλληλουχίες DNA (δεν είναι κατάλληλο για τη δημιουργία μιας τράπεζας δεδομένων DNA). Ίσως ο κυριότερος λόγος της επιτυχίας είναι η απόκτηση ενός μεγάλου αριθμού γενετικών δεικτών που απαιτούν μικρές ποσότητες DNA χωρίς την απαίτηση για κλωνοποίηση, αλληλούχιση ή οποιαδήποτε άλλη μορφή μοριακού χαρακτηρισμού του γονιδιώματος του συγκεκριμένου είδους (N. Senthil Kumar & G. Gurusubramanian, 2011).

Η τυπική τεχνολογία RAPD χρησιμοποιεί κοντά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μήκους 10 βάσεων) τυχαίων αλληλουχιών ως εκκινητές για τον πολλαπλασιασμό νανογραμμαρίων συνολικού γονιδιωματικού DNA σε χαμηλές θερμοκρασίες ανόπτησης με PCR. Τα προϊόντα πολλαπλασιασμού διαχωρίζονται γενικά σε πηκτές αγαρόζης και χρωματίζονται με βρωμιούχο αιθίδιο (Nandani Kumari & Saroj Kumar Thakur, 2014). Πολλαπλασιασμός PCR με εκκινητές μικρότερους από 10 νουκλεοτίδια [δακτυλικό αποτύπωμα DNA (DAF)] έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή περισσότερο σύνθετου προφίλ δακτυλικού αποτυπώματος DNA. Αν και οι προσεγγίσεις αυτές είναι διαφορετικές σε σχέση με το μήκος των τυχαίων εκκινητών, οι συνθήκες πολλαπλασιασμού και οι μέθοδοι οπτικοποίησης, διαφέρουν από τις συνηθισμένες συνθήκες PCR στο ότι χρησιμοποιείται μόνο ένα ολιγονουκλεοτίδιο τυχαίας αλληλουχίας και δεν απαιτείται εκ των προτέρων γνώση για το γονιδίωμα που υποβάλλεται σε ανάλυση (N. Senthil Kumar & G. Gurusubramanian, 2011).

Σε κατάλληλη θερμοκρασία ανόπτησης κατά τη διάρκεια του θερμικού κύκλου, ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές τυχαίας αλληλουχίας δεσμεύουν διάφορες θέσεις εκκίνησης στις συμπληρωματικές αλληλουχίες στο πρότυπο γονιδιωματικό DNA και παράγουν διακριτά προϊόντα DNA, εάν αυτές οι θέσεις εκκίνησης βρίσκονται εντός μιας ενισχυτικής απόστασης η μία από την άλλη. Το προφίλ του πολλαπλασιασμένου DNA εξαρτάται κυρίως από την ομολογία της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων μεταξύ του πρότυπου DNA και του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή στο τέλος κάθε πολλαπλασιασμένου προϊόντος (Nandani Kumari & Saroj Kumar

Thakur, 2014). Πυρηνική μεταβολή μεταξύ διαφορετικών συνόλων πρότυπων DNA θα προκαλέσει παρουσία ή απουσία ζωνών εξαιτίας των αλλαγών στα στοιχεία των εκκινητών. Η ανάλυση αλληλουχιών που χαρακτηρίζουν τα πολλαπλασιασμένα τμήματα (SCARs) των πολυμορφισμών RAPD έδειξε ότι μια αιτία των RAPD πολυμορφισμών είναι οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις όπως οι εισαγωγές/διαγραφές. Επομένως, προϊόντα πολλαπλασιασμού από τα ίδια αλληλόμορφα σε έναν ετεροζυγώτη διαφέρουν ως προς το μέγεθος και θα ανιχνεύονται ως παρουσία και απουσία ζωνών στο προφίλ RAPD, τα οποία είναι παρόμοια με εκείνα τα μοτίβα του δακτυλικού αποτυπώματος χαμηλής αυστηρότητας μικροδορυφόρου DNA και επομένως ονομάζεται RAPD fingerprinting. Κατά μέσο όρο, κάθε εκκινητής καθορίζει τον πολλαπλασιασμό αρκετών διακριτών θέσεων του γονιδιώματος, έτσι ώστε τα αλληλόμορφα να μην διαχωρίζονται στα μοτίβα RAPD (N. Senthil Kumar & G. Gurusubramanian, 2011).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της τεχνολογίας RAPD περιλαμβάνουν: (i) καταλληλότητα για εργασίες σε ανώνυμα γονιδιώματα, (ii) δυνατότητα εφαρμογής σε προβλήματα όπου μόνο περιορισμένες ποσότητες DNA είναι διαθέσιμες, (iii) αποτελεσματικότητα και χαμηλό κόστος. Σχηματίζεται μεγάλος αριθμός θραυσμάτων και είναι μια απλή τεχνική. Οι αυθαίρετοι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την τεχνική αυτή μπορούν να αγοράζονται εύκολα και δεν υπάρχει ανάγκη για αρχικές γενετικές ή γονιδιωματικές πληροφορίες και το μοναδιαίο κόστος είναι χαμηλό. Τα RAPD έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να λαμβάνονται με λογικό κόστος και γενικά πολλαπλασιάζουν ένα εύρος θραυσμάτων του περισσότερου DNA και παρουσιάζουν πολυμορφισμούς. Ορισμένοι εκκινητές θα παράγουν άσχετα μοτίβα μεταξύ άσχετων ζώων και πανομοιότυπα για πολύ στενά συγγενικά ζώα. Κατά πάσα πιθανότητα, οι θέσεις των εκκινητών είναι τυχαία κατανεμημένες κατά μήκος του γονιδιώματος-στόχου και πλαισιώνουν τόσο συντηρημένες όσο και εξαιρετικά μεταβλητές περιοχές. Μεγάλη διακύμανση στην ένταση ζώνης μπορεί να αποδειχθεί ότι είναι αναπαραγώγιμη μεταξύ πειραμάτων, η οποία θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών αντιγράφων των πολλαπλασιασμένων περιοχών στο πρότυπο ή της αποτελεσματικότητας με την οποία πολλαπλασιάζονται συγκεκριμένες περιοχές. Οι πολυμορφικές ζώνες που λαμβάνονται από τα RAPD μπορούν να επίσης να κλωνοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση.

Οι δείκτες RAPD είναι κυρίαρχοι. Ο πολλαπλασιασμός είτε συμβαίνει σε έναν τόπο ή όχι, οδηγώντας σε αποτελέσματα με βάση την παρουσία ή την απουσία ζώνης. Αυτό σημαίνει ότι οι ομοζυγώτες και οι ετεροζυγώτες δεν μπορούν να διακριθούν. Επιπλέον, η απουσία μιας ζώνης λόγω έλλειψης μιας αλληλουχίας-στόχου δεν μπορεί να διακριθεί από αυτή που συμβαίνει λόγω έλλειψης πολλαπλασιασμού για άλλους λόγους (π.χ. κακή ποιότητα του DNA), συμβάλλοντας στην ασάφεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τίποτα δεν είναι γνωστό για την ταυτότητα των προϊόντων πολλαπλασιασμού εκτός εάν οι μελέτες υποστηρίζονται από ανάλυση γενεαλογικών δέντρων. Προβλήματα με την αναπαραγωγιμότητα προκύπτουν καθώς η RAPD πάσχει από ευαισθησία στις αλλαγές της ποιότητας του DNA, των συστατικών και των συνθηκών PCR, με αποτέλεσμα μεταβολές των πολλαπλασιασμένων τμημάτων. Τα αναπαραγώγιμα αποτελέσματα μπορούν να προκύψουν αν ληφθεί μέριμνα για την τυποποίηση των χρησιμοποιούμενων συνθηκών. Προβλήματα της συν-μετανάστευσης εγείρουν ερωτήματα όπως "Μήπως οι ζώνες ίσου μεγέθους αντιστοιχούν σε θραύσματα

DNA"; Η παρουσία μιας ζώνης πανομοιότυπου μοριακού βάρους σε διαφορετικά άτομα δεν είναι απόδειξη από μόνη της ότι τα άτομα μοιράζονται το ίδιο (ομόλογο) τμήμα DNA. Μια ζώνη που ανιχνεύεται σε πηκτή ως μόνη μπορεί να αποτελείται από διάφορα πολλαπλασιασμένα προϊόντα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο τύπος της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή που χρησιμοποιείται, ενώ μπορεί να διαχωρίσει ποσοτικά το DNA (δηλαδή ανάλογα με το μέγεθος), δεν μπορεί να διαχωρίσει θραύσματα ίσου μεγέθους ποιοτικά (δηλ. σύμφωνα με την αλληλουχία των βάσεων) (Nandani Kumari & Saroj Kumar Thakur, 2014).

2.6 Αλληλούχιση Επόμενης Γενιάς (NGS)

Η αλληλούχιση νουκλεϊκών οξέων είναι μια μέθοδος για τον προσδιορισμό της ακριβούς σειράς των νουκλεοτιδίων που υπάρχουν σε ένα δεδομένο DNA ή RNA. Κατά την τελευταία δεκαετία, η χρήση της αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων έχει αυξηθεί εκθετικά, καθώς η δυνατότητα αλληλούχισης έχει γίνει προσιτή στην έρευνα και τα κλινικά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο. Η πρώτη μεγάλη απόπειρα στην αλληλούχιση DNA ήταν το Human Genome Project, ένα έργο ύψους 3 δισεκατομμυρίων δολαρίων, που διήρκεσε 13 χρόνια και ολοκληρώθηκε το 2003. Το Human Genome Project ολοκληρώθηκε με την αλληλούχιση πρώτης γενιάς, γνωστή ως αλληλούχιση Sanger. Η αλληλούχιση Sanger (η μέθοδος τερματισμού αλυσίδας), που αναπτύχθηκε το 1975 από τον Edward Sanger, θεωρήθηκε το πρότυπο για την αλληλούχιση νουκλεϊκών οξέων για τις επόμενες δυόμιση δεκαετίες.

Από την ολοκλήρωση της πρώτης αλληλούχισης του ανθρώπινου γονιδιώματος, η ζήτηση για φθηνότερες και ταχύτερες μεθόδους αλληλούχισης έχει αυξηθεί σημαντικά. Η ζήτηση αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη της δεύτερης γενιάς αλληλούχισης, ή αλλιώς αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Οι πλατφόρμες NGS εκτελούν μαζικά παράλληλη αλληλούχιση, κατά την οποία εκατομμύρια θραύσματα DNA από ένα μόνο δείγμα αλληλουχίζονται ταυτόχρονα. Η τεχνολογία της μαζικής παράλληλης αλληλούχισης διευκολύνει την αλληλούχιση υψηλής απόδοσης, η οποία επιτρέπει ένα ολόκληρο γονιδίωμα να αλληλουχηθεί σε λιγότερο από μία ημέρα. Στο παρελθόν, αναπτύχθηκαν αρκετές πλατφόρμες NGS που παρέχουν χαμηλού κόστους αλληλούχιση υψηλής απόδοσης (Ayman Grada & Kate Weinbrecht, 2013).

Μια σειρά από πλατφόρμες NGS, που χρησιμοποιούν μια ποικιλία διαφορετικών χημικών μεθόδων, είναι ευρέως διαθέσιμες για αλληλούχιση DNA υψηλής απόδοσης και εξακολουθούν να αναπτύσσονται πρόσθετες τεχνολογίες αλληλούχισης. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη οικογένεια τεχνολογιών κατασκευάζεται από την Illumina. Αυτές χρησιμοποιούν αναστρέψιμους φθορίζοντες διδεοξυ τερματιστές για να αλληλουχίσουν συσσωματώματα DNA πολλαπλασιασμένα στην επιφάνεια των αναλώσιμων κυψελίδων ροής. Η Illumina παρέχει μια σειρά επιλογών που παράγουν ένα εύρος από διαφορετικές ποσότητες και μήκη αλληλουχιών DNA (ή "αναγνώσεων" όπως ονομάζονται συχνά), ανάλογα με τις ανάγκες του χρήστη. Δηλαδή από την Illumina iSeq 100, η οποία μπορεί να παράγει το πολύ 1,2 δισεκατομμύρια βάσεις αλληλουχίας ανά εκτέλεση, στη HiSeq X Ten, η οποία είναι ένα σύνολο δέκα οργάνων με το κάθε ένα να παράγει έως και 1,8 τρισεκατομμύρια βάσεις. Αυτή η υψηλή απόδοση επιτρέπει την αλληλούχιση των γονιδιωμάτων ζώων και φυτών σε επίπεδο πληθυσμού. Οι πλατφόρμες Illumina είναι μικρής έκτασης αλληλουχιτές, παράγοντας ένα μέγιστο 2 × 300 βάσεις για ανάγνωση ανά ζεύγη, διαθέσιμες μόνο στον αλληλουχιτή MiSeq. Εναλλακτικές πλατφόρμες που παράγουν σύντομες αναγνώσεις είναι διαθέσιμες, για παράδειγμα χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Ion Torrent, οι οποίες έχουν τα δικά τους πλεονεκτήματα (π.χ. κόστος ανά βάση) και μειονεκτήματα (π,χ. υψηλότερο ποσοστό ομοιοπολικών σφαλμάτων), αν και αυτό μπορεί σε κάποιο βαθμό να διορθωθεί αλγοριθμικά. Η Ion Torrent χρησιμοποιεί τεχνολογία ημιαγωγών για την ανίχνευση ιόντων H^+ που απελευθερώνονται κατά την ενσωμάτωση διαδοχικά εισαγόμενων νουκλεοτιδίων σε μια επιμήκη αλυσίδα DNA. Επί του παρόντος υπάρχουν τρεις συσκευές Ion Torrent, η Personal Genome Machine (PGM), η Proton, και το GeneStudio S5.

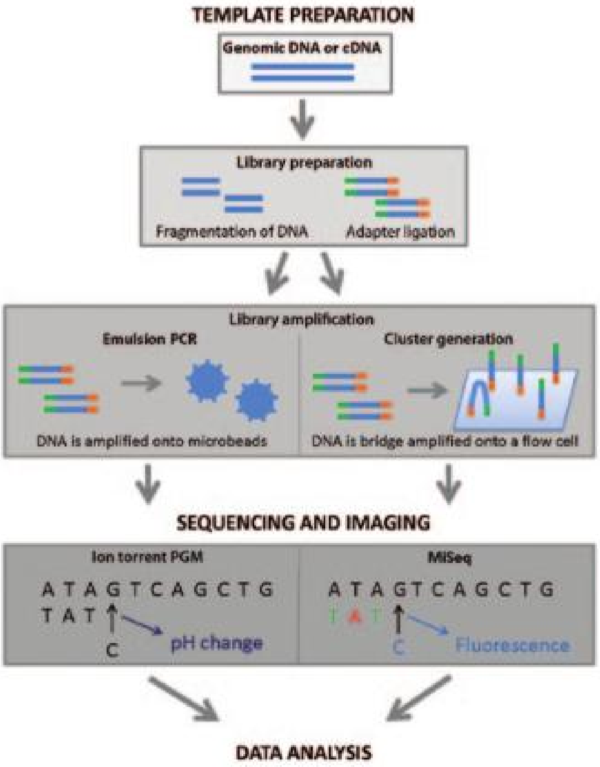
Μια τεχνολογία που παράγει μεγαλύτερες αναγνώσεις είναι η αλληλούχιση ενός μορίου σε πραγματικό χρόνο (SMRT) της Pacific Biosciences (PacBio). Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει επίσης νουκλεοτίδια επισημασμένα με φθορίζουσα ουσία, τα οποία ενσωματώνονται στο μόριο του DNA που αναπαράγεται. Το κύριο πλεονέκτημα των πλατφορμών PacBio έγκειται στην ικανότητά τους να παράγουν σχετικά μεγάλες αναγνώσεις [μέχρι περίπου 60.000 βάσεις (60 κιλοβάσεις, kb)]. Το πιο πρόσφατο σύστημα PacBio είναι το Sequel, το οποίο έχει τη δυνατότητα να παράγει ένα εκατομμύριο αλληλουχίες DNA ανά λειτουργεία, πολύ λιγότερα από αυτά που παράγονται από τις υψηλής απόδοσης πλατφόρμες μικρής ανάγνωσης. Μια διαφορετική τεχνολογία μακράς ανάγνωσης έχει αναπτυχθεί από την Oxford Nanopore Technologies, με τη μορφή της φορητής συσκευής MinION και της επιτραπέζιας συσκευής PromethION (η ακόμη μικρότερη SmidgION, σχεδιασμένη να χρησιμοποιείται με smart phone αναμένεται επίσης να κυκλοφορήσει). Σε αυτά τα προϊόντα το DNA διοχετεύονται μέσα από πόρους νανοκλίμακας και η αλληλουχία προκύπτει από τις μεταβολές σε πιθανές διαφορές κατά μήκος του πόρου. Η τεχνολογία μακράς ανάγνωσης έχει σημαντικές εφαρμογές στη διαλεύκανση της σωστής διάταξης πολύπλοκων γονιδιωμάτων και για την αλληλούχιση μακρών αμπλικονίων PCR (Haynes et al., 2019).

Οι βάσεις δεδομένων οι οποίες χρησιμοποιούνται στην εν λόγω μέθοδο είναι η GenBank και η SRA (Sequence Read Archive). Περιορισμένες βάσεις δεδομένων αλληλουχιών με προδιαγραφές αυθεντικότητας έχουν δημιουργηθεί, ένα παράδειγμα είναι η JRC GMO-Amplicons βάση δεδομένων που περιέχει περισσότερα από 240.000 αμπλικόνια που έχουν παραχθεί με χρήση *Silico* και σχετίζονται με γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Οι βάσεις δεδομένων που θα χρησιμοποιηθούν θα εξαρτηθούν σε μεγάλο βαθμό από τους στόχους της ανάλυσης, είτε πρόκειται για ένα γονίδιο barcode των ίδιων των συστατικών, είτε για το μικροβιακό αποτύπωμα του προϊόντος, ή ακόμη και οι ακολουθίες ολόκληρου του γονιδιώματος των μικροβίων που σχετίζονται με το προϊόν.

Η NGS εφαρμόζεται ήδη στο πλαίσιο της ασφάλειας των τροφίμων, για παράδειγμα για να επιτρέψει θεωρητικά την ακριβή ταυτοποίηση της μεγάλης πλειοψηφίας των μικροβιακών ταξινομικών ομάδων μέσα σε ένα προϊόν, συμπεριλαμβανομένων μικροοργανισμών που είναι μη καλλιεργήσιμοι και εκείνων που είναι παρόντες μόνο σε μικρούς αριθμούς. Η πρόκληση τώρα είναι να εφαρμοστούν οι τεχνολογίες NGS για την αντιμετώπιση ζητημάτων γνησιότητας τροφίμων. Μία από τις διάφορες πιθανές χρήσεις είναι ο εντοπισμός της παρουσίας διαγονιδίων για τον εντοπισμό ΓΤΟ οι οποίοι αυξάνονται σε έκταση και πολυπλοκότητα. Επιπλέον, το πλεονέκτημα της NGS είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης εξέτασης πολλαπλών διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών, ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση όλων των φυτικών, ζωικών, μυκητιακών και μικροφυκών συστατικών σε προϊόντα τροφίμων (Haynes et al., 2019).

Η μέθοδος NGS ξεκινά με την προετοιμασία προτύπων. Η προετοιμασία προτύπων συνίσταται στη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης νουκλεϊκών οξέων [DNA ή συμπληρωματικού DNA (cDNA)] και ενίσχυσης της βιβλιοθήκης αυτής. Βιβλιοθήκες αλληλούχισης κατασκευάζονται με κατακερματισμό του δείγματος DNA (ή cDNA) και συνδέοντας αλληλουχίες προσαρμογής (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας) στα άκρα των θραυσμάτων DNA. Μόλις κατασκευαστούν, οι βιβλιοθήκες πολλαπλασιάζονται κλωνικά για την προετοιμασία της αλληλούχισης. Η PGM χρησιμοποιεί PCR γαλακτώματος στο σύστημα OneTouch για τον πολλαπλασιασμό μεμονωμένων θραυσμάτων της βιβλιοθήκης σε μικροσφαιρίδια, ενώ η MiSeq χρησιμοποιεί γεφυροτό πολλαπλασιασμό για να σχηματίσει συστάδες προτύπων σε μια κυψελίδα ροής.

Για τη λήψη αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων από τις ενισχυμένες βιβλιοθήκες, η Ion Torrent PGM και η MiSeq βασίζονται σε αλληλούχιση μέσω σύνθεσης. Τα θραύσματα της βιβλιοθήκης λειτουργούν ως πρότυπο, από το οποίο συντίθεται ένα νέο θραύσμα DNA. Η αλληλούχιση πραγματοποιείται μέσω ενός κύκλου πλύσης και πλημμύρας των θραυσμάτων με τα γνωστά νουκλεοτίδια σε διαδοχική σειρά. Καθώς τα νουκλεοτίδια ενσωματώνονται στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA, καταγράφονται ψηφιακά ως αλληλουχία. Η PGM και η MiSeq βασίζονται σε ένα ελαφρώς διαφορετικό μηχανισμό για την ανίχνευση πληροφοριών νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η PGM εκτελεί αλληλουχία ημιαγωγών που βασίζεται στην ανίχνευση των αλλαγών του pH που προκαλούνται από την απελευθέρωση ενός ιόντος υδρογόνου κατά την ενσωμάτωση ενός νουκλεοτιδίου σε μια αυξανόμενη αλυσίδα DNA. Αντιθέτως, η MiSeq βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται από την ενσωμάτωση σημασμένων νουκλεοτιδίων στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα του DNA (Ayman Grada & Kate Weinbrecht, 2013).



Εικόνα 4: μεθοδολογία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (Ayman Grada & Kate Weinbrecht, 2013)

Επί του παρόντος, ο ρυθμός υιοθέτησης της εφαρμογής των τεχνικών NGS φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ηπείρων. Στις ΗΠΑ, η εφαρμογή της NGS στα τρόφιμα καθοδηγείται από τον FDA, ενώ στην Ευρώπη και την Ασία η μεγαλύτεροι πρόοδοι έχουν σημειωθεί από την ίδια τη βιομηχανία τροφίμων και ιδίως εκείνες τις εταιρείες που θέλουν να απασχολήσουν εξειδικευμένες επιχειρήσεις για να εκτελέσουν έναν πλήρη έλεγχο των αλυσίδων εφοδιασμού τους (συχνά με την προστασία της εικόνας της μάρκας κατά νου). Ενώ η τρέχουσα χρήση της NGS στη βιομηχανία είναι κάπως περιορισμένη σε σύγκριση με τις πιο καθιερωμένες τεχνικές, υπάρχουν αρκετοί τομείς όπου η εφαρμογή σημειώνει πρόοδο. Ο πρώτος από αυτούς είναι η ταυτοποίηση ΓΤΟ και γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών (ΓΤΜ). Ο άλλος κύριος τομέας στον οποίο χρησιμοποιείται σήμερα η NGS είναι για την ανάλυση πολύπλοκων μητρών τροφίμων, όταν απαιτείται μια πλήρης εικόνα των συστατικών (και όλων των επιμολυντών). Αυτός είναι και ο τομέας που η NGS χρησιμοποιείται περισσότερο από τη βιομηχανία (Haynes et al., 2019).

2.7 Υψηλής διακριτικής ικανότητας Ανάλυση Καμπυλών Τήξης (HRM)

Η τήξη είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα του DNA. Καθώς η διπλή έλικα θερμαίνεται, οι κλώνοι της διαχωρίζονται. Αν η διπλή περιοχή είναι μικρή, όπως για παράδειγμα οι περισσότεροι συνθετικοί ανιχνευτές, η τήξη συμβαίνει χωρίς ενδιάμεσες καταστάσεις και η θερμοκρασία τήξης (Tm) ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία τα μισά από τα διπλά σημεία έχουν διαχωριστεί. Η Tm των σύντομων διπλών σημείων μπορεί συνήθως να εκτιμηθεί με ακρίβεια 2 ^{o}C, λαμβάνοντας υπόψη τη θερμοδυναμική των γειτονικών βάσεων. Αντίθετα, τα μακρύτερα προϊόντα PCR μπορεί να υποστούν τήξη σε πολλαπλά στάδια ή "περιοχές", με περιοχές πλούσιες σε AT να διαχωρίζονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από τις περιοχές πλούσιες σε GC. Όταν υπάρχουν περισσότερες από μία περιοχές, η Tm δεν είναι καθορισμένη και η πρόβλεψη της καμπύλης τήξης απαιτεί πιο σύνθετους αναδρομικούς υπολογισμούς (Maria Erali & Carl Wittwer, 2010).

Η παρακολούθηση της τήξης του DNA γίνεται με φθορισμό και απαιτούνται μόνο νανογραμμάρια (ngs), που παρέχονται βολικά από την ενίσχυση PCR. Η τήξη του DNA με φθορισμό στο πλαίσιο της PCR πραγματικού χρόνου εισήχθη με το LightCycler το 1997. Τόσο η τήξη ανιχνευτών για γονοτυπία όσο και η τήξη προϊόντων με SYBR Green I είναι ευρέως διαδεδομένες σε όργανα πραγματικού χρόνου σήμερα (Maria Erali & Carl Wittwer, 2010).

Αν και οι μικτές διαφορές μεταξύ των προϊόντων PCR διακρίθηκαν από την θερμοκρασία τήξης (Tm), οι λεπτές διαφορές στην αλληλουχία θεωρήθηκαν πέρα από την εμβέλεια της ανάλυσης τήξης με φθορισμό. Αρκετά χρόνια αργότερα, η HRM εμφανίστηκε ως μια ταχεία μέθοδος για αύξηση του περιεχομένου των πληροφοριών (Carl T. Wittwer, 2009). Η HRM κατέστη δυνατή χάρη στην πρόοδο σε τρία μέτωπα: τη χημεία των χρωστικών ουσιών, την ανάλυση των οργάνων και την ανάλυση δεδομένων. Παρόλο που η SYBR Green I μπορεί να διαφοροποιήσει πολλές ομοζυγωτικές παραλλαγές που διαφέρουν ως προς την Tm, π.χ. μεγάλες διαγραφές, σύνθετες επαναλαμβανόμενες περιοχές και ανάλυση μεθυλίωσης, είναι δύσκολο να ανιχνευθούν ετεροδιπλέγματα με SYBR Green I. Οι περισσότερες εφαρμογές HRM εξαρτώνται από τον κορεσμό χρωστικών ουσιών που ανιχνεύουν ετεροδιπλέγματα, μια νέα λειτουργική κατηγορία χρωστικών που είτε συντίθενται de novo ή ταυτοποιούνται από υπάρχουσες χρωστικές. Η LC-Green ήταν η πρώτη διαθέσιμη χρωστική κορεσμού. Τώρα υπάρχουν πολλές άλλες, συμπεριλαμβανομένων των LCGreen+ (Idaho Technology Inc.), Syto9 (Invitrogen, Carlsbad, CA), EvaGreen (Biotum) και LightCycler 480 ResoLight Dye (Roche, Indianapolis, IN). Όλες έχουν ελαφρώς διαφορετικά χαρακτηριστικά και συχνά απαιτούν ελαφρώς διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και συνθήκες PCR (Vossen et.al, 2009). Ορισμένες χρωστικές κορεσμού που είναι διαθέσιμες εκτός των εμπορικών κύριων μιγμάτων, αποκαλύπτουν διαφορές στην ικανότητά τους να ανιχνεύουν ετεροδιπλέγματα. Ομοίως, τα όργανα τήξης διαφέρουν ως προς την ανάλυση. Τέλος, απαιτείται στοχευμένο λογισμικό για τον εντοπισμό των μικρών διαφορών στις καμπύλες τήξης που προσδιορίζουν μια παραλλαγή ή γονότυπο (Maria Erali & Carl Wittwer, 2010).

Αρκετοί προμηθευτές παράγουν συστήματα για καμπύλες HRM. Συνολικά, τα συστήματα αυτά αποδίδουν όπως μπορεί να αναμένεται, αλλά η ανάλυση μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Στα περισσότερα συστήματα υπάρχουν μικρές διαφορές θερμοκρασίας από κυψελίδα σε κυψελίδα που επηρεάζουν αρνητικά την ευαισθησία. Για να παρακάμψουν αυτό το πρόβλημα, οι Seipp et al. (2007) πρόσθεσαν ανιχνευτές ελέγχου βαθμονόμησης θερμοκρασίας: έναν που λιώνει σε χαμηλή και έναν σε υψηλή θερμοκρασία. Το λογισμικό ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιήσει τις θέσεις τήξης αυτών των ανιχνευτών για να αντισταθμίσει διαφορές θερμοκρασίας μεταξύ των κυψελίδων, μειώνοντας την τυπική απόκλιση της Tm κατά 38%, αυξάνοντας αισθητά την ευαισθησία. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το λογισμικό που είναι διαθέσιμο στα όργανα HRM αποτελεί σημαντικό στοιχείο που καθορίζει την τελική ευαισθησία που επιτυγχάνεται.

Η εφαρμογή της HRM είναι αρκετά απλή. Στις απλούστερες ρυθμίσεις, χωρίς να απαιτούνται τροποποιήσεις των υφιστάμενων συνθηκών, η χρωστική προστίθεται μετά την PCR απευθείας πριν από την τήξη. Η εκτέλεση της HRM σε δοκιμασία κλειστού σωλήνα με την προσθήκη της χρωστικής πριν από την PCR είναι πιο ελκυστική. Η HRM δεν απαιτεί μεγάλες αλλαγές στο εργαστήριο. Είναι μια απλή PCR που εκτελείται υπό ελαφρώς τροποποιημένες συνθήκες και παρουσία ειδικής χρωστικής. Επειδή η HRM, σε αντίθεση με πολλές άλλες τεχνικές, δεν απαιτεί διαχωρισμό μετά την PCR, επιτυγχάνεται σημαντική μείωση κόστους. Επιπλέον, η HRM είναι μια μη καταστροφική μέθοδος και η επακόλουθη ανάλυση με, για παράδειγμα, ηλεκτροφόρηση με πηκτή ή αλληλούχιση, μπορεί να πραγματοποιηθεί και μετά την ανάλυση της τήξης (Vossen et.al, 2009).

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της HRM εξαρτάται από τη χρωστική, το όργανο και το λογισμικό που χρησιμοποιείται. Ο συμβιβασμός σε ένα από αυτά μπορεί να χαλάσει το τελικό αποτέλεσμα (Maria Erali & Carl Wittwer, 2010).

Κεφάλαιο 3: Ανίχνευση νοθείας σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Ένα τυποποιημένο σύστημα γενετικής ιχνηλασιμότητας που εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση των ειδών, στα ζώα και τα προϊόντων κρέατος, είναι ζωτικής σημασίας για τους καταναλωτές λόγω των κοινωνικών, θρησκευτικών, υγειονομικών και οικονομικών επιπτώσεων. Στις μέρες μας τα σφάγια ζώων και τα ολόκληρα ψάρια σπάνια παρουσιάζονται, ενώ είτε φρέσκα είτε κατεψυγμένα τεμάχια, επεξεργασμένα και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα διατίθενται όλο και περισσότερο, καθιστώντας την αναγνώριση των ειδών πολύ δύσκολη. Για το λόγο αυτό, θα μπορούσε να υπάρξει δόλια νοθεία, αντικαθιστώντας το δηλωθέν κρέας ή το είδος του κρέατος με άλλα χαμηλότερης εμπορικής αξίας. Τέτοια νοθεία είναι πράγματι πολύ συνηθισμένη σε προϊόντα κρέατος θηραμάτων, με αποτέλεσμα να επιφέρει μεγάλο κέρδος λόγω των υψηλότερων τιμών αυτών των ειδών σε σύγκριση με το βοδινό ή το χοιρινό κρέας. Η βιομηχανία ψαριών εμπλέκεται επίσης σε παραπλανήσεις ειδών, ιδίως στην περίπτωση των κονσερβοποιημένων ψαριών όπως ο τόνος, το γένος του οποίου αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη που χαρακτηρίζονται από διαφορετική ποιότητα. Επιπλέον, ο γαλακτοκομικός τομέας αποτελεί αντικείμενο απάτης όσον αφορά το γάλα και τα τυροκομικά προϊόντα, σχετικά με το είδος προέλευσης. Για παράδειγμα η μεγαλύτερη διαθεσιμότητα και το χαμηλότερο κόστος του αγελαδινού γάλακτος αντί του κατσικίσιου, πρόβειου ή βουβαλίσιο οδηγούν σε δόλιες υποκαταστάσεις στην παραγωγή τυριών. Για να κατανοήσουμε την σημασία αυτών των απατών αξίζει να αναφερθεί ότι στην Ιταλία η προσθήκη αδήλωτου γάλακτος βοοειδών στο γάλα νεροβούβαλου για την παρασκευή τυριού είναι η πιο συχνή απάτη που αναφέρει η Κεντρική Επιθεώρηση Καταπολέμησης της Απάτης του ιταλικού Υπουργείου Αγροτικής και Δασικής Πολιτικής για όλα τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Τα τελευταία χρόνια, περίπου το 13% των τυριών που ελέγχθηκαν αποδείχθηκε ότι περιείχαν αδήλωτο γάλα μη προερχόμενο από νεροβούβαλο (Barcaccia et al., 2015).

3.1 Προϊόντα κρέατος

3.1.1 Προϊόντα κρέατος και DNA Barcoding

Το κρέας υπόκειται συνήθως σε μεγάλες διαδικασίες παραγωγής και αλυσίδες διανομής, γεγονός που απαιτεί κατάλληλα συστήματα ιχνηλασιμότητας. Παθολογίες που σχετίζονται με το κρέας ως τρόφιμο (π.χ. ΣΕΒ, γρίπη των πτηνών) και κακές πρακτικές ορισμένων παραγωγών, έχουν αυξήσει την ευαισθητοποίηση του κοινού σχετικά με την προέλευση και την ποιότητα του κρέατος. Ως εκ τούτου, ο ορισμός των ακριβών και αξιόπιστων μεθόδων για τον προσδιορισμό της σύνθεσης του κρέατος των τροφίμων είναι απαραίτητη, εκτός από τη χρήση των ετικετών, οι οποίες δεν παρέχουν επαρκείς εγγυήσεις για την πραγματική περιεκτικότητα ενός προϊόντος. Αυτές οι νέες μέθοδοι θα πρέπει να προστατεύουν τόσο τους καταναλωτές όσο και τους παραγωγούς από τις απάτες και τα ζώα από την υπερεκμετάλλευση ή το παράνομο εμπόριο. Έτσι, αναπτύχθηκε μια ποικιλία μεθόδων βασισμένων στο DNA (κεφάλαιο 2).

Το 2008 οι Teletchea, Bernillon, Duffraisse, Laudet και Hänni πρότειναν μια μέθοδο βασισμένη σε μικροσυστοιχίες, η οποία κάνει χρήση ανιχνευτών που προέρχονται από το κυτόχρωμα b, ως εργαλείο για τον εντοπισμό εμπορικών και απειλούμενων ειδών σπονδυλωτών τόσο σε τρόφιμα όσο και σε εγκληματολογικά δείγματα κρέατος. Η περιοχή του κυτοχρώματος b παρουσιάζει μεγάλη διαειδική και χαμηλή ενδοειδική ποικιλομορφία, καθώς και συντηρημένες πλευρικές περιοχές, ως εκ τούτου, αποτελεί τυπική υποψήφια περιοχή για DNA Barcoding. Η επιλογή του cyt b αντί του *cox1* οφείλεται κυρίως σε πρακτικούς λόγους. Αρκετές χιλιάδες αλληλουχίες του cyt b έχουν κατατεθεί σε δημόσιες βάσεις δεδομένων για ένα μεγάλο φάσμα βρώσιμων ειδών θηλαστικών, ενώ μόνο λίγες αλληλουχίες *cox1* είναι διαθέσιμες στις BOLD και GenBank. Ωστόσο, παρά την έλλειψη δεδομένων, η τεχνική DNA Barcoding με βάση το *cox1* μπορεί να θεωρηθεί ως αξιόπιστη μέθοδος για την ιχνηλασιμότητα του κρέατος θηλαστικών. Ομοίως, όσον αφορά τα προϊόντα κρέατος πτηνών, η DNA Barcoding με βάση το *cox1* είναι αποτελεσματική στην ταυτοποίηση, αλλά η χρήση της στο πλαίσιο της ιχνηλασιμότητας του κρέατος εξακολουθεί να είναι περιορισμένη.

Όπως εφαρμόζεται στην αγορά κρέατος, οι σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών DNA Barcoding και των ονομάτων των ειδών θα πρέπει να αξιολογούνται κριτικά, επειδή η εμπορική ονομασία ενός προϊόντος κρέατος μπορεί να αναφέρεται σε διαφορετικές μοριακές μονάδες (τις λεγόμενες Μοριακές Λειτουργικές Ταξινομικές Μονάδες ή MOTUs). Για παράδειγμα, οι Ludt, Schroeder, Rottmann, and Kuehn το 2004 έδειξαν συστηματικές μοριακές διαφορές εντός του είδους *Cervus elaphus*. Κατά συνέπεια, το ελαφίσιο κρέας πρέπει να ταυτοποιείται με δύο διαφορετικές αλληλουχίες DNA που αντιστοιχούν στο *Cervus canadensis* (που συναντάται στην Ασία και τη Βόρεια Αμερική) και στο *C. elaphus* (που κατοικεί στην Ευρώπη).

Υπάρχουν επίσης αρκετές περιπτώσεις ειδών ή φυλών με το ίδιο προφίλ DNA. Σε αυτή την περίπτωση η προσέγγιση με DNA Barcoding δεν θα είναι σε θέση να πραγματοποιήσει μια σωστή ταυτοποίηση, καθιστώντας έτσι αδύνατο τον εντοπισμό ορισμένων προϊόντων κρέατος. Αυτό το φαινόμενο, λόγω του υβριδισμού, το οποίο παράγει γενετική εσωστρέφεια, είναι σύνηθες στα ζώα. Τα βοοειδή, όπου πολλές φυλές προέρχονται από υβριδισμό, είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα (Galimberti et al., 2013).

Ένας ακόμη παράγοντας που δύναται να προκαλέσει προβλήματα στην ταυτοποίηση, είναι η τυχόν επεξεργασία που μπορεί να έχουν υποστεί τα τρόφιμα και ιδιαιτέρως η βιομηχανική. Το DNA είναι συνήθως πιο ανθεκτικό στις βιομηχανικές διεργασίες σε σχέση με άλλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, και οι μέθοδοι αποτύπωσης δακτυλικού αποτυπώματος DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την ταυτοποίηση ζωικών ή φυτικών προϊόντων, ακόμη και σε ίχνη. Παρ' όλα αυτά, η επεξεργασία τροφίμων προκαλεί χημικές και φυσικές αλλοιώσεις, με την υποβάθμιση και τον κατακερματισμό να είναι οι πιο συνηθισμένες επιπτώσεις. Η ακεραιότητα του DNA επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αποτελεσματικότητα των μοριακών μεθόδων. Η DNA Barcoding μπορεί να έχει δύο πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις προσεγγίσεις αποτύπωσης δακτυλικού αποτυπώματος DNA: i) απαιτεί τον πολλαπλασιασμό ενός μικρού τμήματος DNA (συνεπώς υπάρχει μικρότερη πιθανότητα κατακερματισμού), και ii) βασίζεται σε μιτοχονδριακό ή πλασμιδικό γονιδίωμα (διατηρείται περισσότερο κατά την επεξεργασία). Το πυρηνικό DNA διατηρείται λιγότερο από το μιτοχονδριακό σε μαγειρεμένο κρέας (Aslan et al., 2009). Η ανάλυση των διαφόρων περιοχών του mtDNA μπορεί να είναι αποτελεσματική στην ταυτοποίηση του κρέατος βοοειδών, προβάτων και χοίρων ακόμη και μετά από βρασμό, πίεση, μαγείρεμα ή τηγάνισμα (Galimberti et al., 2013).

Η DNA Barcoding βασίζεται σε κλασική αλληλούχιση Sanger και στοχεύει σε αρκετά μεγάλα τμήματα DNA, κοντά στα 650 ζεύγη βάσεων (bp). Είναι επομένως δύσκολα εφαρμόσιμη σε επεξεργασμένα προϊόντα όπου το DNA μπορεί να αποικοδομηθεί και να κοπεί σε μικρά θραύσματα κάτω των 200 bp. Επιπλέον, η αλληλούχιση μείγματος κατά Sanger οδηγεί σε αλληλουχίες που επικαλύπτονται και σε μη αξιόπιστα χρωματογράμματα. Επομένως, η DNA Barcoding εφαρμόζεται σε καθαρά κομμάτια κρέατος μόνο.

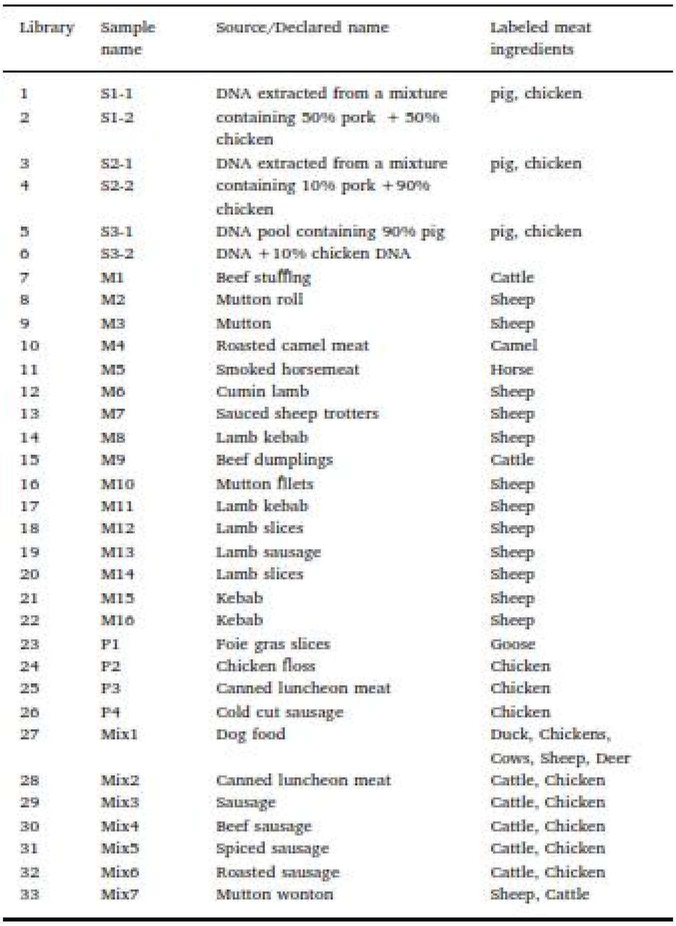
Η εξέλιξη της αλληλούχισης Sanger στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) επέτρεψε τη μαζική ταυτόχρονη αλληλούχιση μεμονωμένων αμπλικονίων στην ίδια δοκιμή. Η DNA Barcoding εξελίχθηκε σε DNA metabarcoding, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μίγματα και επεξεργασμένα δείγματα. Η NGS γίνεται όλο και πιο δημοφιλής για τον έλεγχο της γνησιότητας των τροφίμων και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την εφαρμογή της για τα θαλασσινά, τα μπαχαρικά, τα βότανα και την ταυτοποίηση ειδών κρέατος. Ωστόσο, απροσδόκητες ξένες αλληλουχίες DNA και λανθασμένη ταυτοποίηση έχουν αναφερθεί σε αρκετά άρθρα, αποδεικνύοντας ότι καλές εργαστηριακές πρακτικές, επιμελημένες βάσεις δεδομένων και εργαλεία αξιόπιστης ερμηνείας των δεδομένων πρέπει να εφαρμόζονται ή να αναπτύσσονται (Cottenet et al., 2020).

3.1.2 Ταυτοποίηση με χρήση αλληλούχισης επόμενης γενιάς

Το 2019 οι Ran-Ran Xing et al., πραγματοποίησαν μια έρευνα στην οποία μελέτησαν την ικανότητα του DNA metabarcoding με βάση την αλληλούχιση επόμενης γενιάς να ταυτοποιεί τα ζωικά είδη σε προϊόντα κρέατος και πουλερικών. Για τη δοκιμή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν αποτελέσματα αλληλούχισης υψηλής απόδοσης από δύο βιβλιοθήκες που ελήφθησαν από έξι παρασκευασμένα μείγματα. Στη συνέχεια, μια έρευνα αγοράς για τον προσδιορισμό των ζωικών ειδών σε 27 εμπορικά προϊόντα κρέατος και πουλερικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της αναπτυχθείσας μεθόδου DNA metabarcoding.

Αρχικά, οι ερευνητές αγόρασαν μυϊκό ιστό χοίρου (*Sus scrofa*) και κοτόπουλου (*Gallus gallus*). Η γνησιότητα των δειγμάτων επαληθεύτηκε με την αλληλούχιση Sanger ενός μιτοχονδριακού γονιδίου 16S ριβοσωμικού RNA (16S rRNA). Έπειτα, αγόρασαν είκοσι επτά (27) εμπορικά προϊόντα που αντιπροσωπεύουν μια ποικιλία ειδών θηλαστικών και πτηνών από τις κινεζικές αγορές. Μεταξύ αυτών, δεκαέξι δείγματα ανέφεραν ένα μόνο είδος θηλαστικού, τέσσερα δείγματα ανέφεραν ένα μόνο είδος πτηνού και επτά δείγματα ανέφεραν περισσότερα από ένα είδη θηλαστικών και πτηνών. Οι ερευνητές κατέγραψαν πληροφορίες όπως το δηλωμένο όνομα και τα αναγραφόμενα συστατικά κρέατος και πουλερικών των προϊόντων.

<u>Πίνακας 1</u>: Κατάλογος των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η βιβλιοθήκη 1-6 είναι τα παρασκευασμένα μικτά δείγματα. Η βιβλιοθήκη 7-33 είναι εμπορικά δείγματα κρέατος και πουλερικών.

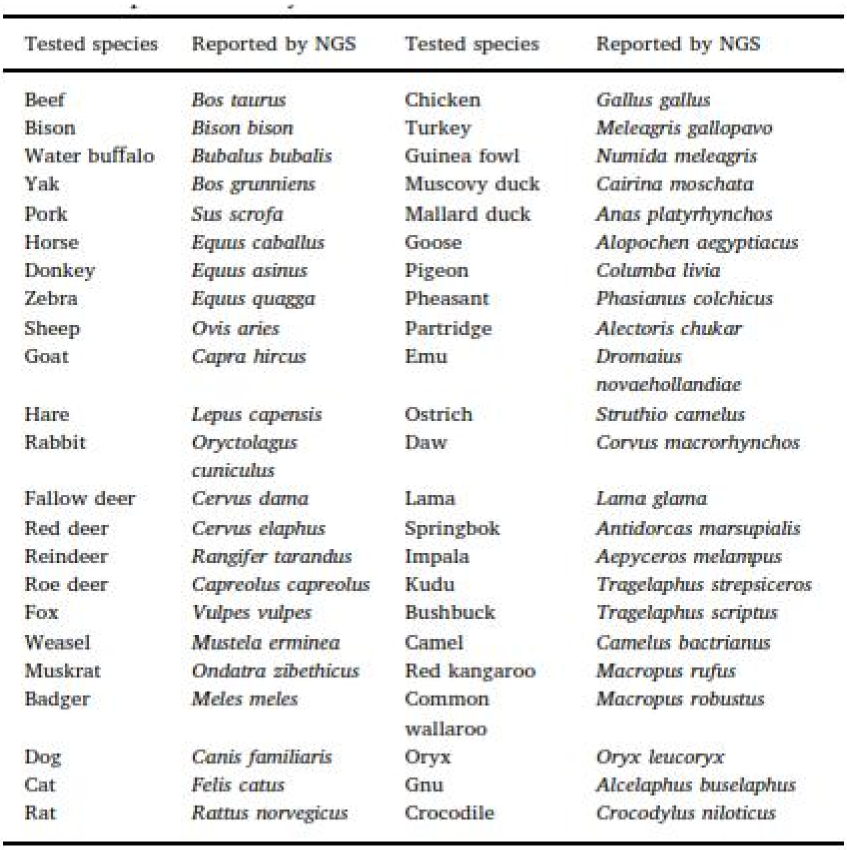


Library	Sample name	Source/Declared name	Labeled meat ingredients
1	S1-1	DNA extracted from a mixture containing 50% pork + 50% chicken	pig, chicken
2	S1-2		
3	S2-1	DNA extracted from a mixture containing 10% pork + 90% chicken	pig, chicken
4	S2-2		
5	S3-1	DNA pool containing 90% pig DNA + 10% chicken DNA	pig, chicken
6	S3-2		
7	M1	Beef stuffing	Cattle
8	M2	Mutton roll	Sheep
9	M3	Mutton	Sheep
10	M4	Roasted camel meat	Camel
11	M5	Smoked horsemeat	Horse
12	M6	Cumin lamb	Sheep
13	M7	Sauced sheep trotters	Sheep
14	M8	Lamb kebab	Sheep
15	M9	Beef dumplings	Cattle
16	M10	Mutton fillets	Sheep
17	M11	Lamb kebab	Sheep
18	M12	Lamb slices	Sheep
19	M13	Lamb sausage	Sheep
20	M14	Lamb slices	Sheep
21	M15	Kebab	Sheep
22	M16	Kebab	Sheep
23	P1	Foie gras slices	Goose
24	P2	Chicken floss	Chicken
25	P3	Canned luncheon meat	Chicken
26	P4	Cold cut sausage	Chicken
27	Mix1	Dog food	Duck, Chickens, Cows, Sheep, Deer
28	Mix2	Canned luncheon meat	Cattle, Chicken
29	Mix3	Sausage	Cattle, Chicken
30	Mix4	Beef sausage	Cattle, Chicken
31	Mix5	Spiced sausage	Cattle, Chicken
32	Mix6	Roasted sausage	Cattle, Chicken
33	Mix7	Mutton wonton	Sheep, Cattle

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι 18 από τα 27 δείγματα (το 67%) ήταν λανθασμένα επισημασμένα ή πιθανώς λανθασμένα επισημασμένα. Για παράδειγμα, στο δείγμα M1 (γεμιστό βοδινό), βρέθηκαν τέσσερα είδη: βοδινό (*Bos taurus*), κοτόπουλο (*Gallus gallus*), άγριο γιακ (*Bos mutus*) και πρόβατο (*Ovis aries*), με το βοδινό να είναι το κυρίως είδος (76,93% των συνολικών αναγνώσεων). Επίσης, δύο από τα δείγματα περιείχαν εντελώς διαφορετικά είδη από τα αναγραφόμενα, όπως το δείγμα M4 (ψητό κρέας καμήλας) το οποίο αποτελούνταν από βοδινό (*Bos taurus*) 90,35% και πρόβατο (*Ovis aries*) 9,29%. Και τα 9 σωστά επισημασμένα προϊόντα ήταν φρέσκα ή κατεψυγμένα. Αντιθέτως, τα περισσότερα από τα δείγματα με λανθασμένη επισήμανση ήταν προϊόντα κρέατος και πουλερικών υψηλής επεξεργασίας, τα οποία ήταν πιο πιθανό να αποτελέσουν στόχο σκόπιμης νοθείας. Οι τύποι των προϊόντων θα μπορούσαν να είναι ένας πιθανός λόγος για την διαφορά σε αυτά τα ποσοστά νοθείας. Η κύρια αιτία των υψηλών ποσοστών εσφαλμένης επισήμανσης σε αυτή τη μελέτη ήταν πιθανότατα λόγω της υψηλής επεξεργασίας ή/και της υψηλής αξίας των υπό εξέταση προϊόντων, για τα οποία υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα σκόπιμης νοθείας. Επιπλέον, η υψηλή ευαισθησία του DNA metabarcoding διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση της ακούσιας νοθείας. Ακόμη, αξίζει να αναφερθεί ότι σε ορισμένα δείγματα ταυτοποιήθηκε σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) και τόνος (*Thunnus tonggol*), τα οποία είδη δεν ήταν αναμενόμενο να βρίσκονται στα συγκεκριμένα προϊόντα. Για παράδειγμα, στο δείγμα P3 (κονσερβοποιημένο κρέας) ανιχνεύτηκαν: τόνος (44,75% των αναγνώσεων), κοτόπουλο (14,87% των αναγνώσεων) και πρόβατο (14,05% των αναγνώσεων), ενώ το προϊόν ήταν επισημασμένο ως κοτόπουλο.

Μια παρόμοια έρευνα διεξήχθη έναν χρόνο μετά. Σε αυτήν, αξιολογήθηκαν οι επιδόσεις του πρώτου εμπορικού NGS Food Authenticity Workflow (Thermo Fisher Scientific) ως μια μη στοχευμένη πλατφόρμα για την ταυτοποίηση των ειδών κρέατος (Cottenet et al., 2020). Για την αξιολόγηση αυτή, κοινά είδη κρέατος συμπεριλήφθηκαν στα πειράματά καθώς και εξωτικά, όταν ήταν διαθέσιμα, αναλύοντας καθαρά δείγματα και μείγματα. Επιπλέον, η αξιοπιστία της ποσοτικοποίησης αξιολογήθηκε με τη χρήση αναγνώσεων NGS που ελήφθησαν ανά είδος. Επιπροσθέτως, 45 δείγματα προερχόμενα από την ευρωπαϊκή (30) και την ασιατική (15) αγορά αναλύθηκαν με το παρόν εργαλείο NGS, προκειμένου να ληφθεί μια εικόνα της νοθείας σε δείγματα αλεσμένου κρέατος. Τα δείγματα δηλώνανε ότι προέρχονται από ένα μόνο είδος κρέατος: βόειο κρέας, κοτόπουλο, χοιρινό, αρνί, πάπια και 2 δείγματα από κρέας πουλερικών.

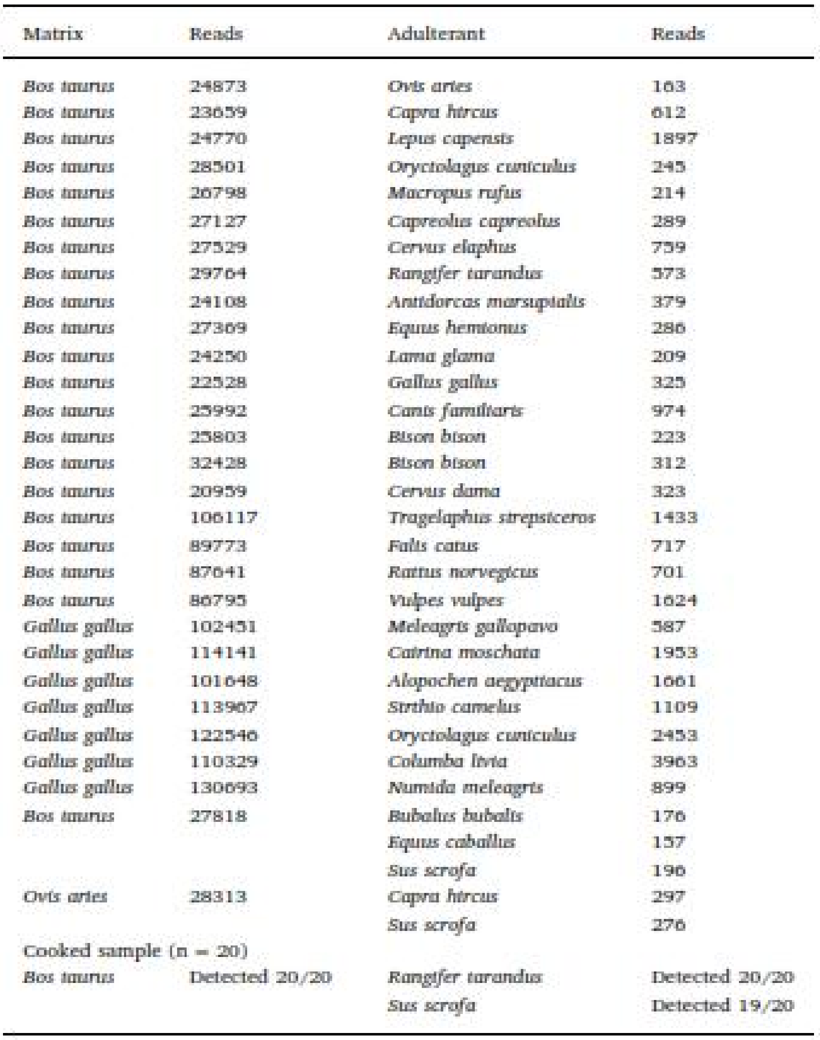
Πίνακας 2: Καθαρά είδη κρέατος που ελέγχθηκαν με NGS.



Tested species	Reported by NGS	Tested species	Reported by NGS
Beef	*Bos taurus*	Chicken	*Gallus gallus*
Bison	*Bison bison*	Turkey	*Meleagris gallopavo*
Water buffalo	*Bubalus bubalis*	Guinea fowl	*Numida meleagris*
Yak	*Bos grunniens*	Muscovy duck	*Cairina moschata*
Pork	*Sus scrofa*	Mallard duck	*Anas platyrhynchos*
Horse	*Equus caballus*	Goose	*Alopochen aegyptiacus*
Donkey	*Equus asinus*	Pigeon	*Columba livia*
Zebra	*Equus quagga*	Pheasant	*Phasianus colchicus*
Sheep	*Ovis aries*	Partridge	*Alectoris chukar*
Goat	*Capra hircus*	Emu	*Dromaius novaehollandiae*
Hare	*Lepus capensis*	Ostrich	*Struthio camelus*
Rabbit	*Oryctolagus cuniculus*	Daw	*Corvus macrorhynchos*
Fallow deer	*Cervus dama*	Lama	*Lama glama*
Red deer	*Cervus elaphus*	Springbok	*Antidorcas marsupialis*
Reindeer	*Rangifer tarandus*	Impala	*Aepyceros melampus*
Roe deer	*Capreolus capreolus*	Kudu	*Tragelaphus strepsiceros*
Fox	*Vulpes vulpes*	Bushbuck	*Tragelaphus scriptus*
Weasel	*Mustela erminea*	Camel	*Camelus bactrianus*
Muskrat	*Ondatra zibethicus*	Red kangaroo	*Macropus rufus*
Badger	*Meles meles*	Common wallaroo	*Macropus robustus*
Dog	*Canis familiaris*	Oryx	*Oryx leucoryx*
Cat	*Felis catus*	Gnu	*Alcelaphus buselaphus*
Rat	*Rattus norvegicus*	Crocodile	*Crocodylus niloticus*

Σε όλα αυτά τα καθαρά δείγματα κρέατος ανιχνεύθηκαν μόνο τα αναμενόμενα είδη και δεν αναφέρθηκαν ξένες αλληλουχίες από το λογισμικό.

Πίνακας 3: Ανίχνευση και ταυτοποίηση ειδών κρέατος σε δείγματα εμπλουτισμένα με 1% (w/w).



Matrix	Reads	Adulterant	Reads
Bos taurus	24873	*Ovis aries*	163
Bos taurus	23659	*Capra hircus*	612
Bos taurus	24770	*Lepus capensis*	1897
Bos taurus	28501	*Oryctolagus cuniculus*	245
Bos taurus	26798	*Macropus rufus*	214
Bos taurus	27127	*Capreolus capreolus*	289
Bos taurus	27529	*Cervus elaphus*	759
Bos taurus	29764	*Rangifer tarandus*	573
Bos taurus	24108	*Antidorcas marsupialis*	379
Bos taurus	27369	*Equus hemionus*	286
Bos taurus	24250	*Lama glama*	209
Bos taurus	22528	*Gallus gallus*	325
Bos taurus	25992	*Canis familiaris*	974
Bos taurus	25803	*Bison bison*	223
Bos taurus	32428	*Bison bison*	312
Bos taurus	20959	*Cervus dama*	323
Bos taurus	106117	*Tragelaphus strepsiceros*	1433
Bos taurus	89773	*Falis catus*	717
Bos taurus	87641	*Rattus norvegicus*	701
Bos taurus	86795	*Vulpes vulpes*	1624
Gallus gallus	102451	*Meleagris gallopavo*	587
Gallus gallus	114141	*Cairina moschata*	1953
Gallus gallus	101648	*Alopochen aegyptiacus*	1661
Gallus gallus	113967	*Strthio camelus*	1109
Gallus gallus	122546	*Oryctolagus cuniculus*	2453
Gallus gallus	110329	*Columba livia*	3963
Gallus gallus	130693	*Numida meleagris*	899
Bos taurus	27818	*Bubalus bubalis*	176
		Equus caballus	157
		Sus scrofa	196
Ovis aries	28313	*Capra hircus*	297
		Sus scrofa	276
Cooked sample (n = 20)			
Bos taurus	Detected 20/20	*Rangifer tarandus*	Detected 20/20
		Sus scrofa	Detected 19/20

Οι ερευνητές παρασκεύασαν διάφορα μείγματα κρέατος που περιείχαν διάφορες νοθευτικές ουσίες που προστέθηκαν σε ποσοστό 1% (w/w), το οποίο αντιστοιχεί στο ρεαλιστικό κατώτατο όριο που ορίζεται από τη σύσταση της ΕΕ. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αναμείχθηκαν έως και 4 διαφορετικά είδη για την αξιολόγηση της ικανότητας της NGS να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί σωστά διάφορα είδη ταυτόχρονα. Όλα τα εξεταζόμενα δείγματα οδήγησαν στην ορθή ανίχνευση και ταυτοποίηση των διαφορετικών ειδών, συμπεριλαμβανομένου του νοθευμένου είδους, όταν η πρόσμιξη έγινε σε 1% . Τα δείγματα που περιείχαν έως και 4 διαφορετικά είδη οδήγησαν σε επιτυχή ανίχνευση όλων των αναμενόμενων ειδών.

Όσον αφορά τα δείγματα του εμπορίου, 37 βρέθηκαν να συμμορφώνονται με τα δηλωθέντα είδη, ενώ 8 βρέθηκαν να περιέχουν μη δηλωμένα είδη σε επίπεδο άνω του 1% (w/w). Μεταξύ αυτών των 8 δειγμάτων, τα 5 ήταν προερχόμενα από την ευρωπαϊκή αγορά και τα 3 από την ασιατική αγορά. Κατσικίσιο κρέας (*Capra aegagrus hircus)* ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα αρνιού, ενώ 30% κοτόπουλου ανιχνεύθηκε σε ένα από τα δείγματα. Δύο δείγματα πουλερικών βρέθηκαν να περιέχουν υψηλά επίπεδο χοιρινού κρέατος (>20%), ενώ ένα από αυτά περιείχε επίσης 15% μοσχαρίσιο κρέας. Αν και είναι γνωστό ότι είναι επιρρεπείς στη νοθεία, η πλειονότητα των προϊόντων με βάση το βόειο κρέας ήταν σύμφωνα με την ετικέτα, εκτός από δύο δείγματα που περιείχαν 3% και 5% κοτόπουλο. Τέλος, εντοπίστηκε 10% χοιρινό σε ένα δείγμα με βάση το κοτόπουλο.

3.1.3 Εύρεση νοθείας με χρήση Multiplex PCR

Το βουβαλίσιο κρέας έχει πολλά οφέλη, όπως υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και χοληστερόλη, καθώς και λιγότερες θερμίδες από το βοδινό κρέας. Έτσι, θεωρείται ως ένα υγιεινό προϊόν για τα καλά διατροφικά του χαρακτηριστικά. Όσον αφορά τον πληθυσμό και την παραγωγή βουβαλιών, η Κίνα είναι σημαντική χώρα με τον τρίτο μεγαλύτερο πληθυσμό στον κόσμο. Το κρέας βουβαλιού έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλές και έχει τεράστια οικονομική σημασία λόγω της αυξανόμενης ζήτησης, ιδίως στην κεντρική και νότια Κίνα. Η τιμή του βουβαλίσιου κρέατος είναι σημαντικά υψηλότερη από το βόειο κρέας, το πρόβειο κρέας και τα άλλα κρέατα οικόσιτων ζώων.

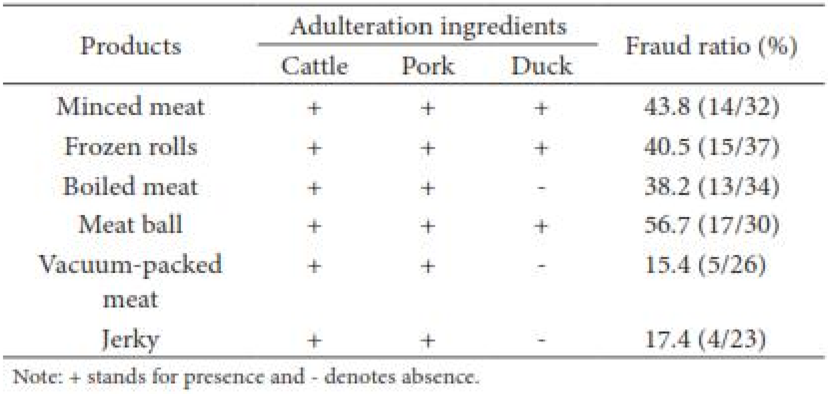
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι Lanping Wang, Xinru Hang και Rongqing Geng δοκίμασαν το 2018 να διεξάγουν μια Multiplex PCR για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση διαφορετικών συστατικών κρέατος χρησιμοποιώντας το μιτοχονδριακό γονίδιο COI (οξειδάση του κυτοχρώματος I). Το πείραμα σχεδιάστηκε για να καθιερωθεί μια PCR υψηλής εξειδίκευσης για τα είδη για την ταυτοποίηση της νοθείας κρέατος βουβαλιού σε ακατέργαστα, θερμικά επεξεργασμένα και εμπορικά δείγματα κρέατος. Οι στόχοι ήταν να προσδιοριστούν οι τρέχουσες καταστάσεις της υποκατάστασης του κρέατος στο βουβαλίσιο κρέας και τα προϊόντα κρέατος, εκούσιες ή ακούσιες, και να παράσχει έναν αποτελεσματικό τρόπο για τις υπηρεσίες επιβολής του νόμου να παρακολουθούν τη νοθεία.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν καθαρά δείγματα κρέατος συμπεριλαμβανομένων βουβαλίσιου (*Bubalus bubalis*), βοοειδούς (*Bos taurus* και *Bos indicus*), χοίρου (*Sus scrofa domesticus*) και πάπιας (*Anas platyrhynchos*) από τοπικά σφαγεία. Αυτά τα δείγματα κρέατος από διαφορετικά είδη ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο PCR με τη χρήση τεσσάρων ζευγών εκκινητών του μιτοχονδριακού γονιδίου COI και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκαν με άμεση αλληλούχιση.

Εκατόν ογδόντα δύο δείγματα τροφίμων, μεταξύ των οποίων κιμάς (n=32), κατεψυγμένα ρολά (n=37), βραστό κρέας (n=34), κεφτεδάκια (n=30), κρέας συσκευασμένο σε κενό αέρος (n=26) και αποξηραμένο κρέας (n=23) συλλέχθηκαν από λιανοπωλητές και αγορές σε διάφορες επαρχίες της Κίνας. Τα τρόφιμα αυτά αντιπροσώπευαν έξι κυρίως τύπους ακατέργαστων και μεταποιημένων προϊόντων βουβαλίσιου κρέατος στις τοπικές αγορές.

Τα αποτελέσματα έδειξαν νοθεία σε όλους τους τύπους προϊόντων, όπως κιμά, κατεψυγμένα ρολά, βραστό κρέας, κεφτεδάκια, συσκευασμένα σε κενό αέρος και αποξηραμένα κρέατα (πίνακας 4). Ο υψηλότερος βαθμός νοθείας (56,7%) βρέθηκε στα κεφτεδάκια και ο μικρότερος (15,4%) βρέθηκε στο κρέας σε συσκευασία κενού. Το μέσο ποσοστό νοθείας ήταν πάνω από 35% (35,3%).

Πίνακας 4: Δείγματα εμπορικών προϊόντων κρέατος βουβαλιού που αναλύθηκαν για γνησιότητα.



Products	Adulteration ingredients			Fraud ratio (%)
	Cattle	Pork	Duck	
Minced meat	+	+	+	43.8 (14/32)
Frozen rolls	+	+	+	40.5 (15/37)
Boiled meat	+	+	-	38.2 (13/34)
Meat ball	+	+	+	56.7 (17/30)
Vacuum-packed meat	+	+	-	15.4 (5/26)
Jerky	+	+	-	17.4 (4/23)

Note: + stands for presence and - denotes absence.

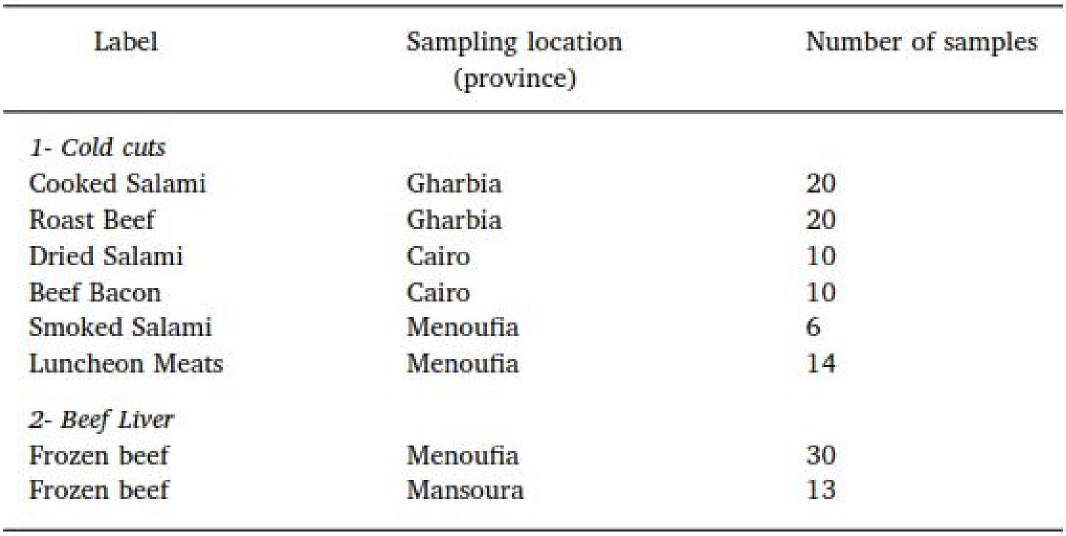
Την Multiplex PCR σε συνδυασμό με αλληλούχιση του γονιδίου 12S rRNA για τον εντοπισμό νοθείας σε κρέας, χρησιμοποίησε και ο ερευνητής Asmaa Galal-Khallaf του πανεπιστημίου της Menoufia της Αιγύπτου το 2021. Στην Αίγυπτο, τα προϊόντα κρέατος είναι από τα πιο δημοφιλή και ευρέως καταναλώσιμα τρόφιμα. Ειδικότερα, η εγχώρια κατανάλωση βοείου κρέατος ανήλθε σε 713.000 MT το 2019, αυξημένη κατά 28.000 MT σε σχέση με το 2018 παρόλο που η πλειονότητα των Αιγυπτίων είναι καταναλωτές χαμηλού εισοδήματος. Επιπλέον, οι Αιγύπτιοι προτιμούν να καταναλώνουν βόειο κρέας από άλλα είδη κρέατος (π.χ. πουλερικών), αν και η τιμή του είναι υψηλή σε σύγκριση με το κοτόπουλο. Έτσι, η συχνότητα της νοθείας του κρέατος έχει γίνει κατανοητή λόγω της αύξησης της τιμής των κρεάτων που διατίθενται στο εμπόριο και τη βαριά επεξεργασία που υφίσταται αυτό για την μετατροπή του στα επιθυμητά προϊόντα.

Εκτός από την τιμή, η θρησκεία είναι ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Για παράδειγμα, απαγορεύεται στους μουσουλμάνους να καταναλώνουν χοιρινό κρέας και τα παράγωγά του. Διαφορετικά, ορισμένα επιτρεπόμενα κρέατα δεν είναι επιθυμητά για τους Αιγύπτιους καταναλωτές, όπως το κρέας γαϊδάρου, το οποίο μπορεί να αποκτηθεί χωρίς προσφερόμενες τιμές, και ως εκ τούτου, υπάρχει σημαντική πιθανότητα ανάμειξής τους σε αιγυπτιακά τρόφιμα. Όσον αφορά τις θρησκευτικές απαιτήσεις, τις επιθυμίες και τον τρόπο ζωής των καταναλωτών, η οπτική αναγνώριση των ειδών είναι περίπλοκη, και συνεπώς είναι σημαντικό να αναπτυχθούν αξιόπιστες και ευαίσθητες μεθοδολογίες για την ανίχνευση της αυθεντικότητας των προϊόντων κρέατος, ιδίως όταν λαμβάνονται υπόψη τα μικτά προϊόντα και εκείνα με κρυφά μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Στην συγκεκριμένη έρευνα, ο ερευνητής επικεντρώθηκε στην εφαρμογή εύκολων, σχετικά γρήγορων και φθηνών μεθόδων για την ανίχνευση τόσο της υποκατάστασης ειδών όσο και των θρησκευτικά μη εγκεκριμένων κρεάτων "haram", εκτός από τα μη βρώσιμα είδη κρέατος στα πιο συχνά κατεψυγμένα και μεταποιημένα προϊόντα κόκκινου κρέατος (συκώτι βοδινού κρέατος και αλλαντικά) στις τοπικές Αιγυπτιακές αγορές, αυτά που είναι γνωστά σε χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος Αιγύπτιους καταναλωτές.

Για την έρευνα, σαράντα τρία (43) κατεψυγμένα δείγματα βοδινού συκωτιού αγοράστηκαν από τοπικές αγορές σε δύο αιγυπτιακές επαρχίες: Menoufia και Mansoura. Αυτά τα προϊόντα κρέατος ανήκαν σε τέσσερις διαφορετικές μάρκες. Συλλέχθηκαν δύο συσκευασίες ανά μάρκα από τις οποίες περίπου πέντε αντίγραφα/συσκευασία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, συνολικά 80 δείγματα αλλαντικών που χαρακτηρίζονται ως καπνιστά σαλάμια, αποξηραμένα σαλάμια, μαγειρεμένα σαλάμια, ψητό βοδινό, βοδινό μπέικον και αλλαντικό, που αντιπροσωπεύουν τα κυριότερα εμπορεύσιμα κρέατα συλλέχθηκαν επίσης από τοπικές αγορές σε τρεις αιγυπτιακές πόλεις: Καΐρο, Menoufia και Gharbia. Ακόμα, συλλέχθηκαν δείγματα ωμού βόειου κρέατος, κοτόπουλου, χοιρινού και γαϊδουρίσιου κρέατος για να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες.

Πίνακας 5: Τύπος, αριθμός δειγμάτων και θέσεις δειγματοληψίας των προϊόντων κρέατος που αναλύθηκαν.



Label	Sampling location (province)	Number of samples
1- Cold cuts		
Cooked Salami	Gharbia	20
Roast Beef	Gharbia	20
Dried Salami	Cairo	10
Beef Bacon	Cairo	10
Smoked Salami	Menoufia	6
Luncheon Meats	Menoufia	14
2- Beef Liver		
Frozen beef	Menoufia	30
Frozen beef	Mansoura	13

Για τις τέσσερις μάρκες βοδινού συκωτιού, τα θραύσματα 12S rDNA πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς και οδήγησαν σε προϊόντα PCR μήκους 410 bp. Η ανάλυση BLASTn επέτρεψε σαφή ταυτοποίηση των ειδών όλων των δειγμάτων ήπατος βοδινού που αναλύθηκαν. Όλες οι αλληλουχίες 12S rDNA παρουσίασαν 99-100% ταύτιση με τα είδη *Bos taurus*

Ωστόσο, ενώ τα θραύσματα 12S rDNA των δειγμάτων αλλαντικών πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς, οι αλληλουχίες τους ήταν ανακριβείς με επικαλυπτόμενες κορυφές. Αυτές οι αλληλουχίες δεν ταίριαξαν με >98% της νουκλεοτιδικής ταυτότητας από την GenBank. Ως αποτέλεσμα, ήταν δύσκολο να ταυτοποιηθεί το κρέας των δειγμάτων αλλαντικών ανάλογα με την αλληλούχιση του 12S rDNA. Κατά συνέπεια, χρησιμοποιήθηκε Multiplex PCR με εκκινητές ειδικούς για τα είδη για τη διάκριση αυτών των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα προϊόντα περιείχαν μόνο halal κρέας. Αν και όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν (100%), παρείχαν θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την παρουσία του δηλωθέντος τύπου "βόειο κρέας", 50 από τα 80 (62,5%) περιείχαν επίσης υπολείμματα πουλερικών που δεν είχαν δηλωθεί στις ετικέτες. Επιπλέον, η μελέτη αυτή έδειξε ότι κανένα από τα προϊόντα δεν περιείχε προσμίξεις από χοίρους ή γαϊδούρια. Σε αντίθεση με τις δηλωθέντες πληροφορίες, το 61,6% των δειγμάτων σαλαμιού και το 100% των δειγμάτων αλλαντικών παρουσίασαν παράγωγα πουλερικών εκτός από βοδινό. Τέλος, το 62,5% όλων των εξετασθέντων δειγμάτων παρουσίασε νοθεία βοείου κρέατος με πουλερικά, το οποίο προφανώς υποδήλωνε δόλια αντικατάσταση του δηλωθέντος είδους.

3.1.4 Εύρεση νοθείας με χρήση HRM

Όταν αναφερόμαστε στην απάτη τροφίμων, συνήθως σκεφτόμαστε την οικονομική εξαπάτηση των καταναλωτών ή τις συνέπειες που μπορεί να έχει στην υγεία ορισμένων ομάδων ανθρώπων. Όμως, όπως είδαμε παραπάνω (υποενότητα 3.1.3) οι θρησκευτικές πεποιθήσεις των καταναλωτών διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις διατροφικές τους συνήθειες. Ως αποτέλεσμα, καθίσταται αναγκαία η ιχνηλασιμότητα και ο εντοπισμός της νοθείας στα προϊόντα τροφίμων για την προστασία των εν λόγω καταναλωτών. Τέτοιου είδους τρόφιμα είναι τα προϊόντα halal, για τα οποία έγινε αναφορά και στην προηγούμενη υποενότητα.

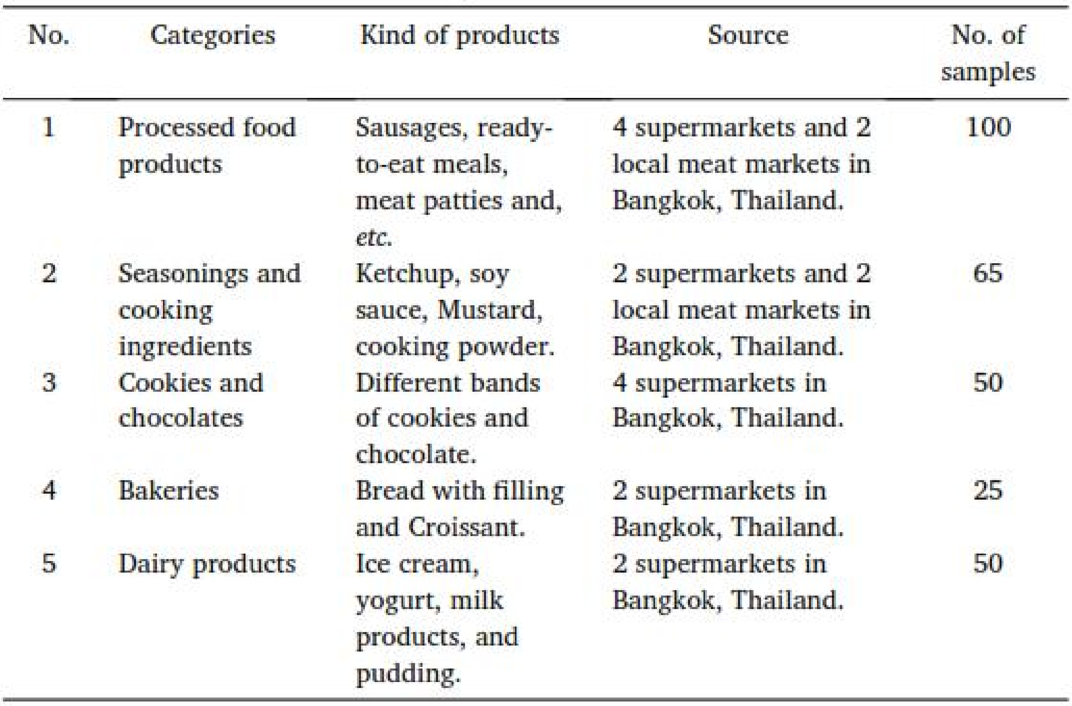
"Halal" είναι ένας αραβικός όρος που σημαίνει επιτρεπτό ή νόμιμο σύμφωνα με ισλαμικούς κανονισμούς. Ως εκ τούτου, το halal φαγητό είναι το φαγητό χωρίς καμία μόλυνση με συστατικό που αντιβαίνει τις ισλαμικές διατάξεις και είναι επιτρεπτό για τους μουσουλμάνους καταναλωτές. Το Ισλάμ είναι μια από τις μεγαλύτερες και ταχύτερα αναπτυσσόμενες θρησκείες. Υπάρχουν περίπου 1,9 δισεκατομμύρια μουσουλμάνοι παγκοσμίως, καθιστώντας το Ισλάμ τη δεύτερη μεγαλύτερη θρησκεία στον κόσμο. Η αύξηση του μουσουλμανικού πληθυσμού έχει ως αποτέλεσμα τη ζήτηση για halal τρόφιμα. Μη περιοριζόμενα μόνο στους μουσουλμάνους καταναλωτές, τα τρόφιμα halal παράγονται με μεθόδους που συμμορφώνονται με υψηλά πρότυπα παραγωγής και ασφάλειας για τους γενικούς καταναλωτές.

Η Ταϊλάνδη έχει υψηλό δυναμικό για την παραγωγή τροφίμων για την εξυπηρέτηση της παγκόσμιας αγοράς και στοχεύει να αυξήσει το μερίδιό της στην αγορά τροφίμων halal. Ωστόσο, ένα σημαντικό πρόβλημα στην παραγωγή τροφίμων είναι η μόλυνση ή/και νοθεία με μη halal υλικά, ιδίως με μη halal κρέατα. Για παράδειγμα, halal προϊόντα μπορούν να μολυνθούν με συστατικά που προέρχονται από χοίρους. Πολλοί παραγωγοί παράγουν διαφορετικές ποικιλίες τροφίμων εντός της ίδιας εγκατάστασης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε τυχαία μόλυνση των τροφίμων halal με μη halal υλικά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι κατασκευαστές μειώνουν το κόστος παραγωγής τους νοθεύοντας προϊόντα κρέατος χρησιμοποιώντας φθηνότερο κρέας, όπως χοιρινό, κοτόπουλο, κρέας αλόγου, αρουραίου και σκύλου σε μοσχαρίσια προϊόντα.

Η ανάπτυξη τεχνικών με υψηλό δυναμικό για την ανίχνευση μολυσματικών ουσιών, ιδίως του μη νόμιμου κρέατος, είναι μεγάλης σημασίας για να διασφαλιστεί ότι οι μουσουλμάνοι και οι γενικοί καταναλωτές έχουν εμπιστοσύνη στις αναγραφές της ετικέτας του προϊόντος και για την προστασία των δικαιωμάτων των καταναλωτών σύμφωνα με τον νόμο περί προστασίας των καταναλωτών B.E. 1998 που εκδόθηκε από το Υπουργείο Δημόσιας Υγείας της Ταϊλάνδης. Έτσι, οι Denyingyhot et al. (2021) πραγματοποίησαν μια μελέτη για τη χρήση HRM για τον έλεγχο επιμόλυνσης σε halal προϊόντα στην Ταϊλανδή. Η HRM είναι μια μέθοδος PCR κατά την οποία το δίκλωνο DNA (dsDNA) μετουσιώνεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η HRM ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό με PCR μιας περιοχής ενδιαφέροντος παρουσία κορεσμένης συγκέντρωσης φθορίζουσας χρωστικής που δεσμεύει DNA. Ο πολλαπλασιασμός ακολουθείται από HRM με τη χρήση οργάνου που μπορεί να συλλάβει μεγάλο αριθμό δεδομένων για τη μεταβολή του φθορισμού με την αύξηση της θερμοκρασίας. Όταν το dsDNA διαχωρίζεται σε μεμονωμένες αλυσίδες, η χρωστική απελευθερώνεται, προκαλώντας μείωση του φθορισμού. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός προφίλ τήξης, χαρακτηριστικό του αμπλικονίου. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο άγνωστων παραλλαγών αλληλουχίας χωρίς διαδικασία αλληλούχισης.

Για τη διεξαγωγή της μελέτης, οι ερευνητές συνέλεξαν κρέας και αίμα από έξι μη halal ζώα, τα οποία χρησιμοποίησαν σαν είδη-στόχους. Αυτά ήταν: γαϊδούρι (*Equus asinus*), γάτα (*Felis catus*), χοίρος (*Sus scrofa*), αρουραίος (*Rattus argentiventer*), σκύλος (*Canis lupus familiaris*) και πίθηκος (*Macaca fascicularis*). Επίσης, συνέλεξαν κρέας και αίμα από τέσσερα halal ζώα: κοτόπουλο (*Gallus gallus*), πρόβατο (*Ovis aries*), άλογο (*Equus caballus*) και κατσίκα (*Capra aegagrus*). Συνολικά, συλλέχθηκαν 260 δείγματα τροφίμων από 180 μάρκες από 4 σούπερ μάρκετ και 2 τοπικές αγορές κρέατος της Μπανγκόκ, στην Ταϊλάνδη.

Πίνακας 6: Πληροφορίες για τα δείγματα τροφίμων που συλλέχθηκαν.



No.	Categories	Kind of products	Source	No. of samples
1	Processed food products	Sausages, ready-to-eat meals, meat patties and, *etc.*	4 supermarkets and 2 local meat markets in Bangkok, Thailand.	100
2	Seasonings and cooking ingredients	Ketchup, soy sauce, Mustard, cooking powder.	2 supermarkets and 2 local meat markets in Bangkok, Thailand.	65
3	Cookies and chocolates	Different bands of cookies and chocolate.	4 supermarkets in Bangkok, Thailand.	50
4	Bakeries	Bread with filling and Croissant.	2 supermarkets in Bangkok, Thailand.	25
5	Dairy products	Ice cream, yogurt, milk products, and pudding.	2 supermarkets in Bangkok, Thailand.	50

DNA από τα παραπάνω τρόφιμα εξήχθη και αναλύθηκε με τη χρήση πολλαπλής HRM και PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση DNA από μη halal ζώα. Δείγματα πιστοποιημένων halal τροφίμων στην παρούσα μελέτη βρέθηκαν αρνητικά για μόλυνση με συστατικό από μη halal ζώα. Ωστόσο, δύο δείγματα τροφίμων, τα τεμαχισμένα προϊόντα κοτόπουλου και η σκόνη καρυκεύματος ζωμού κοτόπουλου, ήταν θετικά για DNA χοίρου. Η πολλαπλή HRM έδειξε τα ίδια αποτελέσματα με εκείνα της PCR πραγματικού χρόνου. Τα δύο θετικά δείγματα προέρχονταν από μη πιστοποιημένα halal τρόφιμα. Τα προϊόντα τεμαχισμένου κοτόπουλου είναι δημοφιλή μεταξύ των μουσουλμάνων καταναλωτών για χρήση ως συστατικό στην αρτοποιεία και για αλμυρά επιδόρπια. Με περαιτέρω έρευνα, διαπιστώθηκε ότι η εταιρεία που παρήγαγε το τεμαχισμένο κοτόπουλο παρήγαγε επίσης προϊόντα τεμαχισμένου χοιρινού κρέατος. Το τεμαχισμένο κοτόπουλο μπορεί να παραγόταν στην ίδια γραμμή παραγωγής με το τεμαχισμένο χοιρινό κρέας, με αποτέλεσμα τη διασταυρούμενη επιμόλυνση. Για τη σκόνη καρυκεύματος ζωμού κοτόπουλου, η ετικέτα στη συσκευασία ανέφερε ότι το προϊόν περιείχε σκόνη χοιρινού κρέατος. Ωστόσο, οι μουσουλμάνοι καταναλωτές θα μπορούσαν να παραπλανηθούν από το προϊόν που αναφέρεται στην ετικέτα της συσκευασίας να έχει γεύση κοτόπουλου και όχι γεύση χοιρινού. Κανένα από τα εμπορικά προϊόντα τροφίμων δεν μολύνθηκε με συστατικά από τα άλλα πέντε μη halal ζωικά είδη.

3.2 Προϊόντα θαλασσινών

Ο όρος "θαλασσινά" χρησιμοποιείται συνήθως για να δηλώσει τις βρώσιμες υδρόβιες μορφές ζωής, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, των μαλακίων, των καρκινοειδών και των εχινόδερμων, τα οποία διατίθενται στην αγορά ως ολόκληροι οργανισμοί ή ως επεξεργασμένα προϊόντα. Τα είδη θαλασσινών γενικά αναγνωρίζονται ανάλογα με την περιοχή προέλευσης τους και με διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, η αυξημένη ζήτηση των θαλασσινών και η παγκοσμιοποίηση της αγοράς, έχουν κάνει τον έλεγχο τόσο των εμπορικών οδών όσο και των συστημάτων βιομηχανικής επεξεργασίας (π.χ. συστήματα αποθήκευσης, κατάψυξης, ξήρανσης) πιο δύσκολο. Επιπλέον, πολλά νέα είδη έχουν εισαχθεί στην αγορά. Ορισμένες φορές, αυτά τα "νέα είδη" έχουν την ίδια εμπορική ονομασία με οργανισμούς που κυκλοφορούσαν προηγουμένως στην αγορά, αλλά δεν αντιστοιχούν στο ίδιο είδος. Θα μπορούσαν επίσης να έχουν διαφορετική θρεπτική αξία, ή/και να είναι δυνητικά αντιγονικοί (Galimberti et al., 2013).

3.2.1 Ταυτοποίηση προϊόντων θαλασσινών με χρήση DNA Barcoding

Αρκετοί ερευνητές έχουν συζητήσει τις δυνατότητες της DNA Barcoding ως εργαλείο για την ιχνηλασιμότητα των βρώσιμων ιχθυηρών. Η περιοχή *cox1* έδειξε καλή διακριτική ικανότητα στην ταυτοποίηση των ιχθυηρών. Επιτυχή αποτελέσματα προέκυψαν επίσης ξεκινώντας από μικρή ποσότητα νωπού ή επεξεργασμένου υλικού με τη χρήση συνδυασμών λίγων καθολικών εκκινητών.

Η DNA Barcoding είναι επιτυχής όταν εφαρμόζεται στα θαλασσινά επειδή:

(1) Σε σύγκριση με άλλες ζωικές πηγές (π.χ. βοοειδή, πρόβατα, κατσίκες, άλογα) ο αριθμός των ειδών είναι μεγαλύτερος, έτσι ώστε η αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυξάνεται.

(2) Οι κλασικές προσεγγίσεις ταυτοποίησης δεν είναι χρήσιμες σε πολλές περιπτώσεις, ιδίως με τα επεξεργασμένα τρόφιμα.

(3) Στα θαλασσινά περισσότερο από ότι σε άλλες ομάδες ζώντων οργανισμών, η μοριακή ταυτοποίηση μπορεί να υπερβεί το επίπεδο του είδους, επιτρέποντας σε αρκετές περιπτώσεις την ταυτοποίηση τοπικών ειδών και, ως εκ τούτου, τον προσδιορισμό της προέλευσης ενός συγκεκριμένου προϊόντος.

Το FISH-BOL (Fish Barcode of Life Initiative) σχεδιάστηκε το 2004 και περιλαμβάνει εκατοντάδες ερευνητές, με στόχο την απόκτηση αρχείων αναφοράς DNA barcode για όλα τα είδη ψαριών στον κόσμο. Τα δεδομένα του FISH-BOL είναι διαθέσιμα με τη μορφή ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων, η οποία περιέχει αλληλουχίες DNA barcode (οι περισσότερες από τις οποίες είναι ελεύθερα διαθέσιμες), εικόνες των δειγμάτων αναφοράς, καθώς και διάφορες λεπτομέρειες δειγματοληψίας. Τα δεδομένα του FISH-BOL κατατίθενται επίσης και οργανώνονται στο σύστημα BOLD (Barcode Of Life Data).

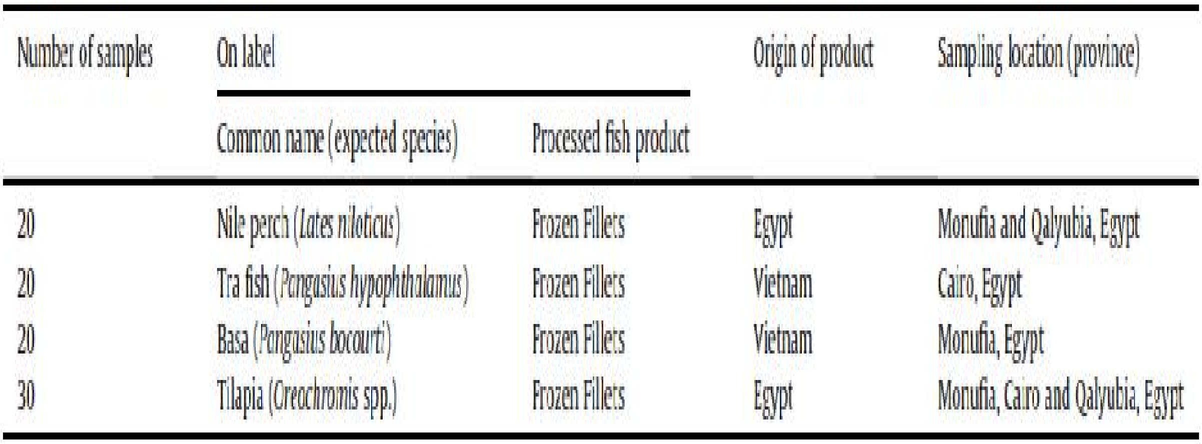
Η DNA Barcoding αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματική στον εντοπισμό των θαλασσινών μετά από βιομηχανική επεξεργασία. Ορισμένα είδη απαιτούν μόνο πρωτογενή επεξεργασία, όπως η κατάψυξη των φρέσκων ψαριών για τη διανομή τους σε λιανοπωλητές και καταστήματα εστίασης, διατηρώντας έτσι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που είναι χρήσιμα για την ακριβή ταυτοποίηση. Ωστόσο, όταν απαιτείται σύνθετη διαδικασία παρασκευής (π.χ. ψύξη, κατάψυξη και κονσερβοποίηση προϊόντων για το λιανικό εμπόριο και την εστίαση) ή στην περίπτωση ψαριών που πωλούνται σε μέρη (π.χ. σουρίμι, ψαροκροκέτες και πτερύγια), οι κλασικές διαδικασίες ταυτοποίησης δεν είναι αποτελεσματικές και η DNA Barcoding μπορεί να είναι χρήσιμη.

Η DNA Barcoding προτάθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για την πιστοποίηση της γνησιότητας των εμπορικών προϊόντων με βάση τα ψάρια. Συγκεκριμένα, ο FDA σχεδίαζε να συμπεριλάβει δεδομένα DNA barcode στη ρυθμιστική εγκυκλοπαίδεια ψαριών (Regulatory Fish Encyclopedia), προκειμένου να βοηθήσει στη διερεύνηση της λανθασμένης επισήμανσης ειδών ψαριών (Galimberti et al., 2013).

Μια ακόμα έρευνα για την νοθεία έλαβε χώρα στην Αίγυπτο, αυτή τη φορά με επίκεντρο τα προϊόντα ψαριών, λόγω της μεγάλης διαθεσιμότητάς τους και του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζουν τα ιχθυηρά στην τοπική οικονομία (Galal-Khallaf et al., 2014). Τα κατεψυγμένα φιλέτα ψαριών είναι από τα πιο δημοφιλή προϊόντα. Στην αιγυπτιακή αγορά, ανήκουν κυρίως σε τρία είδη/γένη: Τιλάπια (*Oreochromis spp.*), πέρκα του Νείλου (*Lates niloticus*) και Παγκάσιους (*Pangasius* ή *Pangasionodon spp.*). Η Τιλάπια (Οικογένεια: Cichlidae, Τάξη: Perciformes) είναι η γενική ονομασία τεσσάρων διαφορετικών ειδών που εκτρέφονται στην Αίγυπτο και είναι το είδος που καταναλώνεται περισσότερο από τα ψάρια του γλυκού νερού. Η πέρκα του Νείλου (Οικογένεια: Latidae, Τάξη: Perciformes), όπως και η Τιλάπια, είναι είδος θερμού νερού. Είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλη την αιθιοπική περιοχή της Αφρικής, απαντώμενη συνήθως σε όλες τις μεγάλες λεκάνες απορροής ποταμών συμπεριλαμβανομένων του Νείλου, του Τσαντ, της Σενεγάλης, του Βόλτα και του Ζαΐρ. Είναι το πιο σημαντικό εμπορικό είδος ψαριού στην Ανατολική Αφρική και η υδατοκαλλιέργειά του είναι ιδιαίτερα πολύτιμη και αποτελεί αντικείμενο καινοτομίας. Εξάγεται συνήθως διατηρημένο με απλή ψύξη ή κατεψυγμένο. Τέλος, το Παγκάσιους (Οικογένεια: Pangasiidae, Τάξη: Siluriformes) είναι ένα Βιετναμέζικο γατόψαρο που καλλιεργείται στο Δέλτα του ποταμού Μεκόνγκ. Σχεδόν όλα τα γατόψαρα που εκτρέφονται στο Δέλτα του ποταμού Μεκόνγκ εξάγονται παγκοσμίως σε περισσότερες από 100 χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Αιγύπτου, της Ευρωπαϊκής Ένωσης, των ΗΠΑ και της Ρωσίας.

Στην παρούσα έρευνα, έγινε χρήση DNA Barcoding για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της λανθασμένης επισήμανσης σε εμπορικά ακατέργαστα φιλέτα ψαριού αγορασμένα από την αιγυπτιακή αγορά. Δείγματα ψαριών που χαρακτηρίστηκαν ως πέρκες του Νείλου (*L. niloticus*), Παγκάσιους (*Pangasius* ή *Pangasionodon spp.*) και Τιλάπια (*Oreochromis spp.*) συλλέχθηκαν, μεταξύ Σεπτεμβρίου και Νοεμβρίου 2013, από τοπικές αγορές σε τρεις αιγυπτιακές επαρχίες: Κάιρο, Monufia και Qalyubia. Οι λεπτομέρειες των δειγμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Ονόματα των εταιρειών των προϊόντων δεν αποκαλύπτονται στη μελέτη.

Πίνακας 7: Αριθμός δειγμάτων που ελήφθησαν για κάθε είδος, πληροφορίες που αναγράφονται στην ετικέτα και τοποθεσίες συλλογής.

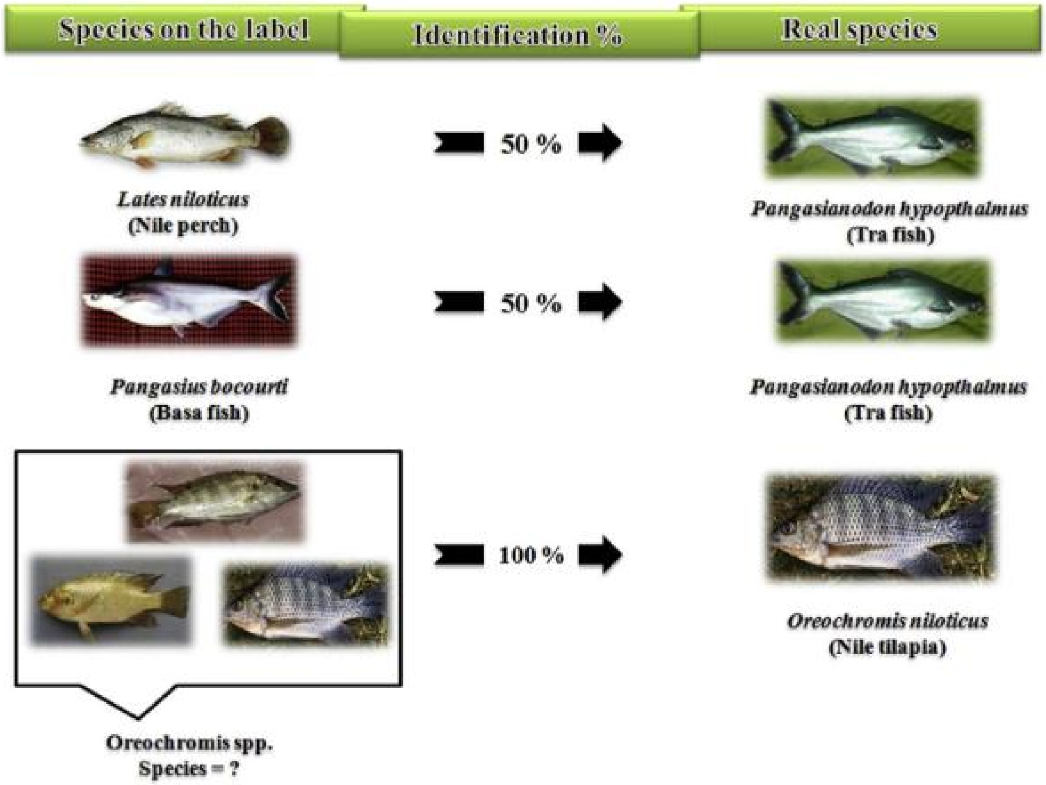


Number of samples	On label		Origin of product	Sampling location (province)
	Common name (expected species)	Processed fish product		
20	Nile perch (*Lates niloticus*)	Frozen Fillets	Egypt	Monufia and Qalyubia, Egypt
20	Tra fish (*Pangasius hypophthalamus*)	Frozen Fillets	Vietnam	Cairo, Egypt
20	Basa (*Pangasius bocourti*)	Frozen Fillets	Vietnam	Monufia, Egypt
30	Tilapia (*Oreochromis* spp.)	Frozen Fillets	Egypt	Monufia, Cairo and Qalyubia, Egypt

Για τις πληροφορίες που αναγράφονταν στις ετικέτες, η πλειονότητα των δειγμάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη (77%) δεν περιλάμβαναν την επιστημονική ονομασία. Όλα ανέφεραν τις κοινές ονομασίες και ως εκ τούτου, ήταν δυνατόν για τους ερευνητές να γνωρίζουν το αναμενόμενο είδος (για την πέρκα του Νείλου και το Παγκάσιους) ή το γένος (για την Τιλάπια) του κάθε φιλέτου.

Όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν με την αλληλούχιση COI, επειδή τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα είδη που εξετάστηκαν παρουσίαζαν μια μοναδική αλληλουχία που διακρίνεται σαφώς από τα υπόλοιπα. Μετά τη σύγκριση με αλληλουχίες αναφοράς από βάσεις δεδομένων (GenBank και BOLD), ένα υψηλό επίπεδο λανθασμένης επισήμανσης εντοπίστηκε στα κατεψυγμένα φιλέτα που αναλύθηκαν (εικόνα 5). Το ταυτοποιημένο είδος δεν ταυτίστηκε με το δηλωθέν στις ετικέτες στο 50% των δειγμάτων πέρκας Νείλου και στο 50% των δειγμάτων Παγκάσιους που αναλύθηκαν, που σημαίνει συνολικά 33,3% λανθασμένη επισήμανση στα αναλυθέντα φιλέτα. Το υποκατάστατο είδος της πέρκας του Νείλου ήταν το ψάρι tra (ιριδίζον καρχαρίας) (*P. hypophthalmus*). Για το Παγκάσιους, το ψάρι Basa (*P. bocourti*) είχε αντικατασταθεί κατά 100% από ψάρι tra (*P. hypophthalmus*). Οι αντικαταστάσεις αυτές, ιδίως για την πέρκα του Νείλου, ήταν πιθανότατα σκόπιμες, επειδή τα είδη είναι μορφολογικά πολύ διαφορετικά (εικόνα 5). Από την άλλη πλευρά, δεν εντοπίστηκαν λανθασμένες επισημάνσεις στα δείγματα Τιλάπιας, δεδομένου ότι όλα τα φιλέτα Τιλάπιας ταυτοποιήθηκαν γενετικά ως *Oreochromis niloticus*, η τοπική Τιλάπια του Νείλου. Συνεπώς, η γενετική βοήθησε στην εξακρίβωση του είδους στο 100% των περιπτώσεων των φιλέτων.

Εικόνα 5: Γραφική σύνοψη της λανθασμένης επισήμανσης των εμπορικών φιλέτων στις αιγυπτιακές αγορές που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη. Το γράφημα δείχνει το όνομα του είδους στην ετικέτα (αριστερά) και το πραγματικό είδος που ταυτοποιήθηκε από το DNA (δεξιά). Το ποσοστό των εσφαλμένα επισημασμένων προϊόντων για κάθε περίπτωση παρεμβάλλεται στο βέλος.



Το φαινόμενο της απάτης τροφίμων, ειδικά στα προϊόντα θαλασσινών, είναι επίσης πολύ έντονο στην Κίνα, λόγω των σημαντικών νομοθετικών και διαχειριστικών ελλείψεων που υπάρχουν στον κινεζικό αλιευτικό τομέα. Ως αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε μια έρευνα το 2019 με σκοπό την χρήση DNA Barcoding και PCR πραγματικού χρόνου για τον εντοπισμό νοθείας σε προϊόντα ψαριών της κινεζικής αγοράς, αλλά και για την κατανόηση των αιτιών του υψηλού φαινομένου της εν λόγω απάτης στην Κίνα. Οι ερευνητές εφάρμοσαν DNA Barcoding FDB (Full DNA Barcoding) και MDB (Mini DNA Barcoding) για την ταυτοποίηση των ειδών 48 εμπορικών ιχθυηρών (24 αποξηραμένα καρυκεύματα και 24 κονσερβοποιημένα) που συλλέχθηκαν τυχαία από τοπικές αγορές της Nanjing της Κίνας, τα οποία ισχυρίζονταν ότι αποτελούσαν προϊόντα σαρδέλας (Η σαρδέλα είναι η κοινή ονομασία για διάφορα πελαγικά είδη μικρού μεγέθους των Clupeiformes, που αντιπροσωπεύουν έναν πόρο μεγάλης σημασίας για την παγκόσμια αλιεία). Όλα τα αποξηραμένα προϊόντα και δεκαπέντε κονσερβοποιημένα ήταν παρασκευασμένα στην Κίνα, ενώ τα υπόλοιπα εννέα κονσερβοποιημένα προέρχονταν από το εξωτερικό.

Επιπροσθέτως, προκειμένου να αξιολογηθεί η ειδικότητα της PCR πραγματικού χρόνου, οι ερευνητές ετοίμασαν αυθεντικά δείγματα που ανήκαν σε 18 είδη τα οποία συμπεριλάμβαναν τα ακόλουθα: *Cyprinus carpio, Coilia ectenes, Larimichthys polyactis, Lateolabrax japonicus, Scomber australasicus, Odontobutis potamophila, Patagonotothen ramsayi, Katsuwonus pelamis, Dissostichus mawsoni, Pangasius hypophthalmus, Albatrossia pectoralis, Ctenopharyngodon idella, Micropterus salmoides, Sardina pilchardus, Clupea harengus, Sprattus sprattus, Sardinella longiceps και Sardinella aurita* (Xiong et al., 2019).

Η ανάλυση ετικέτας διαπίστωσε ότι η επιστημονική ονομασία ήταν διαθέσιμη μόνο σε τρία ξένα προϊόντα και δύο από αυτά δήλωναν *S. pilchardus,* τα οποία ωστόσο ταυτοποιήθηκαν ως ανήκοντα στην *Scomber,* αναδεικνύοντας την εσφαλμένη επισήμανση του είδους. Όλα τα άλλα προϊόντα ανέφεραν το κοινό όνομα 沙丁鱼 στην ετικέτα, υποδεικνύοντας είδος σαρδέλας, χωρίς καμία άλλη πληροφορία σχετικά με την ταυτότητα του είδους. Ένα προϊόν χαρακτηρίζεται ως "σαρδέλα" όταν χρησιμοποιείται αποκλειστικά το είδος *S. pilchardus,* ενώ τα προϊόντα που παράγονται από άλλα είδη ονομάζονται σαρδέλα Χ, αναφερόμενα στη χώρα, τη γεωγραφική περιοχή, το είδος ή την κοινή ονομασία.

Ωστόσο, ειδικές διατάξεις για την επισήμανση των ιχθυηρών και μια τυποποιημένη ονοματολογία στην ηπειρωτική Κίνα δεν ήταν ακόμη διαθέσιμες την περίοδο που διεξήχθη η έρευνα. Ήταν, επομένως, αδύνατο να προσδιοριστεί η ακρίβεια της επισήμανσης συγκρίνοντας το ταυτοποιημένο είδος με το δηλωμένο κοινό όνομα (σαρδέλα στην παρούσα μελέτη). Υπό αυτές τις συνθήκες, μια συνήθης στρατηγική είναι η καθιέρωση ενός αποκλειστικού κριτηρίου. Δεδομένου ότι οι όροι "σαρδέλα", "γαύρος" και "ρέγκα" χρησιμοποιούνται στην αγορά για να αναφέρονται στην τάξη των Clupeiformes, η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε την ορθή επισήμανση των προϊόντων σαρδέλας που παρασκευάζονται από το είδος Clupeiformes με ποσοστό λανθασμένης επισήμανσης 87% (40/46).

Τέλος, οι ερευνητές προσπάθησαν να διαλευκάνουν τις αιτίες του υψηλού ποσοστού απάτης στα προϊόντα ψαριών στην Κίνα. Πρώτον, επισήμαναν τις σημαντικές νομοθετικές και διαχειριστικές ελλείψεις. Ειδικότερα, συγκεκριμένες διατάξεις για την επισήμανση των αλιευτικών προϊόντων και τυποποιημένη ονοματολογία των ψαριών δεν είναι ακόμη διαθέσιμες στην Κίνα. Στην παρούσα μελέτη, τα 11 είδη/γένη που εντοπίστηκαν και ανήκαν σε 5 διαφορετικές τάξεις, ανέδειξαν την σπουδαία ποικιλομορφία των ειδών στα προϊόντα σαρδέλας στην Κίνα. Δεύτερον, αν και τα οικονομικά οφέλη γενικά αποτελούν το μεγαλύτερο κίνητρο για την εσφαλμένη επισήμανση ειδών ψαριών, με την αντικατάσταση ειδών χαμηλής αξίας με είδη υψηλής αξίας, τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης στην παρούσα μελέτη ανέδειξαν μια μεγάλη αντίφαση στην τιμή των ειδών υψηλής αξίας. Για παράδειγμα, το *Lateolabrax japonicus* είναι ένα εμπορικά σημαντικό ψάρι με γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και υψηλή αγοραστική αξία. Η βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας αυτού του είδους έχει αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια στην Κίνα, παράγοντας το 90% της παγκόσμιας παραγωγής το 2017. Το *Sciaenops ocellatus* είναι επίσης ένα πολύτιμο ψάρι για τροφή, το οποίο χαίρει μεγάλης εκτίμησης για τη γεύση του, καθώς και για τις ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία. Η πρώτη εισαγωγή στην Κίνα έγινε το δεκαετία του 1990 και τώρα η Κίνα παρέχει περισσότερο από το 95% της παγκόσμιας παραγωγής του *S. Ocellatus.* Επομένως, η κυκλοφορία αυτών των ειδών ως προϊόντων σαρδέλας που αποκαλύφθηκε σε αυτή τη μελέτη δεν θα μπορούσε να υποστηρίξει μια απόδειξη εκούσιας εσφαλμένης επισήμανσης με σκοπό το κέρδος. Ένας πιθανός παράγοντας για την εσφαλμένη επισήμανση, θα μπορούσε να είναι η διευκόλυνση της πρόσβασης στην αγορά, δεδομένου ότι τα ψάρια που ονομάζονται σαρδέλες εκτιμώνται ιδιαίτερα στην Κίνα.

Τα άλλα είδη που χρησιμοποιήθηκαν για προϊόντα σαρδέλας στην παρούσα μελέτη αφορούσαν τα μικρού μεγέθους ψάρια (*Upeneus japonicus, Lepidotrigla japonica, L. alata,* και διάφορα είδη του του γένους *Saurida* και *Trachurus*). Μεγάλες ποσότητες εκφορτώνονται ως αλιεύματα τράτας. Μια μεγάλη πιθανότητα για την εσφαλμένη επισήμανσή τους θα μπορούσε επίσης να είναι η βελτιωμένη πρόσβαση στην αγορά χρησιμοποιώντας την ονομασία "σαρδέλα", αντί για την αυθεντική κοινή ονομασία. Επιπλέον, οι σαρδέλες χαρακτηρίζονται από υψηλή διατροφική αξία και χαμηλή συσσώρευση βαρέων μετάλλων, καλύπτοντας ικανοποιητικά την κινεζική προτίμηση, και ως εκ τούτου, θα εξακολουθούσε να είναι οικονομικά συμφέρουσα η κατάχρηση της κοινής ονομασίας "σαρδέλα". Επιπλέον, η ασφάλεια των τροφίμων, η ποιότητα των προϊόντων και η χώρα προέλευσης θεωρήθηκαν ως πιο κρίσιμες ανησυχίες στην απόφαση αγοράς των καταναλωτών, αντί της αυθεντικότητας των ειδών, υπογραμμίζοντας επίσης τη μεγάλη αδιαφορία μεταξύ του κοινού απέναντι στην απάτη.

Τα προϊόντα σαρδέλας δεν είναι τα μόνα επιρρεπή για απάτη στην κινεζική αγορά. Το ψητό φιλέτο *Xue Yu* είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα προϊόντα ψαριού στην Κίνα και η ελκυστικότητά του στην αγορά αντικατοπτρίζεται από την υψηλή τιμή του στα τοπικά σούπερ μάρκετ. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης εναρμόνισης γύρω από τον ορισμό του *Xue Yu,* καθώς και της αδυναμίας οπτικής επιθεώρησης για τα μεταποιημένα προϊόντα ψαριών, τα ψητά προϊόντα φιλέτου *Xue Yu,* βρίσκονται αρκετά βαθιά μέσα στο σκάνδαλο της νοθείας των ειδών. Ο όρος *Xue Yu,* με την ευρεία έννοια, αναφέρεται γενικά στα ψάρια της οικογένειας Gadidae και στα συγγενικά είδη της τάξης Gadiformes. Παρόλα αυτά, λόγω των προαναφερθέντων αδυναμιών, οι παραγωγοί και οι διανομείς μπαίνουν στον πειρασμό να χρησιμοποιούν είδη ακόμη και πέραν των Gadiformes για την παρασκευή ψητών προϊόντων φιλέτου *Xue Yu.*

Προκειμένου να εκτιμηθεί η έκταση της παραπλάνησης και της υποκατάστασης με ψητά προϊόντα φιλέτου *Xue Yu*, πραγματοποιήθηκε μια έρευνα χρησιμοποιώντας 153 δείγματα, για λογαριασμό 30 εμπορικών μαρκών, από 16 πόλεις της Κίνας. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν DNA Barcoding (FDB και MDB) για την εξακρίβωση της ταυτότητας των ειδών (Xiong et al., 2018).

Το ποσοστό λανθασμένης επισήμανσης εκτιμήθηκε σύμφωνα με τρεις όλο και πιο αυστηρούς ορισμούς: 1) *Xue Yu* να σημαίνει είδη Gadiformes 2) *Xue Yu* να σημαίνει είδη Gadidae 3) *Xue Yu* να σημαίνει *Gadus spp.* Λαμβάνοντας υπόψη τις προαναφερθείσες διαφωνίες σχετικά με τον ορισμό του *Xue Yu*, οι ερευνητές αξιολόγησαν την αντιστοιχία μεταξύ της ονομασίας του προϊόντος και του είδους που ταυτοποιήθηκε με μοριακή ανάλυση λαμβάνοντας υπόψη τις τρεις διαφορετικές και ολοένα και πιο αυστηρές μεθόδους ορισμούς. Συνολικά, το ποσοστό λανθασμένης επισήμανσης κυμάνθηκε από 58% (ορισμός 1 και 2) έως 100% (ορισμός 3).

Η νοθεία στα τρόφιμα δεν έχει αντίκτυπο μονάχα στην τσέπη του καταναλωτή, αλλά και στη υγεία του. Για παράδειγμα, η συγκεκριμένη μελέτη ταυτοποίησε το γένος *Lagocephalus spp.*, ένα γένος που περιλαμβάνει τοξικά είδη γνωστά ως pufferfish, σε 37 δείγματα. Στην πραγματικότητα, τα pufferfish περιέχουν γενικά τετροδοτοξίνη (TTX), η οποία είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη που μπλοκάρει τους διαύλους νατρίου και επηρεάζει τη νευρωνική μετάδοση στους σκελετικούς μύες. Τα άτομα που επηρεάζονται εμφανίζουν μυϊκή αδυναμία ή παράλυση και δυνητικά θάνατο. Επιπλέον, αυτή η τοξίνη είναι θερμοσταθερή και δεν μπορεί να διασπαστεί κατά την προετοιμασία των τροφίμων, όπως το πλύσιμο, το μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες, η κατάψυξη και η ξήρανση. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ακόμη ειδική αντιτοξίνη έναντι της TTX, συνιστάται αυστηρά η αποφυγή της κατανάλωσης pufferfish.

Όσον αφορά την Κίνα, οι πολιτικές για την εμπορική εκμετάλλευση των pufferfish είναι γεμάτες ανατροπές και βήματα προς την πρόοδο. Από τη μία πλευρά, η νοστιμιά και η τρυφερότητα του κρέατος του ψαριού καθιστούν το pufferfish μια λιχουδιά στην κινεζική κουζίνα. Από την άλλη πλευρά, τα συχνά αναφερόμενα περιστατικά δηλητηρίασης οδήγησαν στη δημοσίευση του κανόνα "Μέτρα για τη διαχείριση της υγιεινής των υδρόβιων προϊόντων" το 1990, που διευκρινίζει την απαγόρευση της κυκλοφορίας του pufferfish. Παρόλο που, μαζί με τις μεγάλες βελτιώσεις στην υδατοκαλλιέργεια των pufferfish, η απαγόρευση καταργήθηκε το 2010, δεν είχε προβλεφθεί επίσημη δήλωση για την απελευθέρωση της μεταποίησης των pufferfish μέχρι το 2016. Επιπλέον, η απελευθέρωση περιορίζεται αυστηρά στα είδη *Takifugu obscurus* και *T. rubripes*, που καλλιεργούνται σε υδατοκαλλιέργειες από πιστοποιημένους παραγωγούς. Ωστόσο, τα είδη *Lagocephalus spp.* δεν προσδιορίστηκαν και συνεπώς δεν πρέπει να επιτραπεί η κυκλοφορία τους στην κινεζική αγορά. Επομένως, μια λογική εξήγηση για τον εντοπισμό *Lagocephalus spp.* θα μπορούσε να είναι ότι οι πωλητές σκόπιμα χαρακτήριζαν λανθασμένα τα ψημένα φιλέτα *Lagocephalus spp.* ως φιλέτα *Xue Yu* προκειμένου να ξεπεράσουν την αντίσταση των καταναλωτών και επίσης για να ικανοποιήσουν τις γευστικές προτιμήσεις του κοινού.

Μια ακόμα κατηγορία προϊόντων θαλασσινών που έχουν υπάρξει συχνά αντικείμενο νοθείας/απάτης είναι τα προϊόντα καλαμαριού. Ο όρος καλαμάρι αναφέρεται στα είδη της οικογένειας Ommastrephidae και Loliginidae της υποτάξης Myopsina. Το καλαμάρι είναι ένα οικονομικά σημαντικό ιχθυηρό που καταναλώνεται ευρέως σε όλο τον κόσμο, επειδή είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και απαραίτητα αμινοξέα και είναι γνωστό ως μια νόστιμη και θρεπτική τροφή. Εκτός από το να πωλούνται φρέσκα, τα καλαμάρια συχνά μετατρέπονται σε επεξεργασμένα τρόφιμα προς πώληση. Η μεγάλης κλίμακας επεξεργασία καλαμαριών έχει καταστεί απαραίτητη για την βιομηχανία ιχθυηρών. Η γεύση και η διατροφική αξία των καλαμαριών ποικίλουν από διάφορες πηγές στην αγορά, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στην τιμή.

Η ανίχνευση των ειδών καλαμαριών γίνεται με τη μορφολογική μέθοδο, εξετάζοντας τα χαρακτηριστικά των σιαγόνων τους. Ωστόσο, όταν το καλαμάρι μεταποιείται σε φιλέτα, κονσέρβες, μπάλες ψαριού και άλλα προϊόντα, τα μοναδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του δύσκολα διατηρούνται, οπότε η μέθοδος αυτή έχει ορισμένους περιορισμούς. Εν τω μεταξύ, η εξακρίβωση της ταυτότητας των ειδών καλαμαριών μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες αναλυτικές μεθόδους, από τις οποίες οι τεχνικές με βάση το DNA είναι οι πιο διαδεδομένες.

Επειδή το καλαμάρι περιέχει αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, οι ετικέτες τροφίμων πρέπει να εμφανίζουν τις πληροφορίες για την πρώτη ύλη των αλλεργιογόνων από είδη που προέρχονται από Ommastrephidae. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για μια τυποποιημένη μέθοδο που να μπορεί να ανιχνεύσει εάν τα επεξεργασμένα τρόφιμα περιέχουν υλικά προερχόμενα από Ommastrephidae.

Έτσι, πρόσφατα διεξήχθη μια έρευνα με σκοπό την χρήση DNA Barcoding και PCR πραγματικού χρόνου για την ταυτοποίηση των ειδών και υλικών που προέρχονται από Ommastrephidae σε καλαμάρια και προϊόντα θαλασσινών. Η δοκιμή DNA Barcoding στόχευσε ειδικά τα γονίδια 16S rRNA, LSU και COI για τον προσδιορισμό της προέλευσης των ειδών. Επίσης, οι ερευνητές δοκίμασαν μια μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου που χρησιμοποιεί την αλληλουχία του γονιδίου 12S rRNA για την ανίχνευση υλικών προερχόμενων από Ommastrephidae σε πολύ επεξεργασμένα τρόφιμα. Για την πραγματοποίηση της έρευνας, 46 προϊόντα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων 19 δειγμάτων Ommastrephidae και 27 δειγμάτων μη Ommastrephidae, συλλέχθηκαν από τις περιφερειακές ψαραγορές και την πλατφόρμα Taobao.com την άνοιξη του 2023. Τα δείγματα των ειδών Ommastrephidae ήταν φρέσκα, ξηρά, κατεψυγμένα ή σε επεξεργασμένη κατάσταση και αγοράστηκαν από διάφορες παράκτιες επαρχίες της Κίνας, όπως οι Shandong, Zhejiang, Fujian και Guangdong (Gao et al., 2023).

Η έρευνα έδειξε ότι τα γονίδια 16S rRNA, COI και LSU που χρησιμοποιήθηκαν για DNA Barcoding, παρουσίασαν εξαιρετική ανθεκτικότητα στην ικανότητα πολλαπλασιασμού της PCR για δείγματα με διαφορετικά επίπεδα ποιότητας DNA. Το γονίδιο COI παρείχε πιο ακριβείς πληροφορίες από ότι το 16S rRNA. Η μέθοδος PCR πραγματικού χρόνου έδειξε να έχει λογική ειδικότητα, ευαισθησία και εφαρμοσιμότητα για την ταυτοποίηση ειδών Ommastrephidae σε επεξεργασμένα τρόφιμα με διάφορα όρια ανίχνευσης για τις τρεις υποοικογένειες. Συμπερασματικά, οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να τυποποιηθούν για την ανίχνευση ειδών καλαμαριών και προσθέτων από Ommastrephidae στα τρόφιμα.

3.2.2 Ταυτοποίηση προϊόντων θαλασσινών με αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

Τα θαλάσσια αγγούρια (Holothuroidea) είναι μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα μαλακών εχινόδερμων. Υπάρχουν περισσότερα από 1700 είδη σε όλο τον κόσμο. Μεταξύ αυτών, περίπου 60 είδη βρώσιμων θαλάσσιων αγγουριών είναι υψηλής εμπορικής αξίας. Επί του παρόντος, η Ασία και ιδιαίτερα η Κίνα, παραμένει η μεγαλύτερη αγορά για τα θαλάσσια αγγούρια. Πιθανά οφέλη για την υγεία από την κατανάλωση θαλάσσιου αγγουριού προέρχονται από τη θρεπτική τους σύνθεση, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες, αμινοξέα, απαραίτητα λιπαρά οξέα, τριτερπενικούς γλυκοζίτες και άλλες βιολογικά δραστικές ενώσεις (π.χ. θειική χονδροϊτίνη, θειούχους πολυσακχαρίτες και πεπτίδια).

Η τιμή των βρώσιμων θαλάσσιων αγγουριών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με το είδος, την περιεκτικότητα σε υγρασία, την εξωτερική εμφάνιση, το μέγεθος, το πάχος των τοιχωμάτων του σώματος και τη ζήτηση στην αγορά. Το πιο δημοφιλές θαλάσσιο αγγούρι που πωλείται στην κινεζική αγορά είναι το *Apostichopus japonicus*. Είναι πολύ πιο ακριβό από άλλα είδη θαλάσσιου αγγουριού. Η υψηλή τιμή του και η επιθυμία για αύξηση του κέρδους έχουν οδηγήσει σε εκτεταμένη εσφαλμένη επισήμανση και απάτη στα προϊόντα θαλάσσιων αγγουριών. Η αντικατάσταση των ειδών υψηλής τιμής με είδη χαμηλής τιμής είναι μια από τις πιο συνηθισμένες δραστηριότητες στη βιομηχανία θαλάσσιου αγγουριού. Εκτός από την παραβίαση των συμφερόντων των καταναλωτών, η λανθασμένη επισήμανση μπορεί να έχει πρόσθετες συνέπειες, όπως η παράνομη αλιεία, η υπεραλίευση, και τελικά να απειλείται η βιωσιμότητα των πόρων θαλάσσιου αγγουριού. Η κατάλληλη επισήμανση του θαλάσσιου αγγουριού είναι απαραίτητη για τη διαφάνεια στην βιομηχανία θαλασσινών. Δυστυχώς, η μορφολογική ταυτοποίηση συγγενικών ειδών μπορεί να γίνει μόνο από ειδικούς, αλλά συνήθως ακόμη και αυτό δεν είναι δυνατό λόγω της επεξεργασίας που υφίστανται συνήθως τα εν λόγω προϊόντα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι Xing et al. (2021) αποφάσισαν να δοκιμάσουν την εφαρμογή της NGS σε συνδυασμό με DNA mini-barcoding για την ταυτοποίηση επεξεργασμένων προϊόντων θαλάσσιου αγγουριού. Για τον σκοπό αυτό, οι ερευνητές συνέλεξαν 40 αποξηραμένα δείγματα θαλάσσιων αγγουριών, συμπεριλαμβανομένων 23 ειδών θαλάσσιων αγγουριών, ώστε να βελτιστοποιήσουν τον σχεδιασμό εκκινητών mini-barcode. Επίσης, συνέλεξαν 12 διαφορετικά είδη εμπορικών προϊόντων από καταστήματα θαλάσσιων αγγουριών, σούπερ μάρκετ και διαδικτυακές πλατφόρμες. Όλα αυτά τα εμπορικά προϊόντα ήταν εξαιρετικά επεξεργασμένα και είχαν χάσει την αρχική τους μορφολογία. Συγκεκριμένα, τα εμπορικά προϊόντα ήταν: θαλάσσιο αγγούρι σε σκόνη, θαλάσσιο αγγούρι σε κάψουλα, θαλάσσιο αγγούρι, χυλός θαλάσσιου αγγουριού, σάλτσα θαλάσσιου αγγουριού, στοματικό διάλυμα θαλάσσιου αγγουριού, κονσερβοποιημένο θαλάσσιο αγγούρι, αλατισμένο θαλάσσιο αγγούρι, μπάλα θαλάσσιου αγγουριού, κατεψυγμένο έτοιμο προς κατανάλωση θαλάσσιο αγγούρι, κέικ θαλάσσιου αγγουριού και αρωματισμένο θαλάσσιο αγγούρι.

Μεταξύ των 12 επεξεργασμένων προϊόντων, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι μόνο δύο (θαλάσσιο αγγούρι σε σκόνη και αλατισμένο θαλάσσιο αγγούρι) αποτελούνταν από ένα είδος θαλάσσιου αγγουριού. Το αλατισμένο θαλάσσιο αγγούρι και τα κατεψυγμένα έτοιμα προς κατανάλωση θαλάσσια αγγούρια ταυτοποιήθηκαν ως *H. Tubulosa* και *H. poli*, αντίστοιχα, τα οποία ταίριαζαν με την ετικέτα τους. Αντιθέτως, το θαλάσσιο αγγούρι σε σκόνη χαρακτηριζόταν ως *Apostichopus japonicus*, αλλά ταυτοποιήθηκε ως *Cucumaria frondosa*. Η τιμή του *Apostichopus japonicus* είναι πολύ υψηλότερη από του *Cucumaria frondosa*, άρα μάλλον έγινε ηθελημένη αντικατάσταση ειδών. Τα άλλα εννέα προϊόντα αποδείχθηκε με την NGS ότι αποτελούνταν από πολλαπλά είδη θαλάσσιου αγγουριού ανά δείγμα. Τέσσερα από τα υπόλοιπα δείγματα (σάλτσα θαλάσσιου αγγουριού, στοματικό διάλυμα θαλάσσιου αγγουριού, κονσερβοποιημένο θαλάσσιο αγγούρι και αρωματισμένο θαλάσσιο αγγούρι) που χαρακτηρίστηκαν ως ένα μόνο είδος θαλάσσιου αγγουριού, φάνηκε πως περιείχαν διάφορα είδη αγγουριού. Τρία από τα τέσσερα δείγματα (σάλτσα θαλάσσιου αγγουριού, στοματικό διάλυμα θαλάσσιου αγγουριού και κονσερβοποιημένο θαλάσσιο αγγούρι) χαρακτηριζόντουσαν ως *A. japonicus*, αλλά ανιχνεύθηκε ότι περιείχαν άλλα λιγότερο ακριβά είδη. Επίσης, και τα υπόλοιπα πέντε δείγματα προϊόντων περιείχαν πολλαπλά είδη.

Συμπερασματικά, τα 10 από τα 12 (83,33%) προϊόντα είχαν λανθασμένη επισήμανση, γεγονός που δείχνει υψηλό ποσοστό απάτης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, η υποκατάσταση μπορεί να ήταν ακούσια λόγω παρόμοιων μορφολογικών χαρακτηριστικών των ειδών. Στα περισσότερα δείγματα με λανθασμένη επισήμανση, τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χαμηλότερων τιμών.

Το 2016 έλαβε χώρα στην Βραζιλία η πρώτη μεταγονιδιωματική προσέγγιση που ελέγχει κυβερνητικά προγράμματα πιστοποίησης και λανθασμένη επισήμανσης προϊόντων θαλασσινών υψηλής επεξεργασίας (Carvalho et al., 2017). Η έρευνα επικεντρώθηκε στα προϊόντα μπακαλιάρου. Τα μεταποιημένα προϊόντα μπακαλιάρου, όπως τα κέικ και τα πιάτα εστιατορίου, χαίρουν μεγάλης εκτίμησης σε όλο τον κόσμο και είναι ένα ακριβό θαλασσινό προϊόν στη Βραζιλία. Τα προϊόντα μπακαλιάρου είναι πιο επιρρεπή σε εσφαλμένη επισήμανση, δεδομένου ότι μόνο τέσσερα είδη μπορούν να επισημανθούν νόμιμα ως "μπακαλιάρος" βάσει της νομοθεσίας της Βραζιλίας: τα *Gadus macrocephalus*, *Gadus morhua*, *Gadusogac*, και *Boreogadus saida*. Επιπλέον, το *Gadus morhua* μπορεί να αντικατασταθεί από λιγότερο ακριβά είδη γάδου (π.χ. *Gadus macrocephalus*), και άλλα είδη που δεν επιτρέπεται να πωλούνται χαρακτηριζόμενα ως "μπακαλιάρος" σύμφωνα με τους βραζιλιάνικους κανονισμούς (π.χ. κολιός, μπακαλιάρος Αλάσκας) ή ακόμη και αναμεμειγμένα με άλλα λιγότερο πολύτιμα άγνωστα είδη.

Ωστόσο, η ανίχνευση μιγμάτων άγνωστων ειδών που θα μπορούσαν να έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή προϊόντων θαλασσινών υψηλής επεξεργασίας δεν μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την παραδοσιακή μεθοδολογία της DNA Barcoding. Για παράδειγμα, τα κονσερβοποιημένα ψάρια, τα χάμπουργκερ ψαριών, τα κέικ ψαριών ή άλλα είδη εξαιρετικά επεξεργασμένων θαλασσινών που μπορεί να περιέχουν διάφορα είδη, τα οποία μπορεί να μην ανιχνεύονται με συμβατική μορφολογική ανάλυση ή ακόμη και με τη χρήση παραδοσιακών δοκιμών με βάση το DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rtPCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της παρουσίας ειδών σε ένα μείγμα, για παράδειγμα, για την ανίχνευση κρέατος αλόγου μέσα σε μπιφτέκια βοδινού κρέατος, ή ακόμη και για την ταυτοποίηση μιγμάτων αγελαδινού γάλακτος σε προϊόντα βουβαλιού. Ωστόσο, η rtPCR απαιτεί εκκινητές ειδικούς για τα είδη-στόχους, τους οποίους μπορεί να είναι αδύνατο να προβλέψει κανείς όταν επιχειρείται ανάλυση σε πολύ επεξεργασμένα θαλασσινά. Ως εκ τούτου, με τη χρήση καθολικών εκκινητών και υψηλής απόδοσης μεθόδων αλληλούχισης DNA (NGS), είναι δυνατή η διεξαγωγή μιας μεταγονιδιωματικής προσέγγισης τροφίμων για την ανίχνευση ειδών σε εξαιρετικά επεξεργασμένα θαλασσινά, χωρίς προηγούμενη γνώση του ποια είδη αναμένεται να βρεθούν.

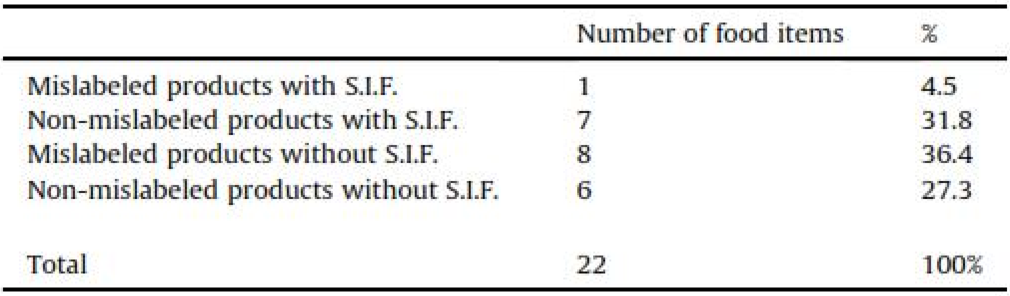
Στην εν λόγω έρευνα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια μεταγονιδιωματική προσέγγιση τροφίμων για να προσδιορίσουν τα είδη που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων μπακαλιάρου, όπως κέικ μπακαλιάρου (κατεψυγμένα και μαγειρεμένα) και πιάτα μπακαλιάρου που πωλούνται στη Βραζιλία. Συνολικά αγοράστηκαν είκοσι δύο προϊόντα γάδου (με την ένδειξη "Βακαλάος") από πέντε σούπερ μάρκετ, τέσσερα τοπικά καταστήματα, δύο ταχυφαγεία και ένα εστιατόριο στην πόλη Belo Horizonte (νοτιοανατολική Βραζιλία). Τα δείγματα αποτελούνταν από κομμάτια μπακαλιάρου, κατεψυγμένα κέικ, μαγειρεμένα γεύματα σε συσκευασία κενού, ένα πιάτο εστιατορίου και κέικ μπακαλιάρου ταχυφαγείου, τα οποία συνολικά προέρχονταν από δεκαεπτά μάρκες/προμηθευτές. Λεπτομέρειες του προϊόντος, όπως τιμή, όνομα του είδους στην ετικέτα του προϊόντος, τόπος συσκευασίας, είδος δείγματος (κατεψυγμένο, μαγειρεμένο, κέικ, πιάτο) και το *Serviço de Inspeçao Federal* σφραγίδα (S.I.F.) καταγράφηκαν από τους ερευνητές. Η S.I.F. είναι μια πιστοποίηση που χορηγείται από το Υπουργείο Γεωργίας, Κτηνοτροφίας και Εφοδιασμού Τροφίμων (MAPA) σε όλα τα βρώσιμα και μη βρώσιμα ζωικά προϊόντα που προορίζονται για την αγορά της Βραζιλίας, καθώς και σε εισαγόμενα και εξαγόμενα προϊόντα. Ένας αριθμός σφραγίδας S.I.F. αναγράφεται στις ετικέτες των προϊόντων που είναι υπό συστηματική κυβερνητική επιθεώρηση.

Τα λατινικά επιστημονικά ονόματα συγκρίθηκαν με τα κοινά ονόματα που προέκυψαν από τον κατάλογο της Βραζιλιάνικης Κυβερνητικής (Instruçao Normativa No 29, 2015) και την FishBase (www.fishbase.org) προκειμένου να εντοπιστεί η εσφαλμένη επισήμανση. Συνολικά, οι ερευνητές βρήκαν δεκατρία προϊόντα (59%) που αποτελούνταν μόνο από μπακαλιάρο, τέσσερα δείγματα (18%) που αποτελούνταν από σαφώς εσφαλμένα επισημασμένα προϊόντα και πέντε (23%) που διέθεταν συνδυασμό δύο ή περισσότερων ειδών που δεν μπορούν να επισημανθούν ως μπακαλιάρος στη Βραζιλία. Επομένως, εδώ υπάρχει ένα ποσοστό λανθασμένης επισήμανσης 41% (N=9) εντός υψηλά επεξεργασμένων προϊόντων γάδου, αλλά η λανθασμένη ταυτοποίηση διαπιστώθηκε λιγότερο συχνά σε προϊόντα που διέθεταν σφραγίδα S.I.F. Οι ερευνητές καταφέρανε να εντοπίσουν επτά είδη γάδου που πωλούνταν ως μπακαλιάρος στα 22 προϊόντα που αναλύθηκαν. Από αυτά τα επτά, μόνο δύο (*Gadus morhua* και *Gadus* *microcephalus*) μπορούν να πωλούνται ως μπακαλιάρος, σύμφωνα με τον βραζιλιάνικο κανονισμό αριθ. 29.

Τα περισσότερα προϊόντα με λανθασμένη επισήμανση αποτελούνταν από τοπικά παραγόμενα θαλασσινά, χωρίς επιθεώρηση από την Βραζιλιάνικη Ομοσπονδιακή Ρυθμιστική Υπηρεσία (δηλ. χωρίς αριθμό S.I.F.). Μόνο ένα λανθασμένα επισημασμένο προϊόν προερχόταν από την Πορτογαλία. Από τα 22 προϊόντα γάδου (με την ένδειξη "Βακαλάος"), οκτώ βιομηχανοποιημένα κατεψυγμένα προϊόντα είχαν κυβερνητικό αριθμό πιστοποίησης της Βραζιλίας (S.I.F.) στην ετικέτα συσκευασίας του προϊόντος, που σημαίνει ότι ελέγχθηκαν από ομοσπονδιακό κυβερνητικό πρόγραμμα επιθεώρησης. Από αυτά, μόνο ένα προϊόν γάδου με αριθμό S.I.F. βρέθηκε να είναι εσφαλμένα επισημασμένο (4,6% του συνόλου των δειγμάτων) (Πίνακας 8). Από την άλλη πλευρά, οκτώ δείγματα βρέθηκαν να έχουν εσφαλμένη επισήμανση (36,4% του συνόλου των δειγμάτων) από τα προϊόντα που δεν είχαν σφραγίδα S.I.F.

Συμπερασματικά, η έρευνα έδειξε ότι τα προϊόντα με σφραγίδα S.I.F. ήταν λιγότερο συχνά εμπλεκόμενα σε εσφαλμένη επισήμανση από ότι τα προϊόντα χωρίς τη βεβαίωση (Πίνακας 8). Ωστόσο, σχεδόν όλα τα αναλυθέντα προϊόντα που διέθεταν τη σφραγίδα S.I.F. εισήχθησαν από την Πορτογαλία και, ως εκ τούτου, μπορεί να είναι πιο επιρρεπή στη ρύθμιση από τα τελωνεία σε σύγκριση με τα προϊόντα που παράγονται τοπικά στην Βραζιλία.

Πίνακας 8: Ποσοστό των προϊόντων θαλασσινών με λανθασμένη επισήμανση μπακαλιάρου με και χωρίς τον κυβερνητικό αριθμό πιστοποίησης της Βραζιλίας (S.I.F.).



	Number of food items	%
Mislabeled products with S.I.F.	1	4.5
Non-mislabeled products with S.I.F.	7	31.8
Mislabeled products without S.I.F.	8	36.4
Non-mislabeled products without S.I.F.	6	27.3
Total	22	100%

Οι Klapper et al. (2023) χρησιμοποίησαν αλληλούχιση επόμενης γενιάς με την χρήση ενός συνδυασμού εκκινητών που στοχεύουν το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα b και την περιοχή ελέγχου, για τον καλύτερο χαρακτηρισμό των παραγόντων που επηρεάζουν τις μετρούμενες αναλογίες των ειδών τόνου σε μείγματα με τη δοκιμή δειγμάτων διαφορετικού βαθμού επεξεργασίας και ανάλυση των αναγνώσεων NGS με διαφορετικές βιοπληροφορικές εφαρμογές. Περαιτέρω, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε εμπορικά δείγματα κονσέρβας τόνου για να εξεταστεί η συμμόρφωση με τους κανονισμούς δήλωσης της ΕΕ. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η πρόοδος στην ανάλυση της δύσκολης μήτρας τροφίμων των κονσερβών τόνου καθώς και η αξιολόγηση της δυνατότητας τυποποίησης στο μέλλον.

Ο τόνος βρίσκεται στην κορυφή των πιο σημαντικών από εμπορική άποψη θαλασσινών ειδών παγκοσμίως με ετήσια εκφόρτωση 5,3 εκατομμυρίων τόνων το έτος

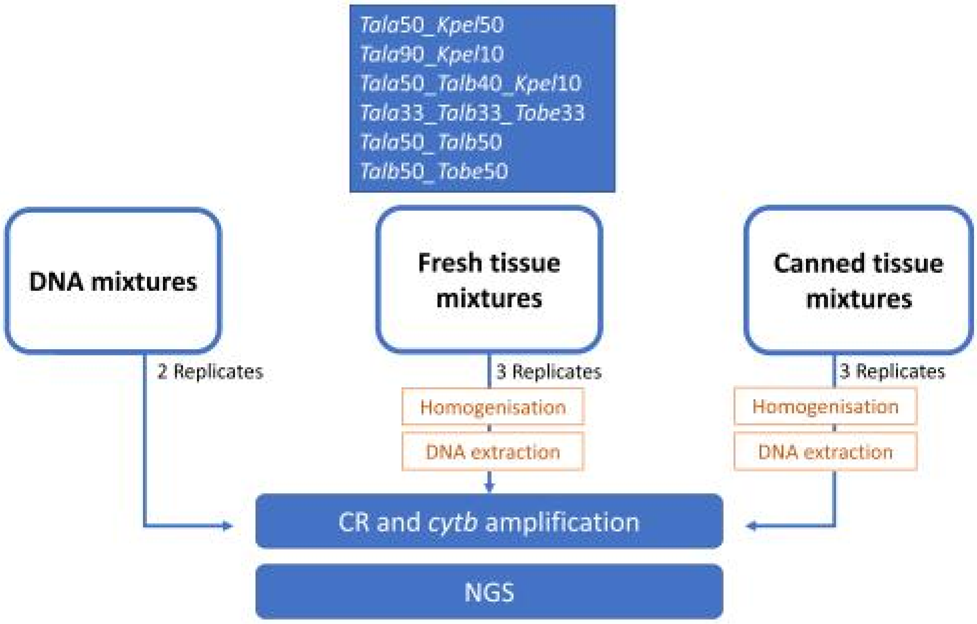
2019. Το σημαντικότερο εμπορικό είδος τόνου είναι η παλαμίδα (*Katsuwonus pelamis*), το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 60 % των παγκόσμιων αλιευμάτων, ακολουθούμενος από τον κιτρινόπτερο τόνο (*Thunnus albacares*) με 28 %, τον μεγαλόφθαλμο τόνο (*T. obesus*) με 7 %, τον λευκό τόνο (*T. alalunga*) με 4 % και τον ερυθρό τόνο του Ατλαντικού (*T. thynnus*) με 1%. Οι τόνοι είναι μεγάλης αξίας, ιδίως το είδος του λευκού τόνου ή "Bonito del Norte" και του ερυθρού του Ατλαντικού. Οι τόνοι πωλούνται νωποί, αποξηραμένοι και κατεψυγμένοι, αλλά στην ευρωπαϊκή αγορά οι κονσέρβες τόνου είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς. Για την κονσερβοποίηση, τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται είναι η παλαμίδα και ο κιτρινόπτερος τόνος. Οι τιμές για την κονσερβοποίηση ποικίλλουν μεταξύ των ειδών, με τις χαμηλότερες τιμές αγοράς για τα πιο κοινά είδη, την παλαμίδα και τον κιτρινόπτερο τόνο. Η ηθελημένη ή μη ηθελημένη υποκατάσταση των ειδών τόνου μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μοιράζονται πολύ παρόμοιους μορφολογικούς χαρακτήρες, ποικίλες ιδιότητες και αγοραίες αξίες μεταξύ των ειδών.

Οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA είναι η κύρια επιλογή ανάλυσης όταν δεν είναι δυνατή η μορφολογική ταυτοποίηση, όπως είναι η περίπτωση των μεταποιημένων προϊόντων. Συνήθως, η αλληλούχιση Sanger με εκκινητές barcoding είναι ο κανόνας. Ωστόσο, ο τόνος αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση για αυτή την αναλυτική προσέγγιση για διάφορους λόγους. Αφενός, τα είδη τόνου είναι φυλογενετικά στενά συνδεδεμένα και, ως εκ τούτου, παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των αλληλουχιών DNA τους. Ένα άλλο σημείο αφορά τις κονσέρβες, καθώς η διαδικασία αποστείρωσης κατά την κονσερβοποίηση οδηγεί σε ισχυρή υποβάθμιση του DNA με πιθανές αντικαταστάσεις ζευγών βάσεων και με κατακερματισμό μικρών αλληλουχιών DNA.

Η PCR πραγματικού χρόνου είναι κατάλληλη για ημιποσοτική ταυτοποίηση ειδών σε μείγματα ανάλογα με τη μήτρα του τροφίμου και το είδος-στόχο, αλλά μπορεί να ανιχνεύσει μόνο έναν περιορισμένο αριθμό ειδών-στόχων ταυτόχρονα. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς είναι μια μέθοδος για μαζική παράλληλη αλληλούχιση για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα και θεωρείται ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο ανάλυσης ρουτίνας για μικτά προϊόντα για τον έλεγχο της γνησιότητας. Αυτή η μέθοδος είναι μάλλον μη στοχευμένη και επομένως μπορεί να εντοπίσει μεγαλύτερο αριθμό ειδών που θα αγνοούνταν σε στοχευμένες προσεγγίσεις όπως η PCR πραγματικού χρόνου. Έτσι, η NGS επιτρέπει την ταυτοποίηση απροσδόκητων ειδών στα τρόφιμα.

Για την συγκεκριμένη μελέτη, οι ερευνητές επέλεξαν κοινά είδη που υπάρχουν σε κονσέρβες τόνου: παλαμίδα, λευκό τόνο, κιτρινόπτερο τόνο και μεγαλόφθαλμο τόνο. Ένα άτομο του κάθε είδους (ολόκληρα δείγματα ή φιλέτα) αγοράστηκε από προμηθευτές από τη Βίγκο (Ισπανία) εκτός από ένα από τη Γερμανία. Επιπλέον, αγοράστηκαν οκτώ κονσέρβες τόνου από τοπικές αγορές και σούπερ μάρκετ του Αμβούργου της Γερμανία (5 κονσέρβες) και της Βίγκο της Ισπανία (3 κονσέρβες).

Εικόνα 6: Πειραματικός σχεδιασμός. Για κάθε μεταχείριση παρασκευάστηκαν έξι μείγματα (DNA, FRE CAN). Παλαμίδα (Kpel), λευκός τόνος (Tala), κιτρινόπτερος (Talb) και μεγαλόφθαλμος (Tobe). Τα δείγματα ιστών ομογενοποιήθηκαν και εκχυλίστηκαν. Θραύσματα αμπλικονίων των BDR και CR προετοιμάστηκαν για NGS.



Η NGS είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για ευρεία εφαρμογή στην αυθεντικότητα των τροφίμων και αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη σημασία στην ανάλυση ρουτίνας. Στην παρούσα μελέτη, μια μέθοδος NGS που βασίζεται στον πολλαπλασιασμό δύο μιτοχονδριακών δεικτών κατέδειξε την καταλληλόλητα να ταυτοποιεί μεμειγμένα είδη τόνου μέσω πειραμάτων σε τεχνητά μείγματα. Είδη τόνου μπόρεσαν να αναγνωριστούν από όλα τα μείγματα σε όλα τα στάδια επεξεργασίας και προσμίξεις μπόρεσαν να ανιχνευθούν ημιποσοτικά σε κάποιο βαθμό. Η χρήση της περιοχής ελέγχου σε συνδυασμό με το κυτόχρωμα b αποδείχθηκε πολύτιμη.

Όσον αφορά τα προϊόντα του εμπορίου, μείγματα από διαφορετικά είδη εντοπίστηκαν σε δύο κονσέρβες που δηλώθηκαν ως "Atun claro" (Light tuna), μια από την Ισπανία και μια από τη Γερμανία. Στην Ισπανία, ο κιτρινόπτερος και ο μεγαλόφθαλμος ανήκουν στην ίδια εμπορική ονομασία και επιτρέπεται η κονσερβοποίηση ως "light tuna" ("atún claro" στα ισπανικά). Στη Γερμανία, δεν υπάρχει τέτοια διαφοροποίηση. Και στις δύο περιπτώσεις, ένα μείγμα από κιτρινόπτερο με μεγαλόφθαλμο μπορούσε να ανιχνευθεί. Οι κιτρινόπτεροι και οι μεγαλόφθαλμοι συχνά αναμειγνύονται λόγω της ταυτόχρονης εμφάνισης σε κοπάδια που οδηγεί σε συνδυαστική αλίευση σε συνδυασμό με την έλλειψη διαφορετικών μορφολογικών χαρακτηριστικών σε ένα μικρό μέγεθος. Τέλος, ένα δείγμα κονσερβοποιημένης παλαμίδας ήταν ασαφές. Ενώ τα αποτελέσματα της CR εντόπισαν μίξη με λευκό τόνο, μόνο ίχνη με <1 % βρέθηκαν στα αποτελέσματα με τη χρήση των εκκινητών BDR. Σε σύγκριση με τα άλλα εμπορικά δείγματα κονσέρβας, ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών αλληλουχιών βρέθηκαν σε αυτό το δείγμα. Μια πιθανότητα είναι τυχών λάθη που μπορεί να έγιναν κατά τον πολλαπλασιασμό ή/και την αλληλούχιση. Αυτό μπορεί επίσης να είναι συνέπεια της μεγάλης αποικοδόμησης του DNA κατά τη διαδικασία κονσερβοποίησης και μπορεί επίσης να οδηγήσει σε διαφορετικά ποσοτικά αποτελέσματα στις αναγνώσεις BDR και CR, π.χ. εάν πραγματοποιήθηκαν υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων στις περιοχές των εκκινητών λόγω της πιο έντονης βιομηχανικής επεξεργασίας κονσερβοποίησης. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι ερευνητές βρήκαν λευκό τόνο και στους δύο δείκτες, μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι τουλάχιστον ίχνη του είδους αυτού υπήρχαν στην κονσέρβα. Δεδομένου ότι ο λευκός τόνος έχει υψηλότερη εμπορική αξία από την παλαμίδα, μια μόλυνση της εγκατάστασης επεξεργασίας θα ήταν πιο πιθανή παρά μια σκόπιμη αντικατάσταση. Στα υπόλοιπα πέντε προϊόντα βρέθηκε ταύτιση με τα δηλωθέντα είδη, άρα σωστή επισήμανση.

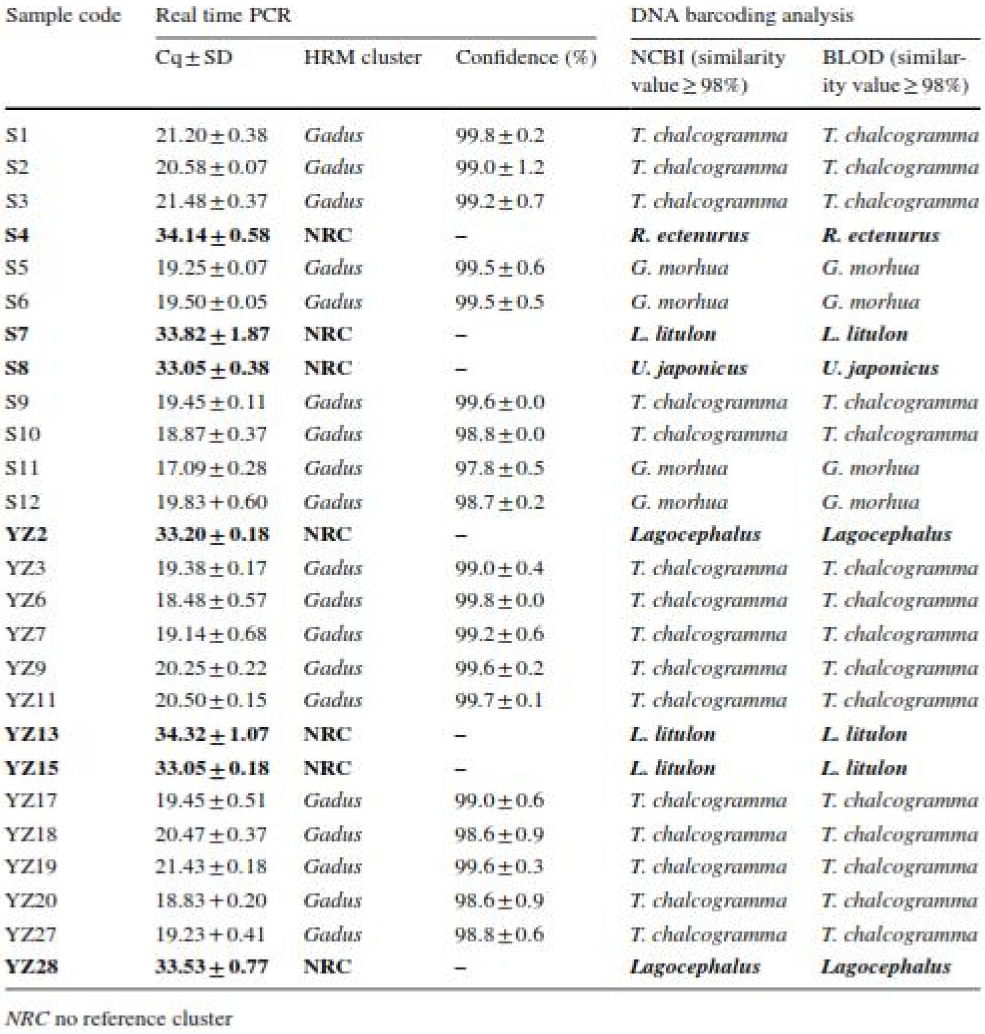
3.2.3 Ταυτοποίηση προϊόντων θαλασσινών με μεθόδους PCR

Η Κίνα είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής θαλασσινών στον κόσμο, καταναλώνοντας το 38% του παγκόσμιου συνόλου για το 2015. Ειδικότερα, οδηγούμενη από την ταχεία αστικοποίηση και την αύξηση του εισοδήματος, η κατανάλωση ακριβών προϊόντων θαλασσινών έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, με τον μπακαλιάρο να είναι ένα από τα πιο εκτιμόμενα και προσιτά. Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 3.2.1, στην Κίνα υπάρχουν σημαντικές νομοθετικές και διαχειριστικές ελλείψεις, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ακόμα εναρμόνιση γύρω από τον ορισμό του μπακαλιάρου, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται πολλά είδη Gadiformes για την παραγωγή προϊόντων μπακαλιάρου στην αγορά. Συγκεκριμένα, τα είδη *Gadus* (συμπεριλαμβανομένων των *G. morhua*, *G. macrocephalus* και *G. chalcogrammus*) αντιπροσωπεύουν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη Gadiformes για την παραγωγή προϊόντων μπακαλιάρου στην Κίνα. Άλλα πέντε είδη Gadiformes που συναντώνται περιστασιακά είναι τα *Pollachius virens, Melanogrammus aeglefinus, Merluccius merluccius, Merluccius australis* και *Albatrossia pectoralis*.

Λόγω των παραπάνω, οι Rongzhen Shi et al. (2020) ανέπτυξαν μια μέθοδο βασισμένη στην mini DNA barcoding και την HRM που να μπορεί να διαφοροποιεί τα προαναφερθέντα είδη *Gadus* και Gadiformes. Επιλέχθηκε μια τεχνική mini-barcoding βασισμένη στο 12S rRNA για τα παραπάνω είδη, λαμβάνοντας υπόψιν την γενετική παραλλακτικότητά τους για τον σχεδιασμό των εκκινητών κα της HRM. Ακόμη, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε προϊόντα μπακαλιάρου του εμπορίου, για την ταυτοποίηση των ειδών που περιέχουν και την επαλήθευση της επισήμανσής τους.

Για ανάλυση ειδικότητας, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν φρέσκα και κατεψυγμένα δείγματα από οκτώ είδη Gadiformes (*G. morhua, G. macrocephalus, G. chalcogrammus, Pollachius virens, Melanogrammus aeglefinus, Merluccius merluccius, Merluccius australis* και *Albatrossia pectoralis*) και 33 μη Gadiformes σαν πειραματικά υλικά, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μορφολογικά από ειδικούς. Επιπλέον, η ταυτότητα των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε με DNA Barcoding. Για επικύρωση της μεθόδου, συλλέχθηκαν 26 εμπορικά προϊόντα από τοπικές αγορές της Nanjing της Κίνας (πίνακας 9). Όλα τα προϊόντα ισχυρίζονταν ότι ήταν μπακαλιάρος, χωρίς αναφορά σε κάποιο συγκεκριμένο είδος.

Πίνακας 9: Εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου σε εμπορικά δείγματα (οι σκούρες λέξεις είναι τα δείγματα που ταυτοποιήθηκαν ως είδη έξω από την τάξη των Gadiformes)



Sample code	Real time PCR			DNA barcoding analysis	
	Cq ± SD	HRM cluster	Confidence (%)	NCBI (similarity value ≥ 98%)	BLOD (similarity value ≥ 98%)
S1	21.20 ± 0.38	*Gadus*	99.8 ± 0.2	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
S2	20.58 ± 0.07	*Gadus*	99.0 ± 1.2	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
S3	21.48 ± 0.37	*Gadus*	99.2 ± 0.7	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
S4	**34.14 ± 0.58**	**NRC**	–	***R. ectenurus***	***R. ectenurus***
S5	19.25 ± 0.07	*Gadus*	99.5 ± 0.6	*G. morhua*	*G. morhua*
S6	19.50 ± 0.05	*Gadus*	99.5 ± 0.5	*G. morhua*	*G. morhua*
S7	**33.82 ± 1.87**	**NRC**	–	***L. litulon***	***L. litulon***
S8	**33.05 ± 0.38**	**NRC**	–	***U. japonicus***	***U. japonicus***
S9	19.45 ± 0.11	*Gadus*	99.6 ± 0.0	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
S10	18.87 ± 0.37	*Gadus*	98.8 ± 0.0	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
S11	17.09 ± 0.28	*Gadus*	97.8 ± 0.5	*G. morhua*	*G. morhua*
S12	19.83 + 0.60	*Gadus*	98.7 ± 0.2	*G. morhua*	*G. morhua*
YZ2	**33.20 ± 0.18**	**NRC**	–	***Lagocephalus***	***Lagocephalus***
YZ3	19.38 ± 0.17	*Gadus*	99.0 ± 0.4	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ6	18.48 ± 0.57	*Gadus*	99.8 ± 0.0	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ7	19.14 ± 0.68	*Gadus*	99.2 ± 0.6	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ9	20.25 ± 0.22	*Gadus*	99.6 ± 0.2	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ11	20.50 ± 0.15	*Gadus*	99.7 ± 0.1	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ13	**34.32 ± 1.07**	**NRC**	–	***L. litulon***	***L. litulon***
YZ15	**33.05 ± 0.18**	**NRC**	–	***L. litulon***	***L. litulon***
YZ17	19.45 ± 0.51	*Gadus*	99.0 ± 0.6	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ18	20.47 ± 0.37	*Gadus*	98.6 ± 0.9	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ19	21.43 ± 0.18	*Gadus*	99.6 ± 0.3	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ20	18.83 + 0.20	*Gadus*	98.6 ± 0.9	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ27	19.23 + 0.41	*Gadus*	98.8 ± 0.6	*T. chalcogramma*	*T. chalcogramma*
YZ28	**33.53 ± 0.77**	**NRC**	–	***Lagocephalus***	***Lagocephalus***

NRC no reference cluster

Όσον αφορά την ταξινόμηση κατά ομάδες, όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανόντουσαν στην ομάδα *Gadus*, χωρίς καθορισμένη ομάδα αναφοράς για τα επτά δείγματα με κωδικούς S4, S7, S8, YZ2, YZ13, YZ15 και YZ28 (Πίνακας 9). Τα αποτελέσματα της HRM έδειξαν την ύπαρξη ενός είδους μπακαλιάρου στα προϊόντα. Για τα επτά δείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω δεν ελήφθησαν καμπύλες πολλαπλασιασμού, γεγονός που καταδεικνύει την έλλειψη μπακαλιάρου στα εν λόγω δείγματα. Τέλος, με την DNA mini-barcoding, τα δείγματα της ομάδας *Gadus* ταυτοποιήθηκαν ως τα είδη *G. chalcogrammus* και *G. morhua.*, ενώ τα επτά δείγματα χωρίς ομάδα αναφοράς ταυτοποιήθηκαν ως Rhynchoconger *ectenurus* (Anguilliformes, Congridae), *Lophius* *litulon* (Lophiiformes, Lophiidae), *Upeneus japonicas* (Perciformes, Mullidae) και *Lagocephalus* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae).

Συγκεκριμένα, το *Upeneus japonicas* είναι ένα μικρό ψάρι με χαμηλή εμπορική αξία και η επισήμανσή του αποτελεί ξεκάθαρα εξαπάτηση των καταναλωτών. Όσον αφορά το *Lagocephalus,* πολλά είδη του έχουν απαγορευτεί να πωλούνται στην Κίνα λόγω της επικινδυνότητάς τους για την υγεία και αυτή η απαγόρευση δυστυχώς παρακάμπτεται με τη επισήμανσή του ως μπακαλιάρο. Τέλος, τα προϊόντα από *Rhynchoconger ectenurus* και *Lophius litulon* επισημασμένα ως μπακαλιάρος, επίσης αποκτούν βελτιωμένη πρόσβαση στην αγορά, λόγω της μεγάλης προτίμησης των Κινέζων καταναλωτών στον μπακαλιάρο.

Η απάτη στα θαλασσινά είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα που αυξάνεται κάθε χρόνο. Ως εκ τούτου, έχουν διεξαχθεί πολλές σχετικές μελέτες σχετικά με αυτό το θέμα σε διάφορες χώρες. Αν και η απάτη στα θαλασσινά έχει πολλές μορφές, όπως η αντικατάσταση ειδών, η λανθασμένη επισήμανση των ειδών και της προέλευσής τους, εκτός από τη νοθεία, η υποκατάσταση ειδών υψηλής αξίας με φθηνότερα είναι μία από τις πιο συνηθισμένες απάτες στον τομέα των ιχθυηρών και των θαλασσινών.

Τα κεφαλόποδα αποτελούνται από 28 οικογένειες και λιγότερα από 1000 είδη, πολλά από τα οποία είναι εμπορικά σημαντικοί θαλάσσιοι πόροι. Το χταπόδι είναι ένας γενικός όρος για τα είδη που ανήκουν στα Octopods και είναι ένα πολύτιμο τρόφιμο λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ασβέστιο και βιταμίνες και των χαμηλών θερμίδων που περιέχει. Μεταξύ των χταποδιών, το μεγάλο μπλε χταπόδι (*Octopus cyanea*), το γιγαντιαίο χταπόδι του Ειρηνικού (*Enteroctopus dofleini*) και το κοινό χταπόδι (*Octopus vulgaris*) είναι τα πιο κοινά είδη του ανατολικού Ειρηνικού ωκεανού, γεγονός που τα καθιστά σημαντικά για την αλιεία. Η ταυτοποίηση των ειδών κεφαλόποδων από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, βασίστηκε στο σχήμα των δοντιών, στους δακτυλίους των βεντούζων, τον αριθμό των σειρών των βεντούζων, το μήκος και το σχήμα των πτερυγίων και των ουρών. Ωστόσο, τα είδη αυτά έχουν παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διάκρισή τους οπτικά. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των κεφαλόποδων μέσω των μορφολογικών χαρακτηριστικών μπορεί να είναι ανακριβής επειδή το φύλο, η ηλικία, η ανάπτυξη, η σεξουαλική ωριμότητα και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά τους.

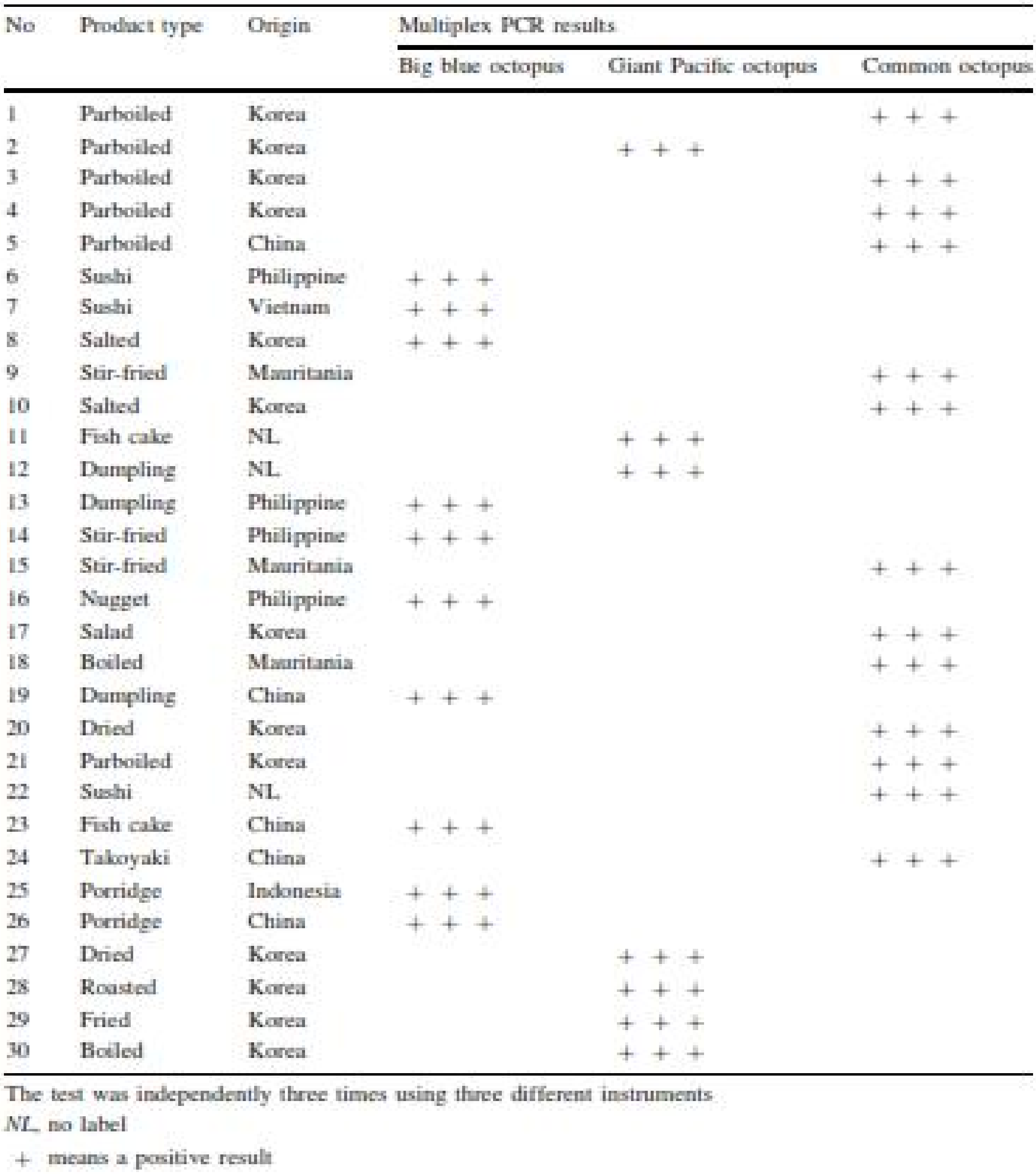
Καθώς η αγορά επεξεργασμένων θαλασσινών επεκτείνεται σταδιακά, πολλά εμπορικά προϊόντα χταποδιού έχουν εντοπιστεί παγκοσμίως, όπως τα κατεψυγμένα, τα μαγειρεμένα και τα κονσερβοποιημένα. Ωστόσο, με τα επεξεργασμένα τρόφιμα, είναι δύσκολος ο εντοπισμός μέσω της μορφολογίας, επειδή τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε απάτη. Στην πραγματικότητα, η υποκατάσταση των ειδών των κεφαλόποδων είναι συχνή και έχουν αναφερθεί ορισμένες σχετικές περιπτώσεις. Επομένως, για να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα είδη χταποδιών και να διασφαλιστεί η σωστή επισήμανση των εμπορικών προϊόντων διατροφής, απαιτούνται ειδικές, ευαίσθητες και αξιόπιστες μέθοδοι ανίχνευσης.

Για αυτό, οι Yu-Min Lee eta al. (2022) ανέπτυξαν μια αποτελεσματική και αξιόπιστη Multiplex PCR για την ταυτοποίηση τριών χταποδιών, χρησιμοποιώντας ειδο-ειδικό σετ εκκινητών. Στη συνέχεια, για να επιβεβαιωθεί η εφαρμοσιμότητά της, η παρούσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε εμπορικά προϊόντα τροφίμων. Το Εθνικό Ινστιτούτο Αξιολόγησης Ασφάλειας Τροφίμων και Φαρμάκων της Ν. Κορέας παρείχε στους ερευνητές δείγματα αναφοράς μεγάλου μπλε χταποδιού (*Octopus cyanea*), γιγάντιου χταποδιού του Ειρηνικού (*Enteroctopus dofleini*) και κοινού χταποδιού (*Octopus vulgaris*). Επιπλέον, αγόρασαν 14 μη στοχευόμενα είδη από το διαδίκτυο και από σούπερ μάρκετ στην Κορέα. Τα είδη αυτά ήταν: το μακρύχερο χταπόδι *(Octopus minor*), το webfoot χταπόδι (*Octopus ocellatus*), η χρυσή σουπιά (*Sepia esculenta*), το ιαπωνικό ιπτάμενο καλαμάρι (*Todarodes pacificus*), το κοντοπτέρυγο καλαμάρι Αργεντινής (*Illex argentinus*), το ιπτάμενο καλαμάρι jumbo (*Dosidicus gigas*), το καλαμάρι diamondback (*Thysanoteuthis rhombus*), το καλαμάρι swordtip (*Loligo edulis*), το καλαμάρι spear (*Loligo bleekeri*), το ιαπωνικό καλαμάρι *(Loliolus japonica*), το καλαμάρι beka (*Loliolus beka*) και το μεγαλοπτέρυγο καλαμάρι του υφάλου (*Sepioteuthis lessoniana*). Στη συνέχεια, όλα τα εμπορικά προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως χταπόδια συλλέχθηκαν από την αγορά για παρακολούθηση. Τα εμπορικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν υποστεί επεξεργασία με διάφορες μεθόδους και η προέλευσή τους ήταν η Κορέα, οι Φιλιππίνες, το Βιετνάμ, η Μαυριτανία, η Ινδονησία και η Κίνα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν την αναπτυχθείσα δοκιμασία Multiplex PCR ως κατάλληλη για τον εντοπισμό ειδών-στόχων τόσο σε ακατέργαστα όσο και σε επεξεργασμένα δείγματα. Καταδείχθηκε η εφαρμοσιμότητα της δοκιμασίας Multiplex PCR, χρησιμοποιώντας 30 εμπορικά προϊόντα που είχαν επισημανθεί ως χταπόδια. Όλα τα εμπορικά προϊόντα ήταν διαφόρων τύπων, συμπεριλαμβανομένων των χταποδιών parboiled, sushi, μπουκιές, stir-fried χταπόδι, salted χταπόδι, μπουκιές dumpling, σαλάτα, αποξηραμένο χταπόδι, κέικ ψαριού, takoyaki, χυλός, ψητό χταπόδι, τηγανητό χταπόδι και βρασμένο χταπόδι (πίνακας 10). Από την εφαρμογή της δοκιμής, οι ερευνητές παρατήρησαν ότι όλα τα προϊόντα ήταν πανομοιότυπα, σε σύγκριση με την ετικέτα του δείγματος (πίνακας 10). Ακολούθως, η δοκιμή επικυρώθηκε με τη χρήση τριών οργάνων PCR στο εργαστήριο. Τα πειραματικά αποτελέσματα ήταν τα ίδια.

Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής, τα εγχώρια είδη (της Κορέας) χταποδιών που αναγνωρίστηκαν ήταν τα το κοινό χταπόδι και το γιγαντιαίο χταπόδι του Ειρηνικού, εκτός από τα εισαγόμενα είδη χταποδιών, συμπεριλαμβανομένου του κοινού χταποδιού και του μεγάλου μπλε χταποδιού. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το σχετικά φθηνό μεγάλο μπλε χταπόδι χρησιμοποιήθηκε μόνο ως εισαγόμενο εμπορικό προϊόν.

Πίνακας 10: Εφαρμογή και επικύρωση της μεθόδου Multiplex PCR σε εμπορικά προϊόντα.



No	Product type	Origin	Multiplex PCR results		
			Big blue octopus	Giant Pacific octopus	Common octopus
1	Parboiled	Korea			+ + +
2	Parboiled	Korea		+ + +	
3	Parboiled	Korea			+ + +
4	Parboiled	Korea			+ + +
5	Parboiled	China			+ + +
6	Sushi	Philippine	+ + +		
7	Sushi	Vietnam	+ + +		
8	Salted	Korea	+ + +		
9	Stir-fried	Mauritania			+ + +
10	Salted	Korea			+ + +
11	Fish cake	NL		+ + +	
12	Dumpling	NL		+ + +	
13	Dumpling	Philippine	+ + +		
14	Stir-fried	Philippine	+ + +		
15	Stir-fried	Mauritania			+ + +
16	Nugget	Philippine	+ + +		
17	Salad	Korea			+ + +
18	Boiled	Mauritania			+ + +
19	Dumpling	China	+ + +		
20	Dried	Korea			+ + +
21	Parboiled	Korea			+ + +
22	Sushi	NL			+ + +
23	Fish cake	China	+ + +		
24	Takoyaki	China			+ + +
25	Porridge	Indonesia	+ + +		
26	Porridge	China	+ + +		
27	Dried	Korea		+ + +	
28	Roasted	Korea		+ + +	
29	Fried	Korea		+ + +	
30	Boiled	Korea		+ + +	

The test was independently three times using three different instruments

NL, no label

\+ means a positive result

3.3 Γαλακτοκομικά Προϊόντα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα γενικά ορίζονται ως τρόφιμα που παρασκευάζονται από γάλα θηλαστικών. Λόγω της οικονομικής σημασίας, του κινδύνου αλλεργιών και των θρησκευτικών πρακτικών που σχετίζονται με αυτή την κατηγορία προϊόντων, η ανάπτυξη τεχνικών για την αξιολόγηση της γνησιότητας και της νοθείας των τροφίμων που προέρχονται από το γάλα είναι ένα ζήτημα πρωταρχικής σημασίας. Η χρήση μοριακών εργαλείων για τον χαρακτηρισμό και τον εντοπισμό των γαλακτοκομικών προϊόντων κερδίζει μεγάλη αποδοχή (Galimberti et al., 2013).

3.3.1 Ταυτοποίηση γαλακτοκομικών με μεθόδους PCR

Η εκτροφή γαλακτοπαραγωγών αιγών καθιερώνεται ως κερδοφόρα δραστηριότητα στη Βραζιλία, μετά τη ρύθμιση του εμπορίου της από το Υπουργείο Γεωργίας, Κτηνοτροφίας και Τροφίμων της Βραζιλίας (MAPA). Το 2000, η MAPA θέσπισε, μέσω της κανονιστικής οδηγίας αριθ. 37 (Βραζιλία, 2000), τις προϋποθέσεις για την παραγωγή, την ταυτότητα και τις ελάχιστες απαιτήσεις του κατσικίσιου γάλακτος, καθώς και τα κριτήρια για την παστερίωση και την αποστείρωση του τελικού προϊόντος. Το 90% της ετήσιας παραγωγής κατσικίσιου γάλακτος παράγεται στη βορειοανατολική Βραζιλία.

Το κατσικίσιο γάλα είναι μια πλήρης τροφή, πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και μικρά μόρια λίπους, τα οποία το καθιστούν ιδιαίτερα εύπεπτο σε σύγκριση με το γάλα άλλων ζώων. Αυτά τα θρεπτικά χαρακτηριστικά συνέβαλαν στην ανάπτυξη της αγοράς για τα κατσικίσια γαλακτοκομικά προϊόντα και κατά συνέπεια έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των κτηνοτρόφων σε διάφορες περιοχές της Βραζιλίας.

Το κατσικίσιο γάλα θεωρείται μια καλή εναλλακτική λύση για το ανθρώπινο και το αγελαδινό γάλα για διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως η αλλεργία, η ατοπία και οι φλεγμονώδεις ασθένειες. Η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα είναι μια συχνή κατάσταση, που επηρεάζει το 5,7% των παιδιών στη Βραζιλία κατά τη διάρκεια των πρώτων 3 ετών της ζωής τους και το 12 έως 30% των βρεφών ηλικίας κάτω των 3 μηνών, με συχνότητα που φτάνει το 20% σε ορισμένες περιοχές. Η υποκατάσταση του αγελαδινού γάλακτος με κατσικίσιο γάλα αναφέρεται ότι επιλύει μεταξύ 30 έως 40% των προβληματικών περιπτώσεων.

Παρά τα διάφορα πλεονεκτήματα, η αγορά του κατσικίσιου γάλακτος και των παραγώγων του στη Βραζιλία δεν έχει ακόμη αναπτυχθεί πλήρως. Ένα από τα προβλήματα είναι η "κατσικίσια" μυρωδιά του γάλακτος και των προϊόντων του, η οποία μπορεί να διορθωθεί στις φάρμες με την απομόνωση της αίγας κατά τη διάρκεια του αρμέγματος. Επίσης, η ψυχρή αποθήκευση του γάλακτος αυξάνει την κατσικίσια γεύση, ενώ η θερμική επεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα μια ελαφρά μείωση. Ένα άλλο θέμα είναι το υψηλότερο κόστος αυτών των γαλακτοκομικών προϊόντων σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα, λόγω του μικρότερου μεγέθους των κατσικιών και την ακανόνιστη παραγωγή γάλακτος κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου στις Βραζιλιάνικες φάρμες αιγών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παραγωγή γάλακτος αίγας δεν έχει ακόμη εδραιωθεί πλήρως στη Βραζιλία και δεν υπάρχουν κανονισμοί ή οδηγίες για την αξιολόγηση των κατσικίσιων γαλακτοκομικών προϊόντων που θα μπορούσαν να αποτρέψουν τον λανθασμένο χαρακτηρισμό του τελικού προϊόντος. Αυτή η έλλειψη κανονισμών έχει οδηγήσει σε δόλιες πρακτικές, όπως η ανάμειξη διαφορετικών συγκεντρώσεων αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος για τη μείωση του κόστους και, ταυτόχρονα, για να μειωθεί το έντονο άρωμα του κατσικίσιου γάλακτος και να προστεθεί όγκος στο τελικό προϊόν.

Έτσι, οι L.P. Golinelli et al. (2014) εφάρμοσαν ειδο-ειδική PCR για τον εντοπισμό νοθείας με αγελαδινό γάλα σε φρέσκο κατσικίσιο τυρί, καθώς και οργανοληπτικό έλεγχο με τριγωνική δοκιμή για να διαπιστώσουν αν η νοθεία θα μπορούσε να γίνει αντιληπτή από τους καταναλωτές. Η ειδο-ειδική PCR έχει αποδειχθεί αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο της γνησιότητας αυτής της κατηγορίας τροφίμων, επειδή μια ειδική αλληλουχία-στόχος (π.χ. 12S rRNA, 16S rRNA, *cytb*) μπορεί να ανιχνευθεί σε μήτρες που περιέχουν μια δεξαμενή ετερογενούς DNA, όπως το γάλα (Galimberti et al., 2013).

Οι ερευνητές συνέλεξαν δείγματα αίματος από 10 αγελάδες (φυλή Girolando) και 10 κατσίκες (φυλή Saanen), για την δημιουργία προτύπων DNA που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου PCR για την ειδο-ειδική ταυτοποίηση. Ακόμα, αγοράστηκαν είκοσι κατσικίσια τυριά από 4 διαφορετικές μάρκες από καταστήματα 3 αλυσίδων σούπερ μάρκετ στη μητροπολιτική περιοχή του Ρίο ντε Τζανέιρο, για μια περίοδο 12 μηνών από το 2010 έως το 2011, σύμφωνα με την εποχικότητα του κατσικίσιου γάλακτος και συνεπώς, της διαθεσιμότητας των τυριών στην αγορά. Τα δείγματα κατανεμήθηκαν ως εξής: 7 διαφορετικές παρτίδες από τις μάρκες I και II και 3 παρτίδες από τις μάρκες III και IV (αυτές οι 2 τελευταίες μάρκες δεν ήταν διαθέσιμες καθ’ όλη τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας).

Η μελέτη έδειξε την ύπαρξη αγελαδινού γάλακτος σε όλα τα εμπορικά προϊόντα φρέσκου κατσικίσιου τυριού. Η εσφαλμένη επισήμανση δεν παραπλανά μόνο τον καταναλωτή, αλλά μπορεί επίσης να είναι επιβλαβής για την υγεία, ιδίως σε άτομα που είναι αλλεργικά στην πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος και πρέπει να χρησιμοποιούν κατσικίσιο γάλα ως υποκατάστατο. Σύμφωνα με το Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Βραζιλία, 1952), ο όρος "γάλα", εάν δεν ορίζεται διαφορετικά, σημαίνει το προϊόν που προέρχεται από την πλήρη, αδιάλειπτη άλμεξη καλά ταϊσμένων και ξεκούραστων υγιών αγελάδων. Το γάλα άλλων ζώων θα πρέπει να ονομάζεται ανάλογα με το είδος που το παράγει και πρέπει να προσδιορίζεται σαφώς στην ετικέτα του προϊόντος. Έτσι, δεν υφίσταται ο ισχυρισμός ορισμένων τοπικών λιανοπωλητών, ότι η προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα και σε παράγωγά του βελτιώνει την αποδοχή των προϊόντων αυτών στην καταναλωτική αγορά.

Για να είναι οικονομικά σημαντική, η δόλια προσθήκη αγελαδινού γάλακτος θα πρέπει να υπερβαίνει το 10%. Για τον έλεγχος της αντίληψης των καταναλωτών για τη σύνθεση του τυριού, οι ερευνητές παρασκεύασαν φρέσκα τυριά με τις ακόλουθες αναλογίες αγελαδινού-κατσικίσιου γάλακτος: 0:100, 10:90, 25:75, 40:60, 55:45 και 70:30 και πραγματοποίησαν τριγωνική οργανοληπτική δοκιμή. Σαράντα έξι συμμετέχοντες στο πάνελ προσδιόρισαν το διαφορετικό δείγμα όταν το δείγμα αναφοράς συγκρίθηκε με το τυρί με 10% πρόσθετο αγελαδινό γάλα. 56 άτομα ήταν σε θέση να επιλέξουν το διαφορετικό δείγμα όταν το δείγμα αναφοράς αξιολογήθηκε σε σύγκριση με ένα δείγμα με 25% αγελαδινό γάλα. 43 καταναλωτές έκριναν σωστά όταν το τυρί με 40% αγελαδινό γάλα εξετάστηκε σε σύγκριση με το προϊόν αναφοράς. Τέλος, 67 και 62 άτομα επέλεξαν το σωστό δείγμα όταν τυριά με 55 και 70% αγελαδινό γάλα, αντίστοιχα, δοκιμάστηκαν έναντι του τυριού αναφοράς (100% κατσικίσιο τυρί). Όλες οι αναλογίες προστιθέμενου αγελαδινού γάλακτος, ακόμη και η χαμηλότερη ποσότητα του 10%, προσδιορίστηκαν από τους συμμετέχοντες σε αυτή τη μελέτη. Η μελέτη έδειξε ότι ακόμη και καταναλωτές άπειροι με το κατσικίσιο τυρί ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν το δείγμα με πρόσθετο αγελαδινό γάλα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παραγωγοί θα πρέπει να γνωρίζουν ότι ακόμη και ελάχιστη αλλοίωση μπορεί να γίνει αντιληπτή από τους καταναλωτές και μπορεί να επηρεάσει την προτίμησή τους για ορισμένες μάρκες.

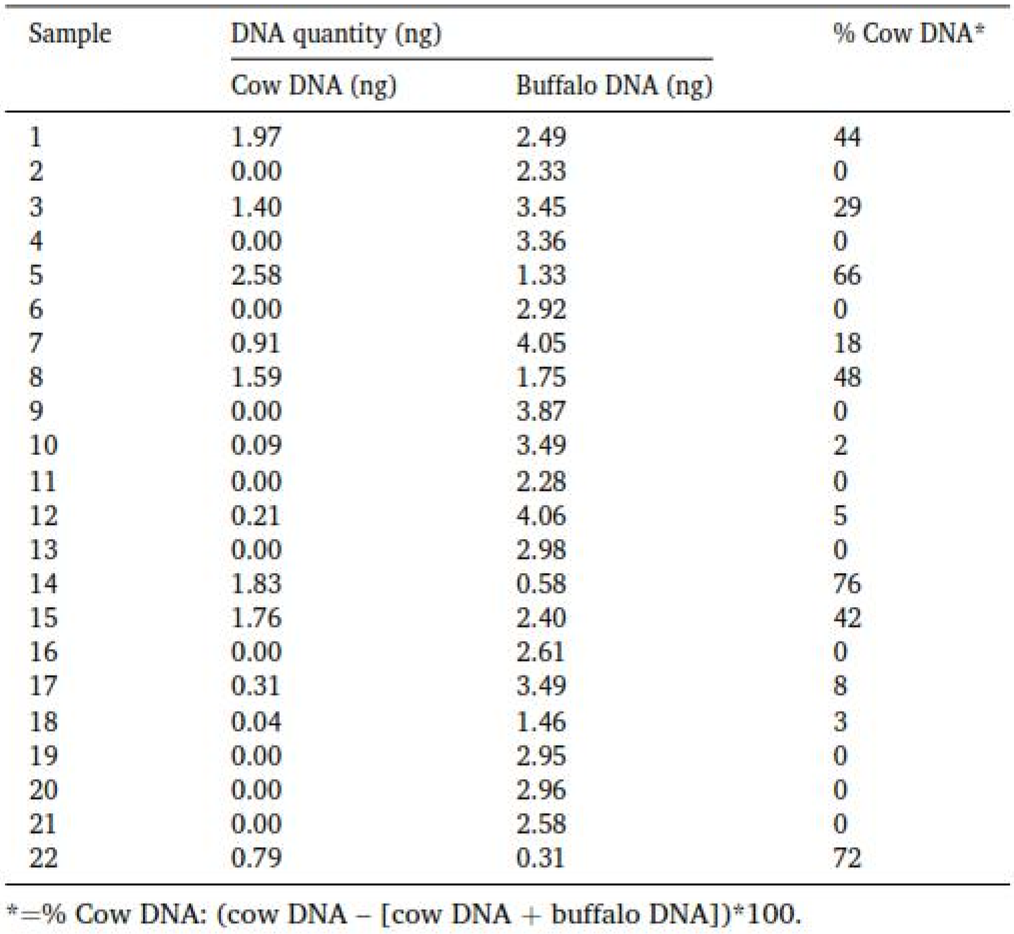
Μέθοδοι με βάση την PCR για την ανίχνευση και τη διαφοροποίηση των ειδών έχουν συνήθως εφαρμοστεί λόγω της υψηλής τους ειδικότητας, ευαισθησίας και ταχύτητας. Η χρήση τους σε εμπορικά γαλακτοκομικά προϊόντα είναι εφικτή, λόγω της παρουσίας ανακτήσιμου DNA που προέρχεται από σωματικά κύτταρα (λευκοκύτταρα και κύτταρα του μαστού), ακόμη και μετά από θερμική επεξεργασία. Τα επίπεδα σωματικών κυττάρων στο γάλα επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως το είδος του ζώου, το επίπεδο παραγωγής γάλακτος, το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, τους ατομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και τις πρακτικές διαχείρισης.

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες αναπτύχθηκαν για να ανιχνεύσουν μόνο την παρουσία της νοθείας και όχι για να ποσοτικοποιήσουν τον βαθμό της μόλυνσης. Επιπλέον, πολλαπλασιασμοί των διαφορετικών περιοχών των ειδο-ειδικών θραυσμάτων DNA με βάση την PCR τελικού σημείου με επακόλουθη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, δεν παρέχει ποσοτικοποίηση των στόχων. Η μόλυνση με DNA αγελάδας κατά την επεξεργασία των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορεί να συμβεί σκόπιμα ή ακούσια. Έτσι, απαιτούνται πειστικές αποδείξεις νοθείας εκτός από την ανίχνευση, δηλαδή την ποσοτικοποίηση των συστατικών του τροφίμου. Για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ποσοτικής PCR (qPCR). Εκτός από την καθιέρωση ενός ορίου ανίχνευσης, υπολογίζει επίσης την ποσότητα του μολυσματικού DNA. Ως εκ τούτου, οι Giglioti et al. (2022) δοκίμασαν να αναπτύξουν μια qPCR για την ταυτόχρονη ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της παρουσίας DNA αγελάδας σε γαλακτοκομικά προϊόντα από βουβάλια, κατσίκες και πρόβατα.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν δώδεκα δείγματα γάλακτος (3 αγελαδινού, 3 βουβαλίσιου, 3 κατσίκας και 3 προβάτου), καθώς και διαφόρους τύπους τυριών: 22 δείγματα βουβαλίσιων, 3 δείγματα κατσικίσιων και 3 δείγματα προβατίσιων.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της νοθείας με την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα από κατσίκες, πρόβατα ή βουβάλια μπορεί να πραγματοποιηθεί με τα εξής δύο βήματα: (i) ανίχνευση του DNA αγελάδας ή/και (ii) ποσοτικοποίηση του DNA αγελάδας στο δείγμα (πραγματοποιείται μόνο όταν ανιχνεύεται η παρουσία DNA αγελάδας). Η ποσοτικοποίηση της μόλυνσης μπορεί να αποτελέσει ουσιαστικό παράγοντα για την κατανόηση των λόγων της νόθευσης, δεδομένου ότι διάφορες ποσότητες αγελαδινού DNA στα δείγματα μπορεί να σχετίζονται με σκόπιμη ή ακούσια επιμόλυνση. Μεταξύ των δειγμάτων DNA από πρόβειο και κατσικίσιο τυρί, δεν υπήρξε επαληθευμένη παρουσία DNA αγελάδας. Όσον αφορά τα δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων βουβαλιού, αγελαδινό DNA ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε σε 12 δείγματα (πίνακας 11).

Πίνακας 11: Ποσότητα (ng) DNA αγελάδας και βουβαλιού από δείγματα βουβαλίσιων τυριών και ποσοστό αγελαδινού DNA που ανιχνεύθηκε σε κάθε δείγμα.



Sample	DNA quantity (ng)		% Cow DNA*
	Cow DNA (ng)	Buffalo DNA (ng)	
1	1.97	2.49	44
2	0.00	2.33	0
3	1.40	3.45	29
4	0.00	3.36	0
5	2.58	1.33	66
6	0.00	2.92	0
7	0.91	4.05	18
8	1.59	1.75	48
9	0.00	3.87	0
10	0.09	3.49	2
11	0.00	2.28	0
12	0.21	4.06	5
13	0.00	2.98	0
14	1.83	0.58	76
15	1.76	2.40	42
16	0.00	2.61	0
17	0.31	3.49	8
18	0.04	1.46	3
19	0.00	2.95	0
20	0.00	2.96	0
21	0.00	2.58	0
22	0.79	0.31	72

*=% Cow DNA: (cow DNA – [cow DNA + buffalo DNA])*100.

Ένα προϊόν που είναι εξαιρετικά επιρρεπές σε νοθεία είναι το τυρί Φέτα. Η Φέτα είναι ένα μαλακό λευκό τυρί που ωριμάζει σε άλμη και παραδοσιακά παρασκευάζεται στην Ελλάδα. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (IP/02/866, 2002) ενέκρινε τη φέτα ως ΠΟΠ. Μόνο τα τυριά που παράγονται στην ηπειρωτική Ελλάδα και το νησί της Λέσβου και παρασκευάζονται κυρίως από ακριβό πρόβειο γάλα, ή από μείγμα πρόβειου γάλακτος και έως 30% κατσικίσιου γάλακτος από την ίδια περιοχή, μπορούν να φέρουν την ονομασία Φέτα. Σύμφωνα με κυβερνητική ρύθμιση, η Φέτα μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο μόνο μετά από περίοδο ωρίμανσης που διαρκεί τουλάχιστον 60 ημέρες. Παρόμοια λευκά τυριά σε άλμη βρίσκονται σε πολλές χώρες της ανατολικής Μεσογείου, τα οποία συχνά παρασκευάζονται εν μέρει ή εξ ολοκλήρου από αγελαδινό γάλα και δεν μπορούν νομίμως να ονομαστούν φέτα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι Ganopoulos et al. (2013) πραγματοποίησαν μια μελέτη στην οποία έκαναν χρήση HRM για τον έλεγχο της γνησιότητας και την ποσοτική ανίχνευση στην ελληνική Φέτα ΠΟΠ. Δείγματα αίματος από 5 πρόβατα (*Ovis aris*), 5 κατσίκες (*Capra hircus*) και 5 βοοειδή (*Bos taurus*) χρησιμοποιήθηκαν ως θετικά δείγματα ελέγχου για τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Παρομοίως, εξετάστηκαν 5 δείγματα πρόβειου γάλακτος και 5 δείγματα κατσικίσιου γάλακτος. Τα δείγματα τυριού περιλάμβαναν οκτώ εμπορικά δείγματα Φέτας ΠΟΠ, τρία δείγματα αιγοπρόβειου τυριού (άγνωστο μείγμα πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος - όχι ΠΟΠ) και ένα δείγμα που φέρεται να παρασκευάζεται μόνο με κατσικίσιο γάλα (όχι ΠΟΠ). Επίσης, οι ερευνητές παρασκευάσαν δικά τους δείγματα αναμιγνύοντας διάφορες αναλογίες πρόβειου, κατσικίσιου και αγελαδινού γάλακτος για να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα αναφοράς.

Η μέθοδος αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική και ακριβής ανιχνεύοντας έως και 0,1% της προσθήκης γάλακτος βοοειδών και προσδιορίζοντας ποσοτικά την αναλογία κατσικίσιου προς πρόβειο γάλα. Όλα τα δείγματα φέτας βρέθηκαν ανόθευτα από αγελαδινό γάλα. Μόνο ένα δείγμα βρέθηκε ότι περιείχε κατσικίσιο γάλα πάνω από 30%, επομένως δεν θα έπρεπε να ονομάζεται Φέτα.

3.3.2 Ταυτοποίηση γαλακτοκομικών με DNA Barcoding

Για να επιτευχθεί ακριβής χαρακτηρισμός της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων, είναι απαραίτητη μια πολυεπίπεδη μοριακή προσέγγιση. Ειδικότερα, προσεγγίσεις όπως η PCR-DGGE, μπορούν να είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση της μικροβιακής σύνθεσης και προέλευσης των μεταποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ οι τεχνικές DNA Barcoding είναι χρήσιμες για την παροχή ενός αξιόπιστου χαρακτηρισμού της σύνθεσης του νωπού γάλακτος (Galimberti et al., 2013).

Το γάλα είναι ένα εξαιρετικά θρεπτικό τρόφιμο, καθώς παρέχει ταυτόχρονα πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα και λίπος. Το λίπος του γάλακτος αποτελεί ένα από τα πιο πολύτιμα, από οικονομική άποψη, βρώσιμα λιπαρά προϊόντα. Κατά συνέπεια, η νόθευση του λίπους του γάλακτος με φθηνότερα ξένα λίπη είναι ένα σημαντικό ζήτημα της γαλακτοβιομηχανίας. Τα φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται συνήθως για την υποκατάσταση/νόθευση του λίπους του γάλακτος στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι καθολικοί DNA barcodes έχουν μεγάλες δυνατότητες να χρησιμεύσουν ως διαγνωστικοί δείκτες γνησιότητας/παραποίησης τροφίμων. Δεδομένου ότι είναι συντηρημένες αλληλουχίες, μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν από ένα ευρύ φάσμα ταξινομικών ομάδων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η ανάγκη σχεδιασμού ειδικών δοκιμασιών για την ανίχνευση κάθε πιθανού νοθευτικού είδους που στοχεύουμε να ανιχνεύσουμε. Μόλις χρησιμοποιηθούν οι barcodes από γονιδιώματα οργανιδίων, το πρόβλημα της αποικοδόμησης του DNA κατά την επεξεργασία των τροφίμων παρακάμπτεται. Επιπλέον, οι διαειδικοί πολυμορφισμοί εντός των αλληλουχιών του barcode, επιτρέπουν την ανίχνευση της σύστασης των ειδών σε μικτά δείγματα.

Οι διαειδικοί INDEL barcodes (εισαγωγή/απομάκρυνση) είναι μια απλή και ισχυρή μέθοδος που έχει επίσης αποδείξει τις δυνατότητές της σε εγκληματολογικές εφαρμογές εκτός από τη γονιδιωματική ανάλυση τροφίμων. Έτσι, οι Ayse Ozgur Uncu και Ali Tevfik Uncu (2020) εφάρμοσαν την DNA Barcoding INDEL για την ανίχνευση νοθείας φυτικών ελαίων σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Κατά συνέπεια, δύο γονοτυπικές δοκιμασίες barcode που βασίζονται στην PCR-CE (PCR-τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης) περιγράφηκαν στο παρούσα μελέτη. Οι δύο δοκιμασίες αλληλοσυμπληρώνονται όσον αφορά την ευαισθησία και την ικανότητα διάκρισης ειδών.

Για την διεξαγωγή της έρευνας, οι ερευνητές προμηθεύτηκαν δείγματα διαυγασμένου βουτήρου (ghee) που παράγεται από αγελαδινό γάλα και παστεριωμένο ημιαποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα (περίπου 1,5% λίπος γάλακτος) από έναν τοπικό παραγωγό γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν ως ανόθευτα δείγματα αναφοράς, καθώς και για την προετοιμασία του συνόλου των νοθευμένων δειγμάτων. Δείγματα αναφοράς φύλλων καλαμποκιού (*Zea mays* L.), σόγιας (*Glycine max* (L.) Merr.), ελαιοκράμβης (*Brassica napus* L.) και ηλίανθου (*Helianthus annuus* L.) προσφέρθηκαν από το Bahri Dagdas International Agricultural Dagdas (Konya, Τουρκία). Αντίστοιχα φυτικά έλαια (refined) αγοράστηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης τροφίμων. Το διαυγασμένο βούτυρο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τεσσάρων διαφορετικών σειρών πρόσμιξης, κάθε μία με ένα διαφορετικό τύπο φυτικού ελαίου (καλαμποκιού, σόγιας, ηλιέλαιο και κραμβέλαιο). Το ημιαποβουτυρωμένο γάλα εμπλουτίστηκε με 2% φυτικό έλαιο (w/w) για την παρασκευή νοθευμένων δειγμάτων γάλακτος. Τα νοθευμένα δείγματα γάλακτος χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή γιαουρτιού.

Ως αποτέλεσμα της παρούσας εργασίας, οι ερευνητές πρότειναν το ιντρόνιο *trnL* (UAA) ως τον διακριτικό barcode για την εξακρίβωση της ταυτότητας του είδους του φυτικού ελαίου που χρησιμοποιείται για τη νοθεία γαλακτοκομικών προϊόντων. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση του barcode όχι μόνο ανίχνευσε την παρουσία φυτικού υλικού σε ένα δείγμα γαλακτοκομικών προϊόντων, αλλά αποκάλυψε επίσης την πηγή του είδους της νοθείας. Ωστόσο, ένας δεύτερος στόχος της PCR, ο μικρός βρόχος P6 του ιντρονίου, συνέβαλε σημαντικά στην ευαισθησία και την αναπαραγωγιμότητα της προσέγγισης PCR-CE όταν εφαρμόστηκε σε εμφωλιάζουσα μορφή. Παρά το γεγονός ότι ένα προϊόν απάτης αναμένεται να περιλαμβάνει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες του νοθευτικού υλικού για σημαντικό οικονομικό όφελος, είναι σημαντικό η μορφή της ανάλυσης να είναι επαρκώς ευαίσθητη σε μικρές ποσότητες νοθευτικών ουσιών. Στην παρούσα εργασία, μια συμπληρωματική δοκιμασία που περιελάμβανε την εμφωλιάζουσα ενίσχυση του βρόχου P6 παρουσίασε τέλεια αναπαραγωγιμότητα στην ανίχνευση 5% φυτικών ελαίων σε βούτυρο που έχει διαυγανθεί και 2% φυτικών ελαίων στο γάλα και γιαούρτι. Συνεπώς, συνιστάται η δοκιμασία Nested PCR-CE να εκτελείται ως δικλείδα ασφαλείας για ύποπτα δείγματα που είναι αρνητικά για την δοκιμή του ιντρονίου *trnL* (UAA).

3.3.3 Ταυτοποίηση γαλακτοκομικών με αλληλούχιση επόμενης γενιάς

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) έχουν αλλάξει τον τρόπο ανάλυσης του DNA συνδυάζοντας την αλληλούχιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA σε ένα μόνο βήμα. Η NGS θεωρείται κοινή προσέγγιση σε πολλές διαφορετικές μελέτες που απαιτούν παραγωγή και ανάλυση μεγάλου αριθμού αλληλουχιών DNA, συμπεριλαμβανομένων εφαρμογών στα τρόφιμα. Για παράδειγμα, οι προσεγγίσεις NGS έχουν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό του μικροβιώματος των τροφίμων ή για την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών.

Η τεχνολογία Ion Torrent βασίζεται σε μια προσέγγιση αλληλούχισης ημιαγωγών που μπορεί να ανιχνεύσει μικρές τροποποιήσεις του pH σε ένα τσιπ, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των βημάτων επιμήκυνσης στη διαδικασία αλληλούχισης. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πλατφόρμας Ion Torrent είναι: i) το σχετικά χαμηλό κόστος ανά εκτέλεση σε σύγκριση με άλλα όργανα NGS, ii) η υψηλή ταχύτητα του βήματος αλληλούχισης (λίγες ώρες), iii) η δυνατότητα χρήσης διαφορετικών τσιπ που μπορούν να επιτρέψουν διαφορετικές κλίμακες αλληλούχισης ανάλογα με τις αναλυτικές ανάγκες, iv) η δυνατότητα πολυπλεξίας των αναλύσεων αλληλούχισης με barcoding διαφορετικών δειγμάτων που μπορούν να τρέξουν στο ίδιο τσιπ και v) ένα ποσοστό σφάλματος που είναι εξαρτώμενο από την αλληλουχία με κατάλοιπα σε πολυμονονουκλεοτιδικές περιοχές.

Το 2017 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα από τους Ribani et al. με σκοπό τη δοκιμή αλληλούχισης επόμενης γενιάς με την τεχνολογία Ion Torrent για την ταυτοποίηση γαλακτοκομικών ειδών με αλληλούχιση στοχευμένων θραυσμάτων mtDNA από μείγματα DNA και DNA από γαλακτοκομικά προϊόντα.

Αρχικά, οι ερευνητές απομόνωσαν DNA από το αίμα τεσσάρων ειδών γαλακτοπαραγωγών ζώων (βοοειδές, *Bos taurus*, πρόβατο, *Ovis aries*, κατσίκα, *Capra hircus* και βουβάλι, *Bubalus bubalis*). Κατασκευάστηκαν δύο τεχνητές σειρές DNA χρησιμοποιώντας μεμονωμένα δείγματα DNA που εξήχθησαν από αίμα: 1) μια σειρά που κατασκευάστηκε από ισομοριακή περιεκτικότητα DNA που εξήχθη από βοοειδή, πρόβατα, κατσίκες και βουβάλια και 2) μια σειρά που κατασκευάστηκε από 10% DNA βοοειδούς + 90% DNA βουβαλιού. Απομονώθηκε επίσης DNA από: α) δύο μείγματα γάλακτος που αποτελούνταν από αποστειρωμένο γάλα κατσίκας και αγελάδας, 1) ένα μείγμα που περιείχε 90% αγελαδινό γάλα + 10% κατσικίσιο γάλα κατ' όγκο και 2) ένα μείγμα που περιείχει 50% κατσικίσιο γάλα + 50% αγελαδινό γάλα κατ' όγκο, β) από μία βουβαλίσια μοτσαρέλα (που αγοράστηκε από έναν λιανοπωλητή), γ) από ένα κατσικίσιο τυρί crescenza (που αγοράστηκε από λιανοπωλητή και που προέρχεται από βιομηχανοποιημένη μονάδα παραγωγής) και δ) από ένα τυρί ρικότα, που έχει ωριμάσει και προέρχεται από μείγμα αγελαδινού, πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος (2:1:1 αναλογία όγκων) και αγοράστηκε από βιοτεχνικό παραγωγό.

Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία DNA προβάτου στα μείγματα γάλακτος, πιθανότατα λόγω της παρουσίας του στο κατσικίσιο γάλα. Το επίπεδο του πρόβειου DNA ήταν χαμηλό (λίγο πάνω από το 0,2% των ορίων για δύο από τα τρία στοχευμένα θραύσματα mtDNA) και θα μπορούσε να οφείλεται σε τυχαία μόλυνση με πρόβειο γάλα στην αλυσίδα παραγωγής αιγών ή στο εργοστάσιο επεξεργασίας γάλακτος. Ένα παρόμοια χαμηλό επίπεδο DNA προβάτου ανιχνεύθηκε στο κατσικίσιο τυρί crescenza, για το οποίο δηλώνει την παρουσία (πιθανώς τυχαία) πρόβειου γάλακτος στο γαλακτοκομικό προϊόν που αναλύθηκε.

Στη βουβαλίσια μοτσαρέλα, η παρουσία DNA βοοειδών ήταν κάτω από τα καθορισμένα κατώτατα όρια και ενδέχεται να προερχόταν από ψευδείς αντιστοιχήσεις ακολουθιών. Είναι ενδιαφέρον ότι το βουβαλίσιο DNA θα μπορούσε να ανιχνευθεί στο τυρί ρικότα που είχε ωριμάσει, για το οποίο η παρουσία του, ακόμη και αν δεν είχε δηλωθεί, δεν θα μπορούσε να αποτελέσει έκπληξη λόγω της βιοτεχνικής παραγωγής σε μονάδα επεξεργασίας που χρησιμοποιεί επίσης βουβαλίσιο γάλα. Το επίπεδό του ήταν ωστόσο χαμηλό και πιθανώς οφειλόταν σε τυχαία ανάμειξη. Αυτό το βιοτεχνικό προϊόν έδειξε επίσης μια άλλη ενδιαφέρουσα υπογραφή προερχόμενη από ένα αρκετά υψηλό επίπεδο (0,6%-1,8%) αναγνώσεων που αντιστοιχούν σε δύο ανθρώπινες περιοχές mtDNA. Καθώς οι ερευνητές απέκλεισαν ότι το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να προέλθει από τυχαία εργαστηριακή μόλυνση από ανθρώπινο DNA, οι εν λόγω δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανή πηγή πληροφοριών για την κατάσταση υγιεινής αυτής της βιοτεχνικής μονάδας. Μεταξύ των άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων που ερευνήθηκαν, μόνο η βουβαλίσια μοτσαρέλα παρουσίασε ένα ορισμένο επίπεδο ανθρώπινων αναγνώσεων.

Ο προσδιορισμός των ανθρώπινων αλληλουχιών mtDNA θα μπορούσε να είναι χρήσιμος για τον καθορισμό του επιπέδου των συνθηκών υγιεινής σε μεταποιημένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Καθώς η μόλυνση με ανθρώπινο DNA στις εργαστηριακές πρακτικές μπορεί να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που δεν μπορούν να ελέγχονται πάντοτε, είναι σημαντικό τα πειράματα NGS να σχεδιάζονται κατάλληλα για να αξιολογηθεί αυτό το πιθανό πρόβλημα που μπορεί να εμποδίσει τη δυνατότητα χρήσης πληροφοριών ανθρώπινου DNA για άλλους σκοπούς παρακολούθησης.

Κεφάλαιο 4: Ανίχνευση νοθείας σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και ζωοτροφές

Τα φυτά αποτελούν βασικό στοιχείο της ανθρώπινης διατροφής, τόσο άμεσα (τα δημητριακά αποτελούν τη βάση της διατροφικής πυραμίδας, ακολουθούμενα από τα φρούτα και τα λαχανικά) όσο και έμμεσα (τα φυτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των βοοειδών). Επιπλέον, αρκετά φυτά χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων (π.χ. σόγια). Μια αξιόπιστη ταυτοποίηση των φυτικών ειδών, καθώς και η προέλευσή τους και η ιχνηλασιμότητά τους, αποτελούν βασικά στοιχεία στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων. Διάφορες μέθοδοι PCR έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες ποικιλίες καλλιεργειών, όπως ρύζι, καλαμπόκι, σόργο, κριθάρι και σίκαλη. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρήσιμες τόσο για τους παραγωγούς, οι οποίοι ενδιαφέρονται για την προστασία και την πιστοποίηση των καλλιεργειών τους, όσο και για τους καταναλωτές, οι οποίοι ενδιαφέρονται για την ποιότητα και την προέλευση των τροφίμων τους. Ακόμη, η αυξανόμενη διάδοση των γενετικά τροποποιημένων (ΓΤ) καλλιεργειών έχει αυξήσει περαιτέρω τη ζήτηση για μοριακές τεχνικές εντοπισμού (Galimberti et al., 2013).

4.1 Τρόφιμα φυτικής προέλευσης

4.1.1 Ταυτοποίηση με χρήση DNA Barcoding

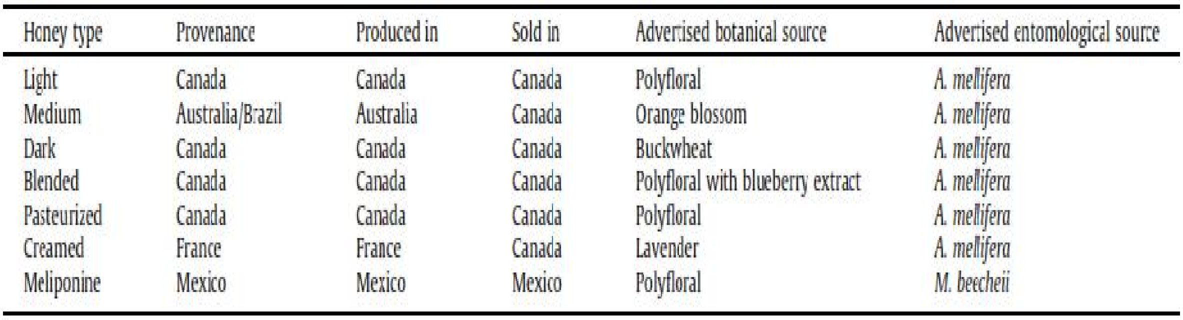
Μια ενδιαφέρουσα χρήση της DNA Barcoding είναι αυτή που αφορά την ταυτοποίηση των φυτικών ειδών στο μέλι. Το μέλι μπορεί να χωριστεί σε δύο υποομάδες: το μονοανθές και το μέλι πολλαπλών ανθών. Ο πρώτος τύπος ανήκει σε ένα μοναδικό φυτικό είδος, ενώ ο δεύτερος συντίθεται από ένα πλήθος φυτικών ειδών (Barcaccia et al., 2015). Λόγω της σπανιότητάς τους, των μοναδικών τους γεύσεων και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους, τα μονοανθή μέλια μπορεί να είναι πολύ ακριβά. Η αξία του μελιού επηρεάζεται επίσης από τα έντομα που το παρήγαγαν. Για παράδειγμα, το μέλι από μέλισσες χωρίς κεντρί (π.χ. *Melipona beecheii*) εκτιμάται ιδιαίτερα, δημιουργώντας κίνητρο για αραίωση ή υποκατάσταση με μέλι από *A. Mellifera.*

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι Sean W.J. Prosser και Paul D.N. Hebert (2016) με σκοπό την ταυτοποίηση των βοτανικών και εντομολογικών συστατικών σε μέλι, χρησιμοποίησαν DNA metabarcoding για την εξέταση τριών γονιδιακών περιοχών. Τα συστατικά της γύρης εξετάστηκαν με τη χρήση του πυρηνικού ITS2, το φυτικό υλικό χωρίς γύρη με το πλαστιδικό γονίδιο rbcLa και το είδος της μέλισσας προέλευσης με τη χρήση της μιτοχονδριακής υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI).

Το πρωτόκολλο δοκιμάστηκε σε επτά από τις πιο κοινές μορφές μελιού για να διαπιστωθούν τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί του.

Εξετάστηκαν επτά δείγματα μελιού. Έξι από την *A. Mellifera* που ελήφθησαν από καταστήματα λιανικής πώλησης ή μελισσοκόμους στο Οντάριο και ένα από τη *M. beecheii* που ελήφθη από παραγωγό στο Μεξικό. Τα έξι δείγματα από την *A. mellifera* αντιπροσώπευαν τους κυριότερους τύπους εμπορικών μελιών.

Πίνακας 12: Τύποι μελιού που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Όλες οι πληροφορίες σχετικά με την προέλευση, την παραγωγή και τις διαφημιζόμενες βοτανικές και εντομολογικές πηγές εξήχθησαν άμεσα ή έμμεσα από τις ετικέτες των περιεκτών.



Honey type	Provenance	Produced in	Sold in	Advertised botanical source	Advertised entomological source
Light	Canada	Canada	Canada	Polyfloral	*A. mellifera*
Medium	Australia/Brazil	Australia	Canada	Orange blossom	*A. mellifera*
Dark	Canada	Canada	Canada	Buckwheat	*A. mellifera*
Blended	Canada	Canada	Canada	Polyfloral with blueberry extract	*A. mellifera*
Pasteurized	Canada	Canada	Canada	Polyfloral	*A. mellifera*
Creamed	France	France	Canada	Lavender	*A. mellifera*
Meliponine	Mexico	Mexico	Mexico	Polyfloral	*M. beecheii*

Συνολικά, εντοπίστηκαν 72 βοτανικές πηγές στο ανοιχτόχρωμο μέλι, αλλά μόνο 16 μπόρεσαν να αντιστοιχιστούν σε κάποιο είδος. Η ανάλυση του ITS2 του εκχυλίσματος γύρης εντόπισε 17 φυτικά είδη από εννέα τάξεις και εννέα οικογένειες, ενώ η ανάλυση του υγρού εκχυλίσματος με βάση το rbcLa εντόπισε 55 φυτικές πηγές από 31 τάξεις και 55 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων 13 από τις 17 φυτικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες που βρέθηκαν στη γύρη. Ενώ οι περισσότερες από τις φυτικές πηγές ήταν σύμφωνες με την καναδική προέλευση, τέσσερα είδη στο εκχύλισμα γύρης και εννέα από τις φυτικές οικογένειες στο υγρό εκχύλισμα δεν απαντώνται στη Βόρεια Αμερική, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μέλι αυτό αραιώθηκε με προϊόν από άλλη περιοχή. Με βάση τις ξένες φυτικές ταξινομικές ομάδες που ανιχνεύθηκαν, το νοθευμένο μέλι πιθανότατα προερχόταν από την Κίνα. Η εντομολογική πηγή επιβεβαιώθηκε ότι ήταν η *A. mellifera*.

Σε αντίθεση με το ανοιχτόχρωμο μέλι, μόνο δύο βοτανικές πηγές ανιχνεύθηκαν στο μέλι μέσης ποιότητας: μία από το εκχύλισμα γύρης και μία από το υγρό εκχύλισμα. Όλες οι βοτανικές πηγές ήταν συνεπείς με την αναφερόμενη αυστραλιανή/βραζιλιάνικη προέλευση. Η εντομολογική πηγή επιβεβαιώθηκε ως *A. Mellifera*. Το εκχύλισμα γύρης από το σκούρο μέλι απέτυχε να δημιουργήσει οποιαδήποτε αλληλουχία, αλλά το DNA από το υγρό εκχύλισμα αποκάλυψε τέσσερις βοτανικές πηγές που αντιπροσωπεύουν τέσσερις τάξεις. Τα φυτά αυτά ήταν σύμφωνα με την καναδική προέλευση, αλλά δεν περιλάμβαναν φαγόπυρο (*Fagopyrum esculentum*), παρά το γεγονός ότι το μέλι αυτό είχε πωλήθηκε ως μονοανθές αυτού του είδους. Η αποτυχία ανίχνευσης του *F. esculentum*, ή του πολλαπλασιασμού οποιουδήποτε DNA από το εκχύλισμα γύρης, μπορεί να οφείλεται στην αναστολή από το υψηλό επίπεδο πολυφαινολών σε αυτό το μέλι. Η εντομολογική πηγή επαληθεύτηκε ως *A. Mellifera*.

Δεν ανακτήθηκαν βοτανικές πηγές από το μέλι που είχε αναμειχθεί με εκχύλισμα βατόμουρου, αλλά η παρουσία DNA της *A. Mellifera* διαπιστώθηκε. Οι ερευνητές απέδωσαν την παραπάνω αδυναμία σε αναστολή της PCR από τα φλαβονοειδή που προέρχονταν από το βατόμουρο και τα οποία συνυπολογίστηκαν με το DNA. Το παστεριωμένο μέλι περιείχε πολύ λίγη γύρη, γεγονός που υποδηλώνει ότι εκτός από παστερίωση είχε υποστεί και φιλτράρισμα. Ως εκ τούτου, δεν ταυτοποιήθηκαν βοτανικές πηγές μέσω της ανάλυσης του εκχυλίσματος γύρης, αλλά δύο φυτά που αντιπροσωπεύουν δύο οικογένειες από δύο τάξεις ταυτοποιήθηκαν από το υγρό εκχύλισμα. Και τα δύο ήταν συνεπή με την καναδική προέλευση και η εντομολογική πηγή ήταν η *A. mellifera*.

Τρεις βοτανικές πηγές ανιχνεύθηκαν στο κρεμώδες μέλι, δύο από το εκχύλισμα γύρης και μία από το υγρό εκχύλισμα. Όλες οι βοτανικές πηγές ήταν συνεπείς με τη γαλλική προέλευση, αλλά δεν υπήρχαν αλληλουχίες DNA που να ανακτήθηκαν από *Lavandula* (οικογένεια Lamiaceae) παρά την υποτιθέμενη μονοανθή προέλευση του μελιού αυτού από τη λεβάντα. Επιπλέον, η εντομολογική πηγή δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί, αμφισβητώντας την αυθεντικότητα αυτού του μελιού. Τέλος, Το μέλι άκεντρης μέλισσας περιείχε 63 ανιχνεύσιμες βοτανικές πηγές, αν και μόνο δύο μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν σε είδη από την ανάλυση γύρης με βάση το ITS2. Η ανάλυση του υγρού εκχύλισματος εντόπισε 59 βοτανικές πηγές από 32 τάξεις φυτών, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας στην οποία ανήκουν η σόγια και το kudzu. Όλες οι βοτανικές πηγές ήταν σύμφωνες με τη μεξικανική προέλευση και η εντομολογική πηγή επιβεβαιώθηκε ως *M. Beecheii*.

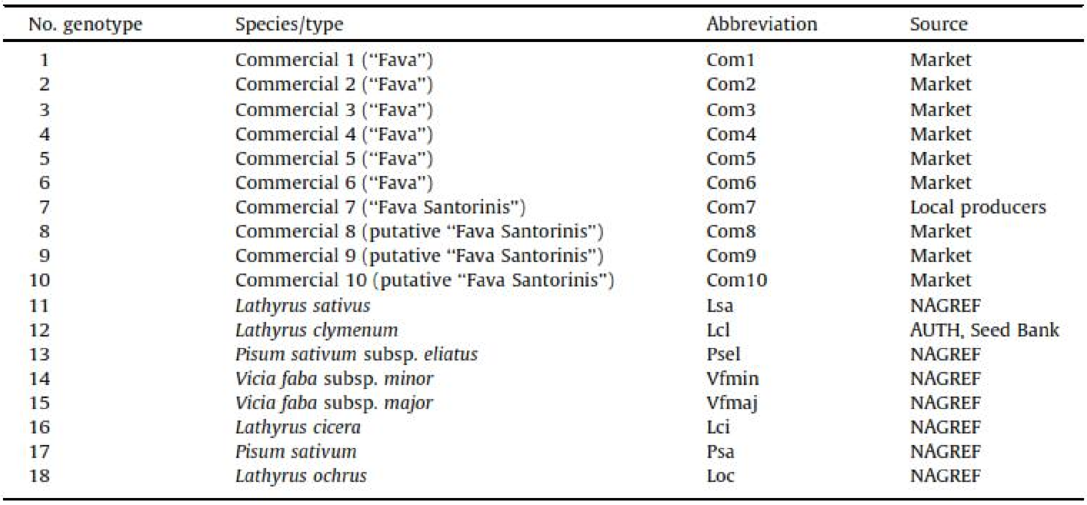
Το 2011 οι Ganopoulos et al., χρησιμοποίησαν DNA Barcoding σε συνδυασμό με HRM για την ταχεία ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και μέτρηση νοθείας των ειδών ”Φάβα Σαντορίνης” και των εμπορικών τους προϊόντων. Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε χρήση δύο καθολικών περιοχών DNA Barcoding, των *trnL* και *rpoC* χλωροπλαστικών περιοχών.

Το *Lathyrus clymenum* ανήκει στο γένος *Lathyrus* της οικογένειας Fabaceae. Τα είδη *Lathyrus* καλλιεργούνται ως τρόφιμα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το *L. clymenum* ("Φάβα") είναι ένα σημαντικό όσπριο στη μεσογειακή διατροφή, όχι μόνο λόγω της γεύσης του, αλλά και για τα θρεπτικά συστατικά του που συμβάλλουν σε μια υγιεινή διατροφή. Προκειμένου να προστατευθούν τέτοιου είδους τρόφιμα που παράγονται στην ΕΕ και έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά, χάρη στη διαδικασία παραγωγής τους ή/και στη θρεπτική τους αξία, έχει εισαχθεί η έννοια της πιστοποίησης των σημάτων ΠΟΠ (Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης) και ΠΓΕ (Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης).

Η ΠΟΠ ”Φάβα Σαντορίνης” που ονομάζεται επίσης ”Φάβα” και ”άρακας” προσφέρει υψηλό εισόδημα για τους καλλιεργητές, αφού είναι 4 φορές πιο ακριβή από την κανονική φάβα που προέρχεται από κουκιά (*Vicia faba*) ή από μπιζέλια (*Pisum sativum*) που τοπικά ονομάζεται ”αρακάς”. Για όλους τους παραπάνω λόγους η ΠΟΠ "Φάβα Σαντορίνης" είναι επιρρεπής σε νοθεύσεις. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα καλλιεργούμενα Fabaceae (*V. faba*) υποείδος *major* (καλλιεργούνται για τρόφιμα) και υποείδος *minor* (καλλιεργείται για ζωοτροφή) ονομάζονται επίσης Φάβα, συχνά θα μπορούσαν να παραπλανήσουν τους καταναλωτές. Το ίδιο ισχύει και για τα μπιζέλια των οποίων τα προϊόντα σπόρων ονομάζονται τοπικά ”αράκας”. Ως εκ τούτου, το *L. clymenum* συχνά αναμιγνύεται με άλλα είδη *Lathyrus*, όπως *Lathyrus cicera*, *Lathyrus ochrus* και *Lathyrus sativus*, αλλά ορισμένα από αυτά περιέχουν υψηλά επίπεδα της νευροτοξίνης α,β-διαμινοπροπανοϊκό οξύ (ODAP) στους σπόρους τους το οποίο μπορεί να προκαλέσει ένα είδος παράλυσης γνωστό ως λαθυρισμός.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τα φυτικά υλικά που παρουσιάζονται στον πίνακα 13. Τα είδη επιλέχθηκαν είτε επειδή το όνομά τους συγχέεται με το κοινό όνομα Φάβα (*V. faba*) ή με το επιστημονικό όνομα *Lathyrous* (*Lathyrous cicera*, *L. ochrus* και *L. sativum*) είτε επειδή αποτελούν φθηνά υποκατάστατα της ακριβής ”Φάβας Σαντορίνης” όπως το *Pisum*. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν 10 εμπορικά προϊόντα: ένα ήταν το αυθεντικό προϊόν "Φάβα Σαντορίνης" που προερχόταν από τους τοπικούς παραγωγούς, τρία ήταν υποτιθέμενα προϊόντα "Φάβα Σαντορίνης" και πέντε ήταν προϊόντα ”Φάβα” (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Εμπορικά προϊόντα "Φάβα", *Lathyrus* και συναφή είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.



No. genotype	Species/type	Abbreviation	Source
1	Commercial 1 (“Fava”)	Com1	Market
2	Commercial 2 (“Fava”)	Com2	Market
3	Commercial 3 (“Fava”)	Com3	Market
4	Commercial 4 (“Fava”)	Com4	Market
5	Commercial 5 (“Fava”)	Com5	Market
6	Commercial 6 (“Fava”)	Com6	Market
7	Commercial 7 (“Fava Santorinis”)	Com7	Local producers
8	Commercial 8 (putative “Fava Santorinis”)	Com8	Market
9	Commercial 9 (putative “Fava Santorinis”)	Com9	Market
10	Commercial 10 (putative “Fava Santorinis”)	Com10	Market
11	*Lathyrus sativus*	Lsa	NAGREF
12	*Lathyrus clymenum*	Lcl	AUTH, Seed Bank
13	*Pisum sativum* subsp. *eliatus*	Psel	NAGREF
14	*Vicia faba* subsp. *minor*	Vfmin	NAGREF
15	*Vicia faba* subsp. *major*	Vfmaj	NAGREF
16	*Lathyrus cicera*	Lci	NAGREF
17	*Pisum sativum*	Psa	NAGREF
18	*Lathyrus ochrus*	Loc	NAGREF

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εν λόγω μέθοδος (Bar-HRM) είναι ικανή όχι μόνο να διακρίνει μεταξύ διαφορετικών *L.clymenum* συγγενών οσπρίων, αλλά επιπλέον να ανιχνεύσει μια αναλογία 1:100 μη Φάβας Σαντορίνης σε εμπορικά προϊόντα Φάβας Σαντορίνης. Συνολικά, στο 75% των εμπορικών προϊόντων που αναλύθηκαν, το όνομα του είδους που αναγραφόταν στην ετικέτα δεν συμφωνούσε με το είδος που περιείχαν. Επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο, εντοπίστηκε νοθεία στα τρία υποτιθέμενα προϊόντα "Φάβας Σαντορίνης" (Com8, Com9 και Com10).

Ο κουρκουμάς [*Curcuma longa* L. (Zingiberaceae)], ήδη ευρέως γνωστός ως μπαχαρικό και χρωστικός παράγοντας για τρόφιμα και καλλυντικά, γίνεται όλο και πιο σημαντικός ως φαρμακευτικό βότανο για τις αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, και αντιικές ιδιότητές του, καθώς και για την θεραπεία του διαβήτη και του Alzheimer. Η Ινδία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός, καταναλωτής και εξαγωγέας κουρκουμά, ο οποίος διακινείται κυρίως με τη μορφή ολόκληρου αποξηραμένου ριζώματος, ως σκόνη και σε μορφές με προστιθέμενη αξία. Η μορφή σκόνης, η οποία είναι η μορφή που χρησιμοποιείται κυρίως στο εμπόριο και από τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων, έχει το υψηλότερο μερίδιο σε εξαγωγές, αποτελώντας περίπου το 42% του παγκόσμιου εμπορίου κουρκουμά.

Η προτίμηση των καταναλωτών για βιολογικά προϊόντα έχει επίσης ωθήσει τη ζήτηση για κουρκουμά, όπως και άλλων βιολογικών προϊόντων, ιδίως εκείνων που πωλούνται σε μορφή σκόνης. Ως αποτέλεσμα, ο κουρκουμάς νοθεύεται, ιδίως με υλικά πλήρωσης που δεν γίνονται οπτικά αντιληπτά. Τέτοια πληρωτικά υλικά προσθέτουν όγκο, με αποτέλεσμα την αραίωση του κύριου προϊόντος και καθιστώντας το έτσι λιγότερο αποτελεσματικό, το οποίο, με τη σειρά του, διαβρώνει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών. Η νόθευση είναι παράνομη, καθώς η κατανάλωση νοθευμένων προϊόντων που περιέχουν μη δηλωμένα συστατικά, μπορεί να προκαλέσει δηλητηρίαση, αλλεργίες ή άλλες ανεπιθύμητες παρενέργειες. Νοθευτικά ή πληρωτικά φυτικής προέλευσης περιλαμβάνουν άγρια είδη *Curcuma*, δηλαδή *C. zedoaria*, άμυλο από φθηνότερες πηγές όπως η κασάβα, και πριονίδι.

Μέθοδοι που βασίζονται σε πρωτεΐνες, όπως ανοσολογικές δοκιμές, ηλεκτροφορητικές και χρωματογραφικές τεχνικές όπως η TLC και η HPLC απαιτούν φρέσκα δείγματα. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτών των μεθόδων είναι λιγότερο αξιόπιστα, επειδή η σύνθεση του ίδιου προϊόντος από διαφορετικούς κατασκευαστές διαφέρει σημαντικά. Ακόμη, με τα προϊόντα υψηλής επεξεργασίας, οι μέθοδοι αυτές δεν είναι αρκετά ευαίσθητες. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη ευρέως προσβάσιμων εμπορικών εργαλείων, όπως η DNA Barcoding για την ανίχνευση της υποκατάστασης προϊόντων και την πιστοποίηση της αυθεντικότητας των εμπορικών προϊόντων.

Για αυτόν τον λόγο, το 2015 οι Parvathy et al. χρησιμοποίησαν DNA Barcoding για την ανίχνευση νοθευτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των πληρωτικών ουσιών, σε δείγματα κουρκουμά σε σκόνη που πωλούνται στην αγορά και να πιστοποιήσει την εγκυρότητα των ετικετών που έχουν επικολληθεί στα δείγματα αυτά (επιλέχθηκαν οι barcodes *rbcL, matK*, και *ITS*) . Για τον σκοπό αυτό, οι ερευνητές συνέλεξαν ολόκληρα νωπά ριζώματα πέντε ποικιλιών του *C. longa* και τεσσάρων ποικιλιών του *C. zedoaria* από τη συλλογή φυτικού υλικού που διατηρείται στο Ινδικό Ινστιτούτο για την μελέτη μπαχαρικών (Kozhikode, Κεράλα, Ινδία) και πέντε δείγματα κασάβας ελήφθησαν από την τοπική αγορά κατά τη στιγμή της μελέτης. Οι barcodes που δημιουργήθηκαν από αυτά τα δείγματα χρησίμευσαν ως barcodes αναφοράς για τον προσδιορισμό της γνησιότητας της εμπορικά διαθέσιμης σκόνης κουρκουμά. Ερευνήθηκε η γνησιότητα 10 δημοφιλών εμπορικών σημάτων κουρκουμά σε σκόνη που προμηθεύτηκαν τοπικά από το Kozhikode. Κάθε μία από τις 10 μάρκες αντιπροσώπευε διαφορετική εταιρεία.

Οι ετικέτες αναφέρεραν τον "κουρκουμά" (*C. longa*) ως το μοναδικό συστατικό. Συνεπώς, εάν κάποιο δείγμα απέδιδε μια αλληλουχία άλλη από την αλληλουχία εκείνη του *C. longa*, το δείγμα θα έπρεπε να θεωρείται μολυσμένο ή νοθευμένο. Δεδομένου ότι η ετικέτα δεν ανέφερε κανένα πληρωτικό υλικό, ακόμη και αυτό πρέπει να θεωρηθεί επιμολυντής. Από τα 10 δείγματα που εξετάστηκαν, ένα βρέθηκε μολυσμένο με άλλο είδος από το αναγραφόμενο συστατικό. Αυτό το δείγμα δημιούργησε αλληλουχίες του *C. zedoaria*, ένα αναφερόμενο νοθευτικό του *C. longa*. Αυτό σημαίνει ότι το δείγμα ήταν νοθευμένο με ένα φθηνότερο και εύκολα διαθέσιμο υποκατάστατο, δηλαδή το *C. zedoaria*.

Σε ένα άλλο δείγμα, ορισμένοι από τους κλώνους παρήγαγαν αλληλουχίες που ήταν πανομοιότυπες (100% ομοιότητα) με εκείνες των *Triticum aestivum* L. (Poaceae) (σιτάρι), *Secale cereale* L. (Poaceae) (σίκαλη) και 91% όμοιες με εκείνες του *Hordeum vulgare* L. (Poaceae) (κριθάρι). Ωστόσο, ένα άλλο δείγμα έδειξε αλληλουχίες που ήταν σχεδόν πανομοιότυπες (99% ομοιότητα) με εκείνες της *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae) (κασάβα), υποδεικνύοντας πιθανή νοθεία της σκόνης κουρκουμά με άμυλο από κασάβα. Συνολικά, τρία δείγματα βρέθηκαν νοθευμένα με φυτικές νοθευτικές ουσίες.

4.1.2 Ταυτοποίηση με τεχνικές PCR

Τα συστατικά τροφίμων από ποικιλίες γενετικά τροποποιημένης σόγιας, αραβόσιτου και ελαιοκράμβης έχουν εγκριθεί για χρήση σε τρόφιμα στην Ευρώπη. Η σόγια Roundup Ready (RR) είναι η μεταλλαγμένη σόγια που έχει εγκριθεί για την αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Από το 1997, η ΕΕ έχει θεσπίσει κανονισμούς για την επισήμανση των καινοφανών τροφίμων και η επισήμανση των τροφίμων που περιέχουν γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς είναι υποχρεωτική.

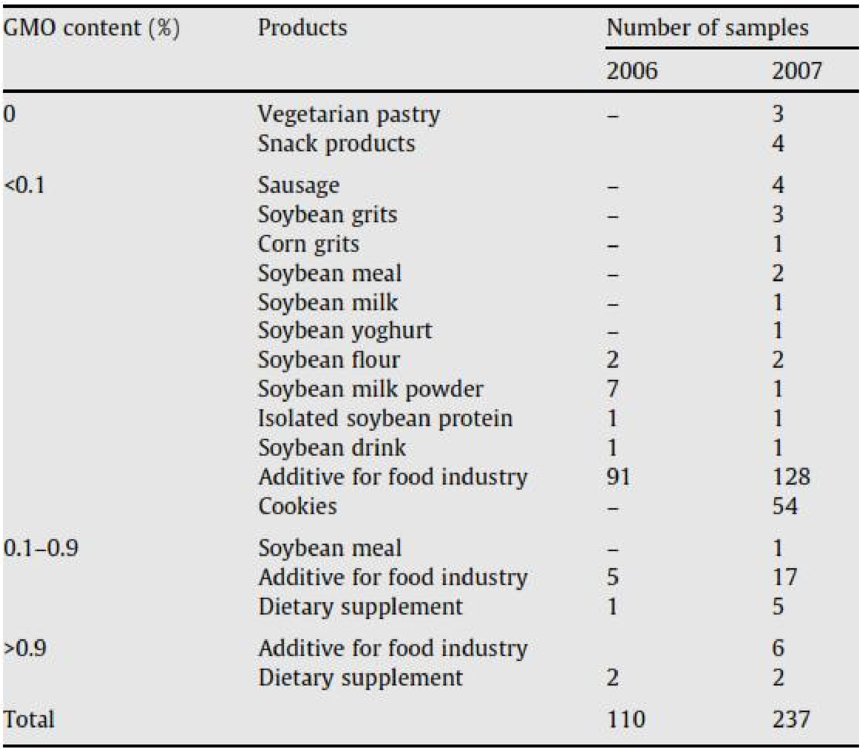
Για την προστασία της ελευθερίας επιλογής των καταναλωτών, περισσότερες από 40 χώρες έχουν εκδώσει κανονισμούς για την επισήμανση των ΓΤΟ. Τα ΓΤ τρόφιμα πρέπει να είναι επισημασμένα στο όριο του 0,9% στην ΕΕ, του 3% στην Κορέα, του 0,5% στη Γερμανία και του 5% στην Ιαπωνία.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) στις διάφορες μορφές της εφαρμόζεται ευρέως σε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (ΓΤΟ) και είναι πλέον μια γενικά αποδεκτή μέθοδος για τον εντοπισμό της συμμόρφωσής τους με τους κανονισμούς. Μέθοδοι Multiplex PCR που βασίζονται στον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό πολλαπλών αλληλουχιών εξοικονομούν σημαντικό χρόνο και προσπάθεια μειώνοντας τον αριθμό των αντιδράσεων που απαιτούνται για την αξιολόγηση της πιθανής παρουσίας ΓΤΟ στο δείγμα τροφίμου. Επίσης, η PCR πραγματικού χρόνου θεωρείται η πιο ακριβής και απλή μεθοδολογία για την ποσοτικοποίηση ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων.

Οι Nikolić et al. (2009), έλεγξαν με χρήση Multiplex PCR και PCR πραγματικού χρόνου, εισαγόμενα στην Σερβία προϊόντα σόγιας, με και χωρίς ετικέτα, από διάφορες χώρες, για να προσδιορίσουν την ενσωμάτωση των γενετικά τροποποιημένων τροφίμων στην τροφική αλυσίδα, καθώς και την εγκυρότητα των ετικετών "μη ΓΤΟ".

Συνολικά, συλλέχθηκαν 347 προϊόντα που αντιπροσωπεύουν μια ποικιλία μεταποιητικών σταδίων επεξεργασίας της σόγιας (237 δείγματα το 2007 και 110 δείγματα το 2006), με σήμανση ως "μη ΓΤΟ" και χωρίς σήμανση, τα οποία παρασχέθηκαν από την επιθεώρηση Φυτοϋγείας του Υπουργείου Υγείας (Δημοκρατία της Σερβίας). Τα δείγματα εισήχθησαν από διαφορετικούς προμηθευτές από χώρες που έχουν διαφορετικές ρυθμιστικές διατάξεις για την επισήμανση: ΕΕ, Ελβετία, Δανία, ΗΠΑ, Παναμάς, Ισραήλ και Βραζιλία. Roundup Ready σόγια (ERM-BF 410 a-e), αραβόσιτος Bt 11 (ERM-BF 421) και ζάχαρη H7-1 (ERM-BF 419) που παράχθεισαν από το Ινστιτούτο Ερευνητικών Υλικών και Μετρήσεων (IRMM, Βέλγιο) χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Πίνακας 14: Περιεκτικότητα ΓΤΟ σε προϊόντα τροφίμων με PCR πραγματικού χρόνου το 2006 και το 2007.



GMO content (%)	Products	Number of samples	
		2006	2007
0	Vegetarian pastry	–	3
	Snack products		4
<0.1	Sausage	–	4
	Soybean grits	–	3
	Corn grits	–	1
	Soybean meal	–	2
	Soybean milk	–	1
	Soybean yoghurt	–	1
	Soybean flour	2	2
	Soybean milk powder	7	1
	Isolated soybean protein	1	1
	Soybean drink	1	1
	Additive for food industry	91	128
	Cookies	–	54
0.1–0.9	Soybean meal	–	1
	Additive for food industry	5	17
	Dietary supplement	1	5
>0.9	Additive for food industry		6
	Dietary supplement	2	2
Total		110	237

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η σόγια RR βρέθηκε σε 29 δείγματα στο εύρος 0,1-0,9%, ενώ 10 δείγματα (πρόσθετο για τη βιομηχανία τροφίμων και συμπληρώματα για ανθρώπινη κατανάλωση) περιείχαν RR σόγια πάνω από το όριο του 0,9%. Το 2006 το 7% των προϊόντων αποδείχθηκε ότι αποτελούνταν από υλικό που προερχόταν από τη σόγια RR και το 13% των δειγμάτων τροφίμων το 2007. Στην παρούσα έρευνα τα περισσότερα από τα αναλυθέντα δείγματα που χαρακτηρίστηκαν ως "μη ΓΤΟ" προέρχονταν από την ΕΕ, όπου ο έλεγχος και η επισήμανση των προϊόντων είναι υποχρεωτικός. Τα δείγματα που είχαν περιεκτικότητα σε ΓΤ πάνω από 0,9%, και πρέπει να επισημαίνονται, εισήχθησαν από τις ΗΠΑ, τον Παναμά, τη Βραζιλία και το Ισραήλ.

Μια ακόμη έρευνα βασισμένη στην PCR πραγματικού χρόνου, πραγματοποιήθηκε από τους López-Calleja et al. (2014). Συγκεκριμένα, ανέπτυξαν μια μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου με βάση τη χρήση ενός γενετικού δείκτη ITS πολλαπλών αντιγράφων, προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία των τεχνικών PCR για την ανίχνευση ιχνών αμυγδάλων σε εμπορικά προϊόντα.

Οι ξηροί καρποί έχουν αποκτήσει σημαντική θέση στη διατροφή του ανθρώπου επειδή θεωρούνται εξαιρετικές τροφές, κυρίως λόγω της ευχάριστης γεύσης τους και τα δυνητικά οφέλη που έχουν για την υγεία. Ειδικότερα, η κατανάλωση των αμυγδάλων έχει συνδεθεί με διατροφικά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της χοληστερόλης, της προστασίας από τον διαβήτη και πιθανές πρεβιοτικές ιδιότητες.

Ωστόσο, αυτά τα πιθανά οφέλη για την υγεία που αποδίδονται στα αμύγδαλα δεν ισχύουν για όλους, δεδομένου ότι αυτός ο ξηρός καρπός είναι ένα γνωστό αλλεργιογόνο τρόφιμο. Τα αμύγδαλα είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση μη φυσιολογικών ανοσολογικών αντιδράσεων σε αλλεργικά άτομα, που κυμαίνονται από ήπιες αντιδράσεις έως δυνητικά θανατηφόρα αναφυλακτικά σοκ, ακόμη και μετά την κατάποση ελάχιστων δόσεων του αλλεργιογόνου τροφίμου. Παρόλα αυτά, η κατάποση αμυγδάλων συμβαίνει συχνά τυχαία, λόγω λανθασμένης επισήμανσης των προϊόντων, των διαδικασιών επανεπεξεργασίας, οι οποίες περιλαμβάνουν τρόφιμα που περιέχουν αμύγδαλα ή εξαιτίας διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Κατά συνέπεια, απαιτούνται κατάλληλες αναλυτικές μέθοδοι για την ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση αλλεργιογόνων για την επαλήθευση της επισήμανσης και για τον εντοπισμό της διασταυρούμενης επαφής με αλλεργιογόνα τρόφιμα.

Για τη διεξαγωγή της έρευνας, αμύγδαλα, ξηροί καρποί, φιστίκια και διάφορες εμπορικές μάρκες τροφίμων αγοράστηκαν από διάφορα τοπικά καταστήματα (στην Ισπανία) και διάφορα delicatessen. Συνολικά, 35 διαφορετικές ποικιλίες αμυγδάλων (φύλλα και μεμονωμένοι πυρήνες) που παρασχέθηκαν από το IRTA (Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentaries, Tarragona, Ισπανία) και το CEBAS-CSIC (Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia, Ισπανία) και τέσσερεις εμπορικές ποικιλίες (μεμονωμένοι πυρήνες) που προέρχονταν από διάφορα delicatessen, αναλύθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η ειδικότητα του συστήματος PCR πραγματικού χρόνου. Επιπλέον, ένα ευρύ φάσμα φυτικών (σάρκα και πυρήνες) και ζωικών (σάρκα) ειδών περιλαμβάνονταν επίσης στις δοκιμές για σκοπούς ελέγχου της ειδικότητας.

Το σύνολο των εμπορικών προϊόντων που αναλύθηκαν ήταν 214 διαφορετικών μαρκών και με διαφορετική δήλωση στην ετικέτα: 28 που περιείχαν αμύγδαλο ως συστατικό, 63 που μπορεί να περιείχαν ίχνη ξηρών καρπών και 123 που δεν δήλωναν την παρουσία αμυγδάλων. Τα αποτελέσματα της PCR βρέθηκαν να συμμορφώνονται με την επισήμανση σε όλα τα δείγματα εκτός από 50 που δεν δήλωναν την παρουσία αμυγδάλου στην επισήμανση. Το περιεχόμενο αμυγδάλου για τα εμπορικά δείγματα τροφίμων με δηλωμένη περιεκτικότητα σε αμύγδαλα, προέκυψε ότι ήταν χαμηλότερο από το ποσοστό που αναγραφόταν στην επισήμανση. Αυτή η υποτίμηση της ποσότητας του αλλεργιογόνου θα μπορούσε να οφείλεται σε μεγάλο αριθμό παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση του DNA, όπως η έκταση της υποβάθμισης του DNA λόγω των επεξεργασιών και της παρουσίας διαφορετικών μητρών τροφίμων που ενδεχομένως περιέχουν διαφορετικές ποσότητες DNA (γάλα, λίπος, σπόροι, κ.λπ.) που ενδέχεται να παρεμποδίζουν την αντίδραση PCR.

Τέλος, όσον αφορά τα προϊόντα που δεν υποδείκνυαν την παρουσία αμυγδάλου ή ίχνη του στην επισήμανση, οι ερευνητές βρήκαν ότι 40 από τα 50 δείγματα με μη δηλωμένη περιεκτικότητα σε αμύγδαλα περιείχαν λιγότερο από 10 mg/kg αμυγδάλου, ενώ 7 περιείχαν μεταξύ 10 και 50 και τα άλλα τρία περιείχαν περισσότερα από 50 mg/kg αμυγδάλου. Για αυτά τα εμπορικά προϊόντα που ήταν θετικά για την παρουσία αμυγδάλου, η μόλυνση πιθανώς συνέβη κατά την παραγωγή, δεδομένου ότι παρήχθησαν από εταιρείες που επεξεργάζονται επίσης αμύγδαλα.

Ένα από τα πιο πολύτιμα τρόφιμα φυτικής προέλευσης είναι το ελαιόλαδο. Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο μπορεί σίγουρα να θεωρηθεί ένα premium προϊόν λόγω της γεύσης, του αρώματος και των ιδιοτήτων του για την υγεία, αλλά υπόκειται συχνά σε απάτες και νοθεύσεις με την προσθήκη φθηνότερων ελαίων που προέρχονται από άλλα φυτά εκτός της ελιάς. Το φουντουκέλαιο, με σύνθεση παρόμοια με αυτή του ελαιολάδου, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούνμενο, αλλά τα έλαια αραβοσίτου, ηλίανθου, σησαμιού και αμπέλου επίσης χρησιμοποιούνται.

Οι Vietina et al. (2013) ανέπτυξαν μια αναλυτική μέθοδο με βάση το DNA για την ταυτοποίηση νοθευτικών ελαίων σε ελαιόλαδο με χρήση PCR πραγματικού χρόνου και ανάλυση HRM μετά την PCR. Οι ερευνητές συνέλεξαν φύλλα ελιάς (*Olea europaea* L.), φουντουκιού (*Corylus avellana* L.), ηλίανθου (*Helianthus annuus* L.), αραβόσιτου (*Zea mays* L.), σουσαμιού (*Sesamum indicum* L.) και σπόρους κολοκύθας (*Cucurbita pepo* L.), σόγιας (*Glycine max* L.), φιστικιού (*Arachis hypogaea* L.) και ρυζιού (*Oryza sativa* L.). Η λήψη DNA πραγματοποιήθηκε σε έλαια που παρασκευάστηκαν από αυτά τα φυτικά είδη, που αγοράστηκαν από σούπερ μάρκετ. Το ελαιόλαδο ήταν ένα πιστοποιημένο Leccino μονοποικιλιακό λάδι που παρείχε το αγρόκτημα ”Il Posticcio” (Massa Carrara, Ιταλία). Το ελαιόλαδο και τα σπορέλαια (αραβόσιτου, ηλίανθου, φουντουκιού) αναμείχθηκαν σε διαφορετικά ποσοστά για την λήψη του DNA και για την δοκιμή PCR πραγματικού χρόνου. Το DNA των φύλλων της ίδιας ποικιλίας ελιάς που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ελαιολάδου, χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά στα πειράματα.

Η ανάλυση HRM παρήγαγε προφίλ για κάθε φυτικό είδος, πανομοιότυπα σε έλαια και φύλλα ή σπόρους. Με την ανάλυση HRM ήταν δυνατόν να εντοπιστούν ξένα έλαια σε όλα τα μείγματα, με βάση το μονοποικιλιακό ελαιόλαδο Leccino, ακόμη και όταν το ξένο συστατικό ήταν μόλις 10%.

4.1.3 Ταυτοποίηση με αλληλούχιση επόμενης γενιάς

Ανησυχίες σχετικά με την ιχνηλασιμότητα των τροφίμων και των ζωοτροφών στην αγορά και το δικαίωμα των καταναλωτών να γνωρίζουν τα ακριβή συστατικά στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές οδήγησαν στη θέσπιση νομοθετικών ρυθμίσεων σχετικά με την εισαγωγή και τον έλεγχο των γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (ΓΤΟ) στην αλυσίδα τροφίμων και ζωοτροφών. Στα εργαστήρια σε όλο τον κόσμο, η παρουσία ΓΤΟ σε τρόφιμα και σε μήτρες ζωοτροφών παρακολουθείται τακτικά με αναλύσεις qPCR (ποσοτική PCR). Ωστόσο, το σύστημα αυτό δεν είναι ειδικά σχεδιασμένο για τον εντοπισμό άγνωστων ΓΤΟ.

Για την επίλυση αυτού του ζητήματος, αναπτύχθηκε μια ολοκληρωμένη στρατηγική DNA walking για την ενίσχυση του τρέχοντος συστήματος qPCR για την ανίχνευση των μη εγκεκριμένων από την ΕΕ ΓΤΟ. Μετά από ένα θετικό σήμα κατά τον έλεγχο ρουτίνας με qPCR για p35S, tNOS ή στοιχεία t35S pCAMBIA, τα οποία απαντώνται συχνά σε ΓΤΟ, αυτή η μέθοδος DNA walking μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων αγνώστων πλευρικών περιοχών. Ωστόσο, η εφαρμογή αυτής της στρατηγικής DNA walking έπρεπε να βελτιωθεί για να γίνει η ανάλυση πιο αποτελεσματική για δείγματα που περιέχουν πολλαπλούς ΓΤΟ.

Έτσι, οι Fraiture et al. (2017) συνδύασαν την μέθοδο DNA walking με αλληλούχιση επόμενης γενιάς για την ανίχνευση ΓΤΟ. Οι ερευνητές δοκίμασαν την συγκεκριμένη μέθοδο σε μια σειρά τροφίμων: (i) σε ένα καθαρό υλικό από κόκκους ΓΤ ρυζιού για τη δοκιμή της εφαρμοσιμότητας, (ii) σε υλικά κόκκων ρυζιού που περιέχουν 1%, 0,1% ή 0,01% ΓΤ ρύζι για την αξιολόγηση της ευαισθησίας, (iii) σε επεξεργασμένες μήτρες (ζυμαρικά ρυζιού) για να εκτιμηθεί ο πιθανός αντίκτυπος της μειωμένης ακεραιότητας του DNA λόγω επεξεργασίας και (iv) σε σύνθετα μείγματα με πολλαπλά ΓΤ ρύζια, αραβόσιτο ή/και σόγια. Έπειτα, χρησιμοποίησαν την μέθοδο σε ένα εμπορικό δείγμα από το Κουβέιτ, για το οποίο όμως δεν δίνουν πληροφορίες για το είδος του.

Η μέθοδος αποδείχτηκε αξιόπιστη, κατάλληλη για εφαρμογή σε επεξεργασμένα τρόφιμα και ευαίσθητη, καθώς μπορούσε να ανιχνεύσει ΓΤΟ ακόμα και σε ίχνη. Όσον αφορά το εμπορικό δείγμα, οι ερευνητές δεν εντόπισαν σε αυτό ΓΤΟ που να μην έχουν λάβει έγκριση από την ΕΕ.

Το 2019 έλαβε χώρα μια ακόμα έρευνα βασισμένη στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς για την αυθεντικότητα φυτικών προϊόντων από τους Barbosa et al. Συγκεκριμένα, ανέλυσαν και χαρακτήρισαν τη σύνθεση και τη γνησιότητα 66 δειγμάτων μπαχαρικών, βοτάνων και προϊόντων καρυκεύματος.

Τα βότανα και τα μπαχαρικά είναι κοινά και σημαντικά συστατικά σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων, ποτών, συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμάκων και καλλυντικών. Τα βότανα στο εμπόριο είναι συνήθως φυτά με πράσινα φύλλα που χρησιμοποιούνται είτε νωπά είτε σε αποξηραμένη μορφή και περιέχουν ευχάριστες γευστικές ή αρωματικές ιδιότητες. Τα μπαχαρικά είναι τα αποξηραμένα μέρη των φυτών, συχνά με έντονα ή ζωηρά χρώματα και συνήθως συλλέγονται από περιοχές που είναι γνωστές για τα θερμότερα κλίματα. Βότανα που χρησιμοποιούνται σε μαγειρικές ή διατροφικές εφαρμογές είναι συνήθως τα φύλλα, άνθη ή μίσχοι των φυτών (π.χ. ρίγανη και βασιλικός), ενώ τα μπαχαρικά αποτελούνται από σπόρους, καρπούς, ρίζες, φλοιούς κ.λπ. (π.χ. μαύρο πιπέρι, κανέλα και τζίντζερ). Η ευρεία μαγειρική χρήση και τα πιθανά οφέλη των φυτικών προϊόντων για την υγεία και την ευεξία, συμπεριλαμβανομένων των μπαχαρικών και των βοτάνων, καθορίζουν τη σημασία αυτών των συστατικών στη βιομηχανία με πολλά οικονομικά οφέλη.

Ως αποτέλεσμα, η βιομηχανία βοτάνων και μπαχαρικών είναι πολύ ευάλωτη στην απάτη τροφίμων μαζί με τις βιομηχανίες κρέατος, ιχθυηρών και ελαιολάδου. Ο κύριος λόγος είναι η υψηλή αξία των προϊόντων κατά βάρος και η περιορισμένη ικανότητα των καταναλωτών να εντοπίζουν τη νοθεία κυρίως σε αλεσμένα ή κονιορτοποιημένα προϊόντα.

Αρχικά, οι ερευνητές ανέλυσαν προϊόντα με την επισήμανση ότι αποτελούνται από ένα συστατικό. Παρατηρήθηκαν αποτελέσματα NGS σε ασυμφωνία με την ετικέτα του προϊόντος στην πλειονότητα των δειγμάτων. Αυτό το σύνολο δειγμάτων περιλάμβανε: 2 δείγματα βασιλικού, 4 κουρκουμά, 6 από τα 11 κύμινου, 10 ρίγανης και 3 από τα 7 πιπεριού. Όλα τα δείγματα ήταν σε μορφή σκόνης. Για όλα τα δείγματα, ταυτοποιήθηκε το δηλωθέν στην ετικέτα είδος. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι δεν υπήρξε περίπτωση ολικής υποκατάστασης ειδών (εκούσια ή ακούσια). Ωστόσο, εντοπίστηκε περισσότερο αδήλωτο φυτικό υλικό σε αυτά τα δείγματα μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δεδομένων NGS. Η πηγή αυτών των πρόσθετων ειδών που εντοπίστηκαν δεν είναι σαφής. Οι ερευνητές δεν μπόρεσαν να πουν με βεβαιότητα αν ήταν αποτέλεσμα δόλιας πρακτικής. Πράγματι, μπορεί να υπάρξουν διασταυρούμενες επιμολύνσεις που συμβαίνουν κατά τη συγκομιδή, το χειρισμό ή την επεξεργασία των συστατικών και του τελικού προϊόντος.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν την ίδια μέθοδο σε δείγματα που αποτελούνταν από μίγματα διαφόρων συστατικών. Από το σύνολο των 26 δειγμάτων που αναλύθηκαν, τα αποτελέσματα που ήταν σύμφωνα με την ετικέτα παρατηρήθηκαν σε 3 από τα 11 δείγματα κάρυ, σε 2 μείγματα σε σκόνη καρυκευμάτων κρέατος και σε 3 από τα 5 μείγματα καρυκευμάτων κρέατος από αποξηραμένα βότανα. Όλα τα άλλα δείγματα μειγμάτων δεν περιείχαν τα δηλωθέντα είδη ή περιείχαν περισσότερα είδη από όσα δήλωναν οι ετικέτες. Μια πιθανή αιτία για τις περιπτώσεις στις οποίες τα δηλωθέντα είδη δεν ταυτοποιήθηκαν, είναι η αδυναμία αυτής της μεθόδου εργασίας να ανιχνεύσει συστατικά σε ίχνη στο δείγμα. Επιπλέον, τα διάφορα συστατικά των δειγμάτων μπορεί να έχουν υποστεί διαφορετικά επίπεδα επεξεργασίας, οδηγώντας σε αποικοδόμηση του DNA και κατά συνέπεια, μικρότερη συνεισφορά βιώσιμου DNA στο τελικό εκχύλισμα του συγκεκριμένου συστατικού. Τέλος, ο υψηλότερος αριθμός ειδών από τον αναμενόμενο που παρατηρήθηκε σε ορισμένα δείγματα, μπορεί να αντιπροσωπεύει δόλιες πρακτικές ή μπορεί απλώς να πρόκειται για διασταυρούμενη μόλυνση κατά την συγκομιδή, τον χειρισμό ή την επεξεργασία των προϊόντων.

4.2 Ζωοτροφές

Η σημερινή αγορά απαιτεί τα προϊόντα να είναι ασφαλή και υψηλής ποιότητας. Ο προσδιορισμός του είδους παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της γνησιότητας και της εμπορευσιμότητας ενός προϊόντος. Έχει γίνει όλο και πιο σημαντικό για το εμπόριο προϊόντων ζωικής προέλευσης να δηλώνεται σωστά το είδος και, αφετέρου, αυτό να μπορεί να επαληθευτεί. Η νοθεία ζωοτροφών έχει γίνει ένα κοινό πρόβλημα σε πολλές χώρες και εγκυμονεί πολλούς κινδύνους για την υγεία όχι μόνο των ζώων, αλλά και των ανθρώπων.

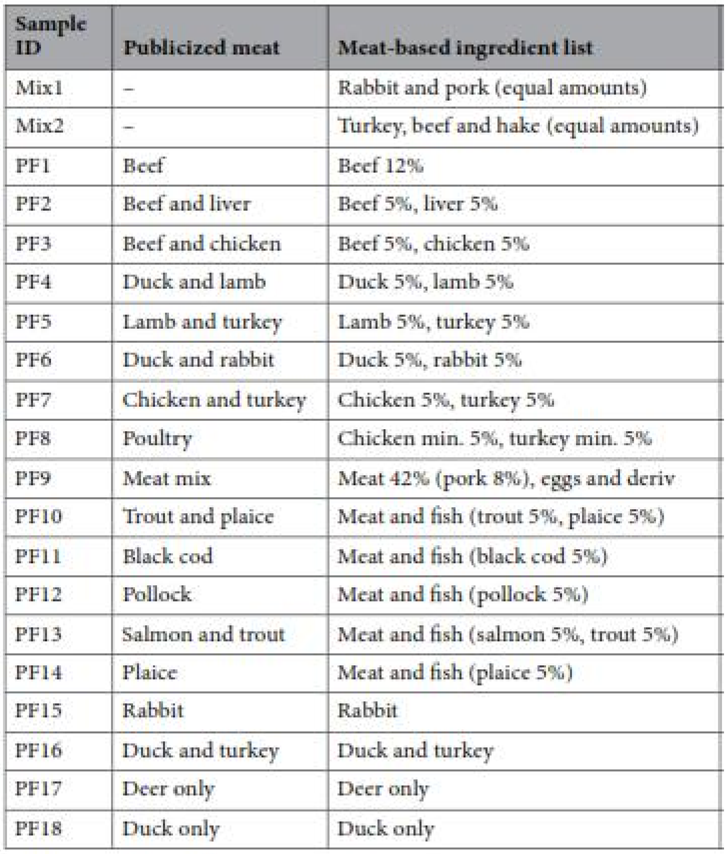
Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών. Είναι μια ασθένεια των μηρυκαστικών που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1986 στο Ηνωμένο Βασίλειο. Από τις αρχές της επιδημίας, έγινε γνωστό ότι η παρουσία αλεύρων κρέατος και οστών στις ζωοτροφές ήταν ένας κοινός παράγοντας σε όλες τις περιπτώσεις σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (Sakinah et al., 2017). Εκτός από τους κινδύνους για την υγεία, η απουσία ειδών ή η παρουσία άγνωστων ειδών στις ζωοτροφές θα μπορούσε να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα του τελικού προϊόντος, δεδομένου ότι είναι γνωστό ότι η διατροφή των ζώων θεωρείται καθοριστικός παράγοντας τόσο για την υγεία τους όσο και για την ποιότητα του προϊόντος (Campos et al., 2018). Τέτοιου είδους περιπτώσεις κατέστησαν σαφές ότι απαιτούνται ευαίσθητες τεχνικές και για την εξακρίβωση των συστατικών των ζωοτροφών και όχι μόνο των τροφίμων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

4.2.1 Εύρεση νοθείας με DNA Barcoding και αλληλούχιση επόμενης γενιάς

Οι τροφές για κατοικίδια ζώα ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως όλα τα προϊόντα που προορίζονται για τη σίτιση των κατοικίδιων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των μπαρών μάσησης για σκύλους. Περισσότερες από 130 εταιρείες ζωοτροφών δραστηριοποιούνται στην αγορά της ΕΕ και η παραγωγή ρυθμίζεται αυστηρά σε κάθε στάδιο. Για την περαιτέρω ενίσχυση των ρυθμίσεων των ετικετών, η ΕΕ εξέδωσε το 2018 τον 'Κώδικα για την καλή πρακτική επισήμανσης για τις τροφές κατοικίδιων'. Σύμφωνα με τις νομικές απαιτήσεις για την επισήμανση που ορίζονται στον προαναφερθέντα κώδικα, θα πρέπει να αναγράφεται η ονομασία του κάθε υλικού κατά φθίνουσα σειρά με βάση το βάρος του. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφέρεται το ποσοστό του βάρους στην ετικέτα, ιδίως εάν υπάρχει κάποιο ειδικό στοιχείο να τονίζεται στην επισήμανση με λέξεις ή εικόνες. Ωστόσο, παρά τις υπάρχουσες ρυθμίσεις, η παγκοσμιοποίηση του εμπορίου τροφίμων έχει αυξήσει τη δυνατότητα απάτης (εσκεμμένης) και τυχαίας λανθασμένης επισήμανσης.

Για αυτό, οι Palumbo et al. (2020) εφάρμοσαν αλληλούχιση επόμενης γενιάς σε συνδυασμό με DNA mini-barcoding με στόχο το γονίδιο *COI* για τον εντοπισμό λανθασμένης επισήμανσης σε τροφές για κατοικίδια. Συνολικά, χρησιμοποίησαν 18 εμπορικά προϊόντα από ιταλικά εκπτωτικά καταστήματα και supermarket. Τα προϊόντα επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύουν την ξηρή και την υγρή μορφή με τις οποίες πωλούνται οι τροφές για σκύλους και γάτες (κροκέτες, μπουκιές, πατέ και λωρίδες).

Πίνακας 15: Λίστα των δειγμάτων που αναλύθηκαν



Sample ID	Publicized meat	Meat-based ingredient list
Mix1	–	Rabbit and pork (equal amounts)
Mix2	–	Turkey, beef and hake (equal amounts)
PF1	Beef	Beef 12%
PF2	Beef and liver	Beef 5%, liver 5%
PF3	Beef and chicken	Beef 5%, chicken 5%
PF4	Duck and lamb	Duck 5%, lamb 5%
PF5	Lamb and turkey	Lamb 5%, turkey 5%
PF6	Duck and rabbit	Duck 5%, rabbit 5%
PF7	Chicken and turkey	Chicken 5%, turkey 5%
PF8	Poultry	Chicken min. 5%, turkey min. 5%
PF9	Meat mix	Meat 42% (pork 8%), eggs and deriv
PF10	Trout and plaice	Meat and fish (trout 5%, plaice 5%)
PF11	Black cod	Meat and fish (black cod 5%)
PF12	Pollock	Meat and fish (pollock 5%)
PF13	Salmon and trout	Meat and fish (salmon 5%, trout 5%)
PF14	Plaice	Meat and fish (plaice 5%)
PF15	Rabbit	Rabbit
PF16	Duck and turkey	Duck and turkey
PF17	Deer only	Deer only
PF18	Duck only	Duck only

Βάση των αποτελεσμάτων, οι ερευνητές κατέταξαν τα δείγματα σε τρεις κατηγορίες: (Α) δείγματα των οποίων το περιεχόμενο αντιπροσωπεύεται σε ποσοστά >90%, από δηλωθέντα είδη, (Β) δείγματα που εμφανίζουν τα δηλωθέντα είδη μαζί με άλλα είδη που δεν αναφέρονται ρητά στην ετικέτα και σε ποσοστά άνω του 10% και (Γ) δείγματα από τα οποία λείπει ένα ή περισσότερα από τα δηλωθέντα είδη.

Η πρώτη κατηγορία περιελάβανε τα προϊόντα PF17 και PF18 (premium προϊόντα από supermarket) τα οποία περιείχαν *Cervus elaphus* (99,3%) και *Anas platyrhynchos* (94.3%) αντίστοιχα. Η κατηγορία Β εκπροσωπήθηκε από 7 προϊόντα, 6 από τα οποία αγοράστηκαν από εκπτωτικά καταστήματα και 1 από supermarket. Εκτός από τα δηλωθέντα είδη, αυτά περιείχαν και είδη που δεν αναγραφόντουσαν στην ετικέτα. Για παράδειγμα, το δείγμα PF1 εκτός από βοδινό περιείχε και γαλοπούλα (46.0% ± 4%) και κοτόπουλο (19.9 ± 4%). Τέλος, η κατηγορία Γ αποτελούνταν από 9 προϊόντα συμπεριλαμβανομένου και του premium προϊόντος PF15. Γενικά, σε αυτήν τη κατηγορία περιλαμβάνονταν τα 7 προϊόντα που δήλωναν ότι περιείχαν κουνέλι (2) και ψάρι (5), αφού το ποσοστό αυτών των ειδών ήταν πάντα κάτω από 0,2%.

Παρόμοια αποτελέσματα έλαβαν και οι Preckel et al. (2021), οι οποίοι με χρήση 16S rDNA metabarcoding ανέλυσαν 23 εμπορικά προϊόντα τροφών για κατοικίδια με έμφαση σε αυτά που περιείχαν ζώα από κυνήγι επειδή αυτά τα προϊόντα είναι γνωστό ότι είναι ευάλωτα στην υποκατάσταση με κρέατα χαμηλότερης αξίας.

Και οι ίδιοι παρατήρησαν ότι πολλά προϊόντα περιείχαν είδη που δεν αναγράφονταν ή περιείχαν εντελώς διαφορετικά είδη από τα αναγραφόμενα. Πιο συγκεκριμένα, δεκαπέντε από τα 23 προϊόντα δήλωναν ότι περιέχουν ελάφι, χωρίς να γνωστοποιείται το είδος του ελαφιού. Τα αποτελέσματα, έδειξαν την παρουσία ειδών ελαφιού σε 11 από τα 15 αυτά δείγματα. Επίσης, σε πολλά δείγματα ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό >5% χοιρινό, κοτόπουλο, βοδινό, αγριόπαπια και γαλοπούλα, τα οποία δεν είχαν δηλωθεί στις ετικέτες. Αυτά τα είδη ζώων χαμηλότερης εμπορικής αξίας, αντικατέστησαν κυρίως το ελάφι, είτε εξ ολοκλήρου είτε εν μέρει. Σε ορισμένα προϊόντα ανιχνεύθηκαν μη δηλωμένα είδη σε αναλογία μεταξύ 1% και 5%. Πιθανότατα, τα είδη αυτά ήταν παρόντα λόγω επιμόλυνσης που σχετίζεται με την παραγωγή. Ακόμη, σε αρκετά προϊόντα, οι ερευνητές δεν ανίχνευσαν καθόλου ορισμένα από τα δηλωμένα είδη ή τα ανίχνευσαν σε ποσότητες μικρότερες από τις αναγραφόμενες. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα απάτη. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να οφείλονται στην ολική ή μερική υποβάθμιση των DNA λόγω των υψηλών βαθμών επεξεργασίας των αντίστοιχων πρώτων υλών.

Μια ακόμα μελέτη που επικεντρώθηκε στις τροφές για γάτες και σκύλους πραγματοποιήθηκε από τους Dunham et al. (2021). Εδώ οι ερευνητές έκαναν χρήση της NGS σε συνδυασμό με DNA metabarcoding για την εύρεση νοθείας και πιθανών πυγών υδραργύρου σε τέτοιου είδους τροφές.

Κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα, οι συγκεντρώσεις υδραργύρου (Hg) στο περιβάλλον έχουν αυξηθεί ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Ο Hg είναι πανταχού παρόν στοιχείο στο περιβάλλον και βιοσυσσωρεύεται στα υδάτινα και χερσαία τροφικά δίκτυα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται υψηλές συγκεντρώσεις Hg σε ορισμένους οργανισμούς (π.χ. τόνος) που συνήθως χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε πολλές εμπορικές τροφές για κατοικίδια ζώα (π.χ. γάτες και σκύλους). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο Hg υπάρχει στις τροφές κατοικίδιων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των τροφών του εμπορίου και των τροφών που παρασκευάζονται στο σπίτι. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ανησυχητικά επειδή ο Hg είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη που μπορεί να υπάρχει σε πολλές μορφές, με τις οργανικές μορφές (π.χ. μεθυλοϋδράργυρος) να είναι οι πιο τοξικές για τις γάτες. Δυστυχώς, δεν υπάρχει επί του παρόντος κανένας κανονισμός για ασφαλείς συγκέντρωσεις Hg στις τροφές κατοικίδιων ζώων. Υπάρχουν διάφορα προτεινόμενα μέγιστα ανεκτά όρια (MTL) για γάτες και σκύλους, που κυμαίνονται από 67 έως 500 μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb) ανάλογα με την πηγή, με τιμές ≤100 ppb να αναφέρονται πιο συχνά.

Πρόσφατα, εντοπίστηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων Hg και ειδικών συστατικών που χρησιμοποιούνται σε τροφές για κατοικίδια ζώα. Υψηλές συγκεντρώσεις έχουν συσχετιστεί με το ελαιόλαδο και τα φασόλια pinto σε παρασκευαζόμενες στο σπίτι τροφές για κατοικίδια ζώα. Όσον αφορά τις εμπορικές τροφές, τα ψάρια και κυρίως τα μεγαλόσωμα και αυτά με το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής αποτελούν μεγάλες πηγές Hg. Ορισμένες φορές έχουν αναφερθεί υψηλές συγκεντρώσεις Hg σε τροφές που δεν αποτελούνται από υλικά που θεωρούνται πηγές Hg (π.χ. σκυλοτροφές με βάση το κοτόπουλο). Αυτό καταδεικνύει ότι τα εν λόγω προϊόντα περιέχουν υλικά πλούσια σε υδράργυρο που δεν αναγράφονται στην ετικέτα, δηλαδή έχουν υποστεί νοθεία.

Συνολικά, οι ερευνητές συνέλεξαν 127 δείγματα εμπορικών τροφών για γάτες και σκύλους. Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειονότητα των εμπορικών τροφών μπορεί να είχε σχετικά ασφαλείς συγκεντρώσεις Hg. Ωστόσο, αρκετές από τις τροφές που εξετάστηκαν περιείχαν ανησυχητικές συγκεντρώσεις ολικού Hg. Καμία από τις λιχουδιές που δοκιμάστηκαν δεν περιείχε υψηλές συγκεντρώσεις Hg. Η πλειοψηφία των δειγμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις Hg ήταν τροφές για γάτες, ιδίως υγρές τροφές για γάτες, και τροφές που περιείχαν συστατικά με βάση τα ψάρια. Τρεις τροφές είχαν ολικές συγκεντρώσεις Hg πάνω από τα προτεινόμενα MTLs (100 μg/kg), και επιπλέον 10 τροφές είχαν συνολικές συγκεντρώσεις Hg πάνω από 30 μg/kg. Δύο τροφές είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε μεθυλοϋδράργυρο σε σχέση με τις συγκεντρώσεις μεθυλυδραργύρου για τα υπόλοιπα δείγματα. Επειδή όμως δεν έχουν καθοριστεί MTLs για γάτες και σκύλους για τον μεθυλοϋδράργυρο, είναι αδύνατο να προσδιοριστεί αν οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν σε αυτά τα δείγματα είναι ανησυχητικές.

Παρά το γεγονός ότι οι συνθέσεις των τροφών για κατοικίδια ζώα είναι απλοϊκές και συνεπείς, πολλές από τις εξεταζόμενες τροφές ήταν νοθευμένες. Νοθεία είχαν υποστεί οι τροφές που είχαν υψηλή συγκέντρωση Hg, αλλά τα συστατικά που αναγράφονταν στις ετικέτες δεν δικαιολογούσαν κάτι τέτοιο. Τα συγκεκριμένα δείγματα είτε είχαν επιπλέον είδη που δεν αναγράφονταν στην επισήμανση είτε αποτελούνταν από εντελώς διαφορετικά είδη από τα αναγραφόμενα. Νοθείες πραγματοποιήθηκαν και στα ζωικά και στα φυτικά συστατικά των ζωοτροφών.

Όπως έγινε αντιληπτό, οι ζωοτροφές είναι εξίσου επιρρεπείς σε πρακτικές νοθείας όσο και τα τρόφιμα για ανθρώπινη κατανάλωση. Ενώ εκ πρώτης όψεως το γεγονός αυτό δεν φαντάζει εξαιρετικά σημαντικό, μπορεί να γίνει επικίνδυνο όταν τα ζώα τα οποία καταναλώνουν την νοθευμένη τροφή δεν είναι κατοικίδια, αλλά εκτρέφονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι τα ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών.

Η ιχθυοκαλλιέργεια είναι ένας σημαντικός κλάδος που συμβάλλει στη βιωσιμότητα των τροφίμων για τον παγκοσμίως αυξανόμενο ανθρώπινο πληθυσμό. Η συνεχής επέκταση της υδατοκαλλιέργειας λόγω της αύξησης της παγκόσμιας διατροφικής ζήτησης, απαιτεί μια βιώσιμη βιομηχανία τροφών για ιχθυηρά. Η ασφάλεια των ιχθυοτροφών σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη συμμόρφωση των κατασκευαστών με τους κανονισμούς που επιβάλλονται από τις αρμόδιες αρχές. Ο Κανονισμός 56/2013 της Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Ένωσης απαγορεύει αυστηρά τη χρήση συστατικών που προέρχονται από μηρυκαστικά σε ιχθυοτροφές λόγω του κινδύνου της εξάπλωσης της μεταδοτικής σπογγώδους εγκεφαλίτιδας.

Από την άλλη πλευρά, τα συστατικά που προέρχονται από χοίρους και μη μηρυκαστικά ζώα επιτρέπεται να προστίθενται στις ιχθυοτροφές. Αυτό, ωστόσο, προκάλεσε ανησυχία μεταξύ των μουσουλμάνων ιχθυοκαλλιεργητών και καταναλωτών. Αν και οι ισλαμιστές μελετητές έχουν διαφορετικές απόψεις για το καθεστώς "Halal" των ψαριών που τρέφονται με τροφές που περιέχουν συστατικά από χοίρο, η επαφή με γυμνό χέρι των μουσουλμάνων κτηνοτρόφων με τροφή που περιέχει συστατικά χοίρου είναι επίσης ένα θέμα.

Στις 26 Μαΐου του 2022 οι Mokhtar et al. δημοσίευσαν μια έρευνά τους στην οποία έκαναν χρήση της μεθόδου DNA metabarcoding βασισμένη στην NGS για την εύρεση του προφίλ των ζωικών ειδών σε ιχθυοτροφές. Αρχικά, δοκίμασαν τη μέθοδο σε δείγματα ανόθευτων και νοθευμένων ιχθυοτροφών που έφτιαξαν οι ίδιοι στο εργαστήριο. Στη συνέχεια, αγόρασαν 10 εμπορικές ιχθυοτροφές από 10 διαφορετικά καταστήματα της Ηπειρωτικής Μαλαισίας.

Εκτός από έντομα και ακτινοπτερύγια ψάρια, αρκετά πτηνά και είδη θηλαστικών εντοπίστηκαν σε διάφορα ποσοστά στα εμπορικά δείγματα ζωοτροφών εκτός από ένα. Συνολικά, το 50% των εμπορικών ιχθυοτροφών περιείχε *S. scrofa* (χοίρο), ενώ το 80% περιείχε τόσο *Gallus gallus* (κοτόπουλο) όσο και *Bos taurus* (αγελάδα). Αυτό καταδεικνύει την εκτεταμένη χρήση πτηνών και θηλαστικών στις εμπορικές ιχθυοτροφές στη Μαλαισία. Οι ακατάλληλα επισημασμένες ζωοτροφές που περιέχουν χοιρινό στην αγορά της Μαλαισίας εγείρουν σοβαρές ανησυχίες μεταξύ των μουσουλμάνων εκτροφέων. Ως εκ τούτου, υπάρχει μια επείγουσα ανάγκη να επιβληθούν αυστηρές απαιτήσεις για την ακριβή επισήμανση των συστατικών των ιχθυοτροφών.

4.2.2 Εύρεση νοθείας με μεθόδους PCR

Όπως έχει τονιστεί και παραπάνω, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει απαγορεύσει τη χρήση συστατικών ζωικής προέλευσης σε ζωοτροφές ως προληπτικό μέτρο για την αποφυγή της εξάπλωσης της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (ΣΕΒ). Έτσι, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για ευαίσθητες και αξιόπιστες μεθόδους.

Μια τέτοια μέθοδος είναι η Multiplex PCR. Οι Dalmasso et al. (2004) έκαναν χρήση της εν λόγω μεθόδου για την ταχεία ταυτοποίηση συστατικών μηρυκαστικών, πουλερικών, ιχθυηρών και χοιρινού σε ζωοτροφές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν δείγματα τεσσάρων εμπορικών τροφών για κατοικίδια. Οι ταμπέλες των προϊόντων ανέφεραν τα παρακάτω είδη: (Α) ψάρι, (Β) κρέας κοτόπουλου τουλάχιστον 4% και κρέας γαλοπούλας τουλάχιστον 4%, (Γ) Κοτόπουλο, γαλοπούλα, ζωικό λίπος και (Δ) κρέας βοοειδών τουλάχιστον 4% και κρέας γαλοπούλας τουλάχιστον 4%.

Η μέθοδος κατέδειξε την παρουσία πουλερικών εκτός από ψάρι στο δείγμα (Α) και χοιρινού στα υπόλοιπα τρία δείγματα εκτός από τα δηλωθέντα είδη. Όσον αφορά το δείγμα (Γ), η ένδειξη "ζωικό λίπος" μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία χοιρινού DNA. Συμπερασματικά, οι ερευνητές κατέληξαν ότι η Multiplex PCR που προτείνεται στην παρούσα μελέτη μπορεί να θεωρηθεί ως περαιτέρω βελτίωση μιας ανάλυσης που βασίζεται στην PCR για τον έλεγχο των ζωοτροφών. Μπορεί να εφαρμοστεί για τη λήψη λεπτομερέστερων πληροφοριών όταν μια προκαταρκτική δοκιμή με καθολικούς εκκινητές δώσει θετικά αποτελέσματα.

Το 2014 δημοσιεύθηκε μια μελέτη των Pegels et al., στην οποία η ερευνητές επηρεασμένοι από το σκάνδαλο με την νοθεία αλογίσιου κρέατος σε προϊόντα τροφίμων, ανέπτυξαν μια PCR πραγματικού χρόνου με ανιχνευτές TaqMan συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση DNA αλόγου (*Equus caballus*) και την περαιτέρω εφαρμογή της για την αξιολόγηση της γνησιότητας διαφόρων κρεατοσκευασμάτων για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα κατοικίδια ζώα που επικρατούν στην ισπανική τοπική αγορά.

Ο μεγάλος αριθμός ζωικών και φυτικών συστατικών που μπορούν να συνθέτουν τις ζωοτροφές, σημαίνει ότι οποιαδήποτε διαγνωστική τεχνική θα πρέπει να ελέγχεται για διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έναντι ενός ευρέως φάσματος ειδών διαφορετικής προέλευσης για την αποφυγή λανθασμένων θετικών αποτελέσματων. Στην παρούσα εργασία, αυθεντικοί ιστοί από άλογο (*E. caballus*) και άλλων ζωικών ειδών ελήφθησαν από λιανικές αγορές, τοπικά σφαγεία ή από το Κτηνιατρικό Νοσοκομείο (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ισπανία). Επιπλέον, ένα ευρύ φάσμα φυτικών ειδών συμπεριλήφθηκε στις δοκιμές ειδικότητας. Συνολικά 171 εμπορικά προϊόντα με βάση το κρέας διαφορετικών εμπορικών σημάτων και χαρακτηριστικών (81 από αυτά προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και 90 για σκύλους και γάτες) αγοράστηκαν από διάφορες ισπανικές λιανικές αγορές και καταστήματα κατοικίδιων ζώων. Ο έλεγχος των δειγμάτων περιελάμβανε αξιολόγηση των προϊόντων που δήλωναν ότι περιέχουν άλογο ως συστατικό (μόνο του ή μαζί με άλλα ζωικά είδη), καθώς και τροφές που δεν αναγραφόταν το είδος αυτό στην ετικέτα τους.

Από τα 81 προϊόντα για ανθρώπινη κατανάλωση, 30 είχαν την επισήμανση ότι περιείχαν κρέας αλόγου ως κύριο συστατικό, ενώ 51 δείγματα δήλωναν άλλα ζωικά συστατικά εκτός του αλόγου στις ετικέτες τους, συμπεριλαμβανομένου του βόειου κρέατος, του χοιρινού κρέατος και του κρέατος πτηνών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανιχνεύτηκε DNA αλόγου στα 30 δείγματα που ισχυρίζονταν ότι περιέχουν αυτό το είδος, ενώ όλα τα δείγματα τροφίμων που δήλωναν ότι δεν περιέχουν συστατικά αλόγου έδωσαν αρνητικό σήμα ανίχνευσης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πλήρη συμφωνία με τις επισημάνσεις που παρέχονται από τους προμηθευτές.

Όσον αφορά τις τροφές για κατοικίδια ζώα, θετικά σήματα φθορισμού επιτεύχθηκαν στα 33 δείγματα επισημασμένα ότι περιέχουν συστατικά από άλογο. Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα που έλαβαν οι ερευνητές για τις αναλύσεις των 57 προϊόντων που δεν δηλώναν άλογο στον κατάλογο των συστατικών, κατέδειξαν ότι τα περισσότερα από αυτά (79%) δεν έδωσαν θετικό σήμα στη δοκιμασία PCR πραγματικού χρόνου, σε συμφωνία με την ετικέτα, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα (21%) έδειξαν παρουσία αλογίσιου κρέατος. Αυτά τα τελευταία αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε τυχαία παρουσία ιχνών DNA αλόγου στα εν λόγω δείγματα, που αποδίδονται σε εγγενή διασταυρούμενη επιμόλυνση όταν χρησιμοποιείται μη επαρκώς καθαρισμένος εξοπλισμός για την επεξεργασία κρέατος από περισσότερα του ενός είδη.

Την ίδια μέθοδο χρησιμοποίησαν και οι Campos et al. (2018), αλλά αυτή τη φορά βασίστηκαν στην οικογένεια γονιδίων της εναλλακτικής οξειδάσης (*AOX*) για τον εντοπισμό φυτικών ειδών σε δείγματα ζωοτροφών. Τα είδη-στόχοι επιλέχθηκαν μεταξύ των πιο κοινών φυτικών ειδών που χρησιμοποιούνται ως συστατικά των ζωοτροφών, ή αντίθετα, αυτά που θεωρούνται μολυσματικά για τις ζωοτροφές, λόγω της αρνητικής επίδρασης που μπορεί να έχουν στην ποιότητα του τελικού προϊόντος (γάλα και τυρί). Συγκεκριμένα, τα φυτικά είδη που επέλεξαν για ανίχνευση σε δείγματα ζωοτροφών ήταν το σιτάρι, ο αραβόσιτος, το κριθάρι, η σόγια, το ρύζι και ο ηλίανθος ως κοινά συστατικά των ζωοτροφών, και το βαμβάκι, το λινάρι και το φιστίκι ως πιθανές ανεπιθύμητες προσμίξεις. Η εφαρμοσιμότητα της δικιμής AOX TaqMan αξιολογήθηκε από τους ερευνητές μέσω της εξέτασης εμπορικών δειγμάτων ζωοτροφών και επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση φυτικών μιγμάτων με γνωστή σύνθεση.

Συνολικά εξετάστηκαν τρεις ομάδες δειγμάτων: (1) δύο μείγματα αναφοράς (ΜΑ) πρώτων υλών ζωοτροφών που μιμούνταν τη σύνθεση των εμπορικών ζωοτροφών, (2) 8 δείγματα ζωοτροφών με επισημασμένα είδη (τα 7 από αυτά εστάλησαν από τους συνεργάτες του Feed-Code και 1 ήταν εμπορική ζωοτροφή αγελάδων) και (3) 7 μείγματα που αποτελούνταν από 1 έως 8 διαφορετικές πρώτες ύλες, σε διαφορετικούς συνδυασμούς, για μια διαδικασία διεργαστηριακής σύγκρισης (ILC), που ανατέθηκε στους συμμετέχοντες από την Eurofins Food and Feed Testing, Norway AS. Τα φυτικά είδη που εξετάστηκαν για τη δοκιμή αυτή ήταν το σιτάρι, το κριθάρι, η σόγια, ο αραβόσιτος, το βαμβάκι, ο ηλίανθος, το ρύζι και το λινάρι.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα, αποδείχθηκε ισχυρή για ανίχνευση φυτικών ειδών τόσο σε επίπεδο ειδικότητας όσο και σε επίπεδο ευαισθησίας. Σε γενικές γραμμές και σε σχέση με τα είδη που μελετήθηκαν, η μη τήρηση των δηλωθέντων συνθέσεων διαπιστώθηκε για όλα σχεδόν τα δείγματα ζωοτροφών. Σφάλματα ή παραποιήσεις σχετίζονταν είτε με ελλείψεις συστατικών, που δηλωνόντουσαν στην ετικέτα αλλά στην πραγματικότητα απουσιάζανε (λινάρι και ηλίανθος σε δύο δείγματα) ή, πιο συχνά, στην παρουσία μη δηλωμένων ειδών. Τα μη δηλωθέντα είδη μπορεί να είναι επιμολυντές (π.χ. ηλίανθος) ή άλλο συστατικό είδος (π.χ. σιτάρι). Μόνο ένα δείγμα ήταν πλήρως συμμορφούμενο με την ετικέτα.

Όπως έχει αναφερθεί, η απάτη των ζωοτροφών μπορεί να προκαλέσει προβλήματα υγείας στους ανθρώπους αν τα ζώα προορίζονται για κατανάλωση, όμως και η υγεία των ίδιων των ζώων μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή τους. Το γεγονός ότι τα κατοικίδια ζώα δεν εκτρέφονται για να καταναλωθούν δεν σημαίνει ότι το ζήτημα της αυθεντικότητας των τροφών τους πρέπει να λαμβάνεται με λιγότερη σοβαρότητα. Για παράδειγμα, τα σκυλιά μπορεί να υποφέρουν από διαφορετικούς τύπους αλλεργιών εξ επαφής, εισπνεόμενες αλλεργίες και τροφικές αλλεργίες. Οι τελευταίες έχουν γίνει μια από τις πιο συχνές ασθένειες για τις οποίες οι ιδιοκτήτες επισκέπτονται τους κτηνιάτρους. Οπότε, για σκύλους με τροφική υπερευαισθησία ή τροφικές αλλεργίες, είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται η κατάλληλη τροφή. Η επιλογή της κατάλληλης νέας τροφής για κατοικίδια ζώα εξαρτάται από τη λήψη ολοκληρωμένων πληροφοριών από τον ιδιοκτήτη του σκύλου για να εξακριβωθεί ότι η πηγή πρωτεΐνης δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι πιο κοινές αλλεργικές πηγές ζωικής πρωτεΐνης που εντοπίζονται στους σκύλους είναι το κοτόπουλο, το χοιρινό, το μοσχάρι και το αρνί, με το ψάρια να αναφέρονται λιγότερο συχνά ως αλλεργιογόνος πρωτεΐνη. Από τα προαναφερθέντα αλλεργιογόνα, η πιο κοινή αλλεργιογόνος τροφή για σκύλους που διαγιγνώσκονται με τροφική αλλεργία είναι το κοτόπουλο, το οποίο αντιπροσωπεύει πάνω από το 60 % των περιπτώσεων τροφικής αλλεργίας.

Η αντικατάσταση των πιο πολύτιμων ζωικών ειδών με ζωικά είδη χαμηλότερης οικονομικής αξίας είναι ένας συνηθισμένος τύπος νοθείας των προϊόντων κρέατος. Τις περισσότερες φορές, τα μη δηλωμένα είδη μπορεί να είναι χοιρινό, κοτόπουλο και μοσχάρι. Τα προαναφερθέντα είδη είναι τα πιο συχνά καταναλισκόμενα, και ως εκ τούτου σφάζονται σύμφωνα με τις ανάγκες των καταναλωτών οι οποίοι τα επιλέγουν συχνότερα. Ως αποτέλεσμα, οι μεγαλύτερες ποσότητες ζωικών παραπροϊόντων προέρχονται από αυτά τα είδη και, κατά συνέπεια, είναι φθηνότερα από τα πρόβατα, το κρέας αιγών, αλόγων ή πιο ασυνήθιστων ειδών, όπως τα ελάφια. Έτσι, είναι εύλογο ότι οικονομικοί λόγοι μπορεί να οδηγήσουν στην συχνή ανίχνευση αυτών των ζωικών ειδών ως νοθευτικών ουσιών στις τροφές για σκύλους. Η νόθευση των τροφών για σκύλους είναι αρκετά συχνή, ακόμη και εκείνων που χαρακτηρίζονται ως "υποαλλεργικές" ή με καινοτόμες ή μονοπρωτεϊνικές πηγές.

Έτσι, λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, οι Pacelik et al. (2023) πραγματοποίησαν μια μελέτη για την ανίχνευση της νοθείας στη σύνθεση των εμπορικών ξηρών σκυλοτροφών περιορισμένης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (επίσης μονοπρωτεϊνικές και υποαλλεργικές) με βάση την ταυτοποίηση του DNA κοτόπουλου και του DNA χοιρινού κρέατος με τη μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου. Από τη βάση των εμπορικών ξηρών τροφών για σκύλους που δεν περιέχουν πρωτεΐνες και λίπος από κοτόπουλο ή χοιρινό, επιλέχθηκαν 29 προϊόντα. Οι τροφές αυτές αγοράστηκαν από τους ερευνητές από καταστήματα κατοικίδιων ζώων και ηλεκτρονικά καταστήματα.

Αν και οι παραγωγοί δεν δήλωσαν την παρουσία κοτόπουλου και χοιρινού σε καμία από τις 29 σκυλοτροφές που αναλύθηκαν, ποσότητα DNA κοτόπουλου ανιχνεύθηκε σε 19 τροφές και χοιρινού σε 11 τροφές. Τα 6 από τα 29 είχαν χαρακτηριστεί ως μονοπρωτεϊνικά. Τα κύρια συστατικά ζωικής προέλευσης ήταν ψάρι, αρνί και βοδινό. Στην περίπτωση των τροφίμων με ψάρι, οι αναλύσεις έδειξαν την παρουσία DNA κοτόπουλου σε ένα τρόφιμο και την παρουσία DNA κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος σε ένα άλλο. Στην τρίτη μονοπρωτεϊνική τροφή ψαριών που περιείχε παπαλίνα, ρέγγα και flounder, δεν βρέθηκε DNA κοτόπουλου ή χοιρινού. Οι δύο τροφές για σκύλους που δηλώθηκαν από τον παραγωγό ότι περιέχουν μόνο αρνί περιείχαν και οι δύο κοτόπουλο και χοιρινό. Δεν ανιχνεύτηκε άλλο ζωικό είδος στην μονοπρωτεϊνική τροφή με βοδινό.

Στην περίπτωση των υποαλλεργικών τροφών, οι οποίες ήταν 12 από τις 29, τα κύρια συστατικά ζωικής προέλευσης που ήταν δηλωμένα από τους παραγωγούς ήταν ψάρια, έντομα, αρνί, γαλοπούλα, στρουθοκάμηλος και καγκουρό. DNA κοτόπουλου και χοιρινού βρέθηκαν σε δύο υποαλλεργικές τροφές ψαριών για σκύλους. DNA κοτόπουλου ανιχνεύθηκε σε δύο τροφές με έντομα. Η σκυλοτροφή με αρνί περιείχε τόσο κοτόπουλο όσο και χοιρινό κρέας. Η τροφή που δηλώθηκε ότι περιέχει γαλοπούλα περιείχε επίσης κοτόπουλο. Η παρουσία DNA κοτόπουλου και χοιρινού κρέατος ανιχνεύθηκε σε τροφή που περιείχε στρουθοκάμηλο και σε τροφή που περιείχε καγκουρό. Στις υπόλοιπες 11 τροφές, οι κατασκευαστές δεν διευκρίνισαν αν η τροφή ήταν μονοπρωτεϊνική ή υποαλλεργική, αλλά η παρουσία μη δηλωμένων ζωικών ειδών ήταν επίσης συχνή. Το περισσότερο DNA κοτόπουλου βρέθηκε στην ζωοτροφή της οποίας τα ζωικά συστατικά που δηλώνονταν στην ετικέτα ήταν ψάρια (σολομός, ρέγγα, χωματίδα, μπακαλιάρος, μαύρος μπακαλιάρος), αλλά το τρόφιμο αυτό δεν χαρακτηριζόταν ως υποαλλεργικό ή μονοπρωτεϊνικό. Αντίθετα, στην περίπτωση του χοιρινού DNA, η μργαλύτερη ποσότητα ανιχνεύτηκε σε τροφή που έγραφε ότι περιείχε μόνο στρουθοκάμηλο και ήταν επισημασμένη ως υποαλλεργική.

Συμπερασματικά, η έρευνα έδειξε ότι τόσο οι μονοπρωτεϊνικές όσο και οι υποαλλεργικές σκυλοτροφές περιείχαν μη δηλωμένες πηγές ζωικών πρωτεϊνών με χαμηλότερη οικονομική αξία, γεγονός που μπορεί να αποτελεί σκόπιμη νοθεία από τους παραγωγούς. Ως εκ τούτου, οι τροφές αυτές, παρά την δήλωση του κατασκευαστή, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη λύση στη θεραπεία σκύλων με τροφικές αλλεργίες, καθώς μπορεί να παρεμβαίνουν στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας, δίνοντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Επίλογος

Συνοψίζοντας όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι το φαινόμενο της νοθείας των τροφίμων είναι διαχρονικό και παγκόσμιο φαινόμενο και θα συνεχίσει να υφίσταται όσο οι επιχειρήσεις βάζουν σε προτεραιότητα το κέρδος αντί για την ποιότητα και την ασφάλεια. Το μεγαλύτερο πρόβλημα όσον αφορά την απάτη των τροφίμων (και ιδιαίτερα των θαλασσινών), φαίνεται να υφίσταται στην Κίνα, λόγω τις έλλειψης του απαραίτητου νομοθετικού πλαισίου και των απαραίτητων ρυθμίσεων. Είναι επιτακτικό η κατάσταση αυτή να βελτιωθεί όσο πιο σύντομα γίνεται, καθώς η Κίνα είναι από τους μεγαλύτερους παραγωγούς και καταναλωτές παγκοσμίως. Επίσης, η νοθεία δεν περιορίζεται μόνο στα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά συναντάται και στις ζωοτροφές, τόσο για τα κατοικίδια ζώα όσο και για εκείνα που εκτρέφονται για την παραγωγή προϊόντων, προκαλώντας αρκετές φορές προβλήματα στην υγεία τους. Ειδικά τα τελευταία, έχουν άμεσες συνέπιες στην ανθρώπινη υγεία, καθώς και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων.

Ευτυχώς, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στο DNA για τον εντοπισμό της νοθείας στα τρόφιμα, οι οποίες χαίρουν όλο και μεγαλύτερης αποδοχής και χρήσης από την επιστημονική κοινότητα και τους ελεγκτικούς φορείς, αφού προσφέρουν ευαίσθητα και αξιόπιστα εργαλεία ανάλυσης και ανίχνευσης. Από τις έρευνες που συλλέχθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, φαίνεται ότι οι μέθοδοι που προτιμώνται περισσότερο είναι η DNA Barcoding, η αλληλούχιση επόμενης γενιάς και τεχνικές που βασίζονται στην PCR, λόγω του γεγονότος ότι είναι σχετικά απλές, γρήγορες και μπορούν να εφαρμοστούν σε επεξεργασμένα προϊόντα με μερική καταστροφή του DNA των συστατικών τους.

Συγκεκριμένα, η DNA Barcoding και η NGS φαίνεται να χαίρουν ευρείας αποδοχής από την επιστημονική κοινότητα στον τομέα ελέγχου νοθείας στα τρόφιμα. Η DNA Barcoding αποτελεί χρήσιμο εργαλείο, λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιεί μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό DNA, το οποίο είναι αρκετά πιο ανθεκτικό από το πυρηνικό, κάνοντάς την ιδανική μέθοδο για τρόφιμα που έχουν υποστεί αρκετή επεξεργασία. Όσον αφορά την NGS, έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί μαζική παράλληλη αλληλούχιση με πολλαπλές αναγνώσεις σε περίπλοκες μήτρες τροφίμων. Η ικανότητά της αυτή, την έχει καταστήσει δημοφιλή σε προϊόντα που αποτελούνται από πολλά είδη τροφίμων ξεπερνώντας και την Multiplex PCR, καθώς δεν απαιτείται γνώση όλων των συστατικών του εκάστοτε τροφίμου. Τέλος, ενώ και HRM χρησιμοποιείται αρκετά, το γεγονός ότι απαιτεί μικρές αλληλουχίες για την ορθή λειτουργεία της, την έχει καταστήσει λιγότερο ελκυστική σε σχέση με τις παραπάνω μεθόδους.

Συμπερασματικά, οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την καταπολέμηση της νοθείας και ήδη χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα για τον εν λόγω σκοπό.

Βιβλιογραφία

- ΕΦΕΤ: Παραπλάνηση/Νοθεία www.efet.gr
- ΝΟΜΟΣ ΥΠ’ ΑΡΙΘ. 4177 (ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ 8 Αυγούστου 2013)
- ΠΑΛΑΙΟΣ ΠΙΝΙΚΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
- ΝΟΜΟΣ ΥΠ’ ΑΡΙΘ. 4619 (ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ 11 Ιουνίου 2019)
- ΠΡΟΕΔΡΙΚΟ ΔΙΑΤΑΓΜΑ ΥΠ’ ΑΡΙΘΜ. 71 (ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ 24 Ιουλίου 2018)
- ΝΟΜΟΣ ΥΠ’ ΑΡΙΘ. 4235 (ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ 11 Φεβρουαρίου 2014)
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1830/2003 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 1536/92 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1169/2011 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1379/2013 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 625/2017 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1760/2000 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2065/2001 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 178/2002 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΟΔΗΓΙΑ 2000/13/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 1379/2013 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ www.europa.eu
- CODEX ALIMENTARIUS
- W.J Fischer, Benoit Schilter, Angelika Tritscher, Richard H Stadler (2011). Contaminants of Milk and Dairy Products: Contamination Resulting from Farm and Dairy Practices. *Food Sciences* pp. 1–13 DOI:10.1016/B978-0-12-374407-4.00104-7
- Parminder Singh, Neeraj Gandhi (2015). Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. Food Reviews International pp. 236-261 DOI:10.1080/87559129.2014.994818
- Hemanth Singuluri and Sukumaran MK (2014). Milk Adulteration in Hyderabad, India – A Comparative Study on the Levels of Different Adulterants Present in Milk. *Journal of Chromatography Separation Techniques* pp. 190-192 DOI: 10.4172/2157-7064.1000212
- Changbai Xiu, K.K. Klein (2010). Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. *Food Policy* pp. 463-470 doi:10.1016/j.foodpol.2010.05.001
- Anthony Kai-ching Hau, Tze Hoi Kwan and Philip Kam-tao Li (2009). Melamine Toxicity and the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* pp. 245-250 doi: 10.1681/ASN.2008101065
- Falkheimer, Jesper; Heide, Mats (2015). Trust and Brand Recovery Campaigns in Crisis: Findus Nordic and the Horsemeat Scandal. *International Journal of Strategic Communication* pp. 134-147 DOI: 10.1080/1553118X.2015.1008636
- Casiane Salete Tibola, Simone Alves da Silva, Alvaro Augusto Dossa, Diego Inácio Patrício (2018). *Journal of Food Science* pp. 2028-2038 doi: 10.1111/1750-3841.14279

- Neal Nathanson, John Wilesmith, and Christian Griot (1997). Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE): Causes and Consequences of a Common Source Epidemic. *American Journal of Epidemiology* pp. 959–969 https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009064
- Jana Telfer (1999). Apocalypse cow: Policy-making in conditions of uncertainty-lessons from the BSE epidemic in the United Kingdom. *Journal of public and international affaires* pp. 162-181 https://jpia.princeton.edu/sites/g/files/toruqf1661/files/1999-10.pdf
- Gianni Barcaccia, Margherita Lucchin and Martino Cassandro (2015). DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy. *Diversity* doi:10.3390/d8010002
- Andrea Galimberti, Fabrizio De Mattia, Alessia Losa, Ilaria Bruni, Silvia Federici, Maurizio Casiraghi, Stefano Martellos, Massimo Labra (2013). *Food Research International* pp. 55-63 https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036
- Nicolas Hubert, Robert Hanner (2015). DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. *Hal open science DNA Barcodes* pp. 44-58 DOI 10.1515/dna-2015-0006
- Vincent Savolainen, Robyn S. Cowan, Alfried P. Vogler, George K. Roderick and Richard Lane (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of The Royal Society* pp. 1805–1811 doi:10.1098/rstb.2005.1730
- David E. Schindel (2005). DNA Barcoding: A New Mission for Museum Collections. *SPNHC NEWSLETTER* September 2005 Volume 19, Number 2.
- Maria Erali, Carl T. Wittwer (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* pp. 250-261 doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.013
- Carl T. Wittwer (2009). High-Resolution DNA Melting Analysis: Advancements and Limitations. *HUMAN MUTATION* pp. 857-859 DOI 10.1002/humu.20951
- Rolf H.A.M. Vossen, Emmelien Aten, Anja Roos, and Johan T. den Dunnen (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More Than Just Sequence Variant Screening. *HUMAN MUTATION* pp. 860-866 DOI 10.1002/humu.21019
- Ayman Grada and Kate Weinbrecht (2013). Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *Journal of Investigative Dermatology* pp. 1-4 doi:10.1038/jid.2013.248
- Edward Haynes, Elisa Jimenez, Miguel Angel Pardo, Sarah J. Helyar (2019). The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control* pp. 134-143 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.010
- Kary Banks Mullis (1994). PCR: Polymerase Chain Reaction
- Mark A. Valasek and Joyce J. Repa (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* pp. 151–159 doi:10.1152/advan.00019.2005
- Mikael Kubista, Jose´ Manuel Andrade ,Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jona´k, Kristina Lind, Radek Sindelka, Robert Sjo¨back, Bjo¨ rn Sjo¨ green, Linda Stro¨ mbom, Anders Sta˚hlberg ,Neven Zoric (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* pp. 95–125 doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- John M. S. Bartlett David Stirling (2003). PCR Protocols SECOND EDITION. *Methods in Molecular Biology Volume 226*. Εκδόσεις HUMANA PRESS.
- P. Markoulatos, N. Siafakas, and M. Moncany (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* pp. 47-51 DOI 10.1002/jcla.2058
- Md. Eaqub Ali, Md. Abdur Razzak, Sharifah Bee Abd Hamid (2014). Multiplex PCR in Species Authentication: Probability and Prospects—A Review. *Food Analytical Methods* pp. 1933–1949 DOI: 10.1007/s12161-014-9844-4
- N. Senthil Kumar and G. Gurusubramanian (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* pp. 116-124 ISSN (online) 2229-6026
- Nandani Kumari and Saroj Kumar Thakur (2014). RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA-A BRIEF REVIEW. American Journal of Animal and Veterinary Sciences pp. 6-13 doi:10.3844/ajavssp.2014.6.13
- Anat Denyingyhot, Chirapiphat Phraephaisarn, Mongkol Vesaratchavest, Winai Dahlan, Suwimon Keeratipibul (2021). A new tool for quality control to monitor contamination of six non-halal meats

in food industry by multiplex high-resolution melting analysis (HRMA). *NFS Journal* pp. 31-40 https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.09.002

- Geoffrey Cottenet, Carine Blancpain, Poh Fong Chuah, Christophe Cavin (2020). Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification. *Food Control* https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107003
- Lanping WANG, Xinru HANG, Rongqing GENG (2018). Molecular detection of adulteration in commercial buffalo meat products by multiplex PCR assay. *Food Science and Technology* pp. 344-348 DOI: https://doi.org/10.1590/fst.28717
- Asmaa Galal-Khallaf (2021). Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets. *Gene* https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145062
- Ö. Aslan, R. M. Hamill, T. Sweeney, W. Reardon and A. M. Mullen (2009). Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability. *Journal of animal science* pp. 57–61 doi: 10.2527/jas.2008-0995
- Ran-Ran Xing, Nan Wang, Ran-Ran Hu, Jiu-Kai Zhang, Jian-Xun Han, Ying Chen (2019). Application of next generation sequencing for species identification in meat and poultry products: A DNA metabarcoding approach. *Food Control* pp.173-179 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.034
- Hongwei Gao, Rui Li, Min Sun, Zhiqin Yue, Hongwei Zhang (2023). Identification of Squid Species Using DNA Barcoding and Real-time PCR. *Research Square* DOI: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3173176/v1
- Regina Klapper, Amaya Velasco, Maik D¨oring, Ute Schr¨oder, Carmen G. Sotelo, Erik Brinks, Marta Mu˜noz-Colmenero (2023). A next-generation sequencing approach for the detection of mixed species in canned tuna. *Food Chemistry: X* https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100560
- Rongzhen Shi, Xiong Xiong, Manhong Huang, Wenjie Xu, Yi Li, Min Cao, Xiaohui Xiong (2020). High resolution melting (HRM) analysis of a12S rRNA mini barcode as a novel approach for codfish species authentication in processed fish products. *European Food Research and Technology* pp. 891–899 https://doi.org/10.1007/s00217-020-03456-5
- Xiong Xiong, Fangying Yuan, Manhong Huang & Xiaohui Xiong (2019). Exploring the possible reasons for fish fraud in China based on results from monitoring sardine products sold on Chinese markets using DNA barcoding and real time PCR. *Food Additives & Contaminants: Part A* pp. 193-204 DOI: 10.1080/19440049.2019.1694709
- Yu-Min Lee, Ga-Young Lee, Hae-Yeong Kim (2022). Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of big blue octopus (*Octopus cyanea*), giant Pacific octopus (*Enteroctopus dofleini*), and common octopus (*Octopus vulgaris*). *Food Science and Biotechnology* pp. 497–504 https://doi.org/10.1007/s10068-022-01051-w
- Asmaa Galal-Khallaf, Alba Ardura, Khaled Mohammed-Geba, Yaisel J. Borrell, Eva Garcia-Vazquez (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control* pp.441-445 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016
- Daniel Cardoso Carvalho, Rafael Melo Palhares, Marcela Gonçalves Drummond, Mario Gadanho (2017). Food metagenomics: Next generation sequencing identifies species mixtures and mislabeling within highly processed cod products. *Food Control* pp.183-186 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.049
- Xiong Xiong, Lili Yao, iaoguo Ying, Lixia Lu, Lisa Guardone, Andrea Arman, Xiaohui Xiong (2018). Multiple fish species identified from China's roasted Xue Yu fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability. *Food Control* pp.123-130 https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.035
- Ran-Ran Xing, Ran-Ran Hu, Nan Wang, Jiu-Kai Zhang, Yi-Qiang Ge, Ying Chen (2021). Authentication of sea cucumber products using NGS-based DNA mini-barcoding. *Food Control* https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108199
- L. P. Golinelli, A. C. Carvalho, R. S. Casaes, C. S. C. Lopes, R.Deliza , V. M. F. Paschoalin, and J. T. Silva (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science* pp. 6693–6699 http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-7990

- Rodrigo Giglioti, Hiago Polli, Bianca Tain´a Azevedo, Luciana Morita Katiki, Anibal Eugˆenio Vercesi Filho (2022). Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: A novel and sensitive qPCR-based method. *Food Chemistry: Molecular Sciences* https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100074
- Ioannis Ganopoulos, Ioannis Sakaridis, Anagnostis Argiriou, Panagiotis Madesis, Athanasios Tsaftaris (2013). A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese. *Food Chemistry* pp. 835-840 https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.130
- Anisa Ribani, Giuseppina Schiavo, Valerio Joe Utzeri, Francesca Bertolini, Samuele Bovo, Luca Fontanesi (2017). Application of next generation semiconductor based sequencing for species identification in dairy products. *Food Chemistry* pp.90-98 doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.006
- Ayse Ozgur Uncu, Ali Tevfik Uncu (2020). A barcode-DNA analysis method for the identification of plant oil adulteration in milk and dairy products. *Food Chemistry* https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126986
- Ioannis Ganopoulos, Panagiotis Madesis, Nikos Darzentas, Anagnostis Argiriou, Athanasios Tsaftaris (2012). Barcode High Resolution Melting (Bar-HRM) analysis for detection and quantification of PDO "Fava Santorinis" (*Lathyrus clymenum*) adulterants. *Food Chemistry* pp.505-512 doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.015
- V. A. Parvathy, V. P. Swetha, T. E. Sheeja & B. Sasikumar (2015). Detection of plant-based adulterants in turmeric powder using DNA barcoding. *Pharmaceutical Biology* pp. 1774-1779 DOI: 10.3109/13880209.2015.1005756
- Sean W.J. Prosser, Paul D.N. Hebert (2017). Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry* pp.183-191 https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.077
- Marie-Alice Fraiture, Philippe Herman, Nina Papazova, Marc De Loose, Dieter Deforce, Tom Ruttink, Nancy H. Roosens (2017). An integrated strategy combining DNA walking and NGS to detect GMOs. *Food Chemistry* pp. 351-358 https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.067
- Cristina BarBosa, sofia nogueira, Mário gadanho, and sandra Chaves (2019). Study on Commercial Spice and Herb Products Using Next-Generation Sequencing (NGS). *Journal of AOAC INTERNATIONAL* pp. 369–375 DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0407
- Inés María López-Calleja, Silvia de la Cruz, Nicolette Pegels, Isabel González, Rosario Martín, Teresa García (2014). Sensitive and specific detection of almond (*Prunus dulcis*) in commercial food products by real-time PCR. *LWT - Food Science and Technology* pp.31-39 https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.039
- Michelangelo Vietina, Caterina Agrimonti, Nelson Marmiroli (2013). Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: A tool for disclosure of olive oil adulteration. *Food Chemistry* pp. 3820-3826 https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.075
- Zorica Nikolic, Ksenija Taški-Ajdukovic, Aranka Jevtic, Dragana Marinkovic (2009). Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers. *Food Research International* pp. 349-352 doi:10.1016/j.foodres.2008.12.013
- NOOR SAKINAH H., SUHAIMI D., WAN SYAHIDAH H., MUHAMMAD SYAFIQ I., NORMAH MIW A., AHMAD TERJUDDIN G., MOHD FAISAL I. AND SAIPUL BAHARI A.R (2017). IDENTIFICATION OF PROCESSED ANIMAL PROTEINS (PAPS) IN FEEDSTUFFS. *Malaysian Journal of Veterinary research* pp. 75-78
- Sarrah M. Dunham-Cheatham, Kelly B. Klingler, Margarita Vargas Estrada, Mae Sexauer Gustin (2021). Using a next-generation sequencing approach to DNA metabarcoding for identification of adulteration and potential sources of mercury in commercial cat and dog foods. *Science of the Total Environment* https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146102
- Laura Preckel, Claudia Brünen-Nieweler, Grégoire Denay, Henning Petersen, Margit Cichna-Markl, Stefanie Dobrovolny and Rupert Hochegger (2021). Identification of Mammalian and Poultry Species in Food and Pet Food Samples Using 16S rDNA Metabarcoding. *Foods (Techniques for Food Authentication: Trends and Emerging Approaches)* https://doi.org/10.3390/foods10112875

- Nur Fadhilah Khairil Mokhtar, Siti Zaharah Imran, Ming Gan Han, Mun Chun Leong, Mohd Nasir Mohd Desa, Raja Mohd Hafidz Raja Nhari, Nor Nadiha Mohd Zaki, Yus Aniza Yusof, Shuhaimi Mustafa & Amalia Mohd Hashim (2022). Next Generation Sequencing-based DNA metabarcoding for animal species profiling in fish feed. *Food Additives & Contaminants: Part A* pp. 1185-1194 DOI: 10.1080/19440049.2022.2077458
- Fabio Palumbo, Francesco Scariolo, Alessandro Vannozzi & Gianni Barcaccia (2020). NGS-based barcoding with mini-COI gene target is useful for pet food market surveys aimed at mislabelling detection. *Scientific Reports* https://doi.org/10.1038/s41598-020-74918-9
- Jagoda Kępi´nska-Pacelik, Wioletta Biel, Małgorzata Natonek-Wi´sniewska, Piotr Krzy´scin (2023). Assessment of adulteration in the composition of dog food based on DNA identification by real-time PCR. *Animal Feed Science and Technology* https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115609
- Maria Doroteia Campos, Vera Valadas, Catarina Campos, Laura Morello, Luca Braglia, Diego Breviario, Helia G. Cardoso (2018). A TaqMan real-time PCR method based on alternative oxidase genes for detection of plant species in animal feed samples. *PLOS ONE* https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190668
- A. Dalmasso, E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, M.T. Bottero (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes* pp. 81–87 doi:10.1016/j.mcp.2003.09.006
- Nicolette Pegels & Teresa García & Rosario Martín & Isabel González (2014). Market Analysis of Food and Feed Products for Detection of Horse DNA by a TaqMan Real-Time PCR. *Food Analytical Methods* pp. 489–498 DOI 10.1007/s12161-014-9914-7