

## ZASTOSOWANIE METODY REKOMENDOWANEJ PRZEZ EURL-AP DO WYKRYWANIA DNA PRZEŻUWACZY W PASZY I MIĘSIE\*

Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Piotr Krzyściń

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,  
32-083 Balice k. Krakowa

*Komisja Europejska w celu identyfikacji DNA przeżuwaczy zaleca stosowanie metody opisanej przez EURL-AP (European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in Feedingstuffs). Celem pracy było sprawdzenie działania tej metody oraz określenie jej parametrów w procesie walidacji wewnętrznej i zewnętrznej. Materiałem badawczym były: plazmid DNA specyficzny dla przeżuwaczy (ERM-AD482), referencyjne próbki paszy niezawierające w swoim składzie składników zwierzęcych oraz próbki paszy zawierające mączkę bydłą, owczą oraz wieprzową w ilości 0,2% i mączkę drobiową 100%, plazmę drobiową oraz wieprzową, próbki mięsa wołowego oraz wieprzowego. W pierwszym etapie badań użyto plazmidu DNA w celu dostosowania metody do aparatu Real-Time (StepOne Plus), na którym miała być wykonywana analiza. Działania takie miały zadanie ustalenia linii odcięcia  $c_T$ , czyli wartości granicznej, rozróżniającej wyniki dodatnie od ujemnych. Następnie wyekstrahowano DNA z próbek wzorcowych przy pomocy zestawu do izolacji DNA z żywności (Wizard), również rekomendowanego przez EURL-AP. Otrzymane DNA poddano reakcji Real-Time PCR, używając starterów kompatybilnych do sekwencji flankującej region specyficzny gatunkowo dla przeżuwaczy oraz sondę kompatybilną z DNA tej grupy zwierząt. Wszystkie próbki analizowano w dwukrotnych powtórzeniach izolacji DNA. Każdy izolat DNA analizowano dodatkowo przy 10-krotnym rozcieńczeniu. Dla wszystkich matryc określono wartości progowe amplifikacji ( $c_T$ ). Wynik kalibracji wskazuje, że rozgraniczenie pomiędzy próbkami pozytywnymi a negatywnymi przebiega w 33. cyklu ( $c_T=33,8$ ). Na tej podstawie określono próbki, w których znajduje się DNA przeżuwaczy. Reakcje pozytywne otrzymano jedynie dla DNA przeżuwaczy (bov 0,2%, ovis 0,2%), zaś dla pozostałych gatunków reakcja zachodziła zawsze powyżej 34. cyklu. Dla próbek dodatnich – w przypadku rozcieńczeń DNA – miejsce odcięcia thresholdu przesuwa się każdorazowo około 3 cykle. Metoda jest bardzo czuła; umożliwia identyfikację przetworzonego materiału w ilości  $<0,1\%$ . W trakcie badań ustalono, że metoda ta jest w 100% specyficzna gatunkowo.*

*Słowa kluczowe: identyfikacja DNA przeżuwaczy, EURL-AP*

Skuteczny zakaz stosowania przetworzonych białek zwierzęcych (PAP) w paszach jest jedynym sposobem zapobiegania rozprzestrzenianiu się encefalopatii TSE

---

\*Praca finansowana z zadania nr 04-18-02-11.

(Transmissible Spongiform Encephalopathies), do których należy choroba BSE. Ustanowienie rygorystycznych przepisów regulujących to zagadnienie doprowadziło do całkowitego zakazu stosowania przetworzonych białek zwierzęcych w paszy, obowiązującego w Europie od wielu lat. Ponadto identyfikacja gatunkowa przetworzonych komponentów spożywczych cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem ze strony konsumentów oraz producentów żywności. Ogólna potrzeba poznania rzeczywistego składu produktów spożywczych wynika z coraz większej dbałości o jakość pokarmów, związanej ze wzrostem świadomości społecznej dotyczącej wpływu żywności na ludzkie zdrowie. Aby wiarygodnie podać skład produktu żywnościowego czy skutecznie egzekwować normy dotyczące karmy lub żywności, potrzebne są metody laboratoryjne, których stosowanie również jest regulowane prawnie.

Od kilkudziesięciu lat oficjalnie obowiązującą w Unii Europejskiej metodą wykrywania przetworzonego białka zwierzęcego w mieszankach paszowych jest klasyczna mikroskopia optyczna (Fumière i in., 2009). Ze względu na jej ograniczenia, związane między innymi z brakiem możliwości rozróżnienia gatunkowego obecnych mączek, Komisja Europejska w zarządzeniach 152/2009 i 51/2013 dopuściła metodę analizy opartą na analizie DNA, mogącą dostarczyć więcej informacji na temat pochodzenia białka zwierzęcego.

Celem pracy była walidacja proponowanej przez EURL-AP metody identyfikacji komponentów odzwierzęcych, pochodzących od przeżuwaczy, w paszy oraz w mięsie.

## Material i metody

Materiałem badawczym były: plazmid DNA specyficzny dla przeżuwaczy (ERM-AD482), referencyjne próbki paszy niezawierające w swoim składzie składników zwierzęcych oraz próbki paszy roślinnej zawierające mączkę bydłącą, owczą oraz wieprzową w ilości 0,2%. Plazmid pochodził z Instytutu Materiału Referencyjnego przy Komisji Europejskiej (ERM-European Reference Materials) natomiast referencyjne próbki paszy z Testu Biegłości (AHVLA). Ponadto stosowano własne materiały odniesienia: mączkę drobiową 100%, plazmę drobiową oraz wieprzową, próbki mięsa wołowego oraz wieprzowego.

### Metody badawcze

W pierwszym etapie badań, używając plazmidu, dostosowano metodę do aparatu Real-Time, na którym miała być wykonywana analiza (StepOne Plus – Thermofisher). Następnie z próbek wzorcowych wyekstrahowano DNA przy użyciu zestawu do izolacji DNA z żywności (Wizard), rekomendowanego przez EURL-AP. Otrzymane DNA poddano reakcji Real-Time PCR, używając starterów flankujących region specyficzny gatunkowo tylko dla przeżuwaczy oraz sondę kompatybilną z DNA tej grupy zwierząt. Wszystkie próbki analizowano w dwukrotnych powtórzeniach izolacji DNA. Każdy izolat DNA analizowano dodatkowo przy 10-krotnym rozcieńczeniu. Wszystkie izolacje wykonywano w obecności kontroli pozytywnych (KP) oraz kontroli negatywnych izolacji (KN); do każdej serii reakcji dodano kontrolę pozytywną

(PTC) oraz kontrolę negatywną qPCRu (NTC). Jako kontroli PTC użyto komercyjnych próbek DNA poszczególnych gatunków o deklarowanym przez producenta składzie lub próbki pochodzące z Testów Biegłości.

Dla wszystkich matryc określono wartości progowe amplifikacji ( $c_T$ ). Wyniki  $c_T$  przedstawiono dla tej samej próbki z dwóch pomiarów oraz względne odchylenie standardowe między tymi pomiarami. Na podstawie wartości progowej amplifikacji wyznaczono ilość kopii dla cut-off.

Na podstawie wartości progowych określono, w których próbkach znajduje się DNA przeżuwaczy. Korzystając z otrzymanych wyników obliczono parametry metody, takie jak: specyficzność, dokładność, granicę wykrywalności oraz czułość, stosując następujące definicje: – specyficzność metody jako udział wyników prawdziwie negatywnych we wszystkich negatywnych próbkach, jakie poddano analizie; – dokładność metody jako udział liczby wyników poprawnie oznaczonych do liczby wszystkich uzyskanych wyników wyrażony wzorem; – granica wykrywalności (LOD) jako najmniejsze stężenie lub ilość produktu możliwa do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej oraz czułość metody jako udział wyników prawdziwie pozytywnych we wszystkich pozytywnych próbkach, jakie poddano analizie.

## Wyniki

Wynik kalibracji wskazuje, że rozgraniczenie pomiędzy próbkami pozytywnymi a negatywnymi przebiega w 33. cyklu ( $c_T=33,8$ ). Na podstawie tej wartości określono, w których badanych próbkach znajduje się DNA przeżuwaczy. Wyniki, w postaci wartości progowych amplifikacji, względnego odchylenia standardowego oraz określenia występowania w próbce DNA przeżuwaczy, zebrano w tabeli 1. Ilość kopii dla cut-off wynosiła 14,77.

Tabela 1. Wynik oznaczania DNA przeżuwaczy  
Table 1. Results of ruminant DNA determination

Nr próbki No. of sample	$c_T$	RSD%	Wynik Result	Nr próbki No. of sample	$c_T$	RSD%	Wynik Result
1	2	3	4	5	6	7	8
Mieszanka paszowa Bov 0,2%	22,78	0,75	+	Mięso bov 100%	15,98	0,68	+
Mieszanka paszowa Bov 0,2%	22,54		+	Mięso bov 100%	15,83		+
Mieszanka paszowa Bov 0,2% 1:10	25,37	0,56	+	Mięso bov 100%	18,00	0,29	+
Mieszanka paszowa Bov 0,2% 1:10	25,58		+	Mięso bov 100%	17,93		+
Mieszanka paszowa 1 Bov 0,2%	22,49	0,44	+	Mięso sus 100%	34,52	1,54	-
Mieszanka paszowa 1 Bov 0,2%	22,36		+	Mięso sus 100%	35,28		-

cd. tabeli 1 – Table 1 contd.

1	2	3	4	5	6	7	8
Mieszanka paszowa 1 Bov 0,2% 1:10	24,85	0,30	+	Mięso sus 100%	33,91	5,88	-
Mieszanka paszowa 1 Bov 0,2% 1:10	24,75		+	Mięso sus 100%	35,77		-
Mieszanka paszowa Sus 0,2%	36,69	0,61	-	Plazma sus	33,96	5,27	-
Mieszanka paszowa Sus 0,2%	36,38		-	Plazma sus	35,84		-
Mieszanka paszowa Sus 0,2% 1:10	38,37	1,22	-	Plazma sus 1:10	35,94	2,80	-
Mieszanka paszowa Sus 0,2% 1:10	39,04		-	Plazma sus 1:10	37,34		-
Mieszanka paszowa Gall 100%	37,88	1,02	-	Plazma drob	35,34	10,97	-
Mieszanka paszowa Gall 100%	37,33		-	Plazma drob	41,29		-
Mieszanka paszowa Gall 100% 1:10	39,45	1,24	-	Plazma drob 1:10	34,46	7,45	-
Mieszanka paszowa Gall 100% 1:10	40,15		-	Plazma drob 1:10	38,29		-
Mieszanka paszowa Ovis 0,2%	26,034	0,06	+	RM neg	37,97	0,43	-
Mieszanka paszowa Ovis 0,2%	26,06		+	RM neg	38,21		-
Mieszanka paszowa Ovis 0,2% 1:10	28,88	0,42	+	RM neg 1:10	38,43	0,02	-
Mieszanka paszowa Ovis 0,2% 1:10	28,71		+	RM neg 1:10	38,45	0,75	-
KN izol	35,41	0,48	-	NTC	43,04	0,12	-
KN izol	35,17		-	NTC	42,96		-

Wartość progową amplifikacji ( $c_T$ ), względne odchylenie standardowe (RSD%) oraz wynik, czyli interpretację, czy dana próbka zawiera DNA przeżuwaczy, zebrano w tabeli 1.

Mieszanka paszowa Ovis 0,2% – mieszanka paszowa zawierająca 0,2% dodatek mączki owczej, mieszanka paszowa Bov 0,2% i mieszanka paszowa 1 bov 0,2% – mieszanki paszowe zawierające dodatek 0,2% mączki bydłowej, mięso bov 100% – mięso wołowe, mięso sus 100% – mięso wieprzowe, plazma drob – plazma z krwi drobiowej, plazma sus – plazma z krwi wieprzowej.

Amplification threshold value ( $c_T$ ), relative standard deviation (RSD%) and the result, namely the interpretation if a given sample contains ruminant DNA are presented in Table 1.

Notes: Mieszanka paszowa Ovis 0.2% – feed mixture containing 0.2% ovine meal; mieszanka paszowa Bov 0.2% and mieszanka paszowa 1 bov 0.2% – feed mixtures each containing 0.2% bovine meal; mięso bov 100% – beef meat; mięso sus 100% – pork meat; plazma drob – plasma from poultry blood; plazma sus – plasma from porcine blood.

## Omówienie wyników

Wszystkie próbki nieposiadające w swoim składzie DNA przeżuwaczy wykazywały  $c_T$  powyżej wartości progowej, natomiast DNA przeżuwaczy przyjmowało

wartości niższe. Na podstawie otrzymanych wartości progowych  $c_T$  można stwierdzić, że metoda jest specyficzna gatunkowo (tab. 1) (specyficzność, czułość oraz dokładność wynosi 100%). Reakcje pozytywne otrzymano jedynie dla DNA przeżuwaczy (bov 0,2%, ovis 0,2%), zaś dla DNA pozostałych gatunków reakcja zachodziła zawsze powyżej 34. cyklu. Prezentowane wyniki  $c_T$  jednoznacznie wskazują na powtarzalność wyników dla próbek dodatnich – różnice  $c_T$  były niewielkie, a względne odchylenie standardowe mniejsze lub równe jednemu cyklowi. Dla DNA nie pochodzącego od przeżuwaczy powtarzalność wyników była zróżnicowana i wynosiła od około 1,5 do 6 cykli.

Dodatkowo warto zauważyć, że dla próbek dodatnich, w przypadku rozcieńczenia, miejsce odcięcia thresholdu przesuwa się o około 3 cykle, natomiast dla próbek negatywnych threshold czasami pozostaje stały.

Metoda jest bardzo czuła; umożliwia identyfikację przetworzonego materiału w dziesięciokrotnym rozcieńczeniu czyli w ilości  $<0,02\%$ . Taką wartość przyjęto dla LOD metody.

W identyfikacji gatunkowej największe znaczenie posiadają metody oparte na PCR lub jej odmianie w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). Należy wspomnieć, że choć DNA jest trwałą cząsteczką, mogąą przetrwać obróbkę hipertermiczno-baryczną, to jednak w trakcie wytwarzania mączek zwierzęcych łańcuch DNA zostaje pofragmentowany do wielkości ok. 100pz. Z tej przyczyny najlepsze efekty analizy uzyskuje się, wykorzystując fragmenty DNA nieco od nich mniejsze (Fumière i in., 2006; de la Torre i in., 2007). Do identyfikacji tak małych fragmentów częściej używa się techniki PCR w czasie rzeczywistym ze względu na wyższą czułość metody oraz większą dokładność dzięki zastosowaniu sond. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają skuteczność takiej metody. Analizie tej można poddać zarówno próbki o znacznej twardości (np. mączki mięsno-kostne), jak również produkty uboczne pozabawione kości (plazma suszona, mięso).

Należy zaznaczyć, że rozwój metod analitycznych, służących do wykrywania i identyfikacji gatunkowej przetworzonych białek zwierzęcych (PAP) w paszach na podstawie analizy mtDNA ma duże znaczenie w hodowli zwierząt, stanowiąc szansę dla ewentualnego zniesienia zakazu krzyżowego skarmiania zwierząt nieprzeżywiających, nieprzeznaczonych do konsumpcji. Natomiast możliwość sprawdzenia składu gatunkowego żywności przyczynia się do uwiarygodnienia rzeczywistego składu produktu.

#### Piśmiennictwo

- de la Torre M.I., García T., González I., Martín R. (2007). PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de adn bovino en piensos vegetales. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1: 237–245.
- Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst C., Berben G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 1045–1054.
- Fumière O., Veys P., Boix A., von Holst C., Baeten V., Berben G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Bio-technol. Agron. Soc. Environ.*, 13: 57–68.

(WE) 152/2009. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz.

(WE) 51/2013. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod analitycznych oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz.

Zatwierdzono do druku 7 VIII 2018

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN

### **The application of a EURL-AP recommended protocol for detection of ruminant DNA in feed and meat**

#### SUMMARY

The European Commission recommends a EURL-AP (European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs) recommended protocol to identify ruminant DNA. The aim of the study was to test method performance and to determine its parameters during internal and external validation. The experiment used ruminant specific DNA plasmid (ERM-AD482), reference feed samples containing no animal components, and feed samples containing bovine, ovine and porcine meal (0.2% each), poultry meal (100%), poultry plasma, pork plasma, beef samples, and pork samples. In the first stage of the study, the DNA plasmid was used to adjust the method to the StepOnePlus Real-Time system, in which the analysis was performed. This was aimed to determine the cut-off line ( $c_t$ ), or the threshold limit value distinguishing between positive and negative results.

Next, DNA was extracted from standard samples using a Wizard Food DNA Isolation Kit recommended by the EURL-AP. The obtained DNA was subjected to Real-Time PCR using primers compatible with the sequence flanking the species specific region for ruminants as well as a probe compatible with ruminant DNA. All the samples were analysed in two repetitions of DNA isolation. Each DNA isolate was additionally analysed at a 10-fold dilution. Amplification thresholds ( $c_t$ ) were determined for all the matrices.

The calibration result shows that the cycle threshold value between positive and negative samples is  $c_t=33.8$ . This served as a basis for determining the samples with ruminant DNA. Positive reactions were only obtained for ruminant DNA (bov 0.2%, ovis 0.2%); for the other species, the reaction always occurred beyond the 34th cycle. For the positive samples, in the case of DNA dilutions, the threshold cut-off value moves every time by around 3 cycles.

This method is highly sensitive, identifying processed material in amounts of <0.1%. Our study showed this method to be 100% species specific.

Key words: DNA identification of ruminants, EURL-AP