Zastosowanie metody real-time PCR do identyfikacji DNA przeżuwaczy w surowych produktach pochodzenia zwierzęcego

ANNA WEINER, ILONA PAPROCKA, AGATA GOŁĘBIOWSKA, KRZYSZTOF KWIATEK

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 28.02.2017

Zaakceptowano 23.05.2017

Weiner A., Paprocka I., Gołębiowska A., Kwiatek K.

Application of real-time PCR to identify ruminant DNA in raw animal products

Summary

Under current regulations, it is possible to export processed animal proteins originating from tissues of animals other than ruminants. In order to ensure appropriate control, studies were undertaken to adopt a real-time PCR method for the analysis of processed products of animal origin. The material consisted of raw by-products of beef, pork and poultry. In the assays, mitochondrial DNA was used. The modified method is capable of detecting ruminant DNA at a level of 0.025%. The results of validation studies demonstrate that the real-time PCR method can be used in routine tests to identify ruminant DNA in raw animal by-products.

Keywords: mtDNA, real-time PCR, animal products

Przetworzone białko pochodzenia zwierzęcego (PAP) powszechnie uznawane jest za przyczynę wystąpienia epidemii gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) (2, 6, 13, 25). Od 1988 r. wprowadzano ograniczenia prawne stosowania PAP w żywieniu zwierząt gospodarskich. Początkowo zakaz wprowadzono w Wielkiej Brytanii i dotyczył on stosowania mączek mięsno-kostnych pochodzących od przeżuwaczy w żywieniu bydła (15, 19-21). Obecnie, zgodnie z Rozporządzeniem Komisji 56/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniającym załączniki I i IV do Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych encefalopatii gąbczastych, obowiązuje zakaz stosowania PAP w żywieniu zwierząt gospodarskich (18). Wyjątek stanowi mączka rybna, którą można wykorzystywać w paszach dla trzody chlewnej, drobiu, a także dla nieodsadzonych przeżuwaczy jako składnik preparatów mlekozastępczych. Ponadto w żywieniu zwierząt akwakultury można stosować przetworzone białka zwierzęce inne niż mączka rybna, pochodzące od zwierząt nieprzeżuwających.

Od 2010 r. trwają prace nad przywróceniem możliwości stosowania PAP w żywieniu zwierząt, zgodnie z wytycznymi zawartymi w Komunikacie Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady „Druga mapa drogowa dla TSE. Dokument strategiczny w sprawie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych na lata 2010-2015” (10).

Ze względu na fakt, że ryzyko przeniesienia BSE między zwierzętami nieprzeżuwającymi jest minimalne, wprowadzanie PAP do żywienia zwierząt będzie polegało na stopniowym uchylaniu zakazu paszowego w odniesieniu do zwierząt innych niż przeżuwacze, tj. świnie, drób czy ryby. Należy jednak zwrócić uwagę, że nadal będzie obowiązywał zakaz powtórnego przetwarzania wewnątrzgatunkowego, czyli np. mączka mięsno-kostna wieprzowa mogłaby być podawana wyłącznie dla drobiu. Z tego względu konieczne stało się opracowanie metod analitycznych pozwalających na identyfikację gatunkową PAP. W 2015 r. wdrożono i akredytowano przekazaną przez Europejskie Laboratorium Referencyjne ds. białek zwierzęcych (EURL-AP) metodę identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach z zastosowaniem techniki real-time PCR.

Od lutego 2016 r. obowiązuje Rozporządzenie Komisji (UE) 2016/27 z dnia 13 stycznia 2016 r., zgodnie z którym możliwe jest eksportowanie PAP produkowanego z tkanek innych niż przeżuwacze (16). W celu potwierdzenia wprowadzenia właściwych środków zapobiegawczych zanieczyszczeniom krzyżowym konieczne jest wprowadzenie kontroli obejmującej również surowe uboczne produkty pochodzenia zwierzęcego. Zgodnie z definicją zawartą w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009, uboczne produkty pochodzenia zwierzęcego są to całe zwierzęta martwe lub ich części, produkty pochodzenia

zwierzęcego lub inne produkty otrzymane ze zwierząt, nieprzeznaczone do spożycia przez ludzi, w tym także komórki jajowe, zarodki i nasienie. Z względu na fakt, że dotychczas nie było metody pozwalającej na analizę tego rodzaju materiału, podjęto prace mające na celu dostosowanie obowiązującej metody real-time PCR wykorzystywanej do badań pasz (5, 17).

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły surowe uboczne produkty pochodzenia zwierzęcego wołowe, wieprzowe i drobiowe. Ponadto do oceny specyficzności reakcji wykorzystano surowe mięso pochodzące z różnych gatunków zwierząt: konia (*Equus caballus*), owcy (*Ovis aries*), kozy (*Capra hircus*), jelenia (*Cervus elaphus*), sarny (*Capreolus capreolus*), łosia (*Alces*), dzika (*Sus scrofa*), kury (*Gallus gallus*), indyka (*Meleagris meleagris*), kaczki (*Anas platyrhynchos f. Domestica*), bażanta (*Phasianus colchicus*), zająca (*Lepus*), psa (*Canis familiaris*), kota (*Felis catus*), szczupaka (*Esox lucius*), dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*), sardynki (*Sardina pilchardus*) oraz materiały roślinne: soję (*Glycine max*), kukurydzę (*Zea mays*), pszenicę (*Triticum aestivum*), buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), żyto zwyczajne (*Secale cereale*), rzepak (*Brassica napus*), owies (*Avena*), jęczmień (*Hordeum*), słonecznik (*Helianthus annuus*). Próbkę została przygotowane według następującego schematu:

- 20 próbek bez zawartości materiału pochodzącego z przeżuwaczy (surowe produkty pochodzące od trzody chlewnej i drobiu);
- 17 próbek surowych mięs różnych gatunków;
- 9 próbek materiałów roślinnych;
- po 20 próbek surowych produktów od trzody chlewnej i drobiu kontaminowanych produktami z przeżuwaczy. Próbkę zawierały dodatek materiału z przeżuwaczy na poziomie: 0,025%, 0,05% i 0,1%.

Ekstrakcja DNA. Do badania przygotowywano próbkę o masie 100 g. Następnie rozdrabniano przy użyciu maszyny do mielenia mięsa/blendera. Po dokładnym wymieszaniu pobierano 200 mg próbki do próbki typu eppendorf o pojemności 2 ml.

Do badania zastosowano zmodyfikowaną metodę identyfikacji DNA przeżuwaczy z zastosowaniem techniki real-time PCR, która została przekazana przez EURL-AP. Pierwsza zmiana dotyczyła testu komercyjnego użytego do izolacji DNA. W prezentowanych badaniach wykorzystano test Genomic Mini AX Tissue (A&A Biotechnology). Izolację wykonywano zgodnie z wytycznymi producenta. Wyekstrahowane DNA zawieszano w 200 µl wody wolnej od DNazy i RNazy. Stężenie uzyskanego DNA mierzono przy użyciu spektrofotometru (Nicolette Evolution 300ThermoSpectronic). Czystość wyekstrahowanego DNA sprawdzano poprzez pomiar stosunku absorbancji przy $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm.

Startery. W oparciu o procedurę identyfikacji DNA przeżuwaczy metodą real-time PCR wykorzystano sekwencje starterów i sondę (5), które zostały zsyntetyzowane w Genomed.

Reakcja real-time PCR. Reakcję przeprowadzono w 96-dółkowych płytkach (Micro-Amp® Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems). Mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl zawierała: mastermix z $MgCl_2$ – 12,7 µl, po 1,1 µl (20 pmol) każdego startera A i B, 0,73 µl (3,65 pmol) sondy, 5 µl wody wolnej od DNazy i RNazy oraz 5 µl

DNA próbki. W badaniach zastosowano TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) zamiast zalecanego w procedurze Universal mastermix (Diagenode). Badania wykonywano przy użyciu aparatu ABI 7500 (Applied Biosystems). Amplifikacja została przeprowadzona zgodnie z następującym profilem czasowo-temperaturowym: dekontaminacja 50°C przez 2 min, denaturacja wstępna 95°C przez 10 min, 50 cykli: denaturacja 95°C przez 15 s oraz przyłączenie starterów i wydłużanie nici DNA w zakresie temperatur 50°C-60°C przez 1 min.

Do określenia wartości cut-off zastosowano zestaw kalibracyjny DNA przeżuwaczy ERM-AD482 Ruminant (JRC-IRMM, Belgia). W celu ustalenia wartości cut-off stanowiącej odniesienie, które próbki należy traktować jako dodatnie, przeprowadzono kalibrację przy użyciu standardów IRMM o znanej zawartości plazmidowego DNA przeżuwaczy. Kalibrację wykonywano przy użyciu kalibrantów zawierających DNA plazmidowe na trzech poziomach (640, 160 i 40 kopii). Każdy poziom sprawdzano jednorazowo w 12 powtórzeniach. Przeprowadzano 4 analizy kalibrantów.

Następnie na podstawie uzyskanych wyników przy pomocy arkusza kalkulacyjnego (5) obliczono wartość cut-off oraz liczbę kopii dla danej wartości cut-off. Istotne było kryterium, którego należało przestrzegać podczas obliczeń tych wartości, a mianowicie liczba kopii dla cut-off powinna być ≥ 9 .

Zastosowana metoda pozwala na określenie obecności lub nieobecności DNA przeżuwaczy, czyli jest metodą jakościową. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie za pomocą statystyki klasycznej i określono następujące parametry: granicę wykrywalności (LOD, dokładność (AC), czułość (SE) oraz specyficzność (SP).

Granica wykrywalności: najmniejsza ilość analitu, którą można wykryć, ale nie można oszacować.

Specyficzność: zdolność metody do niewykrywania analitu, gdy go nie ma w próbce:

$$SP = \frac{NA}{N} \times 100\%$$

Czułość: zdolność metody do wykrycia czynnika wtedy, kiedy znajduje się w badanej próbce:

$$SE = \frac{PA}{N} \times 100\%$$

Dokładność: stopień zgodności między wynikiem badania a przyjętą wartością odniesienia:

$$SP = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

Przedziały ufności:

$$CI = p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

z $n = N, N_+, N_-$, odpowiednio, dla p (w %) = AC, SE, S, gdzie:

PA = liczba próbek pozytywnych ocenionych w badaniu jako pozytywne;

ND = liczba próbek pozytywnych ocenionych w badaniu jako negatywne;

NA = liczba próbek negatywnych ocenionych w badaniu jako negatywne;

PD = liczba próbek negatywnych ocenionych w badaniu jako pozytywne;

N – ogólna liczba próbek (suma NA + PA + PD + ND);

N₋ – ogólna liczba ujemnych wyników uzyskanych metodą odniesienia (suma NA + PD);

N₊ – ogólna liczba dodatnich wyników uzyskanych metodą odniesienia (suma PA + ND).

Wyniki wpisujemy w formularzu przedstawionym poniżej:

		Rzeczywistość		Suma
		+	-	
Test	+	PA	PD	a
	-	ND	NA	b
Suma		N+	N-	N

Wyniki i omówienie

Wiele opublikowanych dotychczas badań opisuje metody identyfikacji mięsa i produktów mięsnych (1, 7, 9, 14, 22). Technika real-time PCR jest narzędziem pozwalającym na szybką, czułą i wysoce specyficzną analizę DNA niezależnie od rodzaju tkanki (4, 11, 12). Przedstawiona metoda po raz pierwszy opisuje identyfikację DNA przeżuwaczy w surowych ubocznych produktach pochodzenia zwierzęcego.

W badaniach wykorzystywano DNA mitochondrialne (mtDNA), które cechuje się wysoką specyficznością i umożliwia odróżnienie nawet blisko spokrewnionych gatunków. Mitochondrium zawiera własny materiał genetyczny w postaci kolistej, dwuniciowej cząsteczki mtDNA o długości ok. 19 569 pz (3). Główną zaletą mtDNA jest duża liczba kopii w komórce oraz wyższa odporność na degradację niż DNA jądrowe, która wynika z charakterystycznej kolistej struktury. Ponadto charakteryzuje się dużym polimorfizmem regionu kontrolnego (tzw. pętla D), bardzo dobrą wydajnością ekstrakcji nawet z niewielkich ilości materiału biologicznego (8, 23, 24).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że wybrany zestaw do izolacji DNA jest odpowiedni. Wyizolowane DNA otrzymano w stężeniu powyżej 150 ng/μl. Natomiast współczynnik $A_{260/280}$ mieścił się w przedziale 1,8-1,95.

Procedura identyfikacji DNA przeżuwaczy została zoptymalizowana. Najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano stosując mieszaninę reakcyjną zawierającą: TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) – 12,7 μl, po 1,1 μl (20 pmol) każdego startera A i B, 0,73 μl (3,65 pmol) sondy, 5 μl wody wolnej od DNazy i RNazy oraz 5 μl DNA próbki (40 ng). Natomiast w profilu czasowo-temperaturowym reakcji temperatura przyłączania starterów i wydłużania nici DNA została ustalona na 60°C, zgodnie z wytycznymi zawartymi w procedurze EURL-AP. Na podstawie wyników badań wykonanych w laboratorium ZHS stwierdzono, że w przypadku zmiany temperatury przyłączania starterów i wydłużania nici DNA niemożliwe było wykonanie kalibracji. Wydajność reakcji, gdy zastosowano temperaturę przyłączania starterów i wydłużania nici DNA wahała się w granicach 3,00-3,10. Natomiast stosując temperaturę wskazaną przez EURL-AP wydajność reakcji mieściła się w przedziale 3,25-3,32. Obniżenie

Tab. 1. Przykładowe wartości ct dla kalibrantów uzyskane podczas jednorazowej analizy

Nr powtórzenia	Wartość ct dla 640 kopii	Wartość ct dla 160 kopii	Wartość ct dla 40 kopii
1.	29,34	32,16	34,47
2.	29,36	32,10	34,36
3.	29,40	32,03	34,54
4.	29,16	32,03	35,24
5.	29,33	32,13	34,37
6.	29,50	31,73	35,45
7.	29,54	32,12	34,52
8.	29,64	31,73	34,44
9.	29,74	31,55	34,39
10.	29,30	32,18	34,52
11.	29,60	32,42	34,48
12.	29,78	32,06	34,45
Średnie wartości ct:	29,47	32,02	34,60

temperatury przyczyniało się do zakłóceń w cykliczności wzrostów krzywych sigmoidalnych kalibrantów. Zgodnie z wynikami zawartymi w tab. 1, można stwierdzić, że średnia wartość ct dla 640 kopii wynosiła 29,47, dla 160 kopii – 32,02, natomiast dla 40 kopii – 34,60. Następnie sprawdzono, że różnica wartości ct pomiędzy kolejnymi poziomami wynosi ~2,5, co świadczy o zachowanej cykliczności wzrostów krzywych sigmoidalnych i potwierdza prawidłowy przebieg reakcji. Na podstawie otrzymanych wyników podczas całego procesu kalibracji metody określono wartość cut-off na poziomie 37,2 cykli, a liczba kopii dla oznaczonego cut-off wynosi 10,15. Proces kalibracji stanowi element kontroli jakości wykonywanych badań i należy powtarzać go każdorazowo przy zmianie serii odczynników wykorzystywanych w reakcji.

Wyniki wykonanych badań próbek kontaminowanych oraz bez zawartości materiału z przeżuwaczy przedstawiono w tab. 2. Stwierdzono jeden wynik fałszywie dodatni w próbce produktów wieprzowo-drobiowych oraz jeden wynik fałszywie ujemny w próbce produktów wieprzowo-drobiowego kontaminowanego materiałem z przeżuwaczy na poziomie niskim (0,025%).

Ponadto na podstawie uzyskanych wyników określono pozostałe parametry walidacyjne, których wartości wynosiły powyżej 95%. Granicę wykrywalności me-

Tab. 2. Wyniki badań próbek surowych produktów przygotowywanych do określenia cech charakterystycznych metody

Materiał	Poziom kontaminacji	Liczba próbek	Liczba próbek oznaczonych jako zgodne	Liczba próbek oznaczonych jako niezgodne
Surowe produkty drobiowe i wieprzowe	0%	20	19	1
Surowe produkty drobiowe i wieprzowe kontaminowane produktami z przeżuwaczy	Niski poziom (0,025%)	20	19	1
	Średni poziom (0,05%)	20	20	0
	Wysoki poziom (0,1%)	20	20	0

tody określono na poziomie 0,025%. Uzyskane rezultaty świadczą o przydatności metody do rutynowej kontroli.

Specyficzność reakcji oceniano przy użyciu DNA z 17 gatunków zwierząt i 9 gatunków roślin. Jedynie w badaniu materiału pochodzącego ze zwierząt przeżuwających (krowa, owca, koza, jeleń, sarna, łos) zaobserwowano wzrost krzywej sigmoidalnej poniżej 37 cyklu, co świadczy o obecności poszukiwanego materiału genetycznego (ryc. 1). W przypadku pozostałych próbek stwierdzono wzrost krzywej sigmoidalnej powyżej 40 cyklu. Przyczyną są powstające niespecyficzne produkty amplifikacji. Różnica pomiędzy reaktywnością próbki na poziomie 0,1% (kontrola pozytywna) a reakcjami krzyżowymi wynosi powyżej 20 cykli. Z tego względu obecność reakcji krzyżowych nie wpływa na interpretację wyników.

Podsumowując, przedstawiona metoda real-time PCR identyfikacji DNA przeżuwaczy jest czuła, szybka oraz gatunkowo specyficzna. Uzyskane wyniki parametrów walidacji wykazują skuteczność metody. Z tego względu może być ona przydatnym narzędziem stosowanym w rutynowej kontroli obecności białek przeżuwaczy w surowych produktach pochodzenia zwierzęcego.

Piśmiennictwo

- Bottero M. T., Dalmaso A.: Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.* 2011, 190, 34-38.
- Bottero M. T., Dalmaso A., Nucera D., Turi R. M., Rosati S., Squadrone S., Gorla M., Civera T.: Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food. Prot.* 2003, 66, 2307-2312.
- Budowle B., Allard M., Wilson M., Chakraborty R.: Forensic and mitochondrial DNA: applications, debates and foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2003, 4, 119-141.
- Dalmaso A., Civera T., Neve F. La, Bottero M. T.: Simultaneous detection of cow and Buffalo milk in mozzarella cheese by real-time PCR assay. *Food Chem.* 2011, 124, 362-366.
- EURL-AP Standard Operating Procedure Detection of ruminant DNA in feed using real-time PCR. <http://eurl.craw.eu/img/page/sops/EURL-AP%20SOP%20Ruminant%20PCR%20V1.1.pdf>
- Gizzi G., Raamsdonk L. W. D., Baeten V., Murray I., Berben G., Brambilla G., von Holst C.: An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2003, 22, 311-331.
- Gouli Z., Mingguang Z., Zhijiang Z., Hongsheng O., Qiang I.: Establishment and application of polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.* 1996, 51, 233-236.
- Holland M. M., Parson T. J.: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.* 1999, 11, 21-50.
- Kingombe C. I. B., Lüthi E., Schlosser H., Howald D., Kuhn M., Jemmi T.: A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci.* 2001, 57, 35-41.
- Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady. Druga mapa drogową dla TSE. Dokument strategiczny w sprawie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych na lata 2010-2015 (COM(2010) 384 final z 16 lipca 2010 r.).
- Pascoa A., Prado M., Calo P., Cepeda A., Barros-Velázquez J.: Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.* 2005, 220, 444-450.
- Pegels N., González I., Fernández S., García T., Martín R.: Sensitive detection of porcine DNA in processed animal proteins using a TaqMan real-time PCR assay. *Food Addit. Contam. Part A* 2012, 29, 1402-1412.

Ryc. 1. Reakcja real-time PCR – sprawdzanie specyficzności metody

- Prado M., Casqueiro J., Iglesias Y., Cepeda A., Barros-Velázquez J.: Application of polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home-made animal meals. *J. Sci. Food Agric.* 2004, 84, 505-512.
- Rodríguez M. A., García T., González I., Asensio L., Hernández P. E., Martín R. J.: PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *J. Food Prot.* 2004, 67, 172-177.
- Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, oraz w sprawie wykonania dyrektywy Rady 97/78/WE w odniesieniu do niektórych próbek i przedmiotów zwolnionych z kontroli weterynaryjnych na granicach w myśl tej dyrektywy (L 54/1, 26.02.2011).
- Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 2016/27 z dnia 13 stycznia 2016 r. zmieniające załączniki III i IV do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (L 9/4, 14.01.2016).
- Rozporządzenie Komisji (UE) 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 (L 20/33, 23.01.2013).
- Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 56/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniające załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii (L 21/3, 24.01.2013).
- Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (L 54/1, 26.02.2009).
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nie przeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego) (L 300/1, 14.11.2009).
- Rozporządzenie (WE) Nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 maja 2001 r., ustanawiające zasady zapobiegania, kontroli i eliminacji pewnych postaci zakaźnego gąbczastego zwrodnienia mózgu (L 147, 31.05.2001).
- Sayez R., Sanz Y., Toldrá F.: PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.* 2004, 66, 659-665.
- Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G., Battaglia P. A.: Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular test for the presence of bovine-derived materials. *J. Food Prot.* 1998, 5, 513-518.
- Unsel M., Beyersmann B., Brant P., Hiesel R.: Identification of species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *PCR Methods Appl.* 1995, 4, 241-243.
- Woodgate S. L., Hoven S. van der, Vaessen J., Margry R.: Control tools to detect processed animal proteins in feed and in animal by-products: specificity and challenges. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2009, 13, 9-13.

Adres autora: dr Anna Weiner, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: aweiner@piwet.pulawy.pl