Wykrywanie i identyfikacja DNA wieprzowego w paszach – opracowanie i walidacja metody

ANNA WEINER, ILONA PAPROCKA, KRZYSZTOF KWIATEK

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

Otrzymano 17.04.2020

Zaakceptowano 03.06.2020

Weiner A., Paprocka I., Kwiatek K.

Detection and identification of pork DNA in feed: Development and validation of a method

Summary

The aim of this paper was to develop and validate a PCR method for identification of pork protein DNA in feed. Based on the results obtained, validation parameters were determined. The following values were obtained: 97.5%, accuracy, 96.7% sensitivity, and 100% specificity. The detection limit of the method was determined at a level of 0.1%. The results confirm the usefulness of the method for routine control because it is capable of detecting the presence of pig material at the same level as the reference microscopic method. For this reason, it can be a useful tool in routine control for the presence of pork proteins in feed.

Keywords: mtDNA, PCR, animal products

Wystąpienie epidemii gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) było związane ze stosowaniem mączek mięsno-kostnych (MBM) w żywieniu przeżuwaczy. Z tego względu od 1988 r. wprowadzano stopniowo ograniczenia stosowania tego rodzaju materiału (24). Obecnie, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi, obowiązuje zakaz stosowania przetworzonego białka pochodzenia zwierzęcego (PAP) w żywieniu zwierząt gospodarskich (18-21, 23). Jedynie mączka rybna może być wykorzystywana w paszach dla trzody chlewnej i drobiu oraz dla nieodsadzonych przeżuwaczy jako składnik preparatów mlekozastępczych. Natomiast w żywieniu zwierząt akwakultury możliwe jest stosowanie mączki rybnej, owadziej oraz PAP pochodzącego od zwierząt innych niż przeżuwacze (19, 23).

Prowadzone są prace mające na celu przywrócenie stosowania PAP w żywieniu zwierząt (7). Planowane stopniowe uchylanie zakazu paszowego będzie dotyczyło zwierząt nieprzeżuwających, tj. drobiu i trzody chlewnej. Równocześnie będzie obowiązywał zakaz kanibalizmu, czyli np. przetworzone białka drobiowe będą mogły być stosowane wyłącznie dla trzody chlewnej. W tym celu konieczne jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na oznaczenie gatunku PAP.

Amplifikacja specyficznych sekwencji DNA za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) jest obecnie najczęściej stosowanym narzędziem do iden-

tyfikacji gatunkowej (1, 5, 6, 16, 17, 28). Już w latach 90. podejmowano próby opracowania metody do identyfikacji DNA bydłowego (25, 26), jednak uzyskane wyniki porównań międzylaboratoryjnych wykazały, że metoda charakteryzowała się niską czułością, co najprawdopodobniej wynikało z intensywnej obróbki termicznej mączki mięsno-kostnej wykorzystanej do przygotowania materiału do badań (1, 2). Przez kolejne lata podejmowano próby opracowania testu PCR pozwalającego na identyfikację DNA przede wszystkim DNA wołowego lub przeżuwaczy. W mniejszym stopniu koncentrowano się na pozostałych gatunkach zwierząt (3, 8, 30).

Celem badań było opracowanie i walidacja metody PCR umożliwiającej wykrywanie i identyfikację DNA wieprzowego w paszach i materiałach paszowych.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły przetworzone białka pochodzenia zwierzęcego wołowego (mączka mięsno-kostna, hemoglobina, mleko w proszku), owczego (mączka mięsno-kostna), wieprzowego (mączka mięsno-kostna, hemoglobina, plazma, suszone krwinki) i drobiowego (mączka mięsno-kostna, mączka z piór). Ponadto do oceny specyficzności reakcji wykorzystano mączki rybne, materiały roślinne: śrutę sojową, kukurydzianą, rzepakową, jęczmienną oraz materiały witaminowo-mineralne. W celu przygotowania mączek mięsno-kostnych wołowych, wieprzowych i drobiowych odpowiednie gatunkowo mięso wraz z kośćmi oddzielnie zostały poddane obróbce termicznej w tempe-

Tab. 1. Sekwencja i charakterystyka starterów zastosowanych w badaniach

Nazwa startera	Gatunek	Sekwencja (5'→3')	Produkt amplifikacji (pz)
SUSR5 SUSF5	<i>Sus scrofa</i>	5'-AAACACTCTTTACGCCGTGGA-3' 5'-CACCCCACGGGAAACA-3'	126

Tab. 2. Zastosowane w badaniach stężenia odczynników w mieszaninie reakcyjnej

Składniki mieszaniny	Stężenie końcowe
Bufor do PCR 10×	1×
50 mM MgCl ₂	1-2 mM
dNTP 2,5 mM	0,5-1,5 mM
Starter SUSR5	0,5-1,5 mM
Starter SUSF5	0,5-1,5 mM
Polimeraza Platinum Taq DNA	1,5 U
H ₂ O wolna od DNazy i RNazy	Uzupełniano do objętości końcowej 45 µl

raturze 140°C, następnie wysuszone i zmielone. Próbkę została przygotowana zgodnie z poniższym schematem:

- 20 próbek nie zawierających materiału wieprzowego;
- próbki pasz kontaminowane PAP wieprzowym na poziomach: 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%;
- 20 próbek pasz kontaminowanych PAP wieprzowym na poziomie niskim – 0,1%;
- 20 próbek pasz kontaminowanych PAP wieprzowym na poziomie średnim – 1%;
- 20 próbek pasz kontaminowanych PAP wieprzowym na poziomie wysokim – 2%.

Ekstrakcja DNA. Z próbki o masie 200 mg izolowano mDNA przy użyciu komercyjnego testu Wizard Magnetic Purification System for Food (Promega). Wyekstrahowane DNA zawieszano w 100 µl wody wolnej od DNazy i RNazy. Stężenie uzyskanego DNA mierzono przy użyciu spektrofotometru (Nicolette Evolution 300 ThermoSpectronic). Czystość wyekstrahowanego DNA sprawdzano poprzez pomiar stosunku absorbancji przy $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm.

Startery. W reakcji zastosowano startery, których sekwencję i charakterystykę przedstawiono w tabeli 1.

Reakcja PCR. W badaniach zastosowano różne stężenia odczynników w mieszaninie reakcyjnej, zgodnie z tabelą 2. Badania wykonywano przy użyciu aparatu SensoQuest. Reakcję PCR prowadzono przy różnych profilach temperaturowo-czasowych: denaturacja wstępna 94°C przez 10 min, 30 cykli: denaturacja 93-95°C przez 30 s – 1 min oraz przyłączanie starterów 52-54°C przez 1 min, wydłużanie DNA i wydłużanie końcowe w temperaturze 72°C przez 1 min. Następnie uzyskane amplikony poddawano analizie dzięki rozdzielowi w 2% żelu agarozowym wybarwionym SimplySafe (EURX) i wizualizacji promieniami UV za pomocą systemu dokumentacji (Vilber Lourmat). Rozkład otrzymanych prążków porównywano z prążkami markera DNA (O'GeneRuler 50 bp Ladder ready-to-use, ThermoScientific).

Ponadto sprawdzono odporność zoptymalizowanej metody na zmianę warunków, biorąc pod uwagę zmianę stężenia $\pm 10\%$ starterów w mieszaninie reakcyjnej oraz modyfikację profilu czasowo-temperaturowego reakcji w zakresie zmiany temperatury $\pm 0,5^\circ\text{C}$ denaturacji wstępnej oraz przyłączania starterów.

Opracowana metoda pozwala na określenie obecności lub nieobecności DNA wieprzowego, 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:

$$SP = \frac{N_A}{N_-} \times 100\%$$

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

$$SE = \frac{P_A}{N_+} \times 100\%$$

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

$$AC = \frac{(P_A + N_A)}{N} \times 100\%$$

przedziały ufności:

$$CI = p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad \text{z } n = N, N_+, N_-, \text{ odpowiednio,}$$

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 wpisywano w formularzu przedstawionym poniżej:

		Rzeczywistość		suma
		+	-	
Test	+	PA	PD	a
	-	ND	NA	b
	suma	N ₊	N ₋	N

Wyniki i omówienie

Technika PCR stanowi czułe, szybkie i wysoce specyficzne narzędzie niezależnie od rodzaju badanej tkanki (4, 10, 13, 14, 25, 26). Opisana metoda pozwala na identyfikację DNA wieprzowego w przetworzonych produktach pochodzenia zwierzęcego.

W niniejszej pracy do opracowywania metody wykorzystano mitochondrialne DNA (mDNA). W każdej komórce mitochondrium zawiera własny materiał genetyczny, który zbudowany jest z dwuniciowej cząsteczki mDNA o długości ok. 19 569 pz (2). Ten rodzaj DNA jest bardziej odporny niż DNA jądrowe na degradację pod wpływem wysokich temperatur ze względu na kolistą strukturę. Dodatkowo cechuje się dużym polimorfizmem regionu kontrolnego (tzw. pętla D) oraz bardzo wysoką wydajnością ekstrakcji nawet z niewielkich ilości materiału biologicznego (3, 7).

Użyte w badaniach startery pozwalały na uzyskanie amplikonu o długości 126 par zasad. W badaniach dotyczących wykrywania produktów świeżych, gotowanych lub karm dla zwierząt w puszkach możliwe było uzyskanie amplikonów o wielkości powyżej 174 pz (1, 4, 10, 11, 15, 26). Natomiast w przetworzonej żywności i paszach, gdzie następuje denaturacja DNA, większe fragmenty DNA (> 200 bp) nie zawsze były amplifikowane (5). W przypadku przetworzonych białek zwierzęcych, które poddawane są działaniom temperatury powyżej 133°C następuje zmniejszenie liczby kopii DNA, ponadto ulega ono degradacji na małe fragmenty. Wyniki badań przedstawione przez von Holsta wyraźnie świadczą o wpływie temperatury sterylizacji na liczbę kopii DNA (9). Największe zmniejszenie liczby kopii DNA stwierdzono w zakresie temperatur od 135°C do 138°C. Dodatkowo zaobserwowano, że liczba kopii DNA materiału ogrzewanego w temperaturze 130°C była około 140 razy większa niż w przypadku materiału poddanego działaniu tempera-

tury 141°C (25). Z tego względu w tym badaniu uzyskano krótką długość fragmentów DNA (86-149 pz), które stosuje się w metodach identyfikacji gatunków mączki mięsno-kostnej (12).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zastosowany 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 wieprzowego została zoptymalizowana. Najbardziej powtarzalne wyniki uzyskano stosując mieszaninę reakcyjną zawierającą: bufor do PCR 10×, $MgCl_2$ – 1,5 mM, dNTP – 0,05 mM, startery – 0,2 μM, polimeraza Platinum Taq DNA – 1,5 U, próbka – 5 μl i uzupełnione wodą wolną od RNazy i DNazy do 50 μl.

Natomiast w profilu czasowo-temperaturowym reakcji temperatura denaturacji została ustalona na 94°C przez 1 min oraz przyłączania starterów: 53°C przez 1 min.

Porównano wyniki uzyskane zoptymalizowaną metodą oraz z modyfikacjami mającymi na celu sprawdzenie odporności metody na zmianę warunków. Badania wykonano przy użyciu mieszanek paszowych kontaminowanych mączką mięsno-kostną wieprzową na poziomie 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%. W przypadku zmiany stężenia starterów w mieszaninie reakcyjnej +/-10% nie stwierdzono istotnego wpływu na uzyskiwane wyniki. W badaniach próbek z zastosowaniem zmodyfikowanej temperatury $\pm 0,5^\circ C$ denaturacji wstępnej oraz przyłączania starterów również uzyskano wszystkie wyniki poprawne. W związku z powyższym można stwierdzić, że metoda jest odporna na niewielkie zmiany parametrów.

Wyniki badań walidacyjnych wykonanych z zastosowaniem zoptymalizowanej metody przedstawiono w tabeli 3. Badaniom poddano próbki pasz kontaminowanych mączką mięsno-kostną wieprzową oraz bez zawartości materiału wieprzowego. Stwierdzono dwa wyniki fałszywie ujemne w próbkach mieszanek paszowych z dodatkiem mączki mięsno-kostnej wieprzowej na poziomie niskim (0,1%).

Specyficzność reakcji oceniano przy użyciu różnych materiałów pochodzących z 6 gatunków zwierząt, 7 gatunków roślin oraz materiałów mineralnych i witaminowych (ryc. 1). We wszystkich przypadkach uzyskano poprawne wyniki badań.

Tab. 3. 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
Mieszanka paszowa	0%	20	20	0
Mieszanki paszowe kontaminowane mączką mięsno-kostną wieprzową	Niski poziom (0,1%)	20	18	2
	Średni poziom (0,5%)	20	20	0
	Wysoki poziom (1%)	20	20	0

Ryc. 1. Specyficzność reakcji

Objaśnienia: 1 – marker, 2 – kontrola pozytywna – mączka mięsno-kostna wieprzowa, 3 – kontrola negatywna – woda, 4 – mączka mięsno-kostna wieprzowa, 5 – hemoglobina wieprzowa, 6 – plazma wieprzowa, 7 – suszone krwinki wieprzowe, 8 – mączka mięsno-kostna wołowa, 9 – hemoglobina wołowa, 10 – mleko w proszku, 11 – mączka mięsno-kostna owcza, 12 – mączka mięsno-kostna drobiowa, 13 – mączka z piór, 14 – mączka rybna, 15 – śruta sojowa, 16 – śruta kukurydziana, 17 – śruta rzepakowa, 18 – śruta jęczmienna, 19 – materiały mineralno-witaminowe, 20 – marker

Ponadto na podstawie uzyskanych wyników określono cechy charakterystyczne metody, których wartości wynosiły: dokładność 97,5%, czułość 96,7% oraz specyficzność 100%. Granicę wykrywalności metody określono na poziomie 0,1%. Uzyskane rezultaty świadczą o przydatności metody do rutynowej kontroli, gdyż umożliwia wykrywanie obecności materiału wieprzowego na takim samym poziomie, jak w referencyjnej metodzie mikroskopowej (20).

Podsumowując, przedstawiona metoda PCR identyfikacji DNA wieprzowego jest czuła, szybka oraz gatunkowo specyficzna. Uzyskane wyniki parametrów walidacji świadczą o skuteczności metody. Z tego względu może być ona przydatnym narzędziem stosowanym w rutynowej kontroli obecności białek wieprzowych w paszach.

Piśmiennictwo

1. Bottero M. T., Dalmaso A.: Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *Vet. J.* 2011, 190, 34-38.
2. 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.
3. 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.
4. Chiappini B., Brambilla G., Agrimi U., Vaccari G., Aarts H. J. M., Berben G., Giambra V., Frezza D.: A real-time PCR approach for ruminant-specific DNA quantification indicates a correlation between DNA amount and MBM heat treatments. *JAOAC Int.* 2005, 88, 1399-1403.
5. 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.
6. 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.
7. Holland M. M., Parson T. J.: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for forensic casework. *Forensic Sci. Rev.* 1999, 11, 21-50.
8. Holst C. von, Anklam E.: Method for the detection of bovine mitochondrial DNA in animal feedings of plant origin. Final report of the competitive support project N° 86-7920/97/000008 Part 2: Validation study. Joint Research Centre, Ispra, Italy 1999, 35.
9. Holst Ch. von, Boix A., Marien A., Prado M.: Factors influencing the accuracy of measurements with real-time PCR: The example of the determination of processed animal proteins. *Food Control* 2012, 24, 142-147.
10. 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.
11. 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.).
12. Krčmář P., Renčová E.: Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *J. Food Prot.* 2001, 64, 117-119.
13. Martín I., García T., Fajardo V., López-Calleja I., Hernández P. E., González I., Martín R.: Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feed stuffs. *Meat Sci.* 2007, 75, 120-127.
14. Pascoal 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.
15. Pegels N., González I., García T., Martín R.: Avian-specific real-time PCR assay for authenticity control in farm animal feeds and pet foods. *Food Chemistry* 2014, 142, 39-47.
16. 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.
17. 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.
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. 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 zwyrodnienia mózgu (L 147, 31.05.2001).
25. 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.
26. Unseld M., Beyer mann 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.
27. Wang R. F., Myers M. J., Campbell W., Cao W. W., Paine D., Cerniglia C. E.: A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feed stuffs. *Mol. Cell Probes* 2000, 14, 1-537.
28. 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