

Badania biegłości w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach metodą real-time PCR

Anna Weiner, Ilona Paprocka, Krzysztof Kwiatek

z Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Jako przyczynę wybuchu epidemii gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) uznano stosowanie w żywieniu przeżuwaczy mączek mięsno-kostnych wyprodukowanych z bydła chorego na BSE lub owiec padłych na trzęsawkę (scrapie; 1, 2). Z tego względu wprowadzono szereg aktów prawnych mających na celu ograniczenie stosowania

wspomnianych mączek w żywieniu zwierząt gospodarskich (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Obecnie, zgodnie z rozporządzeniem Komisji 56/2013 z 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

Proficiency tests for the detection and identification of DNA ruminants in feed using real-time PCR

Weiner A., Paprocka I., Kwiatek K., Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs, National Veterinary Research Institute, Puławy

The aim of this study was to present the principles of the organization and evaluation of the results of the first proficiency test for the detection and identification of ruminant DNA in the feed, using real-time PCR, which was organized by the National Reference Laboratory (NRL), in 2016. Proficiency test (PT), is a very important tool to confirm and establish the competence of the laboratory. Basing on the obtained results, we've got the evidence that all participating laboratories have achieved very good results (all parameters achieved at 100%).

Keywords: proficiency test, feed, real-time PCR.

niektórych przenośnych encefalopatii gąbczastych zakazane jest stosowanie przetworzonego białka zwierzęcego (PAP) w żywieniu zwierząt gospodarskich (10). W ramach odstępstwa można stosować mączkę rybną w paszach dla trzody chlewnej i drobiu, a także dla nieodsadzonych przeżuwaaczy jako składnik preparatów mlekozastępczych. Dodatkowo przetworzone białka zwierzęce inne niż mączka rybna, pochodząc od zwierząt nieprzeżuwających, można stosować w żywieniu zwierząt akwakultury. Dla zapewnienia właściwej kontroli przestrzegania zakazu konieczne jest stosowanie odpowiednich metod, które mogą być weryfikowane poprzez sprawdzanie w badaniach biegłości (proficiency test – PT). Badania te są ważnym z punktu widzenia jednostek certyfikujących, inspekcji oraz klientów bezstronnym narzędziem umożliwiającym potwierdzenie kompetencji laboratorium.

Celem opracowania jest przedstawienie zasad organizacji i oceny wyników badań biegłości w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy metodą real-time PCR w paszach organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne w 2016 r.

Organizator badań

W dniach 13 października – 2 grudnia 2016 r. przeprowadzono 1. rundę badań biegłości, w których brało udział 6 laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW). Badania zostały zorganizowane przez Zakład Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, który zgodnie z rozporządzeniem Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 8 kwietnia 2012 r. pełni rolę Krajowego Laboratorium Referencyjnego w zakresie przetworzonego białka zwierzęcego (11). Według rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE (12) oraz Ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. (13), jest zobowiązane do organizacji porównań międzylaboratoryjnych/badań biegłości. W myśl Ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej laboratoria urzędowe są zobowiązane do regularnego uczestnictwa w badaniach biegłości organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne. Jest to jeden

z warunków, jaki musi spełnić laboratorium, aby zostało zatwierdzone do wykonywania określonych badań. Natomiast brak regularnego udziału w badaniach biegłości lub otrzymanie wyników niezadowolających w dwóch kolejnych rundach może przyczynić się do cofnięcia zatwierdzenia. Program badań biegłości w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach metodą real-time PCR w paszach organizowany jest dla laboratoriów urzędowych oraz ubiegających się o zatwierdzenie i obejmuje jedną rundę w ciągu roku. W przypadku laboratoriów, które uzyskały wyniki niezadowolające badań biegłości organizowane są rundy dodatkowe, w myśl zapisów Ustawy o Inspekcji Weterynaryjnej.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły: mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla przeżuwaczy (granulat), mieszanka paszowa pełnoporcjowa (Prestarter), mieszanka paszowa dla ryb, mieszanka paszowa uzupełniająca (kaliber Musli), mączka z pierza, mączka mięsno-kostna wołowa. Próbkki mieszanek paszowych zostały zbadane w Zakładzie Higieny Pasz metodami mikroskopową i real-time PCR. Wyniki badania zamieszczono w tabeli 1.

Mieszankę paszową dokładnie wymieszano, a następnie podzielono na odpowiednie porcje i fortyfikowano mączką mięsno-kostną wołową. Fortyfikację przeprowadzono w następujący sposób:

- fortyfikacja 0% – 0,00 g mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla przeżuwaczy (granulat),
- fortyfikacja 0,05% – 19,99 g mieszanki paszowej pełnoporcjowej (Prestarter) + 0,01 g mączki mięsno-kostnej wołowej,
- fortyfikacja 0,05% – 19,99 g mączki z pierza + 0,01 g mączki mięsno-kostnej wołowej,
- fortyfikacja 0% – 20,00 g mieszanki paszowej dla ryb,
- fortyfikacja 0% – 20,00 g mieszanki paszowej uzupełniającej (kaliber Musli).

Następnie przygotowano 9 zestawów po 5 próbek w szczelnie zamkniętych butelkach plastikowych. Zestawy zawierały taką samą ilość próbek o takich samych

poziomach fortyfikacji. Do badań w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach metodą real-time PCR zgłosiło się 6 laboratoriów, z których każde otrzymało zestaw składający się z 5 próbek mieszanek paszowych, każda o masie 20 g. Próbkki przekazano do badań 13 października 2016 r.

Uczestnicy wykonali badania metodą real-time PCR według procedury laboratoryjnej opracowanej na podstawie wytycznych zawartych w rozporządzeniu Komisji (UE) nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r. zmieniającym rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod analitycznych oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów proceduralnej kontroli pasz (14, 15) oraz procedury badawczej opisującej metodę real-time PCR zamieszczonej na stronie internetowej Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. białek zwierzęcych (EURL-AP; 16). Identyfikacja DNA przeżuwaczy opiera się na reakcji real-time PCR polegającej na amplifikacji fragmentów mitochondrialnego DNA zawierających specyficzne gatunkowo dla genomu przeżuwaczy sekwencje nukleotydowe. Opisująca reakcja należy do metod specyficznych gatunkowo wykorzystujących system sond TaqMan i jest zoptymalizowana dla aparatów płytkowych ABI. Jest to metoda jakościowa i pozwala jedynie na wykrycie obecności DNA przeżuwaczy.

Jednym z etapów badania było przeprowadzenie kalibracji i oznaczenie wartości cut-off. W tym celu wykorzystywany był zestaw kalibracyjny DNA przeżuwaczy ERM-AD482 Ruminant (JRC-IRMM, Belgia). Wartość cut-off stanowiła wartość graniczną, która różnicuje wyniki dodatnie od ujemnych. Proces kalibracji stanowi także kontrolę jakości badań w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia wyników fałszywie pozytywnych. Kalibracja była wykonywana przy użyciu kalibrantów zawierających DNA plazmidowe na trzech poziomach (640, 160, 40 kopii). Jednorazowo każdy poziom sprawdzany był w 12 powtórzeniach. Taka analiza była wykonywana czterokrotnie. Następnie uzyskane wartości ct dla każdego kalibranta wprowadzano do odpowiedniego arkusza kalkulacyjnego (16) i obliczano wartość cut-off

Tabela 1. Wyniki badania próbek materiałów wykorzystywanych do badań biegłości z zastosowaniem metody mikroskopowej i real-time PCR

Rodzaj materiału	Wyniki badania metodą mikroskopową	Wyniki badania metodą real-time PCR
Mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla bydła	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny
Mieszanka paszowa pełnoporcjowa (Prestarter)	Obecność fragmentów ości, łusek, skrzelii	Ujemny
Mączka z pierza	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych, piór	Ujemny
Mieszanka paszowa dla ryb	Obecność fragmentów ości, łusek, skrzelii	Ujemny
Mieszanka paszowa uzupełniająca (kaliber Musli)	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny
Mączka mięsno-kostna wołowa	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych	Dodatni

Tabela 2. Wyniki badania próbek z zastosowaniem metody mikroskopowej i real-time PCR

Kod	Nr próbki	Skład próbki	Wyniki badania metodą mikroskopową	Wyniki badania metodą real-time PCR
7	85	Mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla bydła	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny
	103	Mieszanka paszowa pełnoporcjowa Prestarter + mączka mięso-kostna wołowa	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych, ości, łusek, skrzelii	Dodatni
	91	Mączka z pierza+ mączka mięsno-kostna wołowa	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych, piór	Dodatni
	97	Mieszanka paszowa dla ryb	Obecność fragmentów ości, łusek, skrzelii	Ujemny
	61	Mieszanka paszowa uzupełniająca (kaliber Musli)	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny
8	59	Mieszanka paszowa pełnoporcjowa dla bydła	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny
	77	Mieszanka paszowa pełnoporcjowa Prestarter + mączka mięso-kostna wołowa	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych, ości, łusek, skrzelii	Dodatni
	65	Mączka z pierza+ mączka mięsno-kostna wołowa	Obecność fragmentów kości zwierząt lądowych, piór	Dodatni
	71	Mieszanka paszowa dla ryb	Obecność fragmentów ości, łusek, skrzelii	Ujemny
	35	Mieszanka paszowa uzupełniająca (kaliber Musli)	Brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	Ujemny

oraz liczbę kopii dla danej wartości cut-off. Wymagane było przynajmniej 9 kopii dla wartości cut-off.

Badanie homogeniczności

W celu oceny jednorodności wybrano losowo 2 zestawy próbek i wykonano badanie z zastosowaniem metody mikroskopowej oraz real-time PCR.

Analiza statystyczna wyników badań

Metoda wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy jest metodą jakościową, w której kontrolowane są następujące parametry:

- Specyficzność – zdolność metody do niewykrywania analitu, gdy nie ma go w próbce.
- Czułość – zdolność metody do wykrycia czynnika wtedy, kiedy znajduje się w badanej próbce.
- Dokładność – stopień zgodności między wynikiem badania a przyjętą wartością odniesienia.

Specyficzność: $SP = \frac{NA}{N_-} \times 100\%$

Czułość: $SE = \frac{PA}{N_+} \times 100\%$

Dokładność: $AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$

Przedziały ufności:

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

odpowiednio dla p (w %) = AC, SE, SP .

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

Kryteria programu

Na podstawie otrzymanych wyników określano takie parametry metody, jak: specyficzność, czułość i dokładność. Parametry

określono w zakresie wykrywania składników białka przeżuwaczy. Jako granicę kontrolną ostrzegawczą przyjęto wartość $\geq 90\%$, a jako granicę kontrolną akceptacji wyników $\leq 60\%$.

Wyniki i omówienie

Wyniki badania próbek metodą mikroskopową i real-time PCR zawarte zostały w tabeli 2. Z powyższych danych wynika, że w każdej próbce otrzymano przewidywane wyniki i materiały mogły być wykorzystane do przygotowania próbek do badań biegłości.

Wyniki sprawdzania homogeniczności przygotowanych próbek przedstawia tabela 3.

Wszystkie uzyskane wyniki były poprawne, a oznaczane parametry wynosiły: dokładność 100%, czułość 100% i specyficzność 100%. Otrzymane rezultaty potwierdziły, że próbki były odpowiednio przygotowane i mogły być wykorzystane w programie badań biegłości.

W tabeli 4 przedstawiono liczby kopii i wartości cut-off uzyskane przez

Tabela 3. Parametry metody mikroskopowej/real-time PCR, określone na podstawie wyników badań zestawów kontrolnych oznaczonych kodami 7, 8

KOD	Specyficzność (%)	Czułość (%)	Dokładność (%)
7	100/100	100/100	100/100
8	100/100	100/100	100/100

Tabela 4. Liczba kopii oraz wartości cut-off oznaczone przez uczestników badania

Kod laboratorium	Liczba kopii dla cut-off	Cut-off	Wyniki fałszywe
1	10,15	36,74	Nie stwierdzono
2	11,14	36,63	Nie stwierdzono
3	10,23	35,26	Nie stwierdzono
4	9,7	37,57	Nie stwierdzono
5	9,58	37,65	Nie stwierdzono
6	10,59	36,47	Nie stwierdzono

Tabela 5. Parametry metody jakościowej, określone na podstawie wyników nadesłanych przez uczestników badań oznaczonych kodami od 1 do 6

KOD	Specyficzność	Czułość	Dokładność
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
4	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%

uczestników podczas kalibracji. Wszyscy uczestnicy spełnili kryterium przynajmniej 9 kopii. Wartości liczby kopii mieściły się w przedziale: od 9,58 do 11,14. Wartości cut-off wynosiły od 35,26 do 37,65. Należy również zaznaczyć, że uczestnicy nie uzyskali wyników fałszywych ujemnych/dodatnich w badaniach próbek podstawowych.

Wszystkie laboratoria uczestniczące w badaniu nadesłały wyniki w wyznaczonym czasie. **Tabela 5** przedstawia oznaczone parametry (specyficzność, czułość dokładność) określone na podstawie nadesłanych wyników.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że wszystkie (100%) laboratoria uczestniczące uzyskały wyniki bardzo dobre (badane cechy osiągnięto na poziomie 100%) w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach.

Analiza wyników badań biegłości w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach, organizowanych przez Krajowe Laboratorium Referencyjne wskazuje na wysoki poziom kompetencji laboratoriów w tym zakresie.

Podsumowując, można stwierdzić, że badania biegłości pozwalają na ocenę kompetencji laboratoriów, a także umożliwiają porównywanie własnych wyników z wynikami otrzymywanymi w innych laboratoriach wykonujących analizy w zakresie identyfikacji DNA przeżuwaczy metodą real-time PCR. Badania biegłości stanowią podstawowy element potwierdzający kompetencje laboratorium, który jest wymagany przez Polskie Centrum Akredytacji

(PCA) w procesie utrzymania i rozszerzenia zakresu akredytacji wymaganej dla laboratoriów uczestniczących w krajowych programach urzędowej kontroli pasz. Ponadto zapewniona jest w ten sposób współpraca między KLR a laboratoriami regionalnymi ZHW, która służy doskonaleniu i wdrażaniu urzędowych metod badań pasz oraz zapewnieniu ich wysokiej jakości.

Krajowe laboratoria upoważnione do wykonywania badań w zakresie identyfikacji DNA przeżuwaczy w paszach metodą real-time PCR w ramach urzędowej kontroli oraz laboratoria będące na etapie przygotowań do takiego wyznaczenia potwierdziły swoje kompetencje, uzyskując 100% wyników zadowolających. Uzyskane rezultaty świadczą o bardzo wysokim poziomie umiejętności personelu wykonującego analizy.

Piśmiennictwo

1. Van Raamsdonk L.W.D., Pinotti L., Veys P., Bremer M., Hekman W., Kemmers A., Campagnoli A., Paltanin C., Belinchon Crespo C., Vliege J., Pinckaers V. & Jørgensen J. S.: New developments in classical microscopy; what can be expected for the official control? *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011, 15(S1), 15–24.
2. Woodgate S.L., van der Hoven S., 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.
3. Rozporządzenie (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady z 22 maja 2001 r., ustanawiające zasady zapobiegania, kontroli i eliminacji pewnych postaci zakaźnego gąbczastego zwyrodnienia mózgu.
4. Decyzja Komisji 2001/9 oraz Decyzja Komisji 2001/165 w sprawie skażeń krzyżowych pasz dla bydła.
5. Rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z 3 października 2002 r., ustanawiające przepisy zdrowotne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi (Dz.U. L 273, 10.10.2002).

6. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1234/2003 z 10 lipca 2003 r., zmieniające załączniki I, IV i XI do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie (WE) nr 1326/2001 w odniesieniu do pasażowalnych encefalopatii gąbczastych oraz żywienia zwierząt.
7. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1292/2005 z 5 sierpnia 2005 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie żywienia zwierząt;
8. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z 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).
9. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 142/2011 z 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.
10. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 56/2013 z 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).
11. Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 18 kwietnia 2012 r. w sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych (Dz.U., poz. 480, z późn. zm.).
12. Rozporządzenie 882/2004/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 roku w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym, oraz regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt (Dz. Urz. UE L 165/1 z 30.04.2004).
13. Ustawa z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz.U. 2016 poz. 1077).
14. Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 51/2013 z 16 stycznia 2013 r. zmieniającym 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).
15. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (L 54/1, 26.02.2009).
16. 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.