

Przetworzone białko zwierzęce – aktualne aspekty stosowania i wykrywania

Anna Weiner, Krzysztof Kwiatek, Ilona Paprocka, Agata Gołębiowska

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

W przeszłości różnego rodzaju mączki, np.: mięsno-kostne, mięsne, kostne, z krwi, ze skór, uzyskiwane z przetwarzania zwłok zwierzęcych i ubocznych niejadalnych surowców pochodzenia zwierzęcego stanowiły ważne źródło wartościowego białka w żywieniu zwierząt gospodarskich. Wystąpienie epidemii gąbczastej encefalopatii bydła (bovine spongiform encephalopathy – BSE) spowodowało wprowadzenie aktów prawnych mających na celu ograniczenie stosowania wspomnianych mączek w żywieniu zwierząt gospodarskich. Pierwsze ograniczenie wprowadzono w Wielkiej Brytanii 18 lipca 1988 r., dotyczyło stosowania mączek mięsno-kostnych pochodzących od przeżuwaczy w żywieniu bydła. Z początkiem lipca 1994 r. wprowadzono kolejne ograniczenie w zakresie karmienia bydła, owiec i kóz mączkami pochodzącymi z przetwarzania

tkanek ssaków. Następnie od 2001 r. obowiązuje całkowity zakaz stosowania mączek pochodzenia zwierzęcego i innych zdefiniowanych postaci przetworzonego białka zwierzęcego w żywieniu zwierząt hodowlanych przeznaczonych do produkcji żywności. Wyjątek stanowi mączka rybna, dla której nie wprowadzono zakazu stosowania w żywieniu zwierząt, z wyjątkiem przeżuwaczy (1, 2). W kolejnych latach przyjęto akty prawne precyzujące zakaz stosowania ubocznych przetworzonych produktów pochodzenia zwierzęcego w żywieniu zwierząt gospodarskich i domowych (3, 4, 5, 6). Wynikające z tego faktu aktualne możliwości stosowania materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego zestawiono w **tabeli 1**.

Obecnie obowiązuje rozporządzenie Komisji (UE) nr 56/2013 z 16 stycznia 2013 r., które zakazuje karmienia

Processed animal protein – novel aspects of use and detection

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

The purpose of this paper was to present some important aspects of use and detection of the processed animal protein. Accordance with current regulations on the use of products containing processed animal protein are subject to rigorous laboratory control. The elimination of products which do not fulfill the specific requirements of the minimizing the risk of bovine spongiform encephalopathy is treated as obligatory. Routine microscopic method is used which allows to detect the additives of animal origin. Furthermore, molecular biology methods, primarily PCR, is under implementation. This should significantly improve the safety of animal feed products that may contain processed animal proteins.

Keywords: processed animal protein, feed additives, methods of detection, safety.

przeżuwaczy dizasadowym fosforanem wapnia i trizasadowym fosforanem wapnia pochodzenia zwierzęcego oraz mieszankami paszowymi zawierającymi te produkty (8). Zgodnie z wyżej wymienionym przepisem prawnym, przeżuwacze

Tabela 1. Zestawienie możliwości stosowania materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami (7, 8)

Rodzaj przetworzonego białka zwierzęcego	Gatunek pochodzenia	Pasze dla			Pasze dla akwakultury	Pasze dla zwierząt mięsożernych	Pasze dla zwierząt towarzyszących
		przeżuwaczy	trzody chlewnej	drobiu			
Mączka z krwi	przeżuwacze	x	x	x	x	✓	✓
	świnie	x	x	x	✓	✓	✓
	drób	x	x	x	✓	✓	✓
Mączka mięsna	przeżuwacze	x	x	x	x	✓	✓
	świnie	x	x	x	✓	✓	✓
	drób	x	x	x	✓	✓	✓
Mączka z piór	drób	x	x	x	✓	✓	✓
Tłuszcz	przeżuwacze	✓*	✓*	✓*	✓*	✓	✓
	świnie	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	drób	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Produkty z krwi (hemoglobina, osocze, krew suszona)	przeżuwaczy	x	x	x	x	✓	✓
	świnie	x	✓	✓	✓	✓	✓
	drób	x	✓	✓	✓	✓	✓
Żelatyna	przeżuwacze	x	x	x	x	✓	✓
	świnie	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	drób	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Hydrolizaty białkowe	przeżuwacze	✓**	✓**	✓**	✓**	✓	✓
	świnie	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	drób	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Produkty z mleka		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Produkty z jaj		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Mączka rybna		x***	✓	✓	✓	✓	✓

Objaśnienia: x – zakazane; ✓ – dozwolone

* – zawartość nierozpuszczalnych zanieczyszczeń stałych powinna wynosić poniżej 0,15%

** – masa cząsteczkowa nie powinna przekraczać 10 kDa

*** – zatwierdzone są preparaty mlekozastępcze zawierające mączkę rybną i przeznaczone są wyłącznie dla nieodsadzonych przeżuwaczy

można karmić następującymi materiałami pochodzenia zwierzęcego, tj.:

- mlekiem i produktami na bazie mleka, produktami pochodnymi mleka,
- siarą oraz produktami z siary,
- jajami i produktami jajecznymi,
- kolagenem i żelatyną pochodzącymi od zwierząt innych niż przeżuwacze,
- hydrolizatami białkowymi pochodzącymi z części zwierząt innych niż przeżuwacze lub ze skór i skórek przeżuwaczy.

Ponadto w żywieniu nieodsadzonych przeżuwaczy można stosować preparaty mlekozastępcze wytworzone z mączki rybnej. W przypadku pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich można stosować w żywieniu następujące produkty pochodzenia zwierzęcego:

- hydrolizaty białkowe pochodzące ze zwierząt innych niż przeżuwacze lub ze skór i skórek przeżuwaczy,
- mączkę rybną,
- dizasadowy fosforan wapnia i trizasadowy fosforan wapnia,
- produkty z krwi pochodzące od zwierząt innych niż przeżuwacze.

Zgodnie z tym rozporządzeniem, w żywieniu zwierząt akwakultury można

stosować przetworzone białka zwierzęce, inne niż mączka rybną, pochodzące od zwierząt nieprzeżuwających.

W nowych przepisach prawnych ważna zmiana dotyczy żywienia zwierząt gospodarskich materiałami paszowymi pochodzenia roślinnego zanieczyszczonymi nieznaczną ilością elementów kostnych pochodzących z tkanek zwierzęcych. Obecnie możliwe jest skorzystanie z takiego odstępstwa na podstawie przeprowadzonej oceny ryzyka, stwierdzającej, że istnieje znikome zagrożenie dla zdrowia zwierząt i ludzi. Ocena ryzyka musi uwzględniać przynajmniej następujące elementy:

- stopień zanieczyszczenia,
- charakter i źródło zanieczyszczenia,
- zamierzone wykorzystanie zanieczyszczonej paszy.

Ponadto rozporządzenie Komisji (WE) nr 142/2010 określa wymagania dla tłuszczów paszowych oraz hydrolizatów białkowych (7). Zgodnie z wytycznymi zawartość nierozpuszczalnych zanieczyszczeń stałych w tłuszczach paszowych pochodzących z przeżuwaczy nie powinna przekraczać 0,15%, a w odniesieniu do hydrolizatów białkowych uzyskanych z tkanek

zwierząt pochodzących z przeżuwaczy masa cząsteczkowa nie powinna przekraczać 10 kDa.

W ostatnim okresie zostało wydane nowe rozporządzenie Komisji (UE) nr 51/2013 z 16 stycznia 2013 r., zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009, w odniesieniu do metod analitycznych oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz (10, 11). Rozporządzenie wprowadziło zmiany w metodach wykorzystywanych do wykrywania przetworzonych produktów pochodzenia zwierzęcego w paszach. Składniki pochodzenia zwierzęcego mogą być oznaczane metodą mikroskopową i PCR. Jednak w praktyce oznacza to utrzymanie metody mikroskopowej jako metody referencyjnej, ponieważ procedura PCR wciąż jest w trakcie opracowywania.

Wprowadzone do metody mikroskopowej zmiany polegają przede wszystkim na modyfikacji sposobu przygotowywania próbki do analizy. Podczas wstępnej przygotowania próbki do badania zalecane jest w przypadku pasz granulowanych i ziarnistych wykonanie przesiewu przez sito o oczkach 1 mm, a następnie

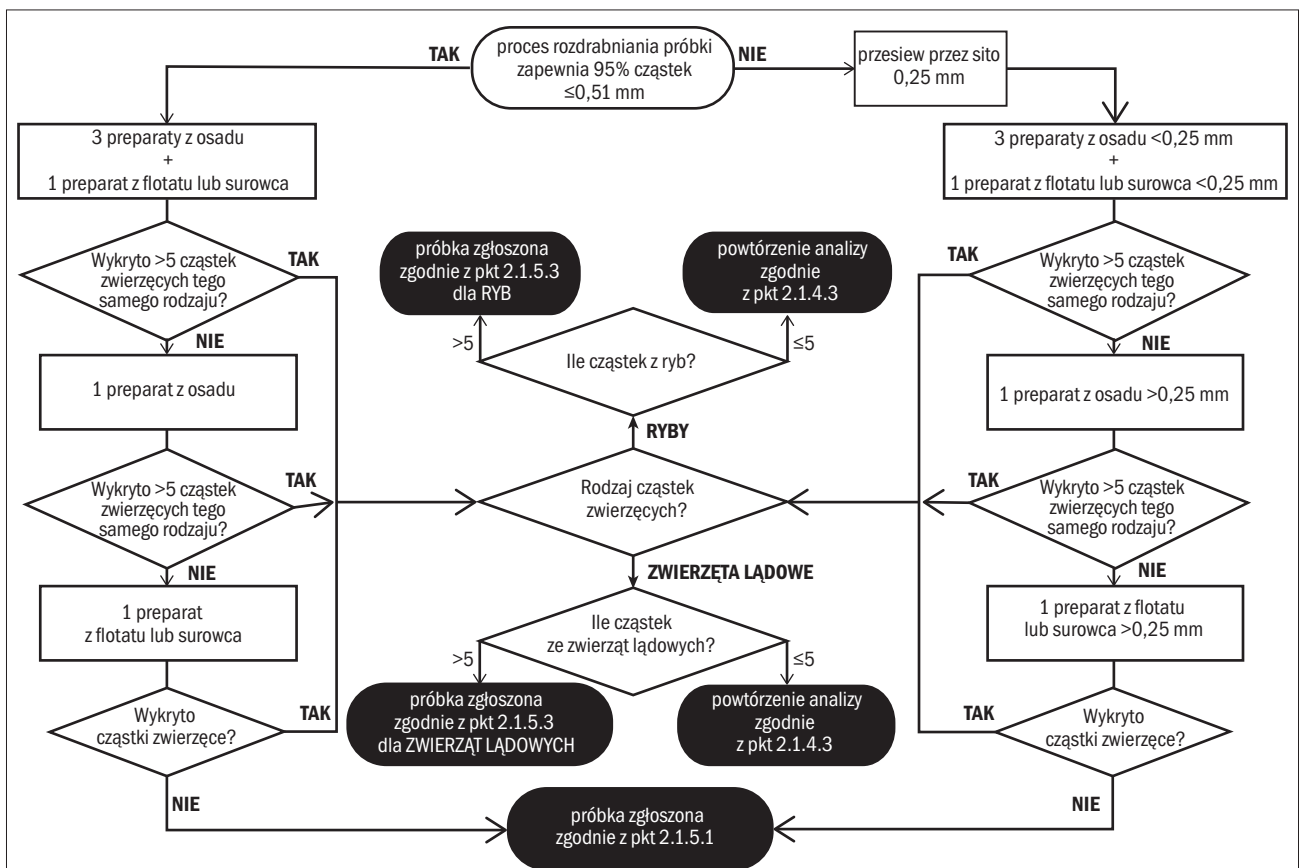
przygotowanie i poddanie analizie uzyskanych frakcji, traktując je jako odrębne próbki. Do badania przygotowuje się przynajmniej 50 g próbki, z której należy pobrać podpróbę o masie 10 g, a w przypadku mączki rybnej lub innych czystych produktów zwierzęcych, składników mineralnych lub premiksów, które wytwarzają więcej niż 10% osadu, próbka powinna mieć masę 3 g. Następnie po rozdrobieniu należy porcję próbki umieścić w odpowiednim naczyniu laboratoryjnym, np. rozdzielaczu lub zlewce osadowej ze stożkowym dnem i dodać 50 ml tetrachloroetylenu. Po wykonaniu tej czynności należy wstrząsać energicznie mieszaniną przez minimum 30 s i ostrożnie dodać nie mniej niż 50 ml tetrachloroetylenu, zmywając wewnętrzną powierzchnię naczynia, aby usunąć wszelkie cząstki przylegające do ścian naczynia. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut. W przypadku użycia zlewki osadowej ze stożkowym dnem mieszaninę należy energicznie mieszać przez przynajmniej 15 sekund, a wszystkie elementy przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując minimum 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Mieszaninę należy pozostawić na 3 minuty, a następnie mieszać ponownie przez 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując

przynajmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na minimum 5 minut, a następnie usunąć płynną frakcję poprzez staranną dekantację, przy czym należy uważać, aby nie stracić części osadu znajdującego się na dnie naczynia. Następnie należy przemieścić flotat i osad na płytce Petriego i suszyć pod wyciągiem. Jeżeli więcej niż 5% osadu stanowią cząstki >0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje. Analizę należy wykonać zgodnie ze schematem właściwym dla badanego materiału (ryc. 1, 2).

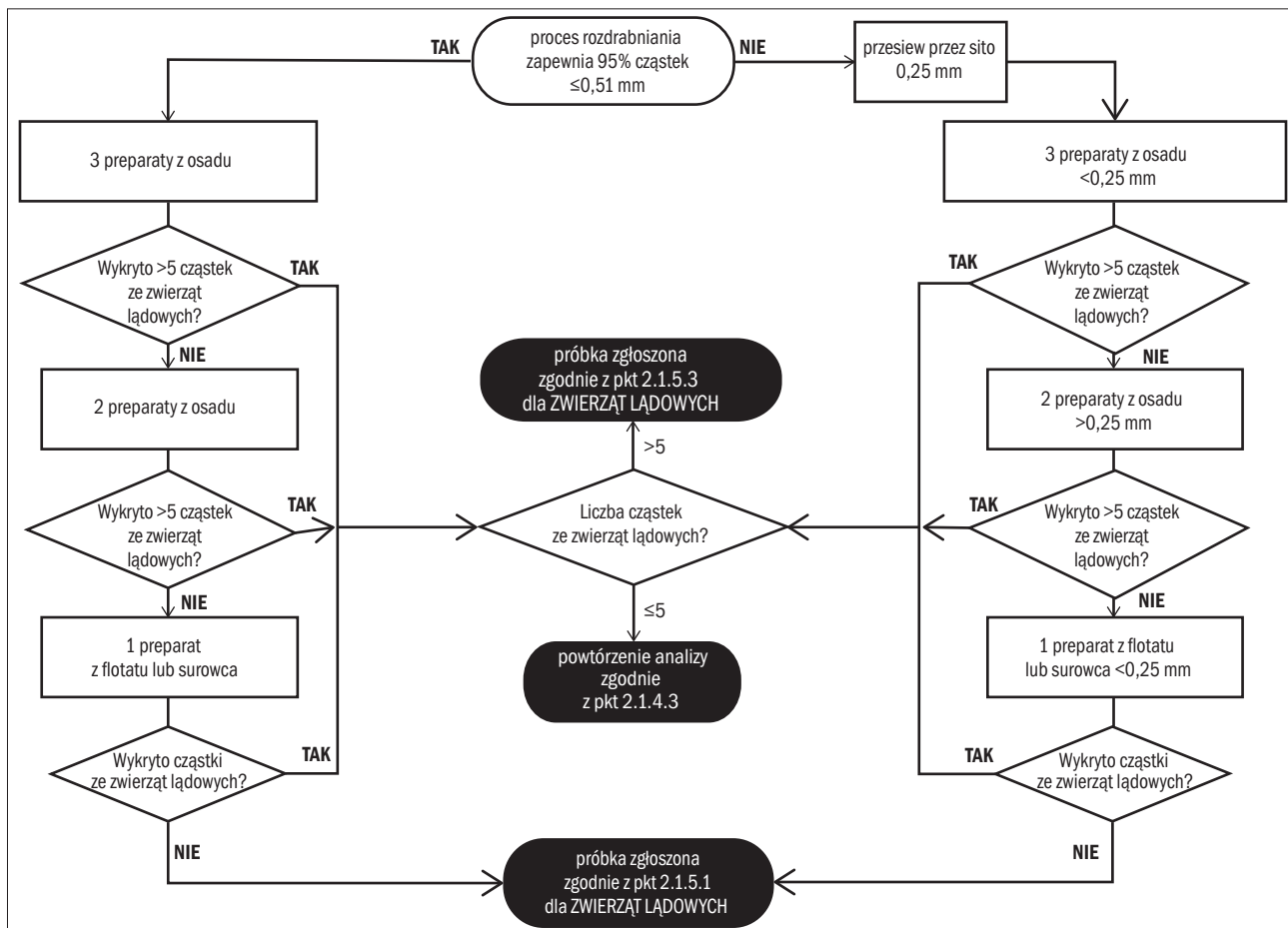
Zalecane jest, aby nie oglądać więcej niż 6 preparatów na jedno oznaczenie. Zmianie uległo również końcowe formułowanie wyniku. Ostateczny wynik badania uzależniony jest od ilości stwierdzonych elementów pochodzenia zwierzęcego, który ponadto powinien zawierać informacje jakiego typu materiał został poddany analizie (osad, flotat, surowiec) i jaka ilość oznaczeń została wykonana. Zgodnie z rozporządzeniem są trzy sposoby formułowania wyniku, zależnie od ilości stwierdzonych fragmentów pochodzenia zwierzęcego podczas analizy. Jeżeli w badaniu nie stwierdzono obecności elementów zwierzęcych, to wynik formułowany jest w następujący sposób: „przy użyciu mikroskopu optycznego w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych/ryb”. Jeżeli podczas oznaczenia stwierdzono

średnio od 1 do 5 elementów zwierzęcych, to wynik formułowany jest następująco: „używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio nie więcej niż 5 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych/ryb. Elementy zidentyfikowane jako pochodzenia zwierzęcego powinny być nazwane i określone jako np. kości, chrząstki, mięśnie, włosy/ości, rybne łuski, chrząstki, otolity czy skrzela. Ta niewielka obecność – poniżej granicy wykrywalności metody mikroskopowej – oznacza, że nie można wykluczyć ryzyka wyniku fałszywie dodatniego”. Natomiast w przypadku wykrycia średnio ponad 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju wynik przedstawiany jest następująco: „używając mikroskopu optycznego w badanej próbce wykryto średnio ponad 5 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych/ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako np. kości, chrząstki, mięśnie, włosy/ości, rybne łuski, chrząstki, otolit czy skrzela”.

Od lipca 2010 r. jest realizowany plan przywracania możliwości stosowania w żywieniu zwierząt przetworzonego białka zwierzęcego 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” (9). Dokument ten został wydany w celu zaprezentowania planowanych zmian pod kątem dostosowywania



Ryc. 1. Protokół obserwacji wykrywania elementów zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych innych niż mączka rybna (11)



Ryc. 2. Protokół obserwacji wykrywania elementów zwierzęcych w mączce rybnej (11)

przepisów prawnych do warunków, w których Unia Europejska jest bliska wyeliminowaniu BSE z populacji bydła. Niemniej jednak konieczne jest stosowanie środków zapobiegawczych i stałe monitorowanie sytuacji na wypadek pojawienia się nowych ognisk BSE lub nowego czynnika wywołującego TSE. Zmiany w przepisach, zgodnie z cytowanym komunikatem, mają być wprowadzane stopniowo w oparciu o konsultacje naukowe z Europejskim Urzędem ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Ponadto muszą uwzględnić istniejące metody badawcze wykorzystywane do kontroli. Modyfikacje mają dotyczyć stopniowego uchylania zakazu paszowego w odniesieniu do zwierząt innych niż przeżuwacze,

tj. świnie, drób czy ryby. Przetworzone białko zwierzęce może być źródłem białka dla zwierząt hodowlanych innych niż przeżuwacze, które wymagają karmienia paszą zawierającą wysokiej jakości białko. Ze względu na fakt, że ryzyko przeniesienia BSE między zwierzętami nieprzeżuwającymi jest minimalne, planowane jest uchylene zakazu w odniesieniu do stosowania w paszach dla zwierząt nieprzeżuwających przetworzonego białka zwierzęcego pochodzącego od zwierząt innych niż przeżuwacze. Jednak należy zwrócić uwagę, że nadal obowiązywałby zakaz powtórnego przetwarzania wewnątrzgatunkowego, czyli np. mączka mięsno-kostna z drobiu mogłaby być podawana wyłącznie świniom. Możliwe

byłoby to jedynie w przypadku dostępności zwalidowanych technik analitycznych w zakresie identyfikacji pochodzenia gatunkowego przetworzonego białka zwierzęcego (12, 13). Aktualnie Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej sprawdza nowe metody diagnostyczne umożliwiające identyfikację gatunkową (przeżuwacze, drób, świnia) mączki mięsno-kostnej w paszy. W lutym 2013 r. zakończono badania biegłości z wykorzystaniem nowo opracowanej procedury wykrywania i identyfikacji gatunkowej przetworzonego białka pochodzącego od przeżuwaczy z zastosowaniem techniki Real-Time PCR. Po podsumowaniu wyników badań przesłanych przez 27 Krajowych Laboratoriów Referencyjnych stwierdzono, że 92,5% uczestników badań (25 laboratoriów) poprawnie wykryło obecność DNA białka przeżuwaczy w paszach dla zwierząt akwakultury i nie uzyskało wyników fałszywie dodatnich/ujemnych. Metoda Real-Time PCR wykrywania i identyfikacji gatunkowej przetworzonego białka przeżuwaczy uzyskała pozytywną ocenę Komisji Europejskiej. Obecnie trwają prace w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB nad jej wdrożeniem do rutynowej analizy, jako uzupełnienie referencyjnej metody mikroskopowej. Metoda Real-Time PCR do identyfikacji gatunkowej DNA białka przeżuwaczy będzie wykorzystywana do badania

Tabela 2. Kształtowanie się praktycznych możliwości metod analitycznych do wykrywania i identyfikacji gatunkowej „nietypowych” materiałów pochodzenia zwierzęcego

Produkt	Wykrywanie metodą mikroskopową	Wykrywanie metodą PCR
Serwatka	×	✓
Mleko w proszku	×	✓
Osocze (plazma) suszone	×	✓
Tłuszcz zwierzęcy	×	✓
Składniki kolagenowe	×	✓
Produkty z krwi	✓	✓
Produkty z jaj	×	×

Objaśnienia: × - możliwe; ✓ - niemożliwe

pasz dla ryb, jeśli w badaniu metodą mikroskopową zostanie stwierdzona obecność składników pochodzących od zwierząt lądowych.

Sprawdzanie przydatności i walidacja metody umożliwiającej potwierdzenie obecności DNA białka wieprzowego planowane było na drugie półrocze 2013 r., a wyniki prawdopodobnie zostaną przedstawione na spotkaniu Krajowych Laboratoriów Referencyjnych w maju 2014 r. W przypadku identyfikacji gatunkowej białka drobiowego branych jest pod uwagę 5 podstawowych gatunków, tj. kura, kaczką, perliczka, indyk i gęś. Dostosowanie starterów i optymalizacja warunków reakcji Real-Time PCR do wykrycia tak wielu różnych genomów stanowi poważny problem i duże wyzwanie. Zgodnie z harmonogramem prac EURL-AP wstępnie opracowana metoda ma być sprawdzana w Krajowych Laboratoriach Referencyjnych w 2014 r.

Konieczność stosowania dwóch metod analitycznych wynika z faktu, że mikroskopowa metoda referencyjna nie pozwala na wykrycie niektórych składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak: serwatka i mleko w proszku, plazma suszona, tłuszcz, składniki kolagenowe czy produkty z jaj. Natomiast przy użyciu metody PCR istnieje możliwość uzyskiwania poprawnych wyników niezależnie od obecności składników o charakterystycznej strukturze morfologicznej, również produktów, których obecności nie można potwierdzić metodą referencyjną (14, 15, 16). Przy zastosowaniu metody PCR w przypadku obecności mleka w proszku, serwatki, produktów z krwi lub tłuszczu bez deklaracji, istnieje duże prawdopodobieństwo otrzymania wyniku fałszywie dodatniego. Analizując rezultaty otrzymane wyłącznie za pomocą techniki PCR, nie można stwierdzić pochodzenia surowcowego białka, np. czy jest to białko mleka w proszku, czy mączki

mięсно-kostnej. Dodatkowo na przebieg reakcji PCR może wpływać wiele czynników, powodując znaczne jej zahamowanie, np. dodatek preparatów witaminowo-mineralnych (12). Zestawienie obecnie dostępnych metod analitycznych w zakresie wykrywania „nietypowych” (innych niż mączka mięsno-kostna) materiałów pochodzenia zwierzęcego przedstawiono w **tabeli 2**.

Podsumowując, w dalszym ciągu prowadzone są intensywne prace nad częściowym uchyleniem zakazu stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w żywieniu zwierząt gospodarskich. Jednak nadal będzie obowiązywał zakaz powtórnego przetwarzania wewnątrzgatunkowego. Warunkiem koniecznym do wprowadzenia takich zmian jest dostępność zwalidowanych metod umożliwiających identyfikację gatunkową przetworzonego białka zwierzęcego. Z pewnością przywrócenie stosowania przetworzonego białka zwierzęcego w żywieniu zwierząt nieprzeżuujących miałyby korzystny wpływ na aspekt ekonomiczny produkcji zwierzęcej.

Piśmiennictwo

1. 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 wyrodnienia mózgu.
2. Decyzja Komisji 2001/9 oraz Decyzja Komisji 2001/165 w sprawie skazań krzyżowych pasz dla bydła.
3. Rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 3 października 2002 r., ustanawiające przepisy zdrowotne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi (Dz.U.L 273, 10.10.2002).
4. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1234/2003 z dnia 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.
5. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1292/2005 z dnia 5 sierpnia 2005 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia (WE) Nr 999/2001 Parlamentu Europejskiego i Rady w zakresie żywienia zwierząt.
6. 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 uchyłające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego).
7. 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.
8. 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.
9. Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego i Rady. Druga mapa drogowa dla TSE. Dokument strategiczny w sprawie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych na lata 2010–2015.
10. 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).
11. 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 urzędowej kontroli pasz.
12. 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 microbiology; what can be expected for the official control? *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011, **15** (S1), 15–24.
13. Fumiere O., Veys P., Boix A., von Holst C., Baeten V., Berben G.: Methods of detection, species identification and quantification of processed animal protein in feeding-stuffs. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 2009, **13**(S), 57–70.
14. Rodríguez M.A., García T., Gonzales 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.
15. 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 feedstuffs. *Meat Sci* 2007, **75**, 120–127.
16. Frezza D., Giambra V., Chegdani F., Fontana C., Maccabiani G., Losio N., Faggiolato E., Chiappini B., Vaccari G., von Holst C., Lanni L., Saccares S., Ajmone-Marsan P. Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2008, **9**, 18–23.