

Ocena kompetencji laboratoriów urzędowych w zakresie identyfikacji gatunkowej DNA zwierzęcego w paszach

Martyna Skowronek, Monika Mazur-Frejowska, Anna Weiner, Krzysztof Kwiatek

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

Evaluation of the competence of official control laboratories for animal species DNA identification in feed

Skowronek M., Mazur-Frejowska M., Weiner A., Kwiatek K., Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs, National Veterinary Research Institute in Puławy

The purpose of the study was to present principles of organization and evaluation of research results proficiency in detecting and identifying ruminant, pork and poultry DNA by using real-time PCR in feeds, organized by the National Reference Laboratory (NRL) in 2022. All laboratories participating in the proficiency tests obtained very good results (tested characteristics were achieved at the level of 100%), in detecting and identifying ruminant DNA, pork DNA and poultry DNA in feeds. This indicates a high level of competence of laboratories in this area and proves a very high level of skills of the staff performing laboratory tests.

Keywords: proficiency testing, real-time PCR, feed, animal species DNA.

Istnieje wiele dowodów naukowych wskazujących na powiązanie gąbczastej encefalopatii bydła (BSE) ze stosowaniem mączek mięsno-kostnych (MBM) w żywieniu przeżuwaczy. Z tego względu wprowadzono szereg zakazów dotyczących stosowania białek zwierzęcych w żywieniu zwierząt gospodarskich (1, 2, 3). W wyniku tych ograniczeń prawnych przez wiele lat mączka rybna była głównym źródłem przetworzonego białka zwierzęcego w żywieniu zwierząt gospodarskich.

W 2013 r. zapoczątkowano stopniowe znoszenie zakazu paszowego w ramach, którego do żywienia zwierząt akwakultury dopuszczone zostało przetworzone białko pochodzenia wieprzowego i drobiowego (4). Ponadto, w 2017 r., umożliwiono wykorzystanie PAP owadziego w żywieniu trzody chlewnej oraz drobiu (5). Następnie w 2021 r., zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) 2021/1372 z dnia 17 sierpnia 2021 r. zmieniającym załącznik IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, dokonano dalszego uchylecia zakazu paszowego, co

w praktyce oznaczało możliwość krzyżowego stosowania PAP oraz kolagenu i żelatyny w żywieniu zwierząt gospodarskich z wykluczeniem przeżuwaczy (6).

W tej nowej sytuacji prawnej niezbędnym stało się opracowanie i wdrożenie odpowiednich metod analitycznych umożliwiających właściwą kontrolę przestrzegania zasad uchylonego zakazu paszowego na podstawie Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiającego zasady dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania niektórych przenośnych gąbczastych encefalopatii (7, 8). Zgodnie z obowiązującym stanem prawnym metoda mikroskopowa powinna być stosowana do wykrywania obecności PAP, natomiast metoda real-time PCR do identyfikacji gatunkowej (9).

W celu potwierdzenia kompetencji i zapewnienia właściwej jakości pracy laboratorium urzędowe zobowiązane są do uczestniczenia w badaniach biegłości (PT) organizowanych przez laboratoria referencyjne w danym obszarze, zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r., co obejmuje także wykrywanie i identyfikację gatunkową PAP w paszach (10).

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy jest przedstawienie zasad organizacji i oceny wyników badań biegłości w zakresie identyfikacji DNA przeżuwaczy, wieprzowego oraz drobiowego metodą real-time PCR w paszach organizowanych w 2022 r. przez Krajowe Laboratorium Referencyjne.

Organizator badań

Zakład Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach (ZHS PIWet-PIB) pełni rolę Krajowego Laboratorium Referencyjnego (KLR) w zakresie wykrywania i identyfikacji przetworzonego białka zwierzęcego w paszach. Jednym z zadań ZHS jest organizacja badań biegłości dla laboratoriów regionalnych (11). Obowiązek uczestnictwa w badaniach biegłości przeprowadzanych przez krajowe laboratorium referencyjne, określa Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej (Dz.U. z 2004 r. nr 33 poz. 287 z późn. zm.; 12). Od 2016 r. organizowane są badania biegłości w zakresie identyfikacji DNA białka przeżuwaczy w paszach. Natomiast w okresie od 31 marca 2022 do 20 kwietnia 2022 r. po raz pierwszy przeprowadzono badania biegłości obejmujące identyfikację

DNA przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego w paszach dla czterech Pracowni Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW).

Warto dodać, że organizator PT – Zakład Higieny Pasz PIWet-PIB corocznie potwierdza swoje kompetencje w przedmiotowym zakresie poprzez udział w analogicznych badaniach przeprowadzonych przez Wspólnotowe Laboratorium Referencyjne ds. białka zwierzęcego (EURL-AP, Gembloux, Belgia).

Materiał i metody

W pierwszym etapie w KLR przygotowano i poddano analizie materiały paszowe wybrane do badań biegłości z zastosowaniem metody mikroskopowej oraz real-time PCR w kierunku identyfikacji DNA białka przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego. Przygotowany materiał do badań stanowiły: mączka rybna, biskopt mielony BABBEN, plazma wieprzowa, hemoglobina wieprzowa, plazma drobiowa, przetworzone białko drobiowe (PAP) oraz mleko w proszku.

W kolejnym etapie po pozytywnej weryfikacji (tab. 1) przedmiotowe materiały paszowe zostały dokładnie wymieszane, a następnie podzielono je na odpowiednie porcje i przeprowadzono fortyfikację próbek nr 1–6 w następujący sposób:

1. 20,00 g mączki rybnej – próbka kontrolna, fortyfikacja 0%;
2. 20,00 g mączki rybnej – próbka kontrolna, fortyfikacja 0%;
3. 19,98 g biskoptu mielonego BABBEN + 0,02 g plazmy wieprzowej, fortyfikacja 0,1%;
4. 19,98 g plazmy wieprzowej + 0,02 g przetworzonego białka drobiowego, fortyfikacja 0,1%;
5. 19,98 g plazmy drobiowej + 0,02 g biskoptu mielonego BABBEN, fortyfikacja 0,1%;
6. 19,96 g biskoptu mielonego BABBEN + 0,02 g przetworzonego białka drobiowego + 0,02 g hemoglobiny wieprzowej, fortyfikacja 0,2%.

Następnie przygotowano pojedyncze zestawy analityczne składające się z sześciu próbek w szczelnie zamkniętych butelkach plastikowych o tej samej 20-gramowej masie i poziomie fortyfikacji.

Do badań biegłości w zakresie identyfikacji DNA przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego w paszach metodą real-time PCR zostały wyselekcjonowane cztery laboratoria ZHW, które otrzymały odpowiednie zestawy przygotowanych uprzednio próbek.

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

Rodzaj materiału	Wyniki badania metodą mikroskopową	Wyniki badania metodą real-time PCR		
		DNA białka przeżuwaczy	DNA białka wieprzowego	DNA białka drobiowego
Mączka rybna	stwierdzono obecność fragmentów ości, łusek, skrzeli	ujemny	ujemny	ujemny
Biskopt mielony BABBEN	brak fragmentów pochodzenia zwierzęcego	dodatni	ujemny	ujemny
Plazma wieprzowa	stwierdzono obecność elementów plazmy	ujemny	dodatni	ujemny
Hemoglobina wieprzowa	stwierdzono obecność elementów plazmy	ujemny	dodatni	ujemny
Plazma drobiowa	stwierdzono obecność plazmy	ujemny	ujemny	dodatni
Przetworzone białko drobiowe	stwierdzono obecność fragmentów kości zwierząt lądowych	ujemny	ujemny	dodatni
Mleko w proszku	stwierdzono obecność elementów mleka	dodatni	ujemny	ujemny

Analizy w zakresie wykrywania PAP i identyfikacji gatunkowej laboratoria prowadziły zgodnie z procedurą badawczą opracowaną na podstawie Rozporządzenia 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, wytycznych EURL-AP zawartych w procedurach badań umieszczonych na stronie internetowej, a także z uwzględnieniem zaleceń KLR przekazanych podczas spotkania organizacyjnego (13, 14, 15).

Jednym z etapów badania było wykonanie kalibracji i oznaczenie wartości cut-off. Kalibracje zostały przeprowadzone przy użyciu trzech rodzajów kalibrantów zawierających DNA plazmidowe przeżuwaczy, wieprzowe i drobiowe na trzech poziomach (640, 160, 40 kopii). Każdy poziom był sprawdzany jednorazowo w 12 powtórzeniach. Taka analiza była przeprowadzana czterokrotnie dla każdego z gatunków. W następnej kolejności otrzymane wartości *ct* dla każdego kalibranta wprowadzono do odpowiedniego arkusza kalkulacyjnego i obliczono wartość cut-off oraz liczbę kopii dla danej wartości cut-off. Wartość cut-off stanowiła limit graniczny, który różnicuje wyniki na dodatnie i ujemne. Konieczne było uzyskanie przynajmniej dziewięciu kopii dla wartości cut-off w przypadku identyfikacji DNA przeżuwaczy i drobiowego, co najmniej pięciu kopii dla wartości cut-off w przypadku identyfikacji DNA wieprzowego.

Badanie homogeniczności

Jednorodność została określona w wyniku badania dwóch losowo wybranych zestawów próbek analizowanych z wykorzystaniem metody mikroskopowej w kierunku obecności PAP oraz metody real-time PCR w kierunku identyfikacji DNA przetworzonego białka przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego.

Analiza statystyczna wyników badań

Stosowane metody wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy, wieprzowego oraz drobiowego mają z zasady charakter jakościowy, w których kontrolowane były 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: $CI = p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$ $zn = N, N_+, N_-$

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 wartości parametrów metody real-time PCR, a mianowicie: specyficzność, czułość i dokładność, które odniosły się do identyfikacji DNA białka przeżuwaczy, wieprzowego i drobiowego. Jako granicę kontrolną ostrzegawczą przyjęto wartość $\geq 90\%$, a jako granicę kontrolną akceptacji wyników $\leq 60\%$.

Wyniki i omówienie

Udział w badaniach biegłości umożliwia niezależną zewnętrzną ocenę wiarygodności uzyskiwanych wyników oraz stanowi bardzo ważny element potwierdzający kompetencje laboratorium. Stanowi to formalny wymóg Polskiego Centrum Akredytacji (PCA) w procesie uzyskiwania i poszerzania zakresu akredytacji w odniesieniu do urzędowych laboratoriów uczestniczących w kontroli pasz. Dzięki uczestnictwie w badaniach PT zapewniona jest również współpraca pomiędzy Krajowym Laboratorium Referencyjnym a urzędowymi laboratoriami ZHW. W efekcie tego rodzaju postępowania uzyskuje się wysoki poziom prowadzonych badań urzędowych i ich należytą wiarygodność.

Wszystkie laboratoria uczestniczące w badaniach biegłości przekazały wyniki w wyznaczonym terminie.

W przeprowadzonych badaniach PT wykazano, że wszystkie cztery laboratoria uczestniczące w programie wykazały się odpowiednim opanowaniem i wdrożeniem weryfikowanych metod w trakcie prowadzonych analiz dostarczonych próbek.

Z danych przedstawionych w **tab. 1** wynika, że materiały wybrane do badań PT posiadały odpowiedni skład zgodnie z przyjętymi założeniami. Ponadto przeprowadzone badania homogeniczności dwóch zestawów próbek potwierdziły właściwy skład analitów (**tab. 2**). Otrzymane wyniki wskazały więc, że próbki zostały przygotowane prawidłowo i można było się nimi posłużyć przy wykonywaniu badań biegłości.

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

Kod	Nr próbki	Skład próbki	Wyniki badania metodą mikroskopową	Wyniki badania metodą real-time PCR		
				DNA białka przeżuwaczy	DNA białka wieprzowego	DNA białka drobiowego
5	23	mączka rybna	stwierdzono obecność fragmentów ości, łusek, skrzeli	ujemny	ujemny	ujemny
	33	mączka rybna	stwierdzono obecność fragmentów ości, łusek, skrzeli	ujemny	ujemny	ujemny
	44	biszkopt mielony BABBEN + plazmy wieprzowa	stwierdzono obecność elementów plazmy i mleka	dodatni	dodatni	ujemny
	18	plazma wieprzowa + przetworzone białko drobiowe	stwierdzono obecność fragmentów kości zwierząt lądowych oraz elementów plazmy	ujemny	dodatni	dodatni
	14	plazma drobiowa + biszkopt mielony BABBEN	stwierdzono obecność elementów plazmy i mleka	dodatni	ujemny	dodatni
	53	biszkopt mielony BABBEN + przetworzone białko drobiowe + hemoglobina wieprzowa	stwierdzono obecność fragmentów kości zwierząt lądowych oraz elementów plazmy, hemoglobiny i mleka	dodatni	dodatni	dodatni
6	7	mączka rybna	stwierdzono obecność fragmentów ości, łusek, skrzeli	ujemny	ujemny	ujemny
	59	mączka rybna	stwierdzono obecność fragmentów ości, łusek, skrzeli	ujemny	ujemny	ujemny
	41	biszkopt mielony BABBEN + plazmy wieprzowa	stwierdzono obecność elementów plazmy i mleka	dodatni	dodatni	ujemny
	21	plazma wieprzowa + przetworzone białko drobiowe	stwierdzono obecność fragmentów kości zwierząt lądowych oraz elementów plazmy	ujemny	dodatni	dodatni
	12	plazma drobiowa + biszkopt mielony BABBEN	stwierdzono obecność elementów plazmy i mleka	dodatni	ujemny	dodatni
	4	biszkopt mielony BABBEN + przetworzone białko drobiowe + hemoglobina wieprzowa	stwierdzono obecność fragmentów kości zwierząt lądowych oraz elementów plazmy, hemoglobiny	dodatni	dodatni	dodatni

Na podstawie wyników nadesłanych przez uczestników badań biegłości określono wartości parametrów dotyczących specyficzności, czułości i dokładności, które zawarto w tab. 3. Na podstawie analizy otrzymanych wyników badań z czterech laboratoriów ZHW stwierdzono, że uzyskane wartości były prawidłowe, a oznaczane cechy zostały określone na poziomie: dokładność – 100%, czułość – 100% i specyficzność – 100% zgodnie z danymi zawartymi w tab. 3.

Ponadto należy podkreślić, że wszyscy uczestnicy osiągnęli wymagane min. dziewięć kopii (wartości wahały się w zakresie od 10,09 do 11,28) w odniesieniu dla wartości cut-off w przypadku identyfikacji DNA przeżuwaczy. W przypadku kalibracji dla DNA białka wieprzowego uczestnicy nie spełnili wymaganego kryterium przynajmniej pięć kopii. Wartości te zawierały się bowiem w przedziale od 3,15 do 3,85. Natomiast w przypadku kalibracji dla DNA białka drobiowego w dwóch laboratoriach (oznaczone kodami 2 i 4) nie przeprowadzono reakcji z powodu opóźnienia realizacji zamówienia. Pozostałe dwa laboratoria (kod 1 i 3) osiągnęły wartości kryterium powyżej dziewięciu kopii, otrzymane wartości mieściły się w przedziale od 10,49 do 11,03. Należy podkreślić, że pomimo tego uczestnicy nie uzyskali

wyników fałszywie ujemnych w badaniach próbek podstawionych. Liczbę kopii i wartości cut-off, które uzyskano przez uczestników podczas kalibracji przedstawiono w tab. 4.

Podsumowując, biorąc pod uwagę przedstawione rezultaty i komentarze można stwierdzić, że wszystkie cztery laboratoria (100%) uczestniczące w badaniach biegłości uzyskały wyniki bardzo dobre (badane cechy osiągnięto na poziomie 100%) w zakresie wykrywania i identyfikacji DNA przeżuwaczy, DNA wieprzowego i DNA drobiowego w paszach. Wskazuje to na wysoki poziom kompetencji laboratoriów w tym zakresie oraz świadczy o bardzo wysokim poziomie umiejętności personelu wykonującego badania laboratoryjne, a w konsekwencji wskazują

Tabela 3. Parametry metody jakościowej, określone na podstawie otrzymanych wyników od uczestników badań biegłości oznaczonych kodami od 1 do 4

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

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

Kod	Liczba kopii dla cut-off			Cut-off			Wyniki fałszywe
	DNA białka przeżuwaczy	DNA białka wieprzowego	DNA białka drobiowego	DNA białka przeżuwaczy	DNA białka wieprzowego	DNA białka drobiowego	
1	10,09	3,28	11,03	36,74	38,45	35,92	nie stwierdzono
2	11,07	3,85	-	35,55	39,65	-	nie stwierdzono
3	11,28	3,55	10,49	35,85	41,18	39,94	nie stwierdzono
4	10,53	3,15	-	34,67	42,57	-	nie stwierdzono

na wiarygodność wyników wykonywanych laboratoryjnych badań urzędowych w zakresie wykrywania i identyfikacji gatunkowej PAP w paszach.

Piśmiennictwo

1. Decyzja Komisji 2001/9 oraz Decyzja Komisji 2001/165 w sprawie skażeń krzyżowych pasz dla bydła.
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego; Dz.U.L 300/1, 14.11.2009).
3. 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 (Dz.U.L 54/1, 26.02.2011 z późn. zm.).
4. 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).
5. Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/893 z dnia 24 maja 2017 r. zmieniające załączniki I i IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 oraz załączniki X, XIV i XV do rozporządzenia Komisji (UE) nr 142/2011 w odniesieniu do przepisów dotyczących przetworzonego białka zwierzęcego (Dz.U.L 138/92, 25.05.2017).
6. Rozporządzenie Komisji (UE) 2021/1372 z dn. 17 sierpnia 2021 r. zmieniające załącznik IV do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 w odniesieniu do zakazu karmienia zwierząt gospodarskich innych niż przeżuwacze, innych niż zwierzęta futerkowe, białkiem pochodzącym od zwierząt (Dz.U.L 295/1, 18.08.2021).
7. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001 z dnia 22 maja 2001 r. ustanawiające przepisy w zakresie zapobiegania, zwalczania oraz likwidacji pewnych zakaźnych encefalopatii gąbczastych (Dz.U.L 147, 31.05.2001 z późn. zm.).
8. 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 (Dz.U.L 173, 11.07.2003).
9. Weiner A., Kwiatek K., Paprocka I.: *Przewodnik wykrywania w paszach składników przetworzonego białka zwierzęcego i owadziego metodą mikroskopową*, Puławy 2021.
10. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (Dz.U.L 95/1, 07.04.2017).
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. Ustawa o Inspekcji Weterynaryjnej z 29 stycznia 2004 r. (Dz.U. z 2004 r. nr 33 poz. 287 z późn. zm.).
13. 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>).
14. EURL-AP Standard Operating Procedure Detection of pig DNA in feed using real-time PCR (<https://www.eurl.craw.eu/wp-content/uploads/2021/09/EURL-AP-SOP-Poultry-PCR-V1.0.pdf>).
15. EURL-AP Standard Operating Procedure Detection of poultry (chicken and turkey) DNA in feed using real-time PCR (<https://www.eurl.craw.eu/wp-content/uploads/2021/09/EURL-AP-SOP-Poultry-PCR-V1.0.pdf>).

Mgr Martyna Skowronek,

e-mail: Martyna.Skowronek-Syroka@piwet.pulawy.pl