

تشخيص الأنواع الحيوانية في عيّنات اللحوم المفرومة ومنتجاتها

باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

عبد الرؤف محمد الشوكاني¹، ذكرى محمد العززي² وعقيل شمس الدين المنوكل²

¹ كلية الطب البيطري - جامعة صنعاء

² المختبر المركزي البيطري - وزارة الزراعة والري - صنعاء

الملخص:

في هذه الدراسة تمّ الاستفادة من ثلاثة أزواج من البادئات لتشخيص لحوم المجترات (أبقار، أغنام، وماعز)، لحوم الدواجن، ولحوم الخنازير. صُمّمت هذه البادئات على أساس ترادف جينات 16S rRNA، 12S rRNA و 12S rRNA-tRNA الموجود ضمن جينات الميتوكوندريا للمجترات، الدواجن، والخنازير بالترتيب، بهدف تشخيص لحوم المجترات، لحوم الدواجن، ولحوم الخنازير في مخلوط اللحوم المصنّعة والدقة المحلية باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

تعطى هذه البادئات قطعاً طولها 104، 183، و290 نيوكليوتيد بالترتيب. أشارت النتائج إلى قدرة هذه البادئات على ازدياد القطع الثلاث بطول 104، 183، و290 نيوكليوتيد من الحمض النووي الميتوكوندري للمجترات، والدواجن والخنازير. كما أنّ هذه البادئات لم تعط أيّ تداخل فيما بينها بحيث أظهرت اختصاصية عالية لتشخيص كل الأنواع الحيوانية المختلفة الخاصة بها. كما لم يكن هناك تأثير للحرارة أو المعاملات الصناعية الأخرى التي تجرى على اللحوم المصنّعة على كفاءة هذا البادئات.

الكلمات المفتاحية: لحوم مفرومة، جينات الميتوكوندريا، بادئات، الغش، تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

Identification of Animal Species in Meat and Meat production Using Polymerase Chain Reaction Assay

Abdu-Alraof Al-shawkany¹, Dhekra Al-azaz², Aqel Al-motwakkel²

1.- College of veterinary medicine- Sana`a university, Yemen

2. Central Veterinary laboratory, Ministry of Agriculture and Irrigation, Yemen

Abstract:

In this study we used three primer pair based on mitochondrial 16s rRNA, 12S rRNA and 12S rRNA-tRNA Val genes after alignment of the available sequences in the GenBank database for detection of adulteration of ruminant, poultry and pig meat in admixed meat and meat products by polymerase chain reaction (PCR). The primer designed generated specific fragments of 104, 181 and 290 bp in length. Results were showed that Amplification of 104, 181 and 290 bp of DNA fragments were observed from ruminant, poultry and pig nucleic acid samples. Primer pairs had not any cross-reaction between other nucleic acid samples. PCR amplification was not influenced by heat treatment. Furthermore, the improved PCR assay was established to be specific for ruminant, poultry and pig could be a feasible tool for detection of meat adulteration.

Keywords: admixed meat, mitochondrial genes, primers, adulteration, PCR.

1- المقدمة:

في السنوات الأخيرة زادت أهمية الكشف عن أنواع أنسجة الحيوانات في الأغذية الحيوانية المصنعة بهدف حماية المستهلك من الغش الاقتصادي، المذهبي والصحي، حيث أشارت التقارير إلى أنّ معدل عدم التطابق بين الملصق والمنتج لمجموعة مختلفة من اللحوم شملت اللحوم المفرومة، النقانق واللحوم المجمدة في المكسيك، تركيا وجنوب أفريقيا بلغ حوالي 20% - 70% (Kane et al., 2016)، لهذا السبب يتم هذا الفحص في الاتحاد الأوروبي بهدف الحد من انتشار مرض جنون البقر (Ciupa et al., 2012)، في حين تزداد أهمية مثل هذه الفحوصات في الدول لكونها تعالج الجوانب الشرعية بسبب تحريم بعض لحوم الحيوانات من قبل بعض الديانات، مثل: الإسلامية واليهودية اللتين تحرمان لحوم الخنازير، بالإضافة إلى الجوانب الصحية المرتبطة بالحساسية لبعض اللحوم (Kane et al., 2016)، كما أنّ الجانب الاقتصادي بما يمثله خلط لحوم رخيصة الثمن بلحوم غالية الثمن (يونس، والسنجري، 2012م، Ni'mah et al., 2016). من أهم طرق الغش للحوم هو خلط اللحوم ببعضها وبيعها كلحوم نقية

في السنوات الأخيرة زادت أهمية الكشف عن أنواع أنسجة الحيوانات في الأغذية الحيوانية المصنعة بهدف حماية المستهلك من الغش الاقتصادي، المذهبي والصحي، حيث أشارت التقارير إلى أنّ معدل عدم التطابق بين الملصق والمنتج لمجموعة مختلفة من اللحوم شملت اللحوم المفرومة، النقانق واللحوم المجمدة في المكسيك، تركيا وجنوب أفريقيا بلغ حوالي 20% - 70% (Kane et al., 2016)، لهذا السبب يتم هذا الفحص في الاتحاد الأوروبي بهدف الحد من انتشار مرض جنون البقر (Ciupa et al., 2012)

وحساسية ويمكن استخدامها لفحص المنتجات الحيوانية التي تصنع بالحرارة (Momcilovic., 2005; Kim et al., 2000). هذا في حين أشار Bilge وآخرون (2016م) إلى إمكانية استخدام التحليل الطيفي لأشعة الليزر في التفريق بين الأنواع الحيوانية حيث استطاعوا التفريق بين لحوم الأبقار والخنازير والدواجن وبدقة عالية.

تعتبر طريقة التشخيص المعتمدة على الحمض النووي سواء الجينومي أو الميتوكوندري من أفضل الطرق المستخدمة في هذا المجال والتي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل الأحادية والمتعددة. كما أن تقنية الهضم الإنزيمي لمحصولات تفاعل البلمرة المتسلسل (RFLP) من التقنيات المستخدمة في هذا المجال بالإضافة إلى التقدير الكمي للحمض النووي (Real time PCR).

من أهم جينات الميتوكوندريا سيتوكروم b، الحمض النووي الريبوزومي إس 16 (S16 rRNA)، والحمض النووي الريبوزومي إس 12

(S12 rRNA)، (Ghovati et al., 2010;)، (Rahmawati et al., 2016).

غالبية الثمن مثل خلط لحوم الخيول، الخنازير، الكلاب والقطط مع اللحوم المستوردة أو في المجازر المحلية (Yosef, et al., 2014).

تستخدم طرق مختلفة للكشف عن نوع الأنسجة الحيوانية مثل الطريقة الميكروسكوبية التي يتم من خلالها فحص أجزاء من عظام الحيوانات بالرغم من أن هذه الطريقة تحتاج إلى وقت كبير، وكادر مدرب ومتخصص بالإضافة إلى عدم القدرة على فحص اللحوم التي لا تحتوي على عظام إلا أنها تعتبر الطريقة المعترف بها في الاتحاد الأوروبي للتحكم بمرض جنون البقر (Dalmasso et al., 2004).

الطريقة البروتينية تعتمد على وجود الإنزيمات والأجسام المضادة، مثل الترحيل الكهربائي على هلام الإكريل أميد ثنائي البعد (SDS PAGE)، طريقة التعادل الكهربائي (IEF)، الأليزا، و HPLC. ويعاب على هذه الطريقة ارتباطها بنوعية وسلامة الأنسجة؛ حيث لا يمكن استخدامها في الأنسجة المتحللة أو التالفة، وكذا الأنسجة التي تمت عليها المعاملات الحرارية والتصنيعية المختلفة والتي تؤدي إلى تلف الإنزيمات، وبالتالي القدرة على التشخيص. لذا كان من الضروري إيجاد طريقة بديلة وسريعة

2- مواد وطرق العمل

2-1. تصميم المبادئ:

تم استخدام البادئات التي ذكرها Dalmasso وآخرون (2004م)، وذلك بعد الرجوع إلى مركز معلومات البيوتكنولوجي العالمي (NCBI)، ومقارنة الترادفات للبادئات عن جينات الميتوكوندريا 16s rRNA، 12S rRNA و 12S rRNA Val باستخدام تقييم البادئات باستخدام برنامج 5 Primer Primer. ثم تم تصنيع البادئات لدى شركة بايونير الكورية.

2-2. جمع العينات:

تم جمع 25 جم من النسيج العضلي خال من الشحوم والأنسجة الرابطة للحم المجترات، الدواجن من عدد من المجازر وعينة الخنازير أخذت من إحدى السفارات الأجنبية؛ وذلك بهدف التقييم الأولي للبادئات ومدى قدرتها على تشخيص اللحوم والتي استخدمت كنترول موجب. بالإضافة إلى 25 عينة للحوم المفرومة المستوردة جُمعت من السوق المحلية في أمانة العاصمة والموضحة في الجدول (1)، حيث تم وضع العينات في كيس بلاستيكي تم كتابة اسم العينة، نوع الحيوان الذي أُخذت منه العينة

استخدمت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في تشخيص أنواع الأنسجة الحيوانية في المنتجات الحيوانية المصنعة، حيث استطاع Lahiff وآخرون (2001م) من تشخيص وجود الحمض النووي للأغنام والماعز، الخنازير والدواجن في منتجات المنتجات الحيوانية المصنعة، كما تمكن Myers وآخرون (2003م) من تشخيص الأنواع الحيوانية الموجودة في الأغذية الحيوانية باستخدام بادئات عمومية لكل الأنواع مع التفريق بينها بالهضم الإنزيمي. إضافة إلى ذلك في العام 2003م صمم Bottero وآخرون بادئات أو بريميرات يمكن استخدامها بشكل مختلط بما يسمى به (multiplex PCR)، حيث يتيح هذا النوع من تفاعل البلمرة المتسلسل الاستفادة من الوقت بحيث يتم اختبار كل الأنواع الحيوانية في تفاعل واحد. ولأهمية موضوع الغش للحوم هدفت هذه الدراسة إلى استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المعتمدة على جينات الميتوكوندريا لتشخيص وجود لحوم المجترات، الدواجن والخنازير في اللحوم المفرومة والمنتجات الحيوانية المصنعة المعروضة في السوق المحلية.

بالنسبة لعينات الكنترول، اسم الشركة المُصنَّعة وتاريخ الجمع، وتم إغلاق الكيس البلاستيكي بشكل جيّد، ونُقلت إلى المختبر تحت التبريد
لحفظها في الفريزر على درجة (-20م) لحين إجراء عمليّة استخلاص الـ DNA.
الجدول (1): بيّن عدد العينات المستخدمة في الدراسة وأنواعها.

نوع اللحم	العدد
نقانق دجاج	2
مورتدلا دجاج	3
مورتدلا دجاج	2
دجاج حبش	1
دجاج مدخن	1
مورتدلا لحم	6
مورتدلا لحم	2
دقة بقري محليّ مصنع	3
دقة غنمي خارجي	1
دقة غنمي خارجي	1
كباب بقري محلي	1
مورتدلا سادة	1
لحم أبقار مدخن	1

محصول استخلاص الحمض النووي في هلام الأجاروز 1%، ثم قراءة النتائج باستخدام جهاز Gel documentation.

2-4. تفاعل البلمرة المتسلسل:

تمّ إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام محاليل شركة بايونير الكورية والتي تحتوي الأنبوبة على كل المواد اللازمة للتفاعل بحالة مجفدة ليتم إضافة 1 ميكروليتر من البادئات و 1 ميكروليتر

2-3. استخلاص الحمض النووي:

تم تقطيع كلّ عيّنة من العينات إلى قطع صغيرة، وهرسها وخلطها جيّدًا، ثم أخذت كمية 25 ملجم من كل عيّنة لاستخلاص الـ DNA منها اعتماداً على النشرة الداخليّة لمحاليل الاستخلاص (Extraction Kit) المنتجة بواسطة شركة بايونير Bioneer الكورية. تم التأكد من نجاح استخلاص الحمض النووي بترحيل مقدار من

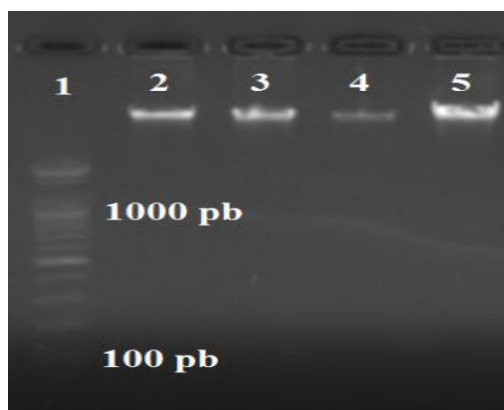
المصبوغ بصبغة الـ SYBR Safe المُصنَّع من قبل شركة سيناجين الإيرانية، ثم قراءة النتائج عن طريق جهاز Gel documentation بتقدير الأحجام الجزيئية لقطع الـ DNA المتضاعفة بمقارنتها مع حزم الجزيئية للدليل الحجمي DNA Marker.

3- النتائج

3-1. استخلاص الحمض النووي:

من الشكل 3-1 يتضح أنّ استخلاص الحمض النووي تم بنجاح وأنه على درجة عالية من النقاوة والتركيز ولم يشاهد وجود أسمير. وهذا يدل على عدم تكسر الحمض النووي خلال مرحلة الاستخلاص.

من الـ DNA، وإكمال حجم التفاعل بالماء المقطر ليصل حجم التفاعل النهائي إلى 20 ميكروليترا. تم وضع أنابيب التفاعل في جهاز Thermocycler، وتم برمجة الجهاز على البرنامج الآتي: مرحلة التسخين الأولية: 94 درجة مئوية لمدة 10 دقائق لدورة واحدة، مرحلة التسخين الثانية 94 درجة لمدة 45 ثانية، مرحلة الاتصال 58 درجة مئوية لمدة 45 ثانية، مرحلة التضخيم أو البناء 72 درجة مئوية لمدة 45 ثانية لخمس وثلاثين دورة، وفي النهاية مرحلة التضخيم النهائي 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق لدورة واحدة. تم التأكد من نجاح تفاعل البلمرة المتسلسل عن طريق ترحيل مقدار من محصول تفاعل البلمرة المتسلسل في جل الأجاروز 1%.



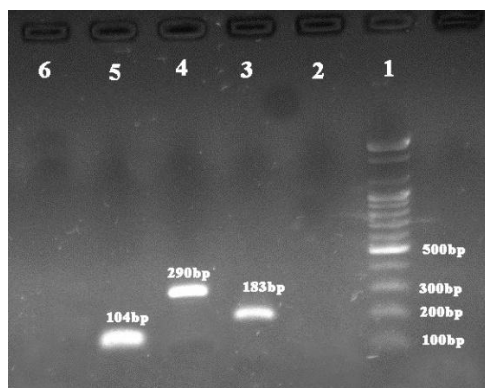
الشكل 3-1: نتائج استخلاص الـ DNA حيث تبين الأعمدة: 1 ماركر وزني 100pb، 2: DNA الأبقار، 3: DNA الأغنام، 4: DNA الخنازير، 5: DNA الدواجن.

3-2. تفاعل البلمرة المتسلسل:

من خلال الشكل 3-2 يتضح أنّ تفاعل البلمرة المتسلسل قد تمّ بنجاح، وأنّ طول الحزم التي تمّ تكثيرها هي 181 زوج نيوكليوتيد الخاصة بالدواجن، و290 زوج نيوكليوتيد الخاصة بالخنازير، و104 زوج نيوكليوتيد الخاصة بالأبقار هي القطع التي صُممت من أجلها البادئات. كما يلاحظ من خلال الشكل 3-3 عدم

وجود أي تفاعل بين بادئات المجترات، الدواجن والخنازير. وهذا يدل على اختصاصية هذه البادئات في تشخيص هذه الأنواع الحيوانية عن بعضها، كما أنه دليل على إمكانية الاستفادة من جينات الميتوكوندريا في عمليات التفريق بين الأنواع الحيوانية

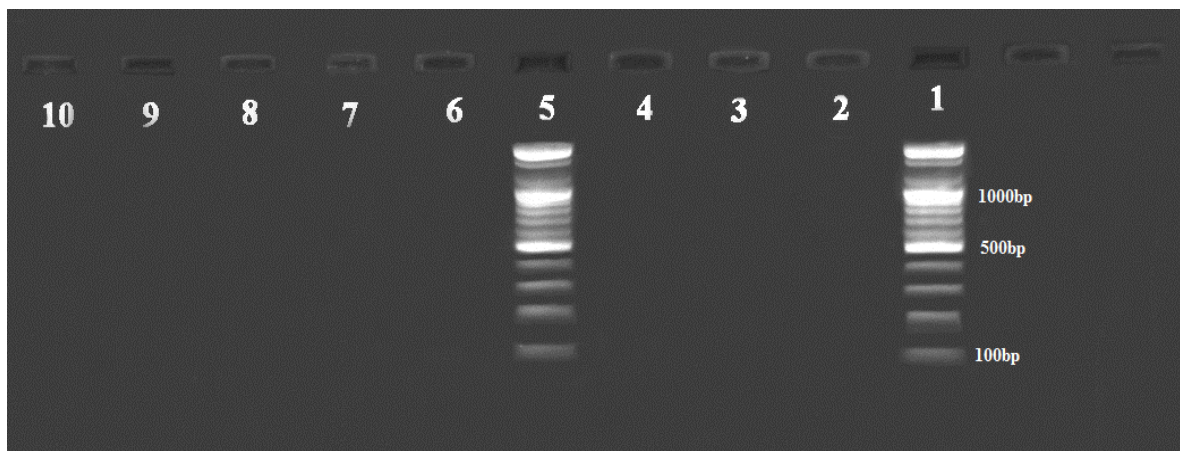
(Myers et al., Guha et al., 2006) (2001).



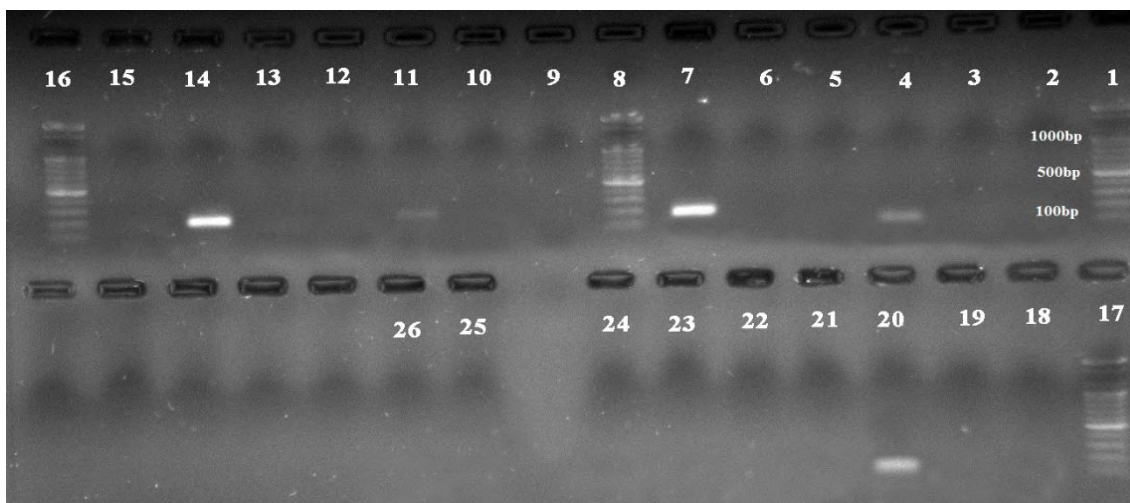
الشكل 3-2: نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، حيث يمثل العمود 1 وماركر وزني 100pb، 2 و6: كترول سالب، 3: الحزمة الخاصة بالدواجن، 4: الحزمة الخاصة بالخنازير، 6: الحزمة الخاصة بالدواجن بالمجترات (الأبقار).

العينات يمكن مشاهدتها في الشكل 4-3، حيث يلاحظ ظهور الحزم الخاصة ببادئ الدواجن 183 زوج نيوكليوتيد في الأعمدة (7)، 11، و(14)، وبادئ المجترات 104 زوج نيوكليوتيد في الأعمدة (4 و20). حيث يمكن القول إن هذه العينات لم تكن مطابقة للملصق المكتوب عليها.

وفيما يخصّ عينات اللحوم المفرومة يتضح من الجدول (2) أنّ ثلاث عينات من لحوم الدواجن المفرومة وبنسبة 33% كانت مخلوطة بلحوم الأبقار، فيما كانت هناك 4 عينات من لحوم المجترات 25% ملوثة بلحوم الدواجن، فيما لم يلاحظ أي تلوث بلحوم الخنازير. بعض هذه



الشكل 3-3: نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR: يبيّن التفاعل بين البادئات، حيث يبين العمود 1، و5 ماركر 100، العمود 2 و3 بادئ الأبقار مع DNA الخنازير والدواجن بالترتيب، العمود 4 و6 كنترول سالب، العمود 7 و8 بادئ



الخلازير مع DNA الأبقار والدواجن بالترتيب، والأعمدة 9 و10 بادئ الدواجن مع DNA الأبقار والخنازير.

الشكل 3-4: يبيّن الماركر في الأعمدة (16، 8، 1، و17)، الأعمدة (7، 11، و14) الحزم الخاصة ببداي الدواجن 183 زوج نيوكليوتيد، الأعمدة (4 و20) الحزم الخاصة ببداي المجترات 104 زوج نيوكليوتيد، الأعمدة 25 و26 كنترول سالب، والأعمدة الأخرى العيّنات غير الملوثة.

الجدول (2): يبين عدد العينات وأنواعها ونتائج تفاعل البلمره المتسلسل PCR بالبادانات الخاصه بالمجترات، الخنازير والدواجن.

نوع اللحم	العدد	اللحم المفترض	مجترات	خنازير	دواجن
نقانق دجاج	2	دواجن	-	-	+
مورتدلا دجاج	3	دواجن	-	-	+
مورتدلا دجاج	2	دواجن	+	-	+
دجاج حبش	1	دواجن	-	-	+
دجاج مدخن	1	دواجن	+	-	+
مورتدلا لحم	6	مجترات	+	-	-
مورتدلا لحم	2	مجترات	+	-	+
دقة بقرى محلي مصنع	3	مجترات	+	-	-
دقة غنمي خارجي	1	مجترات	+	-	+
دقة غنمي خارجي	1	مجترات	+	-	-
كباب بقرى محلي	1	مجترات	+	-	-
مورتدلا سادة	1	أبقار ودواجن	+	-	+
لحم أبقار مدخن	1	مجترات	+	-	+

4- المناقشة:

إنّ عملية الفحص لنوع اللحوم يجب أن تكون وفق طرق سريعة ودقيقة وروثينية في معامل ضبط الجودة لضمان سلامة الأغذية على مستوى العالم (Unajak et al., 2011).

قد تُبرّر عمليّة غش اللحوم بأنها الوسيلة الوحيدة لخفض أسعار اللحوم، ولكن يجب توضيح تأثيرها على صحة وسلامة المجتمع (Yosef, et al., 2014).

يعتبر غشّ اللحوم من المشاكل العالمية المهمة، والتي تنتهك قوانين المصنّعات الخاصة بالمنتجات الغذائية، كما يعد احتيالا اقتصاديا، دينيا وأخلاقيا، بالإضافة إلى ارتباطه بصحة وسلامة الأغذية والمجتمع.

إنّ عملية فحص اللحوم ومدى مطابقتها المنتج مع المصنق الخاص به يُعدّ أمراً ضرورياً ومهماً في سبيل حماية المستهلك وصحته العامّة من الغش والتدليس (Yosef, et al., 2014).

إلى أنّ هذه البادئات مناسبة لتشخيص الغشّ في اللحوم المفرومة ومنتجات اللحوم المصنعة، إلى ذلك استخدم Che Man وآخرون (2007م) بادئات خاصة على جينات الميتوكوندريا لتشخيص تلوّث اللحوم المصنعة بلحوم الخنازير، وبين أنّ حجم القطع الناتجة يعتمد على تصميم ومواقع بادئات الذهاب Forward والإياب Revers على الجين الهدف. كما أنّ (Ni'mah) وآخرين (2016م) أشاروا إلى إمكانية الكشف عن لحوم الخنازير في مخلوط لحوم الأبقار الطازجة والمطهية المعروضة في الأسواق الماليزية باستخدام تقنية البلمرة المتسلسل مع بادئات على جين السيتوكروم b. إلا أنّ النتائج المتحصّل عليها والتي تمثلت بوجود تلوّث أو خلط للحوم الدواجن بلحوم المجترات، بالرغم من أنها لحوم صالحة للاستهلاك البشري في بعض عيّينات الدراسة، جدير بالاهتمام بهذا الموضوع، وبدء التفكير في اعتماد طرق علمية أكثر دقة في الكشف عن الغشّ لحماية المستهلك وخاصة في المناطق والدول التي تعاني من ضعف الرقابة والذي قد يكون ناشئاً عن عدم الاستقرار في هذه المناطق والذي ينعكس بدوره على المستهلك وصحته.

هناك العديد من التقنيات المستخدمة في الكشف عن غش اللحوم ولكل منها عيوب ومزايا، حيث تعد تقنية الاستفاد من الأحماض النووية DNA من أهم وأفضل الطرق المستخدمة في التشخيص. إنّ مقدار الـ DNA الذي تمّ استخلاصه من 25 ملجم من الأنسجة الحيوانية المستخدمة في هذه الدراسة كان كافياً لمعرفة وتشخيص الغش بواسطة استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل.

في هذه الدراسة تم استخدام البادئات الخاصة بالمجترات، الدواجن والخنازير والمصنّمة على المواقع الجينيّة 12S rRNA، 16S rRNA و 12S rRNA-tRNA Val لجينوم الميتوكوندريا لهذه الحيوانات بالترتيب، حيث تم الحصول على الحزم 104 للمجترات، و 181 الدواجن، و 290 زوجاً قاعدياً للخنازير، وهي القطع أو الحزم التي صمّمت من أجلها البادئات. وهذا يدلّ على أنّ البادئات صمّمت بشكل صحيح بحيث لم يكن لها سوى موقع جيني وحيد وليس لها أي تشابه مع مواقع جينيّة أخرى على DNA نفس الحيوان أو الحيوانات الأخرى بمعنى لا يوجد تداخل بين البادئات بين الأنواع الحيوانية، حيث تطابقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Dalmasso وآخرون (2004م) حيث أشاروا

5- الاستنتاجات والتوصيات

شكر وتقدير

الشكر والتقدير إلى إدارة المختبر المركزي البيطري صنعاء وكادره الفني والإداري لإتاحة الفرصة والإمكانات لإجراء هذا البحث.

المراجع:

يونس، إسراء، والسنجري، رعد (2012م). "تطبيق تقنية البلمرة المتسلسل للنوع المتخصص المعتمدة على جين السايوتوكروم ب. للتحقق من لحوم الأبقار". المجلة العراقية للعلوم البيطرية، 26 (3): 193-196.

Bilge, G., Velioglu, H.M., Sezer, B., Eseller, K. E. & Boyaci, I. H. (2016). "Identification of meat species by using laser-induced breakdown spectroscopy". *Mea Science*, 119: 118-122.

Bottero, M. T. A., Dalmaso, M. Cappelletti, C. Secchi, and T. Civera. (2007). "Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay". *J. Biotechnology*. 129: 575-580.

Che Man, Y. B., A. A. Aida, A. R. Raha, and R. Son. (2007). "Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification". *J. Food Control*. 18 (7): 885-889.

Ciupa, A., M. Mihaiu, S. D. Dan, A. Lapuşan, C. Jecan, and I. Cordiş. (2012). "Using PCR Techniques for Rapid Detection of Animal Species in Meat Products". *Veterinary Medicine* 69: 1-2.

نظراً لتطابق النتائج مع الفرضيات المطروحة والمعلومة سابقاً حول مواقع البادئات وأطوال الحزم التي تنتج من استخدامها في تفاعل البلمرة المتسلسل نستنتج وبما لا يدع مجالاً للشك أنّ استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل والمبني على جينات الميتوكوندريا مناسبة ودقيقة في تشخيص الغش بلحوم المجترات، الدواجن والخنازير في اللحوم المفرومة ومنتجاتها المصنعة، ونظراً لعدم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والمبنية من الناحية العلمية على علوم الوراثة الجزيئية في الكشف عن الغش في اللحوم ومنتجاتها، ولكون هذا البحث هو الأول على مستوى اليمن في استخدام هذه التقنية لهذا الغرض، فإننا نوصي بالسعي الحثيث إلى إدخال هذه التقنية إلى المعامل والمختبرات الخاصة بالجهات الحكومية المناط بها متابعة وفحص اللحوم ومنتجاتها لما فيها من أهمية في خدمة المجتمع والحفاظ على سلامته.

a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed”. *J. Food Prot.* 66:1085–1089.

Myers, M. J., S. L. Friedmann, D. E. Farrell, D. A. Dove-Pettit, M. F. Bucker, S. Kelly. (2001). “Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuffs”. *Journal of Food Prot.* 64: 564–566.

Ni'mah, A., Y. Kartikasari, A. D. Pratama, L. R. Kartikasari, B. S. Hertanto and M. Cahyadi. (2016). “Detection of pork contamination in fresh and cooked beef using genetic marker mitochondrial-DNAcytochrome b by duplex-PCR”. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 41 (1):7-12.

Rahmawati, Sisindari, Raharjo, T.J., Sudjadi and Rohman, A. (2016). “Analysis of pork contamination in Abon using mitochondrial D-Loop 22 primers using real time polymerase chain reaction method”. *International Food Research Journal*, 23 (1): 370-374.

Unajak, S., Meesawat, P., Anyamaneeratch, K., Anuwareepong, D., Srikulnath, K., Choowongkomon, K. (2011). “Identification of species (meat and blood samples) using nested-PCR analysis of mitochondrial DNA”. *Afr J Biotechnol.* 10, (29): 5670-5676.

Yosef, T. A., Al- Julaifi, M. Z. and AL-Rizqi A. M. (2014). “Food Forensics: Using DNA-Based Technology for the Detection of Animal Species in Meat Products”. *Nature and Science*, 12: (6) (29): 5670-5676.

Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatti, T. Civera, S. Rosati, and M. Bottero. (2004). “A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs”. *Mol. Cell. Probes.* 18: 81-87.

Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S.Z., Heravi Moussavi, A., Javadmanesh A. (2010). “Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay”. *Food Control* 20: 696–699.

Guha, S., S. P. Goyal and V. K. Kashyap. (2006). “Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochrome b (MT-CYB) and 16Sr RNA (MTRNR2) genes: characterization of eight endangered Pecoran species”. *J. Animal Genetics*, 37: 262–265.

Kane, Dawn E. and Rosalee S. Hellberg. (2016). “Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA based methods”. *Food Control* 59: 158-163.

Kim, S. H., T. S. Huang, T. A. Seymour, C. I. Wei, S. C. Kempf, C. R. Brigman. (2005). “Development of immunoassay for detection of meat and bone meal in animal feed”. *J. Food Protection.* 68: 1860–1865.

Lahiff, S., M. Glennon, L. O'Brien, J. Lyng, T. Smith, M. Maher, and N. Shilton. (2001). “Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM)”. *J. Mol Cell Probes.* 15: 27–35.

Momcilovic, D., A. Rasooly. (2000). “Detection and analysis of animal materials in food and feed”. *J Food Prot.* 63:1602–1609.

Myers, M. J., H. F. Yancy, D. E. Farrell. (2003). “Research note: characterization of