



ORIGINAL ARTICLE

Received:2018/05/31

Accepted:2019/01/24

**Evaluation of the Histological Method in Quantitative Detection of Unauthorized Tissues (chicken skin and bone) in Reconstructed Kabab Loghme and Kielbasa**

**Javad Sadeghinezhad (P.hD.)<sup>1</sup>, Hassan Morowati (P.hD.)<sup>2</sup>, Zohreh Kavyani Yekta (M.Sc.)<sup>3</sup>, Kamand Fattahi (M.Sc.)<sup>4</sup>, Bahador Hajimohammadi (P.hD.)<sup>5</sup>, Afshin Akhondzadeh Basti (P.hD.)<sup>6</sup>, Raziye Barzegar Bafrouie(P.hD.)<sup>7</sup>**

1.Associated Professor, Department of Basic Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

2.Professor, Department of Basic Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

3.Corresponding Author: M.Sc. Student in Food Hygiene and safety, International campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

4.M.Sc. Student in Food Hygiene and safety, International campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

5.Assistant Professor, Department Food Hygiene and Safety, Research Center for Food Hygiene and Safety, School of Puhealth ,Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

6.Professor, Department of Food Hygiene and Control, University of Tehran, Tehran, Iran.

7.M.Sc. Student in Food Hygiene and safety, Public of Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

**Abstract**

**Introduction:** Nowadays, consumption of meat and meat products have increased throughout the world. Regarding the economic values of meat, unauthorized tissues can be used in producing meat products. This study was conducted to detect unauthorized tissues in raw and processed meat products.

**Methods:** Samples of Kabab loghme (70% meat) and kielbasa (30% and 90 % meat), each containing 5, 10, 15, and 20% of chicken skin and bone were prepared. Then, each sample was divided into three parts. One piece was taken from each part and fixed in 10% neutral-buffered formalin. The samples were routinely processed for light microscopy and embedded in paraffin. The paraffin-embedded blocks were cut into 6 µm sections and stained using hematoxylin and eosin (H&E) for histological study.

**Results:** The histological examination revealed the chicken skin and bone tissues clearly in all the samples. The histometrical analysis indicated that the estimated percentages of the additive bone, especially in kabab loghme, were not significantly different from the real percentages. However, the skin tissue was difficult to estimate, especially in Kielbasa.

**Conclusion:** The findings of the present research suggest the histological technique as an effective method for quantitative evaluations of raw and processed meat products. However, the quantitative evaluation of additive tissues in raw meat products was more convenience than the processed products. In addition, estimation of bone additive was more applicable in comparison with skin tissue due to its resistance to histological processing preparations.

**Keywords:** Histology, Kabab loghme, Kielbasa, Adulteration, Skin, Bone

**Conflict of interest:** The authors declared that there is no Conflict interest.



**This Paper Should be Cited as:**

Author: Sadeghinezhad J, Hassan Morovvati, Zohreh Kavyani Yekta, Kamand Fattahi, Bahador Hajimohammadi, Afshin Akhondzadeh Basti, Raziye Barzegar Bafrouie. Evaluation of the Histological Method for the quantitative Detection of Unauthorized Tissues.....Tolooebehdasht Journal.2019;18(2):57-69.[Persian]



## ارزیابی آزمون بافت شناسی در تشخیص کمی بافت های غیر مجاز (پوست و استخوان

### مرغ) در فرآورده های کالباس و کباب لقمه باز ساخته

نویسندگان: جواد صادقی نژاد<sup>۱</sup>، حسن مروتی<sup>۲</sup>، زهره کاویانی یکتا<sup>۳</sup>، کمند فتحی<sup>۴</sup>، بهادر حاجی محمدی<sup>۵</sup>، افشین آخوندزاده بستی<sup>۶</sup>، رضیه برزگر بفرویی<sup>۷</sup>

۱. دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران.

۲. استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران.

۳. نویسنده مسئول: دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران. تلفن تماس: ۰۹۱۲۱۶۹۲۶۶۷ Email: zohrehzohari333@gmail.com

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، پردیس بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.

۵. استادیار مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.

۶. استاد گروه کنترل و بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران.

۷. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.

### چکیده

**مقدمه:** امروزه استفاده از گوشت و محصولات گوشتی در اکثر کشورها در حال افزایش است. با توجه به ارزش اقتصادی گوشت استفاده از بافت های غیرمجاز در فرآورده های گوشتی محتمل است. بنابراین این مطالعه به منظور تشخیص کمی بافت های غیرمجاز در فرآورده های گوشتی خام و حرارت دیده طراحی شده است.

**روش بررسی:** نمونه های کباب لقمه (حاوی ۷۰ درصد گوشت) و کالباس (حاوی ۳۰ و ۹۰ درصد گوشت) که هر کدام دارای بافت های پوست و استخوان مرغ به میزان ۱۰، ۵، ۱۵ و ۲۰ درصد بوده اند تهیه شده اند. سپس هر نمونه به سه قسمت تقسیم و از هر قسمت یک قطعه اخذ و جهت ثبوت در فرمالین ده درصد بافر خنثی قرار داده شد. نمونه ها برای مطالعه میکروسکوپ نوری با روش های معمول بافتی آماده سازی شده و در پارافین قالب گیری شده و مقاطع ۶ میکرومتری تهیه و با استفاده از هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد.

**یافته ها:** بررسی بافت شناسی نشان داد که بافت های پوست و استخوان مرغ بطور واضح در همه نمونه ها قابل تشخیص بوده است. مطالعه هیستومتری مشخص کرد که درصد های تعیین شده استخوان اضافی در کباب لقمه دارای اختلاف معنی داری با درصد های واقعی مربوطه نبوده است. از طرف دیگر تعیین کمی بافت پوست خصوصاً در کالباس مشکل بوده است.

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان می دهد که تکنیک بافت شناسی به عنوان یک روش موثر برای ارزیابی کمی محصولات گوشتی خام و حرارت دیده است. با این حال ارزیابی کمی بافت های افزودنی در فرآورده های خام راحت تر از فرآورده های حرارت دیده گوشتی بوده است. علاوه بر آن تخمین کمی استخوان هم در مقایسه بافت پوستی به دلیل مقاومت آن نسبت به مراحل آماده سازی بافتی بیشتر امکان پذیر بوده است.

**واژه های کلیدی:** بافت شناسی، کباب لقمه، کالباس، پوست، استخوان

این مقاله برگرفته از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد می باشد.

## طلوع بهداشت

دو ماهنامه علمی پژوهشی

دانشکده بهداشت یزد

سال هیجدهم

شماره دوم

خرداد و تیر ۱۳۹۸

شماره مسلسل: ۷۴

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۰۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۴



## مقدمه

گوشت غنی از ویتامین ها، مواد معدنی نظیر آهن، روی و پروتئین است و بعنوان منبع مهم تغذیه ای محسوب می شود (۱،۲). فرآورده های گوشتی، فرآورده هایی هستند که حداقل نیمی از آن ها را گوشت تشکیل داده باشد (۳). و طی فرآوری گوشت، مواد افزودنی جهت ماندگاری، رنگ و مزه به آن اضافه می شود (۴). با توجه به ارزش ریالی گوشت، احتمال استفاده از بافت های غیرمجاز در فرآورده ای گوشتی امکان پذیر است و تحقیقات متعددی در این زمینه صورت گرفته است (۵-۹). مشکلات تقلب در محصولات گوشتی شامل جایگزینی گوشت با گوشت سایر گونه های حیوانی، پروتئین های گیاهی، ترکیبات ارگانیک و هم چنین چربی های گیاهی بجای چربی های حیوانی می باشد (۱۰). بافت های غیرمجاز حیوانی حاوی پروتئین هایی با ارزش تغذیه ای پائین هستند و در مقایسه با عضلات دارای بار میکروبی بالاتر بوده و حتی در انتقال عوامل عفونی نظیر سالمونلا و اشرشیاکلی می توانند نقش داشته باشند. مصرف بعضی از آنها از نظر دین مبین اسلام حرام بوده و یا دارای کراهت شرعی است (۱۱).

روش های مختلفی نظیر الکتروفورز، کروماتوگرافی و آزمون هایی برپایه DNA برای شناسایی انواع گونه های حیوانی موجود در محصولات گوشتی استفاده شده است (۱۶-۱۲). ارزیابی محتوای کلاژن با استفاده از تکنیک های اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی هم بعنوان روش مهم تشخیص بافتی در محصولات گوشتی محسوب می شود (۱۷). بافت شناسی علم مطالعه ساختارهای میکروسکوپی بافت ها می باشد. از دیدگاه بافت شناسی گوشت از رشته عضلانی

اسکلتی، بافت چربی، بافت های هم بندی و سایر ساختارها تشکیل شده است (۱۸). روش بافت شناسی قادر به شناسایی مستقیم و تفریق اجزاء تشکیل دهنده فرآورده های گوشتی است که ارزیابی کمی را هم در فرآورده های گوشتی فراهم می کند (۱۹،۲۰). بر اساس شواهد مبتنی بر استفاده اندام های غیر مجاز مرغ در قالب خمیر مرغ در تهیه فرآورده های گوشتی، بکارگیری و طراحی روش دقیق بافت شناسی برای شناسایی بافت های غیرمجاز در محصولات گوشتی خام و حرارت دیده ضروری است. تاکنون هیچ گونه تحقیقی بر روی کارایی این روش در تشخیص مقادیر و کمیت استخوان و پوست مرغ افزوده شده در فرآورده های گوشتی کالباس و کباب لقمه انجام نشده است. لذا در این تحقیق کارایی آزمون بافت شناسی در تشخیص کیفی و کمی تقلب اختلاط استخوان و پوست مرغ بعنوان معیارهای مهم در استفاده از اندام های غیرمجاز مرغ در فرآورده های گوشتی خام و حرارت دیده مورد مطالعه قرار گرفت.

## روش بررسی

تهیه فرآورده های بازساخته گوشتی کالباس و کباب لقمه: برای تهیه کالباس باز ساخته به این شکل عمل شد که گوشت، سیر، پیاز، نمک، نیتريت، فسفات، روغن، تخم مرغ، آرد، نشاسته، گلوتن، ایزوله نشاسته، شیر خشک، کازینات، اسید اسکوربیک در طی مراحل مشخص و در هر مرحله با توجه به قوام مورد نظر وارد دستگاه کاتر شدند. با توجه به حرکت سریع کاتر و ایجاد گرما در محصول برای خنک نگه داشتن فارش کالباس، یخ در سه مرحله به کاتر اضافه شد. برای تهیه یک کیلوگرم کالباس که حاوی ۳۰ درصد گوشت است باید ۳۰۰ گرم گوشت در نظر



مجاز و در هر محصول به ترتیب ۶۳۰، ۶۶۵، ۵۹۵، ۵۶۰ گرم گوشت در نظر گرفته می شد. این مقادیر بعد از توزین باهم مخلوط شده وارد قالب های مخصوص شده و سپس آماده نمونه برداری گردید.

آزمون بافت شناسی: هر کدام از درصدهای نمونه های بازساخته به سه برش مساوی تقسیم و از هر کدام از برش ها نیز یک قطعه یک سانتیمتر مکعبی انتخاب شد و برای انجام عملیات تثبیت بافت، در داخل توری های پارچه ای ظریف قرار داده شد و در فرمالین ۱۰٪ بافر (pH= ۷/۱-۷/۳) غوطه ور شدند. پس از تثبیت کامل، آنگیری، شفافیت و آغشتگی با پارافین انجام شده و با استفاده از میکروتوم، برش هایی به ضخامت ۶ میکرومتر از هر قالب نمونه آماده گردید و پس از آن رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) صورت گرفت. نهایتاً لام ها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. گسترش های بافتی از لحاظ وجود انواع بافت های غیرمجاز از پیش تعیین شده به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین مورد ارزیابی قرار گرفته و تصاویر لازم اخذ و به کمک نرم افزار فتوشاپ CS (Adobe system, San Joze, CA, USA) پردازش شدند. علاوه بر آن به کمک نرم افزار Axiovision (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)، مساحت سطح بافت های غیرمجاز به کل بافت در شان های مختلف گسترش بافتی محاسبه شد.

آزمون آماری: نسبت مساحت سطح بافت های افزوده شده به مساحت سطح کل میدان های دید میکروسکوپی بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شد. آزمون T-test برای تعیین اختلاف معنی دار بین درصدهای محاسبه شده و واقعی استفاده

گرفته شود که با توجه به اینکه حجم کاتر در واحد تحقیقاتی کارخانه ۵ کیلوگرم می باشد این مقدار گوشت ۱۵۰۰ گرم در نظر گرفته شد. برای اینکه ۵ درصد از گوشت مورد نظر در محصول، بافت غیر مجاز پوست و استخوان مرغ به شکل جدا باشد، مقدار ۱۵ گرم از گوشت را به وجود این بافت ها اختصاص داده که در حجم ۵ کیلوگرم محصول ۷۵ گرم بافت محاسبه شد و برای مقادیر ۲۰، ۱۵، ۱۰ درصد به ترتیب ۳۰۰، ۲۲۵، ۱۵۰ گرم بافت غیر مجاز تهیه شد. برای محاسبه مقدار گوشت مورد نیاز در محصولات مقدار ۱۵۰۰ گرم گوشت از مقدار ۷۵ گرم بافت غیر مجاز کسر شده و ۱۴۲۵ گرم گوشت در نظر گرفته شد. مقدار گوشت مصرفی برای مقادیر ۲۰، ۱۰، ۱۵ درصد بافت غیر مجاز به ترتیب ۴۷۰۰، ۴۷۷۵، ۴۸۵۰ گرم گوشت محاسبه شد. در محصولات ۹۰ درصد گوشت و در حجم ۵ کیلو و مقادیر ۲۰، ۱۰، ۱۵، ۵ درصد از بافت غیر مجاز به ترتیب ۱۲۵، ۱۸۰، ۹۰، ۴۵ و گرم بافت پوست و استخوان مرغ به شکل جدا و مقادیر ۳۸۲۵، ۴۰۵۰، ۴۲۷۵ و ۳۶۰۰ گرم گوشت در نظر گرفته شد. بعد از توزین مواد متشکله محصول و اضافه نمودن آنها به دستگاه کاتر کالباس ۹۰ و ۳۰ درصد گوشت با مقادیر ذکر شده از بافت پوست و استخوان به شکل جداگانه تهیه و پخت گردید. کباب لقمه طبق تعریف استاندارد ملی ایران باید حاوی ۷۰ درصد گوشت باشد. تخم مرغ، مواد پرکننده و اتصال دهنده، نمک طعام، ادویه ها، پیاز و سیر و روغن خوراکی از دیگر مواد تشکیل دهنده آن است. برای تهیه کباب لقمه در حجم ۱ کیلوگرم ۷۰۰ گرم گوشت مورد نیاز است که برای مقادیر ۵، ۱۰، ۲۰، ۱۵ و درصد بافت غیر مجاز پوست و استخوان مرغ باید به ترتیب ۱۴۰، ۱۰۵، ۳۵، ۷۰ و گرم بافت غیر



محدوده  $16/15 \pm 9/22$  متغیر هستند. میزان پوست در تمامی بافت های ترکیب شده (بجز بافت ترکیب شده ۵ درصد)، تفاوت غیرمعناداری با مقدار واقعی دارند. هم چنین ضریب همبستگی نیز ارتباط میان میزان پوست محاسبه شده با مقدار واقعی بافت پوستی ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) را نشان داد.

ارزیابی درصد بافت استخوانی موجود در نمونه های کالباس ۳۰ درصد به روش بافت شناسی و مقایسه آن با مقدار واقعی بافت استخوانی ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) نشان داد که بافت ترکیب شده ۵ درصد در محدوده  $4/44 \pm 4/98$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۰ درصد در محدوده  $9/45 \pm 4/37$  بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $2/83 \pm 1/99$  بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در محدوده  $4/82 \pm 14/44$  متغیر هستند. کالباس ۳۰ درصد با بافت ترکیب شده ۵ و ۱۰ درصد، تفاوت غیرمعناداری با مقدار واقعی و بافت ترکیب شده ۲۰، ۱۵ درصد، تفاوت معناداری با مقدار واقعی دارند.

همبستگی میان میزان استخوان محاسبه شده با مقدار واقعی ترکیب شده مشاهده نشد.

ارزیابی درصد بافت پوست موجود در نمونه های کالباس ۳۰ درصد به روش بافت شناسی و مقایسه آن با مقدار واقعی بافت پوست ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) حاکی از آن است که میزان کالباس ۳۰ درصد با بافت پوست ترکیب شده ۵ درصد در محدوده  $2/23 \pm 4/44$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۰ درصد در محدوده  $1/70 \pm 2/16$ ، بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $4/27 \pm 7/31$  و بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در محدوده  $2/16 \pm 2/12$  متغیر هستند. میزان کالباس ۳۰ درصد در تمامی بافت های ترکیب شده، تفاوت معناداری با مقدار واقعی دارند.

شد. مقدار  $p < 0/05$  بعنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد. علاوه بر آن داده های مربوط به درصدهای محاسبه شده با درصدهای واقعی نیز با استفاده از آزمون ضریب همبستگی (correlation coefficient) مقایسه شد.

### یافته ها

نتایج مقایسه آماری بین درصدهای تعیین شده بافت استخوانی و پوست ترکیب شده با محصولات گوشتی بازساخته کباب لقمه و کالباس در جدول های ۱ و ۲ نشان داده شده است. نتایج بدست آمده در مورد تعیین درصد بافت استخوانی موجود در نمونه های کباب لقمه به روش بافت شناسی و مقایسه آن با مقدار واقعی بافت استخوان ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) نشان داد که میزان لقمه استخوان با بافت ترکیب شده کباب لقمه ۵ درصد در محدوده  $4/71 \pm 2/72$  درصد، بافت ترکیب شده در کباب ۱۰ درصد در محدوده  $14/06 \pm 11/45$ ، بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $17/70 \pm 9/93$  و بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در محدوده  $17/06 \pm 13/75$  متغیر هستند.

بر اساس سطح معنی داری آزمون t میزان لقمه استخوان در تمامی بافت های ترکیب شده، تفاوت غیرمعناداری با مقدار واقعی دارند. هم چنین بررسی ضریب همبستگی میان میزان لقمه استخوان با مقدار واقعی بافت استخوانی ترکیب شده نشان داد که با افزایش درصد واقعی بافت غیر مجاز، درصد محاسبه شده نیز افزایش یافت. نتایج بدست آمده در رابطه با پوست در این محصول، حاکی از آن است که میزان پوست ترکیب شده ۵ درصد در محدوده  $1/91 \pm 2/13$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۰ درصد در محدوده  $8/58 \pm 11/97$ ، بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $13/53 \pm 8/69$  و بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در



جدول ۱: نتایج آزمون t یک نمونه‌ای و ضریب همبستگی استخوان ترکیب شده در کباب لقمه و کالباس

محصول	بافت ترکیب شده	میانگین بر حسب درصد	انحراف معیار	مقدار آماره t	سطح معنی داری	نتیجه	ضریب همبستگی
لقمه	۵ درصد	۴/۷۱	۲/۷۲	-۰/۴۸	۰/۶۴	تفاوت غیرمعنادار	۰/۵۲**
	۱۰ درصد	۱۴/۰۶	۱۱/۴۵	۱/۵۸	۱۳	تفاوت غیرمعنادار	
	۱۵ درصد	۱۷/۷۰	۹/۹۳	۱/۲۲	۰/۲۴	تفاوت غیرمعنادار	
	۲۰ درصد	۱۷/۰۶	۱۳/۷۵	-۰/۹۵	۰/۳۵	تفاوت غیرمعنادار	
کالباس ۳۰ درصد	۵ درصد	۴/۴۴	۴/۹۸	-۰/۵۰	۰/۶۲	تفاوت غیرمعنادار	-۰/۳۵**
	۱۰ درصد	۹/۴۵	۴/۳۷	-۰/۵۶	۰/۵۸	تفاوت غیرمعنادار	
	۱۵ درصد	۲/۸۳	۱/۹۹	-۲۷/۲۱	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
	۲۰ درصد	۴/۸۲	۱۴/۴۴	-۴/۶۹	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
کالباس ۹۰ درصد	۵ درصد	۴/۰۹	۲/۴۲	-۱/۶۸	۰/۱۱	تفاوت غیرمعنادار	۰/۱۵
	۱۰ درصد	۵/۵۹	۲/۴۲	-۱/۸۶	۰/۰۸	تفاوت غیرمعنادار	
	۱۵ درصد	۲/۷۷	۲/۸۶	-۱۹/۰۹	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
	۲۰ درصد	۹/۷۲	۱۰/۱۹	-۴/۲۰	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	

\*\* در سطح ۰/۰۱ معنادار \* در سطح ۰/۰۵ معنادار

جدول ۲: نتایج آزمون t یک نمونه‌ای و ضریب همبستگی پوست ترکیب شده در کباب لقمه و کالباس

محصول	بافت ترکیب شده	میانگین بر حسب درصد	انحراف معیار	مقدار آماره t	سطح معنی داری	نتیجه	ضریب همبستگی
لقمه	۵ درصد	۱/۹۱	۲/۱۳	-۶/۴۶	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	۰/۵۷**
	۱۰ درصد	۸/۵۸	۱۱/۹۷	۰/۵۳	۰/۶۰	تفاوت غیرمعنادار	
	۱۵ درصد	۱۳/۵۳	۸/۶۹	-۰/۷۵	۰/۴۶	تفاوت غیرمعنادار	
	۲۰ درصد	۱۶/۱۵	۹/۲۲	-۱/۸۷	۰/۰۸	تفاوت غیرمعنادار	
کالباس ۳۰ درصد	۵ درصد	۲/۲۳	۴/۴۴	-۲/۷۹	۰/۰۱۲	تفاوت غیرمعنادار	۰/۱۶
	۱۰ درصد	۱/۷۰	۲/۱۶	-۱۷/۱۹	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
	۱۵ درصد	۴/۲۷	۷/۳۱	-۶/۵۵	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
	۲۰ درصد	۲/۱۶	۲/۱۲	-۳۷/۶۰	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
کالباس ۹۰ درصد	۵ درصد	۵/۵۹	۷/۳۸	۰/۳۶	۰/۷۲	تفاوت غیرمعنادار	۰/۰۵
	۱۰ درصد	۵/۱۵	۵/۵۱	-۳/۹۳	۰/۰۰۱	تفاوت معنادار	
	۱۵ درصد	۵/۴۴	۶/۲۸	-۶/۸۱	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	
	۲۰ درصد	۵/۳۵	۸/۳۷	-۷/۸۱	۰/۰۰۰	تفاوت معنادار	

\*\* در سطح ۰/۰۱ معنادار \* در سطح ۰/۰۵ معنادار



واقعی و میزان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد، تفاوت معناداری با مقدار واقعی دارند. هم چنین ضریب همبستگی میان میزان درصد پوست محاسبه شده در کالباس ۹۰ درصد با مقدار واقعی بافت پوستی ترکیب شده مثبت ولی معنادار نیست.

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تشخیص کمی بافت های غیر مجاز (استخوان و پوست مرغ) ترکیب شده در فرآورده های گوشتی بازساخته خام (کیاب لقمه) و حرارت دیده (کالباس) مورد بررسی قرار گرفت. بطور کلی براساس نتایج، درصد تعیین شده بافت استخوان ترکیب شده در کباب لقمه در درصدهای مختلف مورد مطالعه (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ درصد) با درصد واقعی دارای اختلاف معنی داری نبوده است و آزمون بافت شناسی با دقت قادر به تشخیص کمی مقادیر استخوانی اضافه شده در این محصول گوشتی بوده است. در مورد کالباس ۳۰ و ۹۰ درصد نیز آزمون بافت شناسی در تشخیص مقادیر ۱۰ و ۱۵ درصد بافت استخوانی اضافه شده دارای کارایی می باشد. با وجود اینکه پوست در مورد کباب لقمه در مقادیر ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ درصد بافت ترکیب شده بصورت کمی قابل شناسایی بود اما در مورد کالباس ۳۰ و ۹۰ درصد در هیچ کدام از درصدهای ترکیب شده مورد مطالعه قابل اندازه گیری نبوده است. براین اساس، می توان نتیجه گرفت که ردیابی بافت استخوانی معیار مناسبی برای تشخیص کمی خمیر مرغ از حیث استفاده احتمالی از کل لاشه مرغ در محصول می باشد. تحقیقات دیگری در زمینه بررسی اندازه و تعداد استخوان موجود در ۲۶ نمونه از محصولات گوشتی طیور مثل سوسیس، سالامی و گوشت چرخ کرده

هم چنین با توجه به نتایج، ضریب همبستگی میان میزان کالباس ۳۰ درصد پوست با مقدار واقعی بافت پوستی ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵) مثبت اما معنادار نمی باشد.

ارزیابی درصد بافت استخوانی موجود در نمونه های کالباس ۹۰ درصد به روش بافت شناسی و مقایسه آن با مقدار واقعی بافت استخوانی ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) نشان داد که میزان کالباس ۹۰ درصد با بافت استخوان ترکیب شده ۵ درصد در محدوده  $4/09 \pm 2/42$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۰ درصد در محدوده  $5/59 \pm 2/42$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $2/77 \pm 2/86$  و بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در محدوده  $9/72 \pm 1/19$  متغیر هستند. میزان کالباس ۹۰ درصد با بافت استخوانی ترکیب شده ۵ و ۱۰ درصد، تفاوت غیر معناداری با مقدار واقعی و در مقادیر ۵ و ۱۰ درصد، تفاوت معناداری با مقدار واقعی دارند. هم چنین ضریب همبستگی میان میزان استخوان در کالباس ۹۰ درصد با مقدار واقعی بافت استخوانی ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵) مثبت ولی معنادار نیست.

تعیین درصد بافت پوست موجود در نمونه های کالباس ۹۰ درصد به روش بافت شناسی و مقایسه آن با مقدار واقعی بافت پوست ترکیب شده (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ درصد) نشان داد که میزان کالباس ۹۰ درصد با بافت پوستی ترکیب شده ۵ درصد در محدوده  $5/59 \pm 7/38$  درصد، بافت ترکیب شده ۱۰ درصد در محدوده  $5/15 \pm 5/51$  و بافت ترکیب شده ۱۵ درصد در محدوده  $5/44 \pm 6/28$  و بافت ترکیب شده ۲۰ درصد در محدوده  $5/35 \pm 8/37$  متغیر هستند. میزان کالباس ۹۰ درصد با بافت پوست ترکیب شده ۵ درصد، تفاوت غیر معناداری با مقدار



انجام شد (۲۱).

در مطالعه ای دیگر روشهای بافت شناسی و آزمایشات شیمیایی از نظر تشخیص و ارزیابی مقدار استخوان موجود در ۲۹ محصول مختلف بررسی و مقایسه شدند (۲۲).

علاوه بر آن، کارآیی آزمون بافت شناسی در تشخیص کمی بافت های غیرمجاز در فرآورده های گوشتی خام بهتر از فرآورده های حرارت دیده است. اصولاً حرارت در طی فرآوری محصول منجر به آسیب بافتی و از بین بردن جزئیات ساختمانی آن می شود که در مورد پوست بدلیل وجود بافت چربی فراوان در ساختمان آن بخوبی مشهود بوده است. در مطالعه ای که توسط ایزدی و همکاران (۱۳۹۵)، در ارزیابی کمی بافتهای چربی در گوشت چرخ کرده با روش بافت شناسی صورت گرفت نشان داده شد که این روش برای تشخیص کمی بافت چربی در گوشت چرخ کرده کافی و مناسب نبوده است که احتمالاً ناشی از این مساله میباشد که بافت چربی در زمان آماده سازی بافتها برای آزمایشهای بافت شناسی در محلول گزیرلول حل شده بود و قابل تشخیص نبوده است (۲۳).

مطالعات در زمینه تشخیص کمی بافت های غیرمجاز در فرآورده های گوشتی با استفاده از آزمون بافت شناسی محدود است. بررسی اثر روش بافت شناسی در تعیین کمی محتوای گیاهی و جانوری غیر مجاز در گوشت چرخ کرده توسط Sadeghinezhad و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که درصد های تخمین زده شده از گوشت چرخ شده ای که با مقادیر ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سویا و سنگدان مخلوط شده بود با مقادیر واقعی مطابقت داشت بنابر این روش بافت شناسی به عنوان روش مناسب برای بررسی کمی محصولات گوشتی پیشنهاد گردید

(۲۴). در مطالعه ای نمونه های گوشتی حاوی ۱،۵/۵، ۲/۰، ۵ و درصد مواد گیاهی برای تعیین مواد افزودنی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵). علاوه بر موارد ذکر شده روشهای ایمنو هیستوشیمیایی برای تشخیص پروتئینهای سویا نیز استفاده شده است که در این مطالعه ۱،۵/۵، ۲،۵/۰، ۱۰ درصد سویا اضافه شد و با این روش درصدهای اضافه شده تشخیص داده شد (۲۶).

در این مطالعه از آنالیز تصاویر بافتی برای ارزیابی کمی بافت های غیرمجاز در محصولات گوشتی استفاده شد. آنالیز تصاویر مقاطع بافتی نیز برای تعیین میزان ماهیچه های اسکلتی در هشت برند از همبرگر (۲۷) و هشت برند از هات داگ در امریکا انجام شده است که در این تحقیق از رنگ امیزی هماتوکیسین اتوزین و آزمایش ایمنو هیستوشیمیایی استفاده شد و مقدار بافت اسکلتی به طور میانگین ۵/۷ و مقدار آب ۵۷٪ اندازه گیری شد. استخوان، کلاژن، خون، رگ، بافت گیاهی پوست، غضروف، اعصاب محیطی و بافت چربی مشاهده گردید. در بیشتر برندها میزان آب بیشتر از ۵۰ درصد و میزان بافت اسکلتی کمتر از ۱۰ درصد مشاهده شد. این در حالیکه در برندهای معتبرتر که میزان بافت اسکلتی بیشتری تشخیص داده شد به خاطر وجود استخوان و غضروف بیشتری نسبت به سایر برندها بود و بافت مغزی اصلاً مشاهده نگردید (۲۸). مقادیر ماهیچه اسکلتی در ۸۰ نمونه از تورتلینی با آزمایش بافت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت و این روش به همراه آنالیز تصاویر بافتی بعنوان روشی قابل اعتماد برای تعیین مقادیر حتی کوچک بافت های حیوانی در فرآورده های گوشتی گزارش شده است (۲۹). در مطالعه حاضر روش بافت شناسی قادر به تشخیص وجود بافت غیرمجاز استخوان و پوست در کالباس و کباب لقمه در همه درصدها



غدد بزاقی، غدد ترشعی لوله گوارش، گره لنفاوی، مو، ریه، زبان ۳/۸ درصد بود. همچنین فراوانی حضور هر یک از بافت های پستان، اپیدرم پوست و عصب ۷/۷ درصد بود. فراوانی حضور حفره های خالی و رگ هر کدام ۴۶/۱ درصد بود. در ۱۰۰ درصد نمونه ها بافت های گیاهی تشخیص داده شد (۳۳). جاهد و همکاران (۱۳۹۱) در استان تهران ۴۴ نمونه همبرگر تولید صنعتی حاوی ۳۰ و ۶۰ درصد گوشت را از نظر وجود بافت های غیرمجاز خوراکی به جای گوشت در فرمولاسیون به دو روش بافت شناسی و شیمیایی (اندازه گیری میزان هیدروکسی پرولین و کلاژن) مورد آزمون قرار دادند که ۵۷٪ از نمونه های همبرگر ۳۰ درصد و ۳۴/۸ درصد از همبرگرهای ۶۰ درصد دارای بافت غیرمجاز بودند. پوست مرغ و غضروف شفاف به ترتیب فراوان ترین بافت غیرمجاز تشخیص داده شد. همچنین در این مطالعه نمونه های همبرگر که دارای بافت غیر مجاز و فاقد بافت غیرمجاز بودند از نظر میزان هیدروکسی پرولین و کلاژن اختلاف معناداری نداشتند. بنابراین روش شیمیایی را برای وجود بافت های غیرمجاز در همبرگر مناسب و کارآمد تشخیص ندادند (۲۰). پرایسون و همکاران (۲۰۰۸) در امریکا هشت برند هات داگ را مورد آزمون بافت شناسی هماتوکسیلین اتوزین و اندازه گیری میزان آب قرار دادند و درصد پایینی از بافت اسکلتی را تشخیص دادند و بافت های استخوان، کلاژن، رگ های خونی، مواد گیاهی، عصب محیطی، چربی، غضروف و پوست را مشاهده کردند (۲۷). در مطالعه مشابهی از پرایسون و همکاران (۲۰۰۸) در آمریکا بر روی هشت برند همبرگر آزمون بافت شناسی هماتوکسیلین اتوزین و اندازه گیری میزان آب انجام دادند که درصد پایینی از

بوده است. وجود بافت های غیرمجاز حیوانی در فرآورده های گوشتی خام و حرارت دیده در تحقیقات مختلف با استفاده از آزمون بافت شناسی گزارش شده است. در مطالعه ای که توسط رکنی و همکاران (۱۳۷۶) بر روی ۶۰ نمونه کالباس حرارت دیده به روش هیستولوژیک انجام شد در یک نمونه بافت غده بزاقی و در یک نمونه نیز رباط پس سری مشاهده شد (۳۰). در تحقیق مشابهی که توسط رکنی و همکاران (۱۳۸۳) انجام گرفت از تعداد ۱۰ نمونه همبرگر معمولی و کباب لقمه، بافت پستان در سه نمونه همبرگر معمولی گزارش شد و در سایر نمونه ها هیچ گونه بافت غیر مجاز مشاهده نشد (۳۱). همچنین جاهد و رکنی (۱۳۸۳) وجود بافت سویا را با استفاده از آزمایشات هیستولوژیک در همبرگر خام منجمد گزارش کردند (۳۲). رضائیان و همکاران در سال ۱۳۸۱ محصولات تولیدی هفت کارخانه فرآورده های گوشتی حرارت دیده در استان مازندران را مورد آزمون هیستولوژی قرار دادند و در برخی از نمونه ها بافتهای پستان، غده بزاقی، گره لنفاوی، پوست و شکمبه را به عنوان بافتهای غیرمجاز تشخیص دادند (۶). در مطالعه ای که توسط شریعتی فر و همکاران در بهار سال ۱۳۸۹ بر روی ۷۲۰ نمونه سوسیس و کالباس تهیه شده از مراکز توزیع شهر کرمانشاه آزمون هیستولوژیک انجام شد، عضله اسکلتی در ۹۶/۲ درصد از نمونه ها وجود داشت و در ۳/۸ درصد از نمونه ها بافت چربی مشاهده گردید. میزان ۱۹/۲ درصد از نمونه ها دارای عضله قلبی بوده و در ۹۶/۲ درصد از نمونه ها غضروف و استخوان بالغ یافت شد. همچنین در ۵۷/۶ درصد نمونه ها استخوان نابالغ یافت شد. در ۲۷ درصد از نمونه ها بافت همبند و عضلات صاف دیده شد. فراوانی حضور هر یک از بافت های طحال، مری، آئورت،



سویا، غضروف، سنگدان، تخمدان و بافت چربی توسط آزمون بافت شناسی تایید شد (۳۶).

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان می دهد که تکنیک بافت شناسی به عنوان یک روش موثر برای ارزیابی کمی محصولات گوشتی خام و حرارت دیده است. با این حال ارزیابی کمی بافت های افزودنی در فرآورده های خام راحت تر از فرآورده های حرارت دیده گوشتی بوده است. علاوه بر آن تخمین کمی استخوان هم در مقایسه بافت پوستی به دلیل مقاومت آن نسبت به مراحل آماده سازی بافتی بیشتر امکان پذیر بوده است.

#### تضاد منافع

نویسندگان این مقاله این مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافی وجود ندارد.

#### تشکر و قدردانی

از کلیه کسانی که ما را در این تحقیق یاری کرده اند تقدیر و تشکر می گردد.

بافت اسکلتی را تشخیص دادند و بافت های عروق خونی، عصب محیطی، بافت چربی، مواد گیاهی، غضروف و استخوان را مشاهده کردند و همچنین وجود انگل سارکوسیستیس را در ۲ نمونه همبرگر تشخیص دادند (۲۸).

Julini و همکاران در سال ۱۹۷۹ وجود بافت های غیرمجاز حیوانی مانند ریه، پوست، پستان، کلیه، عصب و غضروف را در فرآورده های گوشتی نظیر سوسیس گزارش نمودند (۳۴). در تحقیقی دیگر Julini و همکاران (۱۹۸۲) مواردی از گنجاندن اندام های نامطلوب و غیرمجاز مانند معده و روده، عضله قلب، عقده های لنفاوی، طحال، دستگاه ادراری، غدد آنوکراین و بافت پوششی را با استفاده از روش های بافت شناسی تشخیص دادند (۳۵). در یک مطالعه دیگر که توسط حاجی محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۴ انجام شد بیست نمونه از محصولات گوشتی شامل سوسیس، کباب لقمه، کباب کوبیده و همبرگر دست ساز مورد مطالعه قرار گرفت که حضور بافتهای غیر مجاز

#### References

- 1-McNeill SH. Inclusion of red meat in healthful dietary patterns. *Meat science*.2014; 98(3):452-60.
- 2-Binnie MA, Barlow K, Johnson V, Harrison C. Red meats: time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat science*.2014; 98(3):445-51.
- 3-Rokni N. *Science & Technology of Meat*. 5nd ed. Iran: University of Tehran Press. 2006.[Persian]
- 4-Rohrmann S, Linseisen J. Processed meat: the real villain?. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2015;1-9.
- 5-Jahed Khaniki GHR, Rokni N. Histological study of unpermitted tissues in heated meat products by using of Masson's trichrome stain. *Pajouhesh & Sazandegi*.2005; 73: 96-102.[Persian]
- 6- Rezaian M, Rokni N. Histological study of meat products heated of Mazandaran province. *Pajouhesh & Sazandegi*. 2001; 54: 61-3.[Persian]



- 7-Kavousi Nejad M, Fazlara A, Morowati H. Detection of unauthorized tissue in hamburger with histological method. Proceeding of the 15 th Congress of Veterinary of Iran: 2008: 26-8.
- 8-Georgier L, Vitanov S. Adulteration of mince and sausages. *Khranitelana Promish Lenost .Bulgaria* 1995;44(1):15-16.
- 9-Disbrey DB, Ruck JH. *Histological laboratory methods*. UK, London Livingstone. 2000;15-46.
- 10-Ballin NZ. Authentication of meat and meat products. *Meat Science*. 2010; 86:577–587.
- 11-Kamkar A, Rokni N, Bokaei S, Hoseini H. Determination of Hydroxyproline as Measur of Collagen Content in Meat Product by Colorimetric Method. *Journal of Veterinary Research*. 2005; 60(1):25-30. [Persian]
- 12-Hsieh YHP, Woodward BB, Ho SH. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *Journal of Food Protection*. 1995; 58: 555–9.
- 13-Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*. 2007; 77: 649–53.
- 14-Macedo Silva A, Barbosa SFC, Alkmin MGA, Vaz AJ, Shimokomaki M, Tenuta-Filho AA. Hamburger meat identification by dot-ELISA. *Meat Science*. 2000; 56: 189–92.
- 15-Rao Q, Hsieh YHP. Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats. *Meat Science*. 2007;76:489–94.
- 16-Rodríguez MA, Garcia T, Gonzalez I, Asensio L, Hernandez PE, Martin R. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*. 2004; 67:172–7.
- 17-Colgrave ML, Allingham PG, Jones A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2008;1212:150–3.
- 18-Banks WJ. *Applied veterinary histology*. UK: Mosby-Year Book; 1993: 163-8.
- 19-Fekri M, Hosseini H, Eskandari S, Jahed GH, Adib-Moradi M. Histological study of sausages in point of unpermitted edible tissues assessment and its relationship to collage and hydroxyprolin of product. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2013;41(10):107-16. [Persian]
- 20-AbbasyFasarani M, Hosseini H, Jahed-Khaniki GR, Adibmoradi M, Eskandari S. Histological study of industrial hamburgers containing 30 and 60 percent meat for presence of unpermitted



- edible tissues and correlation of this factor to meat connective tissue chemical indices. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2013;7(5):311-18.[Persian]
- 21-Tremlova B, Starha P. Histometric evaluation of meat products-determination of size and number of objects. Czech journal of food sciences. 2002; 20(5):175-80.
- 22-Rencova E. editor. Microscopic method and image analysis of starch in food. Proceeding of the VIII th Symposium of zouny research wolker. 2007.
- 23-Izadi F, Sadeghinezhad J, Hajimohammadi B, Sheybani M. Evaluation of sensitivity of histological examination in qualitative and quantitative detection of mixing avian skin and Adipose tissues fraud in minced meat. Journal of health Ardabil University of medical science. 2016; 7(4):386-94.[Persian]
- 24-Sadeghinezhad J, Hajimohammadi B, Izadi F, Yarmahmoudi F, Latorre R. Evaluation of the Morphologic Method for the Detection of Animal and Herbal Content in Minced Meat. Czech journal of food science. 2015; 33(6):564-9.[Persian]
- 25-Pospiech M, Tremlova B, Rencova E, Randulova Z. Immunohistochemical detection of soya protein Optimisation and verification of the method. Czech Journal of Food Sciences. 2009; 27(1):11-9.
- 26-Tremlova B, Starha P. Histometric evaluation of meat products: Determination of area and comparison of results obtained by histology and chemistry. Czech Journal of Food Sciences. 2003; 21(3):101-6.
- 27-Prayson BE, McMahon JT, Prayson RA. Applying morphologic techniques to evaluate hotdogs; what is in the hotdogs we eat? Annals of Diagnostic Pathology. USA. 2008; 12(6): 98-102.
- 28-Prayson B, McMahon JT, Prayson RA. Fast food hamburgers: what are we really eating? Annals of Diagnostic Pathology. USA. 2008; 12(6):406-9.
- 29-Ghisleni G, Stella S, Radaelli E, Mattiello S, Scanziani E. Qualitative evaluation of tortellini meat filling by histology and image analysis. International Journal of Food Science and Technology. 2010; 45:267-8
- 30-Rokni N, Rezaian M, Dayani Dardashti A. Histological histometrical study of different heated sausages. Journal of Veterinary Medicine. Tehran University. 1997; 52(1):95-103.[Persian]



- 31-Rokni N, Rezaian M, Noori N, Ebrahimpoor F. Detection of unauthorized tissue in some of cured meat products of Tehran with histological method. *Pajouhesh&Sazandegi*.2004;17(4):2-5.[Persain]
- 32-Jahed-Khaniki GR, Rokni N.Histological detection of soya in freezing raw hamburger of Iran. *Pajouhesh & Sazandegi*.2004; 62(1):71-75.[Persain]
- 33- Shariatifar N, Sadeghi E, Khazaei M, Almasi A, Bohlouli Oskoi S, Tahvilian R. Recognition of Illegal Tissues in the Meat Products from Kermanshah Supply Centers during the years 2009-2010. *Ofogh-e-Danesh; Journal of Gonabad University of Medical Sciences*.2011;17(2):2-4.[Persian]
- 34-Julini M, Parisi E, Chicco G. Histological aspects of commercial frauds in sausage manufacture.*Annali delta facolta di medicina veterinaria di Tomio*.1979;26:231-44.
- 35-Julini M, Parisi E,Minopulos S.Histological aspects of commercial frauds in relation to sausage products.*Annali delta facolta di medicina veterinaria di Tomio*.1982;26:231-44
- 36-Latorre R,Sadeghinezhad J,Hajimohammadi B,Izadi F,Sheibani MT.Application of Morphological Method for Detection of Unauthorized Tissues in Processed Meat Products. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 2015; 2: 71-4.