واع لحوم الأبقار و الأغنام و الديك الرومي المفرومة بطريقة الـ PCR

. مصطفى الحميدي*أ. د. عبد العزيز عروانة**
ستير في قسم الصحة و الطب الوقائي- كلية الطب البيطري / جامعة البعث
حة اللحوم - كلية الطب البيطري / جامعة البعث

١٥ عينة لحوم بشكل عشوائي (٥٠ أبقار ٧٥ أغنام و ٢٥ رومي) من ثلاث مدن دمشق اة وتم فحصها بتقنية PCR (طريقة البرايمرات النوعية)حيث أظهرت النتائج :وجد بعد ينات الأبقار غش تجاري بسيط لخمس عينات تم خلط لحوم الأبقار مع لحوم فروج. و بعد ينات الأغنام وجد غش تجاري مركب لعينتين الأولى تم خلط لحوم الأغنام مع لحوم الأبقار و الثانية خلط لحوم أغنام مع لحوم أبقار و ماعز،و تسع عينات غش تجار بسيط منها ثلاث لط لحوم أغنام مع لحوم أبقار، وعينتين خلط لحوم أغنام مع لحوم ماعز، و أربع عينات خلط نام مع لحوم فروج.. وجد بعد فحص عينات لحوم الرومي غش تجاري بسيط لسبع عينات نات تم فيها خلط لحوم الرومي مع لحوم أبقار، و أربع عينات تم فيها خلط لحوم الرومي مع وج. وقد أظهرت النتائج بعد القيام بمرحلة الترحيل الكهربائي ان طول قطعة الـDNA لـ 603 bp و الأغنام 374 bp والرومي 50 bp)

حة الأغذية مطلباً عاماً إضافة إلى ذلك فقد أصبحت في الآونة الخيرة شغل الخبراء الشاغل ساً بعدما تم التأكد من تواجد لصاقات –تعريفية بالمنتج- غير صحيحة على منتجات غذائية من حيوانية وخصوصاً منتجات اللحوم حيث إن اللحوم تعتبر من أهم مصدر من مصادر البروتين ضمن سلسلة غذاء الإنسان و تكمن أهمية اللحوم الغذائية بكونها تحوي على بعض الأحماض الغير متواجدة في مصادر البروتين النباتي نظراً لهذه الأهمية التغذوية وجب علينا إيجاد أنظمة وعية و متطورة و موثوق بها مستخدمين من اجل ذلك أدوات بسيطة و التي بدورها ستسهل هذه البرامج الهادفة إلى تحديد أنواع اللحوم في وجبات الغذاء (Broodmann and Moor .) وإن مثل هذه الأنظمة ستعزز قناعة المستهلك بنوعية الغذاء المستهلك و من ناحية أخرى فإن ظمة ستمكن المختصين في تحديد و استرجاع الطعام غير الأمن على صحة المستهلك من البيع و اتخاذ الإجراءات القانونية المناسبة إما بالمخالفة أو إلقاء القبض على المدلسين . وإن غذاء و خاصة في أوروبا تسير ضمن خطوات مدروسة لذلك وجب تسليط الضوء على الإنتاج ي ككل و على مجال تصنيع الغذاء الخام أيضاً وبالأخص منتجات اللحوم لتضعه في متناول يد ك بشكل أمن (FLESCHWIRSCHEFT.6/2005) وقد بدأ البحث بشكل جدي في هذه و الأنظمة وذلك بعد انتشار مرض اعتلال الدماغ الأسفنجي (Transmission of (TSE) spongiform encephalopلإنه وجد إن تناول لحم بقري مصاب بمرض اعتلال الدماغ ي البقري (BSE) قد يسبب نشوء مرض جديد في الإنسان هو مرض كروتز فيلد – جاكوب (لدماغ الأسفنجي الفيروسي)(CJD). (Taylor and woodgate.1997)
١٩٨٨أعلنت بريطانيا عن تحريمها للأطعمة المستخرجة من المجترات بسبب انتشار مرض لدماغ الأسفنجي (TSE).
روبا ككل تحرم تناول هذه الأطعمة ولكن مع إضافة بعض الاستثناءات من أجل المواد الغير و المجرى عليها عمليات تطهيرية فإنها تكون قابلة للاستهلاك البشري. (49/38/EEC لجنة سوق الاقتصادية الأوروبية المشتركة) لذلك فهذه الأنظمة مكنت المختصين من كشف الغش

ي يقوم به البائع بالأخص عندما يتورط بنقل أو تبديل منتجات حيوانية غالية الثمن بمنتجات
ديئة أو رخيصة الثمن أو عندما تكون اللصاقة المعرفة بالمنتج غير صحيحة فهذا سيؤدي
ات سلبية على صحة المستهلك و خصوصاً في حال المستهلكين الذين يبدون تحسساً
غير مشار إليها في المنتج (Moor et al . 2003)
ات غذائية متعلقة بالديانات ليمكن تناولها على الإطلاق فمثلاً الشعب الهندوسي لا يتناول
ذلك المسلمين و اليهود فلا يتناولون لحم الخنزير ولو حتى بكميات قليلة . كما إن بعض
يفضلون لحم الفروج كحمية غذائية بدلاً من لحم البقر و الخنزير والغنم (Weder et al

حث :
البحث لتحديد انواع اللحوم المفرومة من اجل كشف الغش الغذائي في منتجات اللحوم
مفرومة الطازجة وذلك باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز التتابعي (PCR) (
POLYMERAS CHIN REA) فقد تم الكشف عن للحوم الأبقار والأغنام و الديك
تخدماً لذلك طريقة البرايمرات النوعية لتقنية الـ PCR العادي (Species-specific
PCR

ق البحث:
ت استخلاص الدنا من عينات للحوم المفرومة وقد استخدم كيت الاستخلاص من شركة)
(GmbH-Germany) C
رايمرات المباشرة و العكسية :(Forward and Reverse Primer)
حديد أنواع اللحوم التالية : (بقر و أغنام و ماعز و الفروج و الرومي) وقد اعتمدت هذه
من قبل (Johannes A.Lenstra , Jacob B.Buntjer and Fredrik W.
Janssen
من قبل شركة Promega

	تسلسل البرايمر	البرايمر
	5' - AAG CCT GTG ACA GAT AGA ACG AT- 3' 5'- GAA GCT GTC TAG AAT TCA GGG A-3'	أبقار
	5'- GTT AGG TGT AAT TAG CCT CGC GAG AA-3' 5'-AAG CAT GAC ATT GCT GCT AAGTTC -3'	أغنام
	5'- CCT CCC AGC TCC ATC AAA CAT CTC TTG ATG AAA -3' 5'- CTC GAC AAA TGT GAG TTA CAG AGG GA-3'	ماعز
	5'- GCG TTT TCT CCT CGC AAA TCC-3' 5'- ACG CGT GAT TTT CGC TTA AAT G-3'	فروج
	5'- GTA TTT GTG GGA GAA AAA GGG -3' 5'- CAC AAA TAC CTG TTT TTA CAC G-3'	رومي

ادة مزيج لتفاعل Promega (Master mix)و الحاوية على
H2o dest (PCR) الماء منزوع لدنا
10x PCR buffe المحلول الموقي لـ PCR
MgCl كلور المغنيزيوم
dNTP نكليوتيدات
PCR polymerase (5U / µl
ادة الأغاروز (Agarose gel) الخاصة بالرحلان الكهربائي من شركة (Oxoid)

صبغة الايثيديوم بروومايد (Ethidium bromide) لصباغة الجل وكشف الدنا في الرحلان الكهربائي (Electrophoresis)
محلول موقي (TE buffer) تم تحضيره في المخبر
محلول موقي (TBE 0.50 x) تم تحضيره في المخبر
ايثانول 98%

ـ الأجهزة المستخدمة:

ماصات مايكروليتر قياس µl (1000.200.20.10)
أنابيب ابن دروف 2ml خاصة بتقنية PCR (خالية من دنا و معقمة)
أنابيب Spin column معقمة وخالية من الدنا و مزودة بفلتر
أنابيب ابن دروف 1.5ml خاصة بجهاز التضخيم الحراري (Thermocycel) معقمة من الدنا
مثقلة ابن دروف خاصة بأنابيب ابن دروف (Centrifuge)
خلاط (Mixer)
حاضنة ابن دروف (حمام مائي مع هزاز) حتى 70° C
جهاز التضخيم الحراري Thermocycler
جهاز الرحلان الكهربائي (Electrophoresis) مع وحدة تنظيم الطاقة الكهربائية
اميرا UV موصولة مع جهاز كمبيوتر

عمل:

ض من الـــ PCR توليد أعداد هائلة من النسخ الجينية لذلك فان هذه التقنية تعتمد على تفاعلات دورية Cycling reac متضمنة ثلاث خطوات رئيسية تتكر حتى 40-30 دورة وتنجز هذه الخطوات بشكل إلي حيث يتم تسخين و تبريد الأنابيب مع تفاعل المزيج الموجود داخل الأنابيب في وقت قصير جداً.
ي الخطوات الرئيسية التي تنجز في جهاز (Thermocycler) .

الأولى: التفكيك Denaturation على درجة حرارة 94°c أثناء هذه المرحلة يتم فك البنية الحلزونية الحمض النووي DNA فتنفصل سلسلتي DNA المشكلة للحلزون كل على حدا ويتم في هذه المرحلة كل أنزيمات التفاعل .

الثانية : الالتحام Annealing على درجة حرارة 60°c يتم في هذه الرحلة اصطفاف البرايمرات ـ المفردة للحمض النووي DNA نتيجة الحركة البراونية لجزيئات المزيج و بعدها تبدأ الروابط الأيونية لسلة المفردة للبرايمر و السلسلة المفردة لقالب DNA بالتشكل و التحطم و من ثم تزداد الروابط قوة و ن البرايمرات (المرتبطة و الملائمة منذ البداية) و قالب DNA فيتشكل بذالك قطع DNA صغيرة ة السلسلة (برايمر قالب) و في هذه اللحظة يمكن لإنزيم البوليميراز أن يبدأ عمله في نسخ القالب و ن عدة وحدات من (برايمر قالب) قد جهزت وفي نهاية هذه المرحلة تكون الروابط الأيونية قد قويت ايمرات و القوالب حتى أنه ليمكن كسرها فيما بعد ضمن ظروف طبيعية .

الثالثة: الامتداد Extension على درجة حرارة 72°c حيث إنها تعتبر درجة الحرارة المثالية من مل أنزيم البوليميراز الذي يقوم بقرن القواعد الأزوتية dNTP'S المكملة للقالب إلى البرايمر من

مل أنزيم البوليميراز على إضافة dNTP'S من الجانب '5 إلى الجانب '3 و تتم قراءة القالب من الجانب '5 (Steffan and Atlas 1991)

١) يوضح مراحل التضخيم الحراري

قد نسخت أثناء عملية التضخيم الحراري لذلك فهناك علاقة اسية متعلقة في عدد نسخ DNA (Steffan and Atlas Andy vierstract

9الشكل رقم ٢ يوضح العلاقة الأسية لعدد نسخ Andy vierstracte 1999 DNA

نات لحوم (الأبقار و الأغنام و الرومي) من محلات بيع اللحوم و المطاعم و توضع كل عينة مة وتزود باستمارة توضح تاريخ جمع العينة ونوعها ورقمها . يتم حفظ العينات التي يراد ة أو المراد فحصها لمدة لا تزيد عن أسبوع على درجة حرارة 8°C- أما بالنسبة لباقي العينات على درجة حرارة 20°C-

س الدنا من العينات المجموعة بواسطة مجموعة الاستخلاص التشخيصية E.Z .N .A) Tissue DNA M.التابعة لشركةQiagen بعد استخلاص الدنا يتم تحضير العينات لاختبار ابيب ابن دروف المعقمة و الخالية من الدنا و الخاصة بـ Thermocycle في غرفة العمل PCR و المعقمة بالأشعة فوق البنفسجية لمنع التلوث فيتم بذلك تحضير مزيج التفاعل من اجل الحراري وفقاً للجدول التالي:

مزيج التفاعل Master mix	25µl
البرايمير الخاص المباشر	1 µl
البرايمير الخاص العكسي	1 µl
ماء منزوع الدنا	18 µl
مستخلص دنا العينة	5 µl

ب بالغطاء الخاص وبشكل محكم ثم توضع في جهاز مزج خاص بأنابيب التضخيم الحراري وضعها في جهاز التضخيم الحراري Thermocycle

جهاز الـ Thermocycle على البرنامج الحراري لكل أنواع اللحوم النيئة وفقاً للبرنامج

دورات	الزمن	درجة الحرارة	المرحلة
	5 دقيقة	94 °C	First Denaturation
	30 ثانية	94 °C	Denaturation
ورة	30 ثانية	60 °C	Annealing
	30 ثانية	72 °C	Extension
	10دقائق	72 °C	Final- Extension
	----------	4 °C	End temperature

المطبوخة البرنامج التالي :

الدورات	الزمن	درجة الحرارة	المرحلة
	5 دقيقة	94 °C	First Denaturation
	30 ثانية	94 °C	Denaturation
دورة	30 ثانية	60 °C	Annealing
	30 ثانية	72 °C	Extension
	10دقائق	72 °C	Final- Extension
	----------	4 °C	End temperature

خراج العينات من جهاز التضخيم الحراري تكون جاهزة للحقن في الجل المحضر من أجل مرحلة الكهربائي (Electrophoresis)

حضير الجل بنسب مختلفة حسب نوع الاختبار (حسب طول قطعة الدنا) ويضاف للجل بعد التحضير الخاصة (Ethidium bromide) والتي ستعطي اللون المميز لسلسلة الدنا بعد تعرضها وق البنفسجية

لاختبار حسب طول القطعة:

	نسبة (Agarose gel)	طول قطعة الـ DNA
	1.5%	603 bp
	2%	374 bp
	2%	157 bp
ج	3%	50 bp
ي	3%	50 bp

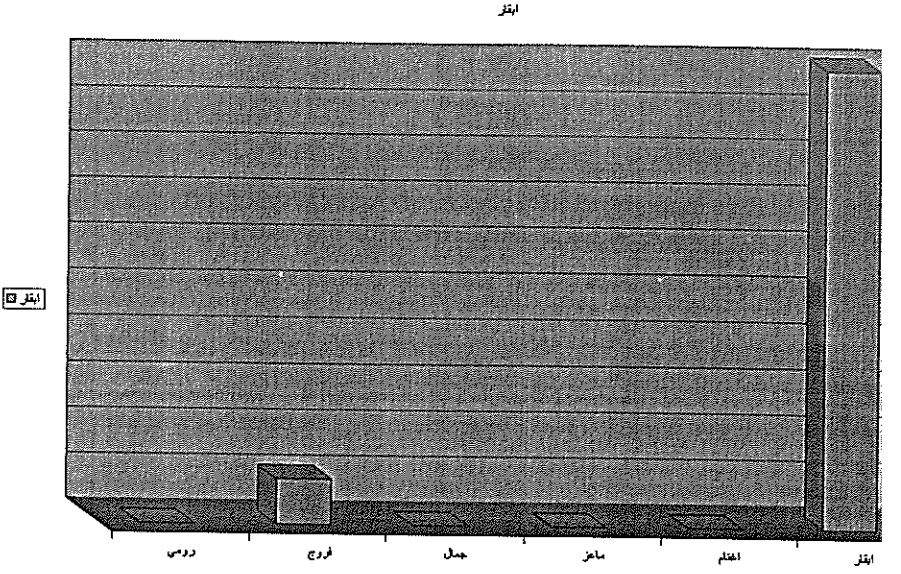
الجل المحضر و المصبوغ ضمن القالب الخاص بجهاز الرحلان الكهربائي و توضع الأمشاط ضمن الجل من أجل تحضير الحفر ويترك الجل ليبرد ويجمد . نسحب الأمشاط من الجل بعد أن يجمد د و بذلك تكون الحفر جاهزة لاستقبال العينات

المحلول الموقي الخاص بالاختبار (TBE buffer)بتركيز 0.50x ويصب في وحدة د بحيث يغطي المحلول الموقي الجل المحضر مسبقاً .

حقن أولاً (في أول حفرة) ضمن الجل بمادة المار كر (DNA Marker) و الذي يحوي على زيئية قياسية مختلفة من الـ DNA . تحقن العينات بالإضافة إلى الشواهد السلبية و الايجابية في جارة لحفرة الماركر وبمقدار (10 µl) لكل عينة

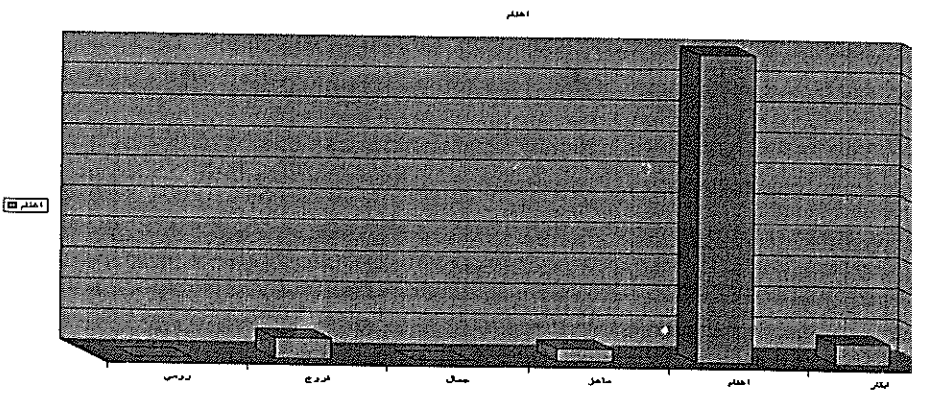
ل جهاز الرحلان الكهربائي بوحدة الطاقة ويتم تشغيله لتبدأ مسيرة عينات الدنا المصبوغة مع لمعروف الأوزان الجزيئية ضمن الجل . يترك الجهاز لمدة نصف ساعة ثم تفصل وحدة الطاقة الجل بحذر من قالب وحدة الاستشراد ليوضع في وحدة التصوير الموصولة بجهاز الكمبيوتر.

دراسة التي أجريت على 150 عينة لحوم للأنواع التالية: أبقار وأغنام و رومي التالي:
د عينات الأبقار 50 عينة وجد بعد فحصها بطريقة PCR العادي (البرايمرات النوعية) غش يط لخمس عينات تم خلط لحوم الأبقار مع لحوم فروج.



الشكل رقم 3 يوضح النسبة المئوية لغش عينات الأبقار

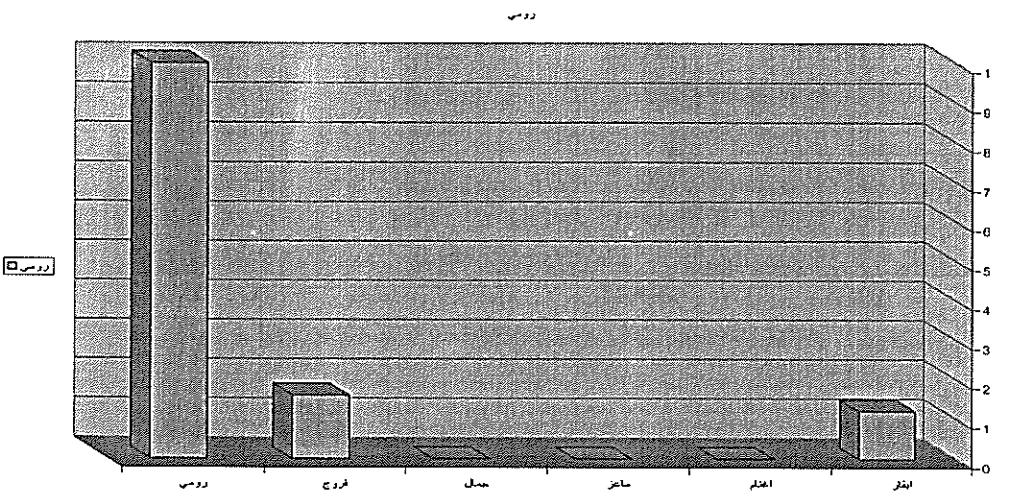
عينات الأغنام 75عينة وجد بعد فحصها بطريقة PCR العادي (البرايمرات النوعية) غش تجاري
ى الأولى تم خلط لحوم الأغنام مع لحوم الأبقار و الفروج والثانية خلط لحوم أغنام مع لحوم أبقار
مع عينات غش تجار بسيط منها ثلاث عينات خلط لحوم أغنام مع لحوم أبقار وعينتين خلط لحوم
أغنام مع لحوم ماعز و أربع عينات خلط لحوم أغنام مع لحوم فروج.



كل رقم 4 يوضح النسبة المئوية لغش عينات الأغنام

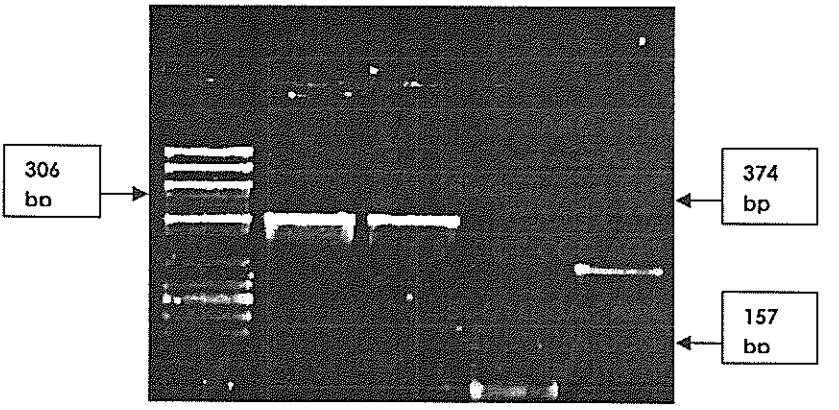
ت لحوم الرومي 25 عينة وجد بعد فحصها بطريقة PCR العادي (البرايمرات النوعية) غش
. لسبع عينات ثلاث عينات تم فيها خلط لحوم الرومي مع لحوم أبقار، و أربع عينات تم فيها خلط

لحوم الرومي مع لحوم فروج.



الشكل رقم (٥) يوضح النسبة المئوية لغش عينات الرومي

ظهرت النتائج بعد القيام بمرحلة الترحيل الكهربائي إن طول قطعة الــDNA لــ (الأبقار 603 bp و
374 bp والرومي 50 bp)



رقم (٦) يوضح عينة أغنام مغشوشة بإضافة لحوم ماعز وأبقار (M ماركر DNA ; 1 شاهد ايجابي
D أبقار ; 2 تواجدDNA بقري ; 3 تواجد DNA ماعزي; تواجد DNA غنمي.

شة

عدة طرق للتميز بين أنواع اللحوم فمنها ما يعتمد على تفاعل الضد مع المستضد (antigen –
antibody react) (Ouchterlony et al 1949) أو على الكيموتوغرافية السائلة

Ashoor) أو على الترحيل الكهربائي (SDS-PAGE (Zeriff et al 1992 أو على
ممتز المناعي (ELISA) (Martin et al 1991) كل هذه الطرق له خاصية تحديد أنواع
اك عدة طرق معتمدة على الـــ DNA إما الجيني أو DNA الجسيمات الكوندرية (mt) ففي
ا يتم الاستفادة من البرايمرات من أجل عملية التضخيم الحراري من خلال طرق متنوعة
(Rehbein et al 1999) و RAPD (Koh et al 1998) و PCR-RFLP
(Cheng و multiplex PCR (Fei et al 1996) و تتابع قطع الـــ
Buntger and Lenstra 1) لذلك فان PCR يقدم إمكانية كشف مكونات الطعام من
تخدمت الطرق على PCR بنجاح في تحديد أنواع لحوم الحيوانات الداجنة (Mereys et
منتجات اللحوم (Martinez and Man 1998) و أنواع كثيرة من الأسماك (Sun
) والدراسة الحالية استطاعت التغلب على أي التباس في مجال تحديد أنواع اللحوم .
أن استخدام طريقة PCR العادي طريقة البرايمرات العادية بأنها طريقة سهلة و بسيطة و
ة مع الطرق الأخرى وتم الكشف عن لحوم الأبقار و الأغنام و الماعز و الجمال و الفروج و
امت (Merye et al 2003) بكشف لحوم الخنزير بنسبة 0.5% في لحوم الأبقار
Pالمضاعف (duplex PCR) وقد أوضحت نتائجها أن طريقة PCR هي الطريقة
يد أنواع اللحوم كما قام (Partis et al 1999) بكشف لحوم الخنزير بنسبة 1% في
تخدما طريقة PCR-RFLP وقد قدم (Hopwood et al 2000) جهودا حثيثة في
وج بنسبة 1% في لحوم الضأن مستخدما PCR العادي .
ة تدعم نتائج (Hopwood et al 2000) ولهذه الطريقة مزايا جمة فهي سريعة جدا
ي كمية كبيرة من DNA فقد تم استخدام زوج من البرايمرات لكل نوع من الأنواع المدروسة
Forward primer) و برايمر عكسي (Reverse primer)وقد تم تصميم
لتعطي حجوم متوقعة (الأبقار 603 bp و الأغنام 374 bp و الماعز 157 bp و الجمال
روج 50 bp والرومي 50 bp) .

التوصيات :

PC (البرايمرات النوعية) طريقة سهلة و رخيصة التكلفة مقارنة مع الطرق الأخرى.
PCR (البرايمرات النوعية) من أدق الطرق بسبب اعتمادها على DNA لذلك فهي طريقة
عالمياً . لذلك ينصح باستخدام هذه الطريقة من اجل كشف أي غش للأغذية من أصل حيواني .
سلطات الصحية المعنية مراقبة الأطعمة ذات المصدر الحيواني ووضعها في متناول يد
آمن كي تعزز قناعة المستهلك بالمنتجات ذات الأصل الحيواني و بالأخص المحلية منها مما
الاقتصاد الوطني بالانتعاش .

References

1-Ashoor, S.H., Monte, W.C. and Stiles, P.G. (1988). Liquid Chromatographic identification of meats. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 309-403.

2- Brodmann, P.D., Moor, D.: Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain rea systems for the detection of beef (Bos taurus) and the detection of the family Mammalia in foo and feed. Meat Sci., 2003; 65: 599-607.

3-Buntzer, J. and Lenstra, J.A. (1998). Mammalian species identification by interspersed repeat PCR fingerprinting. J. Indust. Micro. and Biotech. 21(3): 121-127

4-Cheng, Y.H., Wen, C.M., Ding, S.T., Kao, C.C. and Kuo, T.Y. (1999). Detecting meat and bone meal ruminant's feeds by species specific PCR. J. Anim. And Feed Sci. 12: 851-860.

5-Fei, S., Okayama, T., Yamanoue, M., Nishikawa, I., Mnnen, M. and Tsiuji, S. (1996). Species identificication of meat and meat products by PCR. Anim Sci and Techno (Jpn) 67: 900-905.

6- Hopwood, A.J., Fairbrother, K.S., Lockley, A.K., Bardsley, R.G.: An actin gene-related polymerase ch reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. Meat Sci., 1999; 53: 227-23

7-Koh, M.C., Lim, C.H., Chua, S.B., Chew, S.T., Phang, S.T.W.:Random amplified polymorphic DNA (R fingerprints for identification of red meat animal species. Meat Sci., 1998; 48:275-285.

8-Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tanskley, S.D. (1991b). Rapid identification of markers linked to apseudomonas resistance gene in tomato sing random primers and near – isogenic lines.Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88: 2336-2340.

9-Martinez, I. and Man, Y. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. Food Res. 31(6-7): 459-466.

10- Meyer, R., Candrian, U., L · hy, J.: Detection of pork in heatedmeat products by the polymerase cha reaction. J AOAC Int.,2003; 77: 617-622

11-Obrovska I, Steinhauserova I and Nebola M. 2002. The application of the PCR method to theidentifi of meat species. Folia Veterinaria 46: 113-18.

12-Ouchterlony, O. (1949). Antigen antibody reactions in gels. Acta Patholgia

13- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., Murby, J. :Evaluation of a DNA fingerprintin method for determining the species origin of meats. Meat Sci., 2000; 54: 369-376.

14-Rehbein H., Kress G., Schmidt T. (1997). Application of P C R - S S C P to species identification of fishery products. J. Sci. Food Agric. 74, p. 35–41

15-Steffan R J and Atlas R M (1991): Polymerase chain reaction application in environmental microbiol Annual Revue Microbiology 45:137-61.

16-Sun, Y.L., Lin, C.S.: Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restri fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine,caprine, and bovin meats. J. Agric. Food Chem., 2003; 51: 1771-1776. 12. Tantillo, G., Pinto, A., Vergara, A., Buonavoglia, C.: Polymerase

17-Taylor, D. M., and S. L. Woodgate, 1997 Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of rumi derived protein in cattle diets. Rev Sci Tech 16: 187-198

18- Weder, J.K.P., Rehbein, H., Kaiser, K.P.: On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. Eur. Food Res. Technol., 2001; 213: 139-144.

SUMMARY

Detemination of beef; mutton and turkey meat by PCR n

Vet.Dr.Hmede A.
Prof.Dr.Arwana A.

We gathered / 150 / samples of meat (50 samples beef , 75 mutton an flesh)These samples picked up randomly from three Syrian cities / L Hama-Deraa/ .We tested these sample by (Species-specific PCR primers) Results : we found 1 – in beef samples we found / 5 / of them were adu chicken flesh only . 2 – in mutton samples we found / 2 / samples as compl commercial adulterated with beef and chicken flesh and in one sample some beef ,goat meat with mutton and nine simple commercial adulteratic three of them muttons mixed with beef , /2 / samples mutton mixed to goa samples mutton mixed to chicken flesh) but in turkey flesh was fc commercial adulteration in seven samples (three of them mixed with bee of them turkey flesh mixed with chicken flesh) We obtained length of DNA in meat with electrophoreses as follow : in beef 603 bp , 374 bp in mutto turkey flesh.