تعیین جمعیت نسبی *سالمونلا* در دستگاه گوارش طیور با استفاده از روش PCR

علیرضا صیداوی*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گروه علوم دامی، رشت، ایران

مسئول مکاتبات: alirezaseidavi@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۴

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور با استفاده از روش PCR انجام گردید. محتویات گوارشی جوجه‌ها خارج و DNA مربوطه استخراج شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و شیوه PCR برای بررسی جمعیت نسبی این باکتری استفاده گردید. با استفاده از یک آغازگر اختصاصی، باند اختصاصی مربوط به این باکتری و با استفاده از یک آغازگر عمومی باند اختصاصی کل باکتری‌های دستگاه گوارش به‌دست آمد. سپس به کمک تکنیک PCR، جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل نشان داد که از کل باکتری‌های دوازدهه و ژئوژنوم به ترتیب ۰/۱۲ و ۰/۱۱ درصد متعلق به جنس *سالمونلا* بودند. همچنین از کل باکتری‌های موجود در ایلئوم و روده کور هم به ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۳۹ درصد کل باکتری‌ها از گروه *سالمونلا*ها بودند. علاوه بر این در چهار، چهارده و سی روزگی، به ترتیب ۰/۳۸، ۰/۱۸ و ۰/۰۶ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها، باکتری‌های جنس *سالمونلا* بودند. علاوه بر این معلوم شد در چهار روزگی در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۱۱، ۰/۱۶ و ۰/۹۱ درصد کل باکتری‌ها از جنس *سالمونلا* بودند. بنابراین می‌توان بیان کرد جمعیت نسبی این باکتری‌ها در بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور) نسبت به بخش‌های فوقانی روده باریک بیشتر است. نتایج حاصل نشاندهنده متغیر بودن جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور بود که با عملکرد، وظایف و محیط فیزیکوشیمیایی این بخش‌ها مرتبط است.

کلمات کلیدی: جوجه، *سالمونلا*، PCR، روده

مقدمه

باکتری‌های متعلق به جنس *سالمونلا* از مهمترین عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی از جمله گوشت طیور هستند. این باکتری‌ها معمولاً متحرک، بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل، و از عوامل بسیار مهم بیماری‌زا و مضر برای بهداشت عمومی هستند [۱۳ و ۲۲]. بحث‌های زیادی در مورد طبقه‌بندی باکتری‌های جنس *سالمونلا* مطرح است [۲۵]. *سالمونلا* جنس پیچیده‌ای با بیش از ۲۶۶۸ سروتیپ است که به هفت زیرگونه تفکیک می‌شود. آزمایش‌های جدید نشان داده که دو گونه مشخص و متفاوت از نظر ژنتیکی، در جنس *سالمونلا* وجود دارد که شامل *Salmonella enterica* و *Salmonella bongori* است [۹]. حیوانات میزبان *سالمونلا* بسیار متنوع هستند. از طرفی دیگر، در بسیاری از کشورها برنامه‌ای جامع برای کنترل *سالمونلا* وجود ندارد. لذا این باکتری دارای شیوع زیادی است [۱۷ و ۲۰] و در این میان، طیور بعنوان یکی از میزبان‌های مهم این باکتری مطرح است. در واقع *سالمونلا* امروزه عامل اصلی بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در اکثر کشورهای توسعه یافته است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی، در حدفاصل سال‌های ۱۹۹۸-۱۹۹۳، *سالمونلا* بیشترین موارد گزارش بیماری (۵۴/۶ درصد) را به خود اختصاص داده است [۲۶]. در سال ۲۰۰۰، در بین انسان‌ها ۱۵۰۱۶۵ مورد بیماری ناشی از *سالمونلا* فقط در ۱۷ کشور اروپایی ثبت گردید [۱۱]. به این موارد باید خسارات سنگین ناشی از کاهش تولید در صنعت پرورش طیور را هم اضافه نمود. تحقیقات نشان داده است *سالمونلا* بخاطر ویژگی‌های خاص متابولیسمی و فیزیولوژیکی خود در همه جا حضور دارد. اما منبع اصلی

استقرار، رشد و نمو و تکثیر این باکتری، دستگاه گوارش پرندگان و پستانداران است [۲۲]. با توجه به قدرت تطابق بالای این باکتری‌ها با شرایط مختلف محیطی، براحتی از دستگاه گوارش طیور به محیط‌های دیگر از جمله مواد غذایی با منشا طیور منتقل می‌شوند [۱۵]. با توجه به امکان زنده ماندن و انتقال *سالمونلا* از طریق گوشت و سایر فرآورده‌های طیور هنگام پخت، باید عنوان شود که فرآورده‌های حیوانی زنجیره اصلی انتقال این باکتری به انسان را بر عهده دارند. به‌عنوان مثال ثابت شده است ۳۵ درصد موارد سالمونلوز از تخم‌مرغ و فرآورده‌های جنبی آن است [۲۶]. باید اذعان نمود جمعیت نسبی این باکتری‌ها در بررسی روند تغییرات، فعالیت‌های کلونیزاسیون و استقرار، و نیز روابط متقابل این باکتری‌ها با فلور میکروبی مفید دستگاه گوارش طیور نقش مهمی بر عهده دارد. همچنین غالبیت باکتری‌های بیماری‌زا در محیط فیزیکوشیمیایی دستگاه گوارش طیور سبب بروز علائم بالینی و خسارات ناشی از اُفت تولید در گله می‌شود که در نتیجه لازم است جمعیت نسبی این باکتری‌ها را بررسی نمود. هرچند میزان اهمیت این باکتری‌های بیماری‌زا در مناطق مختلف جهان، با یکدیگر متفاوت است؛ اما کم و بیش همه تولیدکنندگان صنعت طیور با نتایج مخرب شیوع این باکتری‌های بیماری‌زا روبرو هستند. بنابراین لازم است اطلاعات مورد نیاز درباره جمعیت این باکتری‌ها در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور که مکان اصلی استقرار و تکثیر این باکتری‌ها هستند بدست آید تا بتوان برنامه‌ریزی‌های لازم جهت کنترل و کاهش جمعیت آنها را انجام داد. اکثر روش‌های تعیین جمعیت باکتری‌ها در حال حاضر مبتنی بر شمارش تعداد باکتری به روش‌های باکتریولوژیک نظیر تهیه رقت‌های متوالی و سپس رشد دادن نمونه‌ها در یک محیط کشت مناسب است تا پس از تشکیل و رؤیت پرگنه‌ها، تعداد آنها شمرده شده و در عکس رقت ضرب شود تا جمعیت باکتری بدست آید. این روش ضمن اینکه بسیار وقت‌گیر بوده و گاه مستلزم چند روز انتظار برای حصول نتیجه است، در بسیاری از موارد هم از دقت زیادی برخوردار نیست؛ به‌عنوان مثال احتیاجات بسیاری از باکتری‌ها دقیقا شناخته نشده و لذا ممکن است به‌خوبی در محیط کشت رشد نکنند و در شمارش خطا ایجاد گردد. بنابراین روش‌های قدیمی و اولیه برای بررسی و تعیین جمعیت این باکتری‌ها معایب متعددی داشته و لذا امروزه سعی می‌شود تکنیکهای ژنتیک مولکولی، برای این موضوع مورد استفاده قرار گیرد که در رأس آنها روش‌های qPCR بیش از همه مورد توجه قرار دارد.

این تحقیق با هدف تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور با استفاده از روش دنسیتومتری (PCR نیمه کمّی) طراحی شد تا با توجه به فواید روش‌های مولکولی نظیر سرعت زیاد، هزینه پایین، دقت بالا و اعتبار آن ،مشکلات بیان شده کاهش یابد.

مواد و روش کار

حیوانات مورد استفاده و شرایط پرورش: تعداد یکصد و بیست قطعه جوجه گوشتی تجاری حت شرایط یکسان از نظر جیره، مدیریت پرورش (دما، نور، تراکم، تهویه، بستر، واکسیناسیون، رطوبت، آبخوری‌ها، و دان‌خوری‌ها) پرورش داده شد. به این منظور جوجه‌ها روی بستر پوشال و خرده چوب قرار گرفتند. ابتدا سالن جاروب و سپس با فشار آب شسته شد. سپس سالن با مواد ضدعفونی‌کننده گندزدایی گردید. کلیه آبخوری‌ها و دان‌خوری‌ها ابتدا شسته و سپس به‌وسیله مواد مناسب گندزدایی شد. در طول دوره پرورش نیز آبخوری‌ها و دان‌خوری‌ها متناسب با سن جوجه‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفت. پس از خشک شدن کف سالن، روی کف آن پوشال ریخته شد. سه روز قبل از شروع پرورش جوجه‌ها، با بستن کلیه درب و پنجره‌ها و سایر منافذ، با استفاده از گاز فرمالدئید اقدام به ضدعفونی سالن و کلیه وسائل و تجهیزات آن شد و دو روز قبل از شروع پرورش جوجه‌ها هم با باز کردن

در و پنجره‌ها و هواکش‌ها، گاز فرمالدئید خارج گردید. حرارت مورد نیاز سالن نیز توسط هیتر تامین شد. برنامه واکسیناسیون نیز مطابق دستورالعمل موجود و به‌صورت مرسوم در منطقه انجام پذیرفت [۱۹].

جیره غذایی مورد استفاده: چون در این تحقیق بررسی اثر جیره بر نوع و جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* مورد نظر نبود، لذا از جیره استاندارد و منطبق با نیازهای سویه تجاری استفاده شد. تغذیه جوجه‌ها به صورت اختیاری و در حد اشتها بود. جیره طیور بر اساس دستورالعمل راهنمای پرورش آن سویه و با نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تهیه شد [۱].

کشتار پرندگان: در سنین ٤ روزگی، ١٤ روزگی و ٣٠ روزگی، تعداد ٢٤ جوجه گوشتی با میانگین وزن در حد متوسط وزنی گله بطور تصادفی انتخاب و پس از بیهوش کردن، به روش قطع گردنی ذبح شدند. سایر جوجه‌ها در این آزمایش بخاطر جلوگیری از مرگ‌ومیر و اجتناب از کاهش تعداد جوجه‌ها تا پایان آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین علت بیهوشی قبل از کشتار این بود که جوجه‌ها هنگام کشتار دچار استرس نشده و به‌خاطر تکانهای شدید، محتویات دستگاه گوارش آنها بین بخش‌های مختلف جابجا نشود.

خارج کردن دستگاه گوارش و محتویات آن: حفره بطنی عمود بر خط میانی و در ناحیه شکمی باز شد و دستگاه گوارش جوجه‌ها خارج گردید و همراه با محتویات دستگاه گوارش جوجه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. به این منظور دستگاه گوارش جوجه‌ها تحت شرایط استریل بدقت خارج شده و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد تا محتویات بخش‌های مختلف روده کوچک و روده کور خارج و جداگانه در لوله‌های فالکون ریخته شود. در انجام مراحل فوق دقت گردید از ورود آلودگی‌های ثانویه به نمونه‌ها جلوگیری شود. نمونه‌های تهیه شده تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار نمونه‌ها در همه موارد یکسان بود. برای جلوگیری از تکثیر آلودگی و ایجاد عفونت ثانویه، وسایل مورد اتفاده به‌طور مرتب تعویض و از وسایل استریل استفاده شد [۱۹].

استخراج DNA و انتخاب پرایمر: در ادامه DNA محتویات بخش‌های مختلف روده کوچک و روده کور جوجه‌ها جداگانه با استفاده از پروتکل‌های موجود [۱] استخراج و خالص‌سازی شد. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری، کمّیت و با استفاده از الکتروفورز کیفیت این DNA تأیید شد. در تکنیک اسپکتروفتومتری یا طیف‌سنجی از دستگاهی استفاده شد که شدت نور را به‌صورت تابعی از طول موج اندازه‌گیری می‌کند. این کار با انکسار پرتو نور به طیف طول موج‌ها و آشکارسازی شدت‌ها با دستگاه باردار و نمایش نتایج به‌صورت گراف انجام شد. در واقع در این روش غلظت با استفاده از میزان جذب نور تعیین شد. این روش قابلیت اندازه‌گیری نمونه‌های فوق‌العاده کوچک را داشته و معمولاً برای تجزیه و تحلیل اولیه DNA به‌کار می‌رود. در این آزمایش نور با طول موج و انرژی مشخص به نمونه DNA تابانده شد و با اندازه‌گیری مقدار انرژی رد شده از نمونه DNA توسط بخش فتودتکتور دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور توسط نمونه DNA اندازه‌گیری شد. خروجی اسپکتروفتومتر مقدار کمّی DNA را تأیید کرد. سپس با استفاده از گزارش آمیت- روماچ و همکاران [٤]، پرایمری برای شناسایی همه باکتری‌های موجود در بخش‌های مختلف روده کوچک و روده کور جوجه‌ها انتخاب شد. پرایمر رفت Unibac-f بود و بصورت CGTGCCAGCCGCGGTAAT ACG طراحی شد. پرایمر برگشت هم Unibac-r نام داشت و دارای توالی GGGTTGCGCTCGTTG CGGGACTTAACCCAACAT بود. همچنین با استفاده از همین منبع، یک جفت پرایمر مجزا برای شناسایی کلیه باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌ها انتخاب شد که پرایمر رفت Sal201-f با توالی CGGGCCTCTTGCC

ATCAGGTG و پرایمر برگشت Sal597-r با توالی CACATCCGACTT GACAGACC G بود.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): در مرحله بعد، پس از آزمون غلظتهای مختلفی از $MgCl_2$، آغازگر و تعداد چرخه‌های PCR، نهایتاً بر اساس گزارش صیداوی [۱] یک واکنش PCR با استفاده از پرایمر تهیه شده برای شناسایی همه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی بهینه‌سازی و انجام شد. به همین ترتیب یک واکنش PCR مجزا با استفاده از جفت پرایمر تهیه شده، برای شناسایی کلیه سروارهای جنس *سالمونلا* موجود در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی بهینه‌سازی و انجام شد [۱]. محصولات این دو واکنش PCR مورد الکتروفورز قرار گرفتند، مرئی شده و از باندهای مربوطه عکسبرداری شد. جزئیات واکنش PCR اول برای شناسایی همه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به‌صورت شروع داغ (۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ ثانیه)، واسرشته‌سازی (۹٤ درجه سانتی‌گراد و ٤٥ ثانیه)، هم‌سرشته‌سازی (٦۳ درجه سانتی‌گراد و ٤٥ ثانیه)، بسط (۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ ثانیه)، بسط نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ ثانیه) بود و مراحل واسرشته‌سازی، هم‌سرشته‌سازی و بسط در ۳۰ چرخه تکرار گردید. جزئیات واکنش PCR دوم برای شناسایی کلیه سروارهای جنس *سالمونلا* هم به‌صورت شروع داغ (۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ ثانیه)، واسرشته‌سازی (۹٤ درجه سانتی‌گراد و ٤٥ ثانیه)، هم‌سرشته‌سازی (۵۸ درجه سانتی‌گراد و ٤٥ ثانیه)، بسط (۷۲ درجه سانتی‌گراد و ٦۰ ثانیه)، بسط نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ ثانیه) بود و مراحل واسرشته‌سازی، هم‌سرشته‌سازی و بسط در ۳۰ چرخه تکرار گردید [۱]. شاهد مثبت آزمایش هم *Salmonella typhimurium* بود که از بخش میکروبیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد تا صحت و اختصاصی بودن آزمایش تأیید شود. این باکتری توسط مؤسسه فوق به‌روش‌های کشت میکروبیولوژیکی و تشخیص افتراقی از نظر جنس و گونه مورد تأیید قرار گرفته بود. از آب دوبار تقطیر هم به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR: جهت رؤیت محصولات PCR، از ژل آگارز استفاده شد. با روشن کردن و تنظیم شدت جریان و ولتاژ دستگاه، الکتروفورز انجام شد. محصولات واکنش‌ها به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۷۵ ولت الکتروفورز شدند و سپس زیر نور ماورای بنفش عکس‌برداری انجام گردید.

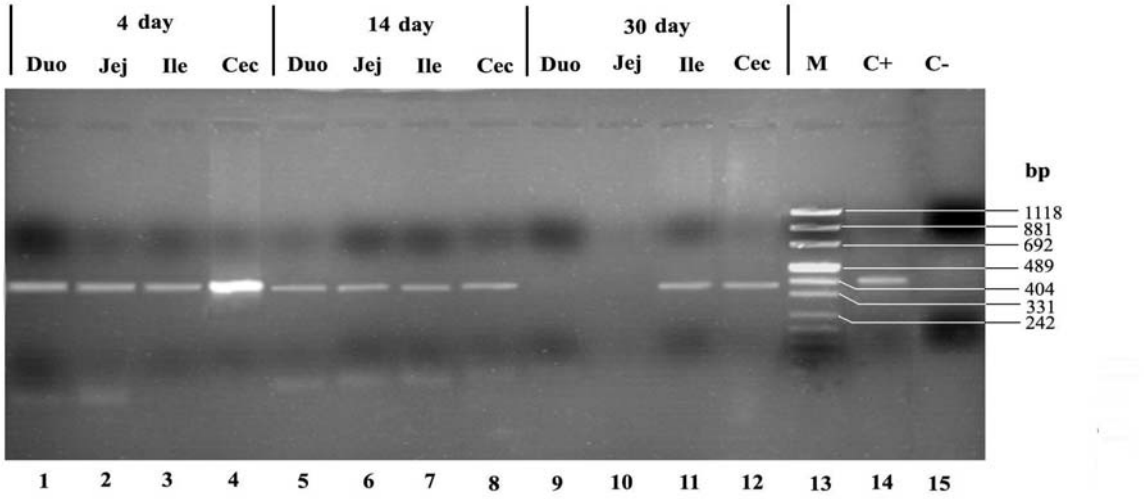
تجزیه و تحلیل اطلاعات: با مقایسه و تجزیه و تحلیل باندهای مرئی شده، جمعیت نسبی باکتری‌های *سالمونلا* به‌صورت درصدی از کل باکتری‌های دستگاه گوارش به‌دست آمد. به این منظور با استفاده از تکنیک دنسیتومتری (تراکم‌سنجی) و نرم‌افزار Gel Proc Analyzer تراکم باندهای اختصاصی باکتری‌های سالمونلا بر اساس مدل رگرسیون خطی با برون‌یابی به‌دست آمد. در واقع از PCR استفاده شد و تراکم محصولات PCR اندازه‌گیری شد. به این منظور پرایمر عمومی به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت و تراکم محصولات PCR *سالمونلا* در هر بخش، نسبت به تراکم محصولات PCR پرایمر عمومی سنجیده و مقایسه شد [٤]. روش PCR (دنسیتومتری یا تراکم‌سنجی) برای بررسی تراکم نسبی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌ویژه در مورد SDS-PAGE و تجزیه و تحلیل پروتئین [۱۰ و ۲۸] و DNA میتوکندریایی [۱۲] و DNA باکتری‌ها [٤] به‌کار می‌رود. همچنین تراکم باندهای اختصاصی برای همه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش هم برآورد شد. در این مرحله تراکم باندهای اختصاصی، نسبتی از تراکم باند مربوط به کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها بود. با تعیین نسبت تراکم باند اختصاصی مربوط به باکتری *سالمونلا* نسبت به باند اختصاصی مربوط به کل باکتری‌های دستگاه گوارش، جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در مقایسه با کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به تفکیک سن به‌دست آمد.

محاسبات فوق در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور نیز به تفکیک انجام گردید.

نتایج

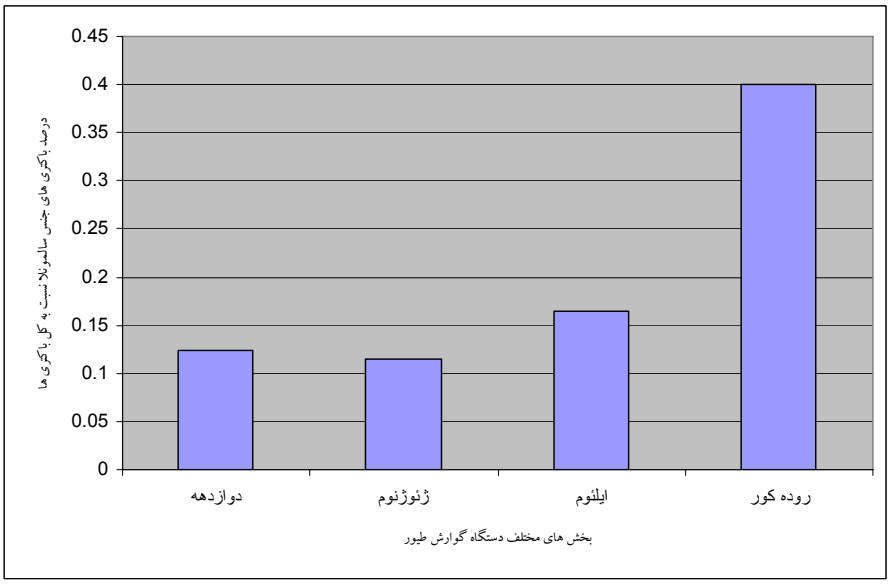
استفاده از تکنیک PCR توانست جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش طیور را برآورد کند. نتایج حاصل توانست نشان دهد چه درصدی از کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی متعلق به سروارهای مختلف باکتری‌های جنس *سالمونلا* هستند. تکثیر قطعه‌ای به طول ۳۹٦ جفت باز از ژن 16S rDNA سبب شناسایی کلیه باکتری‌های جنس *سالمونلا* و بیان آن به صورت باندی اختصاصی شد که پس از الکتروفورز، تحت اشعه ماورای بنفش مرئی شدند. همچنین تکثیر قطعه‌ای به طول ٦۱۱ جفت باز از ژن 16S rDNA سبب شناسایی کلیه باکتری‌های دستگاه گوارش طیور و بیان آن به صورت باندی اختصاصی شد که پس از الکتروفورز، تحت اشعه ماورای بنفش مرئی شدند (شکل ۱). همچنین نتیجه دو واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مجزا و مقایسه نتایج حاصل با Size Marker مناسب، تکثیر قطعات هدف را تأیید کرد.

ابتدا یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی کلیه باکتری‌های *سالمونلا* و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دیگر برای شناسایی عمومی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها درنظر گرفته شد (شکل ۱؛ [۱ و ۱۹]). تصویر این ژل PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. در نمونهٔ DNA مربوط به کنترل مثبت هم یک باند اختصاصی ۳۹٦ bp به‌دست آمد که نتایج حاصل را تأیید نمود. کنترل مثبت مورد استفاده در آزمایش با استفاده از روش کشت میکروبیولوژیکی و تشخیص افتراقی از نظر جنس و گونه مورد تأیید قرار گرفته بود و حصول باند اختصاصی ۳۹٦bp با استفاده از نشانگر استاندارد نیز مجدداً صحت و اختصاصی بودن نتایج آزمایش را تأیید کرد.



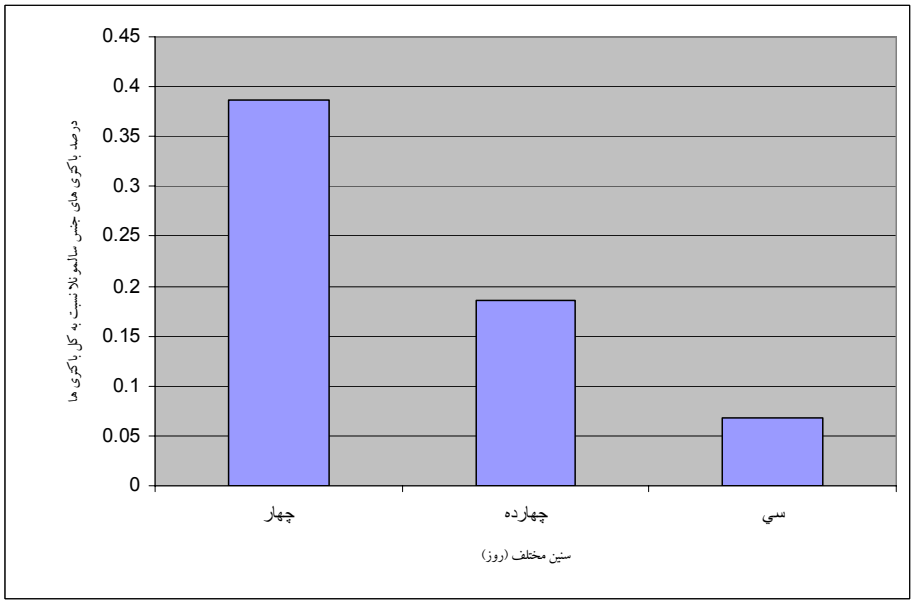
شکل ۱ـ نتایج الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA دستگاه گوارش جوجه‌ها برای تشخیص باکتری‌های جنس *سالمونلا* بر روی ژل آگارز [۱۹] ستون‌های ۱ـ۱۲: محصولات تکثیر DNA باکتری‌های جنس *سالمونلا* با پرایمر. ستون ۱۳: (M) نشانگر استاندارد وزن مولکولی؛ ستون ١٤: (+C) DNA تکثیر شدهٔ شاهد مثبت؛ ستون ۱۵: (-C) شاهد منفی. Duo: دوازدهه Jej: ژوژنوم Ile: ایلئوم Cec: روده کور

جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش: نتایج بدست آمده از این تحقیق توانست درصد باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی نشان دهد. بر این اساس ۰/۱۲ درصد باکتری‌های دوازدهه متعلق به جنس *سالمونلا* بودند. در ژئوژنوم هم ۰/۱۱ درصد کل باکتری‌ها متعلق به این جنس بوده و ۰/۱۶ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم هم از گروه *سالمونلا*ها بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور هم ۰/۳۹ درصد آنها متعلق به جنس *سالمونلا* بودند.



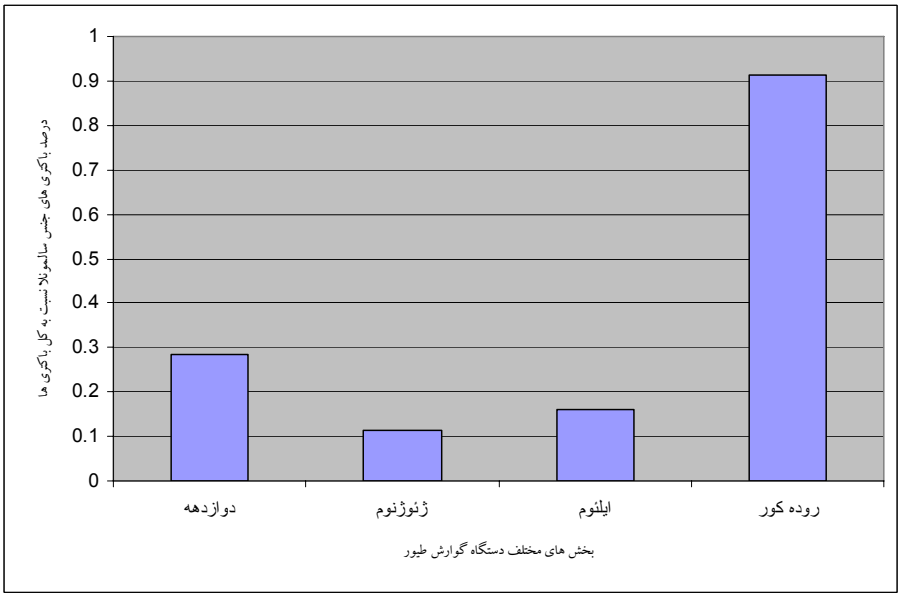
شکل۲- جمعیت باکتری‌های جنس سالمونلا نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف: بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در چهار روزگی، ۰/۳۸ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها، باکتری‌های جنس *سالمونلا* هستند. این باکتری‌ها ۰/۱۸ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها در چهارده روزگی را تشکیل می‌دهند. در سی روزگی نیز باکتری‌های جنس *سالمونلا*، ۰/۰۶ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها را تشکیل می‌دهند.



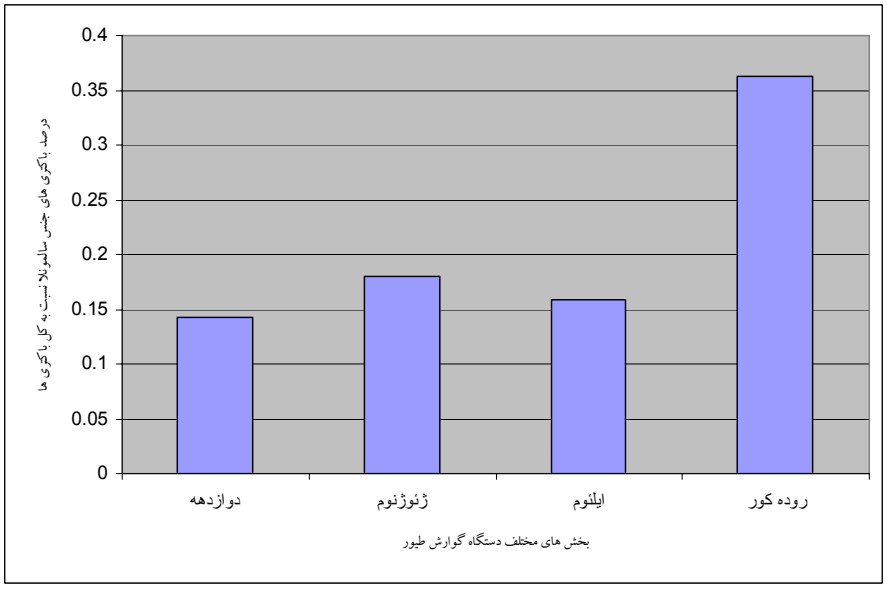
شکل ۳ـ جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف

جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش: با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سن چهار روزگی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی بدست آمد. بر این اساس ۰/۲۸ درصد باکتری‌های دوازدهه در سن چهار روزگی متعلق به جنس *سالمونلا* بودند. همچنین در سن چهار روزگی، در ژئوژنوم هم ۰/۱۱ درصد کل باکتری‌ها متعلق به این جنس بوده و ۰/۱٦ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم در سن چهار روزگی از گروه *سالمونلا*ها بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور در سن چهار روزگی، ۰/۹۱ درصد آنها متعلق به جنس *سالمونلا* بودند.



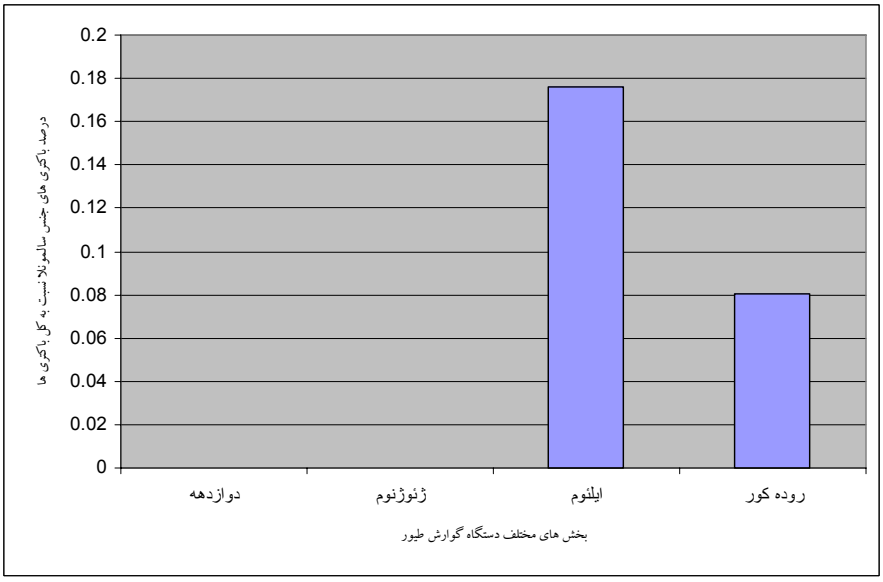
شکل ٤ـ جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش: بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در چهارده روزگی، ۰/۱٤ درصد کل باکتری‌های دوازدهه از جنس *سالمونلا* هستند. در این سن، باکتری‌های جنس سالمونلا ۰/۱۸ درصد باکتری‌های ژئوژنوم را تشکیل می‌دادند و این مقدار در ایلئوم به ۰/۱۵ درصد و در روده کور به ۰/۳٦ درصد کل باکتری‌ها رسید.



شکل ۵- جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش: با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سن سی روزگی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی بدست آمد. بر این اساس در سن سی روزگی در دوازدهه و ژئوژنوم، باکتری‌های جنس *سالمونلا* وجود نداشت. لیکن ۰/۱۷ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم در سن سی روزگی از گروه *سالمونلا*ها بودند و از کل باکتری‌های روده کور در این سن، ۰/۰۸ درصد آنها متعلق به جنس *سالمونلا* بودند.



شکل ٦ـ جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

بحث

هرچند پیش از این، گزارش‌هایی درباره باکتری‌های جنس *سالمونلا* و جمعیت آن در دستگاه گوارش طیور منتشر شده بود [۲ و ۳]؛ لیکن بسیاری از این محققان جمعیت باکتری‌ها را با استفاده از روش‌های دیگری به‌ویژه روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی برآورد و گزارش کرده بودند که معایب چنین روش‌هایی پیش از این بیان شده است که از آن جمله می‌توان به دقت پایین، سرعت کم، هزینه بالا، نیاز به نیروی کار زیاد و ماهر، تکرارپذیری پایین، ناشناخته ماندن یا مشابه بودن احتیاجات رشد بسیاری از باکتری‌ها و غیره اشاره کرد [١٦ و ٢٥]. روش توسعه یافته در این آزمایش، از سرعت و دقت نسبتاً بیشتری در مقایسه با روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی برخوردار بوده و نیاز به استفاده از محیط کشت میکروبی ندارد؛ به‌طوری‌که در صورت تجاری‌سازیِ این نوع روش‌ها، نیروی کار و هزینه کمتری نیز بدنبال خواهد داشت. این نتایج با تأیید امکان بررسی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی، برتری روش‌های مولکولی نسبت به تکنیک‌های سنتی سرولوژیکی و نظایر آن در بررسی میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. بنابراین شیوه دنسیتومتری مبتنی بر نتایج PCR را می‌توان روشی سودمند برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش طیور دانست که لازم است با توسعه آن، به تدریج جایگزین روش‌های سنتی نظیر کشت میکروبی شود. محققان [۵] عنوان کرده‌اند که در بسیاری موارد مقدار برخی باکتری‌ها در دستگاه گوارش طیور بسیار کم بوده و بنابراین لازم است از روش‌هایی با حساسیت بالا جهت تشخیص این باکتری‌ها استفاده شود. البته چندبار غنی‌سازی این نوع نمونه‌ها با محیط کشت اختصاصی مناسب می‌تواند تا حدودی منجر به تشخیص درست و حذف نتایج منفی کاذب ناشی از عدم رشد باکتری‌های هدف در روش‌های کشت میکروبی شود. لیکن همواره باید نتایج مثبت کاذب ناشی از تکثیر باکتری‌های غیر هدف با احتیاجات رشد مشابه باکتری‌های هدف مورد نظر قرار گیرد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کنترل مثبت به‌کار رفته در آن که قبلاً از طریق کشت میکروبی تأیید شده بود، می‌تواند این مشکلات را از بین ببرد. برتری‌های دیگر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسبت به روش‌های کشت میکروبی را می‌توان در سرعت بسیار زیاد این روش‌ها و زمان کمتر مورد نیاز برای حصول

نتیجه، دقت بیشتر، تکرارپذیری بالا، حساسیت بیشتر، اختصاصی بودن، خطای بسیار کمتر، و عدم نیاز به غنی‌سازی و رشد اولیه در بسیاری موارد بیان کرد.

باید به این مسأله توجه شود که هدف از این تحقیق، توسعه کاربرد استفاده از تکنیک PCR در تعیین جمعیت باکتری‌ها بود و جنس *سالمونلا* تنها به عنوان یک نمونه آزمایشی انتخاب شد و لذا می‌توان پس از این، برای تعیین جمعیت هر نوع باکتری مورد نظر در سطح جنس، گونه یا سویه، اقدام به انتخاب پرایمر مربوط به همان جنس، گونه یا سویه کرد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی برای تشخیص همان جنس، گونه یا سویه باکتریایی مورد نظر انجام داد و سپس با استفاده از تکنیک PCR، همانند آن‌چه در این آزمایش انجام شد، اقدام به تعیین جمعیت آن باکتری جنس، گونه یا سویه نمود.

امروزه روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، نقش مهمی در شناسایی فلور میکروبی مضر در پزشکی، دامپزشکی، میکروبیولوژی، محیط زیست، صنایع غذایی و بسیاری از علوم دیگر پیدا کرده و به‌سرعت جایگزین روش‌های قدیمی می‌شود [۲۸]. برتری‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسبت به روش‌های کشت میکروبی را می‌توان در سرعت بسیار زیاد این روش‌ها و زمان کمتر مورد نیاز برای حصول نتیجه، دقت بیشتر، تکرارپذیری بالا، حساسیت بیشتر، اختصاصی بودن، خطای بسیار کمتر، و عدم نیاز به غنی‌سازی و رشد اولیه در بسیاری موارد بیان کرد.

پژوهشگران نیز افزایش حساسیت روش‌های مبتنی بر ژن 16S rDNA نسبت به روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی را برای تشخیص باکتری‌های جنس *سالمونلا* تأیید کرده‌اند [۳۰]. محققان [۲۳] در بررسی‌های خود، فراوانی‌هایی متفاوتی درباره باکتری‌های جنس *سالمونلا* در طیور گزارش کرده‌اند. آنها هم معتقدند وجود این باکتری‌های در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی از قبل هم قابل انتظار است. در واقع اگر به پراکنش باکتری‌ها در محیط پرورش جوجه‌ها، بستر، جیره، آب آشامیدنی، هوای اطراف سالن پرورش، پرندگان عبوری، حشرات و جانوران موذی و غیره توجه کنیم، وجود چنین باکتری‌هایی در دستگاه گوارش طیور قابل انتظار خواهد بود. به‌عنوان نمونه پژوهشگران [۱٤] بیان کردند جیره دام و طیور گاهی اوقات آلوده به باکتری‌های بیماری‌زا است.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس *سالمونلا* نسبت به کل باکتری‌های موجود در هر یک از چهار بخش دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف را مشخص کرد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد میزان باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور متفاوت است که با توجه به نقش منفی جنس *سالمونلا*، علت آن می‌تواند تجمیع این عوامل بیماری‌زا و واکنش‌های دفاعی بخش‌های مختلف بدن طیور نسبت به تجمع این عوامل بیماری‌زا باشد. طبق نتایج این تحقیق می‌توان بیان داشت جمعیت نسبی این باکتری‌ها در بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور) نسبت به بخش‌های فوقانی روده باریک (دوازدهه و ژئوژنوم) بیشتر است. نتایج حاصل نشان‌دهنده متغیر بودن جمعیت باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور است که با عملکرد، وظایف و محیط فیزیکوشیمیایی این بخش‌ها مرتبط می‌باشد. البته باید توجه نمود که جمعیت مطلق و نسبی هر باکتری در دستگاه گوارش تابع عوامل بسیار متنوعی نظیر نوع جیره، فرآوری جیره، افزودنی‌های جیره (نظیر پروبیوتیک‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و نظایر آن)، سن پرنده، محیط فیزیکوشیمیایی دستگاه گوارش، محیط زندگی پرنده، و بویژه جمعیت سایر باکتری‌های دستگاه گوارش (اثرات متقابل اجزای فلور میکروبی بر هم) است [۱، ٤ و ٦]. بنابراین نتایج فوق باید به عنوان یک مورد خاص بیان شده و در هنگام ارائه نتایج مربوط به جمعیت یک باکتری خاص در دستگاه گوارش، شرایط عوامل موثر بر جمعیت این باکتری در نظر گرفته شود. در واقع هدف اصلی این آزمایش، بررسی کارآیی شیوه PCR در تعیین جمعیت

نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور بود. تکثیر ژن هدف در باکتری‌های جنس *سالمونلا* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پیش از این توسط پژوهشگران دیگر [۷ و ۱۹] گزارش شده است. بنابراین با توجه به بررسی‌های انجام گرفته می‌توان گفت امکان شناسایی دقیق و سریع باکتری‌های جنس *سالمونلا* با استفاده از قطعه خاصی از ژن 16S rDNA به طور کامل وجود دارد. همچنین پژوهشگران [۲۹] تنوع فلور میکروبی دستگاه گوارش طیور را تأیید کرده بودند. آنها توانستند مجموعاً ۱٦٥٦ توالی نوکلئوتیدی با منشاء ژن‌های 16S rRNA از باکتری‌های موجود در محتویات و باکتری‌های چسبیده و یا فرو رفته در لایه مخاطی روده کور جوجه‌های گوشتی بدست آورند. هرچند تا کنون گزارشی از تعیین جمعیت باکتری‌ها به روش PCR منتشر نشده است، لیکن اخیراً استفاده از تکنیک PCR (دنسیتومتری) در پزشکی و بویژه در سنجش تراکم استخوان و مسائل پیرامون بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۸، ۱۸، ۲۱ و ۲٤]. یکی از نکاتی که باید در انجام آزمون PCR (دنسیتومتری) به آن توجه نمود، این است که همواره همه‌ی DNAهای هدف با کارآیی یکسانی تکثیر نمی‌شوند. در واقع یک DNA هدف وقتی در یک نمونه وجود داشته باشد، نسبت به وقتی که در نمونه دیگری وجود دارد همیشه همان میزان محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را تولید نمی‌کند. بر این اساس باید همه نکات فوق در انجام آزمایش به دقت مورد توجه قرار گیرد تا نتایج دقیقی بدست آید. یکی از مهمترین محدودیت‌های این شیوه، این است که چون در این روش از DNA پایه‌ای استفاده می‌شود که مقادیر باکتری در هر نانوگرم آنها متفاوت است، بنابراین در شروع PCR، مقادیر DNA متفاوتی در تیمارهای مختلف وجود دارد که سبب می‌شود تکثیر DNA در تیمارهای مختلف با سرعت و کارآیی متفاوتی انجام شود. در نتیجه نمی‌توان با مقایسه مقدار کمّی محصولات PCR، دربارهٔ مقدار اولیه نمونه در تیمارهای مورد بررسی به‌طور قطع اظهار نظر کرد. برای رفع این مشکل می‌توان در ابتدای آزمایش، با استفاده از روش‌هایی نظیر اسپکتروفتوتری، مقدار DNA تیمارهای مختلف را سنجید و پس از رساندن به یک مقدار پایه، با استفاده از مقادیر یکسانی از جمعیت بعنوان DNA پایه، واکنش PCR را انجام داد و نتایج را متناسب با رقت نمونه اولیه تفسیر نمود. در این صورت امکان مقایسه مقدار کمّی محصولات PCR جهت قضاوت درباره مقدار جمعیت‌های پایه وجود دارد. بنابراین در صورت طراحی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهینه شده، امکان مقایسه نتایج این واکنش از طریق تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش PCR (دنسیتومتری) وجود دارد.

یکی دیگر از معایب PCR (دنسیتومتری) این است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این روش برای تعیین تعداد نسخه‌های DNA هدف بکار می‌رود. اما برای معتبر بودن داده‌های آن لازم است کنترل‌های داخلی وجود داشته باشد که دستیابی به این کنترل‌ها مشکل است و همچنین باید برای هر ریزسازواره خاص، یک کنترل مجزا طراحی شود. بنابراین نمی‌توان به تنهایی از تراکم باند برای تعیین کمّی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده کرد. همچنین معمولاً مقدار دی.ان.اِی هدف متناسب با دی.ان.اِی تکثیر شده نیست. بعنوان نمونه معمولاً هزار نسخه از یک DNA هدف تا صدهزار نسخه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ایجاد می‌کند. محدودیت دیگر این روش این است که همه دی.ان.اِهای هدف با کارآیی یکسانی تکثیر نمی‌شوند. در واقع یک دی.ان.اِی هدف وقتی در یک نمونه وجود داشته باشد، نسبت به وقتی که در نمونه دیگری وجود دارد همیشه همان میزان محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را تولید نمی‌کند. عیب دیگر این روش این است که توالی‌های کوتاهتر معمولاً بهتر از توالی‌های بلندتر تکثیر می‌شوند. این امر وقتی مقدار محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از توالی‌های با طول متفاوت، با هم مقایسه می‌شوند از اهمیت بیشتری برخوردار می‌شود. مشکل دیگر این است

که تعداد نسخه ژن‌های 16S rRNA در باکتری‌های مختلف فرق می‌کند و برخی باکتری‌ها دو و برخی بیش از دوازده نسخه دارند. همچنین تفاوت کیفیت DNA نمونه‌ها با یکدیگر هم سبب می‌شود که مقادیر متفاوتی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تولید شود که سبب بروز خطا در تعیین جمعیت میکروبی می‌شوند. به دلایل فوق امکان بررسی و مقایسه باکتری‌های مختلف با یکدیگر حتی در قالب یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هم قابل تأمل است.

نتیجه‌گیری

بنابراین نتایج بدست آمده نشان‌دهنده متغیر بودن جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا* در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور و نیز امکان استفاده از روش تراکم‌سنجی برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های *سالمونلا* است. توصیه می‌شود استفاده از این روش برای بررسی‌های روتین در کلنیک‌ها و آزمایشگاه‌های دامپزشکی توسعه یابد تا بتوان به سرعت در سطح گله‌ی در حال پرورش، بر موارد و سطح جمعیت نسبی و میزان آلودگی به *سالمونلا* نظارت کرده و در صورتی‌که میزان آلودگی از حد معینی بیشتر بود، اقدامات درمانی را آغاز کرد. استفاده از تراکم‌سنجی در مورد سایر بخش‌های دستگاه گوارش و نیز سایر اندام‌ها و لاشه طیور نیز به عنوان جایگزین روش‌های سنتی مبتنی بر کشت میکروبی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج طرح پژوهشی «تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس *سالمونلا*، کلستریدیوم و باکتری اشریشیا کلی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور» استخراج شده است که اعتبار آن از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت تأمین گردیده است. بدین‌وسیله از مسئولین محترم دانشگاه برای حمایت و تأمین هزینه‌های طرح سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- صیداوی، ع. ر. ۱۳۸٦. شناسایی برخی باکتری‌های روده کور (سکوم) دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. رساله دکتری تخصصی علوم دامی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۳۱۷ صفحه.

2- Adak, G.K., S.M. Long, S.J. O'Brien (2002), Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992-2000. *Gut*, 51: 832-841.

3- Altekruse, S.F., M.L. Cohen, D.L. Swerdlow (1997), Emerging foodborne diseases. *Emergency Infectious Diseases*, 3: 285-293.

4- Amit-Romach, E., D. Sklan, Z. Uni (2004), Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*, 83: 1093-1098.

5- Apajalahti, J., A. Kettunen, H. Graham (2004), Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60: 223-232.

6- Bailey, J.S., N.J. Stern, P.J. Fedorka-Cray, S.E. Craven, N.A. Cox, D.E. Cosby, S. Ladely, M.T. Musgrove (2001), Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation. *Journal of Food Protection*, 64(11): 1690-1697.

7- Bennett, A.R., D. Greenwood, C. Tennant, C.G. Banks, R.P. Betts (1998), Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 437-441.

8- Binkowski, M., E. Tanck, M. Barink, W.J. Oyen, Z. Wrobel, N. Verdonschot (2008), Densitometry test of bone tissue: Validation of computer simulation studies. *Computers in Biology and Medicine*, 38(7): 755-764.

9- Boyd, E.F., F.S. Wang, T.S. Whittam, P.K. Selander (1996), Molecular genetic relationships of the salmonellae. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 804-808.
10- Bromage, E.S., S.L. Kaattari (2007), Simultaneous quantitative analysis of multiple protein species within a single sample using standard scanning densitometry. *Journal of Immunological Methods*, 323: 109-113.
11- EC (European Commission) (2002), Trend and sources of zoonotic agents in animals, feedstuffs, food and man in the European Union and Norway to the European Commission in accordance with article 5 of the directive 92/117/EEC, prepared by the community reference laboratory on the epidemiology of zoonoses. Berlin, Germany.
12- Enzmann, H., C. Wiemann, H.K. Ahr, G. Schluter (1999), Damage to mitochondrial DNA induced by the quinolone Bay y 3118 in embryonic turkey liver. *Mutation Research*, 425: 213-224.
13- Garcia del Portillo, J.A. (2000), Molecular and cellular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: Cary, J.W., Linz, J.E. and Bhatnagar, D. (Eds). Microbial foodborn diseases. Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. Technomic Publishing Company, Lancaster, USA. Pp: 3-86.
14- Harris, I.T., P.J. Fedorka-Caray, J.T. Gray, J.T., L.A. Thomas, K. Ferris (1997), Prevalence of *Salmonella* organisms in swine feed. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 1210(3): 382-385.
15- Helmick, C.G., P.M. Griffin, D.G. Addiss, R.V. Tauxe, D.D. Juranek (1994), Chapter 3. In: Everhardt, and James, E. (Eds). Digestive disease in the United States: Epidemiology and impact. U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Pp: 85-123.
16- Hooper, L.V., M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk, J.L. Gordon (2001), Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291: 881-884.
17- Humphrey, T. (2000), Public-health aspect of *Salmonella* infection. In: Way, C. and Way, A. (Eds). *Salmonella* in domestic animals. CABI Publishing, Oxon. UK. pp. 245-263.
18- Miller, P.D (2008), Skeletal Health and Bone Strength: DXA and Beyond Growth for the Journal of Clinical Densitometry. *Journal of Clinical Densitometry*, 11(1): 1-5.
19- Mirhosseini, S.Z., A.R. Seidavi, M. Shivazad, M. Chamani, A. A. Sadeghi, R. Pourseify (2009), Detection of *Salmonella* spp. in Gastrointestinal Tract of Broiler Chickens by Polymerase Chain Reaction. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 15(6): 965-970.
20- Myint, M.S., Y.J. Johnson, N.L. Tablante, R.A. Heckert (2006), The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*, 23:599-604.
21- Riekkinen, M.A., H.J. Töyräs, J.S. Jurvelin (2008), Dual-Frequency Ultrasound- New Pulse-Echo Technique for Bone Densitometry. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(10): 1703-1708
22- Roberts, T.A., A. C. Baird-Parker, and B. B. Tompkin (1996), Microorganisms in food, Characteristics of microbial pathogens. Blackie Academic and Professional. London, UK.
23- Sackey, B.A., P. Mensah, E. Collison, E. Sakyi-Dawson (2001), *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan. *Accra International Journal of Food Microbiology*, 71: 21-28.
24- Tan, H.Y., T. Wahng (2008), Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels. *Optics Communications*, 281(10): 3013-3017.
25- Threlfall, J., L. Ward, D. Old (1999), Changing the nomenclature of

Salmonella. *Communication in Disease Publication of Hearth*, 2: 156-157.
26- WHO (World Health Organization) (2001), WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. 7th report 1993-1998. Schmidt, K. and Tirado, C. (Eds). Federal institute for health protection of consumers and veterinary medicine. Berlin, Germany.
27- Zarlenga, D.S., J. Higgins (2001), PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 101: 215-230.
28- Zhang, H., J. Xu, J. Wang, M. Mnghebilige, T. Sun, H. Li, M. Guo (2007), A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China. *Food Control*, doi:10.1016/j.foodcont.2007.06.010.
29- Zhu, X.Y., T.Z. Yoga Pandya, R.D. Joerger (2002), 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, 68: 124-137.
30- Ziemer, C.J., S.R. Steadham (2003), Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. *Letters of Applied Microbiology*, 37: 463-469.