Archive of SID

کاربرد دنسیتومتری ژنومی برای محاسبه جمعیت نسبی باکتری *اشریشیا کلی* در روده جوجه‌های گوشتی

علیرضا صیداوی[1*]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: alirezaseidavi@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۰، پذیرش نهایی: ۸۸/۶/۱)

چکیده

در این مطالعه روش دنسیتومتری برای محاسبه جمعیت نسبی باکتری‌های *اشریشیا کلی* در بخش‌های مختلف روده جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. پس از آماده‌سازی نمونه‌های محتویات گوارشی، فرآیند خالص‌سازی و استخراج DNA محتویات دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور صورت گرفت. با استفاده از دو جفت آغازگر رفت و برگشت، یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی جهت شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها انجام گردید. با مقایسه و تجزیه و تحلیل باندهای مرئی شده بر اساس رویه رگرسیون خطی با برون‌یابی با استفاده از تکنیک دنسیتومتری و نرم‌افزار Gel Proc Analyzer، تراکم باندهای اختصاصی باکتری‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمد. جمعیت این باکتری در سنین مختلف هم به تفکیک بخش‌های متفاوت دستگاه گوارش جوجه‌ها تعیین شد. نتایج آزمایش نشان داد ۰/۰۰۰۰۰۴ درصد باکتری‌های دوازدهه، ۰/۰۷ درصد کل باکتری‌های ژئوژنوم، ۰/٦٤ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم و ۲/۵۱ درصد باکتری‌های روده کور متعلق به گونه *اشریشیا کلی* بودند. همچنین باکتری *اشریشیا کلی* در چهار روزگی، ۱/۷٦ درصد کل باکتری‌ها، در چهارده روزگی ۰/۰۱ درصد کل باکتری‌ها و در سی روزگی ۰/۸۰ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها را تشکیل می‌دهند. علاوه بر این معلوم شد در چهار روزگی در ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور به ترتیب ۰/۳۰، ۲/۰۵ و ۳/۹۷ درصد کل باکتری‌ها از گونه *اشریشیا کلی* بوده و در دوازدهه این باکتری وجود نداشت. در چهارده روزگی هم در ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور به ترتیب ۰/۰۰۰۰۰۹، ۰/۰۰۰۱۱ و ۰/۰۸ درصد کل باکتری‌ها از گونه *اشریشیا کلی* بودند و در دوازدهه این باکتری وجود نداشت. در سی روزگی هم در دوازدهه، ایلئوم و روده کور به ترتیب ۰/۰۰۰۱۱، ۰/۰۰۹ و ۲/٤۰ درصد کل باکتری‌ها از گونه *اشریشیا کلی* بودند و در ژئوژنوم این باکتری وجود نداشت. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی شیوه دنسیتومتری مبتنی بر نتایج PCR را می‌توان روشی سودمند برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* دستگاه گوارش طیور دانست.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۱، ٤۲۰-٤۱۱.

کلمات کلیدی: دنسیتومتری، *اشریشیا کلی*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جوجه

مقدمه

باکتری *اشریشیا کلی* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی از جمله گوشت طیور هستند. *اشریشیا کلی* دارای چندین پاتوتیپ مهم نظیر پاتوتیپ‌های تولیدکننده توکسین Shiga (STEC)، توکسین Verocytotoxin (VTEC)، و انتروهموراژیک (EHEC) است که از عوامل بیماری‌زای مهم در انسان محسوب می‌شوند و منشأ حیوانی دارند. این باکتری‌ها سبب بروز اسهال خونی، خونریزی و التهاب کولون، و سندرم اورمیک همولیتیک در انسان می‌شوند

www.SID.ir

Archive of SID

(۱ و ۲). *اشریشیا کلی* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده در سراسر جهان شناخته می‌شود که این آلودگی عمدتاً ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری‌های مدفوع دفع شده از دستگاه گوارش حیوانات میزبان است. روش‌های سنتی بررسی و تعیین جمعیت *اشریشیا کلی* نظیر استفاده از محیط‌های کشت غنی‌شده، انتخاب پرگنه‌های باکتریایی، تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی جدایه‌ها و تعیین نشانگرهای حدّت بیماری‌زایی باکتری (۱۹) مستلزم صرف زمان زیاد هستند و نسبت به روش‌های جدید از دقت کمی برخوردار می‌باشند. بر این اساس سیر تحقیقات کنونی درباره باکتری‌های دستگاه گوارش به سمت استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی و توالی‌های DNA باکتری‌ها پیش می‌رود و پیش‌بینی می‌شود در آینده نزدیک بسیاری از این نوع روش‌ها جایگزین شیوه‌های سنتی غیر مبتنی بر ژنتیک مولکولی خواهند شد. البته در هر صورت، کشت میکروبی روشی استاندارد و طلایی باقی خواهد ماند. روش دنسیتومتری هم از جمله روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی است که تاکنون کاربرد آن در بررسی جمعیت باکتریایی گزارش نشده است و در این تحقیق برای اولین بار کاربرد آن در تعیین جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش طیور بررسی می‌شود. اخیراً مقدار آنزیم پروتئینی مؤثر در فیبروبلاست‌ها با استفاده از روش دنسیتومتری اندازه‌گیری شده است (٦). کاربرد دنسیتومتری در اندازه‌گیری عناصر آهن و گوگرد رسوبات و پسماندها هم گزارش شده است (۵). لیکن هنوز گزارشی از اندازه‌گیری جمعیت باکتریایی با استفاده از روش دنسیتومتری منتشر نشده است.

هدف از این تحقیق بررسی و کاربرد روش دنسیتومتری برای محاسبه جمعیت نسبی باکتری‌های اشریشیا کلی در بخش‌های مختلف روده جوجه‌های گوشتی بود تا با استفاده از روشی سریع، کم‌هزینه، مناسب و غیر مبتنی بر کشت میکروبی، جمعیت نسبی باکتری‌های *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی محاسبه شود و در آینده بتوان از چنین روشی برای تعیین جمعیت نسبی سایر باکتری‌ها در دستگاه گوارش و حتی لاشه طیور استفاده کرد.

مواد و روش‌کار

جوجه‌های گوشتی در شرایط استاندارد پرورش داده شده و تعداد ٢٤ جوجه در سنین چهار، چهارده و سی روزگی کشتار شدند. حفره بطنی عمود بر خط میانی و در ناحیه شکمی با چاقوی جراحی باز شده و کل دستگاه گوارش در شرایط استریل از حفره شکمی خارج شد. دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور داخل کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار داده شدند و روی یخ قرار گرفتند. انتهاهای باز باریک سکوم‌ها و انتهاهای سه بخش دیگر، توسط قیچی استریل بریده شد و سریعاً یک گرم از محتویات هر بخش داخل لوله فالکون پانزده میلی‌لیتری استریل حاوی نه میلی‌لیتر PBS (Phosphate-Buffered Saline) استریل با pH=٧/٤ که با برچسب علامتگذاری شده بودند ریخته شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. در کلیه این مراحل با رعایت دقیق شرایط استریل، دقت شد از ورود آلودگی ثانویه به نمونه‌های تهیه شده و نیز انتقال ریزسازواره‌ها بین نمونه‌ها جلوگیری شود.

پس از آماده‌سازی نمونه‌های محتویات گوارشی، فرآیند خالص‌سازی و استخراج DNA محتویات دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور با استفاده از روش Seidavi و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد (۱۷). سپس برای اطمینان از این‌که DNA که هدف اصلی استخراج و نمونه اولیه برای واکنش‌های PCR است، به‌خوبی استخراج شده است، DNA همهٔ نمونه‌های استخراج شده، روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Bio-Rad) بارگذاری شد.

در این آزمایش برای شناسایی باکتری *اشریشیا کلی*، از یک جفت آغازگر رفت (GACCTCGGTTTAGTTCACAGA) و برگشت (CACACGCTGACGCTGACCA) با محصولی به

www.SID.ir

Archive of SID

طول ۵۸۵ جفت باز ارائه شده در منبع Seidavi و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۱۷). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی اختصاصی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و نیز انجام یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها با استفاده از یک جفت آغازگر رفت (CGTGCCAGCCGCGGTAATACG) و برگشت (GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT) با محصولی به طول ٦١١ جفت باز از روش ارائه شده توسط Seidavi و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۱۷). سپس مقدار دو میکرولیتر بافر بارگذاری به شش میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های محصولات PCR مورد استفاده در آزمایش اضافه و کنترل منفی (آب دوبار تقطیر) و مثبت (*E.coli* O157:H7) تهیه شده از بخش ریزسازواره‌ها و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور) و نشانگر اندازه نیز بارگذاری شدند. دستگاه الکتروفورز با جریان ۷۵ ولت به‌مدت ۱/۵ ساعت راه‌اندازی گردید. سپس ژل از دستگاه الکتروفورز خارج شد و زیر نور ماورای بنفش توسط نرم‌افزار BioDocAnalyze عکسبرداری شد.

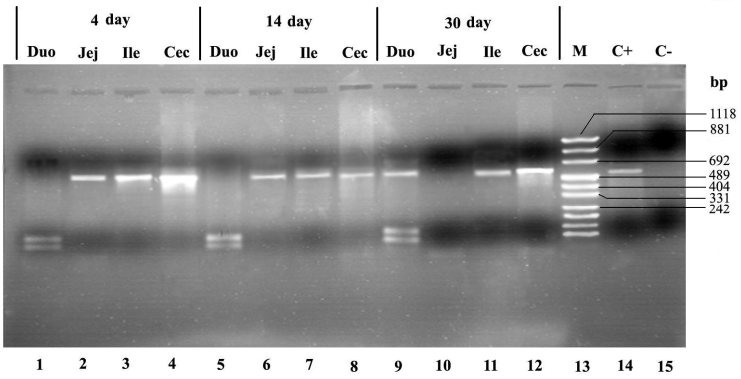
در مرحله بعد با مقایسه و تجزیه و تحلیل باندهای مرئی شده، جمعیت نسبی باکتری‌های *اشریشیا کلی* به‌صورت درصدی از کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها به‌دست آمد. بدین منظور علاوه بر دو رویهٔ نقطه به نقطه با برون‌یابی و رگرسیون خطی با برون‌یابی، خروجی‌های شدت باند و مقدار متوسط هم برآورد شد و در نهایت با توجه به واریانس خروجی‌های هر روش، رویه رگرسیون خطی با برون‌یابی به‌خاطر داشتن کمترین واریانس، برای بررسی پراکنش کمّی باکتری‌ها به‌کار رفت. به این منظور با استفاده از تکنیک دنسیتومتری و نرم‌افزار Gel Proc Analyzer تراکم باندهای اختصاصی باکتری‌های *اشریشیا کلی* به‌دست آمد. همچنین تراکم باندهای اختصاصی برای همه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش هم برآورد شد. در این مرحله تراکم باندهای اختصاصی *اشریشیا کلی*، نسبتی از تراکم باند مربوط به کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها بود. تراکم باند مربوط به *اشریشیا کلی* نسبت به باند اختصاصی کلیه باکتری‌های دستگاه گوارش، سبب تعیین درصد باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در دستگاه گوارش گردید. محاسبات فوق در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور نیز به تفکیک انجام گردید.

نتایج

نتیجه آزمایش نشان داد DNA با کیفیت بالایی استخراج و خالص‌سازی شده است. طبق نتایج این آزمایش ابتدا یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی کلیه باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دیگر برای شناسایی عمومی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها انجام شد (۱۷). سپس با استفاده از تکنیک دنسیتومتری، جمعیت نسبی باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش طیور برآورد شد و مشخص گردید چه درصدی از کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی متعلق به گونه *اشریشیا کلی* هستند که اطلاعات به‌دست آمده در ادامه این بخش ارائه شده است. البته در این آزمایش از روش کشت میکروبی و شمارش مبتنی بر کشت استفاده نشد و فقط نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکنیک دنسیتومتری ژنومی مورد مطالعه قرار گرفت (نگاره ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



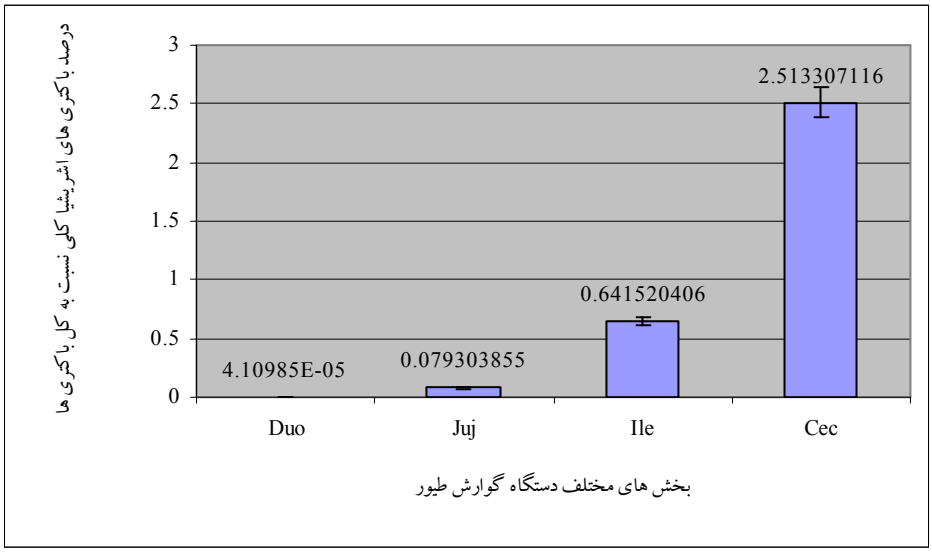
نگاره ۱- تصویر ژل نتایج الکتروفورز محصولات PCR برای شناسایی باکتری *اشریشیا کلی*، ستون‌های ۱-۱۲: محصولات تکثیر DNA باکتری *اشریشیا کلی*؛ ستون ۱۳: (M) نشانگر استاندارد وزن مولکولی (اعداد نشانگر طول باند فرضی و فقط به‌عنوان خط‌کش استاندارد هستند)؛ ستون ١٤: DNA تکثیر شدهٔ کنترل مثبت؛ ستون ۱۵: DNA تکثیر شدهٔ کنترل منفی؛Duo: دوازدهه Jej: ژوژنوم Ile: ایلئوم Cec: روده کور

جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش:

نتایج به دست آمده از این تحقیق توانست درصد باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی نشان دهد. بر این اساس ۰/۰۰۰۰۰٤ درصد باکتری‌های دوازدهه متعلق به گروه *اشریشیا کلی* بودند. در ژئوژنوم هم ۰/۰۷ درصد کل باکتری‌ها متعلق به این گونه بوده و ۰/٦٤ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم هم از گروه *اشریشیا کلی* بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور هم ۲/۵۱ درصد آن‌ها متعلق به گروه *اشریشیا کلی* بودند (نمودار ۲).

www.SID.ir

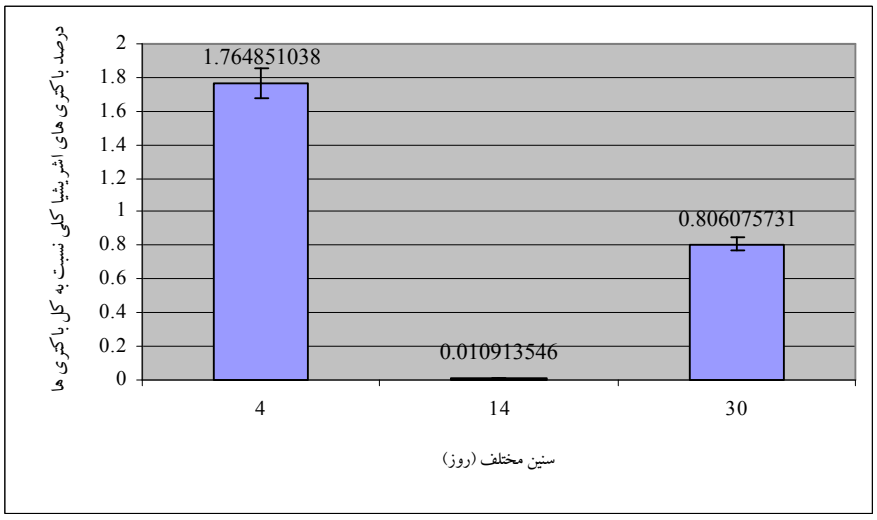
Archive of SID



نمودار۲- جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف:

بر اساس یافته‌های دنسیتومتری مشخص شد در چهار روزگی، ۱/۷۶ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها، باکتری *اشریشیا کلی* هستند. این باکتری‌ها ۰/۰۱ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها در چهارده روزگی را تشکیل می‌دهند. در سی روزگی نیز باکتری *اشریشیا کلی*، ۰/۸۰ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها را تشکیل می‌دهند (نمودار ۳).



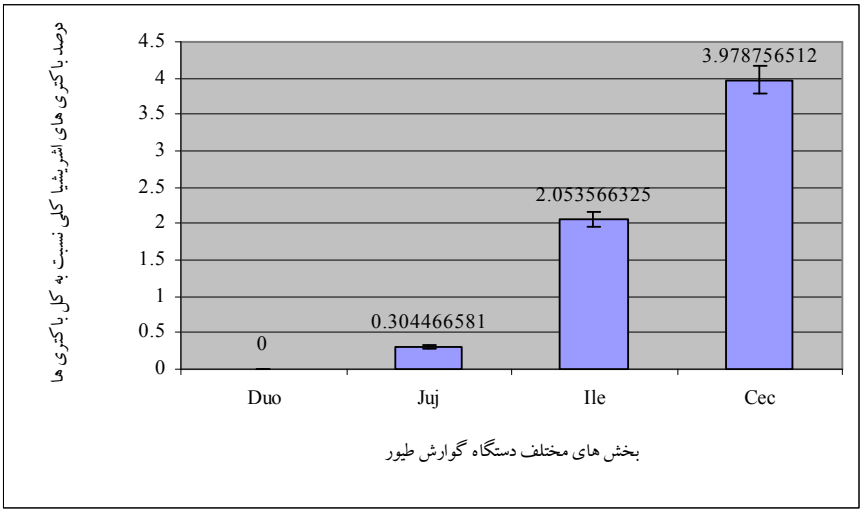
نمودار ۳- جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش:

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، درصد باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سن چهار روزگی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به دست آمد. بر این اساس سن چهار روزگی، باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* در دوازدهه جوجه‌ها وجود نداشتند. همچنین در سن چهار روزگی، در ژئوژنوم هم ۰/۳۰ درصد کل باکتری‌ها متعلق به این گونه بوده و ۲/۰۵ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم در سن چهار روزگی از گروه *اشریشیا کلی‌ها* بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور در سن چهار روزگی، ۳/۹۷ درصد آن‌ها متعلق به گروه *اشریشیا کلی* بودند (نمودار ٤).



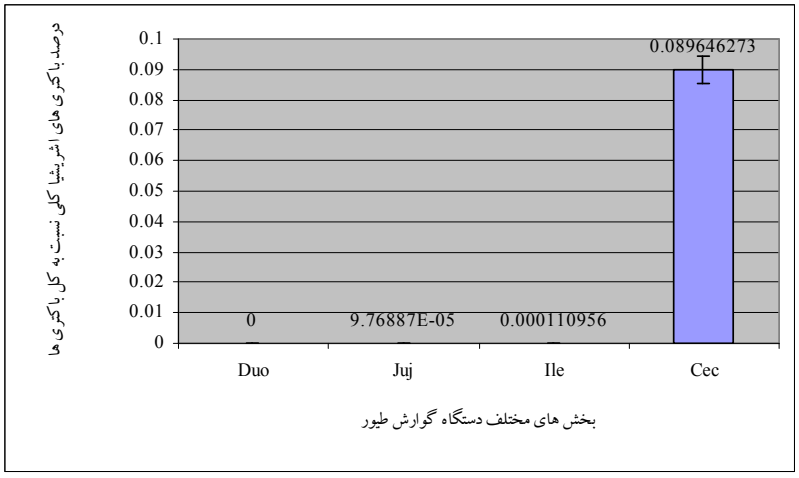
نمودار ٤- جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش:

بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در چهارده روزگی، باکتری‌های گروه *اشریشیا کلی* در دوازدهه وجود نداشتند. در این سن، باکتری *اشریشیا کلی* ۰/۰۰۰۰۰۹ درصد باکتری‌های ژئوژنوم را تشکیل می‌دادند و این مقدار در ایلئوم به ۰/۰۰۰۱۱ درصد و در روده کور به ۰/۰۸ درصد کل باکتری‌ها رسید (نمودار ٥).

www.SID.ir

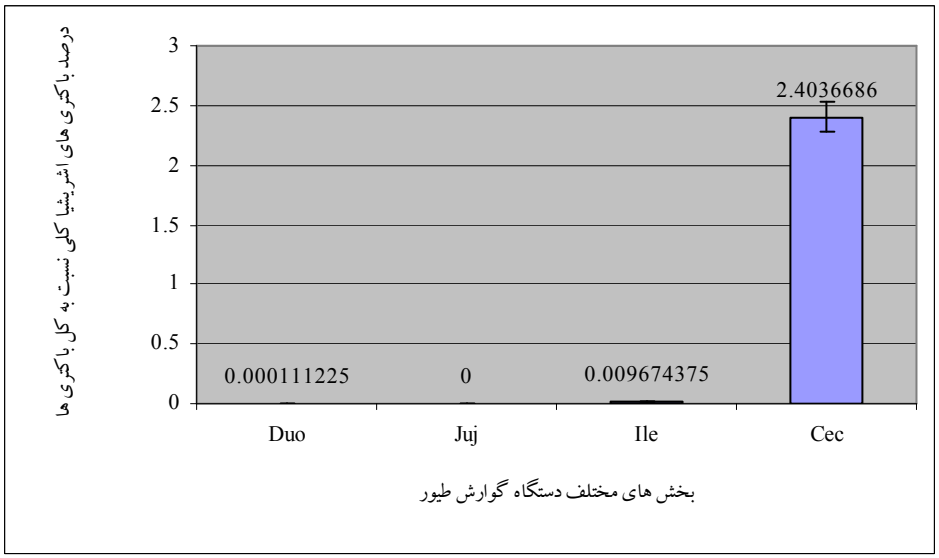
Archive of SID



نمودار ۵- جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش:

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، درصد باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سن سی روزگی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به‌دست آمد. بر این اساس ۰/۰۰۰۱۱ درصد باکتری‌های دوازدهه در سن سی روزگی متعلق به گروه *اشریشیا کلی* بودند. همچنین در این سن، در ژئوژنوم باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* وجود نداشتند. همچنین ۰/۰۰۹ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم در سن سی روزگی از گروه *اشریشیا کلی ها* بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور در این سن، ۲/٤۰ درصد آن‌ها متعلق به گروه *اشریشیا کلی* بودند (نمودار ٦).



نمودار ٦- جمعیت باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصله نشان می‌دهد که تکنیک دنسیتومتری مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را می‌توان روشی مفید و سودمند برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* نسبت به کل باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش طیور دانست که لازم است با توسعه آن و رفع معایب تکنیکی این شیوه، به تدریج جایگزین روش‌های سنتی نظیر کشت میکروبی شود. البته در این آزمایش از روش کشت میکروبی و شمارش مبتنی بر کشت استفاده نشد و فقط نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکنیک دنسیتومتری ژنومی مورد مطالعه قرار گرفت، بنابراین نمی‌توان به‌طور یقین برتری روش دنسیتومتری نسبت به کشت میکروبی را بیان کرد. بنابراین توصیه می‌شود در پژوهش‌های آتی، نتایج روش کنونی با روش‌های کشت میکروبی مقایسه شود. نتایج این آزمایش، امکان تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی نسبت به کل باکتری‌های موجود در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش با استفاده از تکنیک دنسیتومتری را تأیید می‌کند. البته باید به این مسأله توجه شود که هدف از این تحقیق، توسعه کاربرد استفاده از تکنیک دنسیتومتری در تعیین جمعیت باکتری‌ها بود و گونه *اشریشیا کلی* 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 دنسیتومتری، همانند آن‌چه در این آزمایش انجام شد، اقدام به تعیین جمعیت آن باکتری جنس، گونه یا سویه نمود. این روش از سرعت و دقت نسبتاً بیشتری در مقایسه با روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی داشته و نیاز به استفاده از محیط کشت میکروبی ندارد و در صورت تجاری‌سازیِ این نوع روش‌ها، نیروی کار و هزینه کمتری نیز به‌دنبال خواهد داشت.

پیش از این از تکنیک دنسیتومتری برای بررسی کنتیک اسیدهای صفراوی (۲۰)، اثرات متقابل پپتیدهای ضدمیکروبی با غشاهای بیولوژیکی (۸) و بررسی آمین‌های بیوژنیک (۱۸) استفاده کرده بودند. اخیراً هم استفاده از تکنیک دنسیتومتری در پزشکی و به‌ویژه در سنجش تراکم استخوان و مسائل پیرامون بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱٤ و ۲۲).

از مزایای روش به‌کار رفته در این تحقیق، سهولت کاربرد، سرعت بالا، دقت بالا، تکرارپذیری زیاد و هزینه نسبتاً پایین آن است که قبلاً توسط Boluda و همکاران (۱۹۹۹) و Bromage و Kaattari (۲۰۰۷) در مورد موضوعاتی غیر از باکتری هم گزارش شده بود (۳ و ٤). یکی از نکاتی که باید در انجام آزمون دنسیتومتری به آن توجه نمود، این است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این روش برای تعیین تعداد نسخه‌های DNA هدف به‌کار می‌رود. لذا برای معتبر بودن داده‌های حاصل لازم است کنترل‌های داخلی وجود داشته باشد که دستیابی به این کنترل‌ها در برخی موارد مشکل است و همچنین باید برای هر ریزسازوارهٔ خاص، یک کنترل مجزا طراحی شود. در غیر این‌صورت نمی‌توان به تنهایی از تراکم باند برای تعیین کمّی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده کرد. همچنین استفاده از سیستم‌های تصویربرداری پیشرفته لیزر دنسیتومتر، دوربین‌های کالیبره شده و سیستم بسیار جدید LiCor Odyssey و نیز رقیق‌سازی نمونه عواملی هستند که سبب می‌شوند دقت نتایج کمّی‌سازی افزایش یافته و میزان خطای آن به کمتر از ۱± درصد برسد (٤).

با توجه به خروجی‌های مختلفی که تجزیه و تحلیل باندهای اختصاصی باکتری‌ها در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش در سنین مختلف ایجاد می‌کند، می‌توان میزان انحراف معیار خروجی‌های مختلف را بررسی و با یکدیگر مقایسه کرد. در این شیوه، خروجیِ دارای کمترین انحراف معیار می‌تواند به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان بهترین خروجی انتخاب و در تفسیر نتایج به‌دست آمده مورد استفاده قرار گیرد که در این تحقیق هم رویه رگرسیون خطی نسبت به رویه نقطه به نقطه، شدت باند و مقدار متوسط دارای کمترین انحراف معیار بود و به‌عنوان بهترین خروجی برای تفسیر جمعیت نسبی باکتری‌ها در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش در سنین مختلف انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. نکته دیگری که باید به آن توجه شود 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. بر این اساس باید همه نکات فوق در انجام آزمایش به دقت مورد توجه قرار گیرد تا نتایج دقیقی به‌دست آید. پیش از این Valcour و همکاران (۲۰۰۲)، Kaper و همکاران (۲۰۰٤)، La Ferla و همکاران (۲۰۰٤)، Rhodes (۲۰۰۷)، و Sasaki و همکاران (۲۰۰۷) بررسی‌های مشابهی درباره باکتری‌های اشریشیا کلی در بدن انسان و دام انجام داده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۷، ۱۰، ۱۵، ۱٦ و ۲۱). لیکن هیچ یک از محققان فوق از روش دنسیتومتری برای تعیین جمعیت باکتری‌های *اشریشیا کلی* استفاده نکرده‌اند و تحقیق حاضر را می‌توان اولین گزارش در این زمینه دانست.

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 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 اطلاع از جمعیت نسبی این باکتری‌ها را ضروری می‌سازد. 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 آشنا 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 به‌دست آید تا بتوان برنامه‌ریزی‌های لازم جهت کنترل و کاهش جمعیت آن‌ها را انجام داد. اکثر روش‌های تعیین جمعیت باکتری‌ها در حال حاضر مبتنی بر رقیق‌سازی متوالی نمونه‌ها 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 گردد تا جمعیت باکتری به‌دست آید. این روش ضمن این‌که بسیار وقت‌گیر و گاه مستلزم چند روز انتظار برای حصول نتیجه است، در موارد زیادی هم از دقت زیادی برخوردار نیست، به‌عنوان مثال احتیاجات بسیاری از باکتری‌ها دقیقاً شناخته نشده است و لذا ممکن است به‌خوبی در محیط کشت رشد نکنند و در شمارش خطا ایجاد شود.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی شیوه دنسیتومتری مبتنی بر نتایج PCR را می‌توان روشی سودمند برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های گونه *اشریشیا کلی* دستگاه گوارش طیور دانست که لازم است مورد توجه بیشتری قرار گرفته و پس از بررسی‌های بیشتر و رفع معایب احتمالی، به‌تدریج در آزمایشگاه‌ها و کلنیک‌های پزشکی و دامپزشکی جایگزین شیوه‌های سنتی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج طرح پژوهشی «تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس سالمونلا، کلستریدیوم و باکتری *اشریشیاکلی* 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.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

1. Altekruse, S.F., Cohen, M.L. and Swerdlow, D.L. (1997): Emerging foodborne diseases. Emerg. Infect. Dis., 3: 285-293.
2. Armstrong, G.L., Hollingsworth, J. and Morris, J.G. (1996): Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. Epidemiol. Rev., 18: 29-51.
3. Boluda, L., Sastre, J., Casanovas, M. and Fernandez-Caldas, E. (1999): Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry, validation by skin-prick testing. J. Immunol. Methods, 223: 17-23.
4. Bromage, E.S. and Kaattari, S.L. (2007): Simultaneous quantitative analysis of multiple protein species within a single sample using standard scanning densitometry. J. Immunol. Methods, 323: 109-113.
5. Jezequel, D., Brayner, R., Metzger, E., Viollier, E., Prevot, F. and Fievet, F. (2007): Two-dimensional determination of dissolved iron and sulfur species in marine sediment pore-waters by thin-film based imaging: Thau lagoon (France). Estuarine. Coastal. Shelf. Sci., 72: 420-431.
6. Jobin, M.C., Virdee, I., McCulloch, C.A. and Ellen, R.P. (2007): Activation of MAPK in fibroblasts by *Treponema enticola* major outer sheath protein. Biochem. Biophys. Res. Comm., 356: 213-218.
7. Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol., 2: 123-140.
8. Krivanek, R., Rybar, P., Prenner, E.J., McElhaney, R.N. and Hianik, T. (2001): Interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with dimyristoyl–phosphatidylcholine bilayer membranes: a densitometry and sound velocimetry study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes, 1510(1-2): 452-463.
9. Kumar, A.K., Manninder, K. and Kulkarni, S.K. (2008): Estimation of adenosine and its major metabolites in brain tissues of rats using high-performance thin-layer chromatography–densitometry. . Chromatography, 12(1-2): 230-237.
10. La Ferla, K., Seegert, D. and Schreiber, S. (2004): Activation of NF-kB in intestinal epithelial cells by *E. coli* strains isolated from the colonic mucosa of IBD patients. Int. J. Colorectal. Dis., 19: 334-342.
11. Larroudé, M.S., Moggia, M.S., Yantorno, P.D. and Man, Z. (2008): Bone evaluation in Gaucher disease: Radiology and bone densitometry. Bone, 43(6): S129-S130.
12. Lewiecki, E.M, Gordon, C.M., Baim, S., Leonard, M.B., Bishop, N.J., Bianchi, M.L., et al. (2008): International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. Bone. 43(6): 1115-1121
13. Lynn Mann, M., Thornley-Brown, D., Campbell, R., Bell, E., Burroughs, L., Nunnally, N., et al. (2008): The Effect of Peritoneal Dialysate on DXA Bone Densitometry Results in Patients with End-Stage Renal Disease. Clin. Densitometry, 11(4): 532-536.
14. Povoroznyuk, V. and Vayda, V. (2008): Ultrasound densitometry evaluation in postmenopausal women with Colles' fracture Bone, 43(1): S85.
15. Rhodes, J.M. (2007): The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. Gut., 56: 610-612.
16. Sasaki, M., Sitaraman, S. and Babbin, B. (2007): Invasive *Escherichia coli* are a feature of Crohn's disease. Lab. Invest., 87: 1042-1054.
17. Seidavi, A.R., Mirhosseini, S.Z., Shivazad, M., Chamani, M., Sadeghi, A.A. and Pourseify, R. (2009): Detection and investigation on *Escherichia coli* in contents of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers at different ages by PCR. Asia Pacific .Mol. Biol. Biotech., 17(3). In Press.
18. Shakila, R.J., Vasundhara, T.S. and Kumudavally, K.V. (2001): A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. Food Chemistry, 75(2): 255-259.
19. Tarr, P.I. (1995): *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis., 20: 1-8.
20. Tonelli, D., Gattavecchia, E., Mazzella, G. and Roda, A. (1997): Bile acid kinetics in man studied by radio thin-layer chromatography and densitometry coupling. J. Chromatography: Biomedical Sciences and Applications, 700(1-2): 59-66.
21. Valcour, J., Michel, P., McEwen, S. and Wilson, J. (2002): Associations between indicators of livestock farming intensity and incidence of human Shiga toxin-producing *E. coli* infection. Emerging Infectious Diseases, 8(3): 252-257.
22. Xu, H., Li, J., Wu, Q., Xiang, J., Barden, H.S. and Zhou, Q. (2008): Normal reference values for quantitative ultrasound bone densitometry of the calcaneus in Chinese children and adolescents. Bone, 43(Supplement 1): S74.

www.SID.ir