



Detection of Viable But Non-Culturable State of *Escherichia coli* O157:H7 Using Reverse Transcription PCR

Mohammad Khezri¹, Masoud Rezaei^{1*}, Ashraf Mohabbati Mobarez², Mehdi Zolfaghari³

1. Department of Seafood Science, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2. Department of Medical Bacteriology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Department of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Agriculture and Natural Resource University of Gorgan, Gorgan, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/11/15
Accepted: 2019/01/22
Available online: 2019/03/06

Article Subject:

Molecular Bacteriology

IJMM 2019; 12(6): 390-398

Corresponding author:

Masoud Rezaei

Department of Seafood
Science, Faculty of Marine
Sciences, Tarbiat Modares
University, Noor, Iran

Email:

reza_ma@modares.ac.ir

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: Many bacteria including *Escherichia coli* may enter into a viable but non-culturable (VBNC) state under unfavorable stresses, which are unable to be detected by culture-based methods. In this study, the use of Reverse Transcription PCR (RT-PCR) for detection of VBNC state of *E. coli* O157:H7 was investigated.

Materials and Methods: *Escherichia coli* O157:H7 was inoculated in distilled water and 30 percent salt water at room temperature. The cultivability of bacteria was determined using routine culture and colony counting on MacConkey agar. The RT-PCR of 16S rRNA gene involved direct extraction and purification of RNA, DNase I treatment for removing DNA contamination, cDNA synthesis and electrophoresis of PCR products of cDNA was used to detect viable *E. coli* O157:H7 under studied treatments and was compared with the results of RT-PCR of 16S rRNA gene of heat-killed bacteria.

Results: The cultivability of bacteria was maintained during the study period in distilled water; however, the use of 30% NaCl caused the bacteria to be non-cultivable on day 4. The RT-PCR of 16S rRNA showed the positive expression of this gene in cultivable and non-cultivable bacteria during the study period, whereas heat-killed bacteria were negative for this gene, which indicated the efficacy of RT-PCR of 16S rRNA in differentiation of alive from dead bacteria.

Conclusions: *Escherichia coli* O157:H7 entered into the VBNC under 30 percent NaCl which can be associated with serious human health problems. RT-PCR can be used to detect bacteria in the VBNC state.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, Bacteria viability, Reverse Transcriptase PCR

Copyright © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Khezri M, Rezaei M, Mohabbati Mobarez A, zolfaghari M. Detection of Viable But Non-Culturable State of *Escherichia coli* O157:H7 Using Reverse Transcription PCR. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :390-398



شناسایی حالت زنده اما غیرقابل کشت باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* O157:H7) با استفاده از وارونویسی و اکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR)

محمد خضری^۱، مسعود رضائی^{۱*}، اشرف محبتی مبارز^۲ مهدی ذوالفقاری^۳

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲. گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: باکتری‌های متعددی همانند *اشریشیا کلی* تحت شرایط نامساعد می‌توانند وارد حالت زنده اما غیرقابل کشت (VBNC) شوند که با روش‌های تشخیص بر پایه کشت باکتری قادر به شناسایی نیستند. در تحقیق حاضر، وارونویسی و اکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) برای تشخیص باکتری *Escherichia coli* O157:H7 در حالت VBNC بررسی شد. مواد و روش کار: باکتری *E. coli* O157:H7 به تیمارهای آبمقطر و آب‌نمک ۳۰ درصد تلقیح و در دمای اتاق نگهداری شد. کشت‌پذیری باکتری‌ها روی محیط کشت مک کانکی آگار تعیین شد. RT-PCR ژن *16S rRNA* شامل استخراج و تخلیص RNA، تیمار DNase I برای حذف آلودگی DNA و سپس سنتز cDNA و الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های cDNA برای تشخیص زنده‌مانی باکتری *E. coli* O157:H7 تحت تیمارهای مورد مطالعه به کار رفت و با نتایج RT-PCR ژن *16S rRNA* در باکتری‌های کشته‌شده به وسیله حرارت مقایسه شد.

یافته‌ها: کشت‌پذیری باکتری‌ها در تیمار آبمقطر طی مدت مطالعه حفظ شد؛ اما تیمار آب‌نمک ۳۰ درصد باعث کشت‌ناپذیری باکتری در روز چهارم مطالعه شد. نتایج RT-PCR ژن *16S rRNA* بیانگر حفظ بیان این ژن در باکتری‌های کشت‌پذیر و غیرقابل کشت طی مدت مطالعه بود، در حالی که در باکتری‌های کشته‌شده به وسیله حرارت بیان این ژن منفی بود که نشان‌دهنده کارایی RT-PCR ژن *16S rRNA* در تشخیص باکتری‌های زنده از غیرزنده بود.

نتیجه‌گیری: باکتری *E. coli* O157:H7 تحت استرس شوری ۳۰ درصد وارد حالت VBNC شد که می‌تواند باعث مخاطراتی جدی برای سلامت انسان شود. وارونویسی و اکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) می‌تواند برای تشخیص باکتری‌های VBNC به کار رود.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، زنده‌مانی باکتری، وارونویسی و اکنش زنجیره‌ای پلیمرز

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
موضوع:
باکتری شناسی مولکولی
IJMM1397;12(6): 390-398

نویسنده مسئول:

مسعود رضائی

گروه فرآوری محصولات شیلاتی،
دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت
مدرس، نور، ایران

پست الکترونیک:

reza_ma@modares.ac.ir

مقدمه

مدفوعی منابع آبی مختلف و نیز محصولات کشاورزی به این باکتری به‌عنوان منابع خطر این باکتری مطرح هستند (۴، ۱).

باکتری *E. coli* O157:H7 می‌تواند تحت شرایط محیطی مختلف از جمله تغییر دما، pH پایین و ... زنده بماند. همچنین این باکتری همانند تعداد زیاد دیگری از باکتری‌های غیراسپورزا می‌تواند تحت شرایط زیستی نامساعد و سایر استرس‌های شدید وارد

باکتری *Escherichia coli* O157:H7 یک باکتری بیماری‌زای انسانی با منشأ حیوانی است که دارای دوز عفونی پایین حدود ۱۰-۱۰۰ باکتری بوده و می‌تواند موجب بیماری‌های خطرناک و حتی مرگ در انسان شود (۳-۱). حیوانات اهلی و وحشی از مخازن اصلی باکتری *E. coli* O157:H7 به‌شمار می‌آیند. مصرف گوشت چرخ‌شده، شیر خام و سایر فرآورده‌های تولیدشده از گاو، آلودگی

با توجه به نتایج مطالعات انجام گرفته پیرامون القای حالت VBNC در باکتری *E. coli* تحت شرایط گرسنگی و شوری و همچنین با توجه به کاربرد درصد بالای نمک (تا ۳۰ درصد) در فرایندهایی مثل تولید ماهی نمکسود و دودی و نگرانی مضاعف پیرامون القای حالت VBNC در این باکتری به ویژه در مورد تولید ماهی نمکسود از کپور ماهیان که در استخرهای محل پرورش آنها از کودهای حیوانی برای باروری استخرها استفاده می‌شود، مطالعه حاضر به بررسی استفاده از وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) با استفاده از ژن خانه‌دار *16S rRNA* برای شناسایی باکتری *Escherichia coli* O157:H7 در حالت زنده اما غیرقابل کشت القاشده به وسیله استرس شوری اشباع پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه باکتری و آماده‌سازی برای تلقیح به بیمارهای مورد مطالعه

مطالعه حاضر در آزمایشگاه‌های فراوری محصولات شیلاتی و باکتری‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ انجام شد. باکتری *Escherichia coli* O157:H7 از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به شماره جدایه (شماره: ۲۹۵، *E. coli* O157:H7) که تأیید شده و در مطالعات مختلفی به کار رفته بود، تهیه شد (۱۳). کلنی خالص و تازه باکتری مدنظر در محیط BHI مایع در دمای 37°C و rpm ۱۲۰ رشد داده شد. رشد باکتری به وسیله اسپکتروفتومتر در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین به منظور شمارش باکتری‌ها، رقت‌های سریالی از نمونه‌های گرفته شده تهیه و سپس روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در 37°C به مدت ۲۴ ساعت شمارش کلنی‌ها از پلیت‌های دارای ۳۰-۳۰۰ کلنی انجام گرفت و نتایج به صورت CFU/ml گزارش شد. سوسپانسیون باکتری مربوط به اوایل مرحله فاز لگاریتمی رشد با غلظت 5×10^8 CFU/ml تهیه و به تیمارهای آب مقطر و همچنین آب نمک ۳۰ درصد در غلظت نهایی 5×10^7 CFU/ml تلقیح شدند و در دمای اتاق مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۴، ۱). نمونه‌برداری از تیمارهای مورد مطالعه در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ انجام گرفت و کشت‌پذیری باکتری‌ها و تعیین زنده‌مانی آنها ارزیابی شد.

حالت زنده اما غیرقابل کشت (VBNC) شود. حالت VBNC یک مکانیسم زنده‌مانی اتخاذ شده به وسیله این باکتری‌ها است که در آن باکتری زنده بوده اما فاقد کشت‌پذیری و رشد روی محیط‌های کشت متداول باکتری است (۶، ۵). باکتری‌های VBNC شده ممکن است پس از رفع شرایط نامطلوب و استرس‌زا و قرارگیری در معرض شرایط مساعد، قابلیت رشد و کشت روی محیط‌های کشت را بار دیگر به دست بیاورند و به این ترتیب می‌توانند موجب مخاطرات جدی شوند (۹-۷). در همین رابطه، بیان برخی از ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری‌ها در حالت VBNC و یا بعد از احیا و تبدیل به حالت قابل کشت نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱). لذا نظر به وجود فاکتورهای استرس‌زای مختلف در محیط‌زیست و یا حتی در پرورده‌های مختلف از جمله در صنایع غذایی از قبیل دمای پایین، شوری بالا برای افزایش ماندگاری فراورده‌های تولیدی، نگرانی درباره رفتار باکتری اشریشیا کلی و ورود آن به حالت VBNC وجود دارد (۱۱، ۱۰). از طرف دیگر با توجه به اینکه باکتری‌های VBNC شده به وسیله روش‌های متداول کشت و شمارش کلنی روی محیط کشت قابل‌شناسایی نبوده و ممکن است که نمونه‌های آزمایش شده عاری از باکتری قلمداد شوند، این نقص در شناسایی این حالت از باکتری‌ها می‌تواند مخاطرات جدی را در پی داشته باشد. همچنین بسیاری از روش‌های تشخیصی دیگر از جمله آزمایش ایمنی براساس شناسایی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، روش‌های متکی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نیز قادر به تمایز بین سلول‌های زنده و مرده نیستند (۱). به علاوه روش‌های متکی بر باکتریوفاژ نو ترکیب که با استفاده از ترکیبی از ارزیابی شدت فلورسنس و آنالیز مواد غذایی بین باکتری‌های زنده و مرده تمایز قائل می‌شود، در نمونه‌های محیطی ناشی از اختلال فلورسنس ناشی از ذرات موجود در این نمونه‌ها با محدودیت مواجه هستند (۱). از آنجا که یکی از تفاوت‌های بین باکتری‌های VBNC و مرده، حفظ اطلاعات ژنتیکی و بیان ژن در سلول‌های VBNC است (۶) و همچنین با توجه به پایداری کوتاه مدت RNA در خارج از سلول زنده، استفاده از وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) برای شناسایی RNA می‌تواند به عنوان روش مفیدی برای شناسایی باکتری‌های زنده مطرح باشد. این روش شامل استخراج و تخلیص RNA، تیمار DNase I برای حذف DNA و سپس سنتز cDNA و الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های cDNA تهیه شده است (۱۲، ۷).

کشت پذیری باکتری

پروسه PCR

به منظور انجام PCR، از Prime Taq Premix (2X) (کیازن طب صدرا، ایران) استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از Prime Taq Premix، ۳ میکرولیتر از DNA نمونه و ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمرهای فرورارد و معکوس (هرکدام ۵ پیکومولار) مخلوط شده و با آب مقطر دیونیزه استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. مخلوط فوق برای حذف قطرات روی دیواره میکروتیوب به مدت ۱۰ ثانیه اسپین شد. سپس میکروتیوبها برای انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. شرایط PCR به شرح زیر بود:

دنا تورا سیون اولیه در 94°C به مدت ۵ دقیقه؛ رونویسی DNA برای ۳۵ سیکل شامل دنا تورا سیون ثانویه در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در 60°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحله گسترش در 72°C به مدت ۲۰ ثانیه؛ گسترش نهایی در 72°C به مدت ۵ دقیقه. سپس الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲ درصد انجام شد و به وسیله ژل داک از ژل مربوطه عکس گرفته شد. پرایمرهای ژن *16S rRNA* استفاده شده در مطالعه حاضر، شامل پرایمر فروراد: CAT TGA CGT TAC CCG CAG AA و پرایمر معکوس: CGC TTT ACG CCC AGT AAT TCC با اندازه محصول نهایی PCR برابر ۹۸bp بود (۱۶).

آنالیز آماری

آزمایشهای انجام شده در سه تکرار انجام شد. میانگین و انحراف معیار دادهها تعیین شد و براساس آن و با استفاده از نرم افزار اکسل نمودارها رسم شدند. نتایج مربوط به بیان ژن *16S rRNA* در روش RT-PCR به صورت کیفی گزارش شد و عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۲ درصد ارائه شد.

یافتهها

در مطالعه حاضر، کشت پذیری باکتری *E. coli* O157:H7 در تیمارهای آب مقطر و همچنین آب نمک ۳۰ درصد در دمای اتاق با استفاده از روش کشت متداول باکتری و شمارش کلنی مطالعه شد. نتایج نشان داد که کشت پذیری باکتریها در تیمار آب مقطر در طول مطالعه حفظ شد؛ اما در تیمار شوری ۳۰ درصد از روز ۴ به بعد این باکتریها فاقد کشت پذیری بودند (شکل ۱ و ۲).

همچنین در مطالعه حاضر RT-PCR ژن *16S rRNA* برای تشخیص حضور باکتریهای زنده اما غیرقابل کشت در تیمارهای آب مقطر و همچنین شوری ۳۰ درصد انجام شد. همچنین RT-

به منظور بررسی کشت پذیری باکتری در تیمارهای مطالعه شده، در روزهای مختلف نمونه برداری صورت گرفت و رقتهای متوالی از نمونههای باکتریایی تهیه شد؛ سپس روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند. پس از گرمخانه گذاری نمونهها، کلنیهای رشد یافته شمارش و به صورت CFU/ml گزارش شدند. به منظور تعیین وضعیت باکتریهای کشت پذیر در پایان دوره آزمایش تیمارهای مورد مطالعه، هنگامی که تعداد کمتر از 0.1 CFU/ml باکتری کشت پذیر قابل مشاهده بود، باکتریها در حالت VBNC در نظر گرفته شدند (۱).

شناسایی باکتریهای VBNC به وسیله RT-PCR ژن

16S rRNA

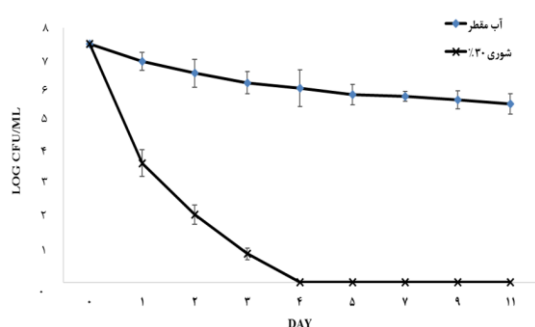
به منظور شناسایی باکتریهای VBNC تحت تیمارهای مورد مطالعه از RT-PCR ژن *16S rRNA* شامل استخراج و تخلیص RNA، تیمار DNase I برای حذف آلودگی DNA و سپس سنتز cDNA و الکتروفورز محصول PCR نمونههای cDNA تهیه شده، استفاده شد (۱۵).

همچنین به منظور اطمینان از کارایی RT-PCR ژن *16S rRNA* در تفکیک باکتریهای زنده از غیرزنده، باکتریهای زنده و تازه باکتری *E. coli* O157:H7 با حرارت (95°C) به مدت ۱۵ دقیقه کشته شد. برای باکتریهای کشته شده نیز RT-PCR ژن *16S rRNA* بلافاصله بعد از کشته شدن (زمان صفر) و نیز بعد از ۲۴ ساعت انجام شد (۱۵).

استخراج RNA باکتری

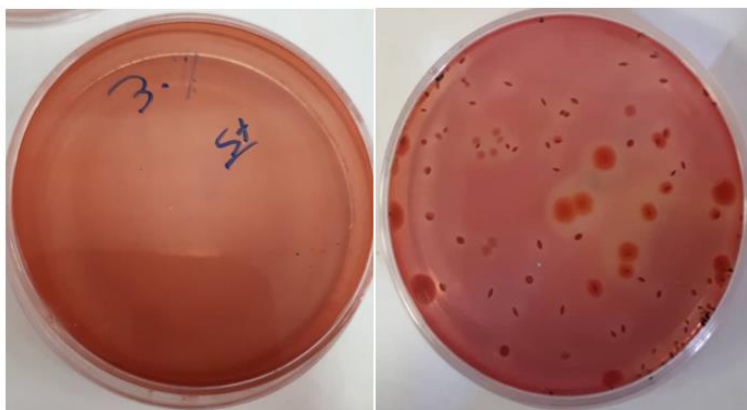
در روزهای نمونه برداری، از هر تیمار ۱۰ میلی لیتر از نمونه به صورت هموژن برداشته شده و در 7000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به منظور استخراج RNA تحت لیز سلولی قرار گرفت. به منظور استخراج RNA نمونههای باکتری، کیت استخراج RNA با نام RiboEx Total RNA kit (GeneAil, South Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده به کار رفت. کیت DNase I (سیناکلون، ایران) جهت حذف آلودگی DNA استفاده شد. سپس RNA حاصل برای سنتز cDNA با استفاده از کیت Viva 2-step RT-PCR kit (Vivantis, Malaysia) به کار رفت.

۳۰ درصد و نیز کارایی RT-PCR ژن *16S rRNA* در تشخیص باکتری‌های VBNC بود.



شکل ۱. تغییر در کشت‌پذیری باکتری *E. coli* O157:H7 در تیمار آب مقطر و همچنین شوری ۳۰ درصد در دمای اتاق

PCR ژن *16S rRNA* در تیمارهای فاقد کشت‌پذیری باکتری نمونه‌های باکتری کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت مقایسه شد. همان‌طور که در جدول ۱ و شکل ۳ مشاهده می‌شود، بیان ژن *16S rRNA* در تیمار آب مقطر و نیز شوری ۳۰ درصد در طول آزمایش مثبت بود. همچنین مشاهده شد که در باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت بیان ژن *16S rRNA* در زمان صفر پس از کشته‌شدن باکتری مثبت بوده ولی بعد از ۲۴ ساعت از کشته‌شدن حرارتی باکتری بیان ژن *16S rRNA* منفی بود. مثبت‌بودن بیان ژن *16S rRNA* در باکتری‌های فاقد کشت‌پذیری روی محیط کشت در تیمار شوری ۳۰ درصد در کنار عدم بیان ژن *16S rRNA* در باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت بیانگر ورود باکتری *E. coli* O157:H7 به حالت VBNC تحت استرس شوری



ب

الف

شکل ۲. حفظ کشت‌پذیری باکتری *E. coli* O157:H7 در تیمار آب مقطر (الف) و عدم کشت‌پذیری تحت شوری ۳۰ درصد (ب) در دمای اتاق

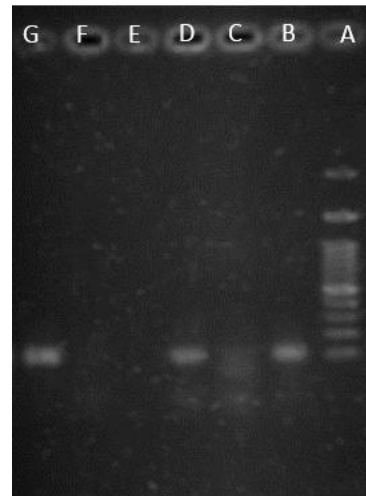
جدول ۱. بیان ژن *16S rRNA* در باکتری *E. coli* O157:H7 به‌وسیلهٔ RT-PCR در تیمارهای مورد مطالعه

تیمار روز	آب مقطر	شوری ۳۰ درصد	کشته‌شدن حرارتی (۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه)
۰	+	+	+
۱	+	+	-
۲	+	+	-
۳	+	+	-
۴	+	+	-
۵	+	+	-
۷	+	+	-
۹	+	+	-
۱۱	+	+	-

+ نشان‌دهندهٔ بیان مثبت ژن *16S rRNA* و - نشان‌دهندهٔ عدم بیان ژن *16S rRNA* در RT-PCR

به‌طور کلی توانایی هر باکتری بیماری‌زا و به‌ویژه باکتری *E. coli* O157:H7 برای ورود به حالت VBNC می‌تواند از جنبه‌های بهداشت و امنیت مواد غذایی اهمیت بسیار داشته باشد؛ زیرا باکتری‌های VBNC ممکن است به داخل آب و یا غذا انتقال یابند و در این محیط‌ها بار دیگر احیا شده و قابلیت رشد و بیماری‌زایی را نشان دهند که در این ارتباط اتفاقات مهمی در مطالعات انجام‌شده گزارش شده است (۱۹). برای نمونه، یک همه‌گیری در ژاپن در سال ۱۹۹۸ ناشی از مصرف تخم نمک‌سودشده ماهی آلوده به حالت VBNC باکتری *E. coli* O157 گزارش شده است (۸). باکتری‌های VBNC می‌توانند در مواد غذایی حاوی شوری‌های بالا مخفی شده و به‌وسیله روش‌های شناسایی متداول باکتری‌شناسی شناسایی نشوند. در همین ارتباط Kim و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که باکتری *Bacillus cereus* کشت‌پذیری خود را در میگوی نمک‌سود و تخمیرشده، تحت شوری ۱۵-۲۰ درصد طی شرایط نگهداری در یخچال از دست داد؛ هرچند تحقیقات بیشتری پیرامون زنده‌مانی این باکتری‌ها به‌وسیله این محققان گزارش نشد (۲۰). بنابراین روش‌های مؤثر تشخیص حالت VBNC باکتری‌ها از اهمیت فراوانی برخوردار است. همان‌طور که مشاهده شد، روش‌های متداول شناسایی باکتری‌ها از جمله کشت مستقیم روی محیط کشت و شمارش کلنی قادر به شناسایی باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت نیستند. همچنین بسیاری از روش‌های تشخیصی دیگر، از جمله آزمایش ایمنی براساس شناسایی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، روش‌های متکی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نیز قادر به تمایز بین سلول‌های زنده و مرده نیستند و در بسیاری از گزینه‌ها، شناسایی باکتری در نمونه‌های محیطی و غذایی با محدودیت مضاعفی مواجه است (۱). همچنین Casasola-Rodríguez و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند که روش‌های جدیدتر متکی بر DNA از جمله qPCR-PMA از دقت کافی برای شناسایی باکتری‌های VBNC برخوردار نیستند (۲۱). از طرف دیگر با توجه به توانایی باکتری‌های متعددی از جمله اشریشیا کلی برای ورود به حالت VBNC تحت استرس‌ها و شرایط نامساعد محیطی و یا حین فرایندهای اعمال‌شده مثل تیمارهای ضدعفونی و یا فرایندهای مورد استفاده در صنایع غذایی، نقص در شناسایی این حالت از باکتری‌ها می‌تواند مخاطرات جدی را در پی داشته باشد (۳).

شناسایی موفقیت‌آمیز باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت *E. coli* O157:H7 به‌وسیله RT-PCR ژن 16S rRNA در مطالعه



شکل ۳. RT-PCR ژن 16S rRNA باکتری *E. coli* O157:H7 در حالت‌های کشت‌پذیر، عدم کشت‌پذیری و کشته‌شده به‌وسیله حرارت

(A مارکر DNA، B کنترل مثبت، C تیمار DNase I نمونه‌های RNA باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیله حرارت در زمان صفر، D باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیله حرارت در زمان صفر، E باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیله حرارت بعد از ۲۴ ساعت، F تیمار DNase I نمونه‌های RNA باکتری‌های بدون کشت تیمار شوری ۳۰ درصد در روز ۱۱، G باکتری‌های بدون کشت تیمار شوری ۳۰ درصد در روز ۱۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، باکتری‌های *E. coli* O157:H7 تحت شوری ۳۰ درصد از روز چهارم مطالعه به بعد، کشت‌پذیری خود را از دست دادند؛ اما تا انتهای دوره مطالعه، این باکتری‌ها بیان مثبت ژن 16S rRNA را با استفاده از RT-PCR نشان دادند. مثبت بودن بیان ژن 16S rRNA در باکتری‌های فاقد کشت‌پذیری روی محیط کشت در تیمار شوری ۳۰ درصد در کنار عدم بیان ژن 16S rRNA در باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیله حرارت، بیانگر ورود این باکتری به حالت VBNC و همچنین کارایی RT-PCR ژن 16S rRNA در تشخیص باکتری‌های زنده اما غیرقابل کشت بود. نتایج مطالعه حاضر مبنی بر ورود باکتری *E. coli* O157:H7 به حالت زنده اما غیرقابل کشت تحت استرس شوری با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد (۸، ۱۷)، اما نتایج مربوط به واردنشدن این باکتری به حالت VBNC در تیمار گرسنگی (آب مقطر) با سایر مطالعات متفاوت بود (۱۸، ۱۰). تفاوت‌های موجود می‌تواند ناشی از تفاوت در سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه، شرایط زیست‌محیطی مطالعه، مرحله رشد لگاریتمی باکتری که در آن استرس اعمال می‌شود و نیز دمای شستشوی باکتری باشد (۱۸).

در جمع‌بندی مطالعه حاضر می‌توان گفت، باکتری *E. coli* O157:H7 تحت شرایط شوری وارد حالت زنده اما غیر قابل کشت شد و RT-PCR ژن *16S rRNA* به‌طور موفقیت‌آمیزی توانست باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت *E. coli* O157:H7 را شناسایی کند؛ بنابراین می‌تواند فرصت مهمی را برای شناسایی باکتری‌های VBNC را فراهم کند. در مطالعه حاضر، با وجود کارایی RT-PCR ژن *16S rRNA* در تشخیص باکتری VBNC، نتایج مثبت کاذب در زمان صفر بعد از کشته‌شدن حرارتی باکتری مشاهده شد؛ اما بعد از گذشت ۲۴ ساعت، RT-PCR ژن *16S rRNA* برای باکتری‌های مرده منفی بود. در نتیجه می‌توان گفت که با وجود اتفاق نظر محققان مختلف در زمینه پایداری و عمر ماندگاری پایین RNA، به نظر می‌رسد RNAهای مختلف حساسیت متفاوتی دارند، لذا انجام مطالعات جامعی پیرامون پایداری و تعیین زمان دقیق ماندگاری RNAهای مختلف تحت تیمارها و استرس‌های مختلف و در ماتریکس‌ها و محیط‌های مختلف ضروری است. بدیهی است که تعیین RNA اختصاصی هر باکتری که دارای بیان مداوم در فازهای مختلف رشد باکتری بوده ولی در باکتری مرده بیشترین حساسیت و کمترین زمان پایداری را داشته باشد، از اولویت استفاده برای RT-PCR برخوردار هستند. همچنین با توجه به اینکه دوز عفونی باکتری *E. coli* O157:H7 پایین و حدود ۱۰ سلول است، دقت تشخیص متناسب با این دوز عفونی از اهمیت بالایی برخوردار است، لذا بهینه‌سازی و افزایش کارایی استخراج RNA در تکنیک RT-PCR و همچنین ترکیب سایر روش‌ها می‌تواند در راستای بهبود دقت تشخیصی این روش مفید باشد. همچنین کارایی این روش‌ها در شناسایی این حالت از باکتری در نمونه‌های محیطی و نمونه‌های مواد غذایی بایستی مطالعه شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مطالعه، مراتب تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در حمایت مالی از تحقیق حاضر (کد طرح: ۹۲۰۱۰۵۳۵) ابراز می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

حاضر با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد. Molaei و همکاران (۲۰۱۵) نیز توانستند باکتری‌های *E. coli* زنده موجود در نمونه‌های آب را به‌وسیله RT-PCR تشخیص دهند (۱۲). Liu و همکاران (۲۰۰۸) باکتری‌های *E. coli* O157:H7 را روی یک غشای اتصالی پروتئینی به دام انداختند و بعد از استخراج RNA با استفاده از RT-PCR و تشخیص میکروآرایی ژن‌های *fliC* و *rfbE* این باکتری، توانستند باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت را با دقت ۱ CFU/ml شناسایی کنند (۱). در این راستا مطالعه بیان ژن‌های مختلف بیماری‌زایی باکتری‌های مختلف در حالت VBNC و استفاده از آنها در روش RT-PCR برای شناسایی این حالت از باکتری‌ها پیشنهاد می‌شود. همچنین Casasola-Rodríguez و همکاران (۲۰۱۸) نیز کارایی موفقیت‌آمیز RT-real time PCR برای شناسایی باکتری *Vibrio cholera* را گزارش کردند (۲۰)؛ لذا پیشنهاد می‌شود که کارایی روش RT-PCR ژن‌های مختلف به‌همراه real time PCR و نیز سایر روش‌های مختلف بررسی شود. Mar Lleo و همکاران (۲۰۰۰) نیز از RT-PCR ژن اختصاصی باکتری *Enterococcus faecalis* برای شناسایی این باکتری‌ها در حالت VBNC استفاده کردند (۲۲). در مطالعات فوق، همانند مطالعه حاضر، تمرکز بر استخراج RNA و سپس سنتز cDNA به‌منظور حذف اثرات کاذب DNA مربوط به باکتری‌های مرده بوده است. همچنین عدم بیان ژن *16S rRNA* در باکتری‌های کشته‌شده از طریق حرارت، به‌وسیله RT-PCR کارایی این روش را برای تمایز باکتری‌های زنده از غیرزنده نشان می‌دهد. هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، Coutard و همکاران (۲۰۰۵) نیز مشاهده کردند که کاهش زنده‌مانی باکتری‌های مورد مطالعه آنها (*Vibrio parahaemolyticus*) با کاهش سیگنال RT-PCR همبستگی داشت (۲۳). تکنولوژی RT-PCR بر پایه عمر ماندگاری بسیار کوتاه RNA و این اصل که RNA فقط در سلول‌های زنده وجود دارد، استوار است. در RT-PCR برخلاف PCR معمولی که نمونه DNA به کار می‌رود، نمونه‌های RNA خالص استخراج و سپس cDNA ساخته شده و در فرایند PCR استفاده می‌شود؛ لذا جواب‌های مثبت کاذب ناشی از DNA مربوط به باکتری‌های مرده حذف می‌شود (۳).

References

- Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li XF. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 bacteria in drinking water and river water. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(5): 1502-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02125-07>
- McIngvale SC, Chen XQ, McKillip JL, Drake MA. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in buttermilk as affected by contamination point and storage temperature. *J Food Prot.* 2000; 63(4): 441-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.4.441>
- Yaron S, Matthews KR. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(4): 633-40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01563.x>
- Kargar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins (stx1, stx2), eaeA and hly genes of *Escherichia coli* O157: H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pac J Trop Med.* 2015; 8(1): 24-8. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60182-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60182-6)
- Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *The journal of microbiology.* 2005; 43(1): 93-100.
- Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34(4): 415-25. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 5: 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Makino SI, Kii T, Asakura H, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, et al. Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Enter the Viable but Nonculturable State in Salted Salmon Roe?. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(12): 5536-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5536-5539.2000>
- Zhao X, Zhong J, Wei C, Lin CW, Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front Microbiol.* 2017; 8: 580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>
- Ding T, Suo Y, Xiang Q, Zhao X, Chen S, Ye X, et al. Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: induction, detection, and control. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(3): 417-28. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09063>
- Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Frontiers in public health.* 2014; 2: 103.
- Molaei N, Abtahi H, Ghannadzadeh MJ, Karimi M, Ghaznavi-Rad E. Application of Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) for rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water samples. *J Environ Health Sci Eng.* 2015; 13(1): 24.
- Koochakzadeh A, Askari Badouei M, Zahraei Salehi T, Aghasharif S, Soltani M, Ehsan M. Prevalence of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in wild and pet birds in Iran. *Rev Bras Cienc Avic.* 2015; 17(4): 445-50.
- Sue D, Boor KJ, Wiedmann M. σ B-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *lmo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* 2003; 149(11): 3247-56.
- Tan Q, Xu H, Chen T, Li P, Aguilar ZP, Xu D, et al. Differential expression of virulence and stress fitness genes during interaction between *Listeria monocytogenes* and *Bifidobacterium longum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76(4): 699-704.
- Spano G, Beneduce L, Terzi V, Stanca AM, Massa S. Real-time PCR for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy and cattle wastewater. *Lett Appl Microbiol.* 2005; 40(3): 164-71
- Lothigius Å, Sjöling Å, Svennerholm AM, Bölin I. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater. *J Appl Microbiol.* 2010; 108(4): 1441-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04548.x>
- Dinu LD, Bach S. Induction of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 on the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(23): 8295-302. <https://doi.org/10.1128/AEM.05020-11>
- Trevors JT. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells. *J Microbiol Methods.* 2011; 86(2): 266-73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.018>
- Kim M, Young Park S, Jung Park T, Ha SD. Effect of Sodium Chloride on the Reduction of *Bacillus Cereus* in Shrimp Jeotgal During Refrigerated Storage. *Journal of Food Safety.* 2017; 37(1): e12281. <https://doi.org/10.1111/jfs.12281>
- Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar RC, Losano L, Ignacio MR, Orta de Velásquez MT. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2018; 365(15): fny156. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny156>
- del Mar Lleó M, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C, Canepari P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl*

Environ Microbiol. 2000; 66(10): 4564-7.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4564-4567.2000>

23. Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, Hervio-Heath D. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. J Appl Microbiol. 2005; 98(4): 951-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02534.x>