بررسی کارآیی روش زنجیره‌ای پلی‌مرآز با نسخه برداری معکوس در تعیین اشریشیا کلی موجود در آب آشامیدنی

حمید ابطحی [1*]، محمد جواد قنادزاده [2]، علی هاتف سلمانیان [3]، احسان غزنوی راد [4]، مسعوده کریمی [5]

خلاصه

سابقه و هدف: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز (Polymerase chain reaction; PCR) از نظر سرعت، دقت و کارآیی نسبت به سایر روش‌های تشخیص اشریشیاکلی در آب، ارجحیت دارد. بروز نتایج مثبت کاذب از معایب این روش است و برای رفع این مشکل می‌توان از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز معکوس (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction; RT-PCR) استفاده نمود. در این تحقیق سعی گردیده تا علاوه بر تعیین کارآیی روش RT-PCR، میزان حساسیت این روش برای شناسایی اشریشیاکلی آب در مقایسه با روش MPN (Most Probable Number) نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها: با استفاده از ترادف ژنی 16srRNA اشریشیاکلی پرایمرهای SF (S rRNA Forward) و SR(S rRNA Reverse) طراحی شدند. رقت‌های مختلف از باکتری در آب مقطر تهیه شده و سوسپانسیون باکتری از دو نوع فیلتر FHLP و HAWP، عبور داده شد. سپس، RT-PCR انجام گردید. شناسایی آلودگی ۱۵ حلقه چاه آب شهر اراک و مقایسه آن با روش MPN برای بررسی کارآیی روش فوق انجام گرفت.

نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که RT-PCR قادر است وجود باکتری در رقت‌های مختلف را شناسایی کند. فیلترهای هیدروفوبیک از جمله FHLP در مقایسه با فیلترهای هیدروفیلیک HAWP توانایی بالاتری در جدا سازی باکتری‌ها دارند. به‌علاوه، مقایسه شناسایی آلودگی آب با دو روش MPN و RT-PCR انجام گرفته در این تحقیق نشان دهنده کارآیی بالای روش RT-PCR بود.

نتیجه‌گیری: با استفاده از RT-PCR که حساسیت بیشتری نسبت به روش MPN دارد، می‌توان وجود باکتری حتی در رقت‌های بسیار پایین را نشان داد. همچنین، فیلترهای هیدروفوبیک نسبت به فیلترهای هیدروفیلیک قدرت بیشتری در جذب باکتری‌ها دارند.

واژگان کلیدی: آلودگی آب، اشریشیا کلی، واکنش زنجیره ای پلی مرآز معکوس

فصلنامه علمی – پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ٤٢٥-٤٢٠

مقدمه

وجود میکروب‌های بیماری‌زا از مهمترین معضلات بهداشتی آب آشامیدنی است و شناسایی و حذف این عوامل از مسایل مهم بهداشتی آب به‌شمار می‌آیند. در روش‌های تشخیصی، از باکتری اشریشیاکلی به‌عنوان نشان‌گر بررسی آلودگی آب به فاضلاب استفاده می‌گردد. روش‌های معمول نظیر MPN و کشت آب در محیط‌های مربوط به آنتروباکتریاسه نظیر brilliant- MacConkey, Endo, eosin methylene blue green-lactose-bile) برای شناسایی عوامل بیماری‌زا در آب علاوه بر اینکه وقت‌گیر و پرهزینه هستند، از دقت کافی نیز برخوردار نمی‌باشند؛ به‌همین علت برای شناسایی وجود عوامل بیماری‌زا در آب روش‌های جدیدی در دست مطالعه است [۱]. واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز (PCR) از جمله روش‌هایی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد. این روش حساس، دقیق و سریع بوده و کارآیی استفاده از آن در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. بیان شده است که روش فوق قادر به شناسائی حتی یک باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب است [۳،۲]. واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز روشی حساس و دقیق بوده که با استفاده از آن نه تنها وجود آلودگی مشخص می‌گردد، بلکه نوع باکتری را نیز می‌توان تعیین نمود [٤]. پایداری نسبتا بالای DNA در محیط باعث می‌گردد تا نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز در مورد سلول‌های مرده نیز مثبت گردد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که انجام PCR با باکتری‌های کشته شده توسط جوشاندن و یا اشعه UV با انجام PCR بر روی باکتری‌های زنده نتیجه مشابهی را خواهد داشت. مطالعات صورت گرفته بر روی اشریشیاکلی و

[1] استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

[2] مربی، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک

[3] دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[4] مربی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

[5] کارشناس، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

* **نشانی نویسنده مسوول:**
دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی

تلفن: ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۰۲ **دورنویس:** ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۲۶

پست الکترونیک: h_abtahi2@yahoo.co.uk

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۸۹/۸/۳۰

Archive

www.SID.ir

لیستریا مونوسیتوزنز نیز نشان می‌دهند که نتیجه فرآیند PCR بر باکتری‌های اتوکلاو شده مثبت است [۵]. عیوب ذکر شده برای روش‌های شناسایی ارگانیزم‌ها بر پایه DNA باعث گردیده تا روش‌های دیگری از جمله غنی سازی اولیه قبل از آزمایش PCR توصیه گردد. با وجود اینکه این روش باعث افزایش کارآیی آزمایش و شناسایی بین نمونه‌های زنده و مرده می‌شود، ولی مستلزم افزایش مدت زمان تست می‌باشد؛ در عین حال در صورتی که تعداد باکتری‌های مرده بالا باشد، می‌تواند باعث بروز نتیجه مثبت کاذب در این آزمایشات نیز گردد [٦]. با توجه به پایداری اندک RNA در محیط، تعیین وجود RNA با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز معکوس می‌تواند نشانگر مناسبی برای سلول‌های زنده بشمار آید. نکته مهم در استفاده از روش RT-PCR تعیین کارآیی آن در شناسایی تعداد کم باکتری‌ها در آب می‌باشد. در این تحقیق سعی شده است تا با تهیه رقت‌های مختلف از باکتری اشریشیا کلی در آب کارآیی روش RT-PCR در شناسایی آن مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر آن نقش دو فیلتر هیدروفیلیک (HWAP) و هیدروفوبیک (FHLP) در جداسازی باکتری و نتیجه واکنش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی در تابستان ۱۳۸۸ انجام گرفته است. باکتری مورد استفاده در این تحقیق اشریشیاکلی سویه DH5α (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) می‌باشد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک (Merck) و آنزیم‌ها و سایر عوامل استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز از شرکت سیناژن (ایران) تهیه گردید.

طراحی و تهیه پرایمرها:

در این مطالعه با استفاده از ژن 16s rRNA (شماره دسترسی: EF620925) از باکتری اشریشیاکلی ترادف پرایمرهای زیر استفاده گردید:

Forward: 5" CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT (FROM 81)
Reverse: 5" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A (FROM 786)

پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت MWG آلمان (نماینده فرآیند دانش آرین) ساخته شد.

رقت‌های آب و فیلتراسیون:

ابتدا رقت‌های متوالی از باکتری اشریشیاکلی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل تهیه گردید. برای تهیه رقت‌های باکتری از محلول شماره یک مک فارلند استفاده شد. بدین منظور ابتدا سوسپانسیون محلول شماره ۱ مک فارلند از باکتری تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون رقت‌های متوالی ۸/۱۰۰ تا ۱/۱٦۰۰ در دو سری (جدول شماره ۱) تهیه گردید. برای تائید صحت تعداد باکتری در رقت‌ها یک میلی لیتر از هر رقت باکتری در محیط نوترینت آگار به‌صورت پور پلیت (Pour Plate) استفاده شد.

جدول شماره ۱- رقت‌های تهیه شده از کلی فرم

رقت	۸/۱۰۰	٤/۱۰۰	۲/۱۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/٤۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱٦۰۰
تعداد باکتری	۸	٤	۲	۱	۱	۱	۱	۱
حجم آب(میلی لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰	٤۰۰	۸۰۰	۱٦۰۰

یک سری از رقت‌ها از فیلتر FHLP (شرکت میلی پور با قطر ۰/۵ میکرون) و سری دوم از فیلتر HAWP (شرکت میلی پور با قطر ۰/٤۵ میکرون) عبور داده شدند. سپس در شرایط استریل فیلترها در داخل میکروتیوب ۰/۵ قرار گرفته و ۵۰ میکرولیتر از آب حاوی یک دهم درصد دی اتیل پیروکربنات (DEPC water) به میکروتیوب‌ها افزوده گردید. میکروتیوب‌ها با شدت ورتکس شده تا باکتری‌ها از سطح فیلتر به مایع داخل میکروتیوب رها شوند.

تخلیص RNA و انجام RT-PCR :

برای تخلیص RNA از کیت RNX-plus (شرکت سیناژن) و برای حذف آلودگی DNA از RNA خالص شده از آنزیم Deoxyribonuclease I استفاده گردید. برای حذف آنزیم مورد نظر پس از افزودن یک میکرولیتر اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA با غلظت ۲۵ میلی مولار) به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

غلظت عوامل RT-PCR جهت تکثیر RNA به‌شرح زیر استفاده گردید: دو میکروگرم از RNA و ۲۰ میکرومول پرایمر برگشت اضافه شد و به‌مدت نیم ساعت در ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی مولار دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)، ممانعت کننده از فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز به میزان ۲۰ واحد بافر با غلظت نهایی 1X افزوده شد. پس از انکوباسیون به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ، ۲۰۰ واحد آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase اضافه گردید و به‌مدت

Archive of SID

www.SID.ir

یک ساعت در دمای ٤٢ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. پس از تولید cDNA برای تکثیر آن از PCR استفاده گردید. برای این منظور از غلظت‌های عوامل زیر جهت PCR استفاده شد: یک میلی مولار از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۲/۵ میلی‌مولار از یون منیزیوم، ۲۰۰ میلی مولار از هر یک از دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات‌ها، ۲/۵ واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase و بافر PCR با غلظت 1X. حجم نهایی مخلوط PCR با آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسید و پس از آن برنامه زیر استفاده گردید: مرحله اول PCR متشکل از ۳۵ چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتورکردن (۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (٤٧ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه) است. پس از خاتمه چرخه‌ها، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. برای بررسی نهایی محصولات PCR، الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر تریس بازی - اسید بوریک- EDTA (TBE با pH = ۸) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت.

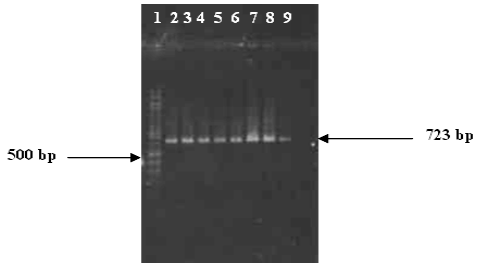
بررسی نمونه‌های آب چاه با RT-PCR و MPN:

برای تعیین کارآیی RT-PCR در شناسایی حداقل تعداد باکتری در آب و اهمیت نوع فیلترهای هیدروفوبیک در نتایج آن، از هریک از ۱۵ حلقه چاه تامین کننده آب شهر اراک ۲۵۰ میلی‌لیتر آب در ظروف استریل طبق استاندارد جمع‌آوری گردید. از روش MPN تنها برای بررسی هم‌خوانی با روش RT-PCR استفاده شد و وجود کلی‌فرم در نمونه‌های تهیه شده با استفاده از هر دو روش بررسی گردید. در روش RT-PCR یک‌صد میلی لیتر آب با استفاده از فیلتر FHLP صاف شده و سپس وجود اشریشیاکلی در آن بررسی شد. آزمایش MPN به‌روش سه لوله‌ای انجام گرفت و بر اساس تولید یا عدم تولید گاز تعداد اشریشیاکلی تعیین شد. داده‌های حاصل از سنجش نمونه‌ها از نقطه نظر آلودگی میکروبی و آزمون مولکولی جمع آوری و در قالب جدول مربوط منعکس گردید.

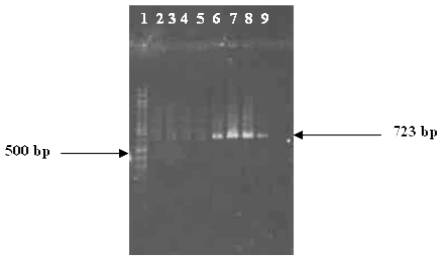
نتایج

کشت رقت‌های تهیه شده در محیط کشت نوترین آگار به روش پور پلیت تعداد باکتری‌ها را تایید نمود. نتیجه RT-PCR رقت‌ها پس از فیلتراسیون نشان داد که این روش قادر است تا وجود ۱ باکتری در حجم ۱٦۰۰ میلی لیتر آب پس از فیلتراسیون با فیلتر هیدروفوبیک (FHLP) را شناسایی کند. در RT-PCR رقت‌ها قطعه برابر bp ۷۲۳ دیده شد (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین، نتایج مربوط به مقایسه دو روش RT-PCR و MPN در جدول شماره ۲ آمده است.

شکل شماره ۱- نتیجه RT-PCR رقت‌های باکتری فیلتر شده با



FHLP – ردیف ۱: مارکر BP ۱۰۰ – ردیف ۲: رقت ۱/۱٦۰۰ – ردیف ۳: ۱/۸۰۰ – ردیف ٤: ۱/٤۰۰ ردیف ۵: ۱/۲۰۰ – ردیف ٦ : رقت ۱/۱۰۰ –ردیف ۷: رقت ۲/۱۰۰ –ردیف ۸: رقت ٤/۱۰۰ – ردیف ۹: رقت ۸/۱۰۰



شکل شماره ۲- نتیجه RT-PCR رقت‌های باکتری فیلتر شده با AWP– ردیف ۱: مارکر BP ۱۰۰ – ردیف ۲: رقت ۱/۱٦۰۰ – ردیف ۳: ۱/۸۰۰ – ردیف ٤: ۱/٤۰۰ –ردیف ۵: ۱/۲۰۰ – ردیف ٦: رقت ۱/۱۰۰ ردیف ۷: رقت ۲/۱۰۰ –ردیف ۸: رقت ٤/۱۰۰ – ردیف ۹: رقت ۸/۱۰۰

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج دو روش RT-PCR و MPN نمونه‌های ۱۵ چاه تامین کننده آب شرب شهر اراک

شماره چاه	۱	۲	۳	٤	۵	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱۵
RT-PCR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPN	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

www.SID.ir

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که RT-PCR قادر است حتی یک باکتری در حجم ۱۶۰۰ میلی لیتر آب را تعیین نماید و افزایش این کارآیی تنها در نمونه‌هایی دیده می‌شود که توسط فیلتر هیدروفوبیک (FHLP) صاف گردیده باشند. نتایج RT-PCR چاه‌های آب نیز نشان می‌دهد که روش RT-PCR در عین بالا بودن کارآیی در تشخیص باکتری در اغلب موارد نسبت به روش MPN نیز ارجحیت دارد. اگرچه استفاده از تکنیک‌های ملکولی در تشخیص عوامل عفونی از بسیاری جنبه‌ها نسبت به روش‌های کشت و تشخیص باکتری‌ها از نظر سرعت جواب دهی و دقت در تشخیص ارجحیت دارند، ولی برخی تکنیک‌های موجود از جمله PCR دارای نتایج مثبت کاذب می‌باشند؛ دلیل این امر به‌واسطه ردیابی و تکثیر ژن باکتری حتی در باکتری‌های مرده است [٤]، لذا برای شناسایی باکتری‌های زنده از تکنیک‌هایی از جمله RT-PCR می‌توان بهره برد. در این تحقیق سعی شد تا میزان کارآیی این روش نسبت به یکی از روش‌های معمول شناسایی آلودگی میکروبی آب (MPN) مقایسه گردد. علاوه بر دقت و کارآیی بالای RT-PCR در تشخیص آلودگی آب کاهش مدت زمان شناسایی باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است؛ به‌طوری‌که در آزمایش معمول MPN حداقل به ٢٤ ساعت برای تعیین آلودگی نیاز است، در حالی‌که در روش RT-PCR این زمان به ٦ تا ٧ ساعت کاهش می‌یابد. به‌طور کلی تکنیک‌هایی که بر پایه اسیدهای نوکلئیک می‌باشند تنها موقعی می‌توانند وجود سلول‌های زنده را ثابت کنند که ملکول هدف پایداری کمی پس از مرگ سلولی داشته باشد. ملکول mRNA در داخل سلول زنده به‌طور مرتب در حال تکثیر و افزایش بوده و بر عکس DNA نیمه عمر بسیار کوتاهی دارد، به‌طوری‌که پس از مرگ سلولی مقدار آن به سرعت در سلول کاهش می‌یابد. علت این کاهش به‌واسطه کارآیی بالای پیوندهای فسفو دی استر نسبت به آنزیم‌های هیدرولیز کننده در ملکول RNA نسبت به DNA است. بنابراین تعیین وجود ملکول mRNA نشانه خوبی برای اثبات وجود سلول‌های زنده است. در مطالعه Sheridan و همکاران با استفاده از روش RT-PCR ثابت شده است که این ملکول تنها در سلول‌های زنده ویبریو کلرا و لژیونلا پنموفیلا دیده می‌شود [٧]. نکته مهم در استفاده از روش‌هایی نظیر RT-PCR بررسی کارآیی این روش‌ها در تعیین عوامل آلودگی آب است. Liu و همکاران نشان داده‌اند که روش RT-PCR قابلیت شناسایی باکتری در سوسپانسیون با 1CFU/ml را ندارد [٨]. این در حالی است که نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد روش RT-PCR علاوه بر اینکه قادر به شناسایی یک باکتری در ١٠٠ میلی لیتر آب است، توانایی تشخیص یک باکتری در حجم‌های بالاتر (تا ١٦٠٠ میلی لیتر آب) را نیز دارد. تفاوت اخیر بین این مطالعه با دیگر مطالعات را باید در استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک برای تغلیظ باکتری‌ها بیان نمود. در مطالعه Bej و همکاران نشان داده شده است فیلترهای هیدروفوبیک نسبت به فیلترهای هیدروفوبیک توانایی بالایی را در جذب باکتری‌ها دارند [٩]. در بررسی حاضر نتایج مربوط به RT-PCR فیلتر هیدروفوبیک نشان داد حتی رقت‌های پایین باکتری عبور داده شده از این فیلترها توسط این روش ملکولی قابل شناسایی است. علت این افزایش کارآیی به‌واسطه از دست ندادن باکتری و در نتیجه حضور اسیدهای نوکلئیک باکتری می‌باشد. در عین حال با وجود اینکه قطر منافذ فیلترهای هیدروفیلیک (نظیرHAWP) کمتر از فیلترهای FHLP است، این فیلترها قدرت کمتری را در جذب باکتری نشان می‌دهند. فیلترهای HAWP تنها قادر به جداسازی باکتری‌ها در رقت‌های بالاتر از چهار باکتری در یک‌صد میلی لیتر آب هستند؛ به‌عبارت دیگر با استفاده از این فیلترها شناسایی باکتری‌ها در رقت‌های پایین‌تر از چهار باکتری توسط روش RT-PCR قابل استفاده نمی‌باشد؛ بنابراین استفاده از روش PCR در سیستم‌های تصفیه و ضد عفونی آب به‌علت پایداری ملکول DNA نتیجه آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز مثبت کاذب خواهد بود. بر این اساس برای بررسی آلودگی در سیستم‌های تصفیه آب استفاده از روش‌های ملکولی نظیر PCR نمی‌تواند اثر مواد ضد عفونی کننده بر روی شاخص آ لودگی آب را نشان د هد. برای رفع این مشکل می‌توان از دیگر مولکول‌های سلول از جمله RNA که پایداری نسبتا کمی دارد استفاده نمود و برای تعیین وجود RNA در محیط لازم است از روش واکنش زنجیره ای پلی مرآز معکوس استفاده شود.

نتیجه گیری

RTPCR روشی با کارآیی بالا در تعیین آلودگی باکتری آب بوده و استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک می‌تواند کارآیی این روش را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

[1] Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. ***Wat Res*** 1999; 33(17): 3545- 56.
[2] Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. ***Clin Infect Dis*** 2007; 45 Suppl 2: S99-S111.
[3] Vaitilling M, Gendre F, Brignon P. Direct Detection of Viable Bacteria, Molds, and Yeasts by Reverse Transcriptase PCR in Contaminated Milk Samples after Heat Treatment. ***Appl Environ Microbiol*** 1998; 64(3): 1157–60.
[4] Horáková K, Mlejnková H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial fecal indicators in water samples using PCR. ***Water Sci Technol*** 2006; 54(3): 135-40.
[5] Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Hall GS, Bauer TW. Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. ***Diagn Microbiol Infect Dis*** 2009; 64(4): 445-7.
[6] Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM. Selective and sensitive for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA Genes in soil. ***Appl Environ Microbiol*** 2000; 66(2): 844- 9.
[7] Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells. ***Appl Environ Microbiol*** 1998; 64(4): 1313–8.
[8] 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.
[9] Bej AK, Mahbubani MH, Dicesare JL, Atlas RM. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. ***Appl Environ Microbiol*** 1991; 57(12): 3529-34.

Archive of SID

www.SID.ir