Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

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

Mohammad Khezri[1], Masoud Rezaei[1*], Ashraf Mohabbati Mobarez[2], Mehdi Zolfaghari[3]

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, Agricultur 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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ ـ شماره ۶ ـ بهمن ـ اسفند ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی حالت زنده اما غیرقابل‌کشت باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli* O157:H7) با استفاده از وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)

محمد خضری[۱]، مسعود رضائی[۱*]، اشرف محبتی مبارز[۲] مهدی ذوالفقاری[۳]

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲. گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکدهٔ شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۴

پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

موضوع:

باکتری‌شناسی مولکولی

IJMM1397;12(6): 390-398

نویسندهٔ مسئول:

مسعود رضائی

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

پست الکترونیک:

reza_ma@modares.ac.ir

چکیده

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 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) برای تشخیص باکتری *Escherichia coli* O157:H7 در حالت VBNC بررسی شد.

مواد و روش‌کار: باکتری *E. coli* O157:H7 به تیمارهای آب‌مقطر و آب‌نمک ۳۰درصد 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 باکتری های کشته‌شده به‌وسیلهٔ 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 غیرقابل‌کشت طی مدت مطالعه بود، در حالی که در باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت بیان این ژن منفی بود که نشان‌دهندهٔ 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 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) می‌تواند برای تشخیص باکتری‌های VBNC به کار رود.

کلمات کلیدی: *اشریشیا کلی*، زنده‌مانی باکتری، وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

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

مقدمه

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 فراورده‌های تولیدشده از گاو، آلودگی 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 می تواند تحت شرایط زیستی نامساعد و سایر استرس‌های شدید وارد

حالت زنده اما غیرقابل کشت (VBNC) شود. حالت VBNC یک مکانیسم زنده‌مانی اتخاذشده به‌وسیلهٔ این باکتری‌ها است که در آن باکتری زنده بوده اما فاقد کشت‌پذیری و رشد روی محیط‌های کشت متداول باکتری است (۶ ، ۵). باکتری‌های VBNCشده 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 به‌دست بیاورند و به‌این‌ترتیب 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 قابل‌کشت نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱). لذا نظر به وجود فاکتورهای استرس‌زای مختلف در محیط‌زیست و یا حتی در پروسه‌های مختلف از جمله در صنایع غذایی از قبیل دمای پایین، شوری بالا برای افزایش ماندگاری فراورده‌های تولیدی، نگرانی دربارهٔ رفتار باکتری اشریشیا کلی و ورود آن به حالت VBNC وجود دارد (۱۰،۱۱). از طرف دیگر با توجه به اینکه باکتری‌های VBNCشده به‌وسیلهٔ روش‌های متداول کشت و شمارش کلنی روی محیط کشت قابل‌شناسایی نبوده و ممکن است که نمونه‌های آزمایش‌شده 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 پلیمراز (PCR) نیز قادر به تمایز بین سلول‌های زنده و مرده نیستند (۱). به‌علاوه روش‌های متکی بر باکتریوفاژ نوترکیب که با استفاده از ترکیبی از ارزیابی شدت فلورسنس و آنالیز موادغذایی 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 کوتاه‌مدت RNA در خارج از سلول زنده، استفاده از وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) برای شناسایی RNA می‌تواند به‌عنوان 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).

با توجه به نتایج مطالعات انجام‌گرفته پیرامون القای حالت VBNC در باکتری E. coli تحت شرایط گرسنگی و شوری و همچنین با توجه به کاربرد درصد بالای نمک (تا ۳۰درصد) 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، مطالعهٔ حاضر به بررسی استفاده از وارونویسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) با استفاده از ژن خانه‌دار *16S rRNA* برای شناسایی باکتری *Escherichia coli* O157:H7 در حالت زنده اما غیرقابل‌کشت القاشده به‌وسیلهٔ استرس شوری اشباع پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ سویهٔ باکتری و آماده‌سازی برای تلقیح به تیمارهای موردمطالعه

مطالعهٔ حاضر در آزمایشگاه‌های فراوری محصولات شیلاتی و باکتری‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ انجام شد. باکتری *Eschericia coli* O157:H7 از کلکسیون میکروبی دانشکدهٔ 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 تازهٔ باکتری مدنظر در محیط BHI مایع در دمای ۳۷°C و rpm ۱۲۰ رشد داده شد. رشد باکتری به‌وسیلهٔ اسپکتروفتومتر در جذب نوری ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین به‌منظور شمارش باکتری‌ها، رقت‌های سریالی از نمونه‌های گرفته‌شده تهیه و سپس روی محیط کشت BHI آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۷°C به‌مدت ۲۴ ساعت شمارش کلنی‌ها از پلیت‌های دارای ۳۰۰-۳۰ کلنی انجام گرفت و نتایج به‌صورت CFU/ml گزارش شد. سوسپانسیون باکتری مربوط به اوایل مرحلهٔ فاز لگاریتمی رشد با غلظت CFU/ml ۵×۱۰^{۸} تهیه و به تیمارهای آب مقطر و همچنین آب‌نمک ۳۰درصد در غلظت نهایی CFU/ml ۵×۱۰^{۷} 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.

کشت‌پذیری باکتری

به‌منظور بررسی کشت‌پذیری باکتری در تیمارهای مطالعه‌شده، در روزهای مختلف نمونه‌برداری 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 رشدیافته شمارش و به‌صورت CFU/ml گزارش شدند. به‌منظور تعیین وضعیت باکتری‌های کشت‌پذیر در پایان دورهٔ آزمایش تیمارهای موردمطالعه، هنگامی که تعداد کمتر از ۰/۱ CFU/ml باکتری کشت‌پذیر قابل‌مشاهده بود، باکتری‌ها در حالت VBNC در نظر گرفته شدند (۱).

شناسایی باکتری‌های VBNC به‌وسیلهٔ RT-PCR ژن *16S rRNA*

به‌منظور شناسایی باکتری‌های VBNC تحت تیمارهای موردمطالعه 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 تهیه‌شده، استفاده شد (۱۵).

همچنین به‌منظور 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 (۹۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه) کشته شد. برای باکتری‌های کشته‌شده نیز RT-PCR ژن*16S rRNA* بلافاصله بعد از کشته‌شدن (زمان صفر) و نیز بعد از ۲۴ ساعت انجام شد (۱۵).

استخراج RNA باکتری

در روزهای نمونه‌برداری، از هر تیمار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه به‌صورت هموژن برداشته شده و در ۷۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به‌منظور استخراج RNA تحت لیز سلولی قرار گرفت. به‌منظور استخراج RNA نمونه‌های باکتری، کیت استخراج RNA با نام RiboEx Total RNA kit (GeneAll, 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.

پروسه PCR

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

دناتوراسیون اولیه در ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه؛ رونویسی DNA برای ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون ثانویه در ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰°C به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس مرحلهٔ گسترش در ۷۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه؛ گسترش نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۵ دقیقه. سپس الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۲درصد انجام شد و به‌وسیلهٔ ژل داک از ژل مربوطه عکس گرفته شد. پرایمرهای ژن *16S rRNA* استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر، شامل پرایمر فوروارد: 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

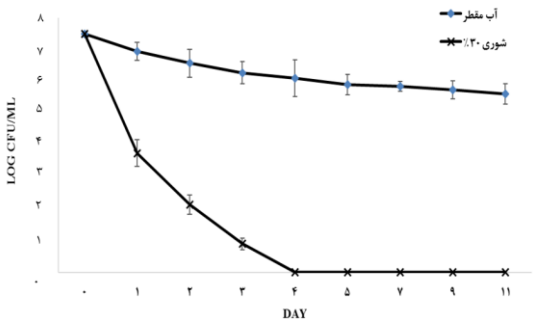
آزمایش‌های انجام‌شده در سه تکرار انجام شد. میانگین و انحراف‌معیار داده‌ها تعیین شد و براساس آن و با استفاده از نرم‌افزار اکسل نمودارها رسم شدند. نتایج مربوط به بیان ژن *16S rRNA* در روش RT-PCR به‌صورت کیفی گزارش شد و عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲درصد ارائه شد.

یافته‌ها

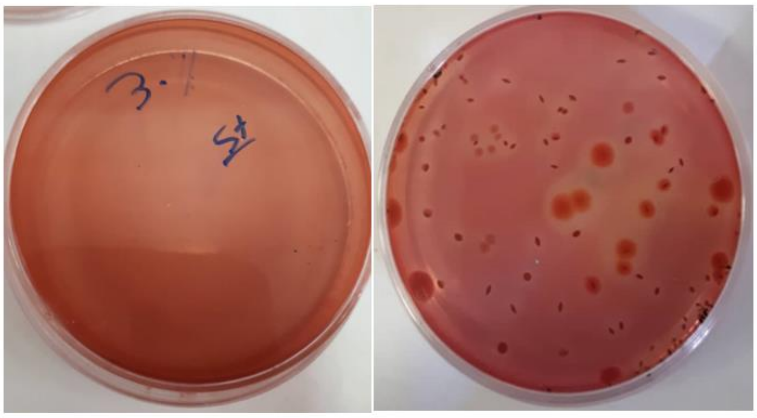
در مطالعهٔ حاضر، کشت‌پذیری باکتری *E. coli* O157:H7 در تیمارهای آب مقطر و همچنین آب‌نمک ۳۰درصد در دمای اتاق با استفاده از روش کشت متداول باکتری و شمارش کلنی مطالعه شد. نتایج نشان داد که کشت‌پذیری باکتری‌ها در تیمار آب مقطر در طول مطالعه حفظ شد؛ اما در تیمار شوری ۳۰درصد از روز ۴ به بعد این باکتری‌ها فاقد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

همچنین در مطالعهٔ حاضر RT-PCR ژن *16S rRNA* برای تشخیص حضور باکتری‌های زنده اما غیرقابل‌کشت در تیمارهای آب‌مقطر و همچنین شوری ۳۰درصد انجام شد. همچنین RT-

PCR ژن *16S rRNA* در تیمارهای فاقد کشت‌پذیری باکتری با نمونه‌های باکتری کشته‌شده به‌وسیلهٔ حرارت مقایسه شد. همان‌طور که در جدول ۱ و شکل ۳ مشاهده می‌شود، بیان ژن *16S rRNA* در تیمار آب‌مقطر و نیز شوری ۳۰درصد 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 ۳۰درصد 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 ۳۰درصد 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 ۳۰درصد در دمای اتاق



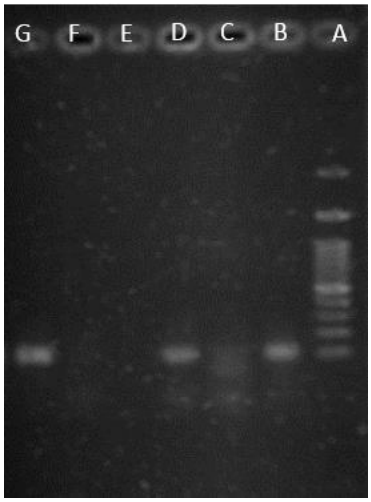
الف ب

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

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

تیمار روز	آب مقطر	شوری ۳۰درصد	کشته‌شدن حرارتی (۹۵°C به‌مدت 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



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

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

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر، باکتری‌های *E. coli* O157:H7 تحت شوری ۳۰درصد از روز چهارم مطالعه به بعد، کشت‌پذیری خود را از دست دادند؛ اما تا انتهای دورهٔ مطالعه، این باکتری‌ها بیان مثبت ژن *16S rRNA* را با استفاده از RT-PCR نشان دادند. مثبت‌بودن بیان ژن *16S rRNA* در باکتری‌های فاقد کشت‌پذیری روی محیط کشت در تیمار شوری ۳۰درصد در کنار عدم بیان ژن *16S rRNA* در باکتری‌های کشته‌شده به‌وسیلهٔ 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 مطالعهٔ حاضر مبنی بر ورود باکتری *E. coli* O157:H7 به حالت زنده اما غیرقابل‌کشت تحت استرس شوری با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد (۱۷، ۸)، 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، مرحلهٔ رشد لگاریتمی باکتری که در آن استرس اعمال می‌شود و نیز دمای شستشوی باکتری باشد (۱۸).

به‌طور کلی توانایی هر باکتری بیماری‌زا و به‌ویژه باکتری *E. coli* O157:H7 برای ورود به حالت VBNC می‌تواند از جنبه‌های بهداشت و امنیت موادغذایی 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 بیماری زایی 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 نمک‌سودشدهٔ ماهی آلوده به حالت VBNC باکتری *E. coli* O157 گزارش شده است (۸). باکتری‌های VBNC می‌توانند در مواد غذایی حاوی شوری های بالا مخفی شده و به‌وسیلهٔ 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 ۱۵-۲درصد طی شرایط نگهداری در یخچال از دست داد؛ هرچند تحقیقات بیشتری پیرامون زنده‌مانی این باکتری‌ها به‌وسیلهٔ 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 پلیمراز (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 به‌وسیلهٔ RT-PCR ژن 16S rRNA در مطالعهٔ

حاضر با نتایج مطالعات پیشین همخوانی دارد. Molaee و همکاران (۲۰۱۵) نیز توانستند باکتری‌های *E. coli* زندهٔ موجود در نمونه‌های آب را به‌وسیلهٔ 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 میکروارای ژن‌های *rfbE* و *fliC* این باکتری، توانستند باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت را با دقت ۱ CFU/ml شناسایی کنند (۱). در این راستا مطالعهٔ 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 مطالعهٔ 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، به‌وسیلهٔ RT-PCR کارایی این روش را برای تمایز باکتری‌های زنده از غیرزنده نشان می‌دهد. هم‌راستا با نتایج مطالعهٔ حاضر، Coutard و همکاران (۲۰۰۵) نیز مشاهده کردند که کاهش زنده‌مانی باکتری‌های موردمطالعهٔ آنها (*Vibrio parahaemolyticus*) با کاهش سیگنال RT-PCR همبستگی داشت (۲۳). تکنولوژی RT-PCR بر پایهٔ 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 نمونهٔ 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).

در جمع‌بندی مطالعهٔ حاضر می‌توان گفت، باکتری *E. coli* O157:H7 تحت شرایط شوری وارد حالت زنده اما غیرقابل 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 مطالعهٔ 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. درنتیجه می‌توان گفت که با وجود اتفاق‌نظر محققان مختلف در زمینهٔ 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 موادغذایی 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.

References

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. The journal of microbiology. 2005; 43(1): 93-100.
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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.
12. Molaee 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.
13. 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.
14. Sue D, Boor KJ, Wiedmann M. σB-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.
15. 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.
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. del Mar Lleò 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