

STRUČNI PREGLEDNI RAD

Izazovi identifikacije živih, ali neuzgojivih patogena iz hrane

Željka Tušek¹, Mladenka Vukšić², Tomislav Mikuš^{2*}, Lidija Kozačinski²

Sažetak

U ovome stručnom radu opisano je stanje određenih mikroorganizama koji su živi, no nisu uzgojivi (eng. *viable but non-culturable* - VBNC), te problemi nemogućnosti identificiranja navedenih mikroorganizama klasičnim metodama. Oni se u takvim uvjetima mijenjaju u stanje u kojem ih je nemoguće identificirati, pa samim time predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. U radu se opisuju i metode za koje je istraženo da identificiraju patogene, s namjerom smanjivanja njihove prisutnosti u hrani.

Keywords: patogeni, VBNC, metode

Uvod

Žive, ali neuzgojive (eng. *viable but non culturable* - VBNC) bakterije su one koje se ne mogu uzgojiti u medijima, a ipak su žive i aktivne. S obzirom na to da ih je nemoguće uzgojiti, isto je tako nemoguće identificirati ih klasičnim metodama. Zbog toga su vrlo često predmet istraživanja u mikrobiologiji. Ovakvo stanje bakterija prvi su opisali Xu i sur. (1982.). U svom su istraživanju koristili različite bakterijske sojeve *Escherichia coli* i *Vibrio cholerae*. VBNC stanje je odgovor bakterije na određene okolišne stresove, kao što su: promjena temperature, manjak hranjivih sastojaka, razina kisika, promjena osmotske koncentracije. Mnogi patogeni hrane imaju sposobnost postići VBNC stanje tijekom prerade i konzerviranja hrane, sušenja, zračenja, dodavanja konzervansa i dezinficijensa. Zbog toga predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Bakterije u ovom stanju nestanu u jednom periodu, a ponovno se pojavljuju kada se uklone nepovoljni uvjeti. Važno je naglasiti da su bakterije u ovom stanju metabolički neaktivne, ali imaju potencijal ponovno posta-

ti aktivnima (Oliver, 2005.). U VBNC stanju dolazi do smanjenja veličine bakterijske stanice. Jednako tako dolazi i do promjena u strukturi membrane, sastavu proteina, a moguća je i promjena rasporeda DNA. Izlazak iz VBNC stanja naziva se oživljavanjem, te do njega dolazi uslijed povećanja dostupnih nutrijenata, povećanja ili smanjenja temperature, različitih smjesa plinova te pod utjecajem spojeva koji luče aktivne stanice ili stanice domaćini (Li i sur., 2014.). Brojne bakterijske vrste dokazano mogu postići VBNC stanje, a najznačajnije su: *E. coli*, *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. One su ujedno i najpoznatije bakterije koje pronalazimo gotovo u svojoj hrani koja se konzumira kao što su razne vrste mesa, mliječnih proizvoda, pa sve do voća i povrća.

Za uspješnu identifikaciju bakterijskih vrsta u VBNC stanju, bitno je pronaći odgovarajuću metodu. Najpouzdanije su se pokazale metode izravnog brojanja bakterija, metode na bazi fluorescentnog označavanja i metode na bazi amplifikacije nukleinskih kiselina. Metode na bazi spektra i biosenzora

¹Tušek Željka, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb, studentica

²Mladenka Vukšić, asistentica; dr.sc. Tomislav Mikuš, docent; dr. sc. Lidija Kozačinski, redoviti profesor u trajnom zvanju; Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb

*Autor za korespondenciju: tmikus@vef.hr

imaju predispozicije da postanu kvalitetne metode za detekciju bakterija u VBNC stanju, no nisu još dovoljno istražene i dokazane, te im je nedostatak visoka cijena opreme.

Bakterije koje posjeduju mogućnost ulaska u VBNC stanje predstavljaju rizik i izazov za potrošače s obzirom da uzrokuju brojne bolesti. Cilj ovoga rada bio je istražiti značaj VBNC patogena iz hrane u sustavu sigurnosti hrane te predstaviti mikrobiološke metode kojima se bakterije u ovom stanju mogu uspješno identificirati u hrani.

Najvažnije VBNC bakterije

Do sad je utvrđeno 85 bakterijskih vrsta koje imaju sposobnost postizanja VBNC stanja, od čega je 18 nepatogenih, a 67 patogenih (Li i sur., 2014.). Najznačajnije bakterije koje imaju sposobnost ući u VBNC stanje i bitne su za sigurnost hrane, preciznije - mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje, su, kao što smo već spomenuli, *E. coli*, *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*.

Escherichia coli

E. coli jedna je od najraširenijih bakterija koje se prenose hranom i vodom, a okoliš najčešće kontaminira putem izmeta ljudi i životinja. Hrana koja je povezana s nalazom *E. coli* je uglavnom meso (većinom govedina), mliječni proizvodi, sokovi te svježe povrće (Liu i Mustapha, 2014.). Ulazak *E. coli* u VBNC stanje potiču postupci dezinfekcije i sterilizacije, radijacija, UV svjetlost te plazma tretman. Upravo ti postupci, koji ne koriste toplinu kao jedan od koraka u procesu dezinfekcije, jesu široko rasprostranjeni u industriji hrane zbog poboljšavanja okusa hrane. S obzirom na činjenicu da ne ubijaju bakterije, one potencijalno predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje. Kako bi se garantirala sigurnost hrane, potrebno je istražiti i razviti ključne dezinfekcijske procese koji će uspješno otkloniti rizik *E. coli*, to jest spriječiti njezin ulazak u VBNC stanje (Ding i sur., 2017.).

Od okolišnih čimbenika ulazak u VBNC stanje potiče manjak nutrijenata, oksidativni stres i niska temperatura. Općenito, postojanje VBNC bakterija u vodama predstavlja rizik za ljudsko zdravlje. Kada je *E. coli* u VBNC stanju, ne možemo ju, kao što je to uobičajeno, koristiti kao indikator fekalne kontaminacije, pa u takvom obliku pogoršava onečišćenje vodenog sustava i postaje rizik po javno zdravlje (Ding i sur., 2017.). Ne smijemo zaboraviti da se voda ugrađuje u gotovo sve vrste hrane.

Dinu i sur. (2011.) proveli su istraživanje koje je uključivalo soj *E. coli*, a povezuje se s bolestima koje se prenose svježim povrćem, uglavnom salatam. Cilj istraživanja je bio utvrditi ponašanje *E. coli* na filozferi salate pri niskim temperaturama. Proučavali su preživljavanje šest bakterijskih sojeva nakon skladištenja u vodi na niskoj temperaturi od 4 °C. Na optimalnoj temperaturi rasta (16 °C) svi sojevi su zadržali uzgojivost na lišću salate, no nakon stresnih uvjeta koji su uključivali niske temperature, sojevi su počeli gubiti uzgojivost i prelaziti u VBNC stanje.

Salmonella

Salmonella spp. su također poznati patogeni hrane koje nalazimo u mesu (peradi, govedini, svinjetini), jajima, mlijeku, plodovima mora te proizvodima koji sadržavaju orašaste plodove (Fleischmann i sur., 2021.). Od salmoneloze, bolesti koja je najčešće praćena dijarejom, u SAD-u godišnje oboli oko 1,4 milijuna ljudi, a od toga oko 600 slučajeva završi smrtnim ishodom (Zeng i sur., 2012.). Dva su soja značajna jer su najčešće odgovorni za trovanje hranom, a to su *Salmonella enteritidis* i *Salmonella Typhimurium*. *S. Typhimurium* ulazi u VBNC stanje kada je izložena gladovanju (Liao i sur., 2017.) i niskim temperaturama (Oliver i sur., 2005.). Liao i sur. (2017.) proveli su istraživanje utjecaja kombinirane metode primjene ultrazvuka i topline (termosonikacija) na VBNC stanje koristeći *S. Typhimurium*. Tretirane i netretirane bakterije obojane su s LIVE/DEAD BacLight kitom koji omogućuje razlikovanje između mrtvih (stanice se oboje u crveno) i živih bakterija (stanice se oboje u zeleno) a vizualno su detektirane pomoću konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije. Izlazak bakterija iz ovog stanja postiže se vraćanjem temperature inkubacije na optimalnih 37 °C. Provedeno je još jedno istraživanje koje je uključivalo bakteriju *Salmonella typhi* i umjetni medij pripremljen filtriranjem i steriliziranjem vode za piće (Zeng i sur., 2012.). Uzorci su ostavljeni u mraku na 4 °C ili na -20 °C. Broj ukupnih stanica određen je metodom AODC (eng. *acridine orange direct count*). Uzorci su bili razrijeđeni, obojeni akridin narančastom i potom pregledani pod fluorescentnim mikroskopom. Pokus je izveden na sobnoj temperaturi, a osnovna prehrana, sadržaj glukoze i koncentracija ((NH₄)₂SO₄) dodani su u medij. Normalne stanice i VBNC stanice tretirane su na -20 °C. Rezultati su pokazali da se VBNC stanice nisu mogle formirati nakon inkubacije na 4 °C tijekom 120 dana. Broj kolo-

nija se nakon 120 dana smanjio, ali su se i dalje mogle uzgajati. Zeng i sur. (2012.) vjeruju da je potrebno mnogo duže vremena da bi se dokazalo da stanice mogu ući u VBNC na 4 °C. *S. typhi* promijenila je stanje u VBNC unutar 48 sati od inkubacije u umjetnom mediju flaširane vode za piće na -20 °C. Uočena je razlika između tzv. *normalnih* bakterija (koje ne mogu doći u VBNC stanje) i VBNC bakterija pod fluorescentnim mikroskopom metodom AODC-a.

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes je Gram pozitivna bakterija koja je odgovorna za neke od najznačajnijih epidemija uzrokovanih hranom. Besnard i sur. (2002.) proveli su istraživanje s ciljem dokazivanja čimbenika koji utječu na ulazak ove bakterije u VBNC stanje. Korištena su četiri soja bakterije uzgajana na 37 °C tijekom 24 sata. Umjetni medij za izgladnjivanje stanice bio je korišten u tri faze. Prva je faza uključivala učinak veličine inokuluma na kultivacija stanica. Stanice su prikupljene, isprane i raspoređene u boce na pH 6,0. Boce su ostavljene u mraku na 4 °C ili 20 °C s natrijevim kloridom (7 %) ili bez njega, dok nije postignut broj od 10⁸ CFU/mL (serija 1) i 10⁶ CFU/mL bakterija (serija 2). Druga faza je obuhvatila utjecaj temperature, pH i koncentracije natrijeva klorida na uzgojenost, a treća utjecaj prirodne svjetlosti kroz 80 dana na bakterijske stanice. Za određivanje VBNC stanica među bakterijskim populacijama bilo je nužno koristiti metode koje omogućuju otkrivanje metaboličke aktivnosti u neuzgojivim stanicama. To su dvije metode: dvostruko bojenje i izravno brojanje živih stanica. Rezultati prve faze eksperimenta pokazale su gubitak uzgojenosti između 28. i 100. dana. Broj živih bakterija pao je ispod razine detekcije. Rezultati druge faze eksperimenta pokazali su da je potrebna niža koncentracija NaCl kako bi bakterijska stanica postigla VBNC stanje. Nizak pH u kombinaciji s niskom koncentracijom natrijeva klorida umanjio je vrijeme potrebno za dostizanje VBNC stanja. Međutim, viša temperatura povećala je vrijeme potrebno za ulazak u VBNC stanje. Rezultati treće faze eksperimenta pokazali su da su, nakon samo 9 do 28 dana izloženosti solarnom zračenju, svi testirani sojevi ušli u VBNC stanje. Metabolička aktivnost određena je metodom izravnog brojanja bakterija i dvostrukog obojenja. Zaključeno je da prirodno svjetlo značajno smanjuje vrijeme potrebno za ulazak u VBNC stanje. Lindbäck i sur. (2009.) su istražili ima li *L. monocytogenes* dobivena iz uzora-

ka morskih plodova, industrijskih pogona i kliničkog materijala potencijal ući u VBNC stanje. Korišteno je 14 sojeva koji sadrže šest kliničkih izolata, pet sojeva izoliranih iz lososa i tri soja izolirana iz postrojenja za preradu. Izgladnjivani su u vodi na 4 °C dok nisu izgubili mogućnost uzgoja. Dokazano je da su svi sojevi ušli u VBNC stanje nakon perioda gladovanja.

Postupci otkrivanja VBNC bakterija

Ključna stvar za osiguranje hrane i zdravlja ljudi je pronalazak odgovarajućih metoda detekcije bakterija u VBNC stanju. Uobičajene mikrobiološke metode koje koriste selektivne i/ili neselektivne hranjive podloge ili obogaćene bujone nisu prikladne za uzgoj mikroorganizama u VBNC stanju. Metode koje se koriste ili su potencijalne za korištenje, jesu: metode izravnog brojanja, metode na bazi metaboličke aktivnosti, metode fluorescentnog označavanja, metode detekcije na bazi amplifikacije nukleinskih kiselina i metode na bazi spektra.

Metoda izravnog brojanja (DVC, direct viable count)

Metoda izravnog brojanja upotrebljava se često, a razvijena je procjenom živih bakterija u morskoj vodi direktnom mikroskopskom metodom. Pokus je uključivao predinkubaciju uzoraka morske vode s malom količinom ekstrakta kvasca i naldiksične kiseline (Gao i sur., 2020.). Ova je metoda vrlo jednostavna te se njome vrlo lako detektiraju žive bakterijske stanice, a rezultati su vidljivi u kratkom vremenskom periodu. VBNC stanice su tretirane antibioticima, primjerice naldiksičnom kiselinom, aztreonamom, ciprofloksacinom i slično, koji imaju ulogu izduživanja stanica, kako bi se omogućilo izravno brojanje mikroskopijom (Xu i sur., 1982.). Metoda je postala široko upotrebljiva i usvojena za otkrivanje stanica *S. enteritidis*, *V. cholerae*, *C. jejuni*, *V. vulnificus* (Gao i sur., 2020.). Međutim, odgovor bakterijskih stanica na antibiotike ovisi o soju bakteriju. Dokazano je da naldiksična kiselina kod Gram pozitivnih bakterija može dovesti do izostanka izduživanja (Gao i sur., 2020.). Utvrđena je i dokazana sposobnost ostalih antibiotika kao što su ciprofloksacin i aztreonam da uzrokuju izduživanje bakterijskih stanica. Besnard i sur. (2002.) su proveli istraživanje u kojemu su umjesto naldiksične kiseline koristili ciprofloksacin za tretiranje *L. monocytogenes*. Utvrdili su da je optimalna koncentracija ciprofloksacina 1 µg/ml, a optimalno razdoblje inkubacije 7 sati za postizanje maksimalne dužine

L. monocytogenes. Kako bi se postigli bolji rezultati, ova se metoda uobičajeno kombinira s fluorescenčnom *in situ* hibridizacijom ili izravnom inkubacijom fluorescentnih antitijela. Kombinacijom DVC metode i akridina narančaste ili 4',6-diamideino-2-2-fenilindol (DAPI) fluorescentne sonde, mogu se primijetiti održive mikrobnne stanice pod mikroskopom. Do sada su DVC metode bile upotrebljavane za otkrivanje različitih VBNC mikroorganizama, uključujući *E. coli*, *V. vulnificus*, *S. typhi*, *L. monocytogenes* i *V. cholerae*. Međutim, različite osjetljivosti različitih sojeva bakterija na različite antibiotike i razvoj rezistencije na antibiotike mogao bi ograničiti široku primjenu metoda otkrivanja DVC-a.

Metode fluorescentnog označavanja

Još jedna metoda za detekciju VBNC bakterija je laserska skenirajuća citometrija (eng. *laser scanning cytometry* - LSC). Također je poznata kao laserska citometrija u čvrstoj fazi, membranska filtracija, izravno bojanje (epifluorescencija) i lasersko skeniranje. Nedostatak metode je taj što je prikladna samo za materijale koji se mogu filtrirati. Uzorak je filtriran, označen i laserski skeniran. Istraživanja su pokazala da se u nekim vrstama vode otkriva veći broj mikroorganizama od uobičajene mikrobiološke metode (Newby, 2007.). Druga metoda koja se koristi je protočna citometrija (eng. *flow cytometry* - FCM,) koristeći digitalnu elektroniku za otkrivanje živih mikroorganizama. Nakon označavanja živućih stanica mikroorganizmi pojedinačno prolaze kroz lasersku zraku gdje se za otkrivanje koristi osjetljivi fotomultiplikator. Parametri se koriste za razlikovanje obilježenih, održivih i autofluorescentnih čestica. Rezultati se izražavaju kao izravno brojanje po volumenu i mogu se pohraniti na računalo (Newby, 2007.).

Metode na bazi metaboličke aktivnosti

Metabolička aktivnost važna je karakteristika živih bakterijskih stanica. Iz tog razloga postoje fluorescentne sonde poput 5-cijano-2,3-ditolil tetrazolij (CTC) i resazurin koje ciljaju metaboličku aktivnost bakterijskih stanica i na taj način detektiraju VBNC bakterije. Pod djelovanjem dehidrogenaze, CTC se reducira u netopivi crveni fluorescentni produkt u održivim bakterijskim stanicama. Bojanje sa CTC i DAPI obojenjem koristi se za razlikovanje živih od mrtvih bakterijskih stanica (Gao i sur., 2020.). Korištenjem epifluorescentne mikroskopije, stanice

koje emitiraju crvenu fluorescenciju su održive CTC obojane populacije, a plave stanice su mrtve koje su obojene DAPI-om. Komercijalni komplet za ispitivanje vitalnih stanica LIVE/DEAD koristi se za dvostruko bojanje sa SYTO i resazurinom, s ciljem odvajanja živih i mrtvih stanica (Gao i sur., 2020.).

Metode detekcije na bazi amplifikacije nukleinskih kiselina

Lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) ne može se koristiti za razlikovanje VBNC od mrtvih bakterijskih stanica. Ovaj se problem može riješiti uz pomoć inhibitora DNA amplifikacije u mrtvim stanicama, kao što su: dvolančane DNA interkalirajuće boje, propidijum monoazid (PMA) (Chaveerach i sur., 2003.) i etidij monoazid (EMA) (Gao i sur., 2020.). EMA/PMA-PCR testovi primjenjivi su za otkrivanje različitih mikroba, uključujući bakterijske stanice i spore, gljivice i kvasce te viruse u hrani i okolišu (Zeng i sur., 2014.). PMA se najčešće od spomenutih koristi za selekciju živih mikroorganizama. To je fotoreaktivna boja koja veže DNA i lagano može prodrijeti u mrtve bakterije kroz ugrožene stanične membrane. Nakon intenzivnog izlaganja svjetlosti acido skupina PMA je pretvorena u reaktivni nitrenski radikal, koji dalje reagira s ugljikovodičnim dijelom lanca DNA, stvarajući na taj način snažnu kovalentnu vezu dušik-ugljik. Ova promjena rezultira strukturalnom promjenom i netopivosti DNA, a to dalje dovodi do gubitka DNA tijekom ekstrakcije i nepristupačnosti DNA za izduživanje pomoću DNA polimeraze (Gao i sur., 2020.). Nadalje, DNA kalup u mrtvim bakterijama koji je prethodno tretiran s PMA neće se amplificirati tijekom PCR-a. Kao dodatak ovoj metodi koristi se još reverzna kvantitativna transkripcija u stvarnom vremenu (RT-qPCR) koja cilja mRNA (Gao i sur., 2020.). Navedena mRNA ima kraću i jednodlančanu strukturu, pa je nestabilnija od DNA i živi kraće od dvije minute. Smatra se da se mRNA razgrađuje u mrtvim bakterijskim stanicama. Iz tog se razloga prisutnost mRNA smatra markerom održivosti stanica. 16SrRNA i mRNA različitih gena usvojeni su kao ciljani geni za RT-qPCR detekciju bakterija u stanju VBNC (Gao i sur., 2020.). Međutim, RT-PCR metoda ograničena je zbog kompliciranih procesa RNA ekstrakcije i lake razgradnje mRNA. Utvrđeno je da je učinkovitost PCR tehnike ograničena raznim inhibitorima u matrici hrane poput minerala, fenolnih spojeva, proteina, masnih kiselina i poza-

dinskih mikrobiota (Yang i sur., 2014.). U posljednje vrijeme razvijena je tehnika digitalnog PCR (d-PCR) za poboljšanje učinkovitosti jer omogućuje precizniju kvantifikaciju bez uspostavljanja kalibracijskih krivulja (Huggett i sur., 2015.). Na temelju načina dijeljenja postoje dvije grupe dPCR-a: jedan je digitalni PCR na bazi komore (cdPCR), a drugi je kapljični digitalni PCR (ddPCR) (Gao i sur., 2020.). S obzirom na to da su uređaji i čipovi za cdPCR skupi i moraju biti posebno dizajnirani, češće se koristi ddPCR.

Metode na bazi spektra

Različite karakteristike sastava stanične membrane i/ili stijenke VBNC bakterija mogu se iskoristiti kao markeri za selektivno otkrivanje tih mikroorganizama. Posljednjih godina određeni je broj studija pokušao primijeniti tehnike analize kemijskih spojeva temeljenih na jedinstvenim spektrima za dijagnozu VBNC mikroorganizama, poput masene spektrometrije (MS) i Ramanove spektroskopije (Gao i sur., 2020.). Za MS, ciljni su spojevi ionizirani u nabijene fragmente. Omjer mase i naboja dobiva se kao otisak prsta za ciljne spojeve. Razvitak Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI-TOF) metode proširio je primjenu MS na veće molekule kao što su proteini, peptidi i ugljikohidrati. Pristupi temeljeni na masenoj spektrometriji su korišteni za dijagnozu pojedinačnih sojeva u različitim fiziološkim stanjima, poput VBNC bakterija. Ramanova spektroskopija je tehnika koja se koristi za određivanje molekularne strukture i kemijskih veza mjerenjem vibracijske energije. Princip Ramanove spektroskopije temelji se na fenomenu neelastičnog raspršivanja svjetlosti koji je rezultat interakcije malog dijela neelastično raspršenih fotona s molekulama ciljnih spojeva. Ova metoda još uvijek ima ograničenja. Posljednjih godina razvijena je nova tehnika Ramanove spektroskopije- SERS koja označava spektroskopiju sa poboljšanom površinom. Primijenjena je u otkrivanju molekula u tragovima, analizi biomolekula i karakterizaciji materijala (Ding i sur., 2017.). Ova metoda uvodi aktivne nanočestice koje su uglavnom izrađene od zlata ili srebra u klasičan Ramanov spektroskopski sustav. Ovom se metodom može primijeniti veći intenzitet signala i znanstvenici smatraju da SERS ima potencijal za otkrivanje VBNC bakterija (Gao i sur., 2020.). Metode na bazi spektra imaju prednost brzog otkrivanja i ciljanja cijelih stanica bez složene pripreme, no mana im je skupoća opreme i činjenica da zahtijevaju profesionalno osposobljene ljude.

Značaj VBNC za sigurnost hrane

S obzirom na nemogućnost detekcije, a i činjenicu da neki dezinfekcijski postupci mogu aktivirati prelazak mikroorganizama u VBNC stanje, postoji realan rizik za ljudsko zdravlje zbog onečišćenja hrane. Nicolò i sur. (2012.) su istražili može li limunska kiselina zajedno s niskom temperaturom potaknuti ulazak bakterije *Staphylococcus aureus* u VBNC stanje. Potvrđeno je da se to i dogodilo 18 dana nakon tretiranja otopinom limunske kiseline na pH 4.0 i temperaturi od 4 °C. Stanice bakterije *E. coli* O157:H7 na površini salate i špinata potaknute su u stanje VBNC niskom temperaturom (Dinu i Bach, 2013.). Nadalje, Gunasekera i sur. (2002.) izvijestili su da je u pasteriziranom mlijeku koje je podvrgnuto termičkoj obradi bakterija *E. coli*, došla u stanje VBNC i ostala živa.

Zabrinjavajući je podatak da se samo 20 % bolesti pripisuje poznatim patogenima, dok ih je čak 80 % nespecificirano. Nespecificirani patogeni još nisu identificirani kao uzročnici bolesti koje se prenose hranom, ili su to oni za koje se zna da se nalaze u hrani, ali im patogenost još uvijek nije dokazana. Zbog toga je njihovo dokazivanje tradicionalnim metodama još uvijek veoma teško (Nicolò i sur., 2012.).

Zaključak

Patogeni iz hrane predstavljaju ozbiljan problem za zdravlje ljudi, posebice ako se zna da bolesti mogu završiti i smrtnih ishodom. Uz to, ne smije se zanemariti činjenica da bolesti uzrokuju i bakterije koje mogu postići VBNC stanje. Njihova detekcija, dok su u prikrivenom stanju, je izrazito komplicirana. Godinama su brojni znanstvenici ulagali napore kako bi dokazali koja je metoda najbolja za njihovo otkrivanje. Do sada već postoje opisane brojne metode, a svaka ima određene prednosti i nedostatke. Ipak, neke se od njih mogu izdvojiti po točnosti. Izdvojene su metode PCR, RT-PCR i metode na bazi fluorescentnog označavanja jer daju poseban uvid u obojane bakterijske stanice. Zajednički problem tih metoda jest svakako skupoća opreme, koju si određeni laboratoriji ne mogu priuštiti. Uz razne metode detekcije postoje i međunarodni programi koji su se posvetili proučavanju bolesnika zaraženog nekom od bolesti koje uzrokuju VBNC bakterije. Time se uglavnom bavi Svjetska zdravstvena organizacija sa svojim timom stručnjaka za analizu, prikupljanje i proučavanje podataka. Takav

je pristup izrazito važan, jer je problem onečišćenja hrane VBNC bakterijama globalni problem. Procjena rizika, upućivanje na nove bolesti i smjernice za poboljšanje sigurnost hrane imaju važnu ulogu u sprječavanju rizika po zdravlje ljudi.

Napomena: Ovaj rad izvadak je iz diplomskog rada Tušek, Ž. (2021): Izazovi identifikacije živih, ali neuzgajivih patogena iz hrane. Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu.

References

- [1] Besnard V., M. Federighi, E. Declercq, F. Jugiau, J. M. Cappelier (2002): Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* 359–370. DOI: 10.1051/vetres:2002022
- [2] Ding T., Y. Suo, Q. Xiang, X. Zhao, S. Chen, X. Ye, D. Liu (2017): Significance of Viable but Nonculturable *Escherichia coli*: Induction, Detection, and Control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 417–428.
- [3] Dinu L. D., S. Bach (2011): Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the Phyllosphere of Lettuce: a Food Safety Risk Factor. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8295–8302. <https://doi.org/10.1128/AEM.05020-11>
- [4] Dinu, L. D., S., Bach (2013): Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157: H7 from vegetable samples using quantitative PCR with propidium monoazide and immunological assays. *Food Control.* 31, 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.020>
- [5] Fleischmann S., C. Robben, T. Alter, P. Rossmann, P. Mester (2021): How to Evaluate Non-Growing Cells—Current Strategies for Determining Antimicrobial Resistance of VBNC Bacteria. *Antibiotics*, 10, 115.
- [6] Gao R., X. Liao, X. Zhao, D. Liu, T. Ding (2020): The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 20, 2146–2175. doi:10.1111/1541-4337.12695
- [7] Gunasekera, T. S., A. Sorensen, P. V. Attfield, S. J. Sorensen, D. A. Veal (2002): Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1988–1993. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1988-1993>
- [8] Huggett, J. F., S. Cowen, C. A. Foy (2015): Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical Chemistry*, 61, 79–88.
- [9] Li L., N. Mendis, H. Trigui, J. D. Oliver, S.P. Faucher (2014): The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- [10] Liao H., L. Jiang, R. Zhang (2017): Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella Typhimurium* by thermosonication and factors affecting resuscitation. *FEMS Microbiol. Lett.* 365 fnx249. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx249>
- [11] Lindbäck T., M. E. Rottenberg, S. M. Roche, L. M. Rørvik (2010): The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* 41, 1–10.
- [12] Newby P. (2007): The Significance and Detection of VBNC Microorganisms. *Am. Pharm. Rev.* 7, 124–126.
- [13] Nicolò M. S., S. P. Guglielmino (2012): Viable but Nonculturable Bacteria in Food. *Public Health - Methodology, Environmental and Systems Issues*. Ed. Maddock, J. InTech, 2012. str. 189–216. doi:10.5772/38118.
- [14] Oliver J. D. (2005): The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *J. Microbiol. Spec No:*93–100. PMID: 15765062.
- [15] Xu H.S., N. Roberts, F. L. Singleton, R.W. Attwell, J. D. Grimes, R. R. Colwel (1982): Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. *Microb. Ecol.* 8, 313–323.
- [16] Yang, R., A. Papparini, P. Monis, U. Ryan (2014): Comparison of next-generation droplet digital PCR (ddPCR) with quantitative PCR (qPCR) for enumeration of *Cryptosporidium* oocysts in faecal samples. *IJP-PAW*, 44, 1105–1113.
- [17] Zeng B., G. Zhao, X. Cao, Z. Yang, C. Wang, L. Hou (2012): Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella typhi*. *Biomed Res. Int.* Article ID 907170 <https://doi.org/10.1155/2013/907170>
- [18] Zeng D., Chen Z., Jiang Y., Xue F. and Li B. (2014): Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. *Front. Microbiol.* 22, 1833. doi:10.3389/fmicb.2016.01833

Dostavljeno/Received: 08.04.2024.

Prihvaćeno/Accepted: 09.05.2024.

Challenges of identification of living but non-culturable food pathogens

Abstract

This paper describes the condition of certain microorganisms in which they are alive, but are not culturable (VBNC, viable but non-culturable). Also, the problem of not being able to identify such bacteria by classical methods is described, since bacteria react to adverse conditions such as conditions used

during food processing and other and enter a state in which they cannot be identified, and thus present a danger to human health. Here are described methods that have been investigated and proven to identify pathogens, in order to reduce their number in food.

Keywords: pathogens, VBNC, methods

Herausforderungen bei der Identifizierung lebender, aber nicht kultivierbarer Krankheitserreger in Lebensmitteln

Zusammenfassung

In diesem Beitrag wird der Zustand bestimmter Mikroorganismen beschrieben, die zwar lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind (engl. VBNC, viable but non-culturable). Außerdem wird das Problem beschrieben, dass solche Bakterien mit klassischen Methoden nicht identifiziert werden können, da sie auf ungünstige Bedingungen, wie z. B. bei der Lebensmittelverarbeitung, reagieren und in einen Zustand übergehen, in dem sie nicht mehr identifiziert werden können und somit eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Hier werden Methoden beschrieben, die untersucht wurden und sich bewährt haben, um Krankheitserreger zu identifizieren und ihre Anzahl in Lebensmitteln zu reduzieren.

Schlüsselwörter: Pathogene, VBNC, Methoden

Desafíos de la identificación de patógenos alimentarios vivos pero no en crecimiento

Resumen

Este documento describe la condición de ciertos microorganismos en la que están vivos, pero no son cultivables (ing. VPNC, viable but non-culturable, viables pero no cultivables). Además, se describe el problema de no poder identificar tales bacterias mediante métodos clásicos, ya que las bacterias reaccionan a condiciones adversas como las condiciones utilizadas durante el procesamiento de alimentos y otras, y entran en un estado en el que no pueden ser identificadas, y por lo tanto representan un peligro para la salud humana. Aquí se describen métodos que han sido investigados y probados para identificar patógenos, con el fin de reducir su número en los alimentos.

Palabras claves: patógenos, VPNC, métodos

Problemi di identificazione degli agenti patogeni vitali ma non coltivabili provenienti dagli alimenti

Riassunto

Questo articolo scientifico descrive la condizione di certi microrganismi vitali ma non coltivabili (in inglese: viable but non-culturable - VBNC) e il problema legato all'impossibilità di identificare tali microrganismi utilizzando i metodi classici. In tali condizioni, essi si trasformano in uno stato in cui è impossibile identificarli e quindi rappresentano un pericolo per la salute umana. L'articolo descrive, inoltre, i metodi studiati per identificare gli agenti patogeni, con l'obiettivo di ridurre la presenza negli alimenti.

Parole chiave: agenti patogeni, VBNC, metodi