



DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.210197

<http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/2021121423.pdf>

## 活的非可培养状态幽门螺杆菌的研究进展

李晶晶, 郑田利, 沈丹芸, 陈嘉熠, 裴晓方

(四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院卫生检验与检疫学系, 成都 610041)

**[摘要]** 幽门螺杆菌是人类常见病原体之一, 可引起慢性胃炎、消化性溃疡甚至胃癌等疾病。近年来研究发现幽门螺杆菌可由螺旋形变为球形, 进入活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态, 可能对公众健康构成潜在威胁。在该状态下, 幽门螺杆菌的形态结构、生理特征发生了改变, 能够保持代谢活性但蛋白质表达下降, 同时丧失了培养基上的生长能力。环境因素、抗生素及抑制剂类物质等条件可诱导幽门螺杆菌进入VBNC状态, 但VBNC状态幽门螺杆菌能否复苏尚不明确。基于VBNC状态幽门螺杆菌细胞膜完整且具有代谢活性等特性, 可使用活菌直接镜检法等经典方法以及反转录聚合酶链反应等分子生物学方法对其进行检测。目前VBNC状态幽门螺杆菌已在水体环境及生物媒介体内检出, 且幽门螺杆菌可在人工污染的食品中进入VBNC状态, 这给公共卫生和食品安全带来了挑战。因此, 研究VBNC状态幽门螺杆菌的变化规律、检测方法等, 对今后VBNC状态幽门螺杆菌的防控及其相关机制研究具有重要意义。

**[关键词]** 幽门螺杆菌; 活的非可培养状态; 检测方法; 诱导; 复苏

## Research progress in the *Helicobacter pylori* with viable non-culturable state

LI Jingjing, ZHENG Tianli, SHEN Danyun, CHEN Jiayi, PEI Xiaofang

(Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

### ABSTRACT

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is one of the most common pathogens in human beings and it is responsible for diseases such as chronic gastritis, peptic ulcer, and even gastric cancer. Studies in recent years have found that *H. Pylori* could transform from the normal spiral-shaped bacillary form into the coccoid form and enter a viable but non-culturable (VBNC) state, which may pose a potential threat to public health. In this state, the morphological structure and physiological characteristics of *H. Pylori* have changed. It can maintain the

收稿日期(Date of reception): 2021-03-29

第一作者(First author): 李晶晶, Email: 1134638498@qq.com, ORCID: 0000-0001-9690-3017

通信作者(Corresponding author): 陈嘉熠, Email: c.jy.210@163.com, ORCID: 0000-0001-9325-5237; 裴晓方, Email: xpeiscu@163.com, ORCID: 0000-0002-4228-4027

基金项目(Foundation item): 四川省科技计划项目(2020YFS0289)。This work was supported by the Sichuan Science and Technology Program, China (2020YFS0289).

metabolic activity but protein expression is decreased. And the *H. Pylori* in this state cannot grow in the culture medium. Conditions such as environmental factors, antibiotics, and inhibitors can induce *H. Pylori* to enter the VBNC state, but it is still not known whether *H. pylori* in the VBNC state can reactivate or not. Based on the cell membrane integrity and metabolic activity of *H. pylori* in the VBNC state, it can be detected by classical methods including direct microscopy of live bacteria and molecular biological methods such as reverse transcription-polymerase chain reaction. *H. pylori* in the VBNC state has been detected in water source and biological media. It has been also found that *H. pylori* can enter the VBNC state in artificially contaminated food, which poses challenges to public health and food safety. Therefore, it is of great significance to study the change pattern and detection methods of *H. pylori* in the VBNC state for the prevention and control of *H. pylori* in the VBNC state. It is valuable to further study the underlying mechanisms of *H. pylori* in the VBNC state.

**KEY WORDS** *Helicobacter pylori*; viable but non-culturable; detection methods; induction; resuscitation

幽门螺杆菌是一种常见的革兰氏阴性微需氧菌,能特异性地定植于人和动物的胃黏膜上皮细胞<sup>[1]</sup>。该菌在自然界中普遍存在,其宿主分布广泛,在人类中的感染形势较为严峻。2015年全球约有40亿人感染幽门螺杆菌,发展中国家成年人的感染率为70%~90%<sup>[2]</sup>。幽门螺杆菌入侵宿主后主要导致慢性胃炎、消化性溃疡等胃肠道疾病,其感染与胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤的发生和发展密切相关,对社会造成了巨大的公共卫生风险及经济负担<sup>[3]</sup>。

活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态是细菌生存的一种特殊形式,指在一定环境中,某些不形成芽胞的细菌失去在培养基上的生长能力,却能保持一定生理活性的状态<sup>[4]</sup>。进入VBNC状态或形成芽胞均为细菌抵抗不良环境的生存策略,二者的区别在于VBNC状态的细菌能够进行呼吸、转录及蛋白质合成等过程,而在细菌芽胞内未观察到代谢活性<sup>[5]</sup>。在不利环境压力下,幽门螺杆菌可由螺旋形转变为球形,进入VBNC状态<sup>[6]</sup>。近年来,VBNC状态幽门螺杆菌的诱导、复苏及检测方法等受到越来越多的关注,但目前未见针对VBNC状态幽门螺杆菌的综述报道。因此,笔者对VBNC状态幽门螺杆菌的生物学特性、诱导及复苏、检测方法、检出现状等方面进行综述,以期今后对VBNC状态幽门螺杆菌的特性及其生存机制进行深入研究提供思路和借鉴。

## 1 VBNC 状态幽门螺杆菌的生物学特性

### 1.1 形态学变化

在幽门螺杆菌进入VBNC状态的过程中,其形态结构、生理特征发生了一系列变化。在透射电子显微镜下,首先,幽门螺杆菌表面出现空泡,致密物质聚集在细胞质周围;随后细胞逐渐弯曲变为“U形”,细胞质浓缩,细胞体积缩小,最终变为球形<sup>[7]</sup>(图1)。新形成的“球形体”具有完整的细胞膜和细胞壁结构,细胞质内电子密度高,有一个或多个囊泡。囊泡内含聚磷酸盐,可作为能量储备,维持细胞活力<sup>[8]</sup>。随着培养时间的延长,其表面出现皱褶,细胞内颗粒消失,最后细胞在体积变小、细胞器破裂、细胞膜失去完整性后死亡,即在幽门螺杆菌转变为球形的过程中,先为VBNC状态,然后逐步退化至死亡<sup>[9-10]</sup>。



图1 幽门螺杆菌进入VBNC状态的形态学变化

**Figure 1 Morphological changes of *H. pylori* entering into VBNC state**

### 1.2 代谢活性及基因表达

虽然VBNC状态幽门螺杆菌的DNA、RNA和ATP含量均降低,但其保留了参与DNA复制、细胞分裂和合成多种蛋白质的能力<sup>[11-12]</sup>。Narikawa等<sup>[12]</sup>将

幽门螺杆菌诱导为VBNC状态后,发现球形菌株的DNA和RNA平均含量分别比螺旋形菌株低6.8和8.1倍。与螺旋形幽门螺杆菌相比,VBNC状态幽门螺杆菌的代谢活性较低,大部分蛋白质的表达下降。螺旋形与VBNC状态幽门螺杆菌的蛋白质表达差异主要出现在30 kD(1 D=1 u)以及45~97.4 kD的两个蛋白质分子量跨度之间<sup>[13]</sup>。Loke等<sup>[11]</sup>比较了不同形态幽门螺杆菌部分蛋白质的相对丰度,发现VBNC状态的幽门螺杆菌有35种蛋白质表达下降,而这些蛋白质主要参与碳、氨基酸、核苷酸及脂质代谢等过程。目前普遍认为这种维持蛋白质低水平表达的代谢机制有助于VBNC状态细菌的长期生存<sup>[11]</sup>。

在基因表达方面,球形与螺旋形幽门螺杆菌具有相似的DNA条带,表明球形幽门螺杆菌基因组与螺旋形幽门螺杆菌相比未发生明显改变<sup>[14]</sup>。当幽门螺杆菌转变为球形后,仍可以表达酶基因 $ureA$ 、 $ureB$ 以及毒力因子 $cagA$ 、 $vacA$ 、 $babA$ 等<sup>[15]</sup>。值得关注的是,球形幽门螺杆菌中 $spoT$ 基因的表达与螺旋形菌株相比上调了30倍,提示该基因可作为识别幽门螺杆菌形态转化的重要标志<sup>[16]</sup>。同时,幽门螺杆菌的形态改变可能受到毒力基因的影响,高致病性幽门螺杆菌菌株比低致病性菌株转变为球形体的可能性更大<sup>[17]</sup>。虽然这些研究大多针对球形幽门螺杆菌,部分研究未确定这些菌株是否能在培养基上生长,但VBNC状态是球形幽门螺杆菌的一种特殊形式,这对于研究VBNC状态幽门螺杆菌具有一定参考意义。

## 2 VBNC状态幽门螺杆菌的诱导与复苏

### 2.1 VBNC状态幽门螺杆菌的诱导条件

诱导幽门螺杆菌进入VBNC状态的因素较多,包括环境、抗生素及其他抑制剂等。温度、氧气浓度、pH值、金属离子、光照等环境因素的改变可促进幽门螺杆菌进入VBNC状态,寡营养常作为协同因素<sup>[18]</sup>。Adams等<sup>[19]</sup>发现幽门螺杆菌可在自然淡水中培养,在短时间内即进入VBNC状态。抗生素也可用于VBNC状态幽门螺杆菌的诱导,可用的抗生素包括阿莫西林、红霉素、克拉霉素、庆大霉素和甲硝唑等<sup>[18,20]</sup>。Faghri等<sup>[20]</sup>进一步比较了阿莫西林、甲硝唑和克拉霉素的诱导效果,结果发现3种抗生素在50%最低抑菌浓度(50% minimum inhibitory concentration, MIC<sub>50</sub>)下均可以使螺旋形幽门螺杆菌转变为球形,其中阿莫西林的诱导比例最高。同时,一些具有抑制作用的物质也有利于幽门螺杆菌的转变。Narikawa等<sup>[12]</sup>在幽门螺杆菌的培养过程中加入甘氨酸脱氧胆酸和柠檬酸铋,培养3 d后得到了较高比

例的球形体,并检测到其mRNA。Correia等<sup>[21]</sup>研究了多不饱和脂肪酸二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)对幽门螺杆菌生长的影响,发现幽门螺杆菌暴露在100 μmol/L DHA的环境中会从螺旋形转变为球形,但并未判断其活力。

### 2.2 VBNC状态幽门螺杆菌的复苏方法

VBNC状态细菌能否恢复到原始状态,关系到环境卫生及公众健康等多个方面。目前已报道的VBNC状态细菌复苏方法包括逐步升温法、添加有机物法、富营养法、生物法等几大类<sup>[22]</sup>。生物法为常用方法,其他几种方法鲜有应用。Cellini等<sup>[6]</sup>将幽门螺杆菌培养20 d后发现其转为球形,进一步将其接种到BALB/c小鼠体内,1个月后小鼠胃黏膜组织出现组织病理学改变。该研究表明幽门螺杆菌在VBNC状态下能在小鼠体内复苏,并导致小鼠感染。但在Boehne等<sup>[23]</sup>的实验中并未出现相似结果,小鼠在被饲喂含有VBNC状态幽门螺杆菌的水后未发生感染。Eaton等<sup>[24]</sup>在微需氧条件下将幽门螺杆菌诱导为球形体后,不能使其在无菌仔猪的胃中定植,但研究者并未判断该球形幽门螺杆菌是否存活。因此,关于VBNC状态幽门螺杆菌能否复苏及其复苏条件还需进一步探索,该状态下幽门螺杆菌的致病潜力也有待研究。目前尚未明确是否存在使VBNC状态幽门螺杆菌复苏的因子,但值得关注的是,Mukamolov等<sup>[25]</sup>发现了具有促进VBNC状态细菌复苏和生长功能的复苏促进因子(resuscitation-promoting factor, Rpf)。Rpf不仅具有促进VBNC状态革兰氏阳性菌生长的作用,而且有促进变形菌(*Proteobacteria*)等部分革兰氏阴性菌复苏的作用,其促进复苏机制主要包括3种假说:1)Rpf作为细胞因子,可能与VBNC状态细菌表面的特定受体结合并引发复苏;2)Rpf可能作用于VBNC状态细菌的细胞壁并诱导其重塑,从而使之复苏;3)Rpf可能作用于细菌的细胞壁,使其部分裂解后释放肽聚糖碎片,进而与其他信号因子结合促进菌体复苏<sup>[26]</sup>。虽然Rpf复苏机制尚未明确,但这些研究为今后探索VBNC状态幽门螺杆菌复苏机制提供了新的思路。

## 3 VBNC状态幽门螺杆菌的检测方法

VBNC状态幽门螺杆菌在培养基上无生长能力,不能通过传统培养方法将之分离并检出,但可通过检测细菌代谢活力、细菌抗原性、细胞膜完整性等来判断其状态。早期的研究大多使用呼吸检测法<sup>[27]</sup>、活菌直接镜检法<sup>[28]</sup>等经典方法检测VBNC状态细菌。



呼吸检测法的主要原理为在待测物中加入电子受体,存活的细菌在新陈代谢过程中进行电子转移,使氧化态电子受体被还原并改变颜色<sup>[27]</sup>;活菌直接镜检法是在细菌培养过程中加入DNA合成抑制剂,VBNC状态细菌DNA合成受到抑制而不分裂,但能继续生长,将细菌染色后可观察其形态并对活菌进行计数<sup>[28]</sup>。

近年来,随着分子生物学的发展,反转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)、活菌计数-荧光原位杂交技术(direct viable count-fluorescent in situ hybridization, DVC-FISH)等方法也被广泛用于检测VBNC状态幽门螺杆菌。与传统方法相比,这些方法更为灵敏,但仍然存在一定局限性:RT-PCR法灵敏度高,但其操作步骤复杂;呼吸检测法、流式细胞术等能够直

接区别死菌和活菌,却不能区别细菌类型,需要与其他方法结合使用;叠氮溴化丙锭(propidiummonoazide bromide, PMA)/叠氮溴化乙锭(edthidiummonoazide bromide, EMA)-定量聚合酶链反应(qPCR)、PMA/EMA-环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等耗时短,但其假阳性率较高(表1)。需注意的是,聚合酶链反应(PCR)、qPCR、LAMP等方法可检测幽门螺杆菌中某些特定基因,但因死亡细菌的DNA也在环境中长期存在,仅使用这些方法不能判断细菌是否存活,故可以将这些方法与生物染料技术结合使用,利用PMA、EMB等生物染料能够进入膜受损的细胞并与其DNA发生共价交联反应的特点,在检测前加入生物染料,使样本中死细胞在PCR过程中的特异性扩增受到抑制,达到检测VBNC状态的目的。

表1 活的非可培养状态幽门螺杆菌检测方法比较

Table 1 Comparison of detection methods of *H. pylori* in the viable but non-culturable state

方法	功能/指示剂	主要原理	优缺点	参考文献
呼吸检测法	CTC、INT	检测电子转移	操作简单;需与其他方法联合使用,准确性差	[27]
DVC	萘啶酮酸	检测形态变化	操作简单;灵敏度低	[28]
DVC-FISH	萘啶酮酸、特异性探针	检测形态变化及荧光信号	可检测复杂样本;操作复杂	[29]
流式细胞术	SYTO <sup>®</sup> 9、PI	检测细胞膜完整性、膜电位	可分析活死细胞数量关系;需与其他方法联合使用,价格昂贵	[16, 30]
LIVE/DEAD BacLight 活力测定	SYTO <sup>®</sup> 9、PI	检测细胞膜完整性	操作简单;价格昂贵,具有致癌风险	[28]
PMA/EMA-qPCR	PMA、EMA	检测细胞膜完整性	灵敏度高,可定量分析;可能产生假阳性结果	[31, 32]
PMA/EMA-LAMP	PMA、EMA	检测细胞膜完整性	所需时间短,结果判定简单;应用较少,可能产生假阳性结果	[33]
RT-PCR	特异性引物	检测细胞内mRNA	可定量分析;操作复杂,可能产生假阴性结果	[34]

DVC: 活菌计数; CTC: 5-氨基-2,3-二甲苯氯化四氮唑; INT: 对碘硝基四唑紫; PI: 碘化丙锭; LIVE/DEAD BacLight: 死活细菌荧光检测剂; PMA: 叠氮溴化丙锭; EMA: 叠氮溴化乙锭; LAMP: 环介导等温扩增技术。

#### 4 VBNC状态幽门螺杆菌的检出现状

近年来,幽门螺杆菌在环境样本中的检测受到了广泛关注,目前已有从水源、蔬菜等环境样本中检出幽门螺杆菌的报道。但其中针对VBNC状态幽门螺杆菌的研究较少,仅在天然水源和饮用水中发现(表2)。Aziz等<sup>[35]</sup>的研究指出,被污染的水源或为幽门螺杆菌传播的重要载体,灌溉水中的病原体可能污染蔬菜等食品。这提示水中存在的VBNC状态

幽门螺杆菌对其传播可能具有重要意义。此外,蔬菜、肉类、乳制品中存活的幽门螺杆菌可能进入VBNC状态,并长期存在于受污染的食品中。在人工模拟环境中,幽门螺杆菌可在超高温灭菌奶中进入VBNC状态,最长存活时间可达30 d<sup>[36]</sup>。接种至菠菜叶的幽门螺杆菌在24 h内不可培养,但可在6 d或更长时间内保持活力<sup>[34]</sup>。幽门螺杆菌也能够人工污染的贻贝中以VBNC状态存在,并维持毒力因子转录物的持续表达<sup>[37]</sup>。

表2 环境和食品中幽门螺杆菌检出情况

Table 2 Detection of *H. pylori* in environment and food

报道年份	采样地点	样品	<i>n</i>	检测方法	阳性率/%	参考文献
2006	—	废水、河水、海水、灌溉水	45	培养法、DVC-FISH	0、35.55†	[28]
2012	伊朗	散装动物乳	447	培养法、PCR*	12.50	[40]
2014	伊朗	蔬菜、沙拉	430	培养法、PCR*	13.72	[41]
2014	希腊	河水	48	DVC-FISH	47.90	[29]
2015	西班牙	饮用水	24	培养法、qPCR、PMA-qPCR、 DVC-FISH	0、66.66、16.66†; 25.00†	[42]
2015	伊朗	动物原料乳	210	PCR	13.33	[43]
2017	伊朗	肉制品	150	培养法、巢式PCR*	7.33	[44]
2017	西班牙	自由生活阿米巴 (分离自废水、饮用水)	67	培养法、qPCR、DVC-FISH	14.90、58.20、31.30	[38]
2018	秘鲁	饮用水	241	qPCR	20.30	[45]
2020	西班牙	自由生活阿米巴 (分离自莴苣)	20	培养法、PMA-qPCR、DVC- FISH	0、55.00†、25.00†	[18]

\*该方法对培养法分离得到的幽门螺杆菌典型菌落进行鉴定, 未标出检出率; †VBNC状态幽门螺杆菌检出率。

在自然环境中 VBNC 状态幽门螺杆菌亦可能存在于其他生物媒介的体内。2017年 Moreno-Mesonero 等<sup>[38]</sup>在饮用水及废水中的阿米巴原虫体内检测到 VBNC 状态的幽门螺杆菌, 提示阿米巴原虫可能作为幽门螺杆菌生存的“庇护所”。阿米巴原虫广泛分布于自然环境中, 生存于农产品表面及水源中的阿米巴原虫可能为幽门螺杆菌等病原体的传播提供了条件<sup>[39]</sup>。在 Moreno-Mesonero 等<sup>[18]</sup>的后续研究中, 该团队对蔬菜样本进行了检测, 虽未直接检测出 VBNC 状态幽门螺杆菌, 但在蔬菜中分离的阿米巴原虫体内发现了 VBNC 状态幽门螺杆菌。这些证据表明环境中可能存在 VBNC 状态幽门螺杆菌, 并且寄生于生物媒介体内, 直接或间接造成食物和水源的污染。因此, 环境中 VBNC 状态幽门螺杆菌的检测情况仍然值得关注, 有必要对水源及食品中的 VBNC 状态幽门螺杆菌潜在的传播风险进行评估。

## 5 结 语

幽门螺杆菌是一种流行较广的病原体, 在不利的生存条件下可进入 VBNC 状态, 在该状态下细菌丧失了可培养性, 使用传统的检测方法容易造成漏检。近年来发现天然水源及人工饮用水系统中存在 VBNC 状态幽门螺杆菌, 这提示幽门螺杆菌可能以 VBNC 状态长期存在于环境和食物中, 对公众健康构成了潜在威胁。同时, VBNC 状态幽门螺杆菌可在生物媒介体内生存, 这对其检测带来了更大的挑战,

也表明环境中幽门螺杆菌的数量可能被低估<sup>[18, 38]</sup>。因此, 进一步完善并优化 VBNC 状态幽门螺杆菌的检测方法, 开展食品及环境中 VBNC 状态幽门螺杆菌的检测, 对于深入研究幽门螺杆菌传播机制、控制幽门螺杆菌的传播具有重要意义。目前的研究较多关注于 VBNC 状态幽门螺杆菌的诱导方法, 但针对其形成机制、复苏条件等方面的探索仍然存在一定局限性, VBNC 状态幽门螺杆菌能否复苏关系到公共卫生与人类健康, 未来需要更多的研究加以验证, 这些研究也将为幽门螺杆菌的防控提供更多的理论支持和数据支撑。

**利益冲突声明:** 作者声称无任何利益冲突。

## 参考文献

- [1] Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(2): 420-429.
- [2] Kotilea K, Bontems P, Touati E. Epidemiology, diagnosis and risk factors of *Helicobacter pylori* infection[J]. *Helicobacter Pylori Hum Dis*, 2019, 1149: 17-33.
- [3] Wroblewski LE, Peek RM. *Helicobacter pylori*: a stealth assassin[J]. *Trends Cancer*, 2021, 9: S2405-8033.
- [4] 阚玉敏, 蒋娜, 白凯红, 等. 细菌有活力但不可培养状态及其机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(3): 880-891.  
KAN Yumin, JIANG Na, BAI Kaihong, et al. Research progress on viable but non-culturable state of bacteria[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(3): 880-891.

- [5] Robben C, Fister S, Witte AK, et al. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15132.
- [6] Cellini L, Allocati N, Angelucci D, et al. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable *in vitro* reverts in mice[J]. *Microbiol Immunol*, 1994, 38(11): 843-850.
- [7] Duš I, Dobosz T, Manzin A, et al. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research: new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013, 67: 261-268.
- [8] Willén R, Carlén B, Wang X, et al. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability[J]. *Ups J Med Sci*, 2000, 105(1): 31-40.
- [9] Gladyshev N, Taame M, Kravtsov V. Clinical and laboratory importance of detecting *Helicobacter pylori* coccoid forms for the selection of treatment[J]. *Prz Gastroenterol*, 2020, 15(4): 294-300.
- [10] Rudnicka K, Graczykowski M, Tenderenda M, et al. *Helicobacter pylori* morphological forms and their potential role in the transmission of infection[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2014, 68: 219-229.
- [11] Loke MF, Ng CG, Vilashni Y, et al. Understanding the dimorphic lifestyles of human gastric pathogen *Helicobacter pylori* using the SWATH-based proteomics approach[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26784.
- [12] Narikawa S, Kawai S, Aoshima H, et al. Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997, 4(3): 285-290.
- [13] Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, et al. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form[J]. *New Microbiol*, 2004, 27(4): 353-360.
- [14] Hua J, Ho B. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? [J]. *Microbios*, 1996, 87(351): 103-112.
- [15] Poursina F, Faghri J, Moghim S, et al. Assessment of *cagE* and *babA* mRNA expression during morphological conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid[J]. *Curr Microbiol*, 2013, 66(4): 406-413.
- [16] Poursina F, Faghi J, Mirzaei N, et al. Overexpression of *spoT* gene in coccoid forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates [J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2018, 63(4): 459-465.
- [17] Krzyżek P, Biernat MM, Gościński G. Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2019, 64(3): 273-281.
- [18] Moreno-Mesonero L, Hortelano I, Moreno Y, et al. Evidence of viable *Helicobacter pylori* and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques [J]. *Int J Food Microbiol*, 2020, 318: 108477.
- [19] Adams BL, Bates TC, Oliver JD. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7462-7466.
- [20] Faghri J, Poursina F, Moghim S, et al. Morphological and bactericidal effects of different antibiotics on *Helicobacter pylori*[J/OL]. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7(1): e8704. (2014-01-01)[2021-03-22]. <https://doi.org/10.5812/jjm.8704>.
- [21] Correia M, Michel V, Matos AA, et al. Docosahexaenoic acid inhibits *Helicobacter pylori* growth *in vitro* and mice gastric mucosa colonization[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35072. (2012-04-17) [2021-03-22]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035072>.
- [22] Dong K, Pan HX, Yang D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(1): 149-183.
- [23] Boehnke KF, Eaton KA, Fontaine C, et al. Reduced infectivity of waterborne viable but nonculturable *Helicobacter pylori* strain SS1 in mice[J/OL]. *Helicobacter*, 2017, 22(4): e12391. (2017-04-24)[2021-03-22]. <https://doi.org/10.1111/hel.12391>.
- [24] Eaton KA, Catrenich CE, Makin KM, et al. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets[J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(2): 459-462.
- [25] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(15): 8916-8921.
- [26] Sexton DL, Herlihey FA, Brott AS, et al. Roles of LysM and LytM domains in resuscitation-promoting factor (Rpf) activity and Rpf-mediated peptidoglycan cleavage and dormant spore reactivation[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(27): 9171-9182.
- [27] Guo LZ, Ye CS, Cui L, et al. Population and single cell metabolic activity of UV-induced VBNC bacteria determined by CTC-FCM and D<sub>2</sub>O-labeled Raman spectroscopy[J]. *Environ Int*, 2019, 130: 104883.
- [28] Piqueres P, Moreno Y, Alonso JL, et al. A combination of direct viable count and fluorescent *in situ* hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability[J]. *Res Microbiol*, 2006, 157(4): 345-349.
- [29] Tirodimos I, Bobos M, Kazakos E, et al. Molecular detection of *Helicobacter pylori* in a large Mediterranean river, by direct viable count fluorescent *in situ* hybridization (DVC-FISH)[J]. *J Water Health*, 2014, 12(4): 868-873.
- [30] Mohiuddin SG, Kavousi P, Orman MA. Flow-cytometry analysis reveals persisters resuscitation characteristics[J]. *BMC Microbiol*, 2020, 20(1): 202.
- [31] Orta de Velásquez MT, Yáñez Noguez I, Casasola Rodríguez B, et al. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images[J]. *Environ Technol*, 2017, 38(6): 744-753.
- [32] Hortelano I, Moreno MY, García-Hernández J, et al. Optimization of pre-treatments with Propidium Monoazide and PEMAX™ before real-time quantitative PCR for detection and quantification of viable *Helicobacter pylori* cells[J]. *J Microbiol Methods*, 2021, 185: 106223.
- [33] Chamanrokh P, Shahhosseiny MH, Mazaheri Assadi M, et al. Three tests used to identify non-culturable form of

- Helicobacter pylori* in water samples[J/OL]. Jundishapur J Microbiol, 2015, 8(4): e16811. (2015-04-18) [2021-03-22]. [https://doi.org/10.5812/jjm.8\(4\)2015.16811](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.16811).
- [34] Buck A, Oliver JD. Survival of spinach-associated *Helicobacter pylori* in the viable but nonculturable state[J]. Food Control, 2010, 21(8): 1150-1154.
- [35] Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: a review[J]. J Adv Res, 2015, 6(4): 539-547.
- [36] Elhariri M, Hamza D, Elhelw R, et al. Occurrence of *cagA*<sup>+</sup> *VacA* *sl* *m1* *il* *Helicobacter pylori* in farm animals in Egypt and ability to survive in experimentally contaminated UHT milk[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14260.
- [37] Quaglia NC, Storelli MM, Scardocchia T, et al. *Helicobacter pylori*: Survival in cultivable and non-cultivable form in artificially contaminated *Mytilus galloprovincialis*[J]. Int J Food Microbiol, 2020, 312: 108363.
- [38] Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, et al. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain[J]. Environ Microbiol, 2017, 19(10): 4103-4112.
- [39] Mungroo MR, Siddiqui R, Khan NA. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms [J]. Folia Microbiol, 2021, 18: 1-11.
- [40] Rahimi E, Kheirabadi EK. Detection of *Helicobacter pylori* in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran[J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(5): 453-456.
- [41] Yahaghi E, Khamesipour F, Mashayekhi F, et al. *Helicobacter pylori* in vegetables and salads: genotyping and antimicrobial resistance properties[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 757941.
- [42] Santiago P, Moreno Y, Ferrús MA. Identification of viable *Helicobacter pylori* in drinking water supplies by cultural and molecular techniques[J]. Helicobacter, 2015, 20(4): 252-259.
- [43] Talaei R, Souod N, Momtaz H, et al. Milk of livestock as a possible transmission route of *Helicobacter pylori* infection[J]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2015, 8(suppl 1): S30-S36.
- [44] Gilani A, Razavilar V, Rokni N, et al. *VacA* and *cagA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* strains isolated from meat products in Isfahan Province, Iran[J]. Iran J Vet Res, 2017, 18(2): 97-102.
- [45] Boehnke KF, Brewster RK, Sánchez BN, et al. An assessment of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru[J/OL]. Helicobacter, 2018, 23(2): e12462. (2018-01-08)[2021-03-22]. <https://doi.org/10.1111/hel.12462>.

(本文编辑 田朴, 陈丽文)

本文引用: 李晶晶, 郑田利, 沈丹芸, 陈嘉熠, 裴晓方. 活的非可培养状态幽门螺杆菌的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2021, 46(12): 1423-1429. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.210197

**Cite this article as:** LI Jingjing, ZHENG Tianli, SHEN Danyun, CHEN Jiayi, PEI Xiaofang. Research progress in the *Helicobacter pylori* with viable non-culturable state[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2021, 46(12): 1423-1429. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2021.210197