

## *Specific Markers of Staphylococcus aureus and Escherichia coli VBNC in Patients with Rheumatoid Arthritis*

Zeinabe Zarifmanesh<sup>1,2</sup>,  
Ramezanali Ataee<sup>3,4</sup>,  
Gholam Hossein Alishiri<sup>5</sup>,  
Javad Arasteh<sup>6</sup>

<sup>1</sup> MSc in Microbiology, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Clinical Research Development Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Professor, Department of Rheumatology, Faculty of Medicine, Chemical Injuries Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received August 23, 2021 ; Accepted June 27, 2022)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Recent studies suggest that the viable but nonculturable (VBNC) bacteria could cause inflammatory diseases. The aim of this study was to detect and investigate the expression of *nuc* and *rfbE* genes in blood samples of patients with rheumatoid arthritis (RA).

**Materials and methods:** In this experimental study, 102 blood samples were collected from patients with RA and universal and specific primers were designed. Then, the genome was extracted and PCR reaction was performed to confirm the presence of universal and specific genes. Finally, RT-Real Time PCR reaction was carried out to evaluate the expression of marker genes associated with VBNC bacteria. Data were grouped and analyzed descriptively.

**Results:** PCR showed *nuc* and *rfbE* genes in 54 (52.9%) and 12 samples, respectively, while according to RT-Real Time PCR these genes were expressed in 80% of the blood samples of patients with RA.

**Conclusion:** In current study, the VBNC state of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were present in the blood samples of patients with RA. Accordingly, and due to the pathogenicity of VBNC bacteria, different diagnostic methods and treatments should be considered for RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, VBNC, RT-Real Time PCR, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (211): 90-96 (Persian).

**Corresponding Author:** Ramezan Ali Ataee - Faculty of Medicine, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: ataee@bmsu.ac.ir, ataee216@gmail.com)

## بررسی مارک‌های اختصاصی استافیلوکوک اورئوس و اش‌ریشیا کولی VBNC در خون بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

زینب ظریفمنش<sup>1و2</sup>

رمضانعلی عطایی<sup>3و4</sup>

غلامحسین علی‌شیری<sup>5</sup>

جواد آراسته<sup>6</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** اخیراً مطالعاتی در زمینه وجود باکتری‌های Viable But Non Culturable (VBNC) و نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های التهابی گزارش شده است. این مطالعه، با هدف ردیابی و بیان ژن‌های *nuc* و *rfbE* در خون بیماران آرتریت روماتوئید، انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، 102 نمونه خون از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید جمع‌آوری شد و پرایمرهای عمومی و اختصاصی طراحی گردید. به منظور تأیید حضور ژن‌های عمومی و اختصاصی، واکنش PCR و جهت بررسی بیان ژن‌های معرف (مارکر) باکتری‌های VBNC و واکنش RT-Real Time PCR انجام شد. نتایج، گروه‌بندی و به صورت توصیفی تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** نتایج بررسی دو ژن *nuc* و *rfbE* با CR، نشان داد که در 54 نمونه از 102 نمونه (52/9 درصد)، ژن اختصاصی *nuc* و در 12 مورد ژن اختصاصی *rfbE* یافت شد. در حالی که با استفاده از روش پیشرفته RT-Real Time PCR در 80 درصد موارد، این ژن‌ها در نمونه‌های خون بیماران بیان شدند.

**استنتاج:** نتایج این مطالعه، حضور باکتری‌های اش‌ریشیا کولی و استافیلوکوک اورئوس VBNC در خون بیماران آرتریت روماتوئید را نشان داد. بر این اساس و با توجه به تولید سوپر آنتی ژن‌های مختلف و نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد بیماری آرتریت روماتوئید، وجود باکتری‌های VBNC در خون بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، ضرورت تجدیدنظر در روش‌های تشخیص و درمان این بیماری را گوش زد می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** آرتریت روماتوئید، VBNC، RT-Real Time PCR، استافیلوکوک اورئوس، اش‌ریشیا کولی

### مقدمه

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis) یک بیماری سیستمیک با اتیولوژی نامعلوم است. افراد مبتلا به این بیماری، ممکن است در ابتدا هیچ علامتی از خود نشان ندهند (1). در خصوص علل ایجاد این بیماری

**مؤلف مسئول:** رمضانعلی عطایی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی E-mail: atae@bmsu.ac.ir | atae216@gmail.com

1. کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی، انستیتوی سم‌شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

2. واحد مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

3. استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی، انستیتوی سم‌شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

4. استاد، کمیته توسعه تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

5. استاد، گروه روماتولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، انستیتوی سم‌شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

6. استادیار، گروه بیولوژی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1400/6/1 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/8/18 تاریخ تصویب: 1401/4/6

است. این مطالعه با هدف، ردیابی حضور این ژن‌های معرف فرم VBNC در خون بیماران و بیان آن‌ها با استفاده از روش RT-Real Time PCR، انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که از فروردین 1397 الی اسفند 1399 انجام گرفت، 102 بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید مراجعه کننده به درمانگاه روماتولوژی بیمارستان فوق تخصصی بقیه الاعظم (عج) توسط فوق تخصص روماتولوژی با رعایت معیارهای لازم معرفی شدند (12، 13). از همه بیماران انتخاب شده با رضایت کامل، نمونه خون اخذ گردید. نمونه‌ها به دو بخش، یک بخش برای استخراج DNA و بخش دیگر جهت استخراج RNA تقسیم شدند.

طراحی پرایمر با استفاده از توالی ژن‌های فرانس موجود در NCBI، زوج پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن nuc/استافیلوکوک اورئوس و Forward 5'-ATGGACGTGGCTTAGCGTAT-3' و Reverse 5'-GCGTTGTCTTCGCTCCAAAT-3' ژن rfbE اش‌ریشیا کولی و Forward 5'-GCCAGTTAGAACAAGCTGA-3' و Reverse 5'-CTTTCCTCTGCGGTCCTAGT-3 طراحی و سنتز شدند.

### استخراج DNA و راه اندازی PCR

با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Maxcell مطابق دستورالعمل ژنوم استخراج گردید. سپس جهت ردیابی باکتری‌های اش‌ریشیا کولی و استافیلوکوک VBNC در نمونه خون بیماران، PCR با پروتکل 40 سیکل و به ترتیب 95، 58 و 72 درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون، اتصال و توسعه قطعات راه‌اندازی گردید. محصول PCR با ژل آگارز 2 درصد و 80 میلی‌ولت الکتروفورز استفاده شد و تحت نور UV باندهای ایجاد شده مشاهده و یک نمونه از هر یک از باندها تعیین سکانس گردید.

تئوری‌های متعددی مطرح گردیده است و ارتباط آرتروپاتی‌ها با عوامل عفونی مورد توجه قرار گرفته است زیرا، منجر به فرم حاد آرتریت روماتوئید می‌شود (2، 3). این در حالی است که تعیین اتیولوژی برای موارد مزمن بیماری آرتریت روماتوئید از معضلات بیان شده است، به ویژه زمانی که نتایج کشت باکتریولوژیک نمونه‌های خون و مایع مفصل بیماران منفی گزارش گردد (4). با این حال، نتایج بررسی‌های پیشرفته مولکولی اتیولوژی باکتریایی و نیز حضور سوپراآنتی‌ژن‌های میکروبی را در خون و مایع مفصل بیماران گزارش نموده است (5، 6). این نتایج سوال مهمی را برانگیخته است. چرا با وجود باکتری در نمونه خون و مایع مفصل بیمار در محیط‌های غنی شده رشد نمی‌کند؟ در سال‌های اخیر وجود باکتری‌های پاتوژن زنده ولی غیر قابل کشت (VBNC=Viable but non-culturable) در مواد غذایی گزارش شده است (7). این حالت، وضعیتی است که در آن باکتری‌ها زنده هستند ولی برخلاف سلول‌های زنده که در محیط‌های کشت تکثیر نموده و کلنی تشکیل می‌دهند، توانایی رشد در محیط‌های غنی شده و استاندارد را از دست داده اند، اما هنوز هم دارای متابولیسم بیماری‌زایی هستند. بنابراین، ویژگی غیر قابل کشت بودن، باعث اختلال در تشخیص این باکتری‌ها با روش‌های باکتریولوژی معمول می‌شود؛ که غیر از باکتری‌های بیماری‌زای درون سلولی هستند (8). در هر حال، برای هر یک از باکتری‌های مختلف یک یا چند بیومارکر اختصاصی فرم VBNC معرفی شده است، به عنوان مثال برای تشخیص گونه‌های سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینترتیدیس VBNC، ژن رمز کننده پروتئین PagC مورد استفاده قرار گرفته است (9). به همین ترتیب، ژن‌های nuc و rfbE به‌عنوان معرف‌های حالت VBNC باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اش‌ریشیا کولی گزارش شده است (10، 11). نظر به این که دو باکتری فوق تولیدکننده سوپراآنتی‌ژن‌های کلاسیک بوده و نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های التهابی گزارش شده

رفرانس تأیید گردید. وجود ژن *nuc* در 54 نمونه از 102 نمونه (52/9 درصد)، و وجود ژن *rfbE* را در 12 مورد از 28 نمونه (42/8 درصد) منتخب که با پرایمر عمومی 16S rRNA تکثیر شده بودند نشان داده شد (تصویر شماره 1).

نتایج RT-real time PCR حاکی از بیان این دو ژن در تمامی نمونه خون‌های جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بود که مؤید وجود این دو باکتری به فرم VBNC می‌باشد. به این ترتیب، تکثیر ژن‌های هدف با PCR مستقیم، متفاوت از بررسی بیان این ژن‌ها با روش RT-real time PCR بوده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد، در 100 درصد نمونه‌ها بیان ژن‌های هدف رخ داده است. در حالی که تکثیر آن‌ها با روش PCR معمولی تفاوت نشان داد. هر ساله بر تعداد بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید افزوده می‌شود، به طوری که در حال حاضر بیش از 1 درصد جمعیت جهان به این بیماری مبتلا هستند (14). به این ترتیب ضرورت تحقیق در خصوص تعیین اتیولوژی بیماری هر روز افزایش یافته است. لذا، این مطالعه، طراحی و انجام گردید.

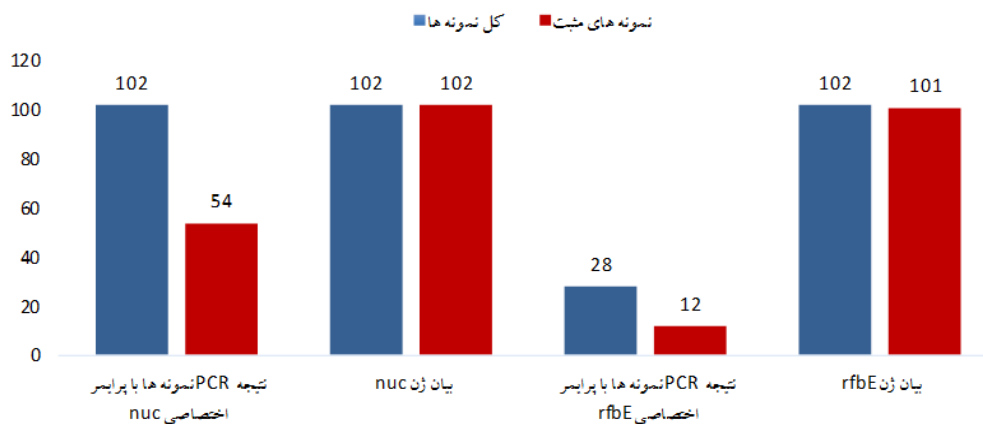
نتایج برخی مطالعات حاکی از آن است که جمعیت میکروبی دستگاه گوارش (microbiome) به عنوان یک عامل مهم محیطی می‌تواند بر تظاهرات بالینی بیماری‌های خود ایمن از جمله آرتریت روماتوئید نقش داشته باشد (15).

### استخراج RNA و انجام Real Time PCR

با استفاده از دستورالعمل کیت Maxcell، RNA استخراج و cDNA سنتز شد. همچنین، جهت بررسی میزان و سطح بیان ژن‌های مورد نظر هر یک از نمونه‌ها و مقایسه با ژن رفرانس Houskiping، از روش مولکولی RT-Real Time PCR استفاده گردید. معیارهای ورود و خروج بیماران در این مطالعه منطبق بر مطالعات پیشین بوده است (12، 13). انجام این مطالعه با رعایت اصول اخلاقی، و تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) به شماره IR.BMSU.REC. 1396.9991 انجام شد.

### یافته‌ها و بحث

در این مطالعه 102 بیمار (29 نفر مرد و 73 نفر زن با میانگین سنی و انحراف معیار  $57/12 \pm 11/15$ ) که بیش از 5 سال به آرتریت روماتوئید مبتلا بوده و مراجعه مکرر داشتند، بررسی شدند. از 102 نمونه خون بیمار استخراج DNA و RNA انجام و بررسی شدند. نتیجه کاربرد روش‌های مولکولی PCR و RT-real time PCR برای ردیابی و بیان ژن‌های *nuc* و *rfbE* که به ترتیب مربوط به استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کولی VBNC هستند، تعیین سکانس و مقایسه با ترادف‌های



تصویر شماره 1: مقایسه آنالیز نهایی یافته‌های حاصل از PCR معمولی و نیز با روش مولکولی پیشرفته RT-real time PCR نشان داده شده است

بلکه در فراورده‌های غذایی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. در نتیجه ضرورت تشخیص سریع و دقیق آنها جزء اولویت‌های مطالعاتی است. لذا، به منظور اعتبار بخشی به نتایج مطالعات گذشته، مطالعه موجود طراحی و انجام شد (23). از یافته‌های مهم این مطالعه، آن است که با روش PCR معمولی تنها درصد کمی از ژن‌های هدف قابل ردیابی بوده، در حالی که با بهره‌گیری از روش RT-Real Time PCR درصد ردیابی ژن‌های معرف VBNC افزایش نشان داد. البته، این بدان معنی نیست که با مصرف آنتی‌بیوتیک می‌توان باکتری‌های VBNC موجود در خون بیماران آرتریت روماتوئید را درمان کرد. زیرا، دست‌یابی به روش‌های مؤثر درمان باکتری‌های VBNC در نمونه‌های بالینی مستلزم انجام مطالعات پیش‌تر می‌باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه‌الله (عج) و همچنین، از رئیس آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌الله (عج) و نیز مسئولین مجموعه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### References

1. Khanna N, Kumar A, Pawar SV. A Review on Rheumatoid Arthritis Interventions and Current Developments. *Current drug targets. Curr Drug Targets* 2021; 22(4): 463-483.
2. Salehi Nodeh AR, Goodarzi K, Ekhtiyari P, Mirshafiee S. Evaluation of VDRL test in Patients Rheumatoid arthritis. *Journal of Payavard Salamat. Payavard* 2008; 2(1): 97-101.
3. Anderson KO, Bradley LA, Young LD, McDaniel LK, Wise CM. Rheumatoid arthritis: review of psychological factors related to etiology, effects, and treatment. *Psychol Bull* 1985; 98(2): 358-387.
4. Ataee RA, Kashefi R, Alishiri GH, Esmaili D. Staphylococcus aureus enterotoxin D: Absence of bacteria but presence of its toxin. *Jundishapur J Microbiol* 2015;8(12): e28395.
5. Ataee RA, Golmohammadi R, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Esmaeili D, et al. Simultaneous detection of mycoplasma pneumoniae, mycoplasma hominis and mycoplasma arthritidis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. *Arch Iran Med* 2015; 18(6): 345-350.
6. Ataee RA, Mohoseni-Moghadam Z, Salimzadeh A, Latifi AM, Ataee MH, Alishiri GH. Enzyme-linked immunosorbent

بر این اساس ضرورت استفاده از تکنولوژی‌های پیشرفته اجتناب‌ناپذیر شده است. از طرف دیگر، شواهد علمی و تأییدکننده در مدل‌های تجربی حیوانی نقش میکروبیوتا را در ایجاد آرتریت نشان داده است (16). از آن‌جا که در موارد مزمن آرتریت روماتوئید کشت خون یا کشت مایع مفصل منفی گزارش می‌گردد. لذا، مطالعات فراوانی وجود سوپر آنتی‌ژن‌های میکروبی را در خون و مایع مفصل بیماران نشان داده شده است (17-20). با این حال، معلوم نیست به چه دلیل، جداسازی باکتری از خون این بیماران با شکست مواجه شده است. همچنین، معلوم نیست به چه دلیل این بیماران علائم باکتری‌می و سپتی سمیک را نشان نمی‌دهند. همچنین، اثر سوپر آنتی‌کلاسیک بر تولید فاکتورهای تشخیص آزمایشگاهی بیماری آرتریت روماتوئید منتشر شده است (21). واژه VBNC یعنی سلول‌های زنده‌ای که توانایی رشد در محیط‌های کشت را از دست داده‌اند در حالی که از نظر متابولیکی فعالیت داشته و فقط قادر به تولید پروتئین‌های مهارکننده رشد باکتری را تولید می‌کنند (22). بنابراین، درک این پدیده، نیازمند تحقیقات پیش‌تری است. همچنین از آن‌جا که تشخیص فرم‌های VBNC نه تنها در بیماری‌های عفونی،

- assay for detection of staphylococcal enterotoxins in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2013; 7(2): 1113-1119.
7. Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmann P, Mester P. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci Rep* 2018; 8(1): 15132.
  8. Bierne H, Milohanic E, Kortebe M. To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of *Listeria monocytogenes*. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:136.
  9. Xu J, Suita K, Okuno K, Takaya A, Yamamoto T, Isogai E. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state. *J Vet Med Sci* 2018; 80(1): 133-137.
  10. Liu Y, Kumblathan T, Uppal GK, Zhou A, Moe B, Hruday SE, et al. A hidden risk: Survival and resuscitation of *Escherichia coli* O157:H7 in the viable but nonculturable state after boiling or microwaving. *Water Res* 2020; 183: 116102.
  11. Liao X, Hu W, Liu D, Ding T. Stress Resistance and Pathogenicity of Nonthermal-Plasma-Induced Viable-but-Nonculturable *Staphylococcus aureus* through Energy Suppression, Oxidative Stress Defense, and Immune-Escape Mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 2021; 87(2): e02380-20.
  12. Alishiri GH, Shirbazoo S, Salimzadeh A, Bayat N, Manafi MR, Ataee RA. An evaluation of toxoplasma antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(147): 386-391 (Persian).
  13. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *Journal of the American Medical Association* 2018; 320(13): 1360-1372.
  14. Bergot A-S, Giri R, Thomas R. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2019; 33(6): 101497.
  15. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7(10): 569-578.
  16. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26(1): 101-107.
  17. Ataee RA, Kashefi R, Alishiri GH, Esmaili D. Assay of blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis for *Staphylococcus aureus* enterotoxin D: absence of bacteria but presence of its toxin. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(12): e28395.
  18. Ataee RA, Kahani MS, Alishiri GH, Ahamadi Z. Staphylococcal Enterotoxin A Detection from Rheumatoid Arthritis Patients' Blood and Synovial Fluid. *Electron Physician* 2016; 8(2): 1850-1856.
  19. Hammad DBM, Liyanapathirana V, Tonge DPJ. Molecular characterisation of the synovial fluid microbiome in rheumatoid arthritis patients and healthy control subjects. *PLoS One* 2019; 14(11): e0225110.
  20. Ataee MR, Alishiri GH, Hesampoor Mahalati A, Ataee RA. Study Effects of *Staphylococcus aureus* Superantigen C on Production of C-Reactive Protein in Rat. *Armaghane Danesh* 2019; 24(4): 612-625.
  21. Mali S, Mitchell M, Havis S, Bodunrin A, Rangel J, Olson G, et al. A proteomic signature of dormancy in the actinobacterium *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol* 2017; 199(14): e00206-e00217.

22. Abd El-Aziz NK, Tartor YH, Gharib AAE-A, Ammar AM. Propidium monoazide quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of some viable but nonculturable foodborne bacteria in meat and meat products. *Foodborne Pathog Dis* 2018; 15(4): 226-234.
23. Hashemi R, Ataei RA, Alishiri GH, Ghorbanalizadegan M, Mahabadi M, Najafi A. Molecular Detection of Bacterial Etiology of Rheumatoid Arthritis. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2019; 29(173): 33-39 (Persian).