Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and molecular identification of *Mycoplasma pulmonis* from the respiratory tract of Rattus rattus.

Mohammad Reza Shafaati[1], Neda sadat Khadem[2], Sajjad Yazdansetad[3], Tanaz Momeni[2], Mina zardadi[3]

1. Department Cellular & Molecular biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Hamadan Branch.
2. Department Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch,Semnan, Damghan, Iran.
3. Department Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and research Branch,Tehran, Iran
4. Department Genetic, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran medical Sciences Branch, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2014/09/19
Accepted: 2015/05/03
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(4): 24-31

Corresponding author at:
Mohammad reza Shafaati

Department Cellular & Molecular biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Hamadan Branch.

Tel:
+98 936 2420374

Email:
shafaati@iauh.ac.ir

Abstract

Background and Aim: *Mycoplasma* is the smallest self-replicating bacteria polymorphic are having a diameter of about 200-500 nm, and lees cell wall. Because of their small size and flexibility to easily pass through the filter membrane and contaminate represented. These organisms are unique in nature, the wide range of diseases among animals, especially respiratory & genitalia diseases were among the rodents.The aim this study was to isolate and identify the molecule *M. pulmonis* of Rats.

Materials and Methods: With aim to isolation of *M. pulmoni*, the tracheal samples were collected and cultured on the medium 243 and Microaerophilic was placed. Genomic DNA was isolated from bacteria grown. *16SrRNA* gene amplified with PCR. The PCR products, finally to identify the bacteria was purified, sequenced were a BLAST.

Results: Macroscopic studies on the isolated colonies showed fried egg colonies were established. Based on the *16SrRNA* sequencing studies, this bacterium belonging *Mycoplasma* genus & had 99% similarity to *M. pulmoni*.

Conclusions: Due to the lack of similarity of 100%, a new strain of bacterium, *M. pulmoni* strain IRMT179 name were called. Finally, the gene bank was recorded with acceptation number KP836312. This study is the first time in Iran; *M. pulmoni* was isolated from the respiratory tract an urban rat.

Key Words: Isolation, *Mycoplasma pulmonis*, Rats, *16SrRNA*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Shafaati M R, Khadem N S, Yazdan Setad S, Momeni T, Zardadi M. Isolation and molecular identification of Mycoplasma pulmonis from the respiratory tract of Rattus rattus. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :24-31.

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی مولکولی *مایکوپلاسما پالمونیس* از دستگاه تنفسی موش صحرایی رت

محمدرضا شفاعتی[۱]، ندا سادات خادم[۲]، سجاد یزدان ستاد[۳]، طناز مؤمنی[۲]، مینا زردادی[۳]

۱. گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران.
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، دامغان، ایران.
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۴. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۸
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی
IJMM 1394; 9(4): 24-31

نویسنده مسئول:
محمدرضا شفاعتی

گروه علوم سلولی و مولکولی- دانشکده علوم پایه - دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان

تلفن: ۰۹۳۶۲۴۲۰۳۷۴

پست الکترونیک:
shafaati @iauh.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *مایکوپلاسما*ها کوچک‌ترین باکتری‌های خود تکثیر پلئومورف با قطری در حدود ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر و فاقد دیواره سلولی هستند. به دلیل اندازه کوچک و انعطاف‌پذیری ساختار آن‌ها به‌راحتی از فیلترهای غشایی عبور کرده و سبب آلودگی می‌گردند. این میکروارگانیسم‌های منحصربه‌فرد در طبیعت عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها در میان جانداران به‌خصوص بیماری‌های تنفسی و تناسلی در میان جوندگان است. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی *مایکوپلاسما پالمونیس* از موش‌های نژاد رت است.

مواد و روش ها: به‌منظور جداسازی *مایکوپلاسما پالمونیس*، نمونه‌های نای جمع‌آوری و روی محیط Medium ۲۴۳ کشت داده‌شده و در محیط میکروآئروفیل قرار داده شد. از باکتری‌های رشد کرده DNA کروموزومی جدا کرده و بعد از PCR بر روی ژن ۱۶SrRNA آن، محصول PCR تعیین ترادف بازی گردید و درنهایت جهت شناسایی دقیق باکتری جداشده، ترادف بازی مورد BLAST قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتری‌های جداسازی شده ازنظر ماکروسکوپی، بر روی محیط کشت اختصاصی (Medium ۲۴۳) کلنی‌هایی به فرم زرده تخم‌مرغی ایجاد کرد. نتیجه بررسی تعیین ترادف بازی ژن ۱۶SrRNA نشان داد که باکتری جداشده متعلق به جنس *مایکوپلاسما* است و دارای ۹۹٪ شباهت به گونه *مایکوپلاسما پالمونیس* است.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم شباهت ۱۰۰٪، باکتری جداشده سویه جدید است با نام مایکوپلاسما پالمونیس سویه IRMT۱۷۹ نام‌گذاری گردید و درنهایت در بانک ژن جهانی با شماره دسترسی ۸۳۶۳۱۲KP ثبت گردید. این مطالعه اولین تحقیق در خصوص جداسازی *مایکوپلاسما پالمونیس* از سیستم تنفسی موش‌های نژاد رت شهری در کشور است.

کلمات کلیدی: جداسازی، *مایکوپلاسما*، رت، ۱۶SrRNA

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

مایکوپلاسماها کوچک‌ترین باکتری‌های خود تکثیر پلئومورف با قطری در حدود ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر و فاقد دیواره سلولی هستند. به دلیل اندازه کوچک و انعطاف‌پذیری ساختار آن‌ها به‌راحتی از فیلترهای غشایی عبور کرده و سبب آلودگی می‌گردند. این میکروارگانیسم‌های منحصربه‌فرد در طبیعت عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها در میان جانداران به‌خصوص جوندگان هستند (۲-۱). عفونت‌های *مایکوپلاسمایی* سبب ایجاد عفونت‌های شدید در بین جوندگان به‌خصوص جوندگان آزمایشگاهی می‌شود (۳). استانداردهای بهداشتی و ژنتیکی برای حیوانات مدل از اهمیت بالایی برای درک چگونگی و مکانیسم، بیماری‌های بین انسان و حیوان برخوردار است. بااین‌حال این حیوانات می‌توانند توسط *مایکوپلاسما* یا دیگر میکروارگانیسم‌ها آلوده شوند (۵-۴). گونه‌های مایکوپلاسما جداشده از جوندگان همچون موش صحرایی عبارت از: *مایکوپلاسما پالمونیس* (۶)، *مایکوپلاسما آرتریتیدیس* (۷)، *مایکوپلاسما موریس* (۸)، *مایکوپلاسما کولیس* (۹)، *مایکوپلاسما نورلیتیکوم* (۱۰) است.

مایکوپلاسما پالمونیس عامل *مایکوپلاسموزیس* تنفسی

www.SID.ir

و تناسلی در موش‌ها است. شیوع این بیماری در بین حیوانات آزمایشگاهی بین ۶۰-۲۰٪ و در بین حیوانات و موش‌های ساکن در محیط‌زیست تا ۱۰۰٪ است (۱۳-۱۱). *مایکوپلاسما پالمونیس* در دستگاه تنفسی موش مستقر است؛ علاوه بر این باکتری در نای، حلق و گوش میانی نیز کلونیزه می‌شود؛ که نتیجه آن ایجاد پنومونی و بیماری‌های تناسلی است که همراه با کاهش نرخ تولیدمثل است (۱۳, ۴،۱۱). این کاهش نرخ تولیدمثل در بین جوندگان بین ۱۰۰-۵۰٪ در جمعیت است (۱۲-۱۱). انتقال *مایکوپلاسما* در دوران جنینی از دو راه بالقوه ممکن وجود دارد: ۱- انتقال از طریق مایع آمینوتیک و یا حمله به جفت ۲- انتقال ناشی از عفونت داخل رحمی یا در زمان لانه گزینی (۴, ۱۴-۱۳).

بر طبق گزارش‌های Davidson و Goto تشخیص *مایکوپلاسموزیس* مشکل نیست بااین‌حال ایجاد تمایز بین عوامل پاتوژن و کومنسال دشوار است (۱۷-۱۵). جداسازی *مایکوپلاسما* در نمونه‌های بالینی با در نظر گرفتن محل نمونه‌گیری، مجموعه روش‌های انتقالی، مهارکننده‌های رشد و نیازهای تغذیه‌ای متفاوت است (۱۸). برای تشخیص *مایکوپلاسما* آزمون‌های سرولوژیک متعددی وجود دارد بااین‌حال به دلیل تداخل در آزمون‌ها مانع تشخیص صحیح می‌شود (۴, ۲۰-۱۹). همچنین ثابت‌شده در حیوانات آلوده نیز آنتی‌بادی می‌تواند تا هفته‌ها پس از عفونت بالا، باقی بماند و سبب ایجاد جواب مثبت کاذب شود (۲۱, ۱۹, ۵). در حال حاضر با پیشرفت‌علم مولکولی و مهندسی ژنتیک، بررسی‌های فیلوژنتیکی بر پایه توالی ۱۶*SrRNA* ابزاری دقیق و سریع در شناسایی *مایکوپلاسما* را به ما می‌دهد (۲۲, ۱۶-۱۵). امروزه مطالعات گسترده ژنتیکی و فیزولوژیکی بر روی *مایکوپلاسما* به‌عنوان یک باکتری مدل موردتوجه است. ازاین‌رو ژنوم باکتری *مایکوپلاسما پالمونیس* به‌طور کامل توالی یابی شده است (۲۳). در دنیا امروز استفاده ازاین‌گونه باکتریایی در مطالعه مکانیسم عفونت‌های مایکوپلاسمایی در انسان و همچنین در فرآیندهای مختلف زیست‌فنّاوری مانند تولید سامانه‌های تحویل دارو، تولید پپتیدهای ضد باکتریایی و مبارزه بیولوژیک با حیوانات موزی استفاده می‌گردد (۱۳-۱۱). با توجه به پتانسیل کاربردی مایکوپلاسما می‌توان از *مایکوپلاسما پالمونیس* در مبارزه بیولوژیک علیه موش‌های صحرایی رت ساکن سیستم‌های شهری استفاده کرد، این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی مولکولی این *مایکوپلاسما پالمونیس* از موش‌های نژاد رت انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه تجربی (آزمایشگاهی) از ناحیه گلو ۴ موش نژاد رت صحرایی که نژاد آن‌ها به‌واسطه کلیدهای جانورشناسی تأیید شد، با خارج کردن نای از گلو، نمونه‌گیری به عمل آمد (۱۸, ۲۵-۲۴). نمونه‌گیری با خارج کردن نای از گلو با عمل تشریح موش در شرایط استریل انجام و نمونه‌های خارج‌شده در محیط انتقالی فاقد گلوکز تا زمان کشت قرار داده شد.

محیط کشت و شرایط رشد

پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا آن‌ها را از فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرون عبور داده سپس با استفاده از تیپ‌های استریل، هم‌زمان به محیط‌های کشت بهینه‌شده های‌فلیک (Heyflick) (۲۶) (عصاره قلب (Difco) ۵/۲۸g، عصاره مخمر با نسبت وزن به حجم ۲۵٪ (Italia ,LIOFILCHEM) ۱۰۰ml، سرم اسب ۲۰۰ml، تالیوم استات ۱٪، پنی‌سیلین G (۲۰،۰۰۰ml/units) ۲/۵ml رساندن به حجم یک لیتر)، محیط بهینه‌شده چاکوست (Chalquest) (۲۵) (PPLO) آگار (Difco) ۶/۳۲g، نشاسته محلول ۵g، رساندن به حجم یک لیتر) و محیط توصیه‌شده توسط کلکسیون میکروبی آمریکا (ATCC ۲۴۳ medium) (عصاره قلب ۵/۱۷g، سرم اسب ۲۰۰ml، عصاره مخمر ۱۰۰ml، معرف فنل رد ۱٪، پنی‌سیلین G (۲۰،۰۰۰ml/units) ۵/۲ml رساندن به حجم یک لیتر) به همراه کنترل منفی (محیط انتقالی فاقد نمونه، سایر شرایط یکسان) تلقیح و در ۳۵ درجه سلسیوس در محیط مرطوب و میکروآئروفیل در جار شمع دار به مدت یک هفته انکوبه شد.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌های خالص

کلنی‌های خالص ازنظر خواص ماکروسکوپی (شکل ظاهری کلنی) نظر رنگ، اندازه، شکل، مشخصات کناره کلنی، برجستگی، ویژگی نوری، بوی کلنی و قوام کلنی و همچنین ازنظر خواص میکروسکوپی طبق روش‌های متداول آزمایشگاه میکروبیولوژی بررسی شدند.

بررسی باکتری‌های جداشده

با توجه به اینکه هدف انجام این تحقیق جداسازی باکتری *مایکوپلاسما پالمونیس* است، لذا جهت بررسی خصوصیت و انتخاب باکتری‌های مثبت، آزمودن‌های بیوشیمیایی مربوط بر اساس راهنمای باکتری‌شناسی Bergey's (۲۷) با انتخاب، یک کلنی خالص از باکتری‌های جداشده انجام شد. از تست گلوکز و آرژینین به‌عنوان تست شاخص جهت تمایز بین گونه‌های مختلف این باکتری استفاده گردید (۲۷).

جداسازی DNA ژنومی و شرایط PCR

جداسازی DNA ژنومی باکتری طبق روش Kuo & Chen (۲۸) با تغییراتی به این شرح انجام گرفت. ۵۰۰ml از نمونه رشد کرده در محیط مایع با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۱ (حاوی سوکروز، تریس، EDTA و RNAase) مخلوط شدند. به مخلوط سلولی ۶۰۰ میکرولیتر محلول شماره ۲ (NaOH ۱٪ و SDS ۱٪) اضافه کرده و به‌آرامی هم زده سپس نمونه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه

www.SID.ir

در آب جوش قراردادیم تا سلول‌ها کاملاً لیز گردند. سپس محلول سلول‌های لیز شده یک‌بار با دو حجم فنل و یک‌بار با دو حجم کلروفرم عصاره گیری گردید. جهت رسوب دادن DNA به محلول حاصل از عصاره گیری دو حجم اتانل ۹۹٪ اضافه کرده و به‌آرامی هم زده تا رسوب DNA تشکیل گردد. رسوب با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه جداشده و با اتانل ۷۰٪ شستشو گردید و بعد از خشک شدن آن، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. نمونه‌های DNA ی استخراج‌شده با روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و نیز کمیت DNA ژنومی جداشده با بررسی میزان جذب در طول‌موج ۲۶۰ و ۲۸۰ به‌وسیله دستگاه نانودراپ (Germany ,Implen) بررسی گردید.

جفت آغازگر مورداستفاده و شرایط انجام PCR

از یک جفت آغازگر که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط تکاپو زیست ایران سنتز شد، که قطعه‌ای ۱۴۸۰ جفت بازی از ژن ۱۶SrRNA را شناسایی و تکثیر می‌نماید، استفاده شد که توالی آن‌ها به این صورت است:

EC16-F: 5' g-TTT-gAT-CCT-ggC-TCA-<g>-3'

EC16-R: 5' TAC-CTT-gTT-ACg-ACT-TCA-3'

هر ۲۵µl واکنش PCR انجام‌شده در این مطالعه حاوی انواع dNTP (Co Ferments) با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی مول، آغازگرها هرکدام با غلظت ۲/۰ میکرو مول، MgCl۲ با غلظت ۲ میلی مول و آنزیم (*Taq* DNA Polymerase Ferments Co.) با غلظت ۱ واحد است. برای هر واکنش PCR، ۱ µg از DNA استخراج‌شده به‌عنوان الگو استفاده شد. این واکنش به همراه کنترل منفی با شرایط دمایی واسرشته شدن ابتدایی در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشته شدن در دمای ۹۵°C به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ °C و گسترش در دمای ۷۲°C هرکدام به مدت یک دقیقه و نهایتاً ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت گسترش نهایی انجام گردید (peclab, UK).

نهایتاً قطعه تکثیر یافته با استفاده از ژل آگاروز ۱٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرارگرفته و نتایج توسط دستگاه BioDoc Analyze (Biometra) ثبت شد.

تعیین سکانس و آنالیز سکانس

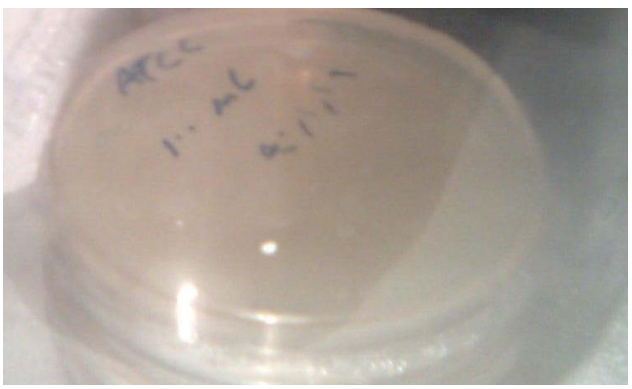
جهت شناسایی کامل باکتری جداشده، محصول PCR خالص‌شده توسط شرکت ژن پویا گستر ایران تعیین سکانس گردید. سکانس به‌دست‌آمده با نرم‌افزار کروماس (ChromasPro۱.۵v. AUS) و سپس بعد از تصحیح‌های موردنیاز، سکانس در بانک ژن جهانی (NCBI) بلاست شده و با توجه به بلاست سکانس موجود با سکانسهای ۱۶SrRNA موجود در بانک ژن جهانی، بیشترین شباهت‌ها بررسی و درنهایت باکتری موردنظر تا حد گونه شناسایی گردید.

یافته‌ها

پس از کشت نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از موش‌های گرفته‌شده در محیط‌های اختصاصی باکتری‌های میکروآئروفیل و قرار دادن در جار شمع دار، رشد مناسب بر روی محیط کشت توصیه‌شده توسط کلکسیون میکروبی آمریکا (ATCC, medium ۲۴۳) مشاهده شد.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی

پس از یک هفته پلیت‌ها جهت تغییر رنگ و رؤیت کلنی موردبررسی قرار گرفت (شکل ۱ الف). پلیت‌های که تغییر رنگ نداده بودند دوباره به مدت یک هفته دیگر انکوبه، و پلیت‌هایی که در کمتر از ۵ روز تغییر رنگ یافتند به علت احتمال آلودگی با غیر *مایکوپلاسما* از مطالعه خارج شدند. نمونه‌های مثبت (تغییر رنگ نمونه‌های مثبت در محیط کشت، با عدم‌تغییر رنگ نمونه کنترل که به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته‌شده بود، مقایسه می‌شد) با بزرگنمایی کم میکروسکوپ جهت مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. در مشاهده میکروسکوپی پلیت‌ها کلنی‌های تیپیک زرده تخم‌مرغی شکل *مایکوپلاسمایی* مشاهده شد (شکل ۱ ب).



تصویر شماره‌ی ۱: مشخصات رشد و کلنی‌های رشد کرده روی محیط ATCC, medium ۲۴۳. الف: پلیت های تغییر رنگ یافته در اثر رشد *مایکوپلاسما*. ب: کلنی‌های *مایکوپلاسما* با بزرگ نمایی x۴۰

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی

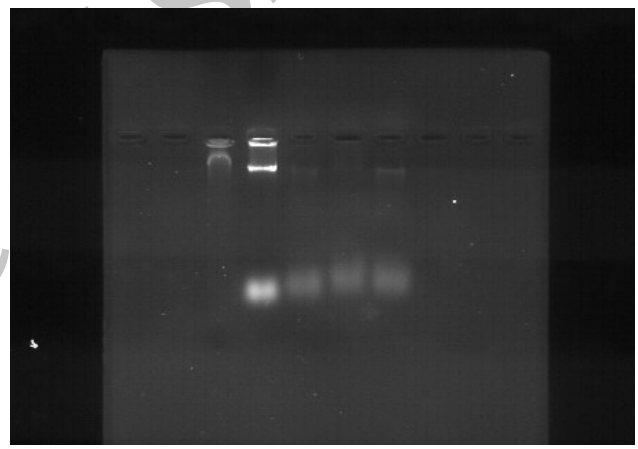
با توجه به اینکه مایکوپلاسما پالمونیس، یک باکتری میکروآئروفیل و فاقد دیواره است؛ یک کلنی خالص‌سازی گردید و بر اساس راهنمای باکتری‌شناسی Bergey's، آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط (جدول ۱) روی آن انجام شد؛ که تأییدکننده باکتری فوق است.

جدول۱: تست‌های بیوشیمیایی انجام شده، برای شناسایی باکتری

گلوکز	مانوز	فسفاتاز	آرژینین	کازئین	همادسورپشن
+	+	–	–	–	+

بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی جداشده

نتیجه الکتروفورز DNA ژنومی جداشده در شکل ۲ آمده است و همین‌طور که در شکل مشخص است نمونه جداشده دارای باند خالص است.



تصویر شماره‌ی ۲: الکتروفورز DNA ژنومی باکتری

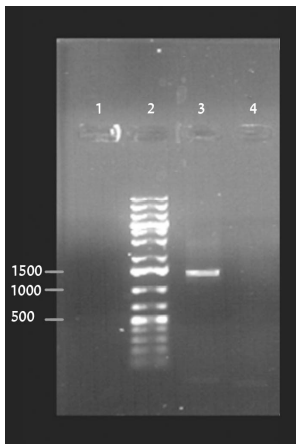
جهت بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی جداشده، جذب رقت یک‌به‌صد نمونه در طول‌موج ۲۶۰ برابر ۰/۱۱۲ و در طول‌موج ۲۸۰ برابر ۰/۰۶۴ است. نسبت این دو جذب برابر ۱/۷۵ است لذا این DNA ازنظر کیفی جهت PCR مناسب است. با توجه به اینکه هر ۱OD جذب در طول‌موج ۲۶۰ برابر با ۵۰ میکروگرم DNA در میلی‌لیتر است (۲۹) غلظت نمونه به شرح زیر محاسبه گردید:

مقدار dsDNA در نمونه: $0.112\times50\mu g/ml\times20_{(\text{فاکتور رقت})} = 112\ \mu g/ml$

غلظت dsDNA در نمونه: $112\ \mu g/ml\times0.1_{(\text{حجم نمونه})} = 11.2\ \mu g$

نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCR

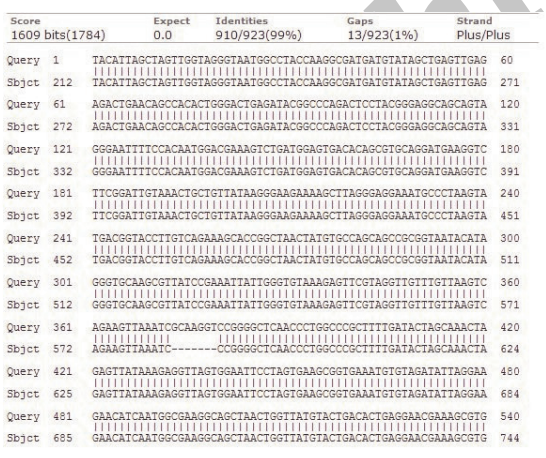
نتیجه الکتروفورز ۵ µl از محصول PCR در کنار سایز مارکر (Fermentase) plus ۱kb بر روی ژل آگاروز ۱٪ مطابق انتظار یک باند اختصاصی حدود ۱۴۸۰ جفت بازی حاصل گردید. (شکل ۳).



تصویر شماره‌ی ۳: الکتروفورز محصول PCR. ردیف ۱: Blank، ردیف ۲: مارکر وزنی (۱kb plus (Fermentas, # SM۱۳۳۱ ، ردیف ۳: قطعه ۱۴۸۰ جفت بازی حاصل از PCR ژن ۱۶SrRNA با پرایمر اختصاصی، لاین ۴: کنترل منفی

نتایج تعیین سکانس محصول PCR

نتیجه آنالیز و بلاست سکانس ۱۶srRNA باکتری دارای کلنی زرده تخم‌مرغی، نشان داد که این باکتری متعلق به جنس مایکوپلاسما بوده و ۹۹٪ شباهت به گونه *pulmonis* دارد (شکل ۴). با توجه به عدم شباهت ۱۰۰٪، باکتری جداشده سویه جدیدی است و *Mycoplasma pulmonis* سویه *IRMT*۱۷۹ نام‌گذاری و با شماره دسترسی KP۸۳۶۳۱۲ در بانک ژن جهانی ثبت گردید.


Score 1609 bits(1784) | Expect 0.0 | Identities 910/923(99%) | Gaps 13/923(1%) | Strand Plus/Plus

```
Query  1    TACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATGTATAGCTGAGTTGAG  60
Sbjct  212  TACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATGTATAGCTGAGTTGAG  271
Query  61   AGACTGAACAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  120
Sbjct  272  AGACTGAACAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  331
Query  121  GGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGTGACACAGCGTGCAGGATGAAGGTC  180
Sbjct  332  GGGAATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGTGACACAGCGTGCAGGATGAAGGTC  391
Query  181  TTCGGATTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAGCTTAGGGAGGAAATGCCCTAAGTA  240
Sbjct  392  TTCGGATTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAGCTTAGGGAGGAAATGCCCTAAGTA  451
Query  241  TGACGGTACCTTGTCAGAAAGCACCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATA  300
Sbjct  452  TGACGGTACCTTGTCAGAAAGCACCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATA  511
Query  301  GGGTGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGGTGTAAAGAGTTCGTAGGTTGTTTGTTAAGTC  360
Sbjct  512  GGGTGCAAGCGTTATCCGAAATTATTGGGTGTAAAGAGTTCGTAGGTTGTTTGTTAAGTC  571
Query  361  AGAAGTTAAATCGCAAGGTCCGGGGCTCAACCCTGGCCCGCTTTTGATACTAGCAAACTA  420
Sbjct  572  AGAAGTTAAATC-------CCGGGGCTCAACCCTGGCCCGCTTTTGATACTAGCAAACTA  624
Query  421  GAGTTATAAAGAGGTTAGTGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGTGTAGATATTAGGAA  480
Sbjct  625  GAGTTATAAAGAGGTTAGTGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGTGTAGATATTAGGAA  684
Query  481  GAACATCAATGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATGTACTGACACTGAGGAACGAAAGCGTG  540
Sbjct  685  GAACATCAATGGCGAAGGCAGCTAACTGGTTATGTACTGACACTGAGGAACGAAAGCGTG  744
```

تصویر شماره‌ی ۴: توالی حاصل از همترازی ژن۱۶SrRNA محصول PCR *مایکوپلاسما پالمونیس* با سایر توالی‌های ژن ۱۶SrRNA موجود از این باکتری در بانک ژن جهانی با استفاده از برنامه BLAST

بحث

عفونت‌های *مایکوپلاسمایی* باعث ایجاد مشکلات تنفسی شدید در بین جوندگان آزمایشگاهی می‌شود. در این میان *مایکوپلاسما پالمونیس* از شایع‌ترین این عوامل است (۱۵)

www.SID.ir

مایکوپلاسما پالمونیس به‌عنوان یک عامل اتیولوژیک اولین بار توسط Sanchez و همکاران (۳۰) به‌واسطه کشت دادن شناسایی شد. این باکتری اغلب با فروانی بالا از تخمدان، رحم و سیستم تنفسی موش وجود دارد (۱۵, ۱). Barreto و همکارانش در سال ۲۰۰۲ باکتری *مایکوپلاسما پالمونیس* را از موش‌های آزمایشگاهی نژاد سوری با علائم بیماری تنفسی جدا کرد (۱۸). مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران، به‌منظور جداسازی *مایکوپلاسما پالمونیس* از سیستم تنفسی موش نژاد رت آزاد موجود در سیستم شهری انجام گرفت. در مطالعات مختلف *مایکوپلاسما* از منابع متعددی که بیشتر نمونه‌های بالینی یا حیوانات ایزوله آزمایشگاهی، جداسازی شده بود (۳۱, ۱۸, ۴). Cassell (۱۹۸۱) و Goto (۲۰۱۲) موفق به جداسازی این باکتری از سیستم تنفسی موش‌های آزمایشگاهی به‌واسطه کشت روی محیط PPLO و محیط بهینه‌شده چاکوست شدند (۳۲, ۱۵). از طرفی در بیشتر بررسی‌های انجام‌شده از محیط‌های اختصاصی مانند محیط کشت بهینه‌شده‌های فیلیک و محیط بهینه‌شده چاکوست استفاده‌شده است (۳۴-۳۳،۱). در مطالعه حاضر از محیط توصیه‌شده توسط کلکسیون میکروبی امریکا استفاده شد. به‌طوری‌که کلنی‌های رشد کرده در روی این محیط به‌صورت کلنی‌های تیپیک زرده تخم‌مرغی گزارش گردید. مزیت استفاده از این محیط کشت عدم وجود مواد دارای سمیت مانند استات تالیوم و آسانی در تهیه و کار با آن است. در بسیاری از مطالعات فاکتور تعیین‌کننده رشد *مایکوپلاسما*، وجود سرم در محیط کشت است (۳۴, ۱۹, ۱۵). که در این مطالعه نیز این موضوع به اثبات رسید. مطالعه حاضر ازنظر منبع جداسازی و روش جداسازی با مطالعات قبلی مغایرت دارد.

در این مطالعه به‌منظور جداسازی DNA باکتریایی با استفاده از یک روش عمومی استفاده گردید. ازآنجایی‌که نمونه DNA ژنومی به دست آماده دارای کیفیت قابل‌قبول است، لذا برای استخراج DNA ژنومی از مایکوپلاسما نیاز به استفاده از روش‌های خاص و یا استفاده از کیت‌های تجاری نیست. در این پژوهش برای شناسایی دقیق باکتری‌های جداسازی شده از روش تعیین توالی ژن۱۶SrRNA استفاده گردید. نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز بلاست توالی۱۶SrRNA نشان داد که دارای شباهت ۹۹٪ به گونه *مایکوپلاسما پالمونیس* است. مشخصات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی نیز تأییدکننده این نتیجه بود.

در مطالعه حاضر یک‌سویه جدید از *مایکوپلاسما پالمونیس* از سیستم تنفسی موش‌های نژاد رت جداسازی و به‌عنوان سویه *IRMT*۱۷۹ با شماره دسترسی KP۸۳۶۳۱۲ در بانک ژن جهانی ثبت گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان گفت از *مایکوپلاسما پالمونیس* جداسازی شده می‌توان به‌عنوان کاندیدی در مبارزه بیولوژیک با موش‌های موجود در سیستم‌های شهری به‌عنوان گزینه مناسب در مراحل بعدی این پژوهش استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله در اینجا لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان و همچنین گروه زیست‌شناسی جانوری این واحد به‌خصوص سرکار خانم آزاده طوسی تکنسین محترم آزمایشگاه بیوسیتماتیک جانوری کمال تشکر و سپاس‌گزاری را نمایند.

Reference

1. Guthrie AL, White CL, Brown MB, deMaar TW. Detection of Mycoplasma agassizii in the Texas Tortoise (Gopherus berlandieri).JWD. 2013;49(3):704-8.

2. Maniloff J, McElhaney R, Finch L, Baseman J. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis: ASM; 1992.

3. Easterbrook JD, Kaplan J, Glass G, Watson J, Klein S. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild-caught Norway rats: a potential threat to laboratory rodent colonies. Lab Anim. 2008;42(1):92-8.

4. Lindsey JR, Cassell GH, Davidson MK. Mycoplasmal and other bacterial diseases of the respiratory system. IAI. 2014;2:21-41.

5. Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in western Europe. Lab Anim. 2009;38(5):161-5.

6. Nelson JB, Lyons MJ. Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of Mycoplasma. JB. 1965;90(6):1750.

7. Hill A, Dagnall G. Experimental polyarthritis in rats produced by Mycoplasma arthritidis. Journal of comparative pathology (JCP). 1975;85(1):45-52.

8. McGarrity G, Rose D, Kwiatkowski V, Dion A, Phillips D, Tully J. Mycoplasma muris, a new species from

Archive of SID

www.SID.ir

laboratory mice. IJSB. 1983;33(2):350-5.

9. HILL AC. Mycoplasma collis, a new species isolated from rats and mice. IJSB. 1983;33(4):847-51.

10. Hottle G, Wright D. Growth and survival of Mycoplasma neurolyticum in liquid media. JB. 1966;91(5):1834-9.

11. Booth JL, Umstead TM, Hu S, Dybvig KF, Cooper TK, Wilson RP, et al. Housing Conditions Modulate the Severity of Mycoplasma pulmonis Infection in Mice Deficient in Class A Scavenger Receptor. Comparative medicine. 2014;64(6):424-39.

12. Cassell G, Clyde W, Davis J. Mycoplasmal respiratory infections. The mycoplasmas. 2013;4:65-106.

13. CassellZ GH, Davis JK, Simeckaz JW, Lindsey JR, Cox NR, Rossz S, et al. Mycoplasmal infections: disease pathogenesis, implications for biomedical research, and control. Viral and Mycoplasmal of Laboratory Rodents: Effects on Biomedical Research. 2012:87.

14. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. Infectious diseases in obstetrics and gynecology (IDOG). 2010;2010.

15. Goto K, Yamamoto M, Asahara M, Tamura T, Matsumura M, Hayashimoto N, et al. Rapid Identification of Mycoplasma pulmonis Isolated from Laboratory Mice and Rats Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. JVMS. 2012.

16. Daubenspeck JM, Bolland JR, Luo W, Simmons WL, Dybvig K. Identification of exopolysaccharidedeficient mutants of Mycoplasma pulmonis. Molecular microbiology. 2009;72(5):1235-45.

17. Davidson MK, Lindsey J, Brown M, Schoeb T, Cassell G. Comparison of methods for detection of Mycoplasma pulmonis in experimentally and naturally infected rats. JCM. 1981;14(6):646-55.

18. Barreto ML, Nascimento ERd, Campos CAdM, Nascimento MdGFd, Lignon GB, Lira MLF, et al. Detection of Mycoplasma pulmonis in laboratory rats. BJM. 2002;33(3):260-4.

19. Danneman PJ, Suckow MA, Brayton C. The laboratory mouse: CRC Press; 2012.

20. Férandon C, Peuchant O, Janis C, Benard A, Renaudin H, Pereyre S, et al. Development of a realtime PCR targeting the yidC gene for the detection of Mycoplasma hominis and comparison with quantitative culture. CMI. 2011;17(2):155-9.

21. Carter GR, Cole Jr JR. Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology: Academic Press; 2012.

22. Hong S, Chung YH. A newly developed consensus polymerase chain reaction to detect Mycoplasma species using 16S ribosomal RNA gene. J. Vet. 2012;35(4):289-94.

23. Chambaud I, Heilig R, Ferris S, Barbe V, Samson D, Galisson F, et al. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen Mycoplasma pulmonis. Nucleic acids research. 2001;29(10):2145-53.

24. Lai W, Bennett M, Johnston S, Barry M, Pakes S. Protection against Mycoplasma pulmonis infection by genetic vaccination. DNA and cell biology. 1995;14(7):643-51.

25. Lai W, Pakes S, Stefanu C, Lu Y. Comparison of Chalquest and Hayflick media, with and without ammonium reineckate, for isolating Mycoplasma pulmonis from rats. JCM. 1986;23(5):817-21.

26. Kirchhoff H, Rosengarten R. Isolation of a motile mycoplasma from fish. JGM. 1984;130(9):2439-45.

27. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Springer Science & Business Media; 2005.

28. Chen W-p, Kuo T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic acids research. 1993;21(9):2260.

29. Labaere P, Hoffmann-Rohrer W. Nucleic Acid Isolation and Purification Manual: Roche Molecular Biochemicals; 1998.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Sanchez S, Tyler K, Rozengurt N, Lida J. Comparison of a PCR-based diagnostic assay for Mycoplasma pulmonis with traditional detection techniques. Lab Anim. 1994;28(3):249-56.

31. Lewis CC, Yang JYH, Huang X, Banerjee SK, Blackburn MR, Baluk P, et al. Disease-specific gene expression profiling in multiple models of lung disease. AJRCCM. 2008;177(4):376-87.

32. Cassell G, Lindsey J, Davis J. Respiratory and genital mycoplasmosis of laboratory rodents: implications for biomedical research. IMAJ. 1981;17(7):548-54.

33. Chvala S, Benetka V, Möstl K, Zeugswetter F, Spergser J, Weissenböck H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and Mycoplasma cynos infection in a dog with pneumonia. VET. 2007;44(4):508-12.

34. Tully J. The Mycoplasmas V2: Human and Animal Mycoplasmas: Elsevier; 2012.

Archive of SID

www.SID.ir