



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

Mohammad Reza Shafaati¹, Neda sadat Khadem², Sajjad Yazdansetad³, Tanaz Momeni², Mina zardadi³

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 lack 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 of this study was to isolate and identify the molecule *M. pulmonis* of Rats.

Materials and Methods: With aim to isolation of *M. pulmonis*, 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. pulmonis*.

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



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

محمد رضا شفاعتی^۱، ندا سادات خادم^۲، سجاد یزدان ستاد^۳، طناز مؤمنی^۴، 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.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: 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 به راحتی 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 روش‌ها: به منظور جداسازی مایکوپلاسما پالمونیس، نمونه‌های نای جمع‌آوری و روی محیط Medium ۲۴۳ کشت داده شده و در محیط میکروآتروفیل 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 در نهایت جهت شناسایی دقیق باکتری جدا شده، ترادف بازی مورد BLAST قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتری‌های جداسازی شده از نظر 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 جدا شده متعلق به جنس مایکوپلاسما است و دارای ۹۹٪ شباهت به گونه مایکوپلاسما پالمونیس است.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم شباهت ۱۰٪، باکتری جدا شده سوپه جدید است با نام مایکوپلاسما پالمونیس سوپه IRMT179 نام‌گذاری گردید و در نهایت در بانک ژن جهانی با شماره دسترسی KP128363 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 میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

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:

محمد رضا شفاعتی

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

تلفن: ۰۹۳۶۲۴۲۰۳۷۴

پست الکترونیک:

shafaati@iauh.ac.ir

مقدمه

استانداردهای بهداشتی و ژنتیکی برای حیوانات مدل از اهمیت بالایی برای درک چگونگی و مکانیسم، بیماری‌های بین انسان و حیوان برخوردار است. با این حال این حیوانات می‌توانند توسط مایکوپلاسما یا دیگر میکروارگانیسم‌ها آلوده شوند (۴-۵). گونه‌های مایکوپلاسما جدا شده از جوندگان همچون موش صحرایی عبارت از: مایکوپلاسما پالمونیس (۶)، مایکوپلاسما آرتریتیدیس (۷)، مایکوپلاسما موریس (۸)، مایکوپلاسما کولیس (۹)، مایکوپلاسما نورلیتییکوم (۱۰) است.

مایکوپلاسما پالمونیس عامل مایکوپلاسموزیس تنفسی

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 به راحتی 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).

موش در شرایط استریل انجام و نمونه‌های خارج شده 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 از نظر خواص ماکروسکوپی (شکل ظاهری کلنی) نظر رنگ، اندازه، شکل، مشخصات کناره کلنی، برجستگی، ویژگی نوری، بوی کلنی و قوام کلنی و همچنین از نظر خواص میکروسکوپی طبق روش‌های متداول آزمایشگاه میکروبیولوژی بررسی شدند.

بررسی باکتری‌های جداشده

با توجه به اینکه هدف انجام این تحقیق جداسازی باکتری مایکوپلازما 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 آرژنین 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 (۱٪ NaOH و ۱٪ SDS) اضافه کرده و به آرامی هم زده سپس نمونه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه

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). مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 لانه‌گزینی (۴، ۱۴-۱۳).

بر طبق گزارش‌های Davidson و Goto تشخیص مایکوپلازما سوزیس مشکل نیست با این حال ایجاد تمایز بین عوامل پاتوژن و کومنسال دشوار است (۱۷-۱۵). جداسازی مایکوپلازما در نمونه‌های بالینی با در نظر گرفتن محل نمونه‌گیری، مجموعه روش‌های انتقالی، مهارکننده‌های رشد و نیازهای تغذیه‌ای متفاوت است (۱۸). برای تشخیص مایکوپلازما آزمون‌های سرولوژیک متعددی وجود دارد با این حال به دلیل تداخل در آزمون‌ها مانع تشخیص صحیح می‌شود (۴، ۲۰-۱۹). همچنین ثابت شده 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 پیشرفت علم مولکولی و مهندسی ژنتیک، بررسی‌های فیلوژنتیکی بر پایه توالی *16S rRNA* ابزاری دقیق و سریع در شناسایی مایکوپلازما را به ما می‌دهد (۲۲، ۱۶-۱۵). امروزه مطالعات گسترده ژنتیکی و فیزیولوژیکی بر روی مایکوپلازما به‌عنوان یک باکتری مدل مورد توجه است. از این رو ژنوم باکتری مایکوپلازما پالمونیس به‌طور کامل توالی‌یابی شده است (۲۳). در دنیا امروز استفاده از این گونه باکتریایی در مطالعه مکانیسم عفونت‌های مایکوپلازمایی در انسان و همچنین در فرآیندهای مختلف زیست‌فناوری مانند تولید سامانه‌های تحویل دارو، تولید پپتیدهای ضد باکتریایی و مبارزه بیولوژیک با حیوانات موزی استفاده می‌گردد (۱۳-۱۱). با توجه به پتانسیل کاربردی مایکوپلازما می‌توان از مایکوپلازما پالمونیس در مبارزه بیولوژیک علیه موش‌های صحرایی رت ساکن سیستم‌های شهری استفاده کرد، این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی مولکولی این مایکوپلازما 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، ۲۴-۲۵). نمونه‌گیری با خارج کردن نای از گلو با عمل تشریح

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

تعیین سکانس و آنالیز سکانس

جهت شناسایی کامل باکتری جدا شده، محصول PCR خالص شده توسط شرکت ژن پویا گستر ایران تعیین سکانس گردید. سکانس به دست آمده با نرم افزار کروماس (ChromasPro 1.5v) و سپس بعد از تصحیح های مورد نیاز، سکانس در بانک ژن جهانی (NCBI) بلاست شده و با توجه به بلاست سکانس موجود با سکانسهای ۱۶SrRNA موجود در بانک ژن جهانی، بیشترین شباهت ها بررسی و در نهایت باکتری مورد نظر تا حد گونه شناسایی گردید.

یافته ها

پس از کشت نمونه های جمع آوری شده از موش های گرفته شده در محیط های اختصاصی باکتری های میکروآئرو فیل و قرار دادن در جار شمع دار، رشد مناسب بر روی محیط کشت توصیه شده توسط کلکسیون میکروبی آمریکا (ATCC, medium ۲۴۳) مشاهده شد.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی

پس از یک هفته پلیت ها جهت تغییر رنگ و رؤیت کلنی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ الف). پلیت های که تغییر رنگ نداده بودند دوباره به مدت یک هفته دیگر انکوبه، و پلیت هایی که در کمتر از ۵ روز تغییر رنگ یافتند به علت احتمال آلودگی با غیر مایکوپلازما از مطالعه خارج شدند. نمونه های مثبت (تغییر رنگ نمونه های مثبت در محیط کشت، با عدم تغییر رنگ نمونه کنترل که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده بود، مقایسه می شد) با بزرگنمایی کم میکروسکوپ جهت مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. در مشاهده میکروسکوپی پلیت ها کلنی های تیپیک زرده تخم مرغی شکل مایکوپلاسمایی مشاهده شد (شکل ۱ ب).

در آب جوش قرار دادیم تا سلول ها کاملاً لیز گردند. سپس محلول سلول های لیز شده یک بار با دو حجم فنل و یک بار با دو حجم کلروفرم عصاره گیری گردید. جهت رسوب دادن DNA به محلول حاصل از عصاره گیری دو حجم اتانل ۹۹٪ اضافه کرده و به آرامی هم زده تا رسوب DNA تشکیل گردد. رسوب با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جدا شده و با اتانل ۷۰٪ شستشو گردید و بعد از خشک شدن آن، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. نمونه های DNA ی استخراج شده با روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ و نیز کمیت DNA ژنومی جدا شده با بررسی میزان جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ به وسیله دستگاه نانودراپ (Germany, Implen) بررسی گردید.

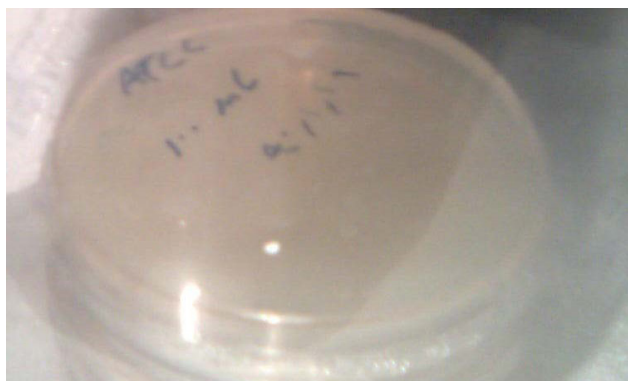
جفت آغازگر مورد استفاده و شرایط انجام PCR

از یک جفت آغازگر که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط تکاپو زیست ایران سنتز شد، که قطعه ای ۱۴۸۰ جفت بازی از ژن ۱۶SrRNA را شناسایی و تکثیر می نماید، استفاده شد که توالی آن ها 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'

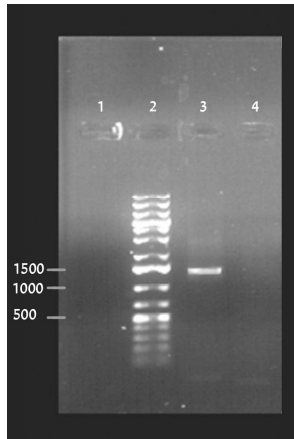
هر ۲۵ μl واکنش PCR انجام شده در این مطالعه حاوی انواع dNTP (Co Ferments) با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی مول، آغازگرها هر کدام با غلظت ۲/۰ میکرو مول، MgCl₂ با غلظت ۲ میلی مول و آنزیم (Taq DNA Polymerase Ferments Co) با غلظت ۱ واحد است. برای هر واکنش PCR، ۱ μg DNA استخراج شده به عنوان الگو استفاده شد. این واکنش به همراه کنترل منفی با شرایط دمایی و اسرشته 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 هر کدام به مدت یک دقیقه و نهایتاً ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت گسترش نهایی انجام گردید (UK, peclab).



تصویر شماره ۱: مشخصات رشد و کلنی های رشد کرده روی محیط ۲۴۳ ATCC. الف: پلیت های تغییر رنگ یافته در اثر رشد مایکوپلازما. ب: کلنی های مایکوپلازما با بزرگ نمایی ۴۰x

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی

مارکر plus 1kb (Fermentase) بر روی ژل آگاروز ۱٪ مطابق انتظار یک باند اختصاصی حدود ۱۴۸۰ جفت بازی حاصل گردید. (شکل ۳).



تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول PCR. ردیف ۱: Blank. ردیف ۲: مارکر وزنی (1kb plus (Fermentase, # SM1331)، ردیف ۳: قطعه ۱۴۸۰ جفت بازی حاصل از PCR ژن 16SrRNA با پرایمر اختصاصی، ردیف ۴: کنترل منفی

نتایج تعیین سکانس محصول PCR

نتیجه آنالیز و بلاست سکانس 16srRNA 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 جدا شده سویه جدیدی است و *Mycoplasma pulmonis* سویه IRMT179 نام‌گذاری و با شماره دسترسی KP836312 در بانک ژن جهانی ثبت گردید.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1609 bits(1784)	0.0	910/923(99%)	13/923(1%)	Plus/Plus
Query 1	TACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCCTACCAAGGCGATGATGATATAGCTGAGTTGAG	60		
Sbjct 212	TACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCCTACCAAGGCGATGATGATATAGCTGAGTTGAG	271		
Query 61	AGACTGAACAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGGTA	120		
Sbjct 272	AGACTGAACAGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGGTA	331		
Query 121	GGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGTGACACAGCGTGCAGGATGAAGTC	180		
Sbjct 332	GGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGTGACACAGCGTGCAGGATGAAGTC	391		
Query 181	TTCCGATTTAACTCTGTTATAAGGGAAGAAAAGCTTAGGGAGGAAATGCCCTAAGTA	240		
Sbjct 392	TTCCGATTTAACTCTGTTATAAGGGAAGAAAAGCTTAGGGAGGAAATGCCCTAAGTA	451		
Query 241	TGACGGTACCTTGTGAGAAAGCACCGGCTAATGATGTCAGCAGCGCGGTAATACATA	300		
Sbjct 452	TGACGGTACCTTGTGAGAAAGCACCGGCTAATGATGTCAGCAGCGCGGTAATACATA	511		
Query 301	GGGTGCAGCGCTATCCGAAATTAATGGGTGTAAGAGTTCGTAGTGTGTTGTTAAGTC	360		
Sbjct 512	GGGTGCAGCGCTATCCGAAATTAATGGGTGTAAGAGTTCGTAGTGTGTTGTTAAGTC	571		
Query 361	AGAGTTAAATCGAAGTCCGGGGCTCAACCTGGCCGCTTTTGATAGCAAACTA	420		
Sbjct 572	AGAGTTAAATCGAAGTCCGGGGCTCAACCTGGCCGCTTTTGATAGCAAACTA	624		
Query 421	GAGTTATAAAGAGGTAGTGGAAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGTTAGATATTAGGAA	480		
Sbjct 625	GAGTTATAAAGAGGTAGTGGAAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGTTAGATATTAGGAA	684		
Query 481	GAACATCAATGGCGAAGGCAGCTAAGTGTATGACTGACACTGAGGACGAAAGCGCTG	540		
Sbjct 685	GAACATCAATGGCGAAGGCAGCTAAGTGTATGACTGACACTGAGGACGAAAGCGCTG	744		

تصویر شماره ۴: توالی حاصل از همترازی ژن 16SrRNA محصول PCR مایکوپلاسما پالمونیس با سایر توالی‌های ژن 16SrRNA 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)

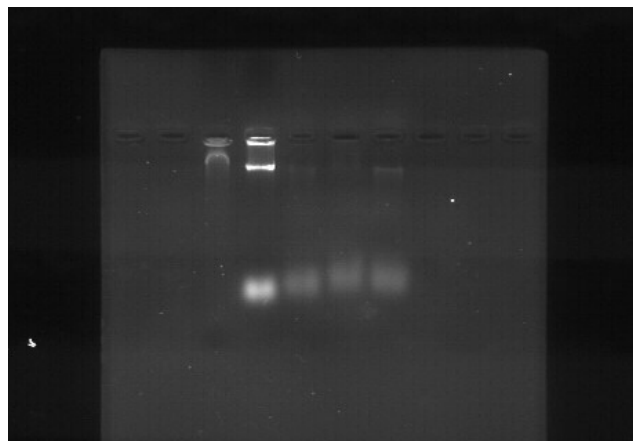
با توجه به اینکه مایکوپلاسما پالمونیس، یک باکتری میکروآئروفیل و فاقد دیواره است؛ یک کلنی خالص‌سازی گردید و بر اساس راهنمای باکتری‌شناسی Bergey's. آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط (جدول ۱) روی آن انجام شد؛ که تأییدکننده باکتری فوق است.

جدول ۱: تست‌های بیوشیمیایی انجام شده، برای شناسایی باکتری

گلوکز	مانوز	فسفاتاز	آرژنین	کازئین	همادسورپشن
+	+	-	-	-	+

بررسی کمی و کیفی DNA کروموزومی جدا شده

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



تصویر شماره ۲: الکتروفورز DNA ژنومی باکتری

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

$$\text{مقدار dsDNA در نمونه: } 0.112 \times 50 \mu\text{g/ml} \times 20 = 112 \mu\text{g/ml} \text{ (فاکتور رقت)}$$

$$\text{غلظت dsDNA در نمونه: } 112 \mu\text{g/ml} \times 0.1 = 11.2 \mu\text{g} \text{ (حجم نمونه)}$$

نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCR

نتیجه الکتروفورز ۵ μl از محصول PCR در کنار سایز

از این پژوهش می‌توان گفت از مایکوپلازما 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 بیوسیتوماتیک جانوری کمال تشکر و سپاس‌گزاری را نمایند.

Reference

- Guthrie AL, White CL, Brown MB, deMaar TW. Detection of *Mycoplasma agassizii* in the Texas Tortoise (*Gopherus berlandieri*). JWD. 2013;49(3):704-8.
- Maniloff J, McElhaney R, Finch L, Baseman J. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*: ASM; 1992.
- 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.
- Lindsey JR, Cassell GH, Davidson MK. Mycoplasma and other bacterial diseases of the respiratory system. IAI. 2014;2:21-41.
- 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.
- Nelson JB, Lyons MJ. Phase-contrast and electron microscopy of murine strains of *Mycoplasma*. JB. 1965;90(6):1750.
- Hill A, Dagnall G. Experimental polyarthritides in rats produced by *Mycoplasma arthritidis*. Journal of comparative pathology (JCP). 1975;85(1):45-52.
- McGarrity G, Rose D, Kwiatkowski V, Dion A, Phillips D, Tully J. *Mycoplasma muris*, a new species from

مایکوپلازما پالمونیس به‌عنوان یک عامل اتیولوژیک اولین بار توسط Sanchez و همکاران (۳۰) به‌واسطه کشت دادن شناسایی شد. این باکتری اغلب با فراوانی بالا از تخمدان، رحم و سیستم تنفسی موش وجود دارد (۱۵، ۱). Barreto و همکارانش در سال ۲۰۰۲ باکتری مایکوپلازما پالمونیس را از موش‌های آزمایشگاهی نژاد سوری با علائم بیماری تنفسی جدا کرد (۱۸). مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران، به‌منظور جداسازی مایکوپلازما پالمونیس از سیستم تنفسی موش نژاد رت آزاد موجود در سیستم شهری انجام گرفت. در مطالعات مختلف مایکوپلازما 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 PLO و محیط بهینه‌شده چاکوست شدند (۳۲، ۱۵). از طرفی در بیشتر بررسی‌های انجام‌شده از محیط‌های اختصاصی مانند محیط کشت بهینه‌شده‌های فیلپیک و محیط بهینه‌شده چاکوست استفاده‌شده است (۳۴، ۱-۳۳). در مطالعه حاضر از محیط توصیه‌شده توسط کلکسیون میکروبی آمریکا 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 مایکوپلازما، وجود سرم در محیط کشت است (۳۴، ۱۹، ۱۵). که در این مطالعه نیز این موضوع به اثبات رسید. مطالعه حاضر از نظر 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. از آنجایی‌که نمونه DNA ژنومی به دست آماده دارای کیفیت قابل قبول است، لذا برای استخراج DNA ژنومی از مایکوپلازما 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 ژن ۱۶SrRNA استفاده گردید. نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز بلاست توالی ۱۶SrRNA نشان داد که دارای شباهت ۹۹٪ به گونه مایکوپلازما پالمونیس است. مشخصات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی نیز تأییدکننده این نتیجه بود.

در مطالعه حاضر یک‌سویه جدید از مایکوپلازما پالمونیس از سیستم تنفسی موش‌های نژاد رت جداسازی و به‌عنوان سویه IRMT۱۷۹ با شماره دسترسی KP۸۳۶۳۱۲ در بانک ژن جهانی ثبت گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده

- 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 exopolysaccharide-deficient 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.

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, Spargser 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.