مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۳، ۲۱۷- ۲۱۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,3:213-217, 2014

بررسی پراکندگی و آنالیز فیلوژنتیکی مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه بر اساس ژن 16S rRNA

سید میلاد واحدی[۱] مهشید بلورچیان[۱] شکوفه ابوالقاسم پور[۱] رامین مظاهری نژاد فرد[۲] حسام الدین اکبرین[۳] تقی زهرایی صالحی[۴] سید جاوید آل داود[۱*]

۱) گروه بیماریهای داخلی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۲) آزمایشگاه مرکزی دکتر رستگار، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳) گروه بهداشت مواد غذایی و کنترل کیفی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۴) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ فروردین ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱۳ تیر ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه، انگل‌های خارجی گلبول‌های قرمز و شامل سه گونه *Mycoplasma haemofelis*، *Candidatus mycoplasma haemominutum* و *Candidatus mycoplasma turicensis* می‌باشند. تشخیص عفونت با این میکروارگانیسم‌ها از طریق روش‌های سیتولوژیک روی گستره خونی صورت می‌گیرد اما با توجه به میزان خطا و نتایج مثبت کاذب بالا در این روش‌ها، فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی دقیق‌تر برای تشخیص عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد. **هدف:** بررسی پراکندگی مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه و آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های جداشده در گربه‌های شهر تهران. **روش کار:** تعداد ۶۰ نمونه خون گربه از درمانگاه‌های دامپزشکی شهر تهران بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های خونی رنگ‌آمیزی شده بوسیله میکروسکوپ نوری از لحاظ وجود انگل هموبارتونلا مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌های مثبت جهت استخراج DNA و PCR استفاده شدند. به منظور تأیید سویه‌ها و بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها، نمونه‌های PCR مثبت توالی یابی شدند. **نتایج:** از میان ۶۰ نمونه خونی اخذ شده، ۳۲ نمونه در بررسی‌های میکروسکوپی از نظر مایکوپلاسمای هموتروپیک مثبت تشخیص داده شدند. از ۳۲ نمونه مثبت، تنها دو مورد (۶/۲۵٪) با استفاده از PCR از نظر *M. haemofelis* مثبت بودند و هیچ نمونه مثبت *C. M. hamemominutum* یا *C. M. turicensis* یافت نشد. آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های جداشده نشان می‌دهد که شباهت این دو سویه با سویه‌های جداشده از کشور چین و تایلند بیشتر از سایر سویه‌ها می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** این مطالعه اولین گزارش از بررسی فیلوژنتیکی سویه‌های جداشده در ایران است. بر اساس شباهت بالای توالی‌های سویه‌های جداشده در ایران، چین و تایلند در آنالیز فیلوژنتیکی می‌توان استنباط کرد که احتمالاً باکتری‌های جداشده دارای منشأ مشترک می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: خون، گربه، مایکوپلاسما هموتروپیک گربه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه، انگل‌های خارجی گلبول‌های قرمز و شامل سه گونه *Mycoplasma haemofelis*، *haemominutum* *Candidatus mycoplasma* و *Candidatus mycoplasma turicensis* می‌باشند (۹،۱۵). این باکتری‌ها برخلاف دیگر باکتری‌های حقیقی فاقد دیواره سلولی بوده و ژنوم کوچکی دارند (۸). مایکوپلاسماهای هموتروپیک می‌توانند موجب آنمی همولیتیک، تب، بی‌حالی و زردی در گربه‌سانان شوند (۹). عامل اصلی آنمی همولیتیک در گربه سانان *M. haemofelis* می‌باشد و دو گونه دیگر به صورت اولیه نمی‌توانند موجب این نوع آنمی گردند (۱،۴،۱۴،۱۵). تشخیص عفونت با این باکتری‌های سخت رشد از طریق روش‌های سیتولوژیک برروی گستره‌های خونی صورت می‌گیرد اما با توجه به میزان خطا و نتایج مثبت کاذب بالا در این روش‌ها، فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی دقیق و مناسب برای تشخیص عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها تشخیص داده شده است (۱۱،۱۲). استفاده از روش PCR بر پایه ژن rRNA 16S حساسیت بالایی را در مطالعات تشخیصی هموپلاسماها فراهم می‌کند (۵،۷)، در نتیجه PCR روش انتخابی (استاندارد طلایی) برای تشخیص عفونت‌های مایکوپلاسمایی می‌باشد. امروزه اطلاعات اندکی از پراکندگی مایکوپلاسماهای هموتروپیک و همه‌گیرشناسی آنها در دسترس است. مطالعات نشان می‌دهد که هر سه گونه مایکوپلاسمای هموتروپیک انتشار جهانی دارند و در عفونت‌های منطقه‌ای در سراسر دنیا نقش ایفا می‌کنند (۲،۳،۵،۶،۱۰،۱۳،۱۵،۱۶). همچنین مطالعات فیلوژنتیکی جهانی تشابه توالی بالایی را بین گونه‌های هموپلاسما در سه قاره نشان می‌دهد (۱۱). هدف از این مطالعه بررسی شیوع این پاتوژن در گربه‌های شهر تهران با استفاده از روش‌های معمول آزمایشگاهی از قبیل مشاهده مستقیم و نیز استفاده از روش‌های مولکولی PCR و سکانسینگ و مقایسه فیلوژنتیکی توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌های موجود از مطالعات دیگر می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: تعداد ۶۰ نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۰۰۳۵-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: sja@ut.ac.ir

جمع‌آوری شده از گربه‌های خانگی و ولگرد دارای علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی هموپلاسموز مورد ارزیابی قرار گرفتند. این گربه‌ها بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ به درمانگاه‌های دامپزشکی شهر تهران ارجاع شده بودند. این علایم شامل بی حالی، بی اشتهایی، کم خونی و زردی مخاطات بود. رنگ‌آمیزی گیمسا برروی گستره‌های خونی انجام شد و همچنین آزمایش شمارش سلولی (CBC) برروی تمامی نمونه‌های خونی صورت گرفت. نمونه‌های خونی بوسیله میکروسکوپ نوری از لحاظ هموپلاسموز مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌هایی که مثبت تشخیص داده شدند جهت استخراج DNA و آنالیز PCR به آزمایشگاه رفرانس دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال گردید. همچنین اطلاعات مربوط به هر مورد در پرسشنامه‌ای ثبت گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها و استخراج DNA: استخراج DNA ژنومی نمونه‌های خونی براساس دستورالعمل کیت مورد استفاده (Korea, South Bioneer®) صورت گرفت. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

تکثیر DNA: DNA نمونه‌های مشکوک به هموپلاسموز (روش میکروسکوپی مستقیم) جهت تأیید و تعیین نوع سویه در روش PCR به کار گرفته شدند. جفت پرایمرهای اختصاصی ژن 16S rRNA در گونه‌های *C. M. turicensis* و *M. haemofelis* قطعه ۱۷۰ جفت بازی و در گونه *M. haemominutum* قطعه ۱۹۲ جفت بازی را تولید می‌کرد (Forward Primer: 5′-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3′; Reverse Primer: 5′-ACGCCCAATAAATCCGRATAAT-3′) (۶). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µL به صورت زیر تهیه شد: بافر یک برابر، کلرید منیزیم یک میلی مولار، مخلوط نوکلئوتیدها (dNTPs) به میزان ۰/۰۸mmol، از هر پرایمر به میزان ۰/۴pmol، آنزیم پلی‌مراز به میزان یک واحد در حجم کل و آب مقطر استریل به میزان لازم برای رسیدن به حجم نهایی. ۱۰۰pg تا ۱۰۰ng، DNA به عنوان الگو استفاده شد. روش PCR مورد استفاده به صورت زیر بهینه سازی شد: واسرشت اولیه دو دقیقه در ۹۵°C و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل واسرشت در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، امتزاج پرایمرها در ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه رشته‌ها در ۷۲°C به مدت یک دقیقه. توسعه نهایی در ۷۲°C به مدت هفت دقیقه صورت پذیرفت. سه سویه *C. M. turicensis*، *C. M. haemominutum* و *M. haemofelis* ابتدا به روش Sanger توالی یابی شده و با اطلاعات موجود در پایگاه‌های داده‌های ژنتیکی مقایسه شدند (Accession nos. HE804775, HE804776, HE804777) و سپس به عنوان کنترل مثبت به کار گرفته شدند. در نهایت محصول PCR برروی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و رنگ آمیزی شد.

سکانسینگ: به منظور تفریق سویه‌های *C. M. turicensis* و *M. haemofelis* از یکدیگر و بررسی فیلوژنتیکی سویه‌ها، جدایه‌های مثبت PCR به روش Sanger توالی یابی شدند (Bioscience, England Source). سپس این توالی‌های نوکلئوتیدی بوسیله نرم افزار v. 1.4 Sequencher مرتب شده و با سایر توالی‌های پایگاه داده‌های ژنی GenBank مقایسه گردیدند و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v. 6 رسم شد.

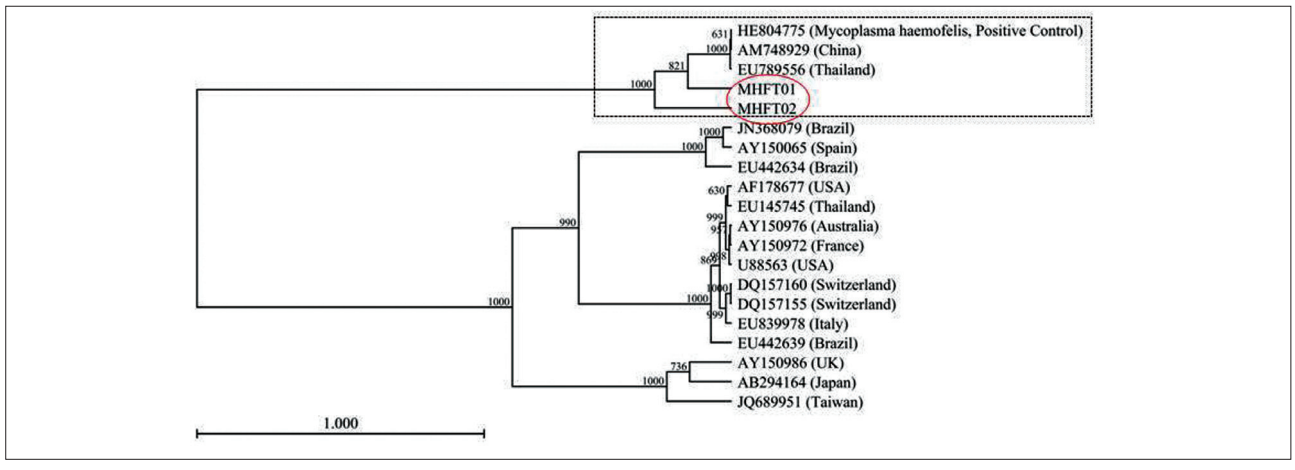
آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 و با استفاده از آزمون‌های مربع کای و آزمون دقیق فیشر انجام شد و p<۰/۰۵ (اطمینان ۹۵٪) در آنالیزها در نظر گرفته شد. متغیرهای در نظر گرفته شده شامل سن، جنس، نژاد، RBC، PCV، Hb، MCV، MCH، MCHC، PLT، نوتروفیل، نوتروفیل باند، ائوزینوفیل، بازوفیل و لنفوسیت بود.

نتایج

نتایج آزمون میکروسکوپی: از میان ۶۰ نمونه خونی اخذ شده، ۳۲ نمونه در بررسی‌های میکروسکوپی از نظر مایکوپلاسماهای هموتروپیک مثبت تشخیص داده شدند. بین جنس و آزمون میکروسکوپی رابطه معنی‌داری یافت شد (p=۰/۱۷) به‌طوری که اکثر نمونه‌های مثبت مربوط به نرها و اکثر نمونه‌های منفی مربوط به ماده‌ها بود. همچنین بین مقادیر کمتر از میزان طبیعی و مقادیر طبیعی (PCV g/dL ۴۵-۲۴٪) و (Hb g/dL ۱۵/۰-۸/۰) رابطه معنی‌داری یافت شد (به ترتیب p=۰/۰۰۷ و p=۰/۰۳۳). بر همین اساس بین مقادیر طبیعی (g/dL ۳۷/۵-۳۱) و بالاتر از حد طبیعی MCHC رابطه معنی‌داری یافت شد (p=۰/۰۰۵). به هر حال، بین سن، نژاد، RBC، MCV، MCH، PLT، نوتروفیل، نوتروفیل باند، ائوزینوفیل، بازوفیل و لنفوسیت با آزمون میکروسکوپی رابطه معنی‌داری یافت نشد (p>۰/۰۵).

نتایج PCR: از ۳۲ نمونه مثبت میکروسکوپی در این مطالعه تنها دو مورد (۶/۲۵٪) از نظر *M. haemofelis* مثبت بودند و هیچ نمونه مثبت *C. M. hamemominutum* یا *C. M. turicensis* یافت نشد. همچنین در آنالیز آماری، بین متغیرهای در نظر گرفته شده و آزمون PCR رابطه معنی‌داری یافت نشد (p>۰/۰۵).

نتایج سکانسینگ: مقایسه توالی ژن 16S rRNA نمونه‌های مثبت در این مطالعه با سایر توالی‌های موجود در GenBank شباهت ۷۸ تا ۱۰۰ درصدی را با سویه‌های *M. hameofelis*، ۹۸ درصدی را با سویه‌های *C. M. turicensis* و تنها ۵۲ درصدی را با سویه‌های *C. M. haemominutum* نشان داد. همچنین E value سویه‌های مورد مقایسه شباهت بالایی را با دو نمونه جدا شده در این مطالعه نشان داد. توالی‌های مورد استفاده و محل استخراج آنها برای مقایسه به شرح زیر می‌باشد: *M. haemofelis*: AB294164 (ژاپن)؛ AF178677 (آمریکا)؛ AM748929 (چین)؛ AY150065 (اسپانیا)؛ AY150972 (فرانسه)؛ AY150976 (استرالیا)؛ AY150986 (بریتانیا)؛ DQ157155 (سوئیس)؛ DQ157160 (سوئیس)؛ EU145745 (تایلند)؛ EU442634 (برزیل)؛ EU442639 (برزیل)؛ EU789556 (تایلند)؛



تصویر ۱. ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف *M. haemofelis* بر اساس بخشی از توالی ژن 16S rRNA. از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer v. 6 و روش UPGMA جهت رسم این درخت استفاده شد. Bootstrap resampling معادل ۱۰۰۰ محاسبه شد.

EU839978 (ایتالیا)؛ HE804775 (انگلستان)؛ JN368079 (برزیل)؛ JQ689951 (تایوان)؛ U88563 (آمریکا)؛ *C. M. turicensis*: HE804777 (انگلستان)؛ DQ157150 (سوئیس)؛ *C. M. haemominutum*: JQ689948 (تایوان)؛ JQ689946 (تایوان)؛ JQ044683 (برزیل)؛ JN368078 (برزیل)؛ HE613254 (انگلستان).

نتایج آنالیز فیلوژنتیکی: آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده در این مطالعه و سایر توالی‌های ژن 16S rRNA سویه‌های *M. haemeofelis* موجود در GenBank نشان می‌دهد که این دو سویه در خوشه‌ای متفاوت از خوشه سویه‌های جدا شده از سایر کشورها قرار دارد. به هر حال، شباهت این دو با سویه‌های جدا شده از کشور چین و تایلند بیشتر از سایر سویه‌ها می‌باشد (تصویر ۱).

بحث

این مطالعه از اولین گزارشات میزان شیوع مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه و اولین گزارش از بررسی فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده در ایران است. تفاوت بسیار زیاد در میزان شیوع به دست آمده از تشخیص میکروسکوپی (۵۳/۳۳٪) و روش PCR (۶/۲۵٪) عدم کفایت روش مشاهده مستقیم را در تشخیص این بیماری به اثبات می‌رساند؛ آن گونه که مطالعات Jensen و همکاران و همچنین Westfall و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داده است. همچنین تعداد بالای نمونه‌های حاوی PCV و Hb کمتر از میزان طبیعی که در آزمون میکروسکوپی مثبت و در آزمون PCR منفی تشخیص داده شده‌اند و یافتن یک رابطه معنی‌دار در این مطالعه بین مقادیر کمتر از میزان طبیعی و مقادیر طبیعی این دو متغیر در آزمون میکروسکوپی این فرضیه را مطرح می‌سازد که پیش داوری فرد آزمایش کننده، وجود آرتیفکت‌های ناشی از خشک کردن، ثابت کردن و رنگ‌آمیزی ناصحیح گستره‌های میکروسکوپی و نیز اشتباه در تمایز هموپلاسماها از اجسام هاول-جولی منجر به تشخیص نادرست بیماری می‌گردد (۱۲).

به طور کلی مقایسه میزان عفونت با *M. haemofelis* گربه در ایران و سایر کشورها نشان می‌دهد که تفاوت‌های زیادی در میزان شیوع این گونه در نقاط مختلف دنیا وجود دارد، به طوری که میزان شیوع *haemofelis M.* در کره جنوبی ۵/۴٪، ژاپن ۱۱/۸۵٪، چین ۱/۱۵٪، بریتانیا ۱/۴٪ و در کانادا ۶۶٪ بررسی شده است (۵،۷،۱۰،۱۶،۱۷). همچنین تعیین توالی بخشی از ژن 16S rRNA، حضور گونه *M. haemofelis* را با توالی مشابه جدایه‌های سایر کشورها تأیید کرد. در این مطالعه، نتایج PCR دو گونه دیگر مایکوپلاسما منفی بود در حالی که در مطالعه Fujihara و همکاران در سال ۲۰۰۷ سویه‌های *C. M. haemominutum* و *C. M. turicensis* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان شیوع را به خود اختصاص داده است. براساس شباهت بالای توالی‌های سویه‌های ایران، چین و تایلند در آنالیز فیلوژنتیکی می‌توان احتمال داد که باکتری‌های جدا شده دارای منشأ مشترکی می‌باشند و این احتمال وجود دارد که پراکنش سویه *M. haemofelis* جدا شده در ایران ناشی از ورود گربه‌های آلوده از این کشورها در زمان‌های گذشته بوده است. به هر حال، اثبات این فرضیه نیاز به نمونه‌گیری بیشتر و تحقیقات گسترده‌تر دارد. همچنین مطالعات وسیع‌تر به منظور بررسی میزان شیوع دو سویه یافت نشده در این مطالعه و آنالیز فیلوژنتیکی آنها لازم به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری صمیمانه آقای مهندس علی یاری سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Berent, L.M., Messick, J.B., Cooper, S.K. (1998) Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections,

using a polymerase chain reaction assay. Am J Vet Res. 59: 1215-1220.

2. Clarck, P., Foster, S.F., Spencer, P.B. (2002) Detection of *Haemobartonella felis* (*Candidatus Mycoplasma haemofelis*) in Australia that is similar to the 'Ohio' strain. Aust Vet J. 80: 703-704.
3. Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C. (2003) Presence of *Mycoplasma haemofelis*, Mycoplasma haemominutum and piraplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. Vet Microbiol. 93: 307-317.
4. Foley, J.E., Harrus, S., Poland, A., Chomel, B., Pederson, N.C. (1998) Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. Am J Vet Res. 59: 1581-1588.
5. Fujihara, M., Watanabe, M., Yamada, T., Harasawa, R. (2007) Occurrence of *Candidatus Mycoplasma turicensis* infection in domestic cats in Japan. J Vet Med. 69: 1061-1063.
6. Jensen, W.A., Lappin, M.R., Kamkar, S., Reagan, W.J. (2001) Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. Am J Vet Res. 62: 604-608.
7. Kewish, K.E., Appleyard, G.D., Myers, S.L., Kidney, B.A., Jackson, M.L. (2004) *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. Can Vet J. 45: 749-752.
8. Messic, B., Santos, A., Guimaraes, A. (2011) Complete genome sequences of two hemotropic mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* strain Illinois. J Bacteriol. 193: 2068-2069.
9. Messic, J.B. (2004) Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet Clin Pathol. 33: 2-13.
10. Tasker, S., Binns, S.H., Day, M.J., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., Helps, C.R., Jensen, W.A., Oliver, C.S., Lappin, M.R. (2003) Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in cats in the United Kingdom. Vet Rec. 152: 193-198.
11. Tasker, S., Helps, C.R., Day, M.J., Harbour, D.A., Shaw, S.E., Harrus, S., Baneth, G., Lobetti, R.G., Malik, R., Beaufils, J.P., Belford, C.R., Gruffydd-Jones, T.J. (2003) Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. J Clin Microbiol. 41: 3877-3880.
12. Tasker, S., Lappin, M.R. (2001) Haemobatonella felis: recent development in diagnosis and treatment. J Fluid Mech. 4: 3-11.
13. Watanabeh, M., Hisasue, M., Souma, T., Ohshiro, S., Yamada, T., Tsuchiya, R. (2008) Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma maemominutum* infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction. J Vet Med Sci. 70: 1095-1099.
14. Westfall, D.S., Jensen, W.A. Reagan, W.J., Radecki, S.V., Lappin, M.R. (2001) Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. Am J Vet Res. 62: 687-691.
15. Willi, B., Boretti, F.S. Cattori, V., Tasker, S., Meli, M.L., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2005) Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. J Clin Microbiol. 43: 2581-2585.
16. Yu, D.H., Kim, H.W., Desai, A.R., Han, I.A., Li, Y.H., Lee, M.J., Kim, I.S., Chae, J.S., Park, J. (2007) Molecular detection of feline haemoplasmas in feral cats in Korea. J Vet Med Sci. 69: 1299-1301.
17. Zhang, Q.J., Zhang, H.J., Lin, R.Q., Yuan, Z.G., Liang, X.J., Qin, X.W. (2010) The occurrence of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in cats in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. J Anim Vet Adv. 9: 635-638.

Molecular characterization and phylogenetic analysis of feline hemotropic mycoplasmas

Vahedi, S.M.[1], Bolourchian, M.[1], Abolghasempour, Sh.[1], Mazaheri Nezhad Fard, R.[2], Akbarein, H.[3], Zahraei Salehi, T.[4], Aldavood, S. J.[1*]

[1]*Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Rastegar Central Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[4]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 11 April 2014, Accepted 4 July 2014)

Abstract:

BACKGROUND: Feline hemotropic mycoplasmas are parasites of erythrocytes and include three species, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus mycoplasma haemominutum* and *Candidatus mycoplasma turicensis*. Diagnosis of the infection with these microorganisms can be carried out using conventional assays such as blood cytology. However, these assays have a low accuracy and a high rate of false-positive results due to the poor techniques and procedures and high occurrence of artifacts. Therefore, molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) are better methods for the diagnosis of infections by these bacteria. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to evaluate Feline hemotropic mycoplasma prevalence and phylogenetic analysis in Tehran. **METHODS:** Sixty cat blood samples were collected from veterinary clinics in Tehran from 2011 to 2012. Giemsa stained blood smears have been examined by the light microscopes and the positive samples were used for DNA extraction and PCR. Positive PCR samples were sequenced for the differentiation of bacterial species and phylogenetic analysis. **RESULTS:** Thirty-two samples were positive in direct examination from which two samples were identified as *M. haemofelis* by the PCR. No positive samples of *C. M. haemominutum* or *C. M. turicensis* were found in PCR. Phylogenetic analysis of the isolates showed that these isolates were more similar to the isolates from China and Thailand compared to those from other countries. **CONCLUSIONS:** This study is the first report of phylogenetic analysis of hemotropic mycoplasmas in Iran. Based on the high sequence similarity between Iran, China and Thailand isolates, it can be concluded that these bacteria possibly had the same origin.

Key words: blood, cat, Feline, hemotropic mycoplasmas, polymerase chain reaction

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Phylogeny of *M. haemofelis* strains based on 16S rRNA gene sequence. CLC Sequence Viewer v. 6 software and UPGMA method were used to draw the phylogenic tree. Bootstrap resampling was calculated 1000

***Corresponding author's email: sja@ut.ac.ir, Tel: 021-66920035, Fax: 021-66933222**