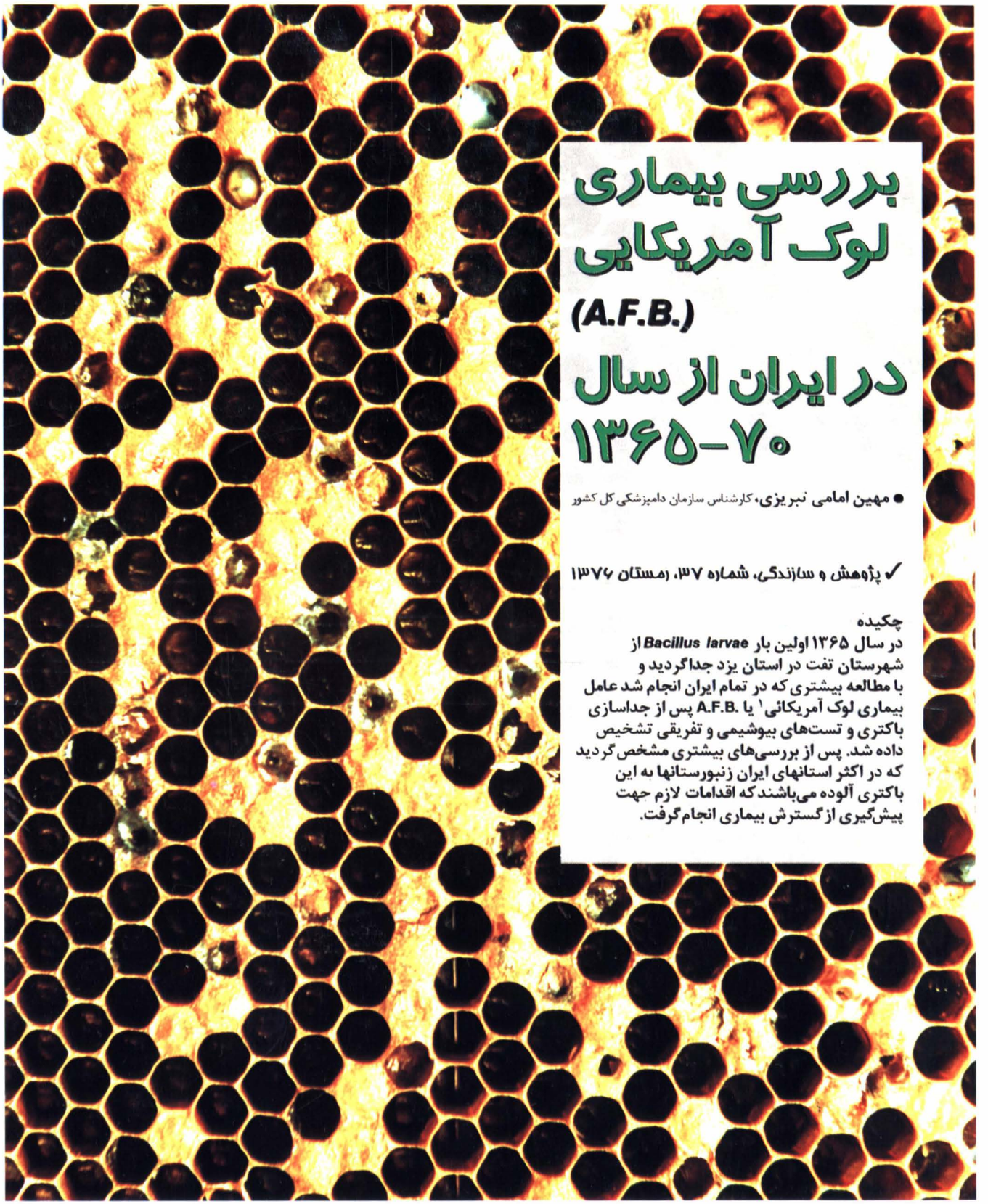


بررسی بیماری لوک آمریکایی (A.F.B.) در ایران از سال ۱۳۶۵-۷۰

● مهین امامی تبریزی، کارشناس سازمان دامپزشکی کل کشور

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۷، زمستان ۱۳۷۶

چکیده

در سال ۱۳۶۵ اولین بار *Bacillus larvae* از شهرستان تفت در استان یزد جداگردید و با مطالعه بیشتری که در تمام ایران انجام شد عامل بیماری لوک آمریکائی[1] یا A.F.B. پس از جداسازی باکتری و تست‌های بیوشیمی و تفریقی تشخیص داده شد. پس از بررسی‌های بیشتری مشخص گردید که در اکثر استانهای ایران زنبورستانها به این باکتری آلوده می‌باشند که اقدامات لازم جهت پیش‌گیری از گسترش بیماری انجام گرفت.

مقدمه

زنبور عسل از زمانهای دور، از دنیای قدیم تا امروز با بشر زیسته و عسل یکی از مواد اولیه غذایی محسوب شده و می‌شود. زنبور عسل از معدود جاندارانی است که در قرآن کریم از آنها نام برده شده و آنقدر ارزشمند بوده که سوره نحل به نام آن نازل گردیده است.

در ایران که پرورش زنبور عسل از گذشته‌های دور به صورت سنتی و پراکنده در نقاط خوش آب و هوا انجام می‌گرفت امروزه به صورت زنبورستانهای وسیع در اقصی نقاط ایران شکل گرفته است. بویژه در سالهای اخیر در صنعت زنبورداری انقلاب اساسی رخ داده و اهمیت عسل نه تنها به عنوان غذا بلکه به عنوان دارو نیز مشخص شده است. از طرف دیگر وجود زنبور از لحاظ گرده افشانی نباتات کشاورزی جایگاه ویژه‌ای را دارا می‌باشد.

وجود بیماریها در زنبور عسل و زنبورستانها به قدمت وجود خود زنبور است. ولی شناخت این بیماریها کمتر از بیماریهای سایر دامها بوده است. با وجود این از هزاران سال پیش اطلاعاتی در مورد بیماریهای زنبور وجود داشته است، ارسطو در نوشتارهای خود شرحی در مورد بعضی از بیماریهای زنبور عسل داده و پس از او Virgil و Pliny نیز در اوایل قرن اول میلادی در کارهای خود به بیماریهای زنبور عسل اشاراتی دارند، گرچه توضیحات آنها برای تشخیص قطعی بیماریها کافی نمی‌باشد. با وجود این از نوشتارهای آنها می‌توان چنین نتیجه گرفت که بعضی از نشانی‌های داده شده شبیه به علامات بیماریهائی است که امروزه Foul Brood نامیده می‌شود (۷).

در سالهای گذشته در ایران مطالعاتی به طور پراکنده در زمینه بیماریهای زنبور عسل انجام گرفته ولی مطالعات جدی و مدون همراه با کارهای آزمایشگاهی وجود نداشته است. در سال ۱۳۶۳ که مایت (هیره) Varroa در زنبورستانهای ایران مسئله‌آفرین شد بیماریهای زنبور عسل مورد توجه بیشتری قرار گرفت و مسئله Varroa هشداری بود برای شناسائی و پیگیری سایر بیماریهای ناشی از باکتریها، قارچها، ویروس‌ها و سایر عوامل انگلی و بدین‌سان از همان موقع مطالعات جدی در مورد تشخیص آزمایشگاهی عوامل بیماری‌زای زنبور در آزمایشگاه مرکز تشخیص و مبارزه با بیماریهای دام و طیور (شبکه دامپزشکی استان تهران) شروع گردید و تاکنون انواع مختلف عوامل بیماری‌زای زنبور عسل از زنبورستانهای ایران جدا شده است که می‌توان به عامل بیماری A.F.B. که از مهمترین و مهلکترین بیماری‌های زنبور عسل است، اشاره نمود. چون خود این بیماری با توجه به علائم بالینی در زنبورستانهای ایران شناخته شده بود و لزوم جداکردن عامل آن بخوبی احساس می‌شد بنابراین مقدمات تشخیص و جداکردن عامل آن فراهم آمد و برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۶۵ عامل آن که باکتریی به نام «White» *Bacillus larvae* می‌باشد از ناحیه تفت استان یزد و سپس از زنبورستانهای مناطق مختلف کشور جداگردید.

لوک آمریکایی

لوک آمریکائی (A.F.B) و لوک اروپائی[۲] (E.F.B.) دو بیماری مهم زنبور عسل می‌باشند که عامل هر دو بیماری باکتری بوده و بیشتر از هر بیماری دیگر در زنبور عسل مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

تا سال ۱۹۰۶ دو بیماری A.F.B. و E.F.B. یکی محسوب شده و هر دو را بنام Foul Brood می‌نامیدند. در این سال Phillips با توجه به مطالعات انجام شده توسط White در مورد باکتریهای کندو و با در نظر گرفتن علائم این دو بیماری نامهای A.F.B. و E.F.B. را برای آنها انتخاب نمود گرچه این نامگذاری ارتباطی با پراکندگی جغرافیایی آنها نداشته است (۱۲). شدت بیماری A.F.B. بیشتر در فصل بهار که فصل فعالیت زنبورهاست می‌باشد ولی به طور عموم بیماری در تمام مواقعی که لارو وجود داشته باشد دیده خواهد شد.

عامل بیماری

عامل بیماری با سیل گرم مثبت هاگ‌داری است به نام «White» *Bacillus larvae* به طول ۵μ-۲/۵ و عرض ۰/۸۲μ-۰/۵، هاگ آن بیضی شکل و اندازه‌اش ۱/۳×۰/۶۲μ است که برای اولین بار در ۱۹۲۰ توسط White به عنوان عامل بیماری A.F.B. تشخیص و تعیین شد. این هاگ نسبت به حرارت، خشکی و مواد ضد عفونی مقاوم است (۲) و سالیان دراز می‌تواند عفونی‌زا باقی بماند، بعضی از سویه‌های آن حرارت ۹۰° درجه سانتی‌گراد را تا ۲۰ دقیقه و ۱۰۰ درجه را تا ۱۱ دقیقه تحمل می‌نمایند. فرم رویشی[۳] باکتری عفونی‌زا نبوده و فقط هاگ آن عفونی‌زا می‌باشد (۲).

انتقال و سرایت بیماری

لاروها از طریق غذای آلوده به هاگ به بیماری مبتلا می‌شوند. هاگ‌ها توسط لارو بلعیده می‌شوند در روده به فرم رویشی در آمده و با سوراخ نمودن جدار روده وارد همولنف شده و شروع به تزاید می‌کنند که لارو را بیمار نموده و سرانجام از بین می‌برند. بنابراین هر عاملی که بتواند غذای مورد مصرف لارو زنبور عسل را آلوده نماید در انتقال بیماری موثر خواهد بود. این عوامل عبارتند از: زنبورهائی که قبلاً حجره‌های آلوده را تمیز کرده‌اند، زنبورداران از طریق بکاربردن وسائل آلوده یا جابجائی قابها و شانهای آلوده از کندوهای آلوده به سالم. استفاده از عسل آلوده جهت تغذیه زنبوران و حتی زنبوران وارداتی نیز می‌توانند نقش مهمی در انتشار بیماری داشته باشند.

هاگ *B. larvae* فقط لاروها را مبتلا ساخته وزنبوران بالغ نسبت به این بیماری مقاوم هستند. لارو زنبوران کارگر، نر و ملکه هر سه به یک اندازه حساس می‌باشند ولی معمولاً کارگرها بیشتر مبتلا می‌گردند (۴). بیماری در صورتی که به موقع تشخیص داده نشود به سرعت در کندوی آلوده منتشر شده سپس سایر کندوهای زنبورستان و در صورت ادامه زنبورستانهای مجاور را نیز مبتلا می‌نماید.

نشانی‌ها و تشخیص ظاهری یا درمانگاهی بیماری

لاروها تقریباً در سن ۲ تا ۳ روزگی بیشتر به این بیماری حساس می‌باشند بنابراین لاروهای جوان‌تر حساسیت کمتری دارند. گرچه سویه NRRI - B3650 (victoria) این باکتری لاروهای جوان را آلوده سازد.

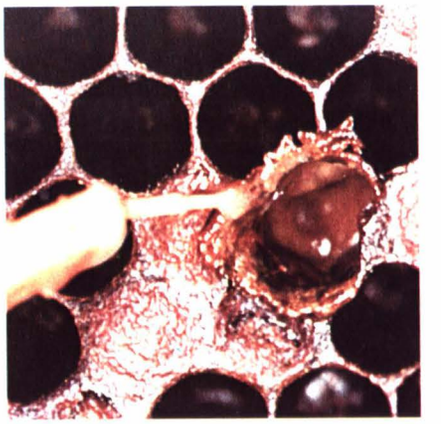
به هر جهت بیماری تا موقعی که درپوش حجرات بسته گردد ادامه خواهد داشت و مرگ لارو در موقعی که درپوش سلولی بسته می‌شود اتفاق می‌افتد. در این حالت پیله آنها تنیده شده و سرآنها به طرف بالا و در حجره می‌باشد (۸) بدین معنی که مرگ و میر لاروها معمولاً در مرحله پیش شفیرگی است ولی در مرحله شفیرگی نیز ممکن است پیش آید.

لارو که در حالت سلامت به رنگ سفید صدفی است در موقع ابتلا به بیماری تغییر رنگ داده کم کم زرد و قهوه‌ای رنگ می‌شود. درپوش حجرات که در حالت طبیعی کمی محدب و به رنگ قهوه‌ای روشن هستند در لاروهای بیمار مرطوب و فرو رفته و تیره رنگ می‌گردند، زنبورهای بالغ با تشخیص چنین حجراتی درپوش آنها را به منظور خارج نمودن لاروهای بیمار و مرده سوراخ می‌نمایند. به این دلیل است که شان آلوده برخلاف شان سالم که در طی مراحل مختلف رشد لارو تقریباً یکدست است خیلی نامنظم بنظر می‌رسد و ظاهر شان چنان می‌نماید که تخمگذاری نا مرتب انجام شده و در این حالت اگر شان را نگاه کنیم حجراتی با درپوش‌های باز، بسته، درپوشهای تغییر رنگ داده و مقعر و درپوشهای سوراخ شده خواهیم دید. لارو مرده شروع به گندیدن نموده تیره رنگ می‌گردد و بوی سریشم‌ماهی از آن استشمام خواهد شد. این بو بعضی اوقات تا موقع خشک شدن لارو ممکن است باقی بماند. در این مرحله اگر چوب کبریتی را به داخل حجره فرو برده کمی پیچانده بیرون بکشیم رشته کشدار تقریباً درازی حداکثر به طول ۲/۵ سانتی متر بدنبال چوب کبریت کشیده خواهد شد که یکی از علائم بسیار مشخص بیماری است. این مرحله Ropping stage نامیده می‌شود. حالت مزبور در لوک اروپائی (E.F.B.) نیز ممکن است دیده شود ولی رشتهاش خیلی کوتاهتر است (۱۲).

بالاخره پس از حدود یک ماه یا بیشتر لارو خشک شده فلس‌مانند گذشته به ته حجره می‌چسبد در صورتی که لارو در حالت شفیره‌ای از بین رفته با شد زبان لارو بطور برجسته از کف حجره نمایان می‌گردد. این حالت نیز یکی از علائم مشخص بیماری لوک آمریمائی (A.F.B.) می‌باشد (۱۲).

تشخیص آزمایشگاهی

جهت تائید تشخیص اولیه‌ای که در زنبورستان داده شده است لازم است نمونه برای بررسی‌های



آزمایشگاهی ارسال گردد. نمونه اگر به صورت شان باشد باید به دقت بررسی گشته و علائم ظاهری آن، وضع حجرات، وجود لارو یا شفیره، رنگ لارو، و طرز استقرار آنها درحجرات،تاریخ نمونه‌برداری ومحل آن ثبت گردد.

یکی از روشهای تشخیص بیماری قرار دادن بقایای لارو خشک شده در مقابل اشعه ماوراء بنفش ۴۰۰۰ ـ ۳۱۰۰ انگستروم است. بقایای خشک شده لارو مقابل اشعه خاصیت فلئورسانس پیدا می‌کنند. ولی در انجام این آزمایش باید خیلی دقت گردد. زیرا بعضی اوقات گرده و عسل نیز در مقابل این اشعه خاصیت فلئورسانس پیدا می‌کنند (۱۵).

Holst milk test

این آزمایش براساس خاصیت آنزیم Proteolytic باکتری *B. larvae* می‌باشد. روشهای مختلفی جهت انجام این آزمایش وجود دارد. اساس آزمایش بر این پایه قرار دارد که مقدار کمی از مواد مظنون با کمی شیر مخلوط می‌شود در صورت آلوده بودن به هاگ *B. larvae* در مدت کمی شیر دلمه می‌شود. این آزمایش در مورد بیماری Sac Brood و گاهی E.F.B. منفی است ولی رویهم رفته آزمایش قابل اطمینانی نیست چون در صورتی که شان‌های حاوی لاروهای بیمار را قبلا با فرم‌الدئید یا پارادی کلروبنز دود داده باشند و گاهی نیز به دلیل نامعلوم منفی می‌گردد (۱۵).

مواد و روشها

نمونه شان‌های آلوده از استانهای مختلف کشور جمع‌اوری و به آزمایشگاه منتقل و مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی‌ها شامل مراحل زیر است.

الف - آزمایشات میکروسکپی

۱ - ساده‌ترین روش، تهیه گسترش از لاروهای مرده له شده یا بقایای آن و رنگ‌آمیزی با روش گرم و یا سایر رنگ‌آمیزی‌های مخصوص هاگ است. این باکتری گرم مثبت بوده و هاگ‌های آن بیضی شکل و شفاف دیده می‌شوند. هاگ *B. alvei* (که در بیماری E.F.B. دخالت دارد) نیز بیضی شکل است ولی بزرگتر و پهلو به پهلوی هم به صورت زنجیر هستند. *B. pulvifaciens* نیز بیضی شکل ولی بزرگتر است. گاهی بقایای پیکره باکتری به صورت برجستگی کوچکی در دو طرف هاگ دیده می‌شود.

۲- رنگ‌آمیز با Nigrosin: کمی از لارو له شده یا بقایای فلسی شکل لارو با چند قطره آب روی لام مخلوط می‌شود بطوری که شیرا به تقریباً کدری درست شود سپس یک قطره نگرو زین (محلول ۱۰٪ آبی Nigrosin به اضافه ۰/۵٪ فرم آلدئید به عنوان Preservative) به آن اضافه پس از مخلوط نمودن گسترش تهیه می‌شود. بعد از خشک شدن با عدسی روغنی گسترش را می‌بینند. شکل رویشی باکتری به رنگ ابی خاکستری در زمینه تیره و هاگ‌های آن به صورت شفاف و بیضی شکل دیده خواهد شد. گاهی نیز هاگ‌های تازه تشکیل شده در انتهای باکتری که در حالت تبدیل شدن به هاگ هستند به شکل گرز دیده می‌شوند (۴).

۳- روش Modified Hanging Drop (۱۵): M.H.D. یکی از روش‌های بسیار مطمئن جهت تشخیص *B. larvae* از سایر عوامل بیمرای‌زای لارو زنبور عسل و مخصوصاً E.F.B. می‌باشد. شیوه آزمایش به این شکل است: گسترش تقریباً کدری از بقایای له شده لارو مرده را روی لامل تهیه کرده آنرا به کمک حرارت خشک و ثابت نموده به مدت ۷-۵ ثانیه با فوشین ذیل، رنگ و شسته می‌شود و در حالیکه هنوز خیس است آنرا روی لامی که قبلاً روی آن کمی روغن سدر[۴] مالیده شده است طوری قرار داده می‌شود که گسترش رنگ شده با روغن در تماس باشد. سپس با عدسی روغنی مشاهده می‌شود. در این وضعیت هاگ‌های *B. larvae* در بین قطرات آب حرکت براونی نشان خواهند داد.

این آزمایش در مورد *B. pulvificiens* و *B. alvei* و *B. apiarius* منفی است.

کشت باکتری

از اوایل قرن بیستم که *B. larvae* توسط White کشف و بررسی گردید تاکنون محیطها و روش‌های مختلفی جهت تشخیص *B. larvae* و *B. apiarius* منفی است.

۱ - عصاره لارو به اضافه زرده تخم مرغ که توسط خود White پیشنهاد شده است.

۲-کشت باکتری روی مخلوط بافت‌های مغز، کبد و قلب Brain-liver heart medium (Gochmauer and L'arive 1969)

۳- محیط کشت Bailey شامل نشاسته، گلوکز و عصاره مخمر، Yeast extract، KH_2PO_4(2)، starch و glucose

۴- محیط کشت J شامل Trypton، K_2HPO_4 و K_2HPO_4 glucose (6).

۵- محیط کشت کلمبیا آگار Columbia Agar, (Plagmain 1985)(13)

۶-ژلز خون و آگار (Blood-Agar)

این محیط در سال ۱۹۸۹ توسط استرالیائی‌ها توصیه شده است (۹) ولی ما از سال ۱۳۶۵ (۱۹۸۶) از آن جهت کشت *B. larvae* با نتیجه خوب استفاده کرده بودیم. بعداً J. Medium نیز بکار برده شد ولی چون Blood agar همیشه تازه در آزمایشگاه در دسترس بود بنابراین برای کشت اولیه از آن استفاده شد ولی برای آزمایشهای تفریقی مبنا محیط‌های مصرفی J. Medium بود (۶).

روش کار

کشت لارو و بقایای فلسی شکل آن

یک لوله درپیچی حاوی چند عدد ساچمه بلوری که یک - دو میلی لیتر آب مقطر در آن ریخته و قبلاً سترون شده است انتخاب نموده و تعدادی از لاروهای مشکوک یا بقایای خشک شده آنها را از ته حجرات نقاط مختلف شان به طور سترون برداشت نموده در لوله ریخته بعداً به کمک دستگاه Shaker یا با تکان دادن بوسیله دست لاروها را سلایه نموده از شیرابه حاصل جهت تهیه گسترش و کشت استفاده می‌شود.

کشت عسل

مقداری عسل در حدود ۵ گرم را با تقریباً ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به خوبی مخلوط نموده به مدت ۴۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژکرده سپس آب روئی را دور ریخته به رسوب حاصل مجدداً ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و پس از مخلوط کردن ۳۰ دقیقه دیگر با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده و از رسوب حاصل جهت کشت استفاده می‌شود (۱۵).

کشت موم

در صورتی که موم آغشته به عسل باشد باید قبلاً آنرا چند بار شستشو داد. در حدود ۵ گرم موم را در ۲۰ میلی لیتر کلروفرم گرم (۵۰ درجه سانتی‌گراد) حل نموده سپس آنرا در یک لوله سانتریفوژ با ۳ میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط کرد. از طبقه آب جهت کشت استفاده می‌شود (۵).

جدول شماره ۱- خواص باکتریایولوژی B. larvae

رنگ گرم	+
حرکت	d
کاتالاز	-
رشد در شرایط بی هوازی	+
آزمایش V.P.	-
رشد در ۲٪ NaCl	+
رشد در محیط pH=5.7	-
گلوکز	+
تولید اسید در محیط آرابینوز	-
تولید اسید در محیط مانیتول	d
تولید اسید در محیط گزیلوز	-
هیدرولیز ژلاتین	+
تجزیه کازئین	+
هیدرولیز ژلاتین	+
تبدیل نیترات به نیتریت	d
سترات	-
محیط اندل	-
Deamination فنیل آلانینی در سه هفته	-

ب - کشت اولیه و آزمایشهای تفریقی

کشت اولیه که در محیط ژلز خون، (J. Medium) یا هر محیط مناسب دیگری که انجام گرفت در گرم خانه ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. پرگنه‌های *B. larvae* پس از ۴۸ ساعت ظاهر می‌شوند. به علت خاصیت ضدباکتریایی *B. larvae* هیچ باکتری دیگری همراه با آن رشد نمی‌کند، بنابراین کشت خالص یکدستی به دست می‌آید. پرگنه‌ها ریزو شفاف و شبنمی هستند.

آزمایش‌های تفریقی طبق جدول شماره یک انجام می‌گیرد. بعضی آزمایش‌ها کلیدی هستند که جهت تائید تشخیص *B. larvae* است و برخی دیگر جهت تعیین بعضی از سویه‌های آن می‌باشد (۶).

نتیجه

در طی شش سال از سال ۱۳۶۵ تا ۱۳۷۰ جمعاً ۳۸۷ نمونه از زنبورستانهای مختلف کشور جهت آزمایش باکتریائی به آزمایشگاه شبکه دامپزشکی استان تهران ارسال شد که نمونه‌ها شامل شانهای حاوی لارو و شفیره، عسل، موم و زنبور بالغ بود. که براساس جدول شماره یک اقدام به تشخیص عامل بیماری A.F.B. شد که پراکندگی آن در جدول شماره ۲ مشخص شده است.

در ضمن باید تذکر داد که سروتایپینگ تمام سویه‌های جدا شده به علت در اختیار نداشتنی آنتی سرمهای اختصاصی انجام نگرفت. فقط در میان سویه‌های جدا شده از دو نقطه (تهران و سمنان) سویه استرالیائی (Victoria) به شماره NRRL-B3650 که متحرک بوده و فاقد خاصیت تبدیل نیترات به نیتریت است جدا و تشخیص داده شده این سویه لاروهای جوان‌تر را مبتلا می‌سازد (۶).

جدول شماره ۲- پراکندگی جغرافیایی *B. larvae* در ایران از سال ۱۳۷۰ - ۱۳۶۵

نام استان	۱۳۶۵ موارد		۱۳۶۶ موارد		۱۳۶۷ موارد		۱۳۶۸ موارد		۱۳۶۹ موارد		۱۳۷۰ موارد	
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
تهران	۱	۵	۲	۲	۴	۴	۲	۵		۱۷	۴	۳
مرکزی											۲	۲
گیلان		۱		۲	۲	۲	۲	۱				۷
مازندران										۴۵		۶
آذربایجان‌شرقی				۳	۲	۲						۱
آذربایجان غربی				۱	۱	۲						
کرمانشاه												
خوزستان												
فارس				۲		۲		۵	۱	۱		
کرمان												
خراسان	۱	۷	۱									
اصفهان	۲		۲									
همدان		۳		۱		۱			۵	۱		
کردستان	۱	۱	۳	۱۸	۲	۲۲	۲	۵	۱	۳	۲	۲
سیستان‌وبلوچستان												
گرگان و گنبد						۱	۱	۱		۳	۱	۳
چهارمحال‌وبختیاری							۵	۱				
هرمزگان												
بوشهر												
یزد	۱	۲	۱	۳	۳	۱	۱	۲				
سمنان	۳	۲	۳	۱	۱	۱	۱۲					۲
زنجان				۱		۱			۲		۳	۵
ایلام		۶		۱		۱			۸	۱		۴
لرستان		۳										
کهکیلویه‌وبویراحمد		۱		۳		۳		۳۳				۱۹

پاورقی‌ها

1- American Foul Brood
2- Eureopean Foul Brood
3- Vegetative
4- Immersion Oil

منابع مورد استفاده

1- Bailey L. and Lee D.C., 1962. *Bacillus larvae*, its cultivation *In vitro* and its growth *In vivo*. J. of ceneral microbiology 29; 711-717.

2- Bailey L., 1981. PP. 26-31. Honey bee pathology, Rothmasted experimental station U.K. Academic Press.

3- Gochnauer, T.A.; L'arive J.C.M., 1969. Experimental infection with *Bacillus larvae*. A strian with a morphological maker. J. Invert. Path 13: 280-289.

4- Gochnauer T.A., Furgala B. and Shimanuki, H., 1979. Diseases and enemies of the honey bee pp., 617-628. From the hive and honey bee, Dadant and Sons. Hamilton, Illinosis.

5- Gochnauer T.A., The distribution of *Bacillus larvae* spores in the invirons ofcolonies infected with American Foul Brood disease, pp. 332-335. American Bee J. May 1981.

6- Gordon R.E.; William H.C. and Hor Nay Pang C., 1973. The cenus bacillus hand book no. 427, United States, department of agriculture.

7- Conzalez A.R., Conzales, V.K. and Hermandes, C.O., Cuba 1982 pp. 223-225. Bee pathology.

8- Hitchocock, J.D. and Wilson W.T., Pathogenicity to honey bee of a strain of *B. larvae* that does not reduce nitrate, pp. 901-902. J. of Economic Entonology, Vol. 66. No. 4.

9- Hornitzky M.A.Z. and Karlovskis, A culture technique for the detection of *B. larvae* in honey bee, J. of Apicultural Research, 28 (2): 118-120.

10- Matheson A., Pests, diseases and other disorders from practical bee keeping in New Zealand.

11- Milne P.S., 1942. Brood diseases of honey bee. Annual of applied biology 30, 191-194.

12- Morse R.A., 1980. pp 44-45. Honey bee pests, predators and diseases, Cornell University Press. Ithaca and London.

13- Plagman, O.A., Simple culture method for the bacteriological identification of *B. larvae* on Columbia blood agar, 1985. 98 (2): 61-62 Berl. Und Münch. Tierärzt. Wsch.

14- Parvanov P. and Kamburov C., 1987. Studying of *E. coli* isolated from ill and dead colonies apimondia, XXX st. Warsaw, Poland.

15- Shimanuki, H. and Cart-well, C.E. 1978. Diagnosis of honey bee diseases, parasites and pests, U.S. Department of Agriculture.