DOI: 10.22092/VJ.2022.357904.1952
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

اپیدمیولوژی مولکولی بیماری لوک آمریکایی در کلنی‌های زنبور عسل هشت استان ایران

• **مجتبی محرمی(نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران.
• **حسین مدیرروستا**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران.
• **مریم ترکمن**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران.
• **حمیدرضا جلالی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران.
• **کامیار احمدی**
سازمان دامپزشکی کشور.
• **محمدحسین فلاح‌مهرآبادی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۲-۰۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱-۰۴-۰۱
Email: mojmoharrami@yahoo.com

چکیده

بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل، جدي‌ترین و کشنده‌ترین بیماري باکتریایي نوزادان زنبور عسل محسوب مي‌شود و عامل آن باکتری گرم مثبت و تولید کننده اسپور *Paenibacillus larvae* می‌باشد. در این راستا، تشخیص دقیق و به موقع این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه حاضر، اپیدمیولوژی مولکولی این بیماری به صورت منطقه‌ای در زنبورستان‌های هشت استان کشور مورد مطالعه قرار گرفت. ۴۸ نمونه زنبور، عسل و خرده‌های کف کندو جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی با روش نستد PCR مورد آزمایش قرار گرفتند و محصول PCR روي ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز شد. از ۴۸ نمونه زنبور بررسی شده ۱۴ مورد مثبت (۲۹/۱۶ ٪)، از ۴۸ نمونه عسل بررسی شده ۱۶ مورد مثبت (۳۳/۳۳ ٪) و از ۴۸ نمونه خرده‌های کف کندوی بررسی شده پنج مورد مثبت (۱۰/۴۱ ٪) شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک و نظارتی عفونت *Paenibacillus larvae* در سطح کلنی‌های زنبور عسل، جمع‌آوری نمونه عسل نسبت به سایر نمونه‌ها، روش معتبرتر و قابل اتکا محسوب می‌شود. امروزه در دنیا از این روش برای پایش مستمر این بیماری استفاده می‌کنند و با توجه به نتایج حاصله، استراتژی مبارزه، کنترل، پیش‌گیری و همچنین درمان را تدوین و اجرا می‌نمایند. نتایج این مطالعه نشان داد که تشخیص بیماری با استفاده از نمونه‌های عسل و در اولویت بعدی زنبورهای بالغ، ارزش پیش آگهی بالاتری در مقایسه با شناسایی باکتری‌های موجود در نمونه‌های موم، گرده و خرده‌های کف کندو دارد.

کلمات کلیدی: لوک آمریکای، *Paenibacillus larvae*، نستد PCR

● Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 113-119

Molecular epidemiology of American foulbrood disease in bee colonies in eight provinces of Iran

By: Moharrami, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension. Modirrousta, H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension. Torkaman, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension. Jalali, H.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension. Ahmadi, K., Iran Veterinary Organization. and Fallah Mehrabadi, M.H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension.

Received:2022-02-21 **Accepted:2022-06-22**

Email: mojmoharrami@yahoo.com

American foulbrood disease is the most serious and deadly bacterial disease of bee infants and is caused by the gram-positive bacterium that produces *Paenibacillus larvae* spores. In this regard, accurate and timely diagnosis of this disease is very important. In the present study, the molecular epidemiology of this disease was studied regionally in eight provinces of the country. Frothy eight samples of bees, honey and debris were collected. After preparation, the samples were tested by nested PCR method and the PCR product was electrophoresed on 1% agarose gel. The results show out of 48 samples of bees examined, number of 14 were positive (29.16%), out of 48 samples of honey were examined, number of 16 were positive (33.33%) and out of 48 samples of debries, number of 5 were positive (10.41%). The results of this study show that for epidemiological and monitoring studies of *Paenibacillus larvae* infection in bee colonies, collecting honey samples is a more reliable method than other samples. Today in the world, this method is used for continuous monitoring of this disease and according to the results, the strategy of control, prevention and treatment are formulated and implemented. Also, diagnosis of the disease using honey samples and in the next priority of adult bees, has a higher prognostic value compared to the identification of bacteria in the samples of wax, pollen and debris.

Key words: American foulbrood, *Paenibacillus larvae*, Nested PCR

مقدمه

بیماری لوک آمریکایی، یک عفونت روده‌ای کشنده لاروهای زنبور عسل بوده و در سراسر جهان در مناطقی که چنین زنبورهایی نگهداری می‌شوند، رخ می‌دهد. ارگانیسم عامل این بیماری، باکتری گرم مثبت و تولیدکننده اسپور *Paenibacillus larvae* می‌باشد که به شکل میله‌ای، مستقیم یا گاهی خمیده، اندازه بسیار متفاوت (عرض ۰/۸-۰/۵ میکرومتر و طول ۶-۱/۵ میکرومتر)، به صورت تکی، زنجیره‌ای و رشته‌ای دیده می‌شود. اکثر سویه‌ها متحرک هستند و در هر لارو آلوده بیش از یک میلیارد اسپور می‌تواند تولید شود. اسپورها در برابر گرما و عوامل شیمیایی بسیار مقاومند و فقط اسپورها قادر به ایجاد عفونت هستند. عفونت توسط زنبورهای پرستار، یا با اسپورهای باقیمانده در قاعده سلول به لارو، منتقل می‌شود. اگرچه زنبورهای کارگر، نر و ملکه همگی در مراحل لاروی، مستعد ابتلا به عفونت هستند اما در شرایط طبیعی، لاروهای ملکه و زنبورهای نر به ندرت آلوده دیده می‌شوند. حساسیت لاروها به بیماری با افزایش سن کاهش می‌یابد بطوریکه نمی‌توان آنها را بعد از ۵۳ ساعت پس از خروج از تخم آلوده کرد. میانگین دوز عفونی (LD_{50}: دوز اسپور که در آن ۵۰ ٪ لاروها کشته می‌شوند) مورد نیاز برای شروع عفونت، بسیار متغیر بوده و بین ۸/۴۹ ± ۱/۴۹ اسپور در لارو با سن ۲۸-۲۴ ساعت می‌باشد (۱۲).

بیماری لوک آمریکایی بسیار مسری بوده و در صورت عدم مدیریت، کلنی‌های آلوده را از بین می‌برد. با توجه به ماهیت عفونی باکتری عامل بیماری که اسپور تولید می‌کند این بیماری می‌تواند به راحتی به کلنی‌های زنبورستان و کلنی‌های همسایه سرایت کند. اسپورهای این باکتری می‌توانند برای چندین دهه روی محصولات و تجهیزات کندو زنده بمانند. همچنین، در اکثر کشورها به عنوان یک بیماری قابل هشدار طبقه‌بندی می‌شود. هر چند در بسیاری از کشورها اقدامات کنترلی شامل، سوزاندن کلنی‌های بیمار و مواد آلوده به اسپور می‌باشد، ولی تاکنون ریشه‌کن کردن این بیماری غیرممکن بوده است. از این رو، این بیماری از صدها سال پیش به عنوان یکی از مشکلات حل نشده زنبورداری باقیمانده است. برای تأیید موارد مشکوک به بیماری یا نظارت بر شیوع *Paenibacillus*

larvae می‌توان از محصولات مختلف کندو مانند عسل، زنبور، موم، گرده و خرده‌های کف کندو برای تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌برداری کرد (۱۲).

نظارت منظم بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا اگر بیماری شناسایی و درمان نشود، منجر به از بین رفتن کندوی عفونی‌شده و به عنوان منبع اصلی عفونت برای کلنی‌های همسایه عمل می‌کند. استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف منجر به مقاومت باکتریایی و باقیمانده دارویی در محصولات زنبور عسل شده است و به صورت قانونی در چندین کشور ممنوع شده است. افزایش تقاضا برای استراتژی‌های جایگزین و طبیعی جهت پیشگیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی، منجر به مطالعات گسترده‌ای در مورد استفاده از روغن‌های ضروری، عصاره‌های گیاهی، بره موم، ژل رویال، مولکول‌های طبیعی غیرمتعارف، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب، باکتری‌ها و باکتریوسین‌ها شده است. با این حال، ماهیت بسیار مقاوم اسپورهای *Paenibacillus larvae* ممکن است اثربخشی این رویکردهای مختلف را کاهش دهد (۱۲).

انتشار طبیعی *Paenibacillus larvae* بین کلنی‌ها از طریق انتقال افقی رخ می‌دهد. به این صورت که زنبورهای عسل حامل اسپور باکتری، بین کلنی‌ها جابجا می‌شوند یا وقتی زنبورهای غارتگر، منابع را از کلنی‌های بیمار ضعیف‌تر می‌دزدند، اسپور را می‌گیرند و آن‌ها را به کلنی خود می‌برند. بنابراین، انتقال این بیماری وابسته به تراکم است و شیوع بیماری بیشتر در مناطقی با زنبورداری‌های دارای تراکم کلنی بالا رخ می‌دهد. شیوه‌های رایج زنبورداری، مانند حمل و نقل و استفاده مجدد از مواد کندو و انتقال زنبورها بین کلنی‌ها، گسترش بیماری را تسریع می‌کنند و در واقع مسیرهای بسیار مهم‌تری نسبت به سرقت از کلنی‌ها توسط زنبورهای غارتگر هستند (۱۳). علاوه بر این، تجارت جهانی زنبورهای عسل و محصولات زنبور عسل جابجایی مواد آلوده را در مسافت طولانی تسهیل می‌کند.

مبارزه با بیماری‌های باکتریایی زنبورهای عسل برای توسعه استراتژی به سمت زنبورداری پایدار و اقتصادی بسیار مهم است. مبارزه موفقیت‌آمیز با بیماری‌های نوزادان با روش‌های پیشرفته تشخیص آزمایشگاهی و مطالعات اپیدمیولوژیک شروع می‌شود. سایر عوامل کلیدی در پاتوژنز *Paenibacillus larvae* شامل درک پاتوبیولوژی عوامل ایجادکننده، فعل و انفعالات میزبان و پاتوژن در طول مدت عفونت و نقش عوامل حدت و متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. فاکتورهای بیماریزای *Paenibacillus larvae* که تا به امروز شناسایی شده‌اند، درک ما را از پاتوژنز آن بسیار بهبود بخشیده‌اند و اکتشافات آینده این تصویر را گسترده‌تر خواهد کرد. درک اپیدمیولوژی بیماری نوزادان اساساً با توانایی تشخیص بین پاتوژن‌های دارای ارتباط ژنتیکی در یک گونه باکتری بهبود یافته است. اکنون، با توسعه روش‌های هماهنگ‌شده تایپینگ بین‌المللی، دانشمندان می‌توانند رابطه بین مناطق شیوع را که در آن بیماری‌های باکتریایی در طول زمان بیشتر مشاهده می‌شوند، تعیین کنند (۱۰).

پیشرفت‌های بیشتر در استفاده از روش‌های توالی‌یابی کل ژنوم با وضوح بالا برای مطالعات اپیدمیولوژیک و ایجاد نظارت مستمر بر بیماری‌های باکتریایی مهم می باشد. بهبود استراتژی‌های کنترل فعلی برای بیماری‌های باکتریایی زنبور عسل با درک گسترش بیماری و توزیع آن در سطح محلی آغاز می‌شود که هر دو به شدت تحت تأثیر شیوه‌های مدیریتی هستند. با این حال، زنبورداری یک صنعت جهانی است که با انتقال زنبورها و محصولات کندو در سراسر جهان همراه است. بنابراین دیدگاه بین‌المللی در مورد بیماری‌های باکتریایی زنبور عسل برای کمک به شناسایی و در نهایت حذف مکانیسم‌های اصلی گسترش این بیماری‌ها و تضمین تجارت ایمن در سراسر جهان، ضروری است.

روش کار

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در اسفند ۱۳۹۹ و فروردین ۱۴۰۰، از زنبوران جوان (پرستار)، عسل و خرده‌های کف کندو، توسط سازمان دامپزشکی از زنبورستان‌های ۸ استان کشور انجام شد. تعداد نمونه از هر استان طبق جداول آماری تعیین گردید و در کل ۴۸ نمونه با استفاده از زنجیره سرد به آزمایشگاه بخش زنبور عسل موسسه رازی منتقل گردید.

آماده سازی نمونه

زنبور بالغ

از هر نمونه ۳۰ زنبور پرستار در ۲۰ میلی‌لیتر PBS استریل به خوبی همگن شد. محلول همگن شده با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. محلول صاف شده سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و رسوب دوباره در PBS حل شده و برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

عسل

۵۰ گرم از نمونه عسل (۵۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد) گرم شد و به نسبت ۱ : ۱ با PBS رقیق گردید. در g ۶۰۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و رسوب دوباره در PBS حل شده و برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

خرده‌های کف کندو

۱/۵ گرم خرده‌های کف کندو یا موم زنبور عسل در ۱۰ میلی‌لیتر حلال آلی (تولوئن، کلروفرم یا دی اتیل اتر) حل شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از قسمت مایع در ۶ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیکی رقیق گردید. از این سوسپانسیون برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

استخراج DNA

سوسپانسیون اسپور به مدت ۲۴ ساعت در MYPGP براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در g ۱۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به حالت تعلیق درآمد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (کیاژن) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (۱۲).

ردیابی ویروس با PCR

ردیابی ویروس به روش نستد PCR و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از ناحیه ژن ۱۶S انجام شد (۹).

PCR خارجی

۱۲/۵ µl مستر میکس (آمپلیکون، دانمارک) (غلظت نهایی ۱ X، ۱ µl از هر پرایمر eF و eR (غلظت نهایی ۰/۴ µM)، ۵/۵ µl آب مقطر و ۵ µl از DNA در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه شد.

PCR داخلی

۱۲/۵ µl مستر میکس (آمپلیکون، دانمارک) (غلظت نهایی ۱ X، ۱ µl از هر پرایمر iF و iR(غلظت نهایی ۰/۴ µM)، ۹/۵ µl آب مقطر و ۱ µl از پروداکت مرحله قبل در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه شد.

برای هر دو مرحله از این برنامه استفاده گردید. مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۰ سیکل مرحله واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ساخت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سپس مرحله ساخت نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

تجزیه و تحلیل محصولات تکثیر شده

وزن مولکولی محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ حاوی سیف استین بررسی شد.

نتایج

در بررسی نمونه‌های زنبور، استان‌های هرمزگان ۷۱/۴ ٪، کرمانشاه ۶۶/۷ ٪، فارس ۳۷/۵ ٪، کرمان ۲۸/۵ ٪، سیستان و بلوچستان ۲۵ ٪ و خوزستان ۹/۰۹ ٪ به ترتیب دارای بیشترین موارد مثبت بودند. درحالیکه، در استان‌های بوشهر و کهگیلویه و بویر احمد موارد مثبت دیده نشد. در کل از ۴۸ نمونه زنبور بررسی شده، در ۱۴ مورد (۲۹/۱۶ ٪) وجود اسپور *Paenibacillus larvae* شناسایی شد.

- در بررسی نمونه‌های عسل، استان‌های هرمزگان ۷۱/۴ ٪، کرمانشاه ۶۶/۷ ٪، کهگیلویه و بویر احمد۵۰ ٪، کرمان ۴۲/۹ ٪، فارس ۲۵ ٪، سیستان و بلوچستان ۲۵ ٪، بوشهر ۱۶/۵ ٪ و خوزستان ۹/۰۹ ٪ به ترتیب بالاترین درصد مثبت را به خود اختصاص دادند. در کل از ۴۸ نمونه عسل بررسی شده، در ۱۶ نمونه (۳۳/۳۳ ٪) وجود *Paenibacillus larvae* شناسایی شد.

- در بررسی نمونه‌های خرده‌های کف کندو، استان‌های سیستان و بلوچستان ۵۰ ٪، کهگیلویه و بویر احمد ۵۰ ٪ و کرمان ۲۸/۵ ٪ مثبت بوده و سایر استان‌ها منفی بودند. در کل، از ۴۸ نمونه خرده‌های کف کندوی بررسی شده، در ۵ مورد (۱۰/۴۱ ٪) وجود اسپور *Paenibacillus larvae* شناسایی شد.

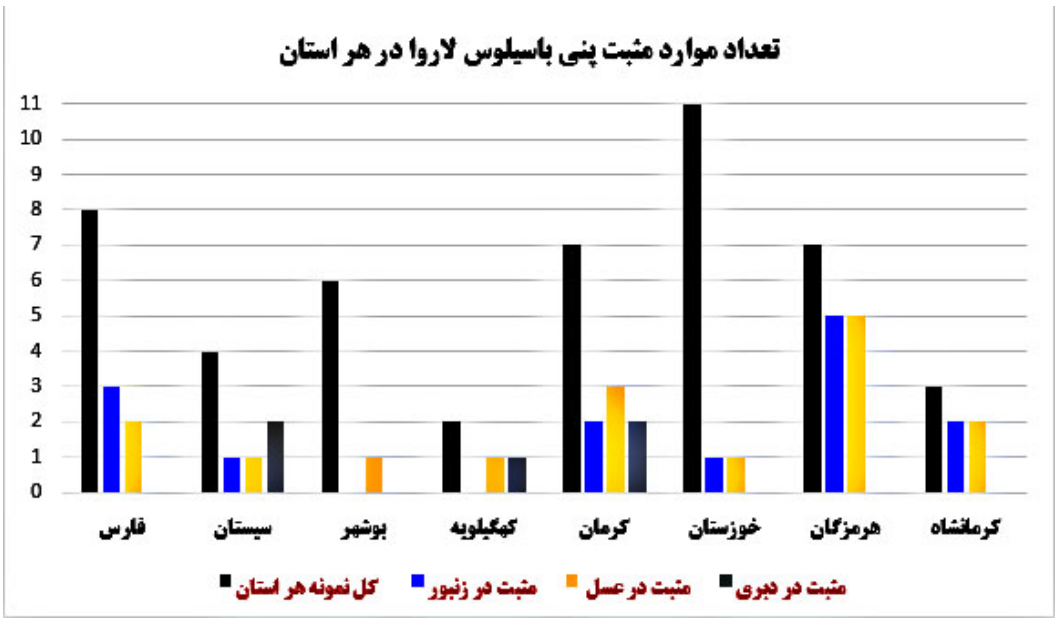
نتایج در جدول ۱ و نمودار ۱ و ۲ به وضوح آمده است.

بحث

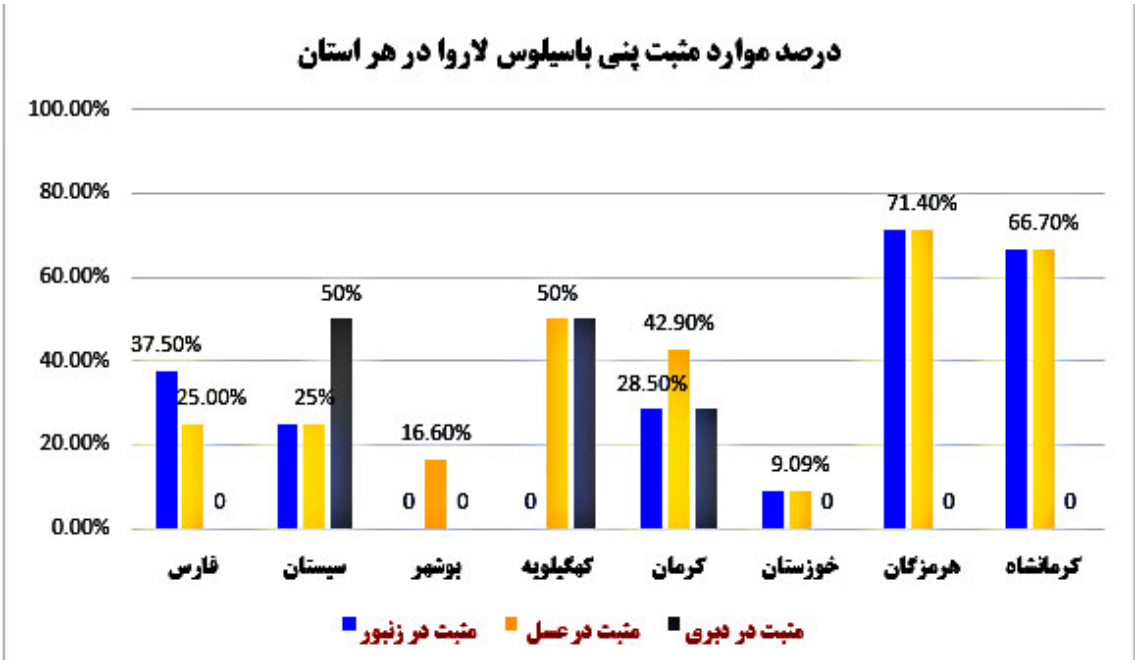
زنبورهای عسل، حشرات بسیار اجتماعی هستند و برای اولین بار در حدود ۱۲۰ تا ۱۳۰ میلیون سال پیش، همزمان با ظهور آنژیوسپرم‌های اولیه (گیاهانی که دانه آنها درون میوه تشکیل می‌شود) ظهور کردند. مطالعات نشان داده است که زنبورهای عسل به دلیل گرده افشانی کارآمد بسیاری از محصولات کشاورزی در سراسر جهان، برای اقتصاد کشاورزی ضروری هستند. برآوردها حاکی از آن است که عملکرد محصولات بدون گرده افشانی زنبور عسل بیش از ۹۰ ٪ کاهش خواهد یافت (۸).

جدول ۱- نتایج موارد مثبت در نمونه‌های زنبور، عسل و خرده‌های کف کندو در هر استان.

ردیف	استان	تعداد نمونه	موارد مثبت در PCR زنبور	موارد مثبت در PCR عسل	موارد مثبت در PCR خرده‌های کف کندو
۱	فارس	۸	۳ (٪ ۳۷/۵)	۲ (٪ ۲۵)	۰
۲	سیستان و بلوچستان	۴	۱ (٪ ۲۵)	۱ (٪ ۲۵	۲ (٪ ۵۰)
۳	بوشهر	۶	۰	۱ (٪ ۱۶/۵)	۰
۴	کهگیلویه و بویر احمد	۲	۰	۱ (٪ ۵۰)	۱ (٪ ۵۰)
۵	کرمان	۷	۲ (٪ ۲۸/۵)	۳ (٪ ۴۲/۹)	۲ (٪ ۲۸/۵)
۶	خوزستان	۱۱	۱ (٪ ۹/۰۹)	۱ (٪ ۹/۰۹)	۰
۷	هرمزگان	۷	۵ (٪ ۷۱/۴)	۵ (٪ ۷۱/۴)	۰
۸	کرمانشاه	۳	۲ (٪ ۶۶/۷)	۲ (٪ ۶۶/۷)	۰
تعداد کل		۴۸	۱۴ (٪ ۲۹/۱۶)	۱۶ (٪ ۳۳/۳۳)	۵ (٪ ۱۰/۴۱)



نمودار ۱- تعداد موارد مثبت در نمونه‌های زنبور، عسل و دبری در هر استان.



نمودار ۲- درصد موارد پنی‌باسیلوس لاروا در نمونه‌های زنبور، عسل و دبری در هر استان.

یکی از مهم‌ترین عواملی که بر توسعه کلنی‌های زنبور عسل و کاهش تولید، تأثیر می‌گذارد، وضعیت بهداشتی کندوها است. از این نظر، بیماری لوک آمریکایی ناشی *Paenibacillus larvae*، جدی‌ترین بیماری با منشأ باکتریایی است که مراحل لاروی و شفیرگی زنبورهای عسل را تحت تأثیر قرار می‌دهد و قادر به نابود کردن کلنی است. این بیماری یکی از معدود بیماری‌های زنبور عسل است که دارای مشکلات منحصر به فرد، برای پیشگیری و کنترل می‌باشد. زیرا، اسپورها می‌توانند برای مدت طولانی در برابر ناملایمات زیست محیطی زنده بمانند. همچنین لوک آمریکایی یک بیماری با اهمیت از نظر اجتماعی- اقتصادی در سطح تجارت بین‌المللی است و عسل آلوده یکی از مهم‌ترین عوامل انتشار این بیماری است (۱).

شدت بیماری و مسری بودن آن دلیلی است که باعث می‌شود این بیماری به عنوان مخرب‌ترین عفونت باکتریایی زنبورهای عسل لقب گیرد. عوامل مهمی در تعیین نتیجه آلودگی *Paenibacillus larvae* در کلنی‌های زنبور عسل نقش دارند. قدرت کلنی، نسبت زنبورهای بالغ به نوزادان، تفاوت در جریان شهد و جمع‌آوری گرده در میان کلنی‌های زنبورستان، عواملی هستند که می‌توانند بر توسعه بیماری لوک آمریکایی تأثیر بگذارند. با این حال، مقاومت کلنی عمدتاً به دلیل سطح رفتار بهداشتی و حدت متفاوت سویه‌ها یا ژنوتیپ‌های *Paenibacillus larvae*، از عواملی هستند که تأثیر بیشتری بر پیامد بیماری دارند (۱).

چهار ژنوتیپ مختلف *Paenibacillus larvae* ERIC (I-IV) با استفاده از پرایمرهای توالی ERIC توصیف شده است (۵). از بین این چهار ژنوتیپ، تنها ERIC I و ERIC II از اهمیت عملی برخوردارند، زیرا هر دو به طور منظم از کلنی‌های زنبور عسل بیمار در سراسر جهان جدا می‌شوند (۱۵). ژنوتیپ‌های ERIC I و ERIC II هم در سطح فردی و هم در سطح کلنی از نظر بیماری‌زایی با یکدیگر متفاوت هستند. در سطح فردی، سویه‌های ERIC I منجر به مرگ ۱۰۰ ٪ لاروهای آلوده در حدود ۱۲ روز می‌شوند، در حالی که باکتری‌های ژنوتیپ ERIC II لاروهای آلوده را در حدود ۷ روز می‌کشند (۵ ، ۴). ژنوتیپ بدخیم‌تر در سطح فردی، ERIC II، در واقع دارای حدت کمتری در سطح کلنی است، زیرا، لاروها قبل از بسته شدن درب سلوها کشته می‌شوند و می‌توانند به راحتی با رفتارهای بهداشتی اجتماعی زنبورهای بالغ شناسایی و حذف شوند. عکس این موضوع برای سویه‌های باکتریایی ژنوتیپ ERIC I صادق است، جایی که لاروهای آلوده تا هنگام بسته شدن درب سلول زنده می‌مانند و از تشخیص و حذف زود هنگام دور می‌مانند. بنابراین، عفونت ژنوتیپ ERIC I در سلول درب بسته شده با تولید اسپور و در نهایت حدت بالاتر در سطح کلنی تکثیر می‌شود (۱۴).

در مطالعه محرمی و همکاران (۲۰۲۲)، سویه‌های جدا شده از سطح زنبورستان‌ها که با استفاده از روش ERIC، تایپینگ شده‌اند نشان داد که ۷۳/۷ ٪ سویه‌ها ژنوتیپ II و ۲۶/۳ ٪ سویه‌ها ژنوتیپ I هستند (۱۱). بسیاری از محققان *Paenibacillus larvae* را از عسل و یا شان کلنی‌هایی جدا کرده‌اند که هیچ علامتی از بیماری لوک آمریکایی در کندوها مشاهده نمی‌شود. استدلال می‌شود که وقتی از اکسی‌تتراسایکلین علیه بیماری استفاده می‌گردد، علی‌رغم سرکوب علائم، عامل بیماری هنوز در این کندوها قابل شناسایی است (۲).

انجام مطالعه اپیدمیولوژیک به منظور کشف منبع عفونت و ردیابی آن در زنبورستان‌های مبتلا از جمله موارد پیشرو برای مبارزه با این بیماری است. از این جهت، به نظر می‌رسد تکنیک‌های مولکولی ابزار بسیار مهمی برای رسیدگی به مشکلات اپیدمیولوژیک باشد.

در این مطالعه، از هشت استان کشور، از ۴۸ زنبورستان نمونه‌گیری به عمل آمد. نتایج مثبت در نمونه زنبور (۲۹/۱۶ ٪) ۱۴ مورد، نمونه عسل (۳۳/۳۳ ٪) ۱۶ مورد و در نمونه خرده‌های کف کندو (۱۰/۴۱ ٪) ۵ مورد مشاهده گردید. بیشترین موارد مثبت در نمونه‌های زنبور و عسل مربوط به استان هرمزگان بود با ۷۱/۴ ٪ و در مورد نمونه‌های خرده‌های کف کندو استان‌های سیستان و بلوچستان و کهگیلویه و بویراحمد با۵۰ ٪ بیشترین موارد مثبت را داشتند. از نمونه‌های عسل در تمامی هشت استان موارد مثبت وجود داشت ولی از نمونه‌های زنبور در شش استان موارد مثبت شناسایی شد. در نمونه‌های زنبور از استان‌های بوشهر و کهگیلویه و بویر احمد مورد مثبت شناسایی نشد.

هورنیتزی و همکاران (۱۹۹۶) از ۱۲ ٪ زنبورهای عسل مورد تحقیق *Paenibacillus larvae* را گزارش کردند (۶). کائکو و نیسکانن (۱۹۹۵) از فنلاند در ۵۲ نمونه عسل مورد آزمایش، ۱۷ ٪ *Paenibacillus larvae* را شناسایی نمودند (۷). آیدمن و همکاران (۱۹۹۷) از ۳۲۷ نمونه عسل، ۱۳/۷۶ ٪ *Paenibacillus larvae* را شناسایی کردند (۳). در ترکیه، آکماز (۲۰۰۱) در ۶۵ نمونه از ۳۰۰ نمونه (۲۱/۶ ٪)، *Paenibacillus larvae* را شناسایی کرد (۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد آلودگی در سطح این هشت استان بسیار بالا است. با توجه به این آمار لزوم توجه به مراقبت و نظارت بر زنبورستان‌ها باید توسط دستگاه‌های نظارتی در دستور کار قرار گرفته و پایش مستمر انجام گردد.

روش PCR که سریع، آسان و اختصاصی است می‌تواند جایگزین مفیدی برای تشخیص‌های زمان‌بر باشد. با این روش می‌توان غربالگری بیماری لوک آمریکایی را در مناطق مشکوک به سرعت انجام داد. وجود تعداد زیادی اسپور شرط ضروری است و علائم بالینی تنها زمانی رخ می‌دهد که سطح مشخصی از اسپور در کلنی‌های زنبور عسل به دست آید. شناسایی کلنی‌های در معرض خطر ابتلا به لوک آمریکایی به زنبورداران اجازه می‌دهد تا اقدامات مناسب را برای جلوگیری از شروع بیماری و گسترش عفونت انجام دهند. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، آگاهی از تعداد اسپور *Paenibacillus larvae* در مواد گرفته شده از کندوها، به ویژه عسل و خرده‌های کف کندو، می‌تواند ابزار مفیدی برای ارزیابی خطر لوک آمریکایی باشد. با شناسایی عامل این بیماری در نمونه‌های عسل و موم، می‌توان به تولیدکنندگان هشدار داد که مراقب باشند. نکته مهم و حائز اهمیت این است که به زنبورداران توصیه شود از استفاده عسل‌های بی‌کیفیت و فاقد شناسنامه بهداشتی جداً خودداری نمایند. این نوع عسل‌ها، منشأ بسیاری از عوامل بیماری‌زا به خصوص اسپورهای *Paenibacillus larvae* عامل بیماری لوک آمریکایی می‌باشند که استفاده از آنها جهت تغذیه کلنی‌ها (تغذیه زمستانه و یا هر نوع تغذیه دیگر)، باعث انتقال و گسترش بیماری‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک

و حتی رصد و مانیتورینگ عفونت *Paenibacillus larvae* در سطح زنبورستان‌ها و کلنی‌های زنبور عسل استان‌ها، جمع‌آوری نمونه عسل نسبت به سایر نمونه‌ها، روشی علمی، دقیق، سریع و با نتایج قابل اتکاء محسوب می‌شود. امروزه در دنیا از این روش برای پایش مستمر این بیماری استفاده می‌کنند و با توجه به نتایج حاصله و شمارش اسپورها به ازاء هر کلنی، استراتژی مبارزه، کنترل، پیشگیری و همچنین درمان را تدوین و اجرا می‌نمایند. تشخیص بیماری با استفاده از نمونه‌های عسل و زنبورهای بالغ ارزش پیش آگهی بالاتری در مقایسه با شناسایی باکتری‌های موجود در نمونه‌های موم، گرده و خرده‌های کف کندو دارد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از کلیه همکاران سازمان دامپزشکی کشور که در نمونه‌برداری کمک شایانی داشته‌اند سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Anonymous, 2012. Report of the meeting of the OIE ad hoc group on diseases of honey bees.- January 31 - February 2, Paris, France, The World Organisation for Animal Health, OIE.- [online] URL: https://www.oie.int/doc/ged/D11514.pdf

2. Akmaz, Ö., A. yöresinde. 2001. Amerikan yavru çürüklüğü hastalnğnnnn yaygnnlnğn. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 32 (1-2): 55-61.

3. Aydmn, N., H. Bülbül, G. Bmymkoğlu, et al. 1997. Kovanlardan ve tüketime sunulan bal örneklerinden *Peanibacillus larvae*'nnn izolasyonu. *Etlik Veterinary Microbiology*, 10 (1): 93-100.

4. Genersch, E., A. Ashiralieva, I. Fries. 2005. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):7551–5.

5. Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikäinen, et al. 2006. Reclassification of Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens and *Paenibacillus larvae subsp. larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3):501–11.

6. Hornitzhy, M.A.Z., B.P. Oldroyd, D. Somerville. 1996. *Bacillus larvae* carrier status of swarms and fetal colonies of honey bees (Apis mellifera) in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 73 (3): 116-117.

7. Kauko. L., M. Niskanen. 1995. Occurence and diagnosis of American foulbrood in SW Finland. *Sectio DD Med Vet*, 50 (825): 249-253.

8. Klein, A.M., B.E. Vaissiere, J.H. Cane, et al. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings Biological sciences*, 274, 303–313.

9. Lauro, F.M., M. Favaretto, L. Covolo, et al. 2003. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3):195-201.

10. Mill, A.C., S.P. Rushton, M.D.F. Shirley, et al. 2014. Clustering, persistence and control of a pollinator brood disease: epidemiology of American foulbrood. *Environmental Microbiology*, 16(12):3753–63.

11. Moharrami, M., E.A. Niri. 2022. Investigation of genotypic diversity of *Paenibacillus larvae* straines isolated from Iranian honey bee colonies. Veterinary Researches & Biological Products, No 137, 91-97

12. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2019. American foulbrood of the honey bee. Chapter 3.2.2.

13. Pentikäinen, J., E. Kalliainen, S. Pelkonen. 2009. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* infection in Finland. *Apidologie*, 40(1):73–81.

14. Rauch, S., A. Ashiralieva, K. Hedtke, et al. 2009. Negative correlation between individual and colony level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10):3344–7.

15. Schäfer, M.O., E. Genersch, A. Fünfhaus, et al. 2014. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 170(3-4):291–7.