JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره دوم، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۹: ۱۱۲-۱۰۳

ارزیابی دو روش کشت باکتریایی و PCR در تشخیص بیماری لوک آمریکایی و اروپایی

صبا الماسی چگنی[۱]، ملاحت احمدی[۲*]، حبیب دستمالچی ساعی[۳]، بنت الهدی رحمان[٤]

۱- دانش‌آموخته‌ی دوره کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- دستیار دکترای تخصصی میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ٢٤ اردیبهشت ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۰ شهریور ۱۳۹۲

چکیده

لوک آمریکایی و لوک اروپایی دو بیماری باکتریایی بالقوه کشنده لاروهای زنبور عسل در کلنی‌های آلوده هستند که به ترتیب توسط باکتری‌های پنی‌باسیلوس لاروا و ملیسوکوکوس پلوتونیوس ایجاد می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر مقایسه روش‌های کشت باکتریایی و PCR در تشخیص دو بیماری لوک آمریکایی و لوک اروپایی است. در این مطالعه ۳۰ نمونه لارو دارای علائم بیماری از ۳۰ زنبورستان واقع در شهرهای مختلف استان لرستان جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها ابتدا توسط کشت میکروبی و سپس با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن 16S rRNA از لحاظ وجود بیماری‌های لوک آمریکایی و لوک اروپایی مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد نمونه‌های مثبت به دست آمده از نظر آلودگی به پنی باسیلوس لاروا توسط کشت میکروبی ۱۰٪ و با استفاده از روش PCR ۱۳/۳٪ بود. همچنین تمام نمونه‌های مورد آزمایش هم در کشت میکروبی و هم در روش PCRاز لحاظ آلودگی به ملیسوکوکوس پلوتونیوس منفی بودند، اگرچه از ۶ نمونه باکتری پنی‌باسیلوس آلوئی که اندیکاتور لوک اروپایی می‌باشد، در کشت باکتریایی جدا گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش PCR برای تشخیص باکتری پنی باسیلوس لاروا بسیار اختصاصی بوده، بنابراین این روش می‌تواند باعث بهبود روش‌های تشخیصی و جایگزین شدن با روش‌های سنتی کشت جهت تشخیص پنی باسیلوس لاروا گردد. با این حال در خصوص ملیسوکوکوس پلوتونیوس انجام مطالعات بیشتر در مورد روش‌های تشخیصی پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: *زنبور عسل، لوک آمریکایی، لوک اروپایی، PCR، استان لرستان*

* نویسنده مسئول: ملاحت احمدی

آدرس: گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. : تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸

پست الکترونیک: m.ahmadi@urmia.ac.ir

مقدمه

زنبور عسل و لارو آن مورد حمله‌ی گستره‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌ها هستند. با توجه به اهمیت اقتصادی زنبورداری در ایران و نقش تولیدات زنبور عسل در مصارف گوناگون، آگاهی از بیماری‌های زنبور عسل و تشخیص به موقع آن امری ضروری می‌نماید. یکی از خطرناک‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های نوزادان زنبور عسل، لوک آمریکایی است که لاروهای زنبور عسل *آ پیس ملی فرا* را مبتلا نموده و عامل آن باکتری گرم مثبت و اسپورزایی به نام *پنی‌باسیلوس لاروا* می‌باشد (۶و۱۰). وجود اسپور *پنی‌باسیلوس لاروا* در کندو نشاندهنده آلوده بودن کندو می‌باشد و به محض ایجاد شرایط مناسب جهت رشد، اسپورها جوانه زده و باعث ایجاد بیماری می‌شوند. این بیماری همواره خسارات اقتصادی قابل توجهی به پرورش دهندگان زنبورعسل وارد می‌نماید (۲۰). چهار ژنوتیپ ERIC I, II, III, IV *پنی‌باسیلوس لاروا* از لحاظ فنوتیپ و حدت با یکدیگر متفاوتند (۹و۱۰). در این میان، ERIC I دارای حدت کمتری بوده (۹و۱۰) و می‌تواند به عنوان ژنوتیپ کلاسیک در نظرگرفته شود که به احتمال زیاد علت اکثر واگیری‌ها در سراسر جهان است. در این بیماری ویسکوزیته محتویات بدن لارو افزایش یافته و نهایتاً به اسکال سختی تبدیل می‌شود که به دیواره سلول می‌چسبد. این اشکال بسیار عفونی بوده و شامل میلیون‌ها اسپور است و باعث انتشار بیماری در درون و بین کلنی‌ها می‌گردد (۱۶). با توجه به مقاومت بالای اسپورها و همچنین تولید بی‌شمار آن‌ها در کلنی‌های آلوده، تشخیص سریع و زودهنگام بیماری در درمان و کنترل آن حائز اهمیت می‌باشد. لوک اروپایی نیز لاروهای جوان با سن کمتر از ۴۸ ساعت را متاثر می‌کند (۲۳) و موجب مرگ و میر لاروهای جوان زنبور عسل (۵-۴ روزه) بر اثر سپتی‌سمی می‌شود. این بیماری حدوداً در ۱۰۰ کشور جهان گزارش شده است (۱۹). در مقایسه با بیماری لوک آمریکایی، این بیماری خفیف‌تر است اما بعلت شیوع گسترده، خسارات اقتصادی قابل توجهی بدنبال دارد (۲۱). عامل بیماری مذکور *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* بوده که یک باکتری گرم مثبت، لانستی شکل و بدون اسپور می‌باشد (۲۱). چندین باکتری دیگر از جمله *پنی‌باسیلوس آلوئی* و *بروی‌باسیلوس لاتروسپروس* نیز ممکن است به عنوان مهاجم ثانویه در وقوع لوک اروپایی نقش داشته باشند (۲۱). ساختار اختصاصی میزبان در انتقال این بیماری مهم است، زیرا تراکم بالای کلنی‌ها و زنبورداری‌ها در یک منطقه باعث ترویج و انتشار جرم بیماری‌زا می‌شود (۴). تشخیص نهایی دو بیماری بر اساس روش‌های آزمایشگاهی، کشت و جداسازی باکتری عامل بیماری می‌باشد. عامل هر دو بیماری، دیر رشد و سخت رشد بوده و تشخیص با استفاده از روش‌های کشت و کیت-های تشخیصی بیوشیمیایی به حدود دو هفته زمان نیاز دارد. با این حال با استفاده از روش‌های دقیق تشخیص مولکولی همچون PCR، می‌توان عفونت را ظرف مدت زمان بسیار کمتر و قبل از بروز علائم بالینی قابل مشاهده در کلنی تشخیص داد و با آنالیز نمودن مداوم مخزن عفونت (زنبورهای کارگر) می‌توان بیماری را کنترل نمود (۲۳). در مطالعات چند سال اخیر در نقاط مختلف دنیا، از روش‌های تشخیص مولکولی، برای شناسایی باکتری‌های *پنی‌باسیلوس لاروا* (۲۴،۲۲،۱۴،۱۲،۸،۳،۱) و *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* (۱۸،۱۱،۷،۴) استفاده شده است. با توجه به پیشرفت روزافزون علوم و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در زمینه‌های مختلف، در مطالعه حاضر سعی گردید تا با استفاده از آخرین اطلاعات موجود پیرامون این دو

بیماری باکتریایی در زنبور عسل، گام موثری در زمینه پیش‌برد آزمایش‌های زنبور عسل و تشخیص این دو عامل بیماری‌زا با استفاده از روش‌های مولکولی در ایران برداشته شود.

مواد و روش کار

روش نمونه برداری

۳۰ قطعه شان با ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر حاوی لاروهای مشکوک به بیماری لوک آمریکایی و اروپایی از ۳۰ زنبورستان واقع در شهرهای مختلف استان لرستان از جمله خرم آباد، پلدختر، الشتر و نورآباد جمع‌آوری و درون یک جعبه مقوایی به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌گیری‌ها از اول اسفندماه ۱۳۹۰ تا آخر خردادماه ۱۳۹۱ شمسی انجام گرفت. قسمتی از هر نمونه جهت شروع آزمایشات میکروبی انتخاب و قسمت دیگر آن تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت باکتریایی

به منظور کشت و جداسازی عامل لوک آمریکایی و اروپایی ابتدا تعدادی از لاروهای بیمار و مرده در لوله درپیچ‌دار استریل حاوی چند عدد پرل شیشه‌ای ریخته شدند. سپس با اضافه نمودن ۳-۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل شیرابه‌ای جهت استفاده در کشت میکروبی تهیه شد (۲و۱۴).

جهت کشت و جداسازی *پنی‌باسیلوس لاروا* ابتدا سوسپانسیون حاصل ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار گرفت تا باکتری‌های غیراسپورزا کشته شوند. از سوسپانسیون سرد و ورتکس شده به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در محیط BHI (Merck, Germany) و در آگار خون‌دار (Merck, Germany) تلقیح شد (۲). پس از ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط میکروآئروفیلیک، گسترش تهیه شده از کلنی‌ها برای جستجوی شکل رویا و اسپور *پنی‌باسیلوس لاروا* به روش گرم و نگروزین رنگ‌آمیزی شدند. آزمایشات اندول، کاتالاز، ووژس-پروسکوئر، متیل رد و احیای نیترات و رشد در محیط نوترینت براث برای تشخیص خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های مشکوک به *پنی‌باسیلوس لاروا* انجام گرفت (۱۴).

جهت کشت و جداسازی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* از سوسپانسیون حاصل به میزان ۳۰۰ میکرولیتر به محیط ترکیبی حاوی یک گرم عصاره مخمر، یک گرم گلوکز، ۱/۳۵ گرم بی‌فسفات پتاسیم، یک گرم نشاسته و ۲ گرم آگار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. کشت‌های میکروبی در شرایط بی‌هوازی با ۱۰٪ دی‌اکسیدکربن و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های مشکوک (ریز و سفید) گسترش تهیه کرده و بعد از رنگ‌آمیزی گرم برای تشخیص نهایی از آزمایشات کاتالاز، ووژس-پروسکوئر، احیای نیترات و هیدرولیز نشاسته استفاده شد (۲۱). در این مرحله علاوه بر باکتری *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* کلیه باکتری‌های اندیکاتور بیماری لوک اروپایی نیز مورد توجه قرار گرفته و در صورت رشد در محیط کشت، جداسازی و خالص گردیدند.

آزمایشات مولکولی

به منظور استخراج مستقیم DNA از لاروهای بیمار ابتدا دو عدد لارو دارای علائم بالینی در لوله آزمایش حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث (Merck, Germany) انکوبه شدند. بعد از یک شب انکوباسیون

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون کشت در ۱۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. استخراج DNA از رسوب حاصل توسط کیت استخراج DNA ژنومی (Fermantas, Germany) و مطابق دستور شرکت سازنده آن انجام گرفت. بعد از اتمام مراحل استخراج DNA، میکروتیوب‌ها تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر ۲۰- درجه یانتی‌گراد قرار داده شدند.

جهت استخراج DNA از کشت باکتریایی، مقداری از کلنی باکتری در ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE (۳ گرم Tris-HCl با ۰/۹۳ گرم EDTA و ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و pH محلول به ۸ رسانده شد) حل شده و استخراج DNA مطابق دستور شرکت سازنده کیت انجام شد.

جهت تشخیص مولکولی *پنی‌باسیلوس لاروا* و *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*، از تکثیر ژن 16S rRNA به روش PCR استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جداول ۱ و ۲ آمده است. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (سیناژن- ایران) سنتز شدند. واکنش PCR با استفاده از کیت تشخیصی PCR ساخت شرکت سیناژن (سیناژن-ایران) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، همچنین پرایمرهای R و F با غلظت ۱۰ pmol هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر، ۶/۵ میکرولیتر از محلول آب دیونیزه استریل و ۴ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده از باکتری انجام گرفت. از باکتری *پنی‌باسیلوس لاروا* به عنوان کنترل مثبت و از نمونه لاروهای سالم نیز به عنوان کنترل منفی جهت تشخیص *پنی باسیلوس لاروا* استفاده گردید. مراحل چرخه دمایی واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۳۵ چرخه متشکل از دناتوراسیون در ۹۳ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، و بدنبال آن مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بودند.

آزمون PCR و سیکل‌های حرارتی برای تشخیص *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* مشابه *پنی باسیلوس لاروا* انجام گرفت با این تفاوت که پرایمرهای اختصاصی ژن 16S rRNA *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* در واکنش مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱و۱۲).

در نهایت به منظور الکتروفورز، حدود ۸ میکرولیتر از هر محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذار به آرامی مخلوط شده و پس از بارگذاری در ژل آگاروز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، عمل الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰V برای مدت ۱ ساعت انجام گرفت. سپس به منظور بررسی باندها، ژل به دستگاه ترانس ایلومیناتور انتقال داده شده و پس از تابش نور ماوراء بنفش موقعیت باندها بر روی ژل آگاروز مشخص گردید.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن 16S rRNA در باکتری *پنی‌باسیلوس لاروا*

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه	منبع
Forward Reverse	5'-AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC-3' 5'-TCTATCTCAAAACCGGTCAGAGG-3'	۹۷۳ bp	Govan et al. 1999

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژن 16S rRNA در باکتری *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*

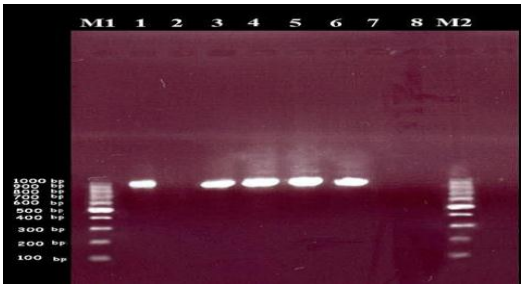
پرایمر	توالی پرایمر	اندازه	منبع
Forward Reverse	5'-GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC-3′ 5'-TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG-3′	۸۱۲ bp	Govan et al. 1999

نتایج

نتایج حاصل از کشت میکروبی

در کشت میکروبی از ۳ نمونه لارو، باکتری *پنی‌باسیلوس لاروا* (۱۰٪) جدا گردید. کلنی‌های رشد کرده روی پلیت آگار خون‌دار از لحاظ تولید رنگدانه متفاوت بوده و به دو صورت بدون رنگدانه و حاوی رنگدانه نارنجی بودند که هر دو مورد به عنوان *پنی‌باسیلوس لاروا* مورد تشخیص قطعی قرار گرفتند. اشکال رویا و اسپور باکتری زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. تمام جدایه‌ها نیترات مثبت، اما از لحاظ واکنش اندول و کاتالاز منفی بودند. هیچ‌کدام از سویه‌های جدا شده قادر به رشد در محیط نوترینت براث نبودند. از این رو بر اساس آزمایشات مذکور تشخیص *پنی‌باسیلوس لاروا* در ۳ نمونه لارو قطعی گردید.

از هیچ کدام از نمونه‌های لارو کشت داده شده *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* جدا نگردید. اما از ۶ نمونه (۲۰٪) از ۳۰ نمونه لارو کشت داده شده، *پنی‌باسیلوس آلوئی* جدا شد که یک باکتری اندیکاتور جهت تشخیص لوک اروپایی می‌باشد. همچنین از هیچیک از نمونه‌های کشت داده شده، عامل لوک آمریکایی و اروپایی (باکتری‌های اندیکاتور لوک اروپایی) به طور همزمان جدا نگردید.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA مربوط به *پنی‌باسیلوس لاروا*.

چاهک‌های M1 و M2: مارکر (Fermentas, Germany) 100 bp

چاهک۱: کنترل مثبت چاهک۲: کنترل منفی

چاهک‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: جدایه‌های مثبت

نتایج حاصل از آزمایش PCR

پرایمرهای مورد استفاده برای *پنی‌باسیلوس لاروا* قطعه‌ای به اندازه ۹۷۳ جفت باز را در ۴ نمونه لارو (۱۳/۳٪) تکثیر دادند. تمام نمونه‌های مثبت از لحاظ کشت میکروبی، در آزمایش PCR نیز مثبت شدند، به علاوه یک نمونه لارو که در کشت میکروبی منفی بود در آزمایش PCR مثبت گردید (شکل۱). از این رو میزان حساسیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۷۵٪ و ۸۷/۰۹٪ به دست آمد. در ضمن درصد منفی و مثبت اخباری به ترتیب ۸۹/۶۵٪ و ۱۲/۹٪ و درصد منفی کاذب و مثبت کاذب به ترتیب ۵۰/۹۴٪ و۴۲/۸۵٪ و میزان دقت تست ۱۳/۳٪ محاسبه گردید.

از ۳۰ نمونه لارو مورد آزمایش در این مطالعه، با استفاده از ژن 16S rRNA مربوط به باکتری *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* به اندازه محصول ۸۱۲ جفت باز، هیچ نمونه مثبتی با روش PCR یافت نشد. البته از ۶ نمونه، باکتری اندیکاتور لوک اروپایی یعنی *پنی‌باسیلوس آلوئی* در کشت جدا گردید. لذا وجود آلودگی کندوها با لوک اروپایی در این تحقیق به کلی رد نمی‌گردد.

شایان ذکر است که با توجه به وقوع بالای دو بیماری باکتریایی لوک آمریکایی و اروپایی در زنبورعسل، نمونه‌ها از جهت وجود این دو بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. سایر بیماری‌های باکتریایی به دلیل وقوع بسیار پایین دارای اهمیت چندان نمی‌باشند (۲).

بحث

لوک آمریکایی یکی از بیماری‌های باکتریایی خطرناک و واگیردار در زنبور عسل می‌باشد. لوک اروپایی نیز بیماری عفونی و واگیرداری است که لاروهای جوان با سن کمتر از ۴۸ ساعت را متاثر می-

نماید. این دو بیماری باکتریایی زنبور عسل انتشار جهانی داشته و عامل بالقوه کشنده لاروهای زنبور عسل در کلنی‌های آلوده هستند. تراکم بالای جمعیت زنبوران و زنبورداری در یک منطقه باعث مستعد شدن آن منطقه جهت ایجاد بیماری می‌شود. به منظور تشخیص نهایی این دو بیماری معمولاً از روش‌های آزمایشگاهی، کشت و جداسازی باکتری عامل بیماری استفاده می‌شود. با توجه به دیر رشد و سخت رشد بودن عامل هر دو بیماری، تشخیص با استفاده از روش‌های کشت و کیت‌های تشخیصی بیوشیمیایی زمان‌بر می‌باشد. این موضوع توجه محققین زیادی را به منظور توسعه روش‌های سریعتر برای تشخیص این بیماری‌ها به خود جلب نموده است. در این ارتباط رو-ش‌های مولکولی، امکان تشخیص را در ظرف مدت زمان بسیار کم فراهم می‌سازند. در این ارتباط از روش PCR برای اولین بار در سال ۱۹۹۹ برای تشخیص *پنی‌باسیلوس لاروا* از کلنی‌های رشد کرده در محیط نیمه اختصاصی استفاده شد (۱۲). همچنین در سال ۲۰۰۱ با مطالعه‌ای که بر روی جدایه‌های *پنی‌باسیلوس لاروا* مربوط به نمونه‌های عسل و لارو انجام گرفت، گزارش شد که حساسیت PCR با استفاده از پرایمر مربوط به ژن 16S rRNA در کشت میکروبی ۳۲ اسپور و در نمونه عسل ۱۷۰ اسپور می‌باشد. پرایمر مورد استفاده برای *پنی‌باسیلوس لاروا* نیز کاملاً اختصاصی بوده و با دیگر باکتری‌های مشابه واکنش متقاطع ایجاد نمی‌کند (۲۲). در چندین مطالعه‌ی دیگر نیز از روش PCR با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA برای ردیابی باکتری *پنی‌باسیلوس لاروا* در نمونه‌های آلوده استفاده شده است (۱و۸). در بررسی دیگر بر روی جدایه‌های *پنی-باسیلوس لاروا* بدست آمده از نمونه‌های عسل، مشخص شد که از میان پرایمرهای مختلف، جفت پرایمرهای Af6 و Af7 دارای بیشترین حساسیت در تشخیص این باکتری به روش PCR بوده و توانایی تشخیص اسید نوکلئیک را در رقت CFU ۰/۰۵ دارند (۳). همچنین برطبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ به منظور بررسی آلودگی موم‌های باقیمانده در کندوهای زمستانی به عامل لوک آمریکایی به روش PCR انجام گرفت، عنوان شد که این روش برخلاف روش‌های زمان‌بر کشت، سریع و حساس است. به طوری که این روش می‌تواند کلنی‌های بیمار را طی زمستان مشخص نموده و از شیوع و انتشار بیماری در تابستان جلوگیری نماید (۲۴). در سال ۲۰۱۰ نیز بر روی ۱۰۰ نمونه عسل و موم مطالعه‌ای انجام گرفت که بر اساس آن، تعداد نمونه‌های مثبت از نظر آلودگی به *پنی‌باسیلوس لاروا* در کشت میکروبی ۷٪ و در روش PCR ۸٪ گزارش شد (۱۴). در مطالعات متعدد از روش Real-time PCR نیز برای جستجوی سلول‌های رویشی و اسپور این باکتری در نمونه‌های آلوده استفاده شده است (۵،۱۳، ۱۵و ۱۷). در این بررسی‌ها، این روش به عنوان روشی سریع، انتخابی، حساس و اختصاصی برای ردیابی سلول‌های رویشی و اسپور باکتری شناخته شده است.

در سال ۱۹۹۸ روش PCR برای تشخیص *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* در لاروهای بیمار بکار برده شد و عنوان گردید که این روش در مقایسه با روش-های کشت، سریع و اختصاصی می‌باشد (۱۱). در همان سال، با استفاده از روش Hemi-nested PCR میزان آلودگی به *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* در ۸۰ نمونه زنبور بالغ، عسل، لارو و گرده گل آزمایش شده ۶۸/۸٪ گزارش گردید، در حالی‌که ۲۷/۵٪ از این نمونه‌ها در کشت میکروبی آلودگی را نشان دادند. این امر نشان‌گر اختصاصی بودن روش PCR نسبت به کشت میکروبی در تشخیص باکتری است (۷). در

مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت از روش PCR برای ردیابی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* در لارو، زنبور بالغ، گرده و عسل در کندوهای سالم و آلوده استفاده شد. در این بررسی، روش PCR به عنوان روشی اختصاصی و حساس برای مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد بیماری لوک اروپایی شناخته شد که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های کشت این باکتری باشد (۱۸). همچنین محققین در سال ۲۰۰۷ با استفاده از روش PCR، توزیع باکتری *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* را در بین زنبورهای مربوط به کلنی‌های مختلف در سوئیس بررسی نمودند. در این مطالعه حدود ۹۰٪ کلنی‌های فاقد علامت که در نواحی آلوده به بیماری قرار داشتند، دارای زنبورهای حامل *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* بودند. این میزان در مورد کلنی‌های بدون علامت و نزدیک به نواحی آلوده ۳۰٪ بود (۴).

در این مطالعه برای اولین بار DNA مورد نیاز جهت استفاده در PCR مستقیماً از لاروهای بیمار استخراج گردید و از لارو برای تشخیص عامل دو بیماری به صورت همزمان و با یک روش استخراج از نمونه‌های بالینی استفاده شد. همچنین در مطالعه حاضر با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن 16S rRNA در هر دو باکتری و با استفاده از سیکل‌های دمایی مشابه در روش PCR، امکان تشخیص همزمان دو بیماری ظرف مدت زمان کم و در حدود ۴ ساعت فراهم گردید. بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر PCR می‌تواند برای تشخیص *پنی‌باسیلوس لاروا* بسیار اختصاصی باشد. همچنین بر اساس مطالعات انجام گرفته پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی برای تشخیص *پنی‌باسیلوس لاروا* ۱۰۰٪ اختصاصی هستند (۱۱). بنابراین، این روش می‌تواند باعث بهبود روش‌های تشخیصی و جایگزین شدن با روش‌های سنتی شود. همچنین PCR در تشخیص عامل بیماری و در مطالعات اپیدمیولوژیکی کاربرد دارد. روش‌های تشخیص مولکولی همچون PCR این امکان را فراهم می‌سازند که بتوان عفونت را قبل از بروز علائم بالینی مشخص و قابل مشاهده در کلنی تشخیص داده و با آنالیز نمودن مداوم مخزن عفونت (زنبورهای کارگر) بیماری را کنترل نمود (۲۳).

اگرچه در مطالعه حاضر، تمام نمونه‌های مورد آزمایش هم در کشت میکروبی و هم در روش PCR از لحاظ آلودگی به *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* منفی بودند اما وجود باکتری اندیکاتور *پنی‌باسیلوس آلوئی* در ۲۰٪ نمونه‌ها می‌تواند نشان‌گر وجود بیماری لوک اروپایی باشد. لذا تحقیق حاضر وجود *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* را رد نمی‌کند و در مورد منفی شدن نتایج حاصل از کشت میکروبی و PCR دلایلی مثل سخت رشد بودن باکتری و یا اختصاصی نبودن پرایمر مورد استفاده در این تحقیق برای شناسایی سوش‌های باکتری موجود در منطقه مورد مطالعه مطرح است. بنابراین، اصلاح روش‌های اختصاصی کشت جهت جداسازی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* و طراحی پرایمرهای اختصاصی مناسب سوش‌های منطقه‌ای پیشنهاد می‌گردد.

لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر میزان آلودگی کندوها در استان لرستان به لوک آمریکایی ۱۳٪ و لوک اروپایی ۲۰٪ گزارش گردید که این نتایج با گزارشات سازمان دامپزشکی کشور در سایر مناطق پرورش زنبور عسل هم‌خوانی دارد. همچنین با توجه به تحقیقات انجام گرفته و نتایج مطالعه حاضر، آزمون PCR جهت تشخیص سریع بیماری لوک آمریکایی و اروپایی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Alippi, A.M., Lopez Lopez, A.C., Aguilar, O.M. (2002). Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* the cause of American foulbrood of honeybees by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3655-60.
2. Alippi, A.M. (1990). Bacterial diseases in hony bee. *Universidad Nacional deL a Plata Calle* **118**: 31-59.
3. Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Grabensteiner, E., Nowotny, N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: Comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1504-10.
4. Belloy, L., Imdorf, A., Fries, I., Forsgren, E., Berthoud, H., Kuhn, R., Jean-Daniel, C. (2007). Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* **38**: 136–40.
5. Chagas, S.S., Vaucher, R.A., Brandelli, A. (2010). Detection of *Paenibacillus larvae* by Real-time PCR. *Acta Scientiae Veterinariae* **38**: 251-6.
6. de Graaf, D.C., Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Homitzky, M., Pernal, S.F., Schuch, D.M., Titera, D., Tomkies, V., Ritter, W. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 583-90.
7. Djordjevic, S.P., Noone, K., Smith, L., Hornitzky, M.A.Z. (1998). Development of a heminested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* **37**: 165-74.
8. Dobbelaere, W., De Graaf, D.C., Peeters, J.E., Jacobs, F.J. (2001). Development of a fast and reliable method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* **32**: 363-70.
9. Genersch, E., Ashiralieva, A., Fries, I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7551-5.
10. Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. (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**: 501-11.
11. Govan, V.A., Brozel, V., Allsopp, M.H., Davison, S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1983-5.
12. Govan, V.A., Allsopp, M.H., Davison, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2243-5.
13. Han, S.H., Lee, D.B., Lee, D.W., Kim, E.H., Yoon, B.S. (2008). Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *Journal of Invertebrate Pathology* **99**: 8-13.
14. Kilic, A., Simsek, H., Kalender, H. (2010). Detection of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*) by the PCR and culture. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **16**: 841-5.

15. Knazovicka, V., Miluchova, M., Gabor, M., Kacaniova, M., Melich, M., Krocko, M., Trakovicka, A. (2011). Using Real-time PCR for Identification of *Paenibacillus larvae*. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **44**: 425-31.
16. Lindstrom, A., Korpela, S., Fries, I. (2008). The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**: 82–6.
17. Martinez, J., Simon, V., Gonzalez, B., Conget, P. (2010). A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Journal of Applied Microbiology* **50**: 603-10.
18. McKee, B., Djordjevic, S., Goodman, R., Hornitzky, M. (2002). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie* **34**: 19-27.
19. Mohan Rao, K., Rana, B.S., Chakravarty, S.K., Katna, S., Sharma, A. (2011). Characterization of *Melissococcus pluton* from European honey bee (*Apis mellifera* L.) of north - west Himalayas. *International Journal of Science and Nature* **2**: 632-8.
20. Neuendorf, S., Hedtke, K., Tangen, G., Genersch, E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* **150**: 2381-90.
21. Nikolina, R., Parvan, P. (2005). European FoulBrood Disease – Etiology, Diagnostics and Control. *Trakia Journal of Sciences* **3**: 10-16.
22. Piccini, C., Zunino, P. (2001). American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytretracycline. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**: 176-7.
23. Roetschi, A., Berthoud, H., Kuhn, R., Imdorf, A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie* **39**: 362-71.
24. Ryba, S., Titera, D., Haklova, M., Stopka, P. (2008). A PCR method of detecting American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Veterinary Microbiology* **139**: 193-6.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 2, 2014

A Comparison between the Bacterial Culture and PCR in the Identification of American Foulbrood (AFB) and European Foulbrood (EFB)

Almasi Chegeni, S.[1], Ahmadi, M.[2*], Dastmalchi Saei, H.[3], Rahman, B.[4]

1- Graduate of the Master of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
4- PhD Student in Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran

Received Date:14 May 2013 *Accepted Date: 1 September 2013*

Abstract: *The American foulbrood (AFB) and European foulbrood (EFB) are important bacterial diseases in honeybee caused by Paenibacillus larvae and Mellisocuccos plutonius, respectively. The aim of this study is to compare the conventional method with molecular method (PCR) in terms of identification of AFB and EFB. In the present study, 30 larves with clinical symptoms from 30 apiaries located in different cities of Lorestan province were collected. The samples were examined for the disease using conventional methods and PCR simultaneously. Two specific primers for 16S rRNA gene were used in PCR. The number of positive samples was 13.3% in PCR but 10% in the conventional method such as bacterial culture for Paenibacillus larvae. All samples in both bacterial culture and PCR methods were negative for Mellisocuccos plutonius but in the bacterial culture, they were isolated from 6 samples of Paenibacillus alvei, an indicator of European foulbrood. According to the results, PCR is a specific method for the identification of Paenibacillus larvae, so this method can improve the diagnosis tests and be an alternative for the conventional culture methods in the diagnosis of Paenibacillus larvae. But for the Mellisocuccos plutonius, further research to improve the diagnosis tests is suggested.*

Keywords: *Honey bee, American foulbrood, European foulbrood, PCR, Lorestan Province.*

**Corresponding author: Ahmadi, M.*
Address: Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran. Tel: 0441-2770508
Email: m.ahmadi@urmia.ac.ir