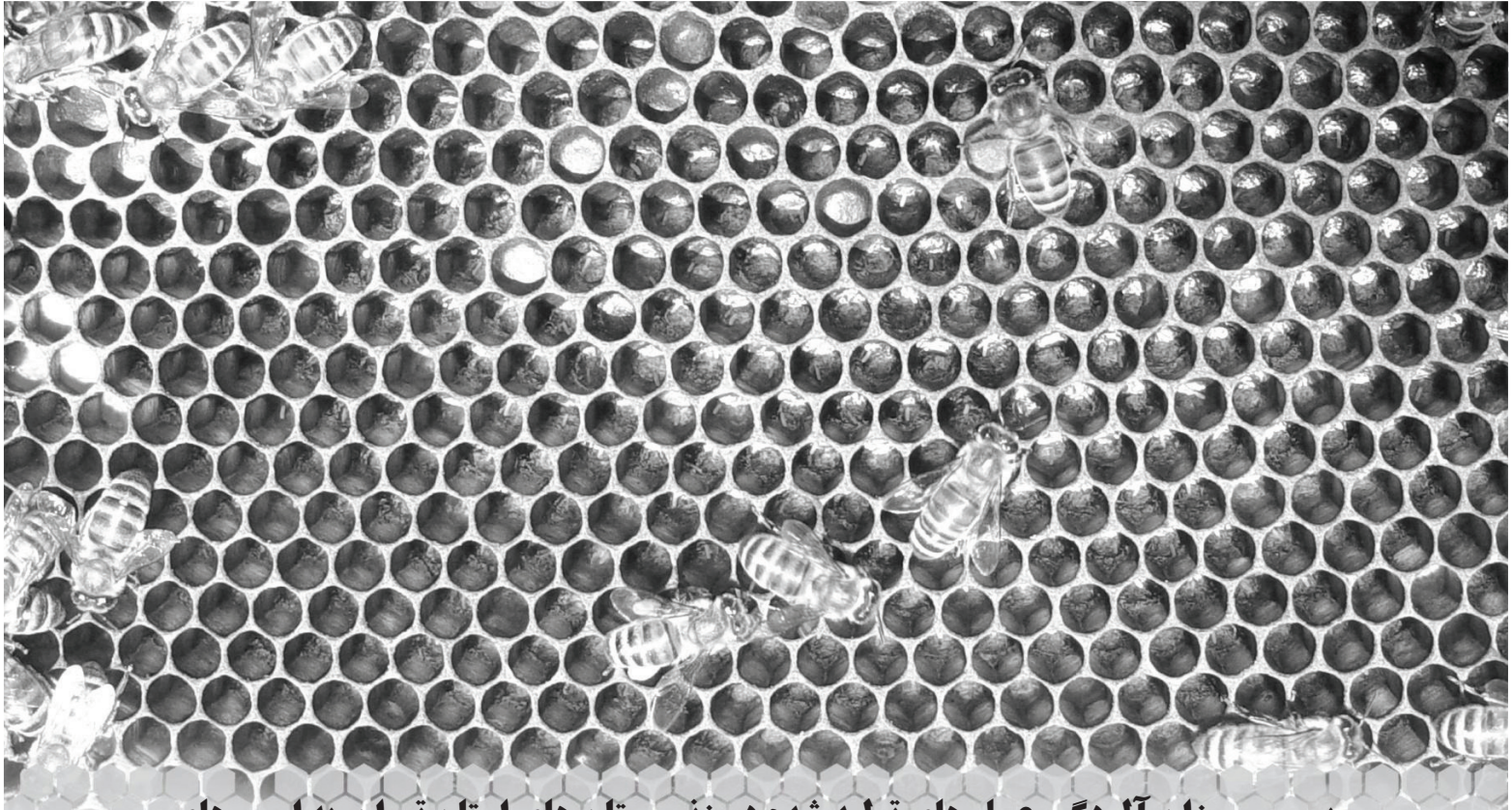


بررسی میزان آلودگی عسل های تولید شده در زنبورستان های استان تهران به اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا لاروا* (عامل بیماری لوک آمریکایی) با روش کشت وPCR

مجتبی محرمی [1*]، حسین مدیرروستا [2]

۱- استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج

۲- کارشناس بخش تحقیقات زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش

تاریخ دریافت : شهریور ۹۳ تاریخ پذیرش : بهمن ۹۳

چکیده:

بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل از بیماری های بسیار مهم و نابود کننده لاروهای زنبور عسل می باشد. جداسازی *پنی باسیلوس لاروا لاروا* عامل بیماری لوک امریکایی از نمونه های لارو بیمار یا مشکوک به بیماری مهمترین روش تایید تشخیص محسوب می شود. با توجه به این که نمونه گیری از عسل بسیار آسان تر از سایرروش های نمونه گیری (لارو، موم، ...) می باشد و همچنین مزاحمت کمتری برای کلنی ها وزنبورداران ایجاد می نماید. امروزه استفاده از نمونه های عسل برای تایید تشخیص بالینی و ردیابی آلودگی در زنبورستان ها بسیار رایج گردیده است.

هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع آلودگی به *پنی باسیلوس لاروا لاروا* در زنبورستان های استان تهران از طریق کشت و جدا سازی باکتری از نمونه های عسل و PCR آن برای تشخیص نهایی باکتری *پنی باسیلوس لاروا لاروا* به جای تست های بیوشیمیایی که بسیار زمان بر و پر هزینه بوده و گاهی با نتایج گمراه کننده همراه هستند، می باشد.

روش کار: تعداد ۱۲۱ نمونه عسل از زنبورداری های سطح استان تهران (قدیم) به صورت تصادفی انتخاب و نمونه برداری گردید. نمونه ها کشت شده و با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند و محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد.

نتایج: از ۱۲۱ نمونه عسل جمع آوری شده از *زنبورستان های* استان تهران، از ۳۱ نمونه عسل *پنی باسیلوس لاروا لاروا* جدا سازی و با روش PCR تایید نهایی گردید. بنا بر این میزان شیوع آلودگی در زنبورستان های استان تهران ۲۵/۶ ٪ می باشد. با توجه به امکان آلودگی فراورده های زنبور عسل به این اسپورها و حساسیت آن در تجارت جهانی و تاثیر کاملا منفی آن بر روی صادرات، مونیتورینگ و شناسایی این اسپورها در عسل ها بسیار ضروری می باشد.

مقدمه

بیماری لوک آمریکایی یا AFB (American foulbrood) مهمترین بیماری باکتریایی نوزادان زنبور عسل ، محسوب می شود. این بیماری در اثر باکتری گرم مثبت و اسپوردار به نام پنی *باسیلوس لاروا تحت گونه لاروا* ایجاد می شود. اسپور ها می توانند ۵۰- ۳۵ سال زنده بمانند (Bakhiet & Stahly, 1985). اسپورها در برابر خشکی، دمای بالا (°C ۱۰۰ برای بیش از ۱۰ دقیقه)، و نور UV بشدت مقاوم هستند. همچنین در تماس با ضد عفونی کننده های متداول مانند محلول فرمالدئید ۱۰ ٪ بیش از ۵ ساعت زنده می مانند (Heyndrickx et al., 1996). اسپورها نوزادان زنبور عسل را در مرحله لاروی مورد حمله قرار می دهند. (معمولاً در طول ۳۶-۲۴ ساعت اولیه زندگی) (Gregorc & Bowen, 1998). لاروهای بیش از ۲ روز نسبت به عفونت مقاوم تر هستند ولی در لاروهای خیلی جوان ۱۰ اسپور یا کمتر به طور موثری سبب بیماری می شود (Bailey & Lee, 1962). جوانه زدن اسپورها در pH حدود ۶/۶ و دمای °C ۳۷- ۳۶ تحت شرایط میکرو آئروفیل CO_2 ۱۰ – ۵ ٪ رخ می دهد. اسپور در روده میانی (pH = ۶/۶)تقریباً یک روز بعد از بلع بوسیله لارو، به شکل رویشی در می آید. سلول های رویشی قادر به تکثیر در روده لارو نیستند بنا بر این به کمک تاژک ها از سطح اپیتلیوم به داخل حفره بدن نفوذ و در همولنف تکثیر می یابند. لارو بعلت یک باکتریمی سیستمیک تلف می شود (Davidson, 1973). بعد از مرگ، لاروها که به طور معمول سفید رنگ هستند به توده قهوه ای تیره تغییر رنگ داده و سپس متلاشی شده و در کف سلول قرار می گیرند. پس از تخریب دیواره بدن، با افزایش ویسکوزیته محتویات بدن لاروها به تدریج پس از مدت کوتاهی به صورت یک فلس خشک شده به کف و دیواره سلول می چسبند (Bailey & Ball, 1991). بیماری لوک آمریکایی یک بیماری مهم در تجارت جهانی است و موجب خسارت های بزرگ اقتصادی می شود اما در خیلی از موارد با تشخیص زود و سریع می توان به کنترل و پیشگیری آن کمک کرد. نظارت بر عسل، لارو و دیگر مواد کندو برای شناسایی *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا لاروا* در ردیابی اپیدمی های AFB بسیار پر ارزش می باشد. شناسایی پنی باسیلوس لاروا درفراورده های زنبور عسل در خصوص صادرات و واردات این فرآورده ها به ویژه عسل، بسیار با اهمیت می باشد و روش با ارزشی در کنترل گسترش AFB بین کشورها محسوب می گردد. بنابر این راه اندازی یک روش توانا در ردیابی عامل بیماریزا هنگامی که هنوز علائم بیماری ظاهر نشده، می تواند اهرم موثری در مبارزه علیه بیماری لوک امریکایی باشد، چرا که هر تاخیری در تشخیص نه تنها برای آن کندو بلکه برای همسایگان آن اغلب زیان بار است به طوریکه به سرعت اسپور های بیماریزا تمامی منطقه را آلوده می کنند. در تمامی موارد فوق استفاده از روش PCR برای تشخیص نهایی و ردیابی عامل این بیماری و همچنین صرفه جویی در زمان و هزینه می تواندکار برد داشته باشد . برای انجام PCR می توان از پرایمر های مشتق شده از ناحیه 16S rRNA استفاده کرد. این مارکر برای بررسی وقوع و انتشار باکتری ها در نمونه ها به صورت گسترده مورد استفاده قرار می گیرد (Alippi et al., 2004). استفاده از روش PCR برای شناسایی بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل برای اولین بار در ایران توسط مدیرروستا و محرمی در سال ۲۰۱۲ انجام شده است.

هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع *اسپور های باکتری پنی باسیلوس لاروا لاروا* در سطح زنبورداری های استان تهران و تایید آن به وسیله روش تشخیصی مولکولار و استاندارد شده PCR با استفاده از نمونه عسل می باشد این نوع نمونه گیری از نظر زنبورداران روشی غیر تهاجمی، بسیار راحت و قابل قبول می باشد

مواد و روش ها

نمونه برداری:

برای انتخاب نمونه ها از روش تصادفی ساده استفاده شد. در این روش با استفاده از فرمول $n = \frac{z^2 \cdot p \cdot q}{d^2}$ و ضریب اصلاحی SPC ، ۱۲۱ نمونه از زنبورستان های استان تهران به صورت تصادفی نمونه گیری به عمل آمد.

با هماهنگی سازمان دامپزشکی، ۱۲۱ زنبورستان در سطح استان تهران به صورت تصادفی انتخاب و نمونه گیری شد. نمونه های عسل درون ظروف استریل جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. در جدول ۱ مناطق نمونه برداری و تعداد نمونه ها مشخص شده است.

جدول۱: نمونه های مورد مطالعه بر حسب شهرستان در استان تهران

ردیف	منطقه	تعداد نمونه	درصد نمونه
۱	فیروزکوه	۴	۳/۳
۲	شمیرانات	۱۴	۱۱/۵۷
۳	دماوند	۳	۲/۴۸
۴	کرج	۳۵	۲۸/۹۳
۵	ساوجبلاغ	۵۲	۴۲/۹۸
۶	ورامین	۱۳	۱۰/۷۴
۷	جمع	۱۲۱	۱۰۰

آماده سازی نمونه :

۲۰ گرم از نمونه عسل، با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و به خوبی هم زده تا کاملا یکنواخت شود. سپس در g ۶۰۰۰ به مدت۴۰ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب حاصل که حاوی اسپور می باشد، برای کشت و جدا سازی DNA در ۱ میلی لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون می گردد.

(Antunez et al., 2004) و (Alessandro B.D et al., 2007)

کشت:

سوسپانسیون حاوی اسپور، در بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته سپس در پنج پلیت حاوی محیط کشت MYPGP agar ، در هر کدام µ ۲۰۰ از سوسپانسیون کشت داده می شود. پلیت ها را در شرایط میکروآئروفیل۱۰- ۵ درصد CO_2 انکوباسیون گردید. تعداد ۵-۳ کلنی باکتری از هر پلیت برای آزمایش های تاییدی اولیه به کار رفت.

(Antunez et al., 2004) و (Alessandro B.D et al., 2007).

آزمایش های تاییدی اولیه:

رنگ آمیزی گرم :

در رنگ آمیزی گرم این باکتری بصورت باسیل گرم مثبت دیده می شود.

کاتالاز:

یک کلنی بوسیله آنس بر داشته و روی یک لام تمیز گذاشته می شود. سپس یک قطره از پراکسید ئیدروژن ۳ ٪ روی آن قرار داده و کاملا مخلوط می شود. در صورت ایجاد حباب و کف واکنش کاتالاز مثبت می باشد. سویه های *پنی باسیلوس لاروا* کاتالاز منفی و گاهی مثبت ضعیف با تاخیر می باشند. (OIE , 2010 Manual)

استخراج DNA از باکتری :

یک کلنی از سویه باکتری در µl ۵۰ آب مقطر سوسپانسیون کرده سپس در بن ماری ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرارداده شد و بعد در g۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی به عنوان DNA در PCR استفاده گردید.

(Neuendorf et al. , 2007) و (Govan et al., 1999)

PCR:

برای انجام PCR، پرایمر های اختصاصی که توسط پیچینی و همکاران (۲۰۰۲) بر اساس توالی ژن 16S rDNA باکتری طراحی شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. این پرایمرها یک قطعه حدودا bp ۷۰۰ را تکثیر می‌دهند.

F: (5′-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3′),
R: (5′-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3′)

واکنش PCR با یک حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت و از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10 X PCR ، ۰/۵ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی مولار dNTP mix، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ میکرو مولار از هر پرایمر،(1U) Taq ، ۲ میکرولیتر از محلول ۲۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده و آب مقطر استفاده گردید. PCR در ترموسایکلر گرادیانت اپندورف با شرایط Initial denaturation با دمای ۹۵ درجه به مدت ۱

دقیقه و ۳۰ سیکل بعدی به صورت Denaturation با دمای ۹۳ درجه ۱ دقیقه، Annealing با دمای ۵۵ درجه ۳۰ ثانیه، Extending با دمای ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل Final extending با دمای ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گردید (Piccini et al., 2002).

۱۰ ماکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر لودینگ بافر به خوبی مخلوط و به داخل چاهک های ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید، اضافه شد. برای این کار از DNA marker، 1 kb استفاده شد و پس از پایان زمان الکتروفورز، ژل روی دستگاه UV-Transilluminator جهت بررسی و عکس برداری قرار گرفت (Sambrook et al., 1989).

نتایج حاصل ازکشت و PCR بر روی نمونه های عسل:

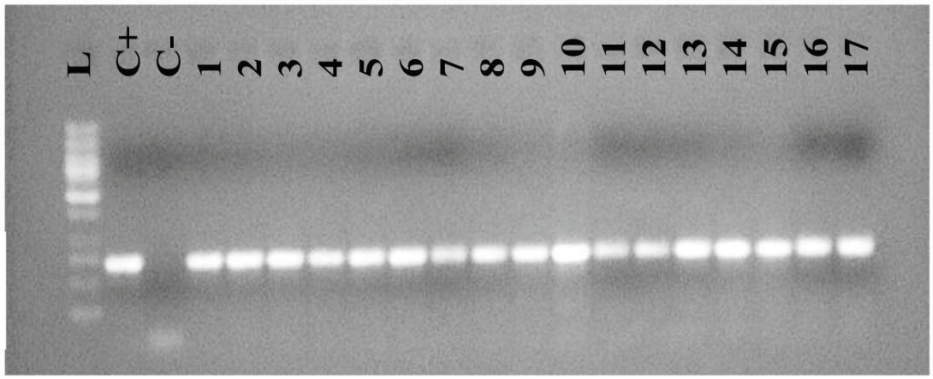
از ۱۲۱ نمونه عسل که از مناطق مختلف استان تهران به صورت تصادفی جمع آوری شده بود ابتدا کشت وسپس PCR به عمل آمد. از این تعداد ۳۱ نمونه درکشت و PCR مثبت بودند. نتایج در جدول ۲ به صورت کلی و به تفکیک مناطق آمده است.

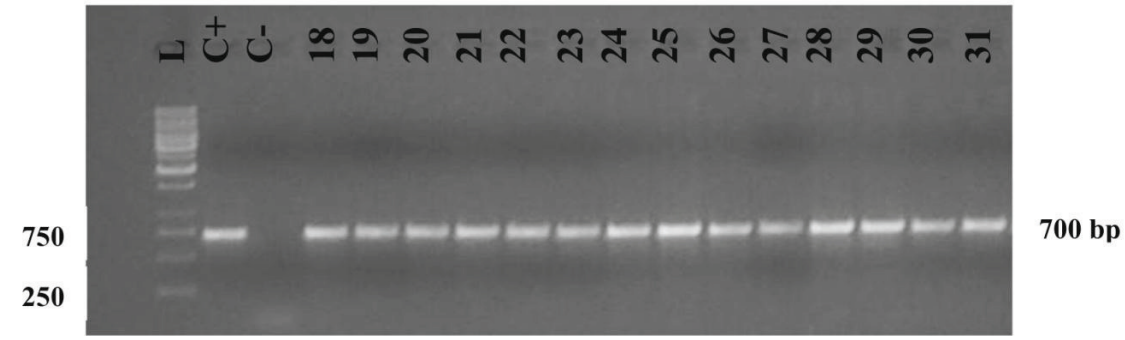
جدول ۲ : توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به اسپورهای پنی باسیلوس لاروا در نمونه های عسل

ردیف	منطقه	کشت و PCR مثبت	
		تعداد	درصد
۱	فیروزکوه	۲	۵۰
۲	شمیرانات	۷	۵۰
۳	دماوند	۱	۳۳/۳
۴	کرج	۸	۲۲/۹
۵	ساوجبلاغ	۱۰	۱۹/۲
۶	ورامین	۳	۲۳
	جمع	۳۱	(٪۲۵/۶)

PCR از کلنی باکتری های جدا سازی شده بر روی محیط کشت

از نمونه های عسل پس از مراحل آماده سازی، و جداسازی باکتری و سپس جداسازی DNA ، PCR انجام شده که نتایج آن در زیر آمده است.





L: Ladder 1 Kb , C+: Positive Control , C-: Negative Control , 1-31: Sampel
باندهای ۳۱ نمونه مثبت که با روش PCR تایید گردید در عکس تهیه شده از ژل‌ها مشاهده می‌شود

بحث

در گذشته تشخیص آزمایشگاهی بیماری لوک آمریکایی عمدتا مبتنی بر کشت و جداسازی عامل بیماری بوده و تشخیص تفریقی عامل بیماری از سایر باکتری ها بسیار زمانبر و براساس مورفولوژی و الگو های بیوشیمیایی بوده است. امروزه در کشورهای مختلف تکنیک PCR به طور وسیعی توسط محققین برای شناسایی و تشخیص *پنی باسیلوس لاروا* عامل بیماری لوک امریکایی مورد استفاده قرار گرفته است. شناسایی *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا*، در نمونه های عسل با استفاده از تکنیک PCR روش بسیار با ارزشی در کنترل و جلوگیری از انتشار بیماری لوک آمریکایی در بین زنبورستان ها در مناطق مختلف و حتی ما بین کشور ها محسوب می شود. مهمترین مشکل در ارتباط با تشخیص اسپور های *پنی باسیلوس لاروا* در نمونه های عسل، غلظت نسبتاً کم این اسپور ها و همچنین حضور سایر پنی باسیلوس ها و یا باسیلوس ها در عسل می باشد که نسبت به *پنی باسیلوس لاروا* سریعتر رشد می کنند و مانع رشد کلنی های *پنی باسیلوس لاروا* می شوند بنابر این اسپور ها را باید به روش دیالیز و یا سانتریفوژ در نمونه های عسل رقیق شده تغلیظ نمود و همچنین با گرمادهی، با کتری های فاقد اسپور را غیر فعال و حذف نمود. در ایران برای اولین بار مدیر روستا و محرمی ۲۰۱۲ روش PCR را در تشخیص *اسپور های پنی باسیلوس لاروا* در عسل راه اندازی کردند و حساسیت آزمایش PCR در مورد کشت باکتریایی عسل را ۳-۲ cfu/ml تعیین کردند. در این مطالعه با استفاده از روش کشت و PCR نمونه های عسل استان تهران از نظر میزان شیوع *اسپور های پنی باسیلوس لاروا* غربالگری شد. در این تحقیق از تکنیک تشخیصیPCR برای شناسایی سریع کلنی های *پنی باسیلوس لاروا* که از نمونه های عسل، جدا سازی شده بود، استفاده شد. استفاده از روش های مولکولار علاوه بر صرفه جویی در زمان و هزینه، سریع ودقیق نیز هستند. نتایج نشان داد که تعداد ۳۱ نمونه درکشت و PCR (۲۵/۶ ٪) مثبت بودند، که حکایت از شیوع نسبتاً بالای عامل بیماری لوک امریکایی در زنبورستان های استان دارد. روش PCR به عنوان یک استراتژی جدید برای غربا لگری عامل بیماری مهم و خسارت بار لوک آمریکایی در ایران محسوب می شود. به کمک این استراتژی می توان به سهولت تعداد بسیار زیادی نمونه عسل را در مدت زمان کوتاهی و با هزینه کمتری مورد ارزیابی قرار داده و قضاوت صحیحی از وضعیت بیماری یا آلودگی و اپیدمی های احتمالی در سطح منطقه و کشور داشت. قطعاً کنترل و مونیتورینگ عامل بیماری از طریق تشخیص عامل بیماری لوک آمریکایی در نمونه های عسل زنبورستان ها نقش بسزایی در جلوگیری از مصرف نابجای آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی داشته و تاثیرات همه جانبه ای در سلامت تغذیه ای جامعه مصرف کنندگان، ارتقاء اقتصادی زنبورداران و افزایش صادرات عسل بر جای خواهد گذاشت. نتایج حاصل از این مطالعه با بررسی های انجام شده بوسیله سایر محققین مشابهت‌ها و تفاوت‌هایی دارد که علل این تفاوت ها را

می توان در وضعیت بیماری، مدیریت زنبورستان ها، و روش کار انجام شده و کیفیت آزمایشگاه و کاربران جستجو نمود.

نتایج بررسی آقای بیکونی و همکاران ۲۰۰۳ بر روی ۲۶ نمونه عسل از ۱۳ کشور (از ۴ قاره) نشان داد که ۱۸ نمونه از نظر آلودگی با *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا* مثبت بودند. گراف و همکارانش (۲۰۰۱) از ۱۳۲۸ نمونه عسل آزمایش شده ۱۱ ٪ آلودگی با *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را گزارش دادند. در لهستان لیپینسکی و همکارانش (۲۰۰۷) از ۲۵۱ نمونه عسل آزمایش شده از ۹ ناحیه از کشورشان ۵۱ مورد (۲۰/۳ ٪) وجود آلودگی با *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را اثبات کردند. کریستیانا و همکارانش (۲۰۰۸) به روی ۲۴۲ نمونه عسل در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۷ کار کردند. در ۲۰۰۵ از ۱۴۲ عسل آزمایش شده ۳۴ مورد (۲۳ ٪) از نظر آلودگی با *پنی باسیلوس لاروا لاروا* مثبت بود. در ۱۰۰ نمونه عسل آزمایش شده در ۲۰۰۷ نیز درصد مشابهی بدست آوردند. در اروگوئه آنتونز و همکارانش (۲۰۰۴) در طی سال های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ با آزمایش از ۱۰۱ نمونه عسل از ۱۹ ایالت، اسپور *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را در ۵۲ نمونه (۵۱/۵ ٪) یافتند. در برزیل شاچ و همکارانش (۲۰۰۱)، ۱۳۷ نمونه عسل وارداتی و ۳۰۰ نمونه عسل از برزیل را آزمایش کردند آن ها *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را از ۲۴ نمونه (۸ ٪) عسل وارداتی جدا کردند.

ریتر در سال ۲۰۰۳ ضمن تحقیقات خود بر روی نمونه های عسل در زنبورستان های آلمان ۲ ٪ آلودگی را با *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا لاروا* را گزارش کرد. در ۹۸ ٪ از ۷۰۰ نمونه عسل وارداتی به آلمان از کشورهای غیر اتحادیه اروپا و ۶۲ ٪ از ۲۰۰ نمونه عسل وارداتی از کشور های اتحادیه اروپا، *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا لاروا* را شناسایی کرد.

مشابه همین تحقیق در سال های ۱۹۹۶- ۱۹۹۳ توسط فاندروئه (۱۹۹۷) انجام شده است. به دنبال آزمایش ۲۰۹۹ نمونه عسل از آلمان و عسل خارجی، در این تحقیقات فقط در ۷ ٪ از عسل های آلمان اسپور های پنی باسیلوس لاروا لاروا رد یابی شد در حالیکه از نمونه عسل های خارجی که از کشورهای آرژانتین، یونان، ایران، روسیه و آمریکا بود این درصد بسیار بالاتر بود.

بسیاری از محققین PCR را برای تشخیص *پنی باسلوس لاروا* از کلنی های رشد کرده بر روی محیط های کشت اختصاصی مورد استفاده قرار داده اند. آقای گوان و همکاران در سال ۱۹۹۹ روش PCR را برای تشخیص *پنی باسیلوس لاروا* از محیط های کشت اختصاصی طراحی کردند با این روش سویه های جدا شده *پنی باسیلوس لاروا* از عسل را به سرعت تایید می کردند. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که بین سطح آلودگی با *اسپورهای پنی باسیلوس لاروا* در عسل و وقوع علائم کلینیکی AFB در لاروهای زنبور عسل ارتباط وجود دارد. روش های ردیابی به کاهش هزینه ها و کار زیاد در مبارزه علیه AFB کمک می کند. این کار می تواند خطر گسترش بیماری را کاهش دهد بدون اینکه نیاز به از بین بردن کلنی های زنبور داشته باشیم.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق ومطالعات سایر محققین تشخیص سریع کلنی ها ی باکتری پنی باسیلوس لاروا لاروا از سایر باکتری ها در محیط های کشت اختصاصی با استفاده از تکنیک PCR و بدون کاربرد تست های بیو شیمیایی می تواند یک تکنیک سریع و قابل اطمینان برای تشخیص AFB در نمونه های عسل، لارو و حتی سایر فرآورده های مر بوط به زنبورباشد، ضمن اینکه نمونه گیری از عسل بسیار آسان تر از سایر نمونه گیری ها (لارو، موم، ...) می باشد.

منابع

1. Alessandro B.D. , Antunez K. , Piccini C. , Zunino P. (2007) DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore- decoating and freeze-thawing techniques.World J Microbiol Biotechnol 23 : 593–597

2. Alippi A.M., Lopez A.C. & Aguilar O.M. (2004).A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. Applied Microbiology, 39 : 25–33

3. Alippi A.M., 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. Appl. Environ. Microbiol., 68 (7) : 3655-3660.

4. Antunez K.A., Alessandro B.D., Piccini C., Corbella E. & Zunino P. (2004).*Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey , Journal of Invertebrate Pathology, 86 : 56–58

5. 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. Appl. Eviron. Microbiol., 69 (3) : 1504-1510.

6. Bailey, L. and Ball, B.V. (1991). Honey Bee Pathology. 2nd edn. Academic Press, London.

7. Bailey, L., Lee, D.C. (1962). *Bacillus larvae*: its cultivation in vitro and its growth in vivo. (1962). J. Gen. Microbiol. 29 : 711 –717.

8. Bakhiet, N., Stahly, D.P. (1985). Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. Appl. Environ. Microbiol. 50 : 690–692.

9. Davidson, E.W. (1973). Ultrastructure of AFB disease pathogenesis in *larvae* of the worker bee, *Apis mellifera*. J. lnvertebr. Pathol.. 21 : 53-61.

10. Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Ali, N. & Berkeley, R. (1996).Reclassification of *Paenibacillus* (formerly Bacillus) pulvifaciens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly Bacillus) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of P. *larvae*, with emended descriptions of P. *larvae* as P. *larvae* subsp. larvae and P. *larvae* subsp. pulvifaciens. Int J Syst Bacteriol 46 : 270–279.

11. Govan, V. A., M. H. Allsopp, and S. Davison. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl. Environ. Microbiol.65:2243–2245

12. Graff de Dirk C.,Vandekerchove D., Dobbellaere W., Peeters J.E.,Jacobs F.J. (2001). Influence of the proximity of American Foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey.Apidologie 32 : 587-599.

13. Gregorc, A., Bowen, I.D., (1998). Histopathological and histochemical changes in honeybee *larvae* (*Apis mellifera L.*) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. Cell Biol. Int. 22 : 137– 144.

14. Krystyana P., Andrezej B. (2008). Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in honey samples domestic apiaries.J. apicultural science.52 (2):105-111

15. Lipinski Z., Szubtarski J., Szubtarska D., Kasztelewicz J. (2007).The contamination of winter stores and early spring honey with spores of *Paenibacillus larvae* in Polish apiaries of the Malopolska – provice. Polish J.Vet.Sci. 10(2): 71-74

16. Modirrousta H., Moharrami M., Torkaman M. (2012). Development of PCR method for diagnosing of honey bee American Foulbrood disease. Archives of Razi Institute,Vol. 67, No.1:1-5

17. Neuendorf S. Hedtke K, Tangen G. and Genersch E. (2004).Biochemical characterization of different genotypes of

Paenibacillus larvae subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. Microbiology, 150: 2381–2390

18. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2010).Part 2 , Section 2.2 , Chapter 2.2.2

19. Pernal S.F., Melathopoulos a.p. (2006).Monitoring for American Foulbrood spores from honey and bee samples in canada.Apiacta. 41: 99-109.

20. Piccini C., D'Alessandro B., Antunez K. & Zunino P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* spores in naturally infected bee *larvae* and artificially contaminated honey by PCR.World J. Microbiol. Biotechnol., 18 : 761- 765.

21. Ritter W. (2003). Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, 38 : 125–130.

22. Schuch .M.T., Madden R.H. & Sattler A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. J. Apicult. Res., 40 (2) : 59–64.

23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

24. Von der ohe W. & Dustmann J.H. (1997). Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. Am.Bee J., 137 (8) : 603–606.

Survey of contamination rate of *Paenibacillus larvae larvae* spores (the causative agent of American foulbrood) in the produced honeys in apiaries of Tehran province by culture and PCR

By: Mojtaba Moharami *[1] - Hossein Modirrousta [2]

1-Assistant Professor of Bee Pathology, Razi vaccine and Serum Research Institute.

2- MSc of Microbiology, Razi vaccine and Serum Research Institute.

Received: September 2014 **Accepted: February 2015**

American foulbrood (AFB), a severe bacterial disease of honeybee brood, caused by the sporeforming bacterium *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. The agent, infect and kill *larvae* and produce billions of resistant spores to environmental factors. The spores are distributed in bee colonies and apiaries, thus bee products (honey…) are contaminated. For diagnosis, culture and chemical tests are very timeconsuming and expensive which occasionally give false result.

In this study, 121 samples of honey were collected from apiaries in Tehran province. The samples were selected by simple random method. Honey samples were diluted with an equal volume of distilled water and centrifuged, then the pellet used for DNA extraction. DNA was used for culture and PCR. PCR products were electrophoresed on 0.8 % agarose gel.

The result showed that out of 121 honey samples which collected from beekeeping of Tehran province, 31(25/6 %) samples were positive by culture and PCR.

To control and preventive measures before the occurrence of any kind of damages, we can monitor or screen of honey samples on regional and national scale by using culture and PCR method. According to the possibility of Honey contamination with the spores and its importance in global trade and a clear negative impact on exports, monitoring and detection of spores in honeys is very essential.