تشخیص مولکولی اسپورهای پنی *باسیلوس لاروا لاروا* در نوزادان بیمار زنبور عسل

مجتبی محرمی، حسین مدیرروستا

بخش تحقیقات زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران.

***نویسنده مسئول:** *mojmoharrami@yahoo.com*

چکیده

بیماری لوک آمریکایی یک بیماری باکتریایی است که اختصاص به نوزادان زنبور عسل دارد و عامل بیماری *باکتری پنی باسیلوس لاروا لاروا* نام دارد . تشخیص آزمایشگاهی سریع این بیماری به دامپزشکان و زنبورداران کمک می کند که بیماری را در مراحل اولیه شناسایی و قبل از آنکه میلیارد ها اسپور در سلولهای حاوی لاروهای تلف شده تولید شود بیماری را کنترل و با آن مبارزه نمایند. روشهایی مانند کشت باکتریایی و تست های بیوشیمیایی بسیار زمان بر و پر هزینه بوده و گاهی با نتایج کاذب همراه هستند. در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR ، اسپور های موجود در نمونه های لارو ردیابی شده‌اند. بدین منظور تعداد ٥٤ نمونه لارو که از زنبورستانهای واقع در استانهای مختلف به بخش تشخیص و تحقیق بیماریهای زنبور عسل موسسه رازی ارسال شده بود مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های لارو مشکوک به بیماری لوک آمریکایی در یک میلی لیتر آب مقطر استریل به خوبی هموژن و سپس سانتریفوژ گردید. محلول رویی را برداشته و در g ٦٠٠٠ به مدت ٣٠ دقیقه سانتریفوژ و رسوب که حاوی اسپور می باشد جهت استخراج DNA مورد استفا ده قرارگرفت. DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت PCR به کار گرفته شد. سپس محصول PCR استخراج شده روی ژل آگارز ٠/٨ ٪ الکتروفورز گردید. نتایج حاصله از انجام PCR نشان داد که ٥ نمونه از ٥٤ نمونه لارو مثبت می باشد.

کلمات کلیدی: *پنی باسیلوس لاروا لاروا*، لوک آمریکایی، زنبور عسل، PCR

مقدمه

بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل یا AFB (American foulbrood)، یک بیماری حاد است که اختصاص به نوزادان زنبور دارد (Hansen and Brodsgaard,1999). عامل این بیماری باکتری گرم مثبت به نام *پنی‌باسیلوس لاروا* تحت گونه *لاروا* می‌باشد و اسپورهایی تولید می کند که بشدت در برابر خشکی، دمای بالا (°C ١٠٠ برای بیش از ١٠ دقیقه)، و نور UV مقاوم هستند. همچنین در تماس با ضد عفونی کننده‌های متداول مانند محلول فرمالدئید ١٠ ٪ برای بیش از ٥ ساعت زنده می‌مانند (Heyndrickx et al.,1996). *پنی باسیلوس لاروا* یک باکتری بی‌هوازی اختیاری است که توانایی تولید اندوسپور بسیار متمایزی را دارد. اطراف اسپور بیشتر باسیلوس‌ها را فقط ٥-٤ لایه احاطه کرده است درحالی‌که در اطراف اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* ٧ لایه محافظت کننده وجود دارد، این اسپورها می‌توانند٥٠- ٣٥ سال زنده بمانند (Bakhiet and Stahly,1985). اسپورها معمولاً لارو زنبور عسل راً در طول ٣٦-٢٤ ساعت اولیه زندگی مورد حمله قرار می‌دهند (Gregorc and Bowen, 1998). لاروهای با سن بیش از ٢ روز نسبت به عفونت مقاوم‌تر هستند ولی در لاروهای خیلی جوان ١٠ اسپور یا کمتر به‌طور موثری سبب بیماری می‌شود (Bailey and Lee, 1962). جوانه زدن اسپورها در pH حدود ٦/٦ و دمای °C ٣٧- ٣٦ تحت شرایط میکرو آئروفیل CO_2 ١٠ - ٥ ٪ رخ می‌دهد. اسپور در روده میانی (pH = ٦/٦) تقریباً یک روز بعد از بلع بوسیله لارو، به

شکل رویشی در می‌آید. سلول‌های رویشی قادر به تکثیر در روده لارو نیستند بنابراین به کمک تاژک‌ها از سطح اپیتلیوم به داخل حفره بدن نفوذ و در همولنف تکثیر می‌یابند، جایی که وضعیت هوازی غلبه دارد. لارو بعلت یک باکتریمی سیستمیک تلف می‌شود (Davidson, 1973). بعد از مرگ، لاروها که به طور معمول سفید رنگ هستند به توده قهوه‌ای تیره تغییر رنگ داده و سپس متلاشی شده و در کف سلول قرار می‌گیرند. 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 and Ball, 1991). علیرغم اهمیت بیماری لوک امریکایی در بین بیماریهای زنبور عسل، روشهای ردیابی سریع و آسان *پنی باسیلوس لاروا* در دسترس نبود. روشهای شناسایی تجاری و مرسوم، زمان بر و بر اساس کشت و متعاقب آن شناسایی بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی ایزوله ها استوار است (Heyndrickx et al.,1996). بیماری لوک آمریکایی یک بیماری مهم در تجارت جهانی است و موجب خسارت‌های بزرگ اقتصادی می‌شود اما در خیلی از موارد با تشخیص زود و سریع می‌توان به کنترل و پیشگیری آن کمک کرد. نظارت بر عسل، لارو و دیگر مواد کندو برای شناسایی اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* در ردیابی اپیدمیهای AFB بسیار پر ارزش می‌باشد . AFB در لیست بیماری‌های عفونی مهم سازمان OIE قرار دارد. این لیست شامل بیماری‌هایی است که قابل انتقال بوده و از اهمیت بالایی برخوردارند و همچنین از نظر بهداشت و سلامت عمومی درکشورهایی که در تجارت جهانی حیوانات و فرآورده های حیوانی فعال هستند با اهمیت می‌باشند (OIE 2013). شناسایی *پنی باسیلوس لاروا* در امر صادرات و واردات فرآورده های کندویی به ویژه عسل، روش با ارزشی در کنترل گسترش AFB بین کشورها می باشد. بنابراین یک روش موثر در ردیابی عامل بیماری‌زا هنگامی که هنوز علائم بیماری ظاهر نشده می‌تواند یک کمک قوی در مبارزه علیه بیماری لوک امریکایی باشد، چون 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 می‌کنند. در تمامی موارد فوق استفاده از روش PCR برای تشخیص و ردیابی عامل این بیماری علاوه بر صرفه جویی در زمان و هزینه می‌تواند بر دقت کار نیز بیفزاید.

مواد و روش کار

نمونه برداری

تعداد ٥٤ نمونه لارو که از زنبورستانهایی که مشکل تلفات نوزادان، ریزش و کاهش در تعداد جمعیت زنبور داشتند، و توسط سازمان دامپزشکی به موسسه رازی بخش تششخیص وتحقیق بیماریهای زنبور عسل کرم ابریشم و حیات وحش ارسال شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

آماده سازی نمونه

دو عدد لارو زنبور عسل از هر نمونه برداشته و در یک میلی لیتر آب مقطر استریل خوب هموژن و در g ٤٨٤ به مدت ٥ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی در g ٦٠٠٠ به مدت ٣٠ دقیقه سانتریفوژ و رسوب آن برای جدا سازی DNA در ١ میلی لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید.(Antunez et al., 2004; Alessro et al., 2007)

استخراج DNA از اسپور

سوسپانسیون حاوی اسپور در ٦٠٠٠ دور به مدت ٣٠ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب در ١ میلی لیتر بافر حاوی 0.1

M DTT و 0.1 M NaOH ; 0.1 M NaCl (pH 10.8) 1% SDS (w/v) ; بـه‌خـوبی مخلـوط و در بـن مـاری ۷۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و هر ۱۰ دقیقه به هـم زده شد. بعد نمونه با ۱ میلی لیتر PBS و سانتریفوژ کـردن شستشو داده شـد و بـه رسـوب ۱۰۰ مـاکرولیتر از محلـول لیزوزیم (بـا غلظـت نهـایی $1/5\ g\ l^{-1}$ در TE) افـزوده و بـه مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه درون انکوبـاتور قـرار گرفـت. سپس ۱۰۰ مـاکرولیتر از محلـول [SDS و Proteinase K] (با غلظت نهـایی ۱ ٪ w/v و $0/2\ g\ l^{-1}$) افـزوده شـد و ۱ ساعت در بن ماری ۵۰ درجه قرار داده شد و پس از خـوب مخلـوط کـردن محلـول فـوق ۱/۲۰ حجـم، محلـول اسـتات آمونیوم سرد (با غلظت نهایی ۲/۵ M) بـه آن افـزوده و بـه مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی با دو حجم اتانول ۱۰۰ ٪ مخلوط و در ۲۰- درجه به مدت یک شب قرار گرفت. رسوب حاصل در ۵۰ ماکرولیتر بافر TE حل شده و به عنوان DNA در PCR به کار گرفته شـد. (Alessro et al., 2007).

انجام PCR

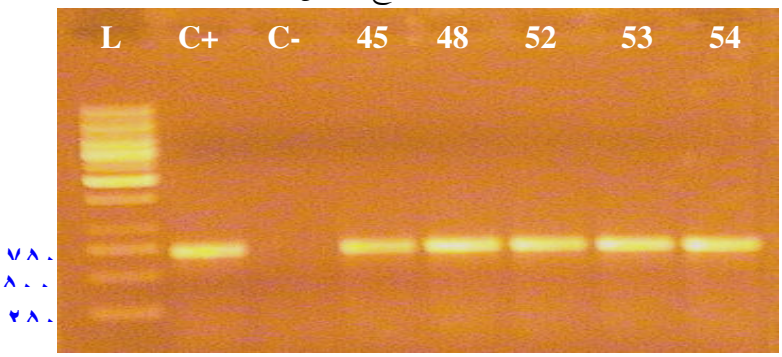
برای انجام PCR از پرایمر های اختصاصی کـه توسـط et Piccini al., 2002 طراحـی شـده بـود اسـتفاده گردیـد. پرایمرها از 16S rDNA طراحـی شـده انـد و یـک قطعـه حدود ۷۰۰ bp را تکثیر می دهند.

F: (5´-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3´)
R: (5´-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3´)

واکنش با یک حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجـام گردیـد 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 پرایمـر، (1U) Taq ، ۲ میکرولیتـر از محلـول ۲۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتـر از DNA اسـتخراج شده و آب مقطـر اسـتفاده گردیـد. PCR در ترموسـایکلر گرادیانت اپندورف بـا شـرایط Initial denaturation بـا دمای ۹۵ درجه به مـدت ۱ دقیقـه و ۳۰ سـیکل بعـدی بـه صـورت Denaturation بـا دمـای ۹۳ درجـه ۱ دقیقـه، Annealing با دمـای ۵۵ درجـه ۳۰ ثانیـه Extending بـا دمای ۷۲ درجه ۱ دقیقه و یک سیکل Final extending با دمـای ۷۲ درجـه ۵ دقیقـه انجـام گردیـد (Piccini et al., 2002). محصول PCR با لودینگ بافر به خوبی مخلـوط و به داخل چاهک هـای ژل آگـارز ۰/۸ درصـد کـه بـه آن اتیـدیوم بروماید اضـافه شـده بـود، الکتروفـورز شـد (Sambrook et al., 1989). تعیـین اختصاصـیت و حساسیت PCR توسط مدیرروستا و همکاران ۱۳۸۹ انجـام گردیده است.

نتایج

از ٥٤ نمونه آزمایش شده ، تعداد ۵ نمونه در PCR مثبت شد. نتایج حاصل در عکس زیر آمده است.



شکل ۱- الکتروفورز نمونه‌های مثبت لارو

بحث

با توجه به موارد آلودگی مشاهده شده به بیماری لوک آمریکایی در زنبورستان‌ها و همچنین هزینه بر بودن و زمان بر بودن تشخیص میکروبیولوژیکی آن، یک روش سریع و دقیق برای ردیابی *پنی باسیلوس لاروا لاروا* مورد نیاز است. PCR امروزه به طور وسیعی برای ردیابی باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گرفته است. برای این منظور، سکانس *16S rDNA* مورد توجه زیادی واقع شده است. محققین در کشورهای مختلف، PCR را برای شناسایی *پنی باسیلوس لاروا لاروا* بطور گسترده به خدمت گرفته‌اند. تاکنون در کشور ما از این روش در شناسایی *پنی باسیلوس لاروا لاروا* استفاده نشده است و تشخیص بر اساس روش های میکروبیولوژی صورت می گیرد. نیاز استفاده از روش-های نوین که علاوه بر صرفه جویی در زمان و هزینه، سریع و دقیق نیز هستند احساس می‌شد. در این تحقیق با مطالعه و در نظر گرفتن کار سایر محققین، اقدام به انجام این کار شده است. در مطالعه‌ای به منظور حساسیت آزمایش PCR در تشخیص آلودگی در لاروها، به صورت تجربی رقت های مختلفی از اسپور تهیه و به لارو سالم و بدون آلودگی به *پنی باسیلوس لاروا لاروا* اضافه و از آنها کشت و کلنی کانت و PCR به عمل آمد، و حساسیت PCR در شناسایی اسپور *پنی باسیلوس لاروا لاروا* در لارو ۲۴۳ cfu/ml تعیین شده است (Modirrousta et al., 2012). یک روش PCR برای ردیابی سریع *پنی باسیلوس لاروا لاروا* از کلنی های رشد کرده بر روی محیط نیمه انتخابی طراحی شد که حساسیت این روش تا ۵۰ cfu/ml بود (Govan et al., 1999). در مطالعه‌ی دیگری *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را با استفاده از PCR ردیابی کنند. حساسیت روش آنها برای اسپور ۳۲ cfu/ml و برای عسل که به صورت تجربی آلوده شده بود ۱۷۰ cfu/ml بود (Piccini et al., 2002).

در تحقیقی دیگر ERIC-PCR طراحی شد که می‌توانست *پنی باسیلوس لاروا لاروا* را در سطح تحت گونه و بطور مستقیم از عسل و لارو شناسایی کند که محدودیت آن تا ۲۸۳ اسپور در گرم عسل بود.(Alippi et al., 2004)در این مطالعه با توجه به هماهنگی‌های به عمل آمده با سازمان دامپزشکی موارد مشکوک به بیماری لوک آمریکایی به بخش تحقیقات زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش ارسال گردید. نمونه ها با روش Modirrousta et al., 2012 ، PCR و از ٥٤ نمونه ارسالی، تعداد ٥ نمونه در PCR مثبت شد. با توجه به حساسیت PCR که cfu/ml ۲٤۳ تعیین شد، در نمونه های مثبت این مطالعه حداقل ۲٤۳ اسپور وجود داشته اند. بنابر این ردیابی حضور اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* در کلنی های زنبور عسل قبل از وقوع علائم کلینیکی AFB ، علاوه بر نوزادان با آنالیز فرآورده های زنبور نیز قابل انجام است. 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 می‌تواند 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 و سایر محققین تکثیر ناحیه ای اختصاصی از ژن *16S rRNA* اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا لاروا* یک تکنیک سریع و قابل اطمینان برای تشخیص AFB در نمونه های عسل، لارو و حتی سایر فرآورده های مر بوط به زنبور بدون نیاز به کشت و یا همراه با کشت برای تشخیص سریع کلنی ها بدون کار برد تست های بیو شیمیایی مورد استفاده قرار

گیرد. با توجه به گستردگی وسیع و قابل ملاحظه اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* در زنبورستان‌های کشور این خطر برای انتقال بیماری AFB از زنبورستانهای مبتلا، به زنبورستان‌های مجاور و نزدیک آنها وجود دارد. تحت نظر گرفتن و ارزیابی از وضعیت AFB در زنبورستان‌های کشور امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به ریسک بسیار بالای بیماری لوک آمریکایی برای زنبور داران و همچنین خسارت اقتصادی آن در سطح ملی، و لزوم تشخیص زود هنگام و سریع آلودگی قبل از بروز علائم بالینی و گسترش اسپورها، PCR تکنیکی بسیار پر ارزش و سریع برای تشخیص آزمایشگاهی این بیماری می‌باشد. ضمناً با استفاده از این روش می‌توان با غربال گری نمونه‌های عسل در مقیاس منطقه ای و ملی به صورت مستمر، آلودگی کندو های زنبورستان‌ها را به اسپورهای عامل این بیماری، نظارت و ردیابی نموده و اقدامات پیشگیرانه و کنترلی را قبل از بروز هر گونه خسارت اجرایی نمود.

References

1. Alessro, B.D., Antunez, K., Piccini, C., and Zunino, P. 2007. DNA extraction PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey bees using spore- decoating freeze-thawing techniques. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 593-597.
2. Alippi, A.M., Lopez, A.C., and 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. Appl. Microbiol. 39: 25-33.
3. Antunez, K.A., Alessro, B.D., Piccini, C., Corbella, E. and Zunino, P. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey, J. Invertebr. Pathol. 86: 56-58.
4. Bailey, L., and Ball, B.V. 1991. Honey Bee Pathology. 2 th ed. Academic Press, London. P: 467.
5. Bailey, L., and Lee, D.C. 1962. *Bacillus larvae*: its cultivation in vitro its growth in vivo. J. Gen. Microbiol. 29: 711-717.
6. Bakhiet, N., and Stahly, D.P. 1985. Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. Appl. Environ. Microbiol. 50: 690-692.
7. Davidson, E.W. 1973. Ultrastructure of AFB disease pathogenesis in larvae of the worker bee, Apis mellifera. J. Invertebr. Pathol. 21: 53-61.
8. Hansen, H., and Brodsgaard, C. 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis control. Bee World. 80: 5-23.
9. Heyndrickx, M., Vemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N., and 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: 270-9.
10. Govan, V.A., Allsopp, M.H., and Davison, S. 1999. A PCR detection method for rapid identification of

11. *Paenibacillus larvae*. Appl. Environ. Microbiol. 65**:** 2243- 2245
12. Gregorc, A., and Bowen, I.D. 1998. Histopathological, 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.
13. Modirrousta, H., Moharrami, M., and Torkaman, M. 2012**.** Development of PCR method for diagnosing of honey bee American Foulbrood disease. Arch. Razi Ins. 67: 1-5.
14. OIE Manual of Diagnostic Tests Vaccines for Terrestrial Animals 2010. Part 2, Section 2.2, Chapter 2.2.2
15. Piccini, C., D'Alessro, B., Antunez, K., and Zunino, P. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* spores in naturally infected bee larvae artificially contaminated honey by PCR.World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 761- 765.
16. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2 th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. P: 312.