



## تعیین حساسیت سویه های پنی باسیلوس لاروه نسبت به اکسی تتراسیکلین، با استفاده از روش انتشار دیسک

مجتبی محرمی\*، حسین مدیر روستا، مریم ترکمن

بخش بیماریهای زنبور عسل، موسسه تحقیقات واکسن سرم سازی رازی، کرج، ایران

دریافت: دی ۱۳۹۴؛ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

پست الکترونیک نویسنده پاسخگو: Mojmoaharami@yahoo.com

### چکیده

پنی باسیلوس لاروه عامل بیماری لوک آمریکایی (American foulbrood) در زنبور عسل، یک باکتری گرم مثبت اسپور دار می باشد. این بیماری، مشکلات اقتصادی قابل توجهی را برای زنبورداران ایجاد می کند. استفاده گسترده از اکسی تتراسیکلین علیه بیماری سبب تجمع باقی مانده دارویی در عسل و سایر محصولات کندو و کاهش کیفیت آنها شده و بازاریابی این محصولات را مشکل می کند. علاوه بر این، مقاومت به اکسی تتراسیکلین در پنی باسیلوس لاروه های جدا شده در بسیاری از کشورها نیز گزارش شده است. در این مطالعه ۲۲ سویه از پنی باسیلوس لاروه های جدا شده از مناطق مختلف، برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که ۷ سویه در برابر آنتی بیوتیک مورد مطالعه حساس و ۱۴ سویه دارای مقاومت متوسط و یک سویه مقاوم بود.

**واژه های کلیدی:** پنی باسیلوس لاروه، لوک آمریکایی، روش انتشار دیسک، اکسی تتراسیکلین

### مقدمه

پنی باسیلوس لاروه عامل بیماریزای لوک آمریکایی، یک بیماری بسیار مسری در نوزادان زنبور عسل، می باشد [۱]. به منظور کاهش خسارت زنبورداران، روش های دارویی به منظور درمان، پیشگیری و کنترل این بیماری ارائه شده است [۲].

استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها از قبیل اکسی تتراسیکلین سبب تجمع باقی مانده دارویی در عسل [۳] و سایر محصولات کندو شده که این امر سبب کاهش کیفیت و بروز مشکلاتی در بازاریابی آنها می شود. علاوه بر تجمع باقی مانده دارویی، مقاومت به آنتی بیوتیک در پنی باسیلوس لاروه های استخراج شده در بسیاری از کشورها ایجاد شده است [۴، ۵].

نگرانی ها در مورد مشکلات ناشی از ایجاد مقاومت میکروبی در حال گسترش است و چشم انداز آینده استفاده از داروهای ضد میکروبی هنوز نامشخص است بنابراین، باید اقداماتی مثل بهینه سازی مصرف آنتی بیوتیک ها در حد مجاز و تولید داروهای جدید شیمیایی یا طبیعی [۶]، می تواند در کنترل بیماری ها موثر باشد. در این مطالعه با هدف تعیین باکتری های مقاوم در برابر اکسی تتراسیکلین، سویه های پنی باسیلوس لاروه های جدا شده از عسل های مناطق مختلف جهت تعیین حساسیت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### مواد و روش ها

این مطالعه بر روی ۲۲ سویه پنی باسیلوس لاروه انجام گرفت (این سویه ها در طی سالیان گذشته از نمونه های عسل ارسالی





سویه مقاوم بود.

### بحث

بیماری لوک آمریکایی یکی از مشکلات اصلی زنبورداران در سراسر جهان است. اسپورهای پنی باسیلوس لاروه بسیار مقاوم بوده و در اجزای داخلی کندو و همچنین تجهیزات به خوبی زنده باقی می ماند.

سویه باکتری	حساسیت به آکسی تتراسیکلین
K <sup>۱</sup>	متوسط
K <sup>۲</sup>	متوسط
K <sup>۳</sup>	متوسط
K.c <sup>۴</sup>	متوسط
D <sup>۵</sup>	متوسط
T <sup>۶</sup>	متوسط
T <sup>۷</sup>	متوسط
T <sup>۸</sup>	متوسط
T <sup>۹</sup>	متوسط
Sh <sup>۱۰</sup>	متوسط
Sh <sup>۱۱</sup>	حساس
Sh <sup>۱۲</sup>	حساس
Sh <sup>۱۳</sup>	حساس
Sh <sup>۱۴</sup>	حساس
Sh <sup>۱۵</sup>	حساس
Sh <sup>۱۶</sup>	حساس
F <sup>۱۷</sup>	متوسط
F <sup>۱۸</sup>	حساس
V <sup>۱۹</sup>	متوسط
L <sup>۲۰</sup>	مقاوم
M <sup>۲۱</sup>	متوسط
Ko <sup>۲۲</sup>	متوسط

K: کرج / K.C: کرج- جاده چالوس / D: دیزین / T: طالقان / Sh: شمیرانات /  
F: فیروزکوه / V: ورامین / L: لرستان / M: مهاباد / Ko: کردستان

سوزاندن کلنی های آلوده یک راه موثر برای کشتن اسپور و قطع سیکل بیماری است، که این مسئله به درستی از طرف غالب زنبورداران، مورد پذیرش قرار نمی گیرد. روش های

به بخش زنبور عسل موسسه رازی جدا سازی و با روش های بیوشیمیایی و مولکولی تایید و در فریزر ذخیره شده اند). دیسک اکسی تتراسیکلین (30mcg per disc) از شرکت پادتن طب تهیه شد.

### تعیین تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار

**دیسک:** روش انتشار دیسک برای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی، عملی ترین روش برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی / مقاومت میکروبی به عوامل ضد میکروبی مختلف است. دقت و تکرارپذیری این آزمون بستگی به حفظ روش های استاندارد دارد. در این روش برای تعیین حساسیت / مقاومت، پنی باسیلوس لاروه های جدا شده نسبت به آکسی تتراسیکلین از محیط کشت MYPGP آگار استفاده شد [۷].

**تعیین مقاومت / حساسیت:** از سویه های پنی باسیلوس لاروه در محیط MYPGP آگار کشت به عمل آمد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $1 \pm 36^{\circ}C$  قرار داده شدند. از باکتری های رشد یافته، سوسپانسیون با غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد (درون لوله های درپوش دار استریل، توسط آب مقطر یا سرم فیزیولوژی استریل). از هر سوسپانسیون باکتریایی، توسط یک سواب پنبه ای، روی محیط MYPGP آگار کشت به عمل آمد. در هر پلیت یک دیسک اکسی تتراسیکلین (۳۰ میکرو گرم) قرار داده شد. پلیت ها در دمای  $1 \pm 36^{\circ}C$  به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. حساسیت به آنتی بیوتیک در هر نمونه با اندازه گیری قطر هاله فاقد رشد در پلیت ها مورد بررسی قرار گرفت [۷].

### نتایج

در این مطالعه، ۲۲ سویه پنی باسیلوس لاروه جدا شده از مناطق مختلف برای تست حساسیت آنتی بیوتیک با استفاده از روش انتشار دیسک مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که ۷ سویه در برابر آنتی بیوتیک مورد مطالعه حساس و ۱۴ سویه دارای مقاومت متوسط و یک





بیوتیکی به روش انتشار دیسک، آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین در برابر ۲۲ سویه پنی باسیلوس لاروه های جدا شده از مناطق مختلف (برای تست حساسیت) مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۴ سویه از ۲۲ سویه دارای مقاومت نسبی و یک سویه در برابر اکسی تتراسیکلین در غلظت (۳۰ میلی گرم / دیسک) مقاوم بود. در واقع اکسی تتراسیکلین بر روی بیش از ۶۰٪ سویه های مورد مطالعه تاثیر کمی داشته و بر علیه یک سویه کاملا غیر فعال بوده است و این بدان معنی است که درمان کلنی های مبتلا به لوک آمریکایی با آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین، حتی فرم رویشی باکتری را نیز به طور کامل از بین نمی برد. بنابر این ادامه مصرف این آنتی بیوتیک در کلنی های زنبور عسل به افزایش روز افزون مقاومت باکتری پنی باسیلوس لاروا منجر خواهد شد. بنابر این لازم است که مطالعات بیشتری در آینده به منظور ارزیابی این آنتی بیوتیک ها در شرایط مزرعه صورت گیرد. باقیمانده ها و آلودگی های ناشی از آنتی بیوتیک ها، آلاینده های صنعتی، سموم، آفت کش ها، کودهای شیمیایی، گازها و آبهای آلوده سلامتی زنبور عسل را به شدت مورد تهدید قرار می دهد. مطالعات میدانی و آزمایشگاهی حاکی از آن است که باکتری های مفید دستگاه گوارش زنبور عسل (باکتری های اسید لاکتیک)، در اثر آنتی بیوتیک ها از بین می روند. باکتری های اسید لاکتیک خود مانع رشد عوامل بیماریزای زنبور عسل از جمله پنی باسیلوس لاروه عامل بیماری لوک آمریکایی می شود [۱۷]. نتایج تحقیقات نشان می دهد که در جمعیت حشرات بین باکتری های همزیست و مقاومت در برابر بیماری هایی که آنها را مورد تهدید قرار می دهد، یک تعادل برقرار است. باکتری های همزیست عامل مقاومت حشرات در برابر بیماری ها محسوب می شوند [۱۸] که با توجه به آنها می توان استراتژی های جدید مبارزه، پیشگیری، کنترل و درمان بیماری های مهم زنبور عسل را طراحی کرد.

ضد عفونی کندو و استفاده از تابش پرتو گاما برای از بین بردن فرم اسپور و رویشی پنی باسیلوس لاروه، قابل توجه هستند. تاثیر درمان شیمیایی با آنتی بیوتیک ها موقتی است و تنها فرم رویشی باکتری را از بین می برد. علاوه بر این، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها سبب تجمع باقی مانده دارویی در محصولات کندو شده و این امر سبب کاهش کیفیت و بروز مشکلاتی در بازاریابی آنها می شود. آزمایشات تعیین مقاومت میکروبی در برابر آنتی بیوتیک ها در اواخر دهه ۱۹۴۰ [۸] آغاز شد. مطالعات اولیه نشان داد که کلر تتراسیکلین علیه پنی باسیلوس لاروا موثر بوده، در حالی که پنی سیلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، و سایر آنتی بیوتیک ها فعالیت ناچیزی علیه پنی باسیلوس لاروه داشتند. اکسی تتراسیکلین (OTC)، از اوایل دهه ۱۹۵۰ برای پیشگیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی و لوک اروپایی استفاده شده است [۸، ۹]. اخیرا، در مورد مقاومت گسترده به اکسی تتراسیکلین در آرژانتین [۱۰] و همچنین در مناطق مختلف در ایالات متحده [۴] نگرانی هایی به وجود آمده است، به همین دلیل آنتی بیوتیک های دیگری مثل تایلوزین و اریترومایسین از گروه ماکرولید به عنوان کنترل و پیشگیری لوک آمریکایی بررسی شده است [۱۱، ۱۲]. ماچو و آ [۱۳] در چکسلواکی سایر آنتی بیوتیک ها را در یک مطالعه سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی ده سویه از پنی باسیلوس لاروه جدا شده از مناطق مختلف مورد آزمایش قرار داد. همچنین در ژاپن تعداد زیادی از سویه های پنی باسیلوس لاروه برای سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی مورد آزمایش قرار گرفتند [۱۴]. مطالعه ال-آو و همکاران [۱۵] نشان داد که ۴ ایزوله پنی باسیلوس لاروه در برابر آنتی بیوتیک های پنی سیلین، دوکسی سیلین، انروفلوکسازین، ریفامپیسین و تایلوزین نسبت به اکسی تتراسیکلین حساس تر بودند. در مطالعه حاضر منطبق با دستورالعمل استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی [۱۶] برای سنجش حساسیت آنتی





(2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria.- Brazilian Journal of Microbiology, 31: 247-256.

7- Dirk C de Graaf et al. (2013) Standard methods for American foulbrood. Journal of Apicultural Research 52(1): (2013).

8- Katznelson H., Arnott J., Bland S.E. (1952) Preliminary report on the treatment of European foulbrood of honey bees with antibiotics, Science Agriculture. 32, 180–184.

9- Gochnauer T.A. (1951) Drugs fight foulbrood diseases in bees, Minn. Home Fm. Sci. 9, 15.

10- Alippi A.M. (2000) Is Terramycin losing its effectiveness against AFB? Bee Biz 27–29.

11- Hitchcock J.D., Moffett J.O., Lockett J.J., Elliott J.R. (1970) Tylosin for control of American foulbrood disease in honey bees, Journal of Economic Entomology. 63, 204–207.

12- Moffett J.O., Hitchcock J.D., Lockett J.J., Elliott J.R. (1970) Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood, Journal of Apicultural Research. 9, 39–44.

13- Machova M. (1970) Variations de la sensibilité aux antibiotiques souches de Bacillus larvae, Bull. Apic. 13, 5–11.

14- Okayama A., Sakogawa T., Nakajima C., Hayama T. (1996) Biological properties and antibiotic susceptibility of Bacillus larvae originated from American foulbrood of honeybee in Japan, Journal of Veterinary Medical Science. 58, 439–441.

15- El-AW et al (2013) An evaluation of the efficiency of different antibiotics for control of the American foulbrood disease of honey bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, February, 27 (27): 493-502.

16- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Second informational supplement – January 2012.

۱۷- محرمی، مجتبی (۱۳۹۲). مقاومت ضد میکروبی و اهمیت آن در بهداشت عمومی. فصل ۱۳، صفحه ۲۱۵–۲۲۱.

18- Kenneth Todar (2012). Todars Online Text book of bacteriology, Bacterial Resistance to antibiotics, university of Wisconsin, Department of bacteriology.

## یافته ترویجی

نتایج مطالعه انجام شده به ما کمک می کند که زنبورداران را از وضعیت موجود آگاه نموده و مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و داروهای شیمیایی را در سطح زنبورستان ها تحت نظارت و کنترل سازمان های اجرایی در آوریم. آگاهی زنبور داران 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 زنبور داران و افزایش صادرات عسل بر جای خواهد گذاشت. از نظر مصرف کننده، فرآورده های زنبور عسل به عنوان یک فرآورده طبیعی با ارزش باید عاری از هر نوع عوامل غیر طبیعی و مصنوعی باشد، بنابراین مصرف اصولی دارو در کندو باید به عنوان یک اصل اساسی و مهم همیشه مورد نظر باشد. در عین حال موضوع انتخاب دارو نیز از اهمیت بسزایی برخوردار بوده و در صلاحیت دامپزشکان است که راهنمایی های لازم را در این خصوص بنمایند.

## منابع

- 1- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen 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: 501-511.
- 2- Shimanuki H., Knox D.A. (1994) Susceptibility of Bacillus larvae to Terramycin, American Bee Journal. 134,125–126.
- 3- Bogdanov S., (2006) Contaminants of bee products - Apidologie, 37: 1-18.
- 4- Miyagi T., Peng C.Y.S., Chuang R.Y., Mussen E.C., Spivak M.S., Doi R.H. (2000) Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen Paenibacillus larvae in the United States, Journal of Invertebrate Pathology. 75, 95–96.
- 5- Evans E., (2003) Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen Paenibacillus larvae.- Journal of Invertebrate Pathology, 83: 56-50.
- 6- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L.,







## Sensitivity of *Paenibacillus larvae* isolates against Oxytetracycline by the disc diffusion method

Moharrami M.\*, Modirrousta H., Torkaman M.

Department of Honey Bee, Silk Worm & Wildlife, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

*Paenibacillus larvae*, a Gram-positive and spore-forming bacterium is responsible for American foulbrood (AFB) disease in bees. AFB is a serious economic problem for beekeepers. The extensive use of antibiotics such as Oxytetracycline (OTC) against AFB have led to the accumulation of residues in honey and other beehive products, decreasing their quality and making their marketing more difficult. Besides residue accumulation, antibiotic resistant isolates of *P. larvae* have been detected in many countries. In this study, in view of the increasing incidence of Antibiotic-resistant bacteria in the world, we tested OTC against 22 isolated of *P. l.* larvae strains from different areas for Antibiotic Susceptibility by the disk diffusion method. Our results introduce evidence that 7 strains was very sensitive, 14 strains intermediate and 1 strain was resistant to OTC.

**Key words:** *Paenibacillus larvae*, American foulbrood disease, Disk diffusion method, Oxytetracycline

