



مروری بر لوک اروپایی: بیماری باکتریایی نوزادان زنبور عسل

ناصر معین فرا^۱، مجتبی محرمی^{۲*}، حسین مدیرروستا^۲

۱. مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، ایران

۲. بخش تشخیص و تحقیق بیماریهای زنبور عسل، گرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن سرم سازی رازی، کرج، ایران

دریافت: دی ۱۳۹۴؛ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

پست الکترونیک نویسنده پاسخگو: Mojmoharami@yahoo.com

چکیده

لوک اروپایی یک بیماری باکتریایی است که لاروهای زنبور عسل را قبل از مرحله بسته شدن درب سلول ها مورد حمله قرار می دهد. در این بیماری، لارو مرده و یا در حال مرگ، به سمت بالا پیچ خورده، به رنگ قهوه ای یا زرد، با قوام شل، و یا خشک و لاستیکی مشاهده می شود. باکتری عامل این بیماری، ملیسو کوکوس پلوتونیوس، توسط لارو زنبور عسل بلعیده شده و در روده لارو برای مواد غذایی داخل بدن لارو رقابت می کند. اگر باکتری در رقابت بر لارو غلبه کند، لارو قبل از بسته شدن درب سلول ها تلف خواهد شد. اگر لارو دارای منابع غذایی کافی باشد زنبور ممکن است تا زمان بلوغ زنده بماند. لوک اروپایی را نباید با لوک آمریکایی اشتباه گرفت. بیماری لوک اروپایی در شرایطی که میزان شهد گیاهی در طبیعت کم است و یا جمعیت زنبوران پرستار برای تغذیه لارو کاهش می یابد بیشتر مشکل ساز می شود. شروع جریان شهد و گرده در اوایل بهار و استفاده از شهد آنها توسط زنبورهای عسل، جمعیت زنبوران پرستار برای تغذیه لارو ها در کلنی ها به سرعت افزایش می یابد. اغلب، هنگامی که نسبت زنبور پرستار به لارو در طول یک فصل پایدار باقی می ماند، علائم بیماری ناپدید می شود. با این حال، این بیماری می تواند در طول یک فصل رخ دهد و گاهی اوقات ممکن است علائم به وضوح مشخص نباشد. در موارد شدید می تواند منجر به نابودی کلنی شود. همچنین، عود سالانه بیماری از قاب ها و تجهیزات آلوده می تواند رخ دهد. باکتری عامل لوک اروپایی اسپور تولید نمی کند، اما قاب های آلوده به باکتری می تواند زنبوران عسل را در سال های بعد دوباره عفونی کنند.

واژه های کلیدی: لوک اروپایی، ملیسو کوکوس پلوتونیوس، زنبور عسل

عامل بیماری:

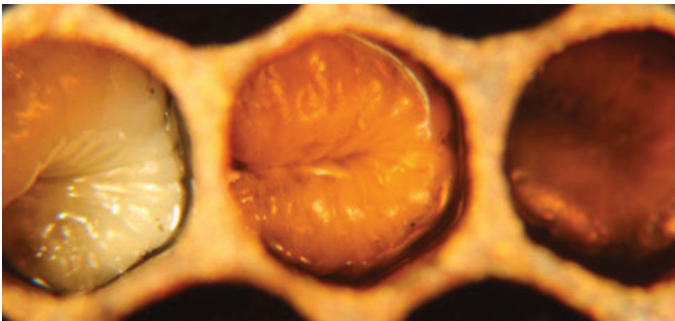
را طبقه بندی کردند و آن را ملیسو کوکوس پلوتون نامیدند. پس از آن با توجه به قوانین، به ملیسو کوکوس پلوتونیوس تغییر نام داد. پلوتونیوس به معنی مربوط به پلوتو و یا عالم مردگان ولی پلوتون به معنی خدای یونانی عالم مردگان است [۳]. باکتری های دیگری در ارتباط با ملیسو کوکوس پلوتونیوس شناسایی شده است که با بیماری لوک اروپایی همراه بوده اند. علت تا حدی به دلیل این واقعیت است که این باکتریها می توانند ملیسو کوکوس پلوتونیوس را بپوشانند و گاهی اوقات به نظر می رسد به بهبود رشد آن در شرایط آزمایشگاه کمک می کنند [۱]. این باکتریهای ثانویه، که با ملیسو کوکوس

لوک اروپایی توسط باکتری ملیسو کوکوس پلوتونیوس ایجاد می شود. باکتری عامل لوک اروپایی را وایت در سال ۱۹۰۸ بطور دقیق شناسایی کرد و آن را باسیلوس Y نامید ولی بعد نام آن را به باسیلوس پلوتون تغییر داد [۱]. پس از آن که ارتباط این باکتری با شروع علائم اثبات شد توسط چندین دانشمند تغییر نام داد. بیلی در سال ۱۹۵۶ باکتری را جدا کرده و بر اساس خصوصیات مورفولوژی آن را استرپتوکوکوس پلوتون نامید. بیلی و کالینز [۲]، بر اساس خصوصیات کشت و شیمیایی باکتری دوباره آن





پرستار، می تواند مرگ لارو و علائم قابل مشاهده را کاهش دهد. با مقادیر کافی از مواد غذایی، لاروها با احتمال بیشتری زنده می مانند [۱]. دلیل این که بروز این بیماری می تواند بطور نامنظم سال به سال یا فصل به فصل تغییر کند، به تعادل نسبت زنبور پرستار به لارو و بنابراین، مقدار مواد غذایی ساخته شده که در دسترس لارو است بستگی دارد.



مراحل تغییر رنگ لاروهای بیمار



شمای قاب حاوی نوزادان مبتلا به بیماری لوک اروپایی

علائم لوک اروپایی

مهم است که لوک اروپایی را با لوک آمریکایی اشتباه نگیریم. این دو بیماری بسیار از هم متفاوت هستند و نیاز به مدیریت و درمان متفاوتی دارند. با این حال هر دو، بیماری باکتریایی نوزادانند. در شکل زیر به عنوان یک مرور کلی تفاوت بین لوک اروپایی و لوک آمریکایی آمده است.

پلوتونیوس همراه هستند عبارتند از: پنی باسیلوس آلویی، آکروموباکتر اویرییدیس و باسیلوس لاترواسپوروس [۴]. این باکتری ها گاهی اوقات همزیست در نظر گرفته می شوند و ممکن است عامل برخی از تفاوتها در بو و ظاهر لارو آلوده باشند [۱]. هنوز در مورد این که برخی از این باکتری ها ممکن است با بعضی از علایم شروع بیماری ارتباط داشته باشند تردید وجود دارد و این موضوع هرگز به وضوح مشخص نشده است [۴].

طبقه بندی باکتری

این باکتری در شاخه Firmicutes، کلاس Bacilli، راسته Lactobacillales، خانواده Enterococcaceae و جنس Melissococcus قرار دارد.

چرخه زندگی لوک اروپایی

لارو زمانی به لوک اروپایی آلوده می شود که مواد غذایی حاوی باکتری ملیسوکوکوس پلوتونیوس توسط نوزادان مصرف شود [۴]. همچنین شواهدی وجود دارد که ممکن است انتقال در اثر گزش مایت وارو آرخ دهد [۵]. در داخل بدن لارو آلوده، جمعیت باکتریایی در مواد غذایی روده میانی و غشاء پری تروفیک روده تمرکز می یابد [۶] جایی که در آن باکتری تکثیر می یابد [۱,۷]. بسته به سطح عفونت، و احتمالاً مقدار مواد غذایی در دسترس، لارو آلوده زنده مانده یا می میرد. میزان و شدت تلفات، به طور مستقیم به مدت یا میزان باکتری که به لارو خورانده شده است ارتباط دارد. لارو های تلف شده به احتمال زیاد با مقدار باکتری تغذیه شده اند [۶]. لاروی که زنده می ماند محتویات روده را تخلیه می کند و تبدیل به شفیره می شود، باکتری های خارج شده روی شان ها می توانند برای سال ها عفونی باشند، اگر چه این باکتری ها اسپور تولید نمی کنند [۸,۱]. لارو های زنده مانده، پس از بلوغ، معمولاً در مقایسه با هم تیان سالم خود وزن پایین تری دارند و با تاخیر به شفیره تبدیل خواهند شد [۹,۶]. لازم به ذکر است افزایش عرضه مواد غذایی از طرف زنبوران





کبریت).

- بو: گوگردی "لانه مرغی"
- فلس‌های داخل سلولی: قهوه‌ای تا سیاه، شکننده
- مرحله نوزادی: پس از بسته شدن درب سلول‌ها
- ظاهر: قهوه‌ای شکلاتی تا سیاه، درپوش سوراخ‌دار

یافته ترویجی

الگوی تخم ریزی لکه‌ای در یک کلنی زنبور عسل (تخم گذاری غیر یکنواخت یا منتشر)، اغلب می‌تواند اولین نشانه از طیف گسترده‌ای از مشکلات، از جمله لوک اروپایی باشد. الگوی تخم ریزی لکه‌ای زمانی می‌تواند رخ دهد که برخی از لاروها در سلول‌های خود در اثربک بیماری می‌میرند، در حالی که دیگران زنده‌اند و درب سلول‌هایشان بسته می‌شود و در نتیجه ظاهر قاب تخم ریزی شده یکنواخت و منظم دیده نمی‌شود. بسیاری از شرایط و موقعیت‌های دیگر نیز می‌تواند منجر به یک الگوی تخم ریزی لکه‌ای شود. برای مثال، یک ملکه همخون زمانی که آلل‌ها در جایگاه جنسی هموزیگوت باشند می‌تواند منجر به الگوی تخم ریزی لکه‌ای تولید شود زیرا در چنین حالتی، نرهای دیپلوئید توسط زنبورهای کارگر مصرف می‌شوند. اگر چه الگوی تخم ریزی لکه‌ای در کندوی مبتلا به لوک اروپایی منحصر به فرد نیست، اما از علائم شایع لوک اروپایی است. در کندوی آلوده به لوک اروپایی، لاروهای مرده یا در حال مرگ، به رنگ زرد و سپس قهوه‌ای در می‌آیند. بوی ترش یا بوی ماهی ممکن است وجود داشته یا نداشته باشد. لوله‌های تراشه در لاروهای مسطح یا متورم شده می‌تواند بیشتر آشکار شود. لارو‌هایی که می‌میرند به سمت بالا پیچ و تاب می‌خورند. در موارد دیگر در سلول خود متلاشی و به صورت توده در هم ریخته در می‌آید. این توده می‌تواند کمی چسبناک باشد [۴]. برای آزمایش چسبناکی بقایا، یک چوب کبریت یا چوب کوچک را به داخل سلول فرو برده و آن را به سمت بیرون بکشید (رشته‌هایی کمتر از ۱/۵ سانتی متر



لوک اروپایی

- محتویات داخل سلول‌ها کمی چسبناک هستند، در صورت آزمایش چوب کبریت، رشته‌هایی کمتر از ۱/۵ سانتی متر ایجاد می‌شود،
- بو: ترش و یا بدون بو
- فلس‌های داخل سلولی: قهوه‌ای تا سیاه، قوام لاستیکی
- مرحله نوزادی: قبل از بسته شدن درب سلول‌ها
- ظاهر: پیچ خورده، زرد تا قهوه‌ای تیره، لوله‌های تراشه اغلب قابل مشاهده



لوک آمریکایی

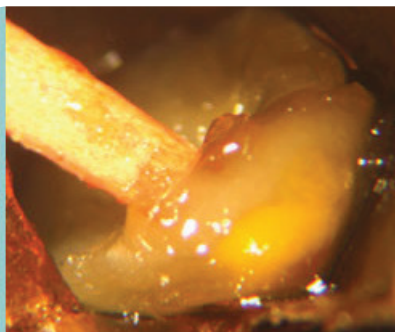
- محتویات داخل سلول‌ها دارای رنگ قهوه‌ای، چسبناک با رشته‌هایی حدود ۲/۵ سانتی متر (در صورت آزمایش چوب





آمریکا، لوک اروپایی در طول بهار و فصل گرده افشانی زغال اخته و قره قاط به شدت مشکل ساز شد. تردیدهایی وجود داشت که تغذیه کم در زمان گرده افشانی در وقوع لوک اروپایی اثر داشته باشد، اما در آزمایشات انجام شده توسط وزارت کشاورزی ایالات متحده این مسئله اثبات نشد [۱۵]. هربرت

و همکاران ۱۹۸۷ گزارش دادند که در سال‌های ۱۹۸۶-۱۹۸۷، لوک اروپایی در نیوجرسی در کلنی‌های آزمایش



نمونه گیری از لاروهای بیمار (تست چوب کبریت منفی است). محتویات چسبندگی ندارند.

شده توسط وزارت کشاورزی

آمریکا یافت نشده است، در حالی که قبل از ۱۹۸۶ این بیماری یک مشکل جدی بود. بیلی در سال ۱۹۸۳ وقوع لوک اروپایی را اینطور توضیح می دهد، "... بیماری در مراحل ابتدایی معمولاً نامشخص باقی می ماند، گاهی اوقات در یک حالت بسیار شدید علائم ظاهر شده، و پس از مدتی غالباً خود به خود ناپدید می شود، به خصوص بعد از نیمه تابستان ...". تامپسون و براوندر سال ۲۰۰۱ نشان می دهند که عود سالانه این بیماری در زنبورستان های آلوده به ویژه در انگلستان مشکل ساز است. در سوئیس، بروز لوک اروپایی در سال های اخیر افزایش یافته است [۱۶]. در این کشور، تکنیک PCR برای تشخیص لوک اروپایی در کلنی های با و یا بدون علائم، استفاده شد [۱۷] و مشخص شد، در زنبورستان هایی که در آنها هم کلنی های بدون علائم بیماری و هم دارای علائم بیماری وجود داشتند، ۹۰٪ از زنبوران عسل بالغ، باکتری را با خود دارند. همچنین ۳۰٪ از کلنی ها در زنبورستان های بدون علائم بیماری، که نزدیک زنبورستان های دارای علائم بیماری مستقر هستند، باکتری را

ایجاد می شود). بقایای لارو پس از مدتی خشک شده و به صورت فلس به کف دیواره سلول می چسبد.

خصوصیات باکتری

شکل ظاهری: کلنی های کوچک، سفید، براق - شکل میکروسکوپی: کوکسی های غیر متحرک، جفت یا زنجیره ای - واکنش به رنگ گرم: مثبت - متابولیسم: بی هوازی - بهترین دمای رشد: ۳۵ درجه سانتی گراد - کاتالاز: منفی - اکسیداز: - سترات: منفی. از نظر تخمیر کربوهیدراتها: گلوکوز +، فروکتوز +، سوکروز و مالتوز متغیر هستند [۱۰].

تایید تشخیص:

تشخیص عفونت با لوک اروپایی باید با بازرسی مشاهده ای از علائم بیماری آغاز شود. پرورش دهنده زنبوری که تجربه با لوک اروپایی را ندارد به احتمال زیاد از تایید تشخیص قبل از اقدام سود خواهد برد. تایید می تواند از طریق حمایت دولتی از برنامه بازرسی زنبورستان ها، یا با استفاده از کیت های تشخیصی ارزان و آسان برای استفاده و یا ارسال نمونه به آزمایشگاه تحقیقات زنبور عسل وزارت کشاورزی برای آزمایش می تواند انجام شود. یک کیت معتبر شده برای استفاده در شرایط میدانی با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال تهیه شده است [۱۱]. روش های دیگر برای تایید لوک اروپایی عبارتند از: ELISA [۱۲]، روش Hemi-nested PCR [۱۳] و روش Real-Time PCR [۱۴, ۷].

وقوع و انتشار

لوک اروپایی در همه قاره ها که در آن زنبور عسل نگهداری می شود رخ می دهد [۴]. در اوایل دهه ۱۹۸۰ در نیوجرسی





و مشخص شد که مقاومتی رخ نداده است [۱۹]. استفاده از ترامایسین در انگلستان تا حد زیادی با آمریکا متفاوت است. استفاده از ترامایسین به عنوان یک روش پیشگیرانه و یا درمانی برای جلوگیری از لوک اروپایی در کلنی‌های بدون علامت، حتی در زنبورستان‌های آلوده، توصیه نمی‌شود [۲۰]. روش امیدوار کننده برای کنترل لوک اروپایی در بریتانیا، شامل اقداماتی از جمله حذف قاب‌های آلوده با استفاده از روش خانه تکانی، همراه با استفاده از آنتی بیوتیک است (روش تلفیقی). روش تلفیقی فوق به نظر می‌رسد علاوه بر کنترل بیماری، از بازگشت مجدد بیماری در سال بعد نیز پیشگیری نماید.

منابع

- 1-Baily, L. (1956). Aetiology of European foulbrood; a disease of larval honeybee. *Nature* 178: 1130.
- 2- Baily, L. and Collins, M. D. (1981). Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Microbiology* 53(2): 215-217.
- 3- Truper, H. G. and de Clari, L. (1998). Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 615.
- 4- Shimanuki, H., Knox, D., and Feldlauer, M. (1992). Honey bee disease interactions: The impact of chalkbrood on other honey bee brood diseases. *American Bee Journal* 132(11): 735-736.
- 5- Kanbar, G., and Engels, W. (2003). Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research* 90: 349-354.
- 6- McKee, B. A., Goodman, R. D., and Hornitzky, M. A. (2004). The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 43(3): 93-100.
- 7- Eva Forsgren, Giles E Budge, Jean-Daniel Charrière and Michael A Z Hornitzky (2013). Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-14.
- 8- Bailey, L. (1981). *Honey Bee Pathology* 124p. Academic Press Inc. (London) LTD.
- 9- Baily, L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology* 2: 67-83.
- 10- <http://www.vetbact.org/vetbact/index.php?artid=180&vbsearchstring=Melissococcus>.
- 11- Tomkies, V, Flint, J., Johnson, G., Ruth, W., Wilkins, S.,

با خود دارند، ولی در زنبورستان‌های دور از زنبورستان‌های دارای علائم بیماری، باکتری ردیابی نشد.

کنترل

گزینه‌های محدودی برای کنترل این بیماری وجود دارد. با این حال، درمان ممکن است همیشه و در همه موارد ضروری نباشد. اگر شرایط تغییر کند در نتیجه بیماری نیز ناپدید می‌شود. تعویض ملکه که با یک وقفه در چرخه نوزادان همراه است مفید خواهد بود [۴]. شواهدی از مقاومت ژنتیکی به بیماری مشاهده شده است [۶,۴] اما هیچ نژاد شناخته شده‌ای که به بیماری مقاوم باشد وجود ندارد. با توجه به حضور باکتری‌ها بر روی شان‌های آلوده، انتقال شان‌ها و تجهیزات سبب آلودگی متقاطع شود. در برخی از کشورها، از بین بردن و یا بهداشت شان‌ها و تجهیزات آلوده مورد توجه است. از سال ۲۰۰۸ در سوئیس، لوک اروپایی به عنوان یک بیماری، که باید در صورت مشاهده شدن اعلان شده و اقدامات بهداشتی در زنبورستان‌ها صورت پذیرد، در آمده است. این اقدامات عبارتند از عدم استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و سوزاندن کلنی‌های آلوده و ضعیف می‌باشند. در یک مطالعه در سوئیس، نشان داده شد که این روند خیلی موثر نبوده است، ۵ تا ۸ زنبورستان علیرغم اقدامات کنترلی و بهداشتی یک سال بعد مجدداً آلوده شدند [۱۴]. با این حال، از بین بردن تجهیزات آلوده ثابت شده که موثر است.

کنترل شیمیایی

در آمریکا، آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین هیدروکلراید با نام تجاری ترامایسین تنها محصول دارای مجوز برای کنترل لوک اروپایی است. ترامایسین برای کنترل لوک آمریکایی نیز استفاده می‌شود، اگرچه شواهدی از مقاومت به این دارو در آمریکا وجود دارد. مطالعه‌ای که نشان دهنده مقاومت لوک اروپایی در برابر ترامایسین باشد در آمریکا یافت نمی‌شود [۱۸]. در یک مطالعه در بریتانیا مقاومت لوک اروپایی در برابر ترامایسین مورد بررسی قرار گرفت





(2005). Distribution of *Melissococcusplutonium* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial Ecology* 50: 369-374.

17- Belloy, L., Imdorf, A., Fries, I., Forsgren, E., Berthoud, H., Kuhn, R., Charriere, J. (2007). Spatial distribution of *Melissococcusplutonium* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* 38: 136-140. Read summary here

18- Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S., and Doi, R. H. (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Pae-nibacillus* larvae in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75(1): 95-96.

19- Waite, R., Jackson, S., and Thompson, H. (2003b). Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcusplutonium*, a pathogen of honeybee larvae. *Letters in Applied Microbiology* 36: 20-24. Read summary here.

20- Thompson, H. M. and Brown, M. A. (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World* 82(3): 130-138. Read summary here.

Danks, C., Watkins, M., Cuthbertson, G., Carpana, E., Mar-ris, G., Budge, G., and Brown, M. (2009). Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie* 40: 63-72.

12- Pinnock, D. E. and Featherstone, N. E. (1984). Detection and quantification of *Melissococcus Pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Apicultural Research* 23(3): 168-170.

13- Djordjevic, S. P., Noone, K., Smith, L., and Hornitzky, M. A. Z. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research* 37(3): 165-174.

14- Roetschi, A., Berthoud, H., Kuhn, R., Imdorf, A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcusplutonium*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie* 39: 362-371. Read summary here.

15- Herbert, E. W., Chitwood, D. J., and Shimanuki, H. (1987). Chalkbrood research at Beltsville. *American Bee Journal* 127: 488-491.

16- Forsgren, E., Lundhagen, A. C., Imdorf, A., and Fries, I.

Overview of European Foulbrood: A Bacterial Disease Affecting Honey Bee Brood

Moeinfar ¹, N., Moharrami ^{*2}, M., Modirrousta ², H.

1. Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Iran

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

European foulbrood is a bacterial disease that effects honey bee larvae before the capped stage. European foulbrood disease is characterized by dead and dying larvae which can appear curled upwards, brown or yellow, melted, and/or dried out and rubbery. The causative bacteria, *Melissococcus plutonium* is ingested by honey bee larvae after which the bacterium competes for food inside the larvae. If the bacteria out-competes the larva, the larva will die before the cell is capped. Alternatively, the bee may survive until adulthood if the larvae has sufficient food resources. European foulbrood should not be confused with American foulbrood (AFB), which is caused by a different bacteria that produces different symptoms and control requirements. European foulbrood disease is considered to be more problematic in situations where forage nectar is sporadic, or other situations that result in fewer nurse bees in colonies to feed larvae. At the onset of nectar flow in early spring, forage recruitment of house bees may increase rapidly resulting in few bees in colonies to feed honey bee larvae. Often, when the nurse bee to larvae ratio stabilizes later in the season, or remains stable throughout a season, symptoms disappear. However, this disease can occur throughout a season and will sometimes not clear up on its own. In severe cases, colony death can occur. Also, yearly reoccurrence of EFB from contaminated combs and equipment can occur. The bacteria that causes EFB does not produce spores, but combs contaminated with the bacteria can still reinfect honey bees in subsequent years.

Key words: European foul brood, *Melissococcus plutonium*, Honey bee

