دو فصلنامه علوم و فنون زنبور عسل، سال هفتم، شماره ۱۱، زمستان ۱۳۹۴(۱۳-۸)

تشخیص سریع عامل بیماری لوک اروپایی (*ملیسوکوکوس پلوتونیوس*) در کلنی های زنبور عسل با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز

مجتبی محرمی[1*]. حسین مدیر روستا[1]. ناصر معین فر[1]. سمانه صدیقی خویدک[2]

۱. بخش تشخیص و تحقیق بیماریهای زنبور عسل، کرم ابریشم و حیات وحش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه ازاد اسلامی اشکذر، یزد؛ ایران

دریافت: خرداد ۱۳۹۴؛ پذیرش: مرداد ۱۳۹۴

پست الکترونیک نویسنده پاسخگو: mojmoharrami@yahoo.com

چکیده

بیماری لوک اروپایی، بیماری نوزادان زنبور عسل می باشد. این بیماری از جمله بیماریهای خطرناک برای کلنی های زنبور عسل محسوب می شود و در اثر باکتری گرم مثبت *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* ایجاد می گردد. این بیماری به صورت گسترده ای در جهان پراکنده است و در برخی از نواحی مشکلات فزآینده ای را ایجاد می نماید. پیشرفت های اخیر در تکنولوژی مولکولار، تشخیص هویت باکتری را بسیار سهل و آسان نموده است و تکنولوژی تشخیص اسیدهای نوکلئیک بسرعت جایگزین روش سنتی میکروبیولوژی شده است. هدف این مطالعه راه اندازی روش واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تشخیص سریع و مطمئن این بیماری در ایران بوده است. از سوی دیگر دخالت عوامل ثانویه باکتریایی موجب شدت و تنوع در بروز علائم بالینی بیماری شده و تشخیص آزمایشگاهی را در مواردی با مشکل مواجه می سازد. بیماری لوک اروپایی در فهرست بیماریهای خطرناک برای بهداشت دامها قرار دارد و در بسیاری از مناطق بیماری بومی بوده و اپیدمی های فصلی ایجاد می کند. با استفاده از سویه باکتری استاندارد و با استفاده از پرایمر های اختصاصی، واکنش زنجیره ای پلیمراز راه اندازی گردید. محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. همچنین با مراجعه به زنبورداریهای مشکوک به این بیماری از ۱۲ زنبورستان لاروهای زنبور عسل جمع آوری گردیدند. نمونه ها همزمان با روش کشت باکتریایی و روش واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد آزمایش قرار گرفتند. از ۱۲ نمونه اخذ شده اززنبورستان های مشکوک، ۸ نمونه در واکنش زنجیره ای پلیمراز مثبت و ۲ نمونه در کشت مثبت شد.

واژه های کلیدی: لوک اروپایی، *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

بیماری لوک اروپایی، بیماری نوزادان زنبور عسل می باشد. این بیماری از جمله بیماریهای خطرناک برای کلنی های زنبور عسل محسوب می شود ولی همانند بیماری لوک آمریکایی اعلام وضعیت خطرناک در مورد وقوع بیماری در همه کشور ها الزامی نیست. این بیماری در اثر باکتری گرم مثبت *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* ایجاد می گردد، و به صورت گسترده ای در جهان پراکنده بوده و در برخی از نواحی مشکلات فزآینده ای را ایجاد می نماید. علیرغم آنکه عامل بیماری از سالیان بسیار دور شناخته شده است ولی هنوز مسائل بنیادی در آسیب شناسی این باکتری بخوبی شناخته نشده است. در بسیاری از مناطق بیماری بومی بوده و اپیدمی های فصلی ایجاد می کند. آزمایشات حدت بیماری بر روی لاروها نشان می دهد که سویه های *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* جمع آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی اروپا از

نظر توانایی ایجاد مرگ و میر در لاروها متفاوت هستند[۱]. تشخیص بالینی لوک اروپایی بر اساس معاینه مشاهده ای نوزادان و لاروهای بیمار انجام می پذیرد. علائم عمومی شامل درپوش نامنظم و تغییر شکل یافته سلول نوزادان، مشاهده پوشش غیر یکنواخت و نامنظم تخم ریزی و لاروها در سطح قاب می باشد. جوانترین لاروها که در اثر این بیماری تلف شده اند کف سلول را پر کرده و بصورت شفاف دیده می شوند. لاروهای مسن که تلف شده اند حالت طبیعی خود را از دست داده و به صورت یکطرفی و چسبیده به دیواره سلول ویا بطرف بیرون سلول کشیده شده اند. رنگ لاروهای عفونی شده تغییر یافته (از رنگ سفید شیری تا رنگ پریده و زرد) و خطوط روی بدن لارو محو شده است. در حالت پیشرفته بیماری، رنگ لارو ها به رنگ قهوه ای و سیاه خاکستری تغییر می یابد، و گاهی یک پوسته سیاه باقی می ماند. نوزادان متلاشی شده، درمقایسه با بیماری لوک آمریکایی از چسبندگی کمتری برخوردار بوده و با انجام تست چوب کبریت، رشته چسبناکی در حدود کمتر از ۲/۵ سانتیمتر از محتویات داخل سلول نوزادان مرده بیرون کشیده می شود. تنها در حالتی که *باسیلوس آلوئی* به عنوان عامل ثانویه در عفونت حاصله دخالت داشته باشد، تست چوب کبریت مثبت خواهد بود (البته نه مثل لوک آمریکایی). جسد متلاشی شده نوزادان مرحله چهارم و پنجم در درون سلول، به صورت یک فلس خشک شده به رنگ قهوه ای تا سیاه در کف سلول و یا چسبیده به دیواره، اما کاملاً سست، قرار دارد. در عفونت مزمن با *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* هیچگونه علائمی از علائم بالینی توضیح داده شده در بالا دیده نمی شود. علائم مشابهی با آنچه گفته شد، در مراحل نهایی بیماری واروا و عمدتاً در اواخر تابستان و پاییز مشاهده می شود[۲]. سیر تکاملی بیماری و علائم کلنیکی لوک اروپایی بسته به نوع عفونت ثانویه مداخله کننده به صورت محسوسی می تواند تفاوت داشته باشد. در کنار *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* عوامل مشابه دیگری مثل *انتروکوکوس فکالیس*، *پنی باسیلوس آلوئی* و *اکروموباکتر اویریدیس* نیز در این بیماری نقش ایفا می نمایند، و به همین دلیل بسته به نوع عفونت ثانویه مداخله کننده سیر تکاملی بیماری و علائم کلینیکی بیماری لوک اروپایی می تواند متفاوت باشد. در بررسیهای آزمایشگاهی نمونه های اخذ شده از شفیره های مرده، عامل اصلی عفونت، همیشه قابل جداسازی نیست. معمولاً *پنی باسیلوس آلوئی* به عنوان ساپروفیت در نوزادان کشته شده در اثر بیماری لوک اروپایی و ویروس ساک برود، رشد و نمو می کند[۳]. *بروی با سیلوسلاتروسپوروس* از دیگر عوامل ثانویه به شمار می آید که به تنهایی پاتوژن نبوده و به عنوان ساپروفیت بر روی نوزادان مرده تکثیر و تزاید می یابد. در اکثر موارد استرپتوکوکوس فکالیس به عنوان یک عامل ثانویه در عفونت لوک اروپایی دخالت داشته و پاتوژنسیته آن بسیار ضعیف است. بوی ترشیدگی ناشی از عفونت لوک اروپایی مربوط به حضور این باکتری می باشد. *استرپتوکرکوس فکالیس* جزء فلور طبیعی داخل کندو نبوده و از محیط بیرون توسط زنبوران به داخل کندو حمل شده است[۴]. غالباً جمعیت های بیمار و یا ضعیف هدف اصلی زنبوران غارت گر بوده و از این طریق عوامل عفونی به راحتی به سایر کندوها منتقل می شود. بالعکس ورود تصادفی زنبوران پروازی به داخل کندوهای بیمار از اهمیت کمتری در اشاعه بیماری برخوردار می باشد. تعویض قابها از کندویی به کندوی دیگر نیز از عوامل مهم اشاعه بیماری محسوب می شود. با توجه به مقاومت ضعیف اسپورهای *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* ، انتقال بیماری از طریق جابجایی جعبه های کندو و وسایل زنبورداری در مقایسه با لوک آمریکایی کمتر اتفاق می افتد. عامل بیماری در کف کندو و بر روی قابها زنده مانده و احتمالاً توسط ملکه قابل انتقال می باشد. *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* باکتری، گرم مثبت، غیرمتحرک، بدون اسپور، سخت رشد و بی هوازی یا میکروآئروفیل است و نسبت به اکثر تست های افتراقی بیوشیمیایی بدون واکنش می باشد و شناسایی و تایید آن بسیار مشکل است. اگر چه عامل این بیماری تقریباً یک قرن پیش توضیح داده شده ولی بسیاری از جنبه های اساسی پاتوژنز آن هنوز ناشناخته مانده است. علائم بالینی بیماری لوک اروپایی ممکن است با بیماریهای دیگر اشتباه شود یا اینکه غیر عادی بودن لاروها تشخیص را مشکل کند.عامل این بیماری سالهای طولانی داخل کندو باقی می

ماند و در شرایط مساعد لاروها را مورد هجوم قرار می دهند. مطالعات قبلی که با روشهای مبتنی بر کشت انجام می شدند با موانع زیادی روبرو بوده اند. علاوه بر عامل اصلی عوامل ثانویه نیز لاروها را مورد تهاجم قرار داده و جداسازی عامل اصلی را با مشکل مواجه می نماید. ضمن آنکه جداسازی عامل اصلی نیز چندان آسان نبوده و بسیار زمان بر است. محیط های انتخابی برای کشت *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* وجود دارد اما شواهدی وجود دارد که باکتری های جدا شده از نواحی مختلف پاسخ متفاوتی به کشت می دهند و این مسئله جداسازی از طریق کشت را مشکل می سازد. پیشرفت های اخیر در تکنولوژی مولکولار، تشخیص هویت باکتری را بسیار سهل و آسان نموده است و تکنولوژی تشخیص اسیدهای نوکلئیک بسرعت جایگزین روش سنتی میکروبیولوژی شده است. از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز بطور موفقیت آمیزی برای شناسایی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* از سال ۱۹۹۰ استفاده شده است[۵]. در این مطالعه هر دو روش کشت و روش واکنش زنجیره ای پلیمراز در تشخیص عامل بیماری از نمونه های مرضی استفاده شده است و نتایج با یکدیگر مقایسه گردیده است.

روش کار

نمونه برداری: با هماهنگی سازمان دامپزشکی از ۱۲ زنبورستان که مشکل تلفات نوزادان زنبور داشتند، از لاروهای بیمار و تلف شده نمونه هایی درون ظروف استریل جمع آوری و به بخش تحقیقات زنبور عسل موسسه رازی ارسال گردید.

آماده سازی نمونه برای انجام کشت: از لاروهای بیمار بوسیله آب مقطر استریل سوسپانسیون تهیه گردید و از محتویات بدن آنها روی محیط کشت اختصاصی، کشت داده شد[۶].

آماده سازی نمونه برای انجام روش واکنش زنجیره ای پلیمراز: هر لارو در یک محیط مایع مغذی (Bailey broth) به مدت یک شب در دمای ۳۰ درجه و جار بی هوازی ۱۰ ٪ CO_2 قرار می گرفت. ۲ میلی لیتر از هر نمونه به مدت ۲ دقیقه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ می شد. مایع رویی را برداشته و به مدت ۵ دقیقه درg۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ می گردید. به رسوب ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده از محلول فوق برای جداسازی DNA استفاده می گردید[۶].

کشت نمونه ها: نمونه های آماده شده را روی محیط MEDIUM 100 و یا BASAL MEDIUM کشت داده و درون جار بی هوازی حاوی ۱۰-۵ ٪ CO_2 قرار داده می شد و به مدت ۷-۴ روز در انکوباتور ۳۵ درجه قرار می گرفتند[۷].

جداسازی DNA: از باکتری رشد یافته جدا سازی DNA به عمل آمد. این مرحله با استفاده از High Pure PCR Template Preparation Kit (کمپانی Roche) و طبق دستورالعمل کیت انجام گردید.

پرایمر: از ژن 16S rRNA انتخاب شده است و یک قطعه 486 bp را تکثیر می دهد.

’REV 5’-ATCATCTGTCCCACCTTA-3

و

’3-FOR 5’-CTTTGAACGCCTTAGAGA

[۶]

واکنش زنجیره ای پلیمراز: این مرحله با استفاده از High Fidelity PCR Master Kit (کمپانی Roche) و طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. برنامه استفاده شده بصورت یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۲ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه ، ۶۱ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود[۶].

الکتروفورز: وزن مولکولی محصول PCR روی ژل آگارز ۱ ٪ که به آن اتیدیوم بروماید اضافه شده بود تعیین شد. از 100 bpDNA marker استفاده گردید و روی دستگاه UV- Transilluminator باندها مشاهده و سپس از ژل عکس گرفته شد[۸].

نتایج

نتایج حاصل از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز و کشت نمونه ها از ۱۲ زنبورستان، در جدول زیر آمده است. از ۱۲ نمونه تعداد ۸ نمونه در روش واکنش زنجیره ای پلیمراز مثبت بودند. از این ۸ نمونه ۲ نمونه در کشت نیز مثبت شدند.

بحث

لوک اروپایی بیماری نوزادان زنبور عسل بوده و در غالب کشور های تولید کننده عسل مشاهده می شود. البته تظاهرات این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است. در سوئیس وقوع بیماری لوک اروپایی از اواخر سال ۱۹۹۰ بصورت خطرناکی رو به افزایش گذارده است. در انگلیس عمده ترین بیماری شایع در کلنی های زنبور عسل بیماری لوک اروپایی است. در نروژ یک اپیدمی منطقه ای، در سال ۲۰۱۰ گزارش گردید. این اپیدمی پس از حدود ۳۰ سال در این منطقه رخ داد. از لحاظ جغرافیایی به نظر می رسد که این بیماری بشدت در نوسان است. در برخی از مناطق تقریباً بدون خسارت بوده و در برخی از مناطق بطور فزآینده ای خسارت بار می باشد[۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲]، روشهای متفاوتی برای شناسایی و تشخیص عامل بیماری استفاده شده است. این روشها شامل مشاهده میکروسکوپیک لامهای رنگ آمیزی شده از نوزادان بیمار[۱۳]، کشت باکتری از نوزادان بیمار یا نمونه های عسل[۱۴]، میکروسکوپ الکترونی[۱۵] و الایزا[۱۶] می باشند. روش الایزای غیر مستقیم به عنوان یک روش متداول در تشخیص سرولوژیک همواره مورد استفاده قرار می گیرد. روشهای کشت و سرولوژی، میکروسکوپ الکترونی و تهیه لام از مواد مشکوک بسیار زمانبر و غالباً غیر حساس برای چنین اهدافی هستند. تشخیص آزمایشگاهی لوک اروپایی در کلنی های زنبور عسل (فرآورده ها یا زنبوران) بسیار مشکل است. از جمله دلایل این موضوع می توان به سخت رشد بودن *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*، شرایط خاص رشد و محیط کشت، غیر حساس بودن اکثر تکنیک های موجود و در دسترس اشاره کرد[۱۴، ۱۵، ۱۶]. عامل بیماری اولین بار توسط بیلی در سال ۱۹۵۷ از لاروهای بیمار کشت داده شد. پس از مدتی به محیط کشت نالیدیکسیک اسید اضافه شد که مانع رشد باکتریهای ثانویه از جمله پنی باسیلوس آلوئی می شود[۱۴]. عامل بیماری در تمامی بافت های زنبوران بالغ، گرده، لاروها و عسل کلنی های آلوده حضور دارند. این موضوع نشان دهنده این است که زنبوران بالغ و فرآورده های کندو و همچنین لارو های بیمار منبع عفونت هستند. آقای هورنیتسکی و اسمیت در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که ۲۷ نمونه از ۴۳۴ نمونه بالک عسل از منطقه شرق استرالیا آلوده به *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* بودند (۶/۲ ٪). لارو های عفونی شده و بیمار ممکن است به دلیل رشد باکتریهای ثانویه در آنها، حاوی تعداد اندکی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* باشند. کشت این باکتری، روشی غیر حساس برای نمونه هایی که دارای تعداد کمی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*هستند، می باشد[۱۷]. نقش هر کدام از این عوامل ثانویه در ایجاد بیماری به تنهایی محل بحث است، به طوری که در بررسی های آزمایشگاهی در کنار *ملیسوکوکوس پلوتونیوس*، *اکروموباکتر اویریدیس* نیز جدا شده است و تنها در موارد معدودی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* به تنهایی حضور داشته است. پنی باسیلوس آلوئی به تنهایی بیماریزا نیست ولی پس از شروع بیماری، به عنوان عامل ثانویه در شفیره های عفونی شده تکثیر یافته و از آنها قابل جداسازی می باشد. در کلنی هایی که مبتلا به بیماری لوک اروپایی شده اند، می توان *پنی باسیلوس آلوئی* را در اکثر موارد از شفیره های سربسته جدا کرد. به هر حال به نظر می رسد که این باکتریها در تسریع روند بیماری نیز نقش مهمی داشته باشند[۵]. اگرچه حضور *پنی باسیلوس آلوئیو انتروکوکوس فکالیس* بعنوان شواهدی از بیماری لوک اروپایی مورد توجه قرار گرفته است ولی در مورد نقش این باکتریها در گسترش بیماری لوک اروپایی تحقیقات کمی انجام شده است. القاء علائم بیماری لوک اروپایی در لاروها به راحتی با تزریق *ملیسوکوکوس* همراه با *آکرومو باکتر اویریدیس* یا *پنی باسیلوس آلوئی* قابل مشاهده است[۱۷]. روش واکنش زنجیره ای پلیمراز امروزه به طور وسیعی توسط محققین در کشورهای مختلف برای ردیابی باکتری های بیماریزا مورد استفاده قرار گرفته است. برای این منظور، سکانس 16S rDNA مورد توجه زیادی واقع شده است. در مطالعه انجام شده با استفاده از سویه استاندارد و پرایمر های اختصاصی روش واکنش زنجیره ای پلیمراز راه اندازی گردید و محصول روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با وزن bp ۴۸۶ پس از الکتروفورز مشاهده گردید. نتایج حاصل از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز نمونه های جمع آوری شده از ۱۲ زنبورستان مشکوک به ابتلا به بیماری لوک اروپایی نشان داد که ۸

نمونه مثبت و چهار نمونه منفی بودند در حالیکه نتایج حاصل از کشت نشان داد که تنها ۲ نمونه مثبت بودند. این نتایج حاکی از آن است که روش واکنش زنجیره ای پلیمراز سریعتر، دقیقتر و نتایج قابل اعتمادتری را به دنبال دارد. هدف این مطالعه نیز طراحی و راه اندازی روشی است که بسیار حساستر و اختصاصی تر در تشخیص *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* در لارو یا سایر نمونه ها از جمله عسل، گرده و بافت های زنبوران بالغ باشد. مهمترین مشکل در ارتباط با تشخیص آزمایشگاهی نمونه ها، غلظت نسبتاً کم این باکتری و همچنین حضور سایر پنی باسیلوسها و یا باسیلوسها و عوامل ثانویه در نمونه می باشد که نسبت به *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* سریعتر رشد می کنند و مانع رشد کلنی ها می باشند. روش های مبتنی بر روش واکنش زنجیره ای پلیمراز با حل این مشکل تحول بزرگی در تشخیص عامل بیماری لوک اروپایی ایفا نموده اند. روش Hemi Nested PCR نشان داد که ۵۵ نمونه از ۸۰ نمونه بالک عسل (۶۸/۸٪) از منطقه شرق استرالیا حاوی *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* بودند، در حالیکه با روش کشت تنها از ۲۲ نمونه (۲۷/۵٪) عامل بیماری جدا سازی شد[۱۶].

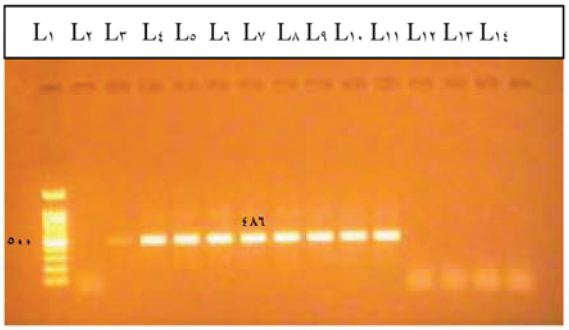
جدول ۱. نتایج حاصل از کشت و روش واکنش زنجیره ای پلیمراز نمونه ها

شماره نمونه	نتایج PCR	نتایج کشت
۱	+	+
۲	+	+
۳	+	–
۴	+	–
۵	+	–
۶	+	–
۷	+	–
۸	+	–
۹	–	–
۱۰	–	–
۱۱	–	–
۱۲	–	–
	۸	۲

تشخیص *ملیسوکوکوسپلوتونیوس* در لاروها، زنبوران بالغ، گرده و عسل در کلنی های سالم و بیمار با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز امکان یک تشخیص حساس و اختصاصی را به منظورمونیتورینگ بیماری، مطالعات اپیدمیولوژیک، بررسی میزان پراکندگی عفونت های پنهان در مناطق مختلف و از جمله مناطقی که آلودگی به تازگی وارد آن مناطق شده است را فراهم می نماید.

شکل ۱: نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگارز

نمونه ها: L_4 - L_{15}، کنترل مثبت: L_3، کنترل منفی: L_2، مارکر L_1: 100bp



منابع

1- Charriere J-D., Kilchenmann V., Roetschi A., (2011). Virulence of different *Melissococcus plutonius* strains on larvae tested by an in vitro larval test; In Proceedings of the 42nd International Apicultural Congress, Buenos Aires 2011: p 158.

2- Ritter W., (1996). Diagnostik und Bekaempfung der Bienenkrankheitem. P 93-95.

3- Bailey L., FERNANDO E.F.W., and STANLEY B.H. (1973). *Streptococcusfaecalis, Bacillus alvei*, and sacbrood virus in European foulbrood of the honey bee. J. Invertebrate Pathol. 22: 450-453.

4- Mundt J.O., (1976). Streptococci in dried and frozen foods. Journal of Milk and Food Technology 39: 413–416.

5- Forsgren E., (2010). European foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 103(Suppl. 1): S5-S9.

6- OIE TERRESTRIAL MANUAL (2010). Chapter 2.2.3.

7- The COLOSS bee book: (2013). Chapter EFU. P 1-14.

8- Sambrook J., FRITSCH E.F., MANIATIS T., (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p 5.4-5.13

9- Wilkins S., Brown M.A., Cuthbertson A.G.S., (2007). The incidence of honey bee pests and diseases in

14- Hornitzky M.A.Z., Smith L., (1999). The sensitivity of Australian *Melissococcus pluton* isolates to oxytetracycline hydrochloride. Australian Journal of Experimental Agriculture 39(7): 881-883.

15- Aliippi A.M. (1991). A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina, J. Apic. Res. 30: 75–80.

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

17- McKEE B.A., DJORDJEVIC S.P., GOODMAN R.D., HORNITZKY M.A., (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bee (Apis Mellifera) and their product using a hemi-nested PCR. Apidology , 34: 19-27.

18- BAILEY L., (1957). The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on "*Bacterium eurydice*". Journal of General Microbiology 17(2): 39-48.

England and Wales. Pest Management Science 63: 1062-1068.

10- Dahle B., SØRUM H., WEIDEMANN J.E., (2011). European foulbrood in Norway: How to deal with a major outbreak after 30 years absence. In Proceedings of the COLOSS Workshop: The future of brood disease research – guidelines, methods and development, Copenhagen, Denmark, 10-12 April, 2011, p 8.

11- Grangier V., (2011). Early detection of European foulbrood using real-time PCR. PhD thesis, Vetsuisse faculty, University of Bern, Switzerland.

12- Arai R., Tominaga. K., WU M., OKURA M., ITO K., OKAMURA N., ONISHI H., OSAKI M., SUGIMURA Y., YOSHIYAMA M., TAKAMATSU D., (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honey bee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PLOS ONE 7(3): e33708.

13- Hornitzky, M A Z; Wilson; S (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases. Journal of Apicultural Research, 28: 191-195.

Rapid detection of Melissococcus Plotinus the agent of European foulbrood in honey bee colonies by PCR

[1]Mojtaba Moharami, [1] Hossein Modirrousta, [1] Nasser moeinfar, [2]Samaneh seddighi Khavidak
1. Razi vaccine and Serum Research Institute
2. Department of Biology, Ashkezar branch, Islamic Azad University,Yazd
mojmoharrami@yahoo.com

Abstract
European foul brood, is a honey bee larvae disease. EFB is a dangerous disease of the bee colonies that considered to be caused by Gram-positive Melissococcus plutonius. The disease is widely distributed in the world and has created a growing problem in some areas. Because of recent advances in molecular technology, identification of bacteria is very easy and nucleic acid detection technology is rapidly replacing traditional methods of microbiology. European foul brood, is located in the list of dangerous diseases for the health of animals. The disease is endemic in many parts of areas and provide seasonal epidemic. The scenario of this disease varies in different countries. In this study with standard strain, PCR was developed by specific primers. PCR products electrophpresed on 1 % agarose gel. Larval samples using culture and PCR methode, were tested simultaneously.Eightsamples werepositive by PCRand2 sampleswere positiveby culture.

Key word: European foul brood, *Melisssococcus plutonius*, PCR