دانشگاه ارومیه

دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی ۹۱-۱۳۹۰ **شماره پایان نامه : ۴۶۲-۲ک**

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته باکتری شناسی

عنوان

مقایسه روش‌های کشت باکتریایی و PCR در تشخیص بیماری لوک آمریکایی و اروپایی

سرکار خانم دکتر ملاحت احمدی، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

استاد راهنما و رئیس هیأت داوران

جناب آقای دکتر حبیب دستمالچی ساعی، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

استاد مشاور

جناب آقای دکتر کریم مردانی، دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

داور خارجی

جناب آقای دکتر نوروز دلیرژ، استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

داور داخلی

تنظیم و نگارش: صبا الماسی چگنی

مهرماه ۱۳۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

پدرم و مادرم

و تمام آنها که به من آموختند

با تشکر از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر ملاحت احمدی که در مدت تحصیلم از ایشان درس علم و بزرگی و محبت آموختم

و با تشکر از جناب آقای دکتر حبیب دستاچی ساعی که زحمت استادمشاور این پایان نامه را به عهده گرفتند.

از زحمات بی دریغ جناب آقای مهندس کاظم نیاکمال تشکر و قدردانی را دارم.

با تشکر و سپاس فراوان از همکلاسی های خوبم (سعیده علی اسعدی، جلال کاظمی، حیدر رحیمی، بهزاد شفیعی، سید شهرام حسینی، حمید فکور و حامد سلامی) که در گذر این دو سال با خلوص نیت یاری ام داده و همواره مرا مورد لطف و محبت خود قرار دادند.

چکیده فارسی: پایان نامه شماره۴۶۲-۲-ک کارشناسی ارشد باکتری شناسی دانشگاه ارومیه

سال تحصیلی: ۱۳۹۰-۱۳۹۱

نگارنده: صبا الماسی

عنوان: مقایسه روش‌های کشت باکتریایی و PCR در تشخیص بیماری لوک آمریکایی و اروپایی

لوک آمریکایی و لوک اروپایی دو بیماری باکتریایی مهم در زنبور عسل بوده که انتشار جهانی داشته و عامل بالقوه کشنده لاروهای زنبور عسل در کلنی‌های آلوده هستند. عامل هر دو بیماری دیر رشد و سخت رشد بوده و تشخیص با استفاده از روش‌های کشت و کیت‌های تشخیصی بیوشیمیایی به حدود دو هفته زمان نیاز دارد.

هدف از مطالعه حاضر مقایسه روش‌های کشت باکتریایی و PCR در تشخیص دو بیماری لوک آمریکایی و لوک اروپایی است

در مطالعه حاضر لاروهای دارای علائم بیماری ابتدا توسط کشت میکروبی و سپس توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن 16S rRNA از لحاظ وجود بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت تعداد موارد مثبت به دست آمده توسط کشت میکروبی و روش PCR با یکدیگر مقایسه شدند.

تعداد نمونه‌های مثبت به دست آمده از لحاظ آلودگی به *پنی باسیلوس لاروا* توسط کشت میکروبی ۱۰٪ و تعداد نمونه‌های مثبت با استفاده از روش PCR ۱۳/۳٪ بود. تمام نمونه‌های مورد آزمایش هم در کشت میکروبی و هم در روش PCR از لحاظ آلودگی به *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* منفی بودند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PCR می‌تواند برای گونه *پنی باسیلوس* بسیار اختصاصی باشد اما برای تشخیص ملیسوکوکوس پلوتونیوس بهبود روش‌های تشخیصی پیشنهاد می‌شود. بنابراین این روش می‌تواند باعث بهبود روش‌های تشخیصی و جایگزین شدن با روش‌های سنتی کشت شود.

کلید واژه: زنبور عسل، لوک آمریکایی، لوک اروپایی، PCR

فهرست

مقدمه ۱

کلیات ۳

لوک آمریکایی ۳

اپیدمیولوژی پنی *باسیلوس لاروا* ۶

ژنوتیپ و ویرولانس ۶

ویرولانس و انتقال ۷

انتشار در بین کلنی‌ها ۸

پاتوژنز لوک آمریکایی ۸

تشخیص درمانگاهی (علائم کلینیکی) ۹

جمع آوری نمونه و انجام اقدامات آزمایشگاهی ۱۰

تشخیص آزمایشگاهی ۱۱

روش‌های میکروبیولوژی ۱۲

تست‌های تشخیصی معمول ۱۵

کنترل و درمان لوک آمریکایی ۱۶

روش‌های فیزیکی ۱۶

روش‌های شیمیایی ۱۶

لوک اروپایی ۱۹

اپیدمیولوژی ۲۰

اتیولوژی ۲۰

مهاجم‌های ثانویه ۲۰

بیماریزایی ۲۲

مقاومت و روش انتقال ۲۳

جداسازی و تشخیص ۲۴

تشخیص آزمایشگاهی ۲۴

پیشگیری و کنترل ۲۶

مواد و روش کار ۲۸

وسایل و مواد مصرفی برای کشت و جداسازی باکتری‌ها ۲۸

وسایل و مواد مصرفی برای استخراج DNA ۲۸
محلولها و مواد مصرفی برای استخراج DNA ۲۹
وسایل و مواد مصرفی برای انجام PCR ۲۹
وسایل و مواد مصرفی برای الکتروفورز ۲۹
روش تهیه‌ی محلول‌ها و مواد مصرفی ۳۰
روش نمونه‌برداری ۳۰
جمع آوری نمونه ۳۰
کشت باکتریایی ۳۰
آزمایشات مولکولی ۳۲
استخراج DNA از کشت باکتریایی ۳۲
استخراج مستقیم DNA از لارو ۳۲
تشخیص مولکولی پنی *باسیلوس لاروا* و *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA ۳۳
الکتروفورز محصولات PCR ۳۴
روش تهیه‌ی ژل آگارز ۳۴
انتقال محصولات PCR به چاهک‌های ژل ۳۵
تجزیه و تحلیل آماری ۳۵
نتایج ۳۷
نتایج حاصل از کشت میکروبی ۳۷
نتایج حاصل از آزمایش PCR به منظور تشخیص پنی *باسیلوس لاروا* و *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* ۳۷
بحث و نتیجه گیری ۳۹
پیشنهادات ۴۲
منابع فارسی ۴۳
منابع انگلیسی ۴۳

مقدمه

پرورش زنبور عسل یکی از کارهای پر فایده و کم خرج می‌باشد که از قدیم الایام در روستاهای ایران مرسوم بوده و هم اکنون نیز در بسیاری از نقاط کشور رواج دارد و قدمت آن را از زمان سومریان و بابلیان دانسته اند. با توجه به شرایط اقلیمی ایران که دارای ۹۰ میلیون هکتار مرتع و ۲۰ میلیون هکتار جنگل و ۱۷ میلیون هکتار باغات میباشد، این کشور دارای استعداد نهفته ای برای توسعه و پیشرفت در این زمینه می‌باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی خاصی که می‌تواند زنبورداری در کشور ما داشته باشد و نقشی که تولیدات زنبور عسل در مصارف غذایی، شیمیایی، دارویی و گرده افشانی دارد، این حرفه می‌بایستی مورد توجه و حمایت بیشتر قرار گیرد. بنابراین آگاهی از بیماری‌های زنبور عسل و تشخیص به موقع آن به خصوص در شرایط داشتن وسعت زیاد و مرزهای طولانی با همسایگان کشورمان و همجواری زنبورستان‌ها در حاشیه مرزها امری ضروری می‌نماید. با پیشرفت پرورش زنبورعسل در اروپا و امریکا و با ورود کندوهای مدرن و ملکه‌های هیبرید به کشور (۱۳۳۵ به بعد) علاقه مندانی در نقاط عسل خیز کشور به ایجاد واحدهای بزرگ صنعتی پرورش زنبورعسل روی آوردند. امار سالهای اخیر نشان میدهد که کندوهای بومی کم شده و جای خود را به کندوهای مدرن داده است. درحال حاضر زنبورداری در کلیه مناطق ایران جز مناطق کویری کشور گسترش پیدا کرده است.

همان طور که اکثر حیوانات دچار بیماری‌های مختلف می‌شوند، زنبور عسل نیز دارای بیماریها، افات و دشمنانی است که موجب مرگ و میر فراوان در مراحل مختلف از دوران نوزادی تا بلوغ انها می‌شود. دانش ما در زمینه بیماریهای زنبور عسل به طور محسوسی با پیشرفت علم افزایش یافته و عوامل اجتماعی، محیطی و ژنتیکی که در سلامتی زنبوران موثرند بهتر شناخته شده اند و میکروارگانیسم‌هایی که موجب بیماری‌های زنبور عسل می‌شوند مورد شناسایی قرار گرفته اند.

بطور کلی بیماری‌ها و مشکلات زنبور عسل ناشی از سه عامل عمده می‌باشد که این عوامل عبارتند از: عوامل عفونی، آفات و غارتگران زنبور عسل، بیماری‌های ناشی از عوامل غیر عفونی مانند عوامل تغذیه‌ای ژنتیکی و مسمومیت‌ها و سایر اختلالات.

از چهار گروه باکتری‌ها که در حشرات ایجاد بیماری می‌کند دو گروه آن در زنبور عسل آلودگی به وجود می‌آورند. گروه اول سبب بیماری لوک آمریکایی و گروه دوم سبب بیماری لوک اروپایی می‌گردد. لوک آمریکایی یکی از خطرناک ترین و مهم ترین بیماری‌های نوزادان زنبور عسل است. این بیماری کلنی‌های زنبوران عسل را کشته و به راحتی از کلنی‌های بیمار به کلنی‌های سالم منتقل می‌شود و به علاوه وجود اسپور به مدت زیادی در قسمت‌های مختلف کندو باقی مانده و خسارات زیادی به بار می‌آورد. لوک آمریکایی[1] لاروهای زنبور عسل *آپیس*

[1]- American foulbrood

ملی فرا[1] را مبتلا می‌نماید و عامل آن *پنی باسیلوس لاروا*[1] می‌باشد. لوک اروپایی[2] نیز موجب مرگ و میر لاروهای جوان زنبور عسل (۵-۴ روزه) می‌شود. این بیماری نیز همانند لوک آمریکایی انتشار جهانی داشته ولی در اکثر نقاط اهمیت آن کمتر از لوک آمریکایی است. عامل بیماری *ملیسوکوکوس پلوتون*[3] نام دارد. در حال حاضر برای تشخیص دو عامل بیماری از کشت میکروبی روی محیط‌های اختصاصی و تشخیص نهایی بر مبنای تست‌های تفریقی استفاده می‌شود.

کنترل و پیشگیری دو بیماری لوک آمریکایی و اروپایی خصوصا لوک آمریکایی مشکل است زیرا نه تنها فرم اسپور باکتری به مدت خیلی طولانی در محیط زنده مانده و تحت شرایط سخت نیز حیات خود را حفظ می‌کند، بلکه تنها تعداد ۱۰ اسپور برای ایجاد بیماری در یک لارو جوان کافی است. PCR یک متد دقیق، سریع و به صرفه است که می‌تواند در تشخیص و در نتیجه در پیشگیری بیماری بسیار کمک کننده باشد و جایگزین روش زمانبر کشت شود. با استفاده از تکنیک PCR می‌توان عامل بیماری را در کمتر از چند ساعت تشخیص داد.

با توجه به پیشرفت روزافزون علوم و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در زمینه‌های مختلف، در این مطالعه سعی بر آن شد تا با استفاده از آخرین اطلاعات موجود پیرامون دو بیماری باکتریایی در زنبور عسل یعنی لوک آمریکایی و لوک اروپایی گام موثری در زمینه پیش برد آزمایش‌های زنبور عسل و تشخیص این دو عامل بیماریزا برداشته شود.

از این رو در مطالعه حاضر از ۳۰ زنبورستان دارای تلفات واقع در استان لرستان نمونه‌گیری به عمل آمده و سپس شان‌های دارای علائم بیماری ابتدا توسط کشت میکروبی و سپس توسط PCR از لحاظ وجود بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت تعداد موارد مثبت به دست آمده توسط کشت میکروبی و روش PCR با یکدیگر مقایسه شد.

---

[1]- *Apis mellifera*
[2]- European foulbrood
[3]- *Melissococcus pluton*

کلیات

زنبور عسل (*آپیس ملیفرا*) فقط از لحاظ تولید عسل مهم نیست. در بین حیوانات گرده افشان زنبورها (چه آن‌هایی که زندگی انفرادی دارند و چه آن‌هایی که به صورت اجتماعی زندگی می‌کنند)، نقش عمده‌ای در چرخه زندگی بسیاری از گل‌ها، محصولات کشاورزی و باغبانی ایفا می‌کنند (Forsgren, 2010). *آپیس ملیفرا*، با ارزش‌ترین گرده افشان از لحاظ اقتصادی برای کشت‌های گیاهان ریشه‌ای و میوه‌ها و ارزان‌ترین، متنوع‌ترین و مناسب‌ترین گرده افشان برای محصولات کشاورزی در سراسر جهان است. بنابراین زنبوران عسل مهم‌ترین جانداران تولید کننده محسوب می‌شوند و سلامت آن‌ها نقش اقتصادی بزرگی در دنیا ایفا می‌کند (Morse and Calderon, 2000). به دلیل نقش عمده و حیاتی زنبوران عسل در گرده افشانی گیاهان ریشه‌ای، میوه‌ها و گل‌ها، عواملی که سلامت زنبوران را تهدید می‌کنند می‌توانند کشاورزی و اکوسیستم‌های غیر کشاورزی را تحت تاثیر قرار دهند. در چند ساله اخیر، مشکل جدی ناپدید شدن زنبوران از کندوها و کاهش جمعیت زنبوران گزارش می‌شود. علت این ناپدید شدن ناگهانی هنوز شناخته نشده، اما بعضی فرضیه‌ها مبنی بر نقش داشتن میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (Forsgren, 2010). میکروارگانیسم‌های مختلفی در رابطه با زنبور عسل وجود دارد (Gilliam, 1997, Olofsson and Vasquez, 2008). اکثر آن‌ها مفید هستند اما بعضی از آن‌ها بسیار مضراند. زنبور عسل و لارو آن مورد حمله گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مثل باکتری‌ها، ویروس‌ها، تک یاخته‌ها، قارچ‌ها و مایت‌ها هستند. در ابتدای ورود مایت انگلی *وآروا دیسترکتور*[1]، و دو بیماری بسیار مهم از لحاظ اقتصادی در زنبور عسل لوک آمریکایی و اروپایی بوده که عامل آن‌ها باکتریایی است. لوک آمریکایی (AFB) و لوک اروپایی (EFB) مهم‌ترین بیماری‌ها از لحاظ اقتصادی در سراسر جهان هستند (Genersch, 2010) و لارو زنبوران عسل را تحت تاثیر قرار می‌دهند. این دو بیماری انتشار جهانی داشته و عامل بالقوه کشنده لاروهای زنبور عسل در کلنی‌های آلوده هستند (Forsgren, 2010). واضح است که برای مقابله هرچه بهتر با بیماری باید عامل آن، راه‌های انتقال عفونت و شرایط محیطی مطلوب برای ایجاد بیماری شناخته شود.

لوک آمریکایی

لوک آمریکایی آسیب‌رسان‌ترین بیماری زنبوران عسل است. این بیماری نه تنها لاروهای بیمار را از بین برده بلکه برای کلنی‌های آلوده شده هم بالقوه کشنده است. در شرایط معمول در زنبورداری بیماری از طریق مبادله کندوها، سازماندهی تعداد زیاد کندو در یک مکان محدود و تجارت کلنی‌ها، ملکه و عسل منتقل می‌شود. سوزاندن کلنی و مواد کندوی آلوده تنها روش کنترل بیماری در بسیاری از کشورها است (Pernal et al., 2008, Von der Ohe, 2003). تاکنون لوک آمریکایی یک مسئله مهم در صنعت زنبورداری در سراسر جهان بوده و باعث ضرر اقتصادی قابل توجه برای متصدیان زنبور عسل می‌شود.

[1]- *Varroa destructor*

نام لوک (به معنی لباس کهنه و مندرس) خیلی قبل از شناخت عامل بیماری، توسط زنبوردارانی که لاروهای زنبوران را دگرگون شده و فاسد می‌یافتند و قاب‌های مومی آن‌ها توسط پروانه موم خوار خراب شده بود، به این بیماری اتلاق گردیده است. به نظر می‌رسد که لوک آمریکایی باید از زمان‌های باستان شناخته شده باشد. ارسطو دانشمند یونانی در کتابی که حدود ۲۳۰۰ سال پیش در باره زندگی زنبور عسل نوشته این بیماری را توصیف نموده، وی این بیماری را به دلیل رنگ لاروها، زنگ زدگی نامید. تا سال ۱۹۰۰ به اشتباه تصور می‌کردند که بین رطوبت و ایجاد بیماری، یک ارتباط وجود دارد، همان گونه که بین آب و زنگ زدگی ارتباط برقرار است. در سال ۱۷۶۹، یک زیست شناس بنام شیراک، در کتاب داستان زنبوران، عوامل مختلفی مثل گذاشتن تخم‌های بد توسط ملکه، وضعیت بد لاروها را به لوک آمریکایی نسبت داده، او برای ریشه کن کردن بیماری، روش‌هایی را که برای مقابله با سایر عوامل عفونی بکار می‌رود پیشنهاد کرده است. نام بیماری بر اساس بوی گندیده ای که از کندوهای بیمار به مشام می‌رسید لارو گندیده (foulbrood) نامیده شد (Schirach, 1769). علائم بیماری لارو گندیده بعدا و در قرن نوزدهم شرح داده شد (Cheshire and Cheyne, 1885). بیش از یک قرن بعد در نوشته‌ها عنوان شد که بیماری لوک می‌تواند شامل دو بیماری متفاوت باشد. بر اساس تحقیقات Dzierzon در سال ۱۸۸۲ نشان داده شد که بیماری لوک به دو شکل اتیوپاتولوژی رخ می‌دهد: شکل ملایم و علاج پذیر لوک یا شکل مهر نشده و غیر چسبنده (که ما امروزه آن را لوک اروپایی می‌نامیم) و شکل بدخیم و علاج ناپذیر لوک یا لوک مهر و موم شده و چسبنده (که امروزه آن را لوک آمریکایی می‌نامیم).

در سال ۱۸۸۵، *باسیلوس آلوئی*[1] از لاروهای آلوده جدا شد و به عنوان عامل بیماری لوک که در آن زمان هنوز به شکل ساده foulbrood نامیده می‌شد، معرفی شد (Cheshire and Cheyne, 1885).

در سال ۱۹۰۶، یک میکروبیولوژیست آمریکایی به نام وایت[2] پس از تلاش ناموفقش در جداسازی *باسیلوس آلوئی* از توده چسبان و آلوده لاروهای بیمار، توانست یک باکتری نامشخص را از کشت جدا کند. او این باکتری را براساس مرفولوژی میله ای شکل و توانایی آن در تشکیل اندوسپور *باسیلوس لاروا*[3] نامید (White, 1906). وایت در تحقیقات بعدی نشان داد که دو نوع بیماری متفاوت لوک به سبب پاتوژن‌های مختلف وجود داشته که علائم متفاوتی را ایجاد می‌کنند. Philips در سال ۱۹۰۶ از دو واژه آمریکایی و اروپایی برای نامیدن بیماری در تشخیص استفاده کرد. به هر حال این نامگذاری به شیوع جغرافیایی بیماری برنمی‌گردد بلکه به جایی بر می‌گردد که بیماری برای اولین بار در آنجا مورد بررسی قرار گرفته است (Shimanuki, 1990). لوک اروپایی که عامل ایجاد کننده آن *ملیسوکوکوس پلوتونیوس* بوده به همراه ساپروفیت *باسیلوس آلوئی* و/یا *انتروکوکوس فکالیس*[4] به عنوان مهاجمین ثانویه (Bailey, 1956, 1957, 1983, Bailey et al., 1973) و لوک آمریکایی که عامل سببی آن *باسیلوس لاروا* می‌باشد (White, 1906). دیگر نام‌های شایع برای این بیماری black brood, ropy brood, foul and disease brood می‌باشد.

[1]- *Bacillus alvei*
[2]- George F.White
[3]- *Bacillus larvae*
[4]- *Enterococcus faecalis*

در سال ۱۹۵۰، باکتری دیگری از لاروهای مرده که به اسکال پودری تبدیل شده بودند (بیماری پوسته پودری[1]) جدا شد و به عنوان *باسیلوس پولویفاسینس*[2] نامیده شد (Katznelson, 1950). گزارشات متضادی در مورد ارتباط بین باکتری *باسیلوس پولویفاسینس* و بیماری پوسته پودری در لارو زنبورعسل وجود دارد (Hitchcock et al., 1979, Katznelson and Jamieson, 1951). بیش از ۵۰ سال طول کشید تا سرانجام به سوال درباره پاتوژنیسیتی و ویرولانس این باکتری پاسخ داده شد (Genersch et al., 2006).

زمانی که در تاکسونومی باکتریایی آنالیز توالی مقایسه ای زیر واحد کوچک (16S rRNA) rRNA معرفی شد، معلوم شد که ژنوم باسیلوس شامل ۵ شاخه است (Ash et al., 1991). با استفاده از یک پروب ژنی بسیار اختصاصی ژن 16S rRNA، هر دو باکتری *باسیلوس لاروا* و *باسیلوس پولویفاسینس* در جنس جدید پنی باسیلوس طبقه بندی شدند، از این رو *پنی باسیلوس لاروا* و *پنی باسیلوس پولویفاسینس* نامیده شدند (Ash et al., 1993). اگرچه آنالیز چندین تایپ و منبع گوناگون از هر دو باکتری تشابه مولکولی بالایی را نشان داده، اما طبقه بندی به دو گونه را توجیه نمی‌کند. در شکل جزئی تر مطالعات الگوی محدودیت rRNA و پیوندهای DNA-DNA، طبقه بندی دوباره دو گونه به یک گونه *پنی باسیلوس لاروا* را پشتیبانی می‌کند (Heyndrickx et al., 1996). در سطح پایین اختصاصیت گونه *پنی باسیلوس لاروا* به دو زیر گونه لاروا و *پولویفاسینس* طبقه بندی می‌شود (Heyndrickx et al., 1996).

به هر حال، مطالعات روی مشخصات گونه‌های ایزوله شده از کلنی‌های بیمار، با خصوصیاتی که برای توصیف دو زیر گونه گفته شده، در تناقض است. یک مثال آن توانایی تولید پیگمان نارنجی است که به *پنی باسیلوس پولویفاسینس* نسبت داده شده است (Heyndrickx et al., 1996). اگرچه واریانت‌های دارای کلنی پیگمان نارنجی از لاروهای مرده در اثر AFB هم جداسازی شده است (Drobnikova et al., 1994). گفته شده که دو زیر گونه همچنین در توانایی تولید اسید از سالیسین و مانیتول با یکدیگر متفاوت‌اند (Heyndrickx et al., 1996). اگرچه تخمیر سالیسین و مانیتول نسبتا شاخصه متغیری برای گونه‌های *پنی باسیلوس لاروا.لاروا*[3] گزارش شده است (Carpana et al., 1995, Dobbelaere et al., 2001). سرانجام مشخص شد که توالی ژنی 16S rRNA می‌تواند عامل تشخیصی برای دو تایپ گونه *پنی باسیلوس لاروا.لاروا* و *پنی باسیلوس لاروا.پولویفاسینس*[4] باشد (Kilwinski et al., 2004). متعاقبا آخرین بازبینی منجر به طبقه بندی دوباره زیر گونه‌های *پنی باسیلوس لاروا.لاروا* و *پولویفاسینس* به عنوان یک گونه *پنی باسیلوس لاروا* بدون تمایز زیر گونه‌ای شده است. لاروهای آلوده مرده در حالیکه علائم AFB را نشان داده به جسم کشسان (ropy) مشخص تبدیل می‌شوند، بنابراین قوی‌ترین استدلال برای دو زیر گونه متفاوت (Heyndrickx et al., 1996) یعنی تفاوت در پاتولوژی *پنی باسیلوس لاروا.لاروا* و *پنی باسیلوس لاروا.پولویفاسینس* (Gilliam and Dunham,1978,

[1]- Powder scale disease
[2]- *Bacillus pulvifaciens*
[3]- *Peanibacillus larvae.larvae*
[4]- *Paenibacillus larvae.pulvifaciens*

(Katznelson, 1950, White, 1906 نامعتبر اثبات شد، در نتیجه آن زیرگونه‌های قبلی به یک گونه بدون تمایز زیرگونه ای دوباره طبقه بندی شدند (Genersch et al., 2006).

اپیدمیولوژی *پنی باسیلوس لاروا*

بیش از یک دهه است که اپیدمیولوژی *پنی باسیلوس لاروا* مورد توجه قرار گرفته است. شیوع AFB "یا بیماری‌های عفونی عمومی" اغلب حاصل در معرض قرار گرفتن با یک منبع متداول پاتوژن است. بنابراین در یک زمان مشخص از یک کلنی چندین میزبان آلوده شده و این میزبان‌ها باعث پخش عامل اتیولوژیکی بیماری می‌شوند. به منظور پیگیری حرکت و گسترش گونه‌های پاتوژن در جمعیت میزبان، مطالعات اپیدمیولوژیکی صورت می‌گیرد. بطور عمومی، مطالعات اپیدمیولوژیکی به انتشار بیماری‌های زودگذر و طولانی رسیدگی کرده و سعی دارد که منبع آلودگی را مشخص کند. شان حاوی لاروهای آلوده بزرگ‌ترین منبع اسپور بوده و می‌تواند بیماری را پخش کند (Shimanuki, 1990, Alippi, 1996).

شیوع لوک آمریکایی بستگی به فصل ندارد؛ و اکثرا در هر زمانی که لاروها حضور دارند اتفاق می‌افتد (Bailey and Ball, 1991)، اما معمولا در فصلی که دوره رشد فعال لاروها است تشخیص داده می‌شود. گسترش بیماری به فاکتورهایی شبیه بچه‌گیری، غارت، مدیریت ناصحیح، تغذیه با عسل با منشأ مشکوک، نبودن ضدعفونی، حمل و نقل و غیره بستگی دارد. برخی از انگل‌ها مثل لاروهای پروانه موم خوار با مصرف موم و مواد موجود در حجره‌ها، از طریق مدفوع، اسپورها را منتشر یا بدون تغییر آن‌ها را حفظ می‌نمایند. بیماری AFB معمولا تمایل به اندمیک شدن در کلنی را برای سال‌ها دارد (Hansen and Rasmussen, 1986). به هر حال، بعد از گذشت مدت زمانی قابل توجه، تعداد کمی از لاروها ممکن است آلوده شده و قبل از اینکه لاروهای مرده ازکندو بیرون شوند این آلودگی به مرحله اسپوری برسد (Alippi, 1990).

ژنوتیپ و ویرولانس

چهار ژنوتیپ ERIC I, II, III, IV برای *پنی باسیلوس لاروا* شرح داده شده است (Genersch et al., 2006). نشان داده شده که این چهار ژنوتیپ از لحاظ فنوتیپ و ویرولانس با یکدیگر متفاوتند (Genersch et al., 2005, 2006). تمام ژنوتیپ‌ها بطور تقریبی ظرف ۷ روز باعث کشتن لاروهای آلوده می‌شوند. ژنوتیپ ERIC I ظرف ۱۲ روز تمام لاروهای آلوده را می‌کشد، این در حالی است که ژنوتیپ ERIC II و ERIC IV در مدت زمان کمتری باعث مرگ لاروهای آلوده می‌شوند، بنابراین ERIC I دارای ویرولانس کمتری است (Genersch et al., 2005, 2006). *پنی باسیلوس لاروا* بدون پیگمان (ERIC I) می‌تواند به عنوان ژنوتیپ کلاسیک در نظرگرفته شود که به احتمال زیاد علت اکثر واگیری‌ها در سراسر جهان است.

اغلب پاتوژن‌های باکتریایی توسط کلاس معینی از جزایر ژنومی به نام جزایر پاتوژنیسیتی[1] (PAI)، مشخص شده‌اند (Hacker et al., 1997). در بیشتر موارد PAI نواحی ژنومی بزرگی با سایز در حدود 10-200 kb را اشغال می‌کند. PAI ژن‌های ویرولانس را حمل می‌کند، بنابراین تنها در ژنوم باکتری‌های پاتوژن وجود داشته و در ژنوم اعضای غیر پاتوژن همان گونه یا گونه‌های مرتبط وجود ندارد. یک ویژگی شاخص PAI محتوای C+G است که با ژنوم هسته ای متفاوت است. از این ویژگی اغلب برای تعیین PAIهای جدید استفاده می‌شود (Schmidt and Hensel, 2004). برای *پنی باسیلوس لاروا* نه توالی یابی کامل ژنوم (Qin et al., 2006) و نه مقایسات ژنومی (Funfhaus et al., 2009)، تاکنون وجود نواحی ژنومی با محتوای C+G قابل توجه را آشکار نکرده و محتوای C+G تعیین شده برای ژنوم *پنی باسیلوس لاروا* (Heyndrickx et al., 1996) اظهار می‌کند که پنی باسیلوس لاروا PAI ندارد.

بسیاری از پاتوژن‌ها که PAI را از دست داده‌اند به شکل فوق العاده‌ای با میزبانشان سازگاری یافته و توانایی تکثیر خارج از میزبان در محیط زیست طبیعی را از دست داده‌اند. در مقابل پاتوژن‌های دارای PAI سیکل زندگی متنوع‌تری داشته و می‌توانند در میزبان‌های مختلف یا قسمت‌های مختلف بدن همان میزبان یا حتی خارج از بدن میزبان زندگی کنند (Schimdt and Hensel, 2004). با این حال، *پنی باسیلوس لاروا* یک باکتری خاص است، فرم رویشی باکتری هیچگاه خارج از لارو آلوده زنبور عسل یافت نشده است و واسطهای پیچیده‌ای برای جوانه زدن، کشت و اسپورزایی در محیط آزمایشگاه لازم است (Lloyd, 1986, Nordstrom and Fries, 1995, Plagemann, 1985). یک تعریف این است که *پنی باسیلوس لاروا* به شکل فوق العاده‌ای با میزبان سازگاری یافته که خود شاهدی براین امر است که این باکتری نمونه‌ای از پاتوژن‌هاست که PAI را از دست داده اند. مطالعات بعدی می‌تواند حضور یا عدم حضور PAI را در *پنی باسیلوس لاروا* آشکار کند.

ویرولانس و انتقال

پاتوژن‌ها که عمدتا برای تکثیر و بقا به میزبان متکی‌اند، برای حفظ بقایشان نیازمند انتقال از یک میزبان به میزبان دیگر هستند. *پنی باسیلوس لاروا* فقط لاروهای زنبور عسل را آلوده کرده و بر روی زنبورهای بالغ بی تاثیر است. لاروها توسط اسپورهایی که در غذای آن‌ها وجود دارد آلوده می‌شوند. لاروهای آلوده توسط زنبورهای کارگر که مسئولیت تمیز کردن کندو را بر عهده دارند از حجرات خارج می‌شوند. اگر مدتی از مردن لاروهای آلوده بگذرد، بقایای لاروهای مرده خشک شده و به حالت فلسی درآمده و به طور محکم به ته حجره می‌چسبد و جدا کردن آن مشکل می‌شود. هر کدام از این لاروهای فلسی شده به تنهایی حاوی حدود ۲۵۰۰ میلیون اسپور می‌باشد. آلودگی از دو طریق منتشر می‌شود. ابتدا، ۱۹-۸٪ از لاروهایی که حاوی آلودگی قبلی هستند رشد کرده‌اند و خودشان را آلوده می‌کنند. دوم آنکه، زنبوران رفتگر اسپورها را به غذای لاروها منتقل می‌کنند. لاروها در مراحل اولیه لاروی نسبت به آلودگی یعنی ۳۶-۱۲ ساعت پس از خروج از تخم حساس‌ترند. در طول این مدت تعداد ۱۰ اسپور یا کم‌تر از طریق غذای آلوده برای آغاز یک عفونت کشنده در لارو کافی است (Bamrick

[1]- Pathogenicity islands

and Rothenbuhler, 1961, Brodsgaard et al.,1998, Genersch et al., 2005, Woodrow, 1942, Woodrow and Holst, 1942). بر طبق تحقیقات Woodrow در سال ۱۹۴۲ یک اسپور برای آلوده کردن لاروی که به تازگی هچ شده است کافیست، زمانیکه سن لارو به بیشتر از ۵۳ ساعت رسید کاملا نسبت به آلودگی مقاوم می‌گردد. LD50 برای *پنی باسیلوس لاروا* در یک لارو یک روزه ۳۵ اسپور است (Shimanuki, 1990).

انتشار در بین کلنی‌ها

انتقال از یک کلنی به کلنی دیگر یک مرحله ضروری در جریان بیماری است (Ratnieks, 1992). شیوه پرورش زنبور یک عامل مهم در شیوع بیماری محسوب می‌شود. انتقال بیماری از چند راه ممکن است، که شامل غذای آلوده (عسل آلوده یا گرده آلوده به اسپور)، انتقال از طریق قاب‌های آلوده به بیماری به آن‌هایی که سالم هستند، استفاده از تجهیزات آلوده به اسپور و راه کم اهمیت تر در انتقال بیماری توسط زنبوران غارتچی می‌باشد (Matheson and Reid, 1992). خرید کردن از مراکز معتبر و فاقد آلودگی و استفاده از غذای عاری از اسپور از روش‌های پیشگیری از شیوع آلودگی است.

پاتوژنز لوک آمریکایی

همانطور که از نام بیماری لوک آمریکایی پیداست این بیماری تنها مرحله لاروی زنبوران عسل را تحت تاثیر قرار می‌دهد. عامل بیماری یک باکتری گرم مثبت و اسپورزا به نام *پنی باسیلوس لاروا* است (Genersch et al., 2006). تنها شکل عفونت زای بیماری، اندوسپور بسیار سرسخت و محکم آن است. اسپورها تنها برای لارو عفونی بوده و زنبوران بالغ با هضم اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* آلوده نمی‌شوند (Hitchcock et al., 1979, Wilson, 1971). روند ایجاد بیماری به این صورت است که: اسپورهای هضم شده وارد میدگات[1] شده و حدود ۱۲ ساعت بعد جوانه می‌زنند (Bamrick, 1967, Yue et al., 2008). تحقیقات قدیمی اظهار می‌کنند که فرم رویشی *پنی باسیلوس لاروا* از طریق فاگوسیتوز به غشا میدگات نفوذ کرده و باکتری در هموسل[2] شروع به تکثیر می‌کند (Bailey and Ball, 1991, Davidson, 1973). امروزه روشن شده است که باکتری رویشی در میدگات کلونیزه شده و بدون تخریب قابل مشاهده‌ای در بافت اپی‌تلیوم میدگات به طور زیاد تکثیر می‌یابد (Yue et al., 2008). شرایط برای جوانه زدن اسپور در بدن لاروهای جوان بسیار مناسب است، اما خیلی زود بدن آنها برای جوانه زدن نامناسب می‌گردد (Bailey and Lee, 1962). در شرایط آزمایشگاهی جوانه زدن در pH حدود ۶/۶ و دمای ۳۷-۳۶ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط میکروآئروفیل (CO_2 ۱۰-۵٪) رخ می‌دهد. طی این مرحله از عفونت‌زایی، *پنی باسیلوس لاروا* بطور مشهود با لارو همزیستی داشته و با غذاهای هضم شده توسط لارو زنده می‌ماند. یافته‌های جدید نشان داده که *پنی باسیلوس لاروا* دارای آنزیم‌های فعال کننده مسیر IV امبدن-میرهوف-پارناس، پنتوز فسفات و انتنردئودورف است که در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نقش داشته و می‌تواند قندهای مختلفی از جمله گلوکز و فروکتوز را برای تسریع (ساپورت) رشد فرم رویشی متابولیزه کند (Julian and

[1]- Midgut
[2]- Haemocoel

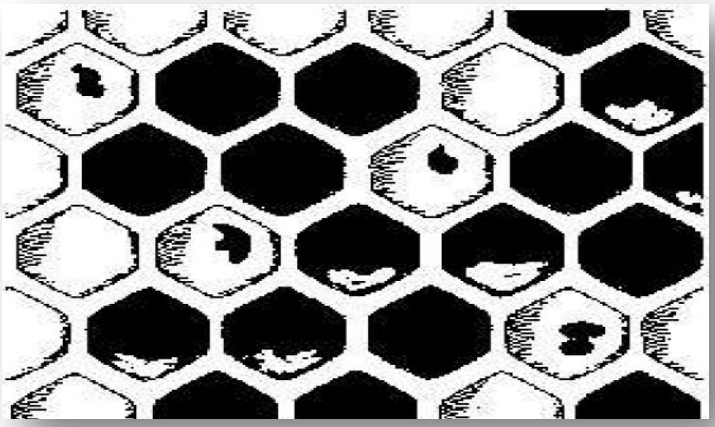
(Bulla, 1971, Neuendorf et al., 2004). یک شاخصه *پنی باسیلوس لاروا* این است که طی رشد رویشی و عفونت‌زایی، پروتئازهای خارج سلولی بسیار فعال ترشح می‌کند (Dancer and Chantawannakul, 1997, Hrabak and Martinek, 2007). تصور می‌شود که برخی از این پروتئازها مسئول شکستن انسجام سدهای اپیتلیال به وسیله کاهش ساختار اتصال‌های سلول-سلول و سلول-ماتریکس است. بدینوسیله *پنی باسیلوس لاروا* توان هجوم به هموسل را می‌یابد. باکتری به فراوانی در همولنف[1] میزبان تکثیر می‌یابد و اسپورواله شدن آغاز می‌شود. لارو در اثر باکتریمی از بین می‌رود (Davidson, 1973). زمانیکه لارو آلوده گردید قبل از اینکه به مرحله پوپی برسد، مرده و فرم اسپور باکتری در بدن لارو ۱۱ روزه دیده می‌شود. یک لارو ۱۴-۱۳ روزه حاوی اسپور در تمام بافت‌های بدن است (Bailey and Ball, 1991). بعد از مرگ، یک لارو سفید نرمال تبدیل به یک لارو قهوه‌ای تیره شده که در ته حجره قرار می‌گیرد. سپس ویسکوزیته محتویات بدن لارو افزایش یافته و چسبنده می‌شود، بطوریکه اگر یک چوب کبریت یا خلال دندان در درون حجره فرو برده و به بیرون بکشیم محتویات به طرز قابل توجهی کش می‌آید و حالت چسبان[2] دارد، سپس در مرحله بعدی به اسکال[3] سخت تبدیل شده که با ضخامت به دیواره سلولی می‌چسبد. این اسکال‌ها بسیار عفونی بوده و شامل میلیون‌ها اسپور است و باعث انتشار بیماری در درون و بین کلنی‌ها می‌شود (Bailey and Ball, 1991, Gregorc and Bowen, 1998, Lindstrom et al., 2008, Sturtevant, 1932). اسپورهای *پنی باسیلوس لاروا* بسیار مقاوم بوده و بیش از ۳۵ سال عفونت‌زا باقی می‌مانند و نسبت به گرما، سرما، خشکی و رطوبت مقاوم اند (Hasemann, 1961). این سرسخت بودن اسپورها و همچنین تولید بی شمار آن‌ها در کلنی‌های آلوده کنترل موثر لوک آمریکایی را با مشکل مواجه کرده است.

تشخیص درمانگاهی (علائم کلینیکی)

لوک آمریکایی دارای یک سری علائم مشخص درمانگاهی است که شامل خصوصیات شان حاوی لارو و خصوصیات حجره می‌باشد (Matheson and Reid, 1992). ظاهر مشخص یک شان آلوده شامل حجرات یک در میان باز و به اصطلاح فلفل نمکی[4] است، یعنی حجرات حاوی لارو سالم و سر پوشیده در کنار حجرات باز و بدون درپوش و حاوی بقایای لاروهای بیمار و حجرات خالی قرار گرفته است. سلول‌های در پوش دار دارای آلودگی حاوی لاروهای مرده با ظاهری خاکستری و سطحی مقعر با سوراخ‌های نامنظم هستند. زمانیکه پوشش برداشته می‌شود، لارو مرده می‌تواند به اندازه ۲/۵-۲ سانتی متر کش بیاید. لاروهای مرده یا پوپ‌های آلوده یک تغییر رنگ پیش رونده از زرد کاهی به سمت قهوه ای شکلاتی و اغلب سیاه دارند.

[1]- Haemolymph
[2]- Ropy stage
[3]- Scale
[4]- Pepper box

شان‌های حاوی لاروهای آلوده بوی شبیه سریش یا ترشیدگی دارند. در آخر، بعد از گذشت یک ماه، بقایای لارو بیمار خشک شده و به صورت محکم به کف حجره می‌چسبد. اگر مرگ در فاز پوپی رخ دهد، یعنی مرحله ای که پوپ شکل زبانی دارد، زائده دهانی مربوط به پوپ که نقش دفاعی دارد به سقف سلول می‌چسبد.



شکل ۲-۱- شکل ظاهری شان آلوده

جمع آوری نمونه و انجام اقدامات آزمایشگاهی

تشخیص دقیق آزمایشگاهی بیماری (هر بیماری زنبور عسل) ملزم به ارائه یک نمونه خوب به آزمایشگاه است. AFB یک بیماری بسیار مهم در لارو زنبور عسل است. نمونه شان مناسب شامل یک قطعه ۱۰×۱۰ از شان است که حاوی لاروهای مرده و تغییر شکل یافته است. این نمونه باید تا حد ممکن دارای بیشترین شفیره‌های مرده و تغییر رنگ داده و کمترین مقدار عسل باشد (دستورالعمل سازمان دامپزشکی کل کشور، شماره ۱۳۸۶/۴۲/۰۱). نمونه به صورت شل در یک پوشش کاغذی پیچیده می‌شود. از گذاشتن نمونه در کیسه پلاستیکی، فویل آلومنیوم، کاغذ روغنی، قوطی حلبی یا شیشه‌ای باید اجتناب کرد، چون این‌ها اجازه می‌دهند که قارچ در نمونه رشد کند و در تشخیص اختلال ایجاد می‌کند. شان را می‌توان در یک جعبه چوبی یا مقوایی قرار داد (Shimanuki and Knox, 1991). در صورتی که فرستادن تکه‌ای از شان عملی نباشد، می‌توان برای اخذ نمونه از سواب استفاده کرد که در این حالت باید به مقدار کافی از مواد داخل سلول برای انجام آزمایش برداشت گردد. این نمونه را نیز بهتر است در کاغذ پیچیده یا در لوله آزمایش قرار داد. چنین نمونه برداری که با اندازه کم انجام می‌شود تنها زمانی کارساز است که فرد نمونه بردار از تجربه کافی برخوردار بوده و یا به اندازه کافی برای شناسایی مناطق درگیر آموزش دیده باشد. در صورتی که در معاینات ماکروسکوپیک کندو توسط شخص با تجربه مشخص شود که شان‌های حاوی تخم از نظر ظاهری سالم هستند، نمونه عسل می‌تواند به آزمایشگاه ارسال شود. نمونه‌برداری از عسل می‌تواند هم از تکه‌ای از شان حاوی عسل و یا از عسل اکستراکت

شده آماده عرضه انجام شود (در مورد دوم مشخص کردن کندوی آلوده میسر نخواهد بود). میزان عسل خالص مورد آزمایش باید ۳۰ تا ۵۰ گرم باشد (دستورالعمل سازمان دامپزشکی کل کشور، شماره ۱۳۸۶/۴۲/۰۱).

تشخیص آزمایشگاهی

آزمون‌های میکروسکوپی

تست قطره معلق اصلاح شده[1]: یک تست مخصوص و مفید برای تفریق لوک آمریکایی از دیگر بیماری‌های زنبور عسل است. ابتدا از مواد کشسان (طنابی[2]) لاروهای بیمار یک سوسپانسون تهیه کرده و با قطره آب مقطر مخلوط و روی یک کاور اسلاید (۲۴-۳۶ mm) قرار داده، سپس اسمیر با حرارت شعله فیکس شده، در همین زمان به مقدار کافی روغن ایمرسیون روی یک اسلاید تمیز قرار می‌گیرد. اسمیری که با حرارت فیکس شده با کربول فوشین بمدت ۲۰-۱۵ ثانیه رنگ آمیزی شده و رنگ اضافه با جریان آب شسته می‌شود. زمانیکه اسمیر هنوز مرطوب است آن را سریعا روی اسلایدی که حاوی روغن ایمرسیون است قرار می‌دهیم. قسمت رویی اسلاید (رنگ شده) روی سطح روغنی قرار می‌گیرد. سطح اسلاید توسط کاغذ خشک کن یا جوهر خشک کن خشک شده و اسلاید توسط لنز روغنی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در زیر میکروسکوپ ناحیه‌ای که آب بین بسته‌های روغن قرار دارد بررسی می‌شود. اسپور *پنی باسیلوس لاروا* در زیر میکروسکوپ حرکات براونی[3] نشان می‌دهد.

اسپور *پنی باسیلوس آلوئی* و دیگر گونه‌ها نیز ممکن است در تشخیص نهایی اختلال ایجاد کند ولی اسپور این گونه‌ها متحرک نیست. بعضی اوقات، ممکن است باقیمانده لارو و دیگر گونه‌ها نیز در زیر میکروسکوپ حرکت براونی از خود نشان دهند، که در این مواقع باید به سایز اسپورها توجه کرد (Alippi, 1990).

رنگ آمیزی انفرادی[4]: در این روش اسمیر بر روی یک اسلاید میکروسکوپی تهیه می‌گردد. سپس با حرات فیکس شده و با کربول فوشین[5] یا دیگر رنگ آمیزی‌های مناسب برای رنگ کردن باکتری‌ها بمدت ۳۰ ثانیه رنگ رنگ می‌شود و سپس با لنز روغنی تحت بررسی میکروسکوپی قرار می‌گیرد.

نکته: اگر آلودگی در لاروی که کمتر از ۱۰ روز سن دارد رخ دهد، باکتری‌های رویا با ظاهری بلند و میله‌ای به همراه فلاژل مشاهده می‌شود. فلاژل‌ها به صورت دسته ای و در ته باکتری قرار دارند.

[1]- Modified hanging-drop
[2]- Ropy
[3]- Brownian movement
[4]- Single stain
[5]- Carbol fuchsin

روش‌های ایمنی شناسی

ایمونوفلورسنت[1]: این روش برای تعیین وجود میکروارگانیسم تعریف شده و در نمونه‌های کلینیکی به صورت مستقیم به کار برده می‌شود (بدون جداسازی پاتوژن). آنتی ژن دیواره سلولی بر روی اسلایدهای میکروسکوپی فیکس شده و با Ab اختصاصی که با آنتی ژن واکنش می‌دهد مجاور می‌گردد.

Ott در سال ۱۹۷۳ تکنیک ایمونوفلورسانس مستقیم[2] را برای تشخیص *پنی باسیلوس لاروا* توسط تزریق میکروب خالص به خرگوش توسعه داد. در نتیجه آنتی سرم جمع آوری شده و با رنگ فلوروکروم[3] کنژوگه شد. اشکالی که گزارش شد شامل واکنش متقاطع با فرم اسپوری دیگر باکتری‌ها بود. بنابراین نیاز است از Ab کنژوگه مختلف (متفاوت) برای فرم اسپوری و رویای باکتری استفاده شود (Otte, 1973). در ایمونوفلورسانس غیر مستقیم[4]، Ab غیر کنژوگه اختصاصی به عنوان مثال تولید شده در خرگوش، در اولین مرحله با آنتی ژن دیواره سلولی باکتری واکنش می‌دهد. در مرحله دوم، Ab ضد Ab خرگوش که با رنگ‌های فلورسنت نشان دار شده اضافه می‌شود (این Ab در گوسفند یا گاو تولید می‌شود). بعلاوه، برای آنتی ژن اختصاصی دیواره سلولی می‌توان کلنی باکتری روی محیط آگار را با Ab فلورسنت مجاور کرد.

الایزا[5]: در این روش با استفاده از آنزیم متصل به آنتی‌بادی، آنتی‌ژن‌های همولوگ در نمونه سرولوژیکی مشخص می‌شود. Olsen و همکاران روشی را توسعه دادند که در آن از آنتی‌بادی مونوکلونال[6] *پنی باسیلوس لاروا* در الایزای مستقیم استفاده می‌شود. این آزمایش مقدار حداقل ۱۰×۱۰^{۵} میلی لیتر از سلول رویا و اسپور باکتری را مشخص می‌کند. این روش یک نتیجه رضایت بخش و تاییدی برای تشخیص AFB در نمونه‌های کلینیکی بیماری می‌دهد. در مطالعات بعدی نیاز است که بررسی شود آیا عفونت AFB در سطح تحت کلینیکی در کلنی‌ها قابل شناسایی است یا خیر (Olsen et al., 1990).

روش‌های میکروبیولوژی

جداسازی و تشخیص دقیق

نمونه لارو: برای جداسازی *پنی باسیلوس لاروا*، فلس یا بقایای کشسان از یک حجره در ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داری می‌شود. سپس یک شوک حرارتی در ۸۰ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه به نمونه‌ها داده تا تمام اشکال غیر اسپوری باکتری‌ها از بین برود (Hansen et al., 1986). سپس مخلوط را بخوبی ورتکس می‌گردد و ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون توسط یک سواب کتانی استریل روی محیط کشت اختصاصی پخش می‌شود. پلیت‌ها در $۳۶-۳۷^{\circ}C$ در اتمسفر حاوی

[1]- Immunoflurescence
[2]- Direct immunoflurescence
[3]- Fluorochrome dye
[4]- Indirect immunofluorescence
[5]- Enzyme-linked-immunosorbent-assay
[6]- Monoclonal antibody

CO_2٪۱۰ (شرایط میکروآئروفیلیک) انکوبه می‌شوند. محیط‌های معمول مانند نوترینت آگار رشد پنی *باسیلوس لاروا* را تامین نمی‌کنند. اولین محیط اختصاصی برای رشد پنی *باسیلوس لاروا* توسط Horniyzky و Clark شرح داده شد (Hornitzky and Clark, 1991).

این میکروارگانیسم به محیط‌های مغذی حاوی فاکتورهای رشد ارگانیک، مثل MYPG agar (Dingman and Stahly, 1983) و BHI همراه با تیامین[1] (Shimanuki and Knox, 1991) و یا محیط J-agar (Hornitzky and Nicholls, 1993) نیاز دارد. محیط‌های با پایه خون مثل کلمبیا بلاد آگار[2] حاوی ۱۰٪ خون گوسفند (Lloyd, 1986) و بلاد آگارگوسفندی[3] (SBA) (Hornitzky and Karlovskis, 1989) نیز برای رشد باکتری مناسب هستند. طبق تحقیقات بهترین اسپورولاسیون در محیطی که توسط Dingman و Stahly استفاده شد رخ می‌دهد (Dingman and Stahly, 1983). زمانیکه نمونه‌ها دارای آلودگی ثانویه توسط باکتری‌های مهاجم هستند، بخصوص پنی *باسیلوس آلوئی*، برای جلوگیری از رشد این باکتری به محیط نالیدیکسیک اسید[4] به میزان ۶ µg/ml اضافه می‌شود. Alippi محیط نیمه اختصاصی Jagar شامل نالیدیکسیک اسید و پی پمیدیک اسید[5] را برای رشد پنی *باسیلوس لاروا* پیشنهاد داد (Alippi, 1995).

نمونه عسل: روش‌های زیادی برای جداسازی و کشت اسپور پنی *باسیلوس لاروا* از عسل گسترش یافته است. Hansen روشی را گسترش داد که در آن اسپور پنی *باسیلوس لاروا* توسط یک روش مستقیم، انکوباسیون عسل رقیق نشده که قبلا در حرارت ۹۲-۸۸ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه قرار گرفته، روی محیط J-agar جدا می‌شود (Hansen, 1984a, 1984b). Shimanuki و همکاران هم روشی را گزارش کردند که شامل دیالیز، سانتریفیوژ، مخلوط کردن دوباره، حرارت و سپس انکوباسیون آن بر روی محیط BHI بود (Shimanuki and Knox, 1988). Hornitzky و Clark روشی را شرح دادند که شامل سانتریفیوژ کردن عسل رقیق شده، حرارت دادن، رسوب آن و کشت روی محیط SBA شامل ۳µg/ml نالیدیکسیک اسید می‌باشد (Hornitzky and Clark, 1991). اضافه کردن نالیدیکسیک اسید به محیط کشت از رشد پنی *باسیلوس آلوئی* جلوگیری کرده اما دیگر پنی *باسیلوس‌ها* و *باسیلوس‌ها* می‌توانند رشد کنند و تشخیص درستی را برای پنی *باسیلوس لاروا* فراهم می‌کند. محیط‌های نیمه انتخابی برای جداسازی اسپور پنی *باسیلوس لاروا* در بسیاری از نمونه‌های آلوده عسل در آرژانتین گسترش یافته است (Alippi, 1995). این روش شامل رقیق کردن نمونه عسل (۱:۲) در فسفات بافر، غلظت سازی اسپور توسط سانتریفیوژ و شوک حرارتی قبل از انکوبه کردن آن در محیط J-agar حاوی نالیدیکسیک اسید و پی‌پمیدیک اسید است. پلیت‌ها را در دمای ۳۷-۳۶ درجه سانتی گراد و در شرایط اتمسفری حاوی ۵٪ دی اکسید کربن برای حداکثر ۷ روز قرار داده می‌شوند. Fries و Nordstrom گزارش کردند که محیط MYPG برای جدا کردن مقدار اندک اسپور پنی *باسیلوس لاروا* در عسل نسبت به دیگر محیط‌ها ارجحیت دارد (Nordstrom and Fries, 1995).

[1]- Brain heart infusion with thaimine
[2]- Columbia blood agar
[3]- Sheep blood agar
[4]- Nalidixic acid
[5]- Pipemidic acid