DOI: 10.22092/VJ.2022.357516.1935
شماره ۱۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

بررسی تنوع ژنوتیپی سویه‌های باکتری *Paenibacillus larvae* جدا شده از کلنی‌های زنبور عسل ایران

• **مجتبی محرمی (نویسنده مسئول)**
بخش تشخیص بیماری‌های زنبور عسل و کرم ابریشم، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **الناز احمدی‌نیری**
گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه دانشگاه علم و فرهنگ تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۹-۱۰-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش:۲۳-۱۱-۱۴۰۰
Email: mojmoharrami@yahoo.com

چکیده

بیماری لوک آمریکایی زنبورعسل یک بیماری باکتریایی کشنده لاروهای زنبورعسل در سراسر جهان است. این بیماری توسط باکتری گرم مثبت و تشکیل‌دهنده اسپور *Paenibacillus larvae* ایجاد می‌شود و زیان‌های اقتصادی مهمی را به همراه دارد. اما در مورد تنوع عامل ایجاد کننده تاکنون در ایران مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در این تحقیق از ۱۹ سویه *Paenibacillus larvae* که از لاروهای بیمار، تلف شده و عسل، جداسازی شده بودند پس از تأیید بوسیله آزمایشات بیوشیمیایی، PCR ژن 16S rRNA و تعیین توالی، جهت استفاده در تکنیک ERIC-PCR برای بررسی تنوع ژنوتیپی استفاده شدند. نتایج امکان شناسایی ژنوتیپ‌های ERIC I و ERIC II را برای اولین بار در ایران فراهم کرد. ۱۴ سویه ژنوتیپ II (۷۳/۷ ٪) و ۵ سویه ژنوتیپ I (۲۶/۳ ٪) را نشان دادند.

کلمات کلیدی: *Paenibacillus larvae*، بیماری لوک آمریکایی، تکنیک ERIC-PCR، ژنوتیپ ERIC

● Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 91-97

Investigation of genotypic diversity of *Paenibacillus larvae* strains isolated from Iranian honey bee colonies.

By: Moharrami, M., (Corresponding Author) Department of Honey Bee, Silk Worm a Wildlife, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. and Ahmadi Niri, E., Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, University of Science and Culture, Tehran, Iran.

Received:2022-01-19 **Accepted: 2022-02-12**

Email: mojmoharrami@yahoo.com

American Foulbrood disease is a deadly bacterial disease of honey bee larvae in the world. The disease is caused by gram-positive and spores forming bacteria of *Paenibacillus larvae* that has significant economic losses. However, no study has been done on the diversity of this disease agent in Iran. In this study, 19 strains of *Penibacillus larvae* that were isolated from diseased and dead larvae and honey after confirmation by biochemical tests, PCR of 16S rRNA gene and sequencing, were used in ERIC-PCR technique to study genotypic diversity. The results enabled the identification of ERIC I and ERIC II genotypes for the first time in Iran. 14 strains of genotype II (73.7%) and 5 strains showed genotype I (26.3%).

Key: *Paenibacillus larvae*, American Foulbrood, (ERIC-PCR) technique, ERIC genotypes

مقدمه

بیماری لوک آمریکایی زنبورعسل، یک بیماری باکتریایی کشنده و بسیار مسری لاروهای زنبور عسل می‌باشد. این بیماری توسط باکتری گرم مثبت، تاژک‌دار و تشکیل دهنده اسپور *Paenibacillus larvae* ایجاد می‌شود. لاروها از طریق بلع اسپور *Paenibacillus larvae* آلوده می‌شوند. پس از بلع اسپورها، در لومن روده میانی به شکل باکتری درآمده، اشکال رویشی *Paenibacillus larvae* در اپیتلیوم روده نفوذ کرده و در بافت‌های لارو گسترش می‌یابند (۱۵). جذب خوراکی حدود ده اسپور توسط لارو برای ایجاد عفونت کشنده در زنبور عسل کافی است. فقط لاروهای زنبورهای عسل در سن کمتر از ۳۶ ساعت مستعد این بیماری هستند (۳،۲). در کلنی‌های به شدت آلوده، درپوش سلول‌های حاوی نوزادان بیمار با ظاهری مرطوب و تیره به نظر می‌رسد و به دلیل پیشرفت عفونت مقعری و سوراخ‌دار می‌شود. همچنین، لارو یا شفیره تغییر رنگ می‌دهد، ابتدا به رنگ قهوه‌ای روشن مایل به خاکستری و در نهایت به رنگ قهوه‌ای تیره تبدیل می‌شوند. لاروها از نظر قوام می‌توانند چسبنده باشند، سرانجام بقایای لارو بیمار خشک، سفت، تیره، شکننده و کاملاً به کف سلول می‌چسبد (۱۱،۶). سویه‌های *Paenibacillus larvae* با استفاده از پرایمرهای ERIC2، ERIC1R و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به چهار ژنوتیپ ERIC I, II, III, IV تقسیم شده‌اند. ژنوتیپ‌های ERIC I, II مربوط به زیرگونه *P. l. larvae* است، در حالی که ژنوتیپ‌های ERIC III, IV با زیرگونه *P. l. pulvifaciens* مطابقت دارند. هر چهار ژنوتیپ در مورفولوژی کلنی و اسپور، متابولیسم منبع کربن و از همه مهم‌تر بیماری‌زایی متفاوت هستند (۱۵). اخیراً ژنوتیپ جدید ERIC V از یک نمونه عسل اسپانیایی جدا شده است. آزمایشات نشان داده است که ژنوتیپ‌های ERIC II, III, IV, V برای لاروها بسیار بیماریزا هستند و از نظر دوره زمانی زودتر باعث مرگ و میر لاروها می‌شوند. لاروهای آلوده به این ژنوتیپ‌ها طی حدود هفت روز کشته می‌شوند (۳). ژنوتیپ ERIC I حدود ۱۲ روز به کشتن لاروهای آلوده نیاز دارد و از این رو برای لاروها کم‌تر بیماریزا در نظر گرفته می‌شود (۶). ژنوتیپ ERIC I شایع‌ترین ژنوتیپ است در حالیکه ژنوتیپ ERIC II محدودتر است، ولی هر دو در سراسر جهان گزارش شده‌اند. ژنوتیپ‌های ERIC III, IV در دهه اخیر کمتر گزارش شده‌اند (۴). علایم بالینی بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل بسیار متنوع است و به ژنوتیپ *Paenibacillus larvae*، مرحله بیماری و مقاومت کلنی زنبور عسل بستگی دارد (۹).

در این مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی، فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی سویه‌های باکتری *Paenibacillus larvae* که از کلنی‌های مبتلا به بیماری لوک آمریکایی در ایران جدا شده بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

سویه‌های *Paenibacillus larvae*

در این مطالعه از ۱۹ سویه باکتری *Paenibacillus larvae* استفاده شد که این نمونه‌ها از لاروهای بیمار، تلف شده و عسل، جداسازی شده بودند.

تجزیه و تحلیل میکروبیولوژی

سویه‌ها بر روی محیط کشت MYPGP agar برای تشخیص شکل و رنگ کلنی و محیط کشت بلاد آگار برای شناسایی همولیز کشت داده شدند. بعد از کشت و چهار روز گرماگذاری در دستگاه انکوباتور (Labtron) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رشد کلنی‌ها، محیط کشت‌ها مورد

بررسی قرار گرفتند. از کلنی‌های رشد کرده آزمایش‌های تأییدی اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز انجام شد. برای شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌ها از دو محیط کشت نوترینت براث و محیط کشت پایه J – براث فاقد گلوکز (دارای سالیسین یا مانیتول) استفاده شد. بعد از کشت و دو هفته گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی شدند (۱). همچنین تست حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسیکلین (۳۰ µg/disk) با استفاده از روش انتشار دیسک روی محیط MYPGP آگار انجام گردید. پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (۱).

تجزیه و تحلیل مولکولی

برای اطمینان و تأیید سویه‌های *Paenibacillus larvae* با استفاده از پرایمرهای مربوط به توالی ژن 16S rRNA، آزمایش PCR انجام شد. همچنین با استفاده از ERIC-PCR و پرایمرهای ERIC، تنوع ژنوتیپی آنها بررسی شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA باکتری‌ها از کیت شرکت Qiagen آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد و سپس توسط دستگاه نانودراپ (Bio-Rad)، کیفیت و غلظت آنها اندازه‌گیری گردید.

پرایمرها

برای شناسایی مولکولی باکتری‌ها از پرایمرهای معرفی شده توسط پاچینی و همکاران در سال ۲۰۰۲ و برای تعیین ژنوتیپ از پرایمرهای معرفی شده توسط ورسالوویچ و همکاران سال ۱۹۹۴ استفاده گردید (جدول ۱).

وضعیت PCR

واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ µl انجام شد.
برای PCR از 16S: مستر میکس ۱۲/۵ µl (Taq DNA Polymerase Mix Red-MgCl2 1.5 mM-Ampliqon) پرایمر F و R شرکت سینا کلون از هر کدام ۰/۵ µl، ۵ DNA µl و آب مقطر ۶/۵ µl تهیه شد. برنامه برای PCR بوسیله دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf)، شامل مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ min و ۳۰ سیکل مرحله واسرشت در ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ min، مرحله اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ساخت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ min و سپس مرحله ساخت نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ min انجام شد (۱۶).
برای ERIC-PCR: از مستر میکس ۱۲/۵µl (۲x Master Mix- Hot Start Ampliqon)، پرایمر ERIC1R و ERIC2 از هر کدام ۳ µl، ۱/۵ DNA µl، آب مقطر ۵ µl تهیه شد. برنامه برای ERIC-PCR، شامل مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ °C به مدت ۱۵ min و ۴۰ سیکل مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ min، مرحله اتصال در ۵۳/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ min، مرحله ساخت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ min و سپس مرحله ساخت نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ min انجام شد (۱۰).
محصول PCR روی ژل آگارز ۱ ٪ که به آن سیف استین اضافه شده بوسیله دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad) الکتروفورزگردید. برای تعیین وزن مولکولی از لدر ۱۰۰ bp استفاده شد و توسط دستگاه ژل داک (Bio-Rad) باندها مشاهده و سپس از ژل عکسبرداری انجام شد.

رسم درخت فیلوژنتیک

با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و توالی‌های مربوط به 16S نمونه‌های مورد آزمایش و نمونه‌های انتخاب شده از بانک ژن، رسم درخت فیلوژنتیک انجام شد.

نتایج

آنالیز میکروبیولوژی

کلنی‌های *Paenibacillus larvae* دو مورفوتیپ مختلف را در محیط کشت MYPGP agar نشان دادند. دو نمونه دارای رنگدانه نارنجی و ۱۷ نمونه دارای کلنی‌های سفید تا کرم رنگ بودند. همه سویه‌ها میله‌ای گرم مثبت و از نظر همولیز منفی بودند (شکل۱). تست کاتالاز نمونه‌ها، منفی و یا مثبت ضعیف با تأخیر بودند. نتایج تست حساسیت در برابر اکسی‌تتراسیکلین سویه‌ها، نشان داده شد که تمامی نمونه‌ها حساس بودند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده.

۱۶S rDNA	F: 5′-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3′ R: 5′-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3′	(۸)
ERIC-PCR	ERIC1R: 5′- ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC -3′ ERIC2: 5′- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG -3′	(۹)

بیوشیمیایی

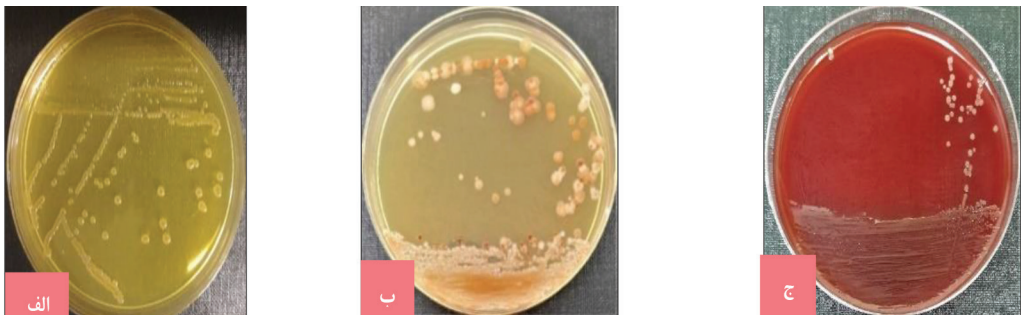
نتایج کشت سویه‌ها در محیط نوترینت براث نشان داده شد که پنج نمونه در محیط نوترینت براث رشد نکرده، ولی ۱۴ نمونه دیگر توانایی رشد داشتند. همچنین این پنج نمونه ذکر شده در محیط قندی J – براث فاقد گلوکز، سالیسین مثبت و مانیتول منفی بودند، ولی ۱۴ نمونه دیگر مانیتول مثبت و سالیسین منفی بودند.

آنالیز مولکولی

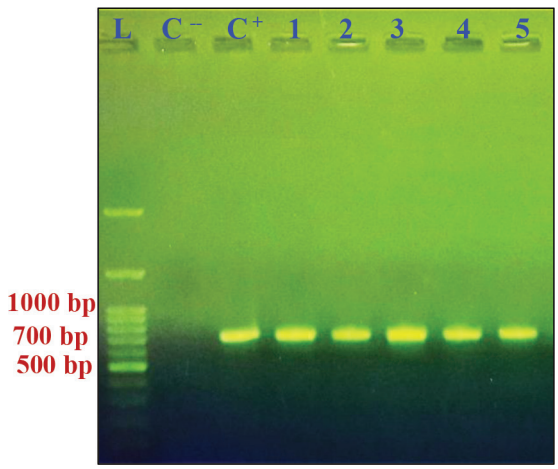
پس از استخراج DNA، کیفیت و غلظت آنها با استفاده از نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت که دارای کیفیت و غلظت مطلوبی بودند. همه نمونه‌ها در PCR با استفاده از ژن ۱۶S به عنوان باکتری *Paenibacillus larvae* تأیید شدند و یک قطعه ۷۰۰ جفت-بازی را تکثیر دادند (شکل ۲). نتایج تعیین ژنوتیپ سویه‌ها با استفاده از ERIC-PCR و پرایمرهای ERIC نشان داده شد که پنج نمونه دارای ژنوتیپ ERIC I و ۱۴ نمونه دارای ژنوتیپ ERIC II می‌باشند. ژنوتیپ‌های ERIC III, IV, V و در بین سویه‌های بررسی شده وجود نداشتند (شکل ۳).

نتایج رسم درخت فیلوژنتیک

رسم درخت فیلوژنتیک با نرم‌افزار MEGA ۷ با روش Maximum likelihood و مدل GTR+I+G انجام شد. در نتایج تعیین توالی، تشابه نمونه‌های تعیین توالی شده با نمونه‌های موجود در بانک ژن بین ۹۹ تا

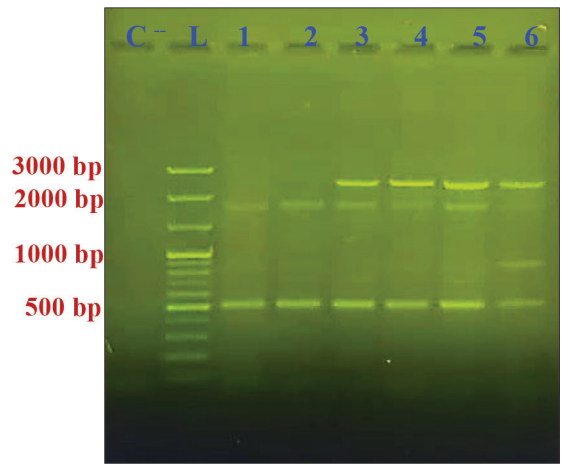


شکل ۱- کشت بر روی MYPGP آگار و بلاد آگار: الف: کلنی‌های بدون پیگمان ب: کلنی‌های دارای پیگمان ج: کلنی‌های بدون همولیز هستند.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن 16S :

L: لدر/ -C: کنترل منفی/ +C: کنترل مثبت. چاهک‌های یک الی پنج نمونه‌های مثبت.



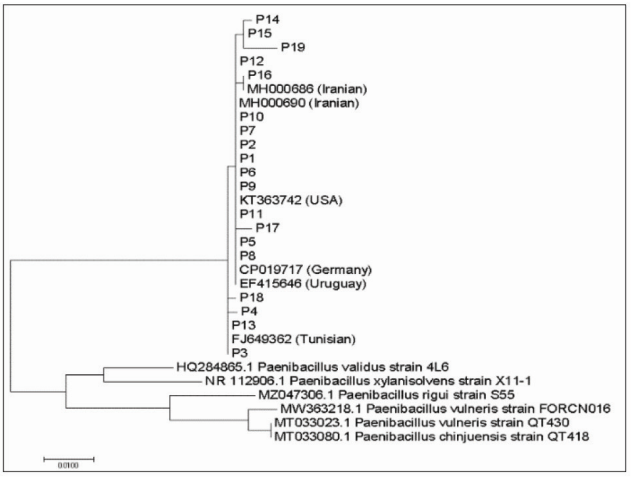
شکل ۳- نتایج الکتروفورز محصول Eric-PCR:

L: لدر/ -C: کنترل منفی. چاهک‌های یک و دو دارای ژنوتیپ I و بقیه چاهک‌ها دارای ژنوتیپ II هستند.

۱۰۰ ٪ بود. همانطور که در درخت مشخص است، ۱۹ سویه مطالعه شده با کد P۱ -P۱۹ نشان داده شده‌اند که در گروه *Paenibacillus larvae*، P۳, P۴, P۱۳, P۱۸ و سویه تونس با درصد اختلاف بسیار جزئی (حدود ۰/۰۰۲۵) از سایر گونه‌های *Paenibacillus larvae* مجزا شده‌اند و همین میزان اختلاف در گروه P۱۴, P۱۶, P۱۵, P۱۹ و MH۰۰۰۶۸۶ با سایر گونه‌های *Paenibacillus larvae* مشاهده شد. دیگر سویه‌ها که شامل P۱، P۲، P۵، P۶، P۷، P۸، P۹، P۱۰، P۱۱، P۱۲، P۱۷، MH۰۰۰۶۹۰، سویه آمریکا، سویه آلمان و سویه اروگوئه هستند، کاملاً مشابه هم بودند و هیچ‌گونه تفاوت و اختلاف در بین این سویه‌ها مشاهده نشده است. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌های مطالعه شده و شش سویه از پایگاه داده که شامل کشورهای آمریکا، آلمان، اروگوئه، تونس و دو سویه از ایران در یک گروه منوفیلتیک قرار دارند و با هم قرابت دارند که نشان از تشابه بسیار بالای آنها است (شکل ۴).

بحث

اعضای جنس *Paenibacillus*، از محیط‌های مختلف جدا شده‌اند. این باکتری‌ها نقش مهمی در خاک، حیوانات و گیاهان ایفا می‌کنند. بسیاری از گونه‌های *Paenibacillus* در صنعت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴،۱۲). علاوه بر گونه‌های متنوع و سودمند *Paenibacillus*، برخی از عوامل بیماریزای مهم حشرات نیز از اعضای این جنس هستند. مهم‌ترین گونه بیماریزا در حشرات، *Paenibacillus larvae* می‌باشد که عامل ایجاد کننده یک بیماری کشنده در لاروهای زنبورعسل (لوک آمریکایی) می‌باشد (۲۰،۱۲). هایندریکس و همکارانش *Paenibacillus larvae* را براساس تفاوت‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و اختلافات پاتولوژی بیماری به دو زیرگونه *P. l. larvae* و *P. l. pulvifaciens* طبقه‌بندی کردند (۱۳). زیرگونه *P. l. pulvifaciens* لاروهای آلوده را خیلی زود از بین می‌برد، بطوریکه دو روز پس از عفونت لاروها، سبب کشته شدن ۵۰ ٪ آنها و هفت روز پس از آن سبب کشته شدن ۱۰۰ ٪ آنها می‌شود (۱۰). در تعیین ژنوتیپ بر



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک ۱۹ سویه مطالعه شده (کدP۱- P۱۹).

اساس ERIC-PCR با پرایمرهای ERIC، ژنوتیپ‌های I و II مربوط به *P. l. larvae* و ژنوتیپ‌های III و IV مربوط به *P. l. pulvifaciens* می‌باشند. ژنوتیپ‌های I دو توکسین را بیان می‌کنند که توانایی حمله به اپیتلیوم روده را دارند (۸). ژنوتیپ‌های II و V یک لایه پروتئین به نام لایه S را بیان می‌کنند که واسطه چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده میانی است (۷).

به کار گرفتن تکنیک‌های استاندارد که امکان تمایز انواع مختلف سویه‌های *Paenibacillus larvae* را فراهم می‌آورد، برای مطالعه اپیدمیولوژی بیماری لوک آمریکایی ضروری است.

جنرش و همکارانش در آلمان سال ۲۰۰۶، با استفاده از ERIC-PCR، باکتری‌های *Paenibacillus larvae* را که از سوئد، فنلاند و آلمان منشأ گرفته بودند، مورد بررسی قرار دادند و چهار ژنوتیپ (I, II, III, IV) را شناسایی کردند (۱۰). دیپینتو و همکارانش در ایتالیا سال ۲۰۱۱، به بررسی ژنوتیپ‌های *Paenibacillus larvae* با روش ERIC-PCR، پرداختند و چهار الگو از نظر باند در الکتروفورز (ERIC A-D) مشاهده کردند (۵). روزنووا و همکارانش در سال ۲۰۱۳، در بلغارستان از سویه‌های *Paenibacillus larvae* جدا شده دو ژنوتیپ II و I را شناسایی کردند (۱۷). باسی و همکارانش در ایتالیا سال ۲۰۱۴، از ۱۱۷ سویه *Paenibacillus larvae*، ۱۰۱ سویه را به عنوان ژنوتیپ I و ۱۶ سویه را به عنوان ژنوتیپ II شناسایی کردند و در کشت سویه‌ها دو مورفوتیپ مختلف را نشان دادند. یک نوع بی‌رنگ و تا حدی شفاف و نوع دیگر دارای رنگدانه نارنجی بودند. در رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز همه سویه‌ها به شکل میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. در ارزیابی تخمیر قندهای سالیسین و مانیتول نشان داده شد که مانیتول توسط ۸۶/۶ ٪ از سویه‌های ژنوتیپ II و سالیسین توسط ۵ ٪ از سویه‌های ژنوتیپ I متابولیزه شدند (۲). یوکو و همکارانش در ژاپن سال ۲۰۱۶، برای اولین بار وجود ژنوتیپ II و I را در ژاپن نشان دادند. همچنین آنها هفت سویه *Paenibacillus larvae* را از نظر مورفولوژی کلنی و کشت بر روی J-agar و J´-agar، بررسی کردند که چهار سویه دارای رنگدانه نارنجی و سه سویه تا حدی شفاف و مایل به سفید بودند. هیچ‌کدام از نمونه‌ها بر روی بلاد آگار همولیز نشان ندادند. تمام سویه‌ها از لحاظ فعالیت کاتالاز منفی بودند. قند مانیتول، تنها توسط سویه‌های ژنوتیپ II تخمیر شدند، با این حال یکی از سویه‌های ژنوتیپ II توانایی استفاده از آن را نداشت. سالیسین توسط یک سویه از ژنوتیپ I تخمیر شد، اما سویه‌های دیگر فاقد توانایی متابولیسم آن بودند (۱۹). بایمز و همکارانش در آلمان سال ۲۰۲۰، از ۲۶ نمونه *Paenibacillus larvae* جدا شده از عسل، ۱۸ نمونه ژنوتیپ I و هشت نمونه ژنوتیپ II شناسایی کردند. همچنین یک سویه *Paenibacillus larvae* را که با ژنوتیپ‌های I-IV تفاوت داشت، ژنوتیپ جدید ERIC V در نظر گرفتند (۳).

برای اطمینان و تأیید سویه‌ها، با استفاده از پرایمرهای مربوط به توالی ژن ۱۶S rRNA آزمایش PCR انجام شد. نتایج تأیید کرد که همه نمونه‌ها *Paenibacillus larvae* بودند. نتایج بررسی درخت فیلوژنتیکی نشان داد که تمامی سویه‌های بررسی شده در یک گروه قرار گرفتند و تشابه بسیار بالایی داشتند. سایر گونه‌ها در شاخه‌های دیگری قرار گرفته‌اند که نشان از تفاوت و اختلاف آنها با گونه‌های *Paenibacillus larvae* می‌باشند.

برای تعیین ژنوتیپ سویه‌های *Paenibacillus larvae*، با استفاده از پرایمرهای ERIC1R و ERIC2 آزمایش ERIC-PCR انجام شد. نتایج حاکی از وجود پنج ژنوتیپ I و ۱۴ ژنوتیپ II در نمونه‌های مورد بررسی بودند. در الکتروفورز سویه‌های ژنوتیپ II یک باند شاخص در محدوده‌ی ۲۵۰۰ جفت‌باز وجود داشت. در سویه‌های ژنوتیپ I، الگوی الکتروفورز با سویه‌های شناسایی شده به عنوان ژنوتیپ II کاملاً یکسان بودند، ولی در ناحیه ۲۵۰۰ باندی وجود نداشت. همه سویه‌های ژنوتیپ I دارای کلنی‌های بدون پیگمان، بدون همولیز، تست کاتالاز دو سویه با تأخیر مثبت ضعیف و بقیه سویه‌ها کاتالاز منفی، عدم رشد در نوترینت براث، سالیسین مثبت و مانیتول منفی بودند. از سویه‌های ژنوتیپ II، دو سویه دارای کلنی‌های با پیگمان نارنجی و بقیه بدون پیگمان بودند. همه بدون همولیز، تست کاتالاز سه سویه با تأخیر مثبت ضعیف و بقیه سویه‌ها کاتالاز منفی، دارای رشد در نوترینت براث، سالیسین منفی و مانیتول مثبت بودند. این نتیجه با نتایج سایر محققین شباهت دارد. همچنین نتایج سویه‌های مطالعه شده از نظر تنوع ژنوتیپی با نتایج محققانی نظیره روزنووا، باسی، یوکو و بایمز که بر روی سویه‌های *Paenibacillus larvae* جدا شده از لاروهای بیمار، تلف شده و عسل انجام شد، یکسان بود. در این تحقیق نیز ژنوتیپ‌های ERIC I و ERIC II شناسایی شد و ژنوتیپ‌های ERIC III و ERIC IV در بین نمونه‌های بررسی شده وجود نداشتند. از میان محققین فوق تنها بایمز و همکارانش ژنوتیپ جدید ERIC V را از عسل تهیه شده از اسپانیا شناسایی کردند. فقط دیپینتو و جنرش بودند که از سویه‌های *Paenibacillus larvae* مورد بررسی، چهار الگوی مختلف (ERIC I, II, III, IV) را شناسایی کردند. اغلب تکنیک‌های مبتنی بر شناسایی خصوصیات فنوتیپی، قادر به شناسایی صحیح *Paenibacillus larvae* نیستند. تکنیک ERIC-PCR می‌تواند بین گونه‌های دارای ارتباط نزدیک به هم باکتری‌ها تمایز قائل شود و نتایج خوبی را نشان می‌دهد و با موفقیت در انگشت نگاری ژنتیک، طبقه‌بندی و تمایز سویه‌های بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی را مورد استفاده قرار گرفته است. در این مطالعه نیز، علاوه بر انجام ERIC-PCR، مورفولوژی کلنی و برخی خصوصیات بیوشیمیایی *Paenibacillus larvae* جدا شده از لاروهای بیمار ارزیابی شد و این نتایج با نتایج حاصل از انگشت نگاری ژنتیک DNA مقایسه شد. مشخص شدن خصوصیات باکتری‌های جدا شده در ایران از جمله ژنوتیپ، خصوصیات بیوشیمیایی و مقاومت آنتی-بیوتیکی آنها، برای کنترل بهتر بیماری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه نوع ژنوتیپ بر روی عفونت *Paenibacillus larvae* تأثیر دارد و عفونت‌های چند ژنوتیپی کلنی‌ها یا زنبورستان‌ها، می‌توانند با تأثیر بر نوع و سرعت رشد علائم بالینی، پیچیدگی عفونت‌های لارو را افزایش دهند. بنابراین شناسایی دقیق ژنوتیپ‌های *Paenibacillus larvae* توسط آزمایشگاه‌های تشخیصی برای مقابله با این بیماری مهم است. یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند برای آموزش دامپزشکان، کارکنان ترویجی، بازرسان زنبورعسل و زنبورداران مفید باشد. این روش‌ها به دانشمندان این امکان را می‌دهد تا شیوع بیماری را مشخص کنند، منبع عفونت را تعیین کنند، رابطه بین شیوع بیماری‌ها را تشخیص دهند، سویه‌های بیشتر بیماری‌زا را بشناسند و راهکارهای پیشگیری و درمانی را طراحی کنند. شناسایی بیماری لوک آمریکایی و مدیریت کارآمد، امکان کاهش خسارت‌های اقتصادی برای زنبورداران را فراهم می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با استفاده از روش ERIC-PCR امکان تعیین تنوع ژنوتیپی سویه‌های *Paenibacillus larvae* برای اولین بار در ایران فراهم شد. نتایج حاکی از وجود ژنوتیپ‌های ERIC I و ERIC II در ایران می‌باشد. همچنین ۱۴ سویه ژنوتیپ II (۷۳/۷ ٪) و ۵ سویه ژنوتیپ I (۲۶/۳ ٪) را نشان دادند.

به طور کلی در این مطالعه پنج سویه که ژنوتیپ I بودند، در صورتی که رفتار بهداشتی زنبور عسل خوب باشد (عوامل مؤثر در رفتار بهداشتی: تغذیه مناسب کندو، تعویض به موقع ملکه‌ها، مدیریت صحیح بهداشتی، مناطق دارای شهد و گرده فراوان و... می‌باشند.) به دلیل روند کندتر و آهسته‌تر بیماری (۱۲ روز) دیرتر باعث مرگ و میر لاروها در سلول می‌شوند و در نتیجه قدرت بیماریزایی کمتری دارند و آسان‌تر می‌توان با این بیماری مقابله کرد. اما ۱۴ سویه دیگر که ژنوتیپ II بودند، اگر رفتار بهداشتی زنبور عسل ضعیف باشد، به دلیل قدرت بیماریزایی بیشتر و سریعتر (هفت روز)، نسبت به سویه‌های ژنوتیپ I زودتر باعث مرگ و میر لاروها می‌شوند. در نتیجه کنترل این بیماری سخت‌تر از سویه‌های ژنوتیپ I است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری سازمان دامپزشکی کشور برای انجام هماهنگی‌های لازم برای نمونه‌گیری در استان‌های مختلف قدردانی می‌شود. از تمامی دامپزشکان که در کار فیلدی این مطالعه همکاری نمودند و همه زنبوردارانی که از زنبورستان‌های آن‌ها نمونه‌گیری شد، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از زحمات کارکنان آزمایشگاه تشخیص بیماری‌های زنبورعسل موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به دلیل انجام آزمایش‌های مربوطه قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع مورد استفاده

1. Alippi, A. M., A. C. Lopez, F. J. Reynaldi, D. H. Grasso and O. M. Aguilar. 2007. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honey bees. *Veterinary Microbiology* 125 (3) 4: 290-303.

2. Bassi, S., G. Formato, M. Milito, K. Trevisiol, C. Salogni and E. Carra. 2014. Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus larvae* isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Veterinary Quarterly*, Vol. 35, pp. 27-32.

3. Beims, H., B. Bunk, S. Erler, K. I. Mohr, C. Spröer, S. Pradella, G. Günther, M. Rohde, W. v. d. Ohe and M. Steinert. 2020. Discovery of *Paenibacillus larva* ERIC V: Phenotypic and genomic

comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology* 310: 151394.

4. De Graaf, D. C., A. M. Alippi, K. Antunez, K. A. Aronstein, G. Budge, D. De Koker, L. De Smet, D. W. Dingman, J. D. Evans, L. J. Foster, A. Funfhaus, E. Garcia-Gonzalez, A. Gregorc, H. Human, K. D. Murray, B. K. Nguyen, L. Poppinga, M. Spivak, D. Van Engelsdorp, S. Wilkins and E. Genersch. 2013. Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52.

5. Di Pinto, A., L. Novello, V. Terio and G. Tantillo. 2011. ERIC-PCR Genotyping of *Paenibacillus larvae* in Southern Italian Honey and Brood Combs. *Current Microbiology* 63: 416–419.

6. Djukic, M., E. Brzuszkiewicz, A. Fünfhaus, J. Voss, K. Gollnow, L. Poppinga, H. Liesegang, E. Garcia-Gonzalez, E. Genersch and R. Daniel. 2014. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLOS ONE,* Vol. 9, Issue. 3.

7. Ebeling, J., H. Knispel, G. Hertlein, A. Fünfhaus and E. Genersch. 2016. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100: 7387–7395.

8. Fünfhaus, A., L. Poppinga and E. Genersch. 2013. Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Environmental Microbiology* 15: 2951–2965.

9. Genersch, E., A. Ashiralieva and I. Fries. 2005. strain and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae, a bcterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 71, no. 11, pp. 7551–7555.

10. Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikainen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski and I. Fries. 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.

11. Genersch, E. 2010. American Foulbrood in honey bees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *The Journal of Invertebrate Pathology* 103: 10–19.

12. Grady, E. N., J. MacDonald and L. Liu. 2016. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review. *Microbial Cell Factories* 15: 203.

13. Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke and B. Hoste. 1996. Reclassification of *Paenibacillus pulvifaciens* as a subspecies of P. larvae, with emended descriptions of P. larvae as *P. larvae subsp*. *Larvae* and *P. larvae subsp. pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270–279.

14. Liang, T. W and S. L. Wang. 2015. Recent advances in exopolysaccharides from Paenibacillus spp: production, isolation, structure, and bioactivities. *Mar Drugs* 13: 1847–1863.

15. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018. American foulbrood of the honey bee. Chapter 3.2.2.

16. Piccini, C., B. D'Alessandro, K. Antunez and P. Zunino. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae subsp. Larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *The World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 761-765.

17. Rusenova, N., P. Parvanov and S. Stanilova. 2013. Molecular Typing of *Paenibacillus larvae* Strains Isolated from Bulgarian Apiaries Based on Repetitive Element Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR). *Current Microbiology*.

18 Versalovic, J., M. Schneider, F. J. De Bruijn and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular cell biology* 5: 25-40.

19. Yuko, H., S. Toshinari, I. Nanami, M. Naokazu and T. Daisuke. 2016. Existence of *Paenibacillus larvae* genotypes ERIC I-ST2, ERIC I-ST15 and ERIC II-ST10 in the western region of Aichi prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 78 (7): 1195-1199.

20. Yousten, A. A and J. L. Capinera. 2018. Encyclopedia of entomology. Dordrecht Springer, pp. 2718–2719.