DOI: 10.22092/VJ.2022.358709.1974
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اپیدمیولوژی مولکولی شش ویروس بیماریزای زنبور عسل در زنبورستان‌های هشت استان ایران

• **مجتبی محرمی(نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **حسین مدیرروستا**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **مریم ترکمن**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **حمیدرضا جلالی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
• **کامیار احمدی**
سازمان دامپزشکی کشور
• **محمدحسین فلاح مهرآبادی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان ترویج آموزش و تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۰۳-۰۳-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۲۲-۰۵-۱۴۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۲-۰۵-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۰۱-۰۴-۱۴۰۲
Email: mojmoharrami@yahoo.com

چکیده

کاهش کلنی‌های زنبورعسل در سال‌های اخیر موضوعی نگران‌کننده در صنعت زنبورداری و کشاورزی بوده است. یکی از عمده‌ترین علل تلفات کلنی‌ها، وقوع عفونت با ویروس‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر، اپیدمیولوژی مولکولی شش ویروس بیماریزای زنبورعسل شامل ویروس تغییر شکل‌دهنده بال، ویروس فلجی مزمن، ویروس فلجی حاد، ویروس سیاه شدن سلول ملکه، ویروس نوزاد کیسه‌ای و ویروس کشمیر زنبورعسل در زنبورستان‌های هشت استان کشور شامل فارس، سیستان و بلوچستان، کرمان، هرمزگان، بوشهر، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد و خوزستان مورد مطالعه قرار گرفت. ۴۵ نمونه زنبورعسل جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی با روش RT-PCR بررسی شدند و محصول PCR روي ژل آگارز ۱/۲ ٪ الکتروفورز شد. همچنین، از محصول PCR موارد مثبت برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج برای ویروس تغییر شکل‌دهنده بال (۳۷/۷ ٪) ۱۷، ویروس فلجی مزمن (۳۵/۵ ٪) ۱۶، ویروس سیاه شدن سلول ملکه (۱۳/۳ ٪) ۶ و ویروس فلجی حاد (۲/۲ ٪) ۱ مثبت بودند، درحالی‌که، ویروس نوزاد کیسه‌ای و ویروس کشمیر شناسایی نشدند. بیشترین درصد ویروس فلجی مزمن (۱۰۰ ٪) در نمونه‌های استان کرمانشاه و بیشترین درصد ویروس سیاه شدن سلول ملکه (۶۲/۵ ٪) و ویروس تغییر شکل‌دهنده بال (۷۵ ٪) در نمونه‌های استان فارس مشاهده شدند. ویروس فلجی حاد (۱۴/۲۹ ٪) فقط در نمونه‌های استان هرمزگان مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که مطالعات اپیدمیولوژیک ویروس‌های زنبورعسل برای دانستن پویایی شیوع ویروس‌ها حیاتی بوده و می‌تواند اطلاعات کلیدی را برای طراحی برنامه‌های نظارتی علیه این تهدیدات زنبورداری فراهم کند.

کلمات کلیدی: زنبور عسل، اپیدمیولوژی مولکولی، ویروس‌های بیماریزا، RT-PCR، هشت استان ایران

Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 52-59

Molecular epidemiology of six pathogenic viruses in apiaries of eight provinces of Iran

By: Moharrami, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Modirrousta, H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Torkaman, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Jalali, H.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Ahmadi, K., Iran Veterinary Organization. and Fallah Mehrabadi, M.H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: 2022-05-24 **Accepted: 2022-08-13**
Revised: 2022-08-03 **Published:2023-07-22**

Email: mojmoharrami@yahoo.com

Reduction of honey bee colonies in recent years has been a matter of concern in the beekeeping and agricultural industries. One of the main causes of mortality in colonies is infection with viruses. In the present study, the molecular epidemiology of six honey bee pathogenic viruses, which are deformed wing virus (DWV)و acute bee paralysis virus (ABPV), chronic bee paralysis virus (CBPV), black queen cell virus (BQCV), Sacbrood virus (SBV) and Kashmir bee virus (KBV) and was studied in apiaries of eight provinces of the country (Fars, Sistan and Blouchestan, Kerman, Hormozgan, , Bushehr, Kermanshah, Kohkilouyeh and Boyer Ahmad and Khouzestan). 45 samples of honey bees were collected. Samples were examined by RT-PCR method and the PCR product was electrophoresed on a 1.2% agarose gel. Also, PCR products of positive samples were sent for sequencing. Results were positive for deformed wing virus 17 (37.7%), chronic bee paralysis virus 16 (35.5%), black queen cell virus 6 (13.3%) and acute bee paralysis virus 1 (2.2%) , but no sacbrood virus and keshmir bee virus were detected. The highest percentage of chronic paralysis virus (100%) was observed in samples of Kermanshah province and the highest percentage of black queen cell virus (62.5%) and deformed wing virus (75%) were observed in samples of Fars province. Acute paralysis virus (14.29%) was observed only in samples of Hormozgan province. The results of this study showed that epidemiological studies of honey bee viruses are vital to know the dynamics of virus prevalence and can provide key information for designing surveillance programs against these beekeeping threats.

Keyword: Honey bees, Molecular epidemiology, Pathogenic viruses, RT-PCR, Iran.

مقدمه

زنبوران عسل با گرده افشانی روی انواع محصولات و گل‌ها نقش حیاتی در کشاورزی دارند و خدمات کلیدی در اکوسیستم انجام می‌دهند (۴). حدود یک سوم محصولات کشاورزی در جهان به گرده افشانی زنبوران عسل بستگی دارد. در سال ۲۰۰۵ ارزش اقتصادی جهانی گرده افشانی حشرات ۲۱۲ میلیارد دلار در سال تخمین زده شد که معادل ۹/۵ ٪ از ارزش اقتصادی کل تولیدات کشاورزی جهان برای مصرف انسان است. چند سالی است که نگرانی‌ها در مورد سلامت زنبور عسل و در نتیجه تأثیر آن بر اقتصاد جهانی افزایش یافته است. جمعیت زنبورهای عسل در آمریکای شمالی و اروپا طی۳۰ سال گذشته رو به کاهش بوده است. در سال ۲۰۰۶ پدیده‌ای به نام اختلال فروپاشی کلنی (CCD) ظهور کرد. زنبورداران و دانشمندان متوجه شدند که تعداد زیادی از زنبورهای عسل بالغ کلنی خود را ترک می‌کردند و به کندو باز نمی‌گشتند که پیامدهای زیان‌باری برای کشاورزان و پرورش‌دهندگان زنبورهای عسل داشت. مطالعات نشان داد که عوامل متعددی در CCD نقش دارند که شامل انگل‌ها، پاتوژن‌ها، آفت‌کش‌ها و عوامل محیطی استرس‌زا می‌باشند (۱۲). ویروس‌ها از مهم‌ترین تهدیدات برای سلامت زنبورهای عسل هستند. شایع‌ترین ویروس‌های زنبورعسل به راسته *Picornavirales*، و خانواده‌های *Dicistroviridae* و *Iflaviridae* تعلق دارند و قادرند مراحل مختلف رشد زنبورهای عسل از جمله تخم، لارو، شفیره و زنبور بالغ را آلوده کنند. ویروس‌های زنبور عسل معمولاً به‌عنوان عفونت‌های نامشخص باقی می‌مانند و نشانه‌ای از بیماری ایجاد نمی‌کنند، اما می‌توانند در شرایط خاص، عمر زنبورهای آلوده را کوتاه کنند و یا باعث بیماری جدی یا کشنده در زنبورهای عسل یا فروپاشی کل کلنی‌ها شوند (۲).

به طور خاص، هفت مورد از این ویروس‌ها عامل بیماری شدید در زنبورهای عسل هستند و زنبورداری جهان را تهدید می‌کنند که عبارتند از: ویروس فلجی حاد زنبورعسل (ABPV)، ویروس سیاه شدن سلول ملکه (BQCV)، ویروس فلجی مزمن زنبورعسل (CBPV)، ویروس

تغییردهنده شکل بال (DWV)، ویروس فلجی حاد اسرائیلی (IAPV)، ویروس کشمیر زنبورعسل (KBV) و ویروس نوزاد کیسه‌ای (SBV) (۷). ویروس تغییردهنده شکل بال به طور گسترده در سراسر جهان توزیع شده است. عفونت با این ویروس، شیوع بیشتری نسبت به سایر ویروس‌های زنبورعسل دارد. بیماری‌زایی این ویروس کم بوده و اغلب مسئول عفونت‌های نهفته است و پس از یک موقعیت استرس‌زا مانند آلودگی بالا با مایت واروآ دستراکتور، کمبود منابع غذایی یا مدیریت اشتباه زنبورداری، قادر است تمام مراحل رشد زنبورها از تخم تا زنبور بالغ را آلوده کند (۲).

ویروس نوزاد کیسه‌ای بر روی نوزادان زنبورهای عسل با تکثیر زیاد باعث تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی می‌شود که منجر به مرگ لارو می‌گردد. ارتباط مثبت بین شیوع SBV در نمونه‌های مایت واروآ و حضور SBV در نمونه‌های زنبور بالغ، سبب می‌شود تا نقش احتمالی برای واروآ به عنوان ناقل این عفونت در نظر گرفته شود (۲).

ویروس سیاه شدن سلول ملکه از لاروها و شفیره‌های ملکه که در سلول‌های در بسته خود مرده بودند، جدا شده و نشان داده شد که شایع‌ترین علت مرگ لارو ملکه می‌باشد. همچنین، گزارش شده است که در کلنی‌های آلوده، BQCV در زنبورهای بالغ، نسبت به شفیره شیوع بیشتری دارد (۱۰).

ویروس فلجی حاد عامل عفونی رایج زنبورهای عسل است و اغلب در کلنی‌های به ظاهر سالم از سراسر جهان شناسایی شده است. (۱). علائم بیماری شامل لرزش، ناتوانی در پرواز و تیره شدن تدریجی و ریزش مو از ناحیه سینه و شکم و مرگ سریع زنبوران بالغ می‌باشد.ABPV می‌تواند به تمام مراحل زنبورعسل حمله کند، اما مطلوب‌ترین میزبان برای تکثیر ویروس، شفیره‌ها هستند. ABPV به‌عنوان عامل اصلی شرکت در مرگ و میر زنبورهای عسل آلوده به واروآ دستراکتور تعیین شده است و همچنین علت اصلی مرگ و میر در کلنی‌های ضعیف شده می‌باشد (۵).

ویروس کشمیر زنبورعسل به عنوان یکی از چندین ویروس مرتبط با فروپاشی کلنی در زنبورستان‌های آلوده به مایت واروآ دستراکتور اهمیت بیشتری پیدا کرده است. KBV از نظر ژنتیکی و سرولوژیکی به ABPV نزدیک است و تمام مراحل زندگی زنبور عسل را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵).

ویروس فلجی مزمن می‌تواند در طول سال‌ها به‌عنوان یک عفونت پنهان باقی بماند، اما ممکن است در سطوح بالایی تکثیر شود و باعث عفونت آشکار با تلفات قابل‌توجه در کلنی‌ها گردد. کمبود منابع غذایی، زمستان‌های سخت یا شرایط نامساعد آب و هوایی در تابستان ممکن است باعث ایجاد این شیوع شود. عفونت با CBPV حتی در یک کلنی می‌تواند به صورت دو سندرم مختلف مشاهده گردد. لرزش غیرطبیعی بدن و بال‌ها، شکم متورم و بال‌هایی که ناتوان در پرواز هستند متداول‌ترین علائم هستند. سندرم دیگر با زنبورهایی که بدن آنها بدون مو، براق و سیاه است ظاهر می‌شود و آنها کوچکتر از زنبورهای سالم و با شکم نسبتاً پهن‌تر به نظر می‌رسند (۱۴).

در مطالعه حاضر، اپیدمیولوژی مولکولی شش ویروس بیماریزای زنبور عسل در زنبورستان‌های هشت استان کشور به منظور بررسی توزیع و فراوانی بیماری‌های ناشی از این ویروس‌ها، مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در اسفند ۱۳۹۹ و فروردین ۱۴۰۰، از زنبوران بالغ زنبورستان‌های هشت استان کشور توسط سازمان دامپزشکی انجام شد. تعداد نمونه از هر استان طبق جداول آماری تعیین گردید و در مجموع از ۴۵ زنبورستان در هشت استان نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها با استفاده از زنجیره سرد به آزمایشگاه بخش زنبورعسل موسسه رازی منتقل گردید.

آماده‌سازی نمونه

جهت آماده‌سازی نمونه برای استخراج RNA، از هر زنبورستان تعداد ۴۰ عدد زنبور بالغ، در هاون‌های چینی استریل قرار داده شد و به آن آب دیس اضافه و خوب همگن گردید. محلول همگن، در g ۲۰۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برای استخراج RNA جمع‌آوری گردید.

استخراج RNA

با استفاده از کیت RNA Isolation Hybrid-R (305-101) از شرکت GeneAll کره جنوبی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج انجام گردید.

سنتز cDNA

با استفاده از کیت 2X RT Pre-Mix از شرکت Bio Fact کره جنوبی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده در حجم ۲۰ µl شامل: ۰/۵ µg - ۱۰ ng از RNA ، ۱ میکرولیتر پرایمر (الیگو dt یا هگزامر) و آب و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید.

واکنش PCR

در حجم ۲۵ µl شامل: مستر میکس ۱۲/۵ µl(Taq DNA Polymerase Mix Red -Ampliqon)، پرایمر F و R از هر کدام ۱ µl، cDNA ۵ µl، آب مقطر ۵/۵ µl تهیه شد. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول یک آمده است (۲).

مرحله واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل شامل: مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله ساخت در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و سپس مرحله ساخت نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه اجرا شد.

الکتروفورز

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ ٪، حاوی سیف استین الکتروفورز گردید. برای تعیین وزن مولکولی از لدر kb ۱ استفاده شد و روي دستگاه "یو- وی ترانس ایلومیناتور" باندها مشاهده و سپس از ژل عکس‌برداری انجام شد. جهت تأیید، از موارد مثبت برای تعیین توالی ارسال شد.

نتایج

بر اساس نتایج مطالعه، بیشترین شیوع مربوط به ویروس DWV با ۳۷/۷٪ و CBPV با ۳۵/۵ ٪ بود که از لحاظ آماری شیوع معنی‌داری نسبت به سایر ویروس‌های مطالعه شده نشان داد (P<۰/۰۵). کمترین میزان شیوه مربوط به ویروس فلجی حاد با ۲/۲ ٪ بود (P<۰/۰۵) و فقط در یک استان مشاهده شد. در هیچ یک از نمونه‌ها ویروس‌های SBV و KBV شناسایی نشدند. فراوانی و فراوانی نسبی شناسایی شش ویروس زنبورعسل در نمونه‌های دریافتی، در جدول ۲ و شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج ژل الکتروفورز برخی از نمونه‌های مثبت در شکل ۲ دیده می‌شود.

بحث

کاهش کلنی‌های زنبورعسل در سال‌های اخیر موضوعی نگران‌کننده در صنعت زنبورداری و کشاورزی است. عمده‌ترین علت تلفات کلنی‌ها، وقوع عفونت با ویروس‌ها می‌باشد. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که تأثیر سندرم‌های مختلف ناشی از ویروس زنبورعسل یک تهدید جهانی برای زنبورداری است. درک بهتر اپیدمیولوژی ویروس‌ها برای دانستن پویایی شیوع ویروس حیاتی بوده و ممکن است بحران کنونی گرده افشان‌های جهان را روشن کند.

درمان‌های احتمالی علیه عفونت‌های ویروسی در زنبورهای عسل قبلاً هرگز به طور جدی مورد توجه قرار نگرفته است. روش‌های مختلفی برای مبارزه با بیماری‌های ویروسی زنبورعسل شرح داده شده‌اند که شامل: انتخاب زنبورهای مقاوم به بیماری، تداخل RNA و جلوگیری از معرفی پاتوژن جدید است. انتظار نمی‌رود هیچ یک از این رویکردها منجر به افزایش سلامت زنبورعسل در کوتاه مدت شود. بنابراین، دانش عمیق از جنبه‌های مختلف عفونت‌های ویروسی و به ویژه راه‌های مختلف انتقال و عوامل مختلف فعال‌سازی عفونت‌های بدون علامت، مانند عفونت‌های همزمان با باکتری یا انگل و تأثیر مواد شیمیایی منتشر شده در محیط یا در کمبودهای رژیم غذایی برای تحقق یک برنامه کنترل موثر بیماری بسیار مهم است.

تشخیص عفونت‌های ویروسی زنبورعسل دشوار است، زیرا ویروس‌های زنبورعسل معمولاً به‌عنوان عفونت‌های نامشخص باقی می‌مانند و هیچ علامت آشکاری از بیماری ایجاد نمی‌کنند. همچنین کلنی‌های زنبور عسل می‌توانند از عفونت‌های ویروسی متعدد بدون نشان دادن علائم پاتولوژیک رنج ببرند در نتیجه تشخیص‌ها را مخدوش کنند. بنابراین، تشخیص سریع و دقیق عفونت ویروسی، جزء حیاتی برنامه‌های نظارت و کنترل بیماری زنبورعسل است. از آنجایی‌که کشت سلولی با منشأ زنبورعسل در دسترس نیست، تنها راه جداسازی و تکثیر مصنوعی ویروس‌ها، عفونت تجربی شفیره‌ها است. علاوه بر این، از آنجایی که زنبورها آنتی‌بادی علیه پاتوژن‌ها تولید نمی‌کنند، تعیین غیرمستقیم

جدول ۱ - پرایمرهای استفاده شده.

ABPV ویروس فلجی حاد	F: ۵'- GTG CTA TCT TGG AAT ACT AC۳-' R: ۵'- AAG GYT TAG GTT CTA CTA CT۳-'	7928-7947 8527-8546	۶۱۸ bp
BQCV ویروس سیاه شدن سلول ملکه	F: ۵'- AGT AGT TGC GAT GTA CTT CC۳-' R: ۵'- CTT AGT CTT ACT CGC CAC TT۳-'	252-271 710-729	۴۷۷ bp
SBV ویروس نوزاد کیسه‌ای	F: ۵'- ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG۳-' R: ۵'- CCT TGG AAC TCT GCT GTG TA۳-'	221-240 689-708	۴۸۷ bp
CBPV ویروس فلجی مزمن	F: ۵'- TGT CGA ACT GAG GAT CTT AC۳-' R: ۵'- GAC CTG ATT AAC GAC GTT AG۳-'	111-130 407-426	۳۱۵ bp
DWV ویروس نقص بال	F: ۵'- ATT GTG CCA GAT TGG ACT AC۳-' R: ۵'- AGA TGC AAT GGA GGA TAC AG۳-'	2345-2364 2760-2779	۴۳۴ bp
KBV ویروس کشمیر	F: ۵'- GAT GAA CGT CGA CCA ATT GA۳-' R: ۵'- TGT GGG TTG GCT ATG AGT CA۳-'	5406-5425 5781-5800	۳۹۴ bp

عفونت‌های ویروسی امکان‌پذیر نیست. میکروسکوپ الکترونی و روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص مقادیر بسیار کم آنتی‌ژن ویروسی در نمونه‌های میدانی با مشکلاتی همراه است. در سال‌های اخیر، توسعه سنجش‌های زیست مولکولی رویکردی سریع، حساس و خاص برای شناسایی ویروس‌های زنبورعسل ارائه کرده است. این سنجش‌ها، قادر به تشخیص عفونت‌های نهفته کلنی هستند. در غیاب بررسی‌های اپیدمیولوژیک و پروتکل‌های اختصاصی، ظهور احتمالی بیماری‌های ویروسی زنبورهای عسل و تأثیر آنها ممکن است نادیده گرفته شده و ارزیابی آنها غیرممکن باشد. مطالعات اپیدمیولوژیک می‌تواند اطلاعات کلیدی را برای طراحی برنامه‌های نظارتی علیه یکی از تهدیدهای اصلی زنبورداری در سراسر جهان ارائه دهد.

تلفات و کاهش کلنی‌های زنبور عسل در سطح جهانی منجر به افزایش علاقه و بررسی هر گونه تهدید برای سلامت زنبورعسل در کشور ما نیز شده است. ویروس‌های زنبورعسل از جمله پاتوژن‌هایی هستند که می‌توانند سلامت یک کلنی را مورد تهدید قرار دهند. زنبورداران باید از ویروس‌های زنبورعسل و همچنین سایر ارگانیسم‌های عامل بیماری آگاه باشند تا در صورت امکان تأثیر این بیماری‌ها را به حداقل برسانند. هنگامی که علائم ویروس در زنبورهای عسل مشاهده می‌شود، در بیشتر موارد با عامل عفونی دیگری همراه است. عفونت‌های ویروسی با حضور انگل‌های نوزما و واروآ ارتباط قوی دارند. این انگل‌ها در فرآیند تغذیه از لارو یا زنبور بالغ، فرصتی برای ورود ذرات ویروسی به بدن زنبور ایجاد می‌کنند. در این شرایط، ذرات ویروس راحتتر قادر به تکثیر و انتشار هستند. عوامل دیگری که تأثیر ویروس‌ها را افزایش می‌دهند استرس‌های محیطی و تغذیه‌ای می‌باشند.

گاموسوا و همکاران سال ۲۰۱۰ در ترکیه، از نمونه‌های ۲۸ زنبورستان از شش استان منطقه دریای سیاه، سه ویروس زنبورعسل شامل فلجی حاد، فلجی مزمن و سیاه شدن سلول ملکه را مورد ارزیابی قراردادند. نتیجه بررسی آنها، برای ویروس فلجی مزمن ۲۵ ٪ و برای ویروس سیاه شدن سلول‌های ملکه ۲۱ ٪ مثبت بود، اما ویروس فلجی حاد در کندوها قابل‌شناسایی نبود (۸).

تاپلاک و همکاران سال ۲۰۱۲ در اسلوونی، در ۶۰ نمونه مربوط به ۴۵ زنبورستان، حضور شش ویروس زنبورعسل را بررسی کردند. نتیجه بررسی آنها برای ویروس تغییر شکل‌دهنده بال۷۰ ٪، ویروس سیاه شدن سلول ملکه ۸۳/۳ ٪، ویروس فلجی حاد ۴۰ ٪، ویروس فلجی مزمن ۱۸/۳ ٪، ویروس نوزاد کیسه‌ای ۸/۳ ٪ و ویروس کشمیر ۱/۷ ٪ مثبت بودند (۱۶).

رادریگز و همکاران سال ۲۰۱۴ در منطقه بیبیو در شیلی، به شناسایی ویروس فلجی حاد، ویروس سیاه شدن سلول ملکه و ویروس تغییر شکل‌دهنده بال در نمونه‌های شفیره و زنبورهای بالغ از ۶۰ زنبورستان پرداختند. نتیجه بررسی آنها برای ویروس تغییر شکل‌دهنده بال ۴۲ ٪، ویروس سیاه شدن سلول ملکه ۱۰ ٪، ویروس فلجی حاد ۲ ٪ مثبت بود (۱۵).

در مطالعه قرآنی و همکاران سال ۲۰۱۷ از بررسی ۸۹ زنبورستان در استان‌های مازندران، هرمزگان، کردستان و خراسان رضوی که دارای علائم کاهش جمعیت، فروپاشی ناگهانی، فلجی یا زنبوران دارای رنگ تیره بودند ویروس تغییر شکل‌دهنده بال ۱۷/۷۹ ٪، ویروس فلجی حاد

جدول ۲- فراوانی و فراوانی نسبی ویروس‌های مورد مطالع به تفکیک استان و نوع بیماری در زنبورستان‌های کشور ۱۴۰۰-۱۳۹۹.

ردیف	نام استان	تعداد نمونه	بیماری‌های ویروسی					
			ABPV	CBPV	DWV	BQCV	SBV	KBV
۱	فارس	۸	۰	۱(٪ ۱۲/۵)	۶(٪ ۷۵)	۵(٪ ۶۲/۵)	۰	۰
۲	سیستان و بلوچستان	۴	۰	۰	۲(٪ ۵۰)	۰	۰	۰
۳	بوشهر	۴	۰	۰	۲(٪ ۵۰)	۰	۰	۰
۴	کهگیلویه و بویر احمد	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	کرمان	۷	۰	۵(٪ ۷۱/۴۳)	۳(٪ ۴۲/۸۶)	۱(٪ ۱۴/۲۹)	۰	۰
۶	خوزستان	۱۱	۰	۵(٪ ۴۵/۴۵)	۰	۰	۰	۰
۷	هرمزگان	۷	۱(٪ ۱۴/۲۹)	۳(٪ ۴۲/۸۶)	۳(٪ ۴۲/۸۶)	۰	۰	۰
۸	کرمانشاه	۲	۰	۲(٪ ۱۰۰)	۱(٪ ۵۰)	۰	۰	۰
جمع تعداد نمونه‌ها		۴۵	۱	۱۶	۱۷	۶	۰	۰
درصد نمونه‌های مثبت			٪۲/۲	٪۳۵/۵	٪۳۷/۷	٪۱۳/۳	۰	۰

۳/۳۷ ٪، ویروس فلجی مزمن ۳/۳۷ ٪ شناسایی شدند ولی نتایج در مورد ویروس نوزاد کیسه‌ای، ویروس کشمیر و ویروس سیاه شدن سلول ملکه منفی بود (۶).

در مطالعه محرمی و همکاران سال ۲۰۱۸، از ۱۶۰ نمونه دریافتی از ۲۳ استان کشور، ویروس کشمیر ۴/۵ ٪، ویروس فلجی حاد ۵/۸ ٪، ویروس فلجی مزمن ۷/۸ ٪، ویروس نوزاد کیسه‌ای ۱۸/۵ ٪، ویروس نقص بال ۲۱/۸ ٪ و ویروس سیاه شدن سلول ملکه ۲۵/۶ ٪ شناسایی کردند (۱۱).

در مطالعه خضری و همکاران سال ۲۰۱۹، از ۵۰ زنبورستان در استان کردستان ۲۶ ٪ ویروس فلجی حاد شناسایی کردند (۹).

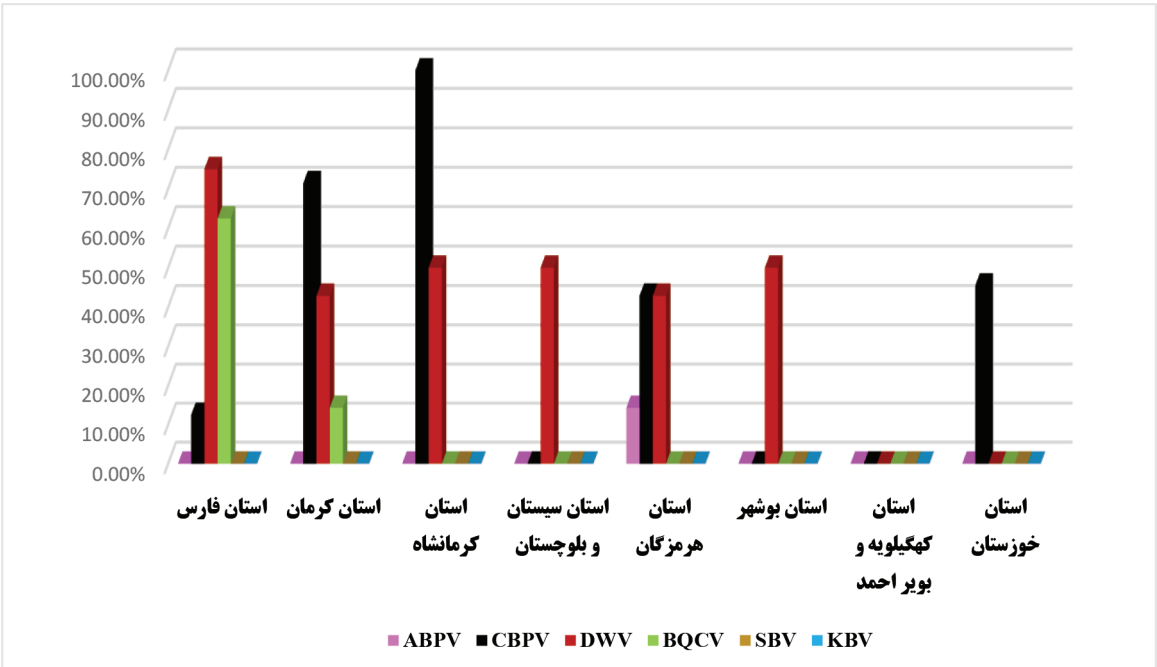
در این مطالعه ۴۵ زنبورستان مربوط به هشت استان کشور از نظر شش ویروس بیماریزای زنبور عسل بررسی شدند که نتایج برای ویروس تغییر شکل‌دهنده بال (۳۷/۷ ٪) ۱۷، ویروس فلجی مزمن (۳۵/۵ ٪) ۱۶، ویروس سیاه شدن سلول ملکه (۱۳/۳ ٪) ۶ و ویروس فلجی حاد (۲/۲ ٪) ۱ مثبت بودند ولی ویروس نوزاد کیسه‌ای و ویروس کشمیر شناسایی نشدند.

ویروس فلجی حاد فقط در استان هرمزگان و در ۱۴/۲۹ ٪ از نمونه‌ها شناسایی گردید. ویروس سیاه شدن سلول ملکه از نمونه‌ها استان فارس ۶۲/۵ ٪ و از نمونه‌های استان کرمان ۱۴/۲۹ ٪ شناسایی گردید. ویروس تغییر شکل‌دهنده بال از نمونه‌های استان فارس ۷۵ ٪، از نمونه‌های استان‌های سیستان و بلوچستان و کرمانشاه هر کدام ۵۰ ٪ و از نمونه‌های استان‌های کرمان و هرمزگان هرکدام ۴۲/۸۶ ٪ شناسایی شد. ویروس فلجی مزمن از نمونه‌های استان کرمانشاه ۱۰۰ ٪، از نمونه‌های استان کرمان ۷۱/۴۳ ٪، از نمونه‌های استان خوزستان ۴۵/۴۵ ٪، از نمونه‌های استان هرمزگان ۴۲/۸۶ ٪ و از نمونه‌های استان فارس ۱۲/۵ ٪ شناسایی شد. بیشترین درصد ویروس فلجی مزمن (۱۰۰ ٪) در نمونه‌های استان کرمانشاه و بیشترین درصد ویروس سیاه شدن سلول ملکه (۶۲/۵ ٪) و ویروس تغییر شکل‌دهنده بال (۷۵ ٪) در نمونه‌های استان فارس مشاهده شدند.ویروس فلجی حاد (۱۴/۲۹ ٪) فقط در نمونه‌های استان هرمزگان مشاهده شد.

هدف اصلی این مطالعه به دست آوردن بینشی در مورد شیوع فعلی شش ویروس بیماری‌زای زنبور عسل در زنبورستان‌های هشت استان کشور بود. نتایج این مطالعه شیوع نسبتاً بالایی از ویروس‌های تغییر شکل‌دهنده بال، فلجی مزمن و ویروس سیاه شدن سلول ملکه را در زنبورستان‌ها اثبات کرد که نشان‌دهنده اهمیت این ویروس‌ها در بهداشت زنبورداری و تولید عسل می‌باشد. لذا می‌بایست در استراتژی های زنبورداری و تولید عسل موارد ذکر شده لحاظ شود.

ویروس تغییر شکل دهنده بال با علائم بسیار مشخص تغییر شکل بال و کاهش اندازه بدن همراه است. ویروس در تمام مراحل رشد زنبورعسل از جمله تخم، لارو، شفیره، بالغین و همه گروه‌های زنبورعسل از جمله ملکه‌ها، کارگران و زنبورهای نر یافت شده است. زنبورهای آلوده پس از ظاهر شدن علائم می‌میرند. گاهی اوقات زنبورهای به ظاهر سالم آلوده به ویروس هستند.سایر سویه‌های این ویروس نیز رفتار تهاجمی زنبورها را افزایش می‌دهند و بر پاسخ حسی، یادگیری و حافظه بالغین تأثیر می‌گذارند.

ویروس فلجی مزمن تمایل زیادی به عصب دارد. در واقع پنجاه درصد

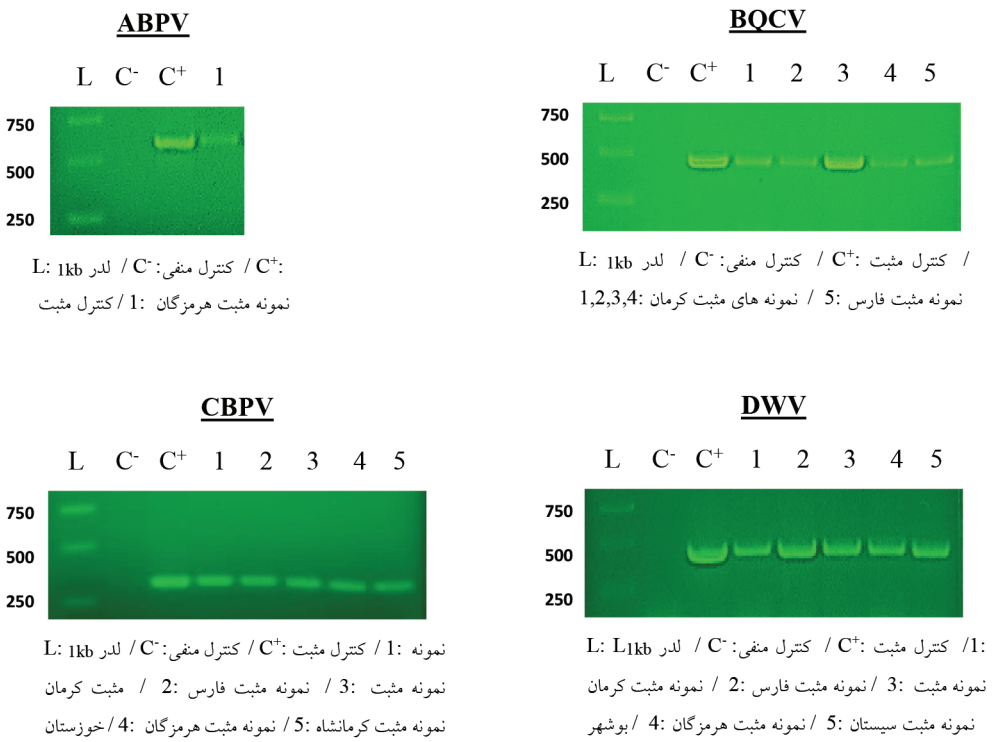


شکل ۱- درصد شیوع عفونت‌های ویروسی در هر استان.

از میلیون‌ها ذره ویروسی که در یک زنبور فلج وجود دارد در سر زنبور متمرکز است. وضعیت شلوغ کلنی‌ها باعث گسترش ویروس از طریق تماس مستقیم زنبورهای سالم با زنبوران فلج می‌شود. وجود ذرات ویروس در مدفوع زنبوران آلوده منبع مهم آلودگی محیطی در کلنی می‌باشد. تشخیص CBPV در ملکه‌ها و در تمام مراحل رشد نوزادان آنها از جمله تخم گزارش شده است که احتمال انتقال عمودی این ویروس را نشان می‌دهد. عفونت CBPV هرگز به مایت واروآ دستراکتور مرتبط نبوده و ویروس در این انگل گزارش نشده است (۱۳).

ویروس سیاه شدن سلول ملکه در صورت بلعیده شدن با اسپور تک یاخته Nosema apis می‌تواند در زنبورهای بالغ تکثیر شده و بافت روده میانی زنبورهای بالغ را آلوده کند. این ناحیه به عفونت BQCV حساسیت بیشتری دارد. در واقع، ارتباط مهمی بین بروز BQCV و Nosema apis در کلنی‌های زنبور عسل با اوج عفونت در طول بهار و اوایل تابستان مشاهده شده است. این داده‌ها نشان می‌دهد که BQCV ممکن است در مرگ و میر زنبورهای آلوده به این انگل دخیل باشد. این ویروس در شفیره‌های با چشم سفید تا بنفش به ظاهر سالم زنبوران نر و کارگر قادر به تکثیر است. تشخیص توالی BQCV در مدفوع ملکه و در بافت‌های روده، انتقال این ویروس از طریق غذا را ثابت می‌کند، که نشان‌دهنده عفونت احتمالی نوزادان ملکه از طریق زنبورهای پرستار آلوده در طول تغذیه است (۳). داده‌های متناقضی در مورد نقش مایت واروآ دستراکتور در این عفونت وجود دارد. به استثنای نمونه‌های مایت واروآ دستراکتور جمع‌آوری‌شده از زنبورستان‌های تایلند، این ویروس زنبور عسل هرگز در هیچ نمونه مایتی شناسایی نشده است. مطالعات بیشتری برای روشن شدن نقش کنه‌های واروآ به عنوان ناقل عفونت BQCV مورد نیاز است. ویروس فلجي حاد عمدتاً از طریق مایت واروآ منتقل شده و به سایر کلني‌ها گسترش مي‌یابد و باعث تغییر رفتار در زنبوران مبتلا مي‌گردد، به طوریکه آنان دچار اشتباه در تشخیص کلني خودي شده و در برابر مهاجمان نیز قادر به دفاع نیستند. کلني‌هاي مبتلا غالباً هدف غارت توسط سایر کلني‌ها قرار گرفته و از این طریق بیماري بسرعت منتشر مي‌گردد. کلنی‌هایی که به طور همزمان توسط مایت و ویروس آلوده شوند مرگ و میر بالایی دارند. در واقع مایت هم به عنوان ناقل و هم به عنوان فعال کننده عفونت ویروسی، زنبورهای عسل را تضعیف می‌کند و نقش مهمی در انتشار این ویروس دارد (۲).

هیچ درمان شناخته شده‌ای برای ویروس‌های زنبور عسل وجود ندارد اما مدیریت خوب در کاهش اثرات احتمالی ویروس‌های زنبور عسل کمک خواهد کرد. به حداقل رساندن سایر آفات و بیماری‌های زنبورعسل یک استراتژی عالی در زمینه کنترل هر گونه مشکلی که مستقیماً با ویروس‌های زنبورعسل مرتبط است می‌باشد. جایگزینی منظم ملکه با سویه‌هایی از زنبور که به بیماری مقاوم هستند، مدیریت کلنی‌های زنبورعسل برای به حداقل رساندن سطوح بیماری نوزما در طول سال و همچنین به حداقل



شکل ۲- نتایج الکتروفوز برخی از نمونه‌های مثبت.

رساندن استرس‌های تغذیه‌ای به کلنی توسط ارائه شربت قند و مکمل گرده در دوره‌های کمبود، هرگونه شگفتی ناخواسته را که ممکن است به دلیل وجود ویروس‌های زنبور عسل ایجاد شود به حداقل می‌رساند.

نتیجه

درک بهتر عفونت‌های ویروسی در زنبورهای عسل و اپیدمیولوژی ویروس‌ها می‌تواند از اهمیت زیادی در سلامت زنبوران عسل برخوردار باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه همکاران سازمان دامپزشکی کشور که در نمونه‌برداری کمک شایانی داشته‌اند سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Benjeddou, M., N. Leat, M. Allsopp, 2001. Detection of Acute Bee Virus and Black Queen Cell Virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 67:2384-7.

2- Berenyi, O., T. Bakonyi, I. Derakhshifar, et al. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 72:2414-20.

3- Chen, Y.P., J. Evans, M.F. Feldlaufer, 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honeybee, Apis mellifera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92:152-9.

4- Crotti, E., L. Sansonno, E.M. Prosdocimi, et al. 2013. Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology*. 30:6.

5- de Miranda J.R., G. Cordoni, G. Budge, 2010. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*.103:30-47.

6- Ghorani, M., O. Madadgar , A. Ghalyanchi, et al. 2017. The first comprehensive molecular detection of six honey bee viruses in Iran in 2015-2016. *Archives of Virology*, 62(8):2287-2291.

7- Gisder, S., P. Aumeier, E. Genersch, 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites. *Journal of General Virology*. 90:463-7.

8- Gumu, S.O., H. Albayrak, M. Kurt, et al. 2020. Prevalence of three honey bee viruses in Turkey. *The journal Veterinarski arhiv*. 80 (6), 779-785.

9- Khezri, M., S. Salahi, M. Moharrami, et al. 2019. The prevalence of acute bee paralysis (ABPV) in Kurdistan apiaries. Iranian Honey *Bee science and technology*. No (10), 19, 4-12.

10- Maramorosch, K., and Shatkin, A. (2007) Honey bee viruses. In: Ziebuhr J, editor. Advances in Virus Research. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier pp. 33-80.

11- Moharrami, M., H. Modirrousta, 2018. Molecular Identification of Six Honeybee Viruses in Iranian Apiaries. *Archives of Razi Institute*, Vol. 73, No. 4, 311-318.

12- Nazzi, F., S.P. Brown, D. Annoscia, et al. 2012. Synergistic parasite–pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLOS Pathogens*. 8:1002735.

13- Olivier, V., I. Massou, O. Celle, et al. 2008. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honeybee (Apis mellifera) brain. *Journal of Virological Methods*. 153:232-7.

14- Ribière, M., V. Olivier, P. Blanchard, 2010. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology*.103:120-31.

15- Rodríguez, M., M. Vargas, K. Antúnez, et al. 2014. Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 4(2) april-June.

16- Toplak, I., D. Rihtari, U.J. Ciglenečki, et al. 2012. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of carniolan gray bee (Apis mellifera carnica). *Slovenian Veterinary Research*. 49 (2): 89-96.