بررسی احتمال آلودگی کندوهای شهرستان لاهیجان به Acute Paralysis Virus

میرساسان میرپور*[۱]، مهدی آسمار[۲]، احیا غاروریانی[۳]، زهره قلی‌زاده[۴]

۱*، ۲، ۳و ۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران،

صندوق پستی: ۱۶۱۶

s_mirpour@yahoo.com

چکیده

عسل از مهمترین محصولات کشاورزی است و زنبور عسل از دیر باز در معرض عوامل بیماری‌زای مختلف قرار داشته است. از این‌رو این مطالعه برای شناسایی دلایل ریزش زنبورهای عسل در سطح لاهیجان انجام گردید. برای انجام این بررسی اقدام به جمع‌آوری نمونه‌های زنبور عسل از چندین کندو در سطح شهرستان لاهیجان گردید. زنبورها از نظر شکلی ارزیابی شده به دو دسته ی سالم و بیمار تقسیم شدند. هر دو گروه جهت بررسی وجود Acute Paralysis Virus در ردهٔ کشت سلولی SF9 تلقیح گردیدند. نتایج نشان داد که زنبورهای سالم (از نظر ظاهری) هیچ نوع CPE در این رده ایجاد ننمودند در حالی‌که زنبورهای دارای علائم بالینی بیماری در این سلول‌ها CPE ایجاد نمودند. سپس زنبورهای عسل به شکل مستقیم، با میکروسکوپ الکترونی (TEM) ارزیابی شدند. طبق بررسی انجام یافته تمامی زنبورهایی که علائم بیماری داشتند حاوی ویروس بودند. اما به دلیل این که آنتی سرم مربوط برای شناسایی خریداری نشد (در دسترس نبود) امکان تائید نهایی حضور ویروس در این زنبورها وجود نداشت. از عصارهٔ زنبورهای آلوده به زنبورهای سالم اسپری شد و علائم بیماری در آن‌ها نیز دیده شد این موضوع نشان‌دهندهٔ مسری بودن بیماری و وجود عوامل بیرونی در ایجاد این نوع بیماری است. شیوع Acute Paralysis Virus در فصول سال نیز بررسی شد. شیوع بیماری در فصول بهار و تابستان (۶و۱۰ درصد) بیشتر از پاییز و زمستان (۲ و ۰ درصد) است. این موضوع نشان می‌دهد که بیماری در فصول گرم سال شیوع بیشتری نسبت به فصول سرد سال دارد. با توجه به این که ویروس جزء خانوادهٔ Picornavriridae است این نوع شیوع قابل پیش بینی می‌باشد.

کلمات کلیدی: لاهیجان، Acute Paralysis Virus، زنبور عسل، فلج حاد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

زنبور عسل همراه با تولید عسل نقش مهمی در زراعت ایفا می‌کند و نخستین بی‌مهره‌ای است که بیماری‌های آن گزارش شده است. ارسطو در کتابی راجع به بیماری‌های حیوانات به لاروهایی اشاره کرده است که احتمالاً به لوک امریکایی یا اروپایی آلوده بوده‌اند (۲۰). بیماری‌های زنبورهای عسل را می‌توان به دسته‌های مختلفی تقسیم‌بندی کرد. از نظر عوامل ایجاد کنندهٔ بیماری ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها می‌توانند زنبورها را آلوده نمایند. در این بین بیماری‌های ویروسی بیش از سایر بیماری‌ها مورد توجه هستند، زیرا درمان آن‌ها در هیچ جانداری به طور کامل انجام نمی‌شود و تنها راه مطمئن پیشگیری از بیماری است. البته اطلاعات موجود در زمینه انتشار ویروس، شیوع بیماری و عوامل موثر در شیوع کم است (۱).

بیماری فلج (Paralysis) یک بیماری عفونی و مسری در زنبورهای بالغ است. این بیماری با نام‌های مختلفی مثل hairless Black Syndrome و Little Black Syndrome نام‌گذاری شده است (۲). اگر چه علایم این بیماری بیش از ۲۰۰۰ سال پیش توسط ارسطو شناسایی شده بود ولی عامل آن تا سال ۱۹۶۳ شناسایی نشد. در این سال Bailey و همکارانش (۲) این ویروس را شناسایی کردند و عنوان نمودند که Acute Bee Paralysis Virus (ABPA) و Chronic Bee Paralysis Virus (CBPA) عامل ایجاد فلج در زنبورهای بالغ است. هیچ ارتباطی بین انتشار ویروس با انگل Varroa destructor مشاهده نشده است که همیشه در کندوها دیده می‌شود (۱۹).

به استثناء Large Filamentous Virus که دارای ژنوم DNA است، همه ویروس‌هایی که زنبورها را آلوده می‌کنند حاوی RNA تک رشته‌ای است. از بین ۱۸ ویروس دارای RNA تنها ABPV دارای تقارن مکعبی است. آن یکی از ویروس‌های مهم در زنبورهای عسل بوده که باعث فلج شدن زنبورعسل می‌شود (۳). بدن زنبور سیاه شده، بال‌های آن پیچ می‌خورد. زنبور ابتدا توانایی پریدن را از دست می‌دهد، سپس از دوپا یا چهار پا فلج می‌شود و در نهایت خواهد مرد (۵).

در این مقاله احتمال وجود ABPV در کندوهای عسل منطقهٔ لاهیجان بررسی شده است. ارزیابی حضور ویروس در مناطق مختلف کشور این امکان را به ما می‌دهد که بتوانیم راه‌های پیشگیرانه را در آن مناطق انجام دهیم.

مواد و روش‌ها

برای هر فصل ۱۰۰ نمونه به طور تصادفی از کندوهای عسل گرفته شد و بر اساس علائم فنوتیپی زنبورهای سالم از بیمار جدا شدند. زنبورهای بیمار به رنگ سیاه بوده بال‌های آنان توانایی پرواز ندارند بعد از مدتی نیز فلج شده حتی نمی‌توانند راه بروند و سپس می‌میرند. بدین ترتیب برای ارزیابی فصلی بیماری ۴۰۰ نمونه گرفته شد.

از زنبورهایی که علائم بیماری را داشتند (از نظر فنوتیپی) عصاره‌ای تهیه گردید به این ترتیب که سر زنبورها در یک هاون استریل و در زیر هود میکروبیولوژیک همراه با سرم فیزیولوژیک استریل کوبیده شدند. این مجموعه هموژنیزه شد و با فیلتر میلی‌پور (۰/۲۲) صاف گردید. سپس از آن برای تلقیح

Archive of SID

www.SID.ir

در کشت سلولی و آلوده نمودن زنبورهای سالم استفاده شد. لازم به ذکر است که این عمل با شاهد سالم انجام گردید و به آن‌ها تنها سرم فیزیزیولوژیک استریل تلقیح یا اسپری شد.

از عصاره‌ای که قبلاً از زنبورهای آلوده گرفته شده بود در کشت سلولی SF_9 کشت داده شد و وجود CPE در این کشت سلولی ارزیابی گردید. لازم به ذکر است که این آزمایش نیز همراه با شاهد بود و در محیط کشت شاهد تنها از سرم فیزیزیولوژیک استریل استفاده گردید.

برای این کار از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. عصاره هر زنبور آلوده در چهار چاهک حاوی $۰/۰۲۵cm^3$ سوسپانسیون کشت سلولی همراه با $۰/۰۲۵cm^3$ محیط کشت حاوی ۲ درصد FCS، به میزان $۰/۰۲۵cm^3$ ریخته شد. یک ردیف کامل به عنوان شاهد سلولی استفاده گردید که هر چاهک حاوی $۰/۰۲۵cm^3$ کشت سلولی و $۰/۰۵۰cm^3$ محیط کشت حاوی ۲ درصد FCS بود. قبل از بررسی نمونه‌ها، کشت سلولی شاهد ارزیابی شد. در صورت سالم بودن آن‌ها، نمونه‌هایی که حداقل در ۳ چاهک CPE داشتند، مثبت ارزیابی شد.

در میکروسکوپ الکترونی TEM مانند میکروسکوپ معمولی نیاز به تهیه نمونه در مقاطع باریک می‌باشد زیرا در TEM دسته پرتو الکترونی از نمونه عبور نموده و بدین طریق تصویر تشکیل می‌شود. برای آن‌که دسته پرتو الکترونی به راحتی بتواند از نمونه عبور کند ضخامت نمونه باید کم باشد. این کار می‌تواند با قالب‌گیری نمونه (Embedding) در یک ماده سخت مانند رزین و سپس برش قطعات با ضخامت مناسب به وسیله الترامیکروتوم انجام شود. برای بهتر دیدن تصاویر از رنگ‌آمیزی منفی (Negative Staining) و سایه زدن (Shadow Casting) استفاده شد.

نتایج

ارزیابی فنوتیپی زنبور عسل

همان‌طور که ذکر گردید، زنبورها بر اساس خصوصیات شکلی به ۲ دسته سالم و بیمار تقسیم شدند (شکل ۱و۲). زنبورهای آلوده به رنگ سیاه در آمده و بال‌های آنان پیچ می‌خورد. پس از چند روز از ۲ یا ۴ پا فلج می‌شوند.

شکل ۱: زنبور سالم

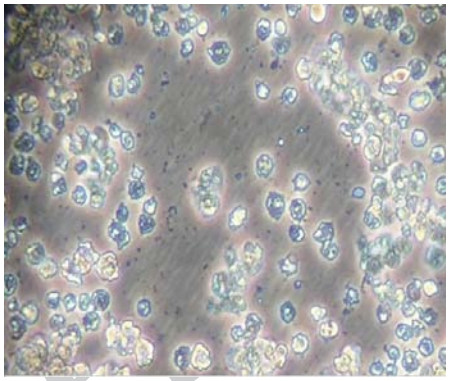
شکل ۲: زنبور بیمار

Archive of SID

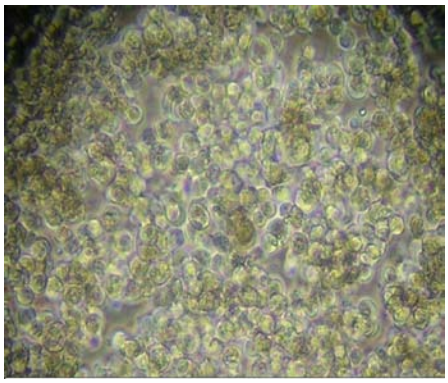
www.SID.ir

ارزیابی زنبورهای بیمار و سالم با کشت سلولی

ارزیابی کشت سلولی با استفاده از تغییرات شکلی آن انجام شد (CPE). در مورد سلول‌های SF_9، جدا شدن از سطح فلاسک و تجمع آن‌ها در کنار هم نشان‌دهنده CPE است (شکل ۳). در شرایط عادی سلول‌ها در کنار هم باقی مانده و به طور یکنواخت دیده می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۳: CPE در سلول‌های SF_9



شکل۴: سلول‌های سالم SF_9

مجموع ۴۰۰ نمونه زنبور مربوط به فصول مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. از این تعداد ۱۸ زنبور بیمار شناسایی شدند که بیشترین شیوع بیماری به فصل تابستان مربوط بود (جدول ۱).

جدول ۱: فراوانی موارد بیماری در فصول مختلف سال

وضعیت	سالم		بیمار	
فراوانی / فصل	تعداد	درصد	تعداد	درصد
بهار	۹۴	٪۹۴	۶	٪۶
تابستان	۹۰	٪۹۰	۱۰	٪۱۰
پائیز	۹۸	٪۹۸	۲	٪۲
زمستان	۱۰۰	٪۱۰۰	۰	٪۰
N=۴۰۰	۳۸۲	٪۹۵/۵	۱۸	٪۴/۵

آلوده نمودن زنبورهای سالم و ارزیابی آن‌ها به شکل فنوتیپی و با استفاده ازکشت سلولی

۱۰۰ زنبور سالم (از نظر فنوتیپی) با استفاده از عصاره زنبورهای آلوده اسپری شدند. آن‌ها یک هفته مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از آن‌هایی که علایم بیماری را نشان داده و مردند، عصاره‌گیری به عمل آمد و در کشت سلولی Sf_9 تلقیح شد. تمامی زنبورهای مورد آزمایش بیمار شدند و در کشت سلولی CPE نشان دادند. ۳ درصد از زنبورهای شاهد نیز بدون علایم بالینی CPE را در کشت سلولی ایجاد نمودند (جدول ۲).

Archive of SID

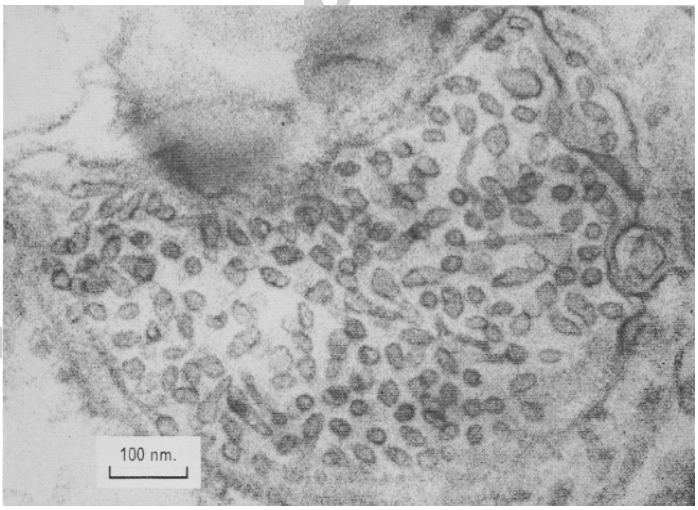
www.SID.ir

جدول۲: فراوانی موارد بیماری بر اساس CPE در کشت سلولی

مواد / زنبور	تعداد کل	CPE	درصد	بدون CPE	درصد
تست	۱۰۰	۱۰۰	٪۱۰۰	۰	٪۰
شاهد	۱۰۰	۳	٪۳	۹۷	٪۹۷

میکروسکوپ الکترونی

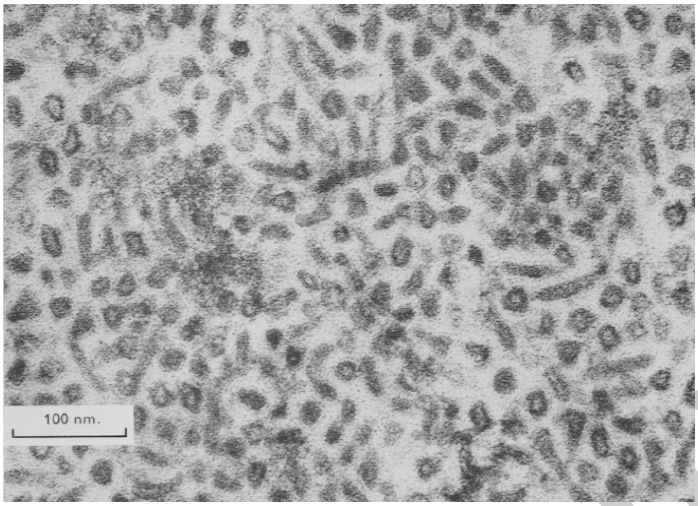
نمونه‌های بیمار در بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه پوترا (University of Putra Malaysia) بررسی شدند. پس از مشاهده ۶ گراف انتخاب شدند. تجمع پروتئین‌های ویروسی در سیستم عصبی زنبورهای آلوده دیده شد و با زنبورهای سالم مقایسه گردید (شکل ۵و۶). همان‌طور که مشهود است در بافت عصبی زنبورهای بیمار همبستگی و یکنواختی سلول‌های عصبی از بین رفته است و ذرات ویروسی زیادی دیده می‌شوند که به نظر می‌رسد Core protein یا بخش‌های دیگر پروتئینی ویروس باشند. در گراف‌های دیگر تجمع ویروس در بخش‌هایی از غشائ سلول‌های عصبی (شکل ۷ و ۹) و سیتوپلاسم (شکل ۸) مشاهده شد. در نهایت با استفاده از بزرگ‌نمایی بیشتر APV دیده شد (شکل ۱۰).



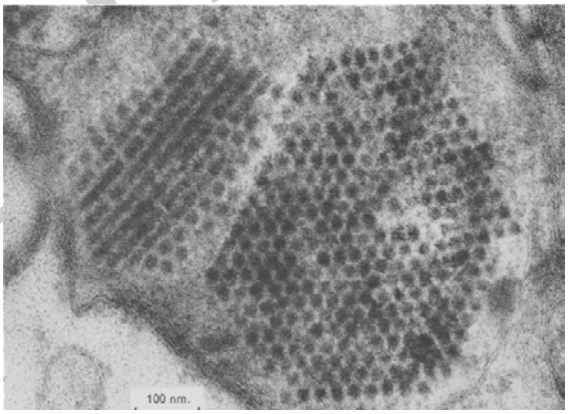
شکل۵: میکروگراف از سر زنبورسالم که دارای ویزیکول‌های سالم می‌باشد (TEM)

Archive of SID

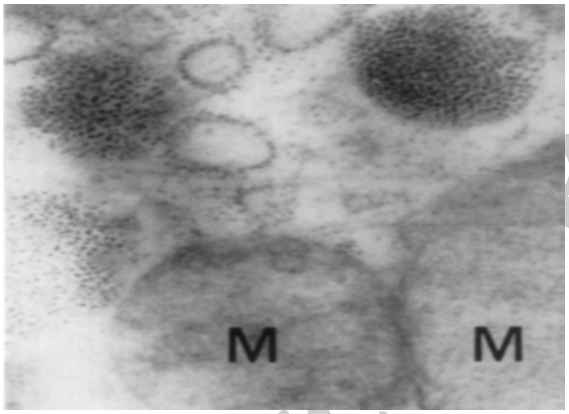
www.SID.ir



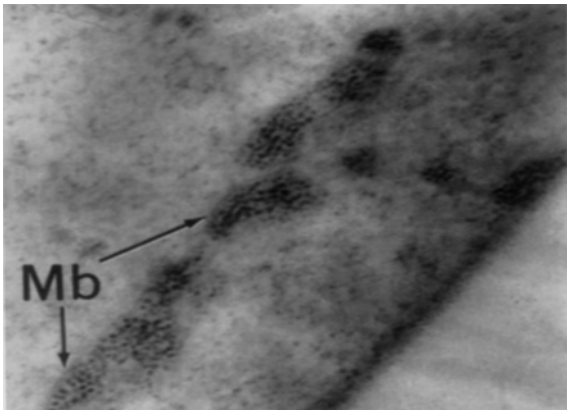
شکل۶: میکروگراف از سر زنبور بیمار که بخش‌هایی از سیستم عصبی دارای تجمع هستند که به نظر می‌رسد Coreprotein یا بخش‌های دیگر پروتئین ویروس باشند (TEM)



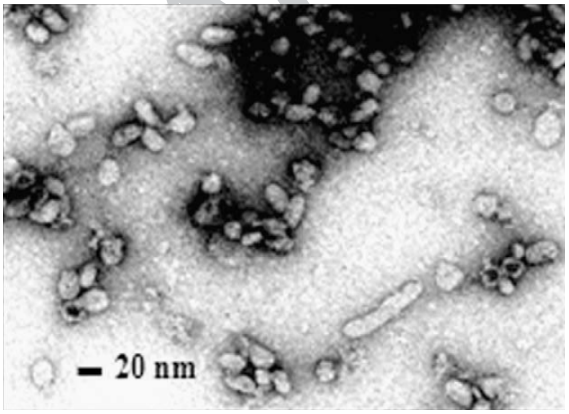
شکل ۷: ذرات ویروس APV در نمونه های آلوده



شکل ۸: ذرات ویروسی در سیتوپلاسم (M= میتوکندری) ۳۲۰۰۰×



شکل۹: کلنی‌های کوچک در ساختار غشاء سلولی(Mb) ۴۰۰۰۰×



شکل۱۰: ویروس APV

www.SID.ir

بحث

بر اساس نتایج بدست آمده شیوع بیماری در فصول گرم سال بیشتر از شیوف آن در فصول سرد سال است که مطابق با بررسی‌های Blanchard (۴)، Carletto (۷)، Carter (۸)، Tentcheva (۲۲) می‌باشد. اما با بررسی Chen (۱۰) مغایرت دارد که بر روی زنبورهای ملکه انجام شد.

با توجه به گراف‌های میکروسکوپی مشخص شد که ویروس مورد نظر تقارن مکعبی دارد و به این ترتیب ABPV است و می‌توان آن را از CBPV جدا نمود (۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶).

همان‌طور که ذکر گردید انتقال ویروس به طور مستقیم در این بررسی ارزیابی شد و از اسپری عصاره زنبورهای آلوده بر روی زنبورهای سالم (از نظر فنوتیپی) استفاده گردید. زنبورهای سالم علائم بیماری را نشان دادند و تا یک هفته مردند. این موضوع نشان‌دهنده انتقال مستقیم بیماری در طبیعت است که توسط Chen (۱۱و ۱۲)، Ribiere (۱۷، ۱۸ و ۱۹)، Shen (۲۱) نیز ارائه گردیده است. تغییرات بافت مغزی که در این بررسی مشاهده شد شبیه مواردی است که توسط Wessnitzer (۲۳) در حشرات توصیف شده است.

با توجه به این نتایج و ارزیابی نحوه انتقال ویروس به نظر می‌رسد بیشتر باید به راه‌های پیشگیرانه برای کنترل بیماری توجه کرد. این مهم با افزایش آگاهی‌های زنبورداران و بیشتر شدن امکانات شناسایی مقدور می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که یک آزمایشگاه پایه برای آزمون عفونت‌زایی ویروس مخصوص زنبور عسل، مخصوصاً در مناطقی که فقط بیماری فلج ویروسی شیوع دارد، برپا شود. اما به دلیل وجود ویروس‌های غیر فعال یا پنهان، نتایج می‌تواند گیج‌کننده باشد. همچنین عفونت‌های تجربی با استفاده از آنتی‌سرم‌های شناخته شده می‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای تشخیص بیشتر در نظر گرفته شود.

همراه با یک آزمایشگاه آسیب‌شناسی مخصوص زنبور عسل که برای تحت پوشش قرار دادن کامل بیماری‌های آن برپا شده است باید آزمایشگاه سرولوژیکی و ویرولوژیکی نیز تأسیس شود. به دلیل ناآگاه بودن ما از ماهیت واقعی مسائل، تعداد قابل توجهی از آن‌ها ناشناخته باقی می‌مانند یا تحت نام‌های معمولی (اضمحلال بهاری، نوزادان فاسد، اضمحلال پاییزی) عنوان می‌شود. از آن‌جا که عفونت‌های ویروسی نمی‌توانند نادیده گرفته شود اغلب سردرگمی به وجود می‌آید. در مواقعی خاص که مسمومیت ناشی از حشره‌کش‌ها در زنبور نیز دیده می‌شود این امکان وجود دارد که سایر علل مرگ و میر این حشره نادیده گرفته شود.

دوره‌های آموزشی پرورش زنبور عسل یا آسیب‌شناسی حشرات باید مشتمل باشد بر تحقیق روی بیماری‌های زنبور عسل به شکلی عمیق‌تر از آنچه که با روش‌های میکروسکوپی معمولی ساده انجام می‌پذیرد و یا از آن طریق آثار بیماری به آسانی قابل رویت است. باید آزمایشگاه‌های تشخیص بیماری در سطح کشور یا منطقه چندان قوی باشند که اطلاعات پایه‌ای مربوط به کشف و تشخیص بیماری‌ها را در مورد زنبورهای مرده یا بیمار در اختیار همگان قرار دهند، اعم از این‌که عوامل بیماری‌زایی ویروسی عمده در کار باشند یا نباشند.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان در انجام این تحقیق قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Corbella, E. and Zunino, P., 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. J. Invertebr. Pathol. 90, 69–72.
2. Bailey, L.; Ball, B.V. and Perry, J.N., 1983. Honeybee paralysis: its natural spread and its diminished incidence in England and Wales. J. Apicult. Res. 22, 191–195.
3. Blanchard, P.; Ribière, M.; Celle, O.; Lallemand, P.; Schurr, F.; Olivier, V.; Iscache, A.L. and Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. J. Virol. Methods 141, 7–13.
4. Blanchard, P.; Olivier, V.; Iscache, A.L.; Celle, O.; Schurr, F.; Lallemand, P., and Ribière, M., 2008a. Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. J. Invertebr. Pathol. 97, 182–185.
5. Blanchard, P.; Schurr, F.; Celle, O.; Thiery, R.; Faucon, J.P. and Ribière, M., 2008b. Bee viruses: implication in honey bee colonies weakening. OIE symposium, Freiburg, August, pp. 26–28.
6. Blanchard, P.; Schurr, F.; Olivier, V.; Celle, O.; Antúnez, K.; Bakonyi, T.; Berthoud, H.; Haubruge, E.; Higes, M.; Kasprzak, S.; Koelberger, H.; Kryger, P.; Thiery, R. and Ribière, M., 2009. Phylogenetic analysis of the RNA-dependant RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographical regions. Virus Res. 144, 334 338.
7. Carletto, J.; Blanchard, P.; Schurr, F.; Celle, O. and Ribière, M., 2009. How to detect and quantify a honeybee virus: the CBPV (Chronic bee paralysis virus). Poster. CoLoss Workshop new molecular tools, Bern, May 2009, pp. 19-20.
8. Carter, M. and Genersch, E., 2008. Molecular characterisation of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R.F., Milani, N., Bernardinelli, I. (Eds.), Virology and The Honey Bee. European Commission, Brussels, pp. 85–120.
9. Celle, O.; Blanchard, P.; Schurr, F.; Olivier, V.; Cougoule, N.; Faucon, J.P. and Ribière, M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and RNAreplication in various host: possible ways of spread. Virus Res. 133, 280– 284.
10. Chen, Y.; Pettis, J.S. and Feldlaufer, M.F., 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee Apis mellifera L. J. Invertebr. Pathol. 90, 118–121.
11. Chen, Y.; Evans, J. and Feldlaufer, M., 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. J. Invertebr. Pathol. 92, 152–159.
12. Chen, Y.P.; Pettis, J.S.; Collins, A. and Feldlaufer, M.F., 2006b. Prevalence and transmission of honey bee viruses. Appl. Environ. Microbiol. 72, 606–611.
13. Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U. and Ball, L.A., 2005. Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London. 110-120.
14. Maori, E.; Lavi, S.; Mozes-Koch, R.; Gantman, Y.; Peretz, Y.; Edelbaum, O.; Tanne, E. and Sela, I., 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intraand inter-species recombination. J. Gen. Virol. 88, 3428–3438.
15. Olivier, V. and Ribière, M., 2006. Taxonomy of Apis mellifera viruses. Virologie 10, 267– 278.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Olivier, V.; Blanchard, P.; Chaouch, S.; Lallemand, P.; Schurr, F.; Celle, O.; Dubois, E.; Tordo, N.; Thiery, R.; Houlgatte, R. and Ribière, M., 2008a. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. Virus Res. 132, 59–68.
17. Ribière, M.; Chaouch, S.; Lallemand, P.; Schurr, F.; Faucon, J.P. and Aubert, M., 2004. Asymptomatic contamination of adult honey bee by the chronic bee paralysis virus (CBPV). Viral load relative quantification assay by real time-PCR. In: Bernardinelli, I., Milani, N. (Eds.), Proceeding of the First European Conference of Apidology, EurBee, Udine, Italy, pp. 94–95.
18. Ribière, M.; Lallemand, P.; Iscache, A.L.; Schurr, F.; Celle, O.; Blanchard, P.; Olivier, V. and Faucon, J.P., 2007. Spread of infectious Chronic bee paralysis virus by honeybee (Apis mellifera L.) feces. Appl. Environ. Microbiol 73, 7711–7716.
19. Ribière, M.; Ball, B. and Aubert, M., 2008. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses. In: Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R.F., Milani, N., Bernardinelli, I. (Eds.), Virology and the Honey Bee. European Commission, Brussels, pp. 15–119.
20. Roger, R. Morse, 1980. Honey bee pests, predators and diaease. Cornell University Press. 65-95.
21. Shen, M.; Cui, L.; Ostiguy, N. and Cox-Foster, D., 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. J. Gen. Virol. 86, 2281–2289.
22. Tentcheva, D.; Gauthier, L.; Zappulla, N.; Dainat, B.; Cousserans, F.; Colin, M.E. and Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. Appl. Environ. Microbiol. 70, 7185–7191.
23. Wessnitzer, J. and Webb, B., 2006. Multimodal sensory integration in insects – towards insect brain control architectures. Bioinsp. Biomim. 1, 63–75.

Archive of SID

www.SID.ir