.

خلاصه:

توصیف و اهمیت بیماری:

جرب های جنس *تروپیله لپس*[1]انگل های نوزادان زنبور عسل می باشند. تغذیه آن ها از لارو و شفیره باعث بد شکلی نوزادان، مرگ زنبورها و نتیجتاً کاهش جمعیت یا فرارجمعیت زنبور عسل[2]می شود. تکامل آن ها حدود یک هفته طول می کشد و جرب ها روی بدن زنبور ها پراکنده می شوند. حداقل ۴ گونه در جنس *تروپیله لپس* وجود دارد که هر کدام تمایل به زنبور عسل به خصوصی دارد. دو گونه *(کلاره*[3] *و مرسدسه*[4]) آفات آسیب رسان به *آپیس ملیفرا*[5]هستند . به نظر می رسد که بقیه آن ها یعنی دو گونه (*کونیگروم*[6] *و تایی*[7]) به *آپیس ملیفرا* آسیبی نمی رسانند.

شناسایی عامل: روش های مولکولی و ریخت شناسی[8]برای شناسایی هر گونه وجود دارد. تشخیص آلودگی با *تروپیله لپس* می تواند با شیوه چشمی بر روی زنبور ها یا توسط آزمایش خرده بقایای[9]کف کندو انجام شود. الگوی استقرار نوزادان، نامنظم، مرگ یا بد شکلی زنبورهای نابالغ، زنبورهای با بال های بدشکل و در حال خزیدن جلوی ورودی کندو و مخصوصاً وجود جرب های کشیده، به رنگ قرمز – قهوه ای در حالی که به سرعت روی شان ها می دوند، برای *تروپیله لپس کلاره* و/یا *تروپیله لپس مرسدسه* ارزش تشخیصی دارد.

تشخیص زود هنگام می تواند از طریق باز کردن حجره های نوزادی و یافتن جرب های بالغ و نابالغ در آن انجام شود. می توان کندو(جمعیت زنبور عسل) را با مواد شیمیایی مختلفی که باعث ریزش جرب ها از شان ها و زنبورها شوند، درمان کرد. همچنین می توان از صفحه چسبناک کف کندو برای آزمایش خرده بقایای کندو و جرب ها استفاده کرد. روش جایگزین "تست ضربه زدن" برای غربالگری سریع قابل انجام است. تشخیص قطعی در آزمایشگاه براساس آزمایشات ریخت شناسی زیر میکروسکوپ انجام می شود. آزمایش تاییدی را می توان به وسیله PCR معمولی و توالی یابی انجام داد.

---

1. Tropilaelaps
2. Colony
3. T. clareae
4. T. mercedesae
5. Apis mellifera
6. T. koenigerum
7. T. thaii
8. Morphologic
9. Derbis

آزمایشات سرولوژیک: تست های سرولوژیک کاربردی در این خصوص ندارند.

الزامات واکسن: هیچ واکسنی در این مورد وجود ندارد.

مقدمه:

جرب های *تروپیله لپس*(.SPP) متعلق به رده *آراکنیدا*[1] تحت رده *آکاری*[2]، فوق راسته *پارازیتی فورمس*[3] راسته *مزوستیگماتا*[4] و خانواده *لیلاپیده*[5] می باشند. این عامل را نباید با جرب *واروا دستراکتور*[6](انگلی که در اروپا به خوبی گسترش پیدا کرده است) اشتباه گرفت. تروپیله *لپس کلاره* در آسیا وجود دارد که در آنجا انگل زنبور عسل بومی یعنی *آپیس دورساتا برویلی گولا*[7] می باشد. همچنین انگل گونه های معرفی شده زنبور عسل یعنی *آپیس ملیفرا* در فیلیپین و گونه های بومی زنبور عسل *آپیس دورساتا بینگامی*[8] در جزیره سولاوسی در اندونزی است. *تروپیله لپس مرسدسه* (که قبلاً با *تروپیله لپس کلاره* اشتباه می شد) به همراه *تروپیله لپس کونیگروم*، انگل *آپیس دورساتا دورساتا* در سرزمین اصلی آسیا و اندونزی هستند (به جز جزیره سولاوسی).

تروپیله لپس مرسدسه نیز انگل *آپیس ملیفرا* است که به این مناطق و اطراف آن وارد شده است و به همراه گونه دیگری یعنی *تروپیله لپس تایی*، انگل *آپیس ملیفرا لابوریزا* در منطقه کوهستانی هیمالیا وجود دارند.

۱- چرخه زندگی:

جمعی از *تروپیله لپس* های ماده می توانند با تعداد زیاد مثلاً ۱۲ عدد در داخل یک حجره باشند. اندکی پیش از سرپوش دار شدن حجره از ۱ تا ۴ تخم روی لاروهای زنبور می گذارند. *تروپیله لپس* نوزادان نر(زنبور عسل) را ترجیح می دهد و ممکن است تقریباً ۱۰۰ درصد حجره های آن ها انگلی شوند. نتاج جرب، (معمولاً یک نر و تعدادی ماده) از نوزاد زنبور تغذیه کرده و به آن آسیب جدی می زنند. تکامل جرب به حدود یک هفته زمان نیاز دارد. بالغین که ماده اولیه وارد شده به حجره نیز جزء آن ها است، با زنبور بالغ خارج می شوند و به دنبال میزبان های جدید می گردند.

---

1. Arachnida
2. Acari
3. Parasitiformes
4. Mesostigmata
5. Laelapidae
6. Varroa destructor
7. Apis dorsata breviligula
8. A. dorsata binghami

چرخه کوتاه زندگی و نیز اقامت بسیار کوتاه بر روی بدن زنبور های بالغ این موضوع را که چرا جمعیت های *تروپیله لپس* سریع تر از جرب های *واروا* افزایش پیدا می کنند را توجیه می نماید. رقابت *تروپیله لپس کلاره* با جرب واروا زمانی اتفاق می افتد که *تروپیله لپس کلاره* و *واروا دستراکتور* به طور همزمان کلنی را آلوده نمایند. گزارش شده است که در هنگامی که هر دو گونه جرب با هم در یک حجره هستند، تولید مثل هر دوی آن ها کاهش پیدا می کند. مدت زمان فاز فورتیک بر روی زنبور ها بسیار کوتاه است (تنها ۲-۱ روز) زیرا *تروپیله لپس* نمی تواند پوشش زنبورهای بالغ را سوراخ کند. زمان فورتیک برای *تروپیله لپس (SPP)* جهت درک چرخه زندگی مهم است و تحقیقات اخیر نشان می دهد که دوره زمانی می تواند ۱۰-۵ روز باشد. جرب های ماده تلقیح شده ظرف ۲ روز می میرند.

تروپیله لپس نیز مانند *واروا* می تواند به عنوان ناقل بالقوه ویروس های زنبور عسل (مانند ویروس بد شکلی بال[1]) عمل کند. گزارش شده است که ویروس بد شکلی بال در *تروپیله لپس مرسدسه* تکثیر پیدا می کند که این گزارش موید این نکته است که جرب نقش خود را به عنوان ناقل بیولوژیک ویروس اجرا می نماید. تاثیر کمپلکس ویروس – جرب کاملاً درک نشده است. برخی از داده ها نشان می دهند که تاثیر اساسی آلودگی به *تروپیله لپس* می تواند توسط خود جرب ایجاد شود که موجب کاهش پاسخ ایمنی زنبور میزبان می گردد.

آلودگی با *تروپیله لپس* موجب مرگ بسیاری از لاروهای زنبور(بالای ۵۰ درصد) می شود که سبب ایجاد الگوی نامنظم نوزادان شده و لاروهای مرده ممکن است تاحدی از حجره ها بیرون بزنند. تعداد زیادی از زنبورهای بد شکل با شکم کوچک، بال های ناقص و پاهای بد شکل یا بدون پا به وجود می آیند که احتمالاً به دلیل عفونت مرتبط با DWV می باشد. تعدادی از زنبورهای آسیب دیده جلوی ورودی کندو روی زمین می خزند. به علاوه سوراخ شدن سرپوش های حجره ها نیز قابل مشاهده است (نتیجه فعالیت بهداشتی زنبور های کارگر که شفیره ها یا بالغین جوان را بیرون می شکند) . برخی از کلنی های آلوده فرار می کنند و جرب ها را به مکان جدید حمل می نمایند.

پاسخ های رفتار زنبور عسل به *تروپیله لپس مرسدسه* بستگی به گونه *آپیس* دارد. در یک بررسی *آپیس سرانا* و *آپیس دورساتا* (میزبان های طبیعی *تروپیله مرسدسه*) مقاومت رفتاری بالاتری نسبت به *آپیس ملیفرا* نشان دادند. در *آپیس ملیفرا*، آلودگی *تروپیله لپس مرسدسه* باعث کاهش چشمگیر طول عمر و وزن زنبور متولد شده گردید. همچنین موجب افزایش سطح ویروس بد شکلی بال و نشانه های بالینی مرتبط با آن شدند و توانستند آسیب فراوانی به کلنی ها وارد نمایند.

1. Deformed wing virus (DWV)

روش های تشخیصی:

جدول ۱: روش های آزمایشگاهی موجود جهت تشخیص آلودگی زنبور های عسل به تروپیله لپس (SPP) و اهداف آن ها:

روش	هدف					
	جمعیت عاری از آلودگی	**عاری بودن هر کدام ازحیوانات (زنبورها) از آلودگی پیش از جابجایی**	**کمک به سیاست های ریشه کنی**	**تایید موارد بالینی**	**شیوع آلودگی – مراقبت**	**وضعیت ایمنی در تک تک حیوانات و جمعیت ها (زنبور عسل)پس از واکسیناسیون**
شناسایی عامل						
ریخت شناسی	+++	+++	+++	+++	+++	–
PCR معمولی	++	++	++	++	+	–

کلید: +++= توصیه شده برای همین هدف؛ ++= توصیه شده لیکن محدودیت هایی دارد؛ += مناسب در شرایط بسیار محدود؛ - = برای این هدف مناسب نیست. PCR: زنجیره واکنش پلیمراز

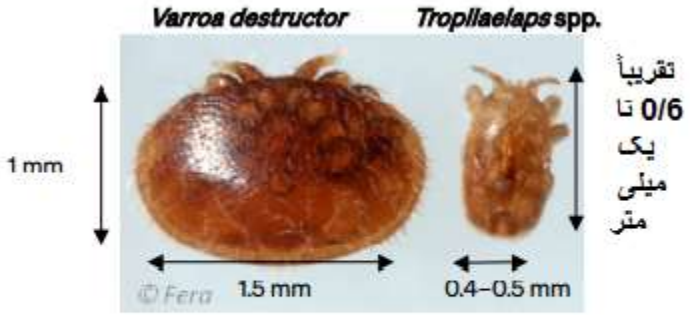
تشخیص میدانی جرب :

اولین نشانه آلودگی به گونه های *تروپیله لپس* اغلب با مشاهده جرب های قرمز– قهوه ای ، کشیده بر روی شان ها یا روی بدن زنبور های بالغ مشخص می شود. (اشکال ۲ و ۳).

طول بدن بستگی به گونه دارد و در نرها و ماده ها متفاوت است. *تروپیله لپس کونیگروم* کوچک ترین عضو جنس با طول بدن کمتر از ۰/۷ میلی متر برای ماده ها و تقریباً ۰/۵۷۵ میلی متر برای نرها است. *تروپیله لپس مرسدسه* ماده (تقریباً ۰/۹۹– ۰/۹۵ میلی متر) ، *تروپیله لپس کلاره*(تقریباً ۰/۸۸۷– ۰/۸۸۵ میلی متر) و *تروپیله لپس تایی* (تقریباً ۰/۸۹ میلی متر) بسیار بلند تر هستند. در حالی که طول بدن نر *تروپیله لپس مرسدسه* و *تروپیله لپس کلاره* اندکی کوچکتر از ماده های مرتبط می باشند. (به ترتیب ۰/۹۲۷–۰/۹۰۷ و ۰/۸۵۸–۰/۸۵۲ میلی متر)

تروپیله لپس را به راحتی می توان از جرب *واروا* با استفاده از لنز ۱۰ تفکیک کرد. بدن جرب *واروا* عریض تر بوده و به آرامی حرکت می کند در حالی که بدن *تروپیله لپس* کشیده است (شکل ۱) و سریع حرکت می کند.

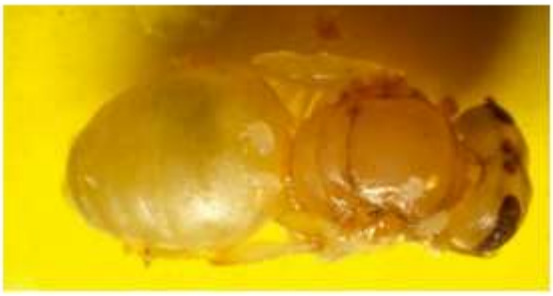
همچنین *تروپیله لپس* را نباید با دیگر انگل های خارجی زنبور عسل مانند مگس بروﻻ[1] یا دیگر جرب های *لیلا پیده* که در خرده بقایای کف کندوهای زنبور عسل زندگی می کنند مانند *ملیتیفیس آلوآریوس*[2] (شکل ۴) یا جرب *امروسیده* [3] (*نئوسیفولا پس آپیکولا* [4]) اشتباه گرفت.



شکل ۱ : سطح پشتی *تروپیله لپس و واروا*

شکل ۲: *تروپیله لپس* بر روی لارو *آپیس دورساتا*

[1] . Braula flies
[2] . Mellitiphis alvearius
[3] . Ameroseiidae mite
[4] . Neocypholaelaps apicola



شکل ۳: نوزاد *تروپیله لپس* بر روی شفیره *آپیس ملیفرا*

شکل ۴: ۱- *برولا سوئکا*، ۲- *واروا دستراکتور*، ۳- *تروپیله لپس*(**SPP**)، ۴- *ملیتیفیس آلواریوس*(سطح پشتی)

جمع آوری جرب:

روش جمع کردن جرب شامل غلطاندن در اتر یا شکر می باشد. تقریباً ۲۰۰-۱۰۰ زنبور را در یک ظرف (دهان گشاد) درب دار جمع آوری کنید. برای جمع آوری زنبورها می توانید ظرف را در زنبورستان روی قاب مملو از زنبور کشیده ویا با مکش جارو برقی (که به همین منظور تغییر شکل داده شده)، زنبورها را جمع کنید. باید پس از جمع آوری زنبور ها در کف ظرف، زنبورها باید به اندازه حدود ۲/۵ تا ۵ سانتی متر از پایین ظرف را اشغال کنند.

درب ظرف را بردارید و به مدت ۲ ثانیه با اتر (به عنوان مایع آغاز گر) به درون آن اسپری کنید. در روش دیگر، به اندازه کافی درون ظرف الکل ۷۰ درصد یا آب صابون بریزید تا روی زنبورها را بپوشاند یا این که حدود ۲۵ گرم پودر شکر (یا آرد) درون ظرف بریزید. در صورت استفاده از اتر درب ظرف را تعویض کرده و ظرف را به مدت ۱۰ ثانیه هم بزنید یا بچرخانید. جرب ها باید به دیواره بچسبند. چنانچه از صابون یا الکل استفاده می کنید، ظرف را هم بزنید و سپس با یک صفحه فلزی مشبک یا یک الک فلزی محتویات را صاف کنید. جرب ها از صافی رد می شوند.

شکل ۵: صفحه فلزی مشبک

شکل۶: الک مورد استفاده برای صاف کردن مایع حاوی

جرب و زنبورها

.

اگر از پودر شکر یا دیگر پودر ها استفاده می کنید، مش مخصوصی را روی درب ظرف تعبیه کنید (مانند همان صفحه فلزی مشبک) و سپس مانند نمک دان بر روی صفحه سفیدی بتکانید. هر دو دقیقه یکبار این کار را تکرار کنید. برای افزایش دقت آزمون، جهت اتمام کار از الکل یا آب صابون به منظور جمع آوری همه جرب ها استفاده کنید.

آزمایش جمعیت زنبورها و نوزادان:

هنگام پایش جمعیت های زنبور عسل از جهت وجود *تروپیله لپس* (یا *واروا*)، آزمایش نوزادان نر و کارگر می تواند نشانه اولیه آلودگی را مشخص کند. جرب ها را می توان داخل حجره سرپوشیده نوزادان زنبور با استفاده از چنگال زنبورداری[۵]مشاهده کرد که در این روش چنگال را داخل شان فروکرده و شفیره های سرپوشیده را بیرون می کشیم.[۶]جرب ها کاملاً قابل مشاهده هستند.

در مراحل ابتدایی تر، جرب ها سفید رنگ هستند و ممکن است در هنگام تغذیه بر روی بدن میزبان خود بی حرکت باشند زیرا ضمائم دهانی و پاهای جلویی در کوتیکول زنبور میزبان ثابت شده است. میزان درگیری با انگل را می توان با باز کردن تعدادی (از قبل تعیین شده) حجره های نوزادی تخمین زد؛ به این شکل که میزان آلودگی را به صورت درصد حجره های نوزادی سرپوشیده حاوی جرب های زنده محاسبه نمود.

آزمایش ضربه زدن:

روش دیگر ساده و سریع آزمایش ضربه زدن است. این روش شامل کوبیدن محکم قاب نوزادی زنبور عسل بر روی تشت جمع آوری می باشد. در ابتداء ، همه زنبور های بالغ را با تکاندن قاب حاوی نوزادان سرپوشیده در بالای کندو به داخل خود کندو می ریزیم. هنگامی که قاب ها از زنبورهای بالغ روی آن ها خالی شدند، آن ها را محکم روی تشت فلزی سفیدی می کوبیم. در این روش یک انتهای قاب به گوشه تشت کوبیده می شود ، قاب را بر می گردانیم ، دوباره با آن ضربه می زنیم و این فرآیند را دوباره تکرار می کنیم (تا مجموع ۴ ضربه). این فرآیند جرب ها را از روی سطح شان جدا می کند که سپس می توانیم آن ها را بشماریم.

آزمایش صفحه چسبناک:

تشخیص دقیق را می توان با استفاده از صفحه چسبناک پوشیده شده با مش انجام داد که در این روش از برگشت جرب های ریخته شده در کف کندو به داخل کندو (توسط زنبورها) ممانعت می شود. سوراخ های مش باید به اندازه ای باشد که جرب ها بتوانند از آن رد شوند. با استفاده از صفحه پوستر[۷]، کارتن یا هر کاغذ سفید محکمی که با وازلین یا دیگر مواد

۱- وسیله ای که معمولاً زنبوردار برای برداشتن سرپوش مومی روی حجره ها(پیش از استخراج عسل) از آن استفاده می کند.

۲- بهتر است تک تک حجره ها به وسیله پنس باز و مورد بررسی قرار گیرند.(م)

۳- مثلاً صفحات پلاستیکی بنرهای تبلیغاتی

چسبناک پوشیده شده اند صفحه چسبناکی بسازید[۸] کاغذ یا تکه پلاستیک (مانند پلاستیک بنرهای تبلیغاتی) را به اندازه کف کندو ببرید. تکه ای از صفحه مشبک یا مش را بالای صفحه چسبناک نصب کنید. برای جلوگیری از اینکه زنبورها جرب ها را از روی صفحه پاک کنند، زیر لبه های بیرونی بنر را تا کنید تا از روی تخته بلند شود و در جای خود منگنه یا چسب بزنید.

به مدت بیش از ۳ روز تخته کف کندو را به همین حالت باقی بگذارید و خرده بقایا و جرب ها را جمع آوری کنید. گاهی اوقات از آکاراسیدها برای جدا کردن جرب ها از روی زنبورها استفاده می شود که در این حالت جرب ها روی صفحه چسبناک قابل مشاهده هستند.

شناسایی آزمایشگاهی جرب:

تشخیص سریع و قابل اعتماد برای اجرایی کردن اقدامات بهداشتی و جلوگیری از انتشار در مناطق آلوده اهمیت زیادی دارد. در شرایطی که در زنبورستان به وجود آلودگی مشکوک باشیم، نمونه هایی که شک داریم که متعلق به جنس *تروپیله لپس* هستند را باید برای تایید تشخیص به آزمایشگاه ارسال کنیم. باید برای تشخیص اولیه از شناسایی ریخت شناسی بهره گیریم. این روش سریع و ارزان است و نیاز به تجهیزات پیچیده ندارد. آزمایش تاییدی می تواند با استفاده از PCR برای شناسایی مولکولی گونه های *تروپیله لپس* انجام شود.

اقدامات احتیاطی ویژه لازم برای نمونه برداری:

نمونه های مورد شناسایی باید از کندوهای زنبور عسل جمع آوری گردند. نمونه های مشکوک باید قبل از ارسال به آزمایشگاه کشته شوند. مثلاً هنگامی که قرار است از روش مولکولی استفاده شود نباید الکل اتانول ۷۰ درصد دناتوره را به کار برد، زیرا احتمال مهار واکنش زنجیره ای پلی مراز وجود دارد. به جای آن جهت کشتن نمونه ها، می توان آن ها را در طول یک شب در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. هنگام ورود به آزمایشگاه بسته ها باید در شرایط ایمن (از نظر فرار جرب ها) باز شوند. اگر در مقصد متوجه شدید که نمونه ها زنده هستند، نمونه باید تقریباً یک ساعت قبل از باز شدن کامل در دمای منفی۸۰ درجه سانتیگراد قرار گیرد. این روش نمونه ها را بی حرکت می کند که متعاقباً می توان آنها را در اتانول ۷۰ درصد نگهداری کرد.

۱- **بهتر است با ترکیبی از وازلین و روغن مایع با نسبت وزنی برابر این ماده چسبناک ساخته شود**

شناسایی ریخت شناسی *تروپیله لپس (SPP):*

این روش با در نظر گرفتن شاخص های ریخت شناسی جرب *تروپیله لپس* در مقایسه با سایر جنس های جرب (خاصه *واروا دستراکتور*) که عموماً در جمعیت های زنبور یافت می شوند، تنها براساس آزمایشات چشمی جرب های بالغ می باشد.
آزمایش چشمی توضیح داده شده برای تفریق بین ۴ گونه *تروپیله لپس* کافی نیست زیرا آن ها از نظر ریخت شناسی بسیار شبیه هستند.

تجهیزات و معرف ها :

تجهیزات کلاسیک حشره شناسی و مواد مورد نیاز:

- استریومیکروسکوپ (لوپ)
- میکروسکوپ مرکب(۱۰۰۰×)
- صفحه داغ
- ظروف: پتری دیش شیشه ای، ظروف سرامیکی چینی، شیشه ساعت یا مشابه آن
- سوزن گیرهای میکروی تشریح، مجهز به پین های کوچک و با پین های ساخته شده از نخ ماهیگیری (با انتهای له شده برای اینکه شکلی شبیه قاشق به خود بگیرند).
- انبرک با نوک ریز
- لام ها (کلاسیک و مقعر) به همراه لامل
- ویال های سر بسته هرمتیک
- اسید لاکتیک
- لاک محکم (مانند هویر) و لاک شفاف ناخن برای استفاده طولانی مدت
- محافظ اسلایدهای میکروسکوپی
- اتانول ۷۰٪ (از استفاده از اتانول دناتوره شده خودداری کنید).

روش آزمایش:

تمام نمونه ها در یک ظرف قرار داده می شوند و از نظر همگنی با استفاده از لوپ بررسی می شوند. اگر نمونه ها همگن نباشند، هر نوع موجود به صورت جداگانه آزمایش می شود. نمونه های تحت آزمایش باید از جرب های آسیب ندیده انتخاب شوند. نمونه ها با استفاده از انبرک (پنس) با نوک ریز یا نگهدارنده سوزن گرفته می شوند و برای بررسی بیشتر در ظرف قرار می گیرند.

زیر لوپ ، جرب ها برای سه معیار شناسایی اولیه *تروپیله لپس(SPP)* بررسی می شوند (جدول شماره ۲ پایین). اگر هیچ کدام از این سه معیار مشاهده نشد، آزمایشات میکروسکوپیک بیشتری دنبال نمی شود.

برای آزمایش میکروسکوپیک ، به منظور آشکار شدن مشخصات ریخت شناسی، بافت های نرم باید تمیز شوند. چند قطره اسید لاکتیک را روی لام میکروسکوپ بریزید (برای نمونه های بزرگتر از لام های مقعر استفاده کنید).

نمونه های انتخاب شده را با استفاده از نگهدارنده های سوزن (مجهز به نخ ماهیگیری) (یا انبرک خیلی ظریف) روی لام در اسید لاکتیک بگذارید.

با استفاده از دو نگهدارنده (مجهز به سوزن کوچک)، نمونه ها را طوری قرار دهید که سطح شکمی بالا باشد. بدون له کردن جرب یک لامل روی لام میکروسکوپیک قرار دهید و مواظب باشید که حباب های هوا تشکیل نشوند. در صورت امکان با دقت روی لامل شیشه ای با انبرک فشار وارد کنید تا پاها را که معمولا زیر بدن جمع شده اند از هم بازکنید. لام را روی صفحه داغ (تقریباً ۵۰ درجه سانتی گراد) قرار دهید و صبر کنید تا اسید لاکتیک اثر کند(تقریباً ۳۰ دقیقه).

نکته: مایع نباید روی لام بجوشد زیرا این اتفاق باعث تخریب نمونه می شود.

اسلایدها را زیر میکروسکوپ مرکب در بزرگنمایی ۱۰۰× ، ۲۰۰× ، و سپس ۴۰۰ × به منظور مشاهده کامل معیارهای تشخیصی مختلف (چنانچه در جدول شماره ۲ آمده است) آزمایش کنید. مشاهدات مقایسه ای باید با اسلایدهای رفرانس (در صورت دسترسی) مقایسه شود. ممکن است لازم باشد عمق میدان مشاهده شده با توجه به ضخامت بدن جرب متفاوت باشد.

نمونه ها را می توان در دمای اتاق در یک ویال سربسته محتوی اتانول ۷۰ درصد نگهداری کرد. اگر اسلاید ها را در محیط هویر[9]قرار دهیم و بگذاریم به مدت ۲ هفته در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک شود، سپس لامل را با لاک شفاف ناخن مهر و موم کنیم، می توان آن ها را برای مدت طولانی نگه داشت. برای اطلاعات بیشتر در مورد نگهداری و قرار دادن جرب ها به دایتمن[10] و همکاران مراجعه کنید. (۲۰۱۳).

[9] . Hoyer

[10] . Dietemann

معیار های شناسایی *تروپیله لپس (SPP)* بالغ:

تروپیله لپس (SPP) با چشم غیر مسلح قابل رویت است. طول آن تقریباً بین ۱- ۰/۶ میلی متر و عرض آن بین ۰/۵- ۰/۴ میلی متر است. *تروپیله لپس* از *واروا دستراکتور* کوچک تر است (شکل ۱ و ۴). اگر همه شاخصه های ریخت شناسی جرب بالغ تایید شود (معیارهای ۱ تا ۹ از جدول ۲)، نتیجه تایید مثبت جنس *تروپیله لپس* است. چنانچه یکی یا بیشتر از مشخصه های ریخت شناسی(معیارهای از ۱ تا ۹) تروپیله لپس (SPP) وجود نداشته باشد، نتیجه منفی و شناسایی جنس *تروپیله لپس* تایید نمی شود. اگر حضور یا عدم وجود همه ۹ معیار مشخص نشود، (مانند مواردی که نمونه آسیب دیده است) نتیجه غیر قطعی و از روش های مولکولی باید جهت تایید استفاده کرد.

ویژگی های زیر باید آزمایش شود:

۱- منافذ استیگماتا و تراشه ای.
۲- کوکسا : اولین قطعه پا است و پا را به بدن متصل می کند.
۳- پریترم[1,1] ساختارهای لوله ای شکل هستند که از استیگماتا خارج می شوند. آن ها می توانند در تنفس نقش داشته باشند.
۴- تریتواسترنوم[1,2] یک اندام حسی مویی مانند Y شکل است که پشت گناتوزوما قرار دارد (گناتوزوم بخشی از بدن آکاری است که شامل ضمائم دهانی است).

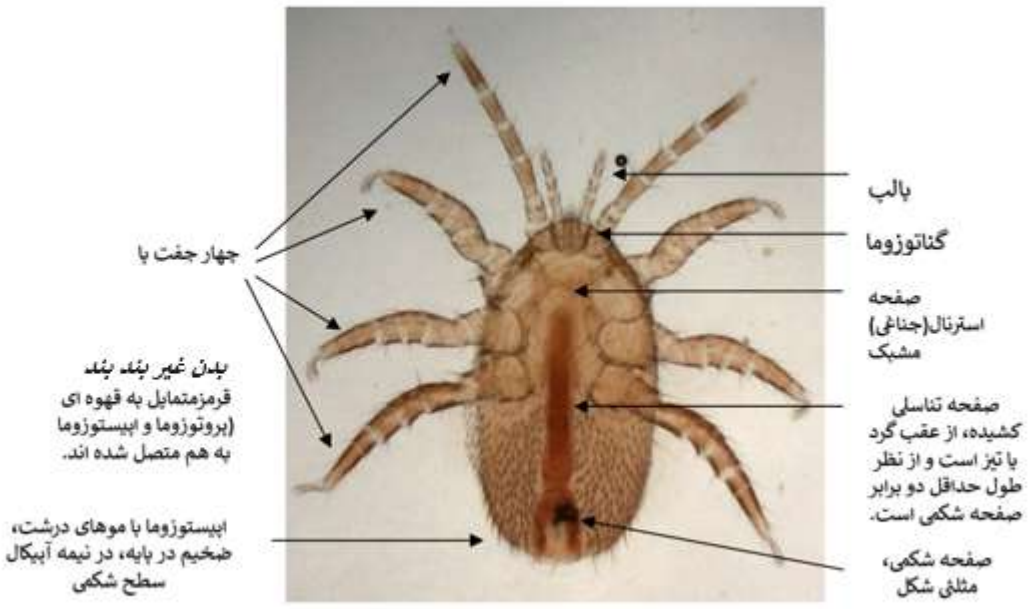
---

1 . Peritremes 1
1 . Tritosternum 2

جدول ۲: معیارهای تشخیصی تروپیله لپس (SPP)

	استریومیکروسکوپ (لوپ)	میکروسکوپ مرکب
۱- تروپیله لپس ۴ زوج پا دارد. اولین زوج به صورت عمودی (شبیه آنتن) می باشد (شکل۵) ← رده آرآکنیدا (Arachnida)	×	
۲- بدن به دلیل اتصال پروزوما (معادل سری سینه ای) و اوپیستوما (یا شکم) به صورت یک قسمتی، بند بند نیست شکل ۵) ← زیر رده آکاری	×	
۳- محور طولی بدن بلندتر از عرض آن است (برخلاف واروا دیستراکتور) (شکل ۱ و ۴)نسبت طول به عرض بیشتر از ۱/۳ است.	×	
۴- دارای یک زوج استیگمای کناری- شکمی بین کوکسای سوم و چهارم هستند(شکل ۵) ←راسته پارازیتی فورم		×۴۰۰
۵- وجود پریترم های کشیده (شکل ۷) . وجود یک تریتوستریوم (شکل ۷) (معیار اختیاری، مشاهده دشوار) ← تحت راسته مزوستیگماتا		×۲۰۰

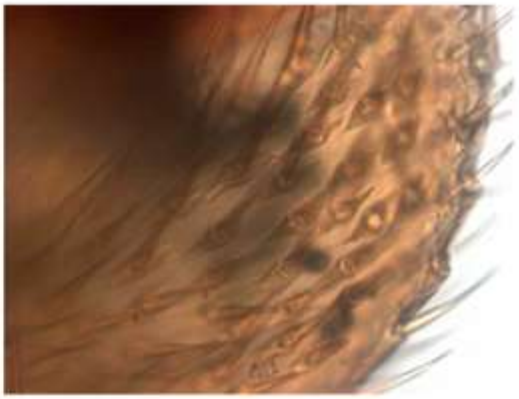
۶- صفحه اپیژنیال طویل، در خلف گرد یا نوک تیز. صفحه شکمی مثلثی شکل (شکل ۵ و ۶) ← لیلاپیده		×۱۰۰
۷ - صفحه اپیژنیال کشیده، حداقل دو برابر صفحه شکمی(شکل ۵ و ۶)		×۱۰۰یا×۲۰۰
۸- صفحه استرنال مشبک (شکل ۷)		×۴۰۰
۹- اوپیستوزوما با موهای درشت، ضخیم در قاعده[1] در نیمه آپیکال سمت شکمی (شکل ۵ و ۶).		×۲۰۰
توجه: معیارهای تشخیص نر و ماده: شنیسر نر نخی شکل (اسپرموداکتیل) است (شکل ۸) .صفحه اپی ژینیال در نر کوتاهتر از ماده است (شکل ۸)		×۲۰۰



شکل ۷: *تروبیکله لپس کلاره* ماده (سطح شکمی)

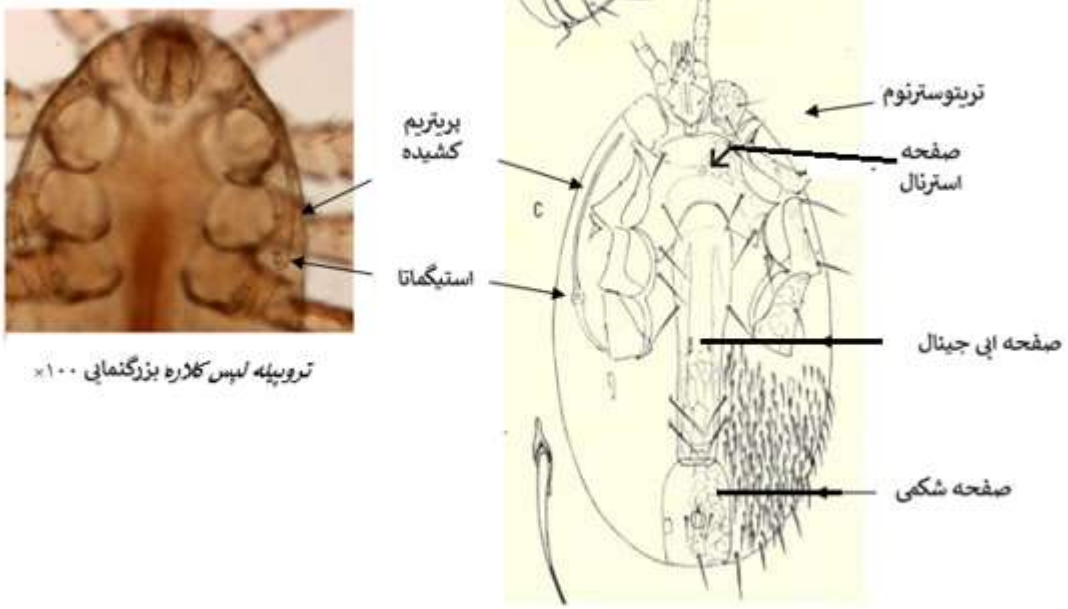
[1] قاعده موها ضخیم رتر است.

بزرگنمایی ۱۰۰×



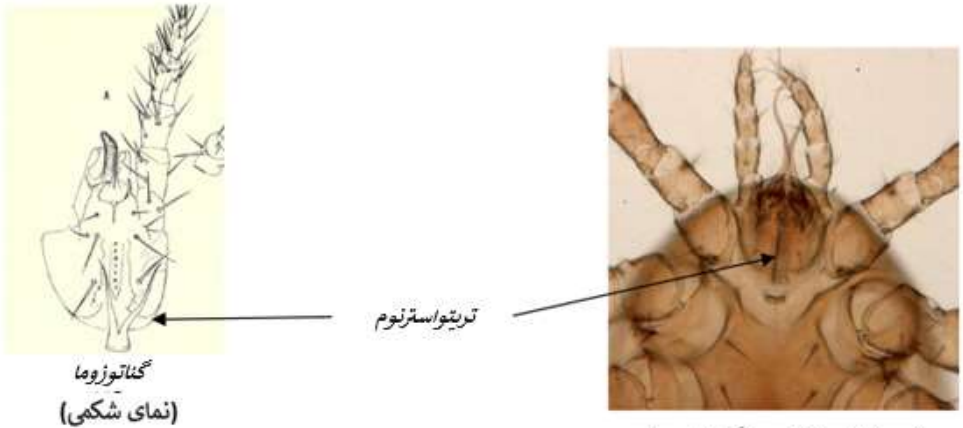
بزرگنمایی ۴۰۰×

شکل ۸: *تروبیله لیس (.SP)*: (سطح شکمی) *اوپیستوزوما*، موهای آپیکال درشت (قاعده موها ضخیم است).



تروبیله *لپس کلاره* بزرگنمایی ۱۰۰×

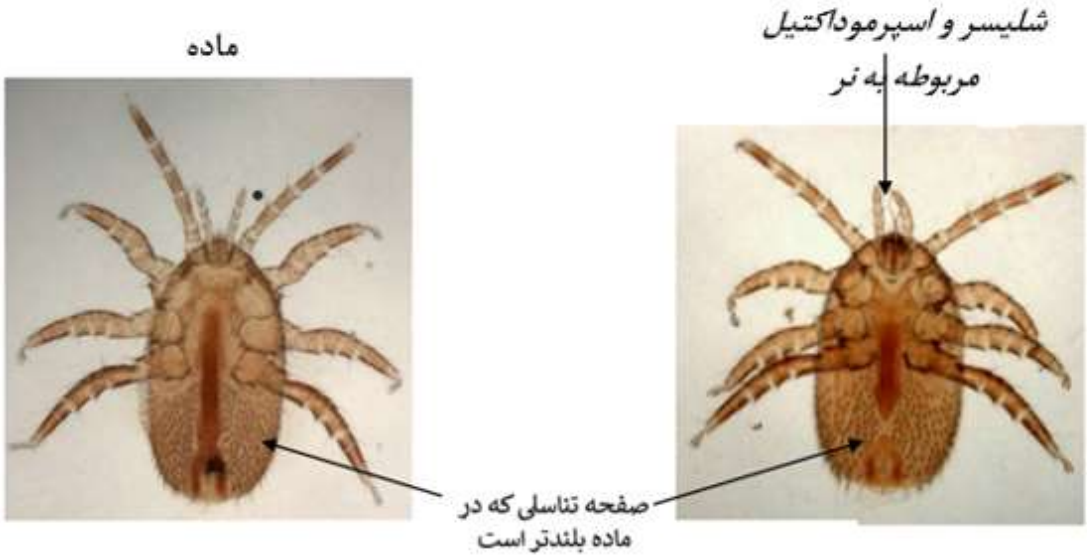
شکل۹: تروبیله *لپس ماده* (نمای شکمی)



گناتوزوما
(نمای شکمی)

تروبیله *لپس کلاره* بزرگنمایی ۲۰۰×

شکل10 آناتومی تروبیله *لپس کلاره*



شکل ۱۱: *تروپیله لپس* ، نرو ماده نمای شکمی

شناسایی مولکولی:

شناسایی ریخت شناسی *تروپیله لپس* (.SPP) به دلیل شباهت آن ها به دیگر جرب هایی که ممکن است در کندو یافت شوند، پیچیده است. روش های PCR به صورت فزاینده ای برای تایید موارد مشکوک به آلودگی در حال استفاده است. روش PCR معمولی که در زیر شرح داده شده است، براساس تقویت بخشی از یک توالی از ژن میتوکندری *تروپیله لپس* (.SPP) کد کننده سیتوکروم اکسیداز I (COI) می باشد. پرایمرهای COI-TCF1 و COI-TCR2 قطعه ۵۸۰ جفت باز را تکثیر می کنند. اندازه محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز در مقایسه با یک مارکر DNA (نشانگر وزن مولکولی) تعیین می شود. پرایمرها مخصوص *تروپیله لپس*(.spp) نیستند و تکثیر ژن COI از سایر انگل ها نیز می تواند انجام پذیرد، بنابراین زمانی که محصول PCR با اندازه مورد انتظار به دست آمد، لازم است DNA توالی یابی شود.

آماده سازی نمونه، تجهیزات و معرف ها:

.نمونه های آزمایش شده معمولاً حدود ۱۰ جرب بالغ می باشند که در الکل غیر دناتوره بالای ۹۵ درصد یا خشک نگهداری می شوند. اگر در الکل نگهداری شوند اول باید سه بار در حجم زیاد بافر فسفات (۵۰ میلی لیتر

در لوله) شستشو شوند یا به سادگی قبل از مرحله استخراج DNA برای چند دقیقه در دستمال کاغذی خشک شوند. جرب ها سپس به میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل می شوند . این مرحله برای جلوگیری از مهار مهم است. جرب ها با استفاده از یک ساچمه شیشه ای یکبار مصرف در میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری هضم می شوند. نمونه های آسیاب شده را می توان در دمای انجماد برابر یا کمتر ازمنفی۱۶ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

یک سیستم تشخیص و آنالیز PCR معمولی مورد نیاز است. از هر روش یا کیت مناسبی می توان برای استخراجDNA ، تکثیر در ترموسایکلر و به دنبال آن الکتروفورز استفاده کرد. روی ژل آگارز تمام تجهیزات و مواد باید برای استفاده در آزمایشگاه جداگانه تایید شوند .اقدامات معمول برای جلوگیری از آلودگی DNA باید انجام شود و روش ها باید از استانداردهای لازم پیروی کنند. برای تمام مراحل باید از کنترل های مثبت و منفی استفاده شود.

روش PCR :

پرایمرهای طراحی شده توسط آندرسون و مورگان (۲۰۰۷) به صورت زیر است:

نام	سکانس
COI-TCF1	5'-CTATCCTCAATTATTGAAATAGGAAC-3'
COI-TCR2	5'-TAGCGGCTGTGAAATAGGCTCG-3'

محصول واکنش PCR باید از دستورالعمل های سازنده در مورد روش های استفاده و ذخیره سازی تبعیت کند. محلول های در حال استفاده موجود برای پرایمرها با بافر TE اتیلن دی آمین تترااستیک اسید اندک (EDTA) بدون نوکلئاز در غلظت ۲۰ میکرو مولار در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد تهیه می شوند.

محصول واکنش PCR در یک اتاق آزمایشگاهی جداگانه آماده می شود. همه معرف ها، به جز نمونه های DNA، قبل از توزیع در هر کدام از لوله های واکنش مخلوط می شوند. در هر آزمایش PCR، کنترل‌های مناسب باید شامل حداقل یک الگوی کنترل (NTC، فقط معرف‌ها)، کنترل‌های منفی (یعنی ۱ در ۱۰ نمونه آزمایش‌شده) و یک کنترل مثبت (محلول DNA پلاسمید شامل توالی‌که باید تکثیر شود، اضافه می‌شود) گنجانده شود. تا ۱۰

برابر حد تشخیص [LDPCR] PCR رقیق شود. تکثیر ها در حجم کل ۲۰ میکرولیتر انجام می شود. مخلوط‌های معرف PCR در اتاق تمیز[2] اضافه می‌شوند.

	غلظت نهایی	حجم برای یک لوله (µl)
Nuclease free H_2O	/	12.6
Taq DNA pol (5 U/µl)	0.5 U/µl	0.2
Taq DNA pol buffer (10×)	1×	2.0
$MgCl_2$ (50 mM)	3.5 mM	1.3
dNTP mix (10 mM)	450 µM	0.9
COI-TCF1 (20 µM)	500 nM	0.5
COI-TCR2 (20 µM)	500 nM	0.5
Mix total volume		18

2میکرولیتر از نمونه DNA (نمونه ناشناخته یا DNA پلاسمید) یا کنترل منفی را به مخلوط معرف اضافه نموده تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد .نمونه های DNA باید تهیه شوند و به مخلوط PCR در جای دیگر اضافه شوند.

یک مثال از برنامه ترموسایکلر به شرح زیر است:

مرحله	چرخه	دما (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)
دناتوراسیون اولیه	۱	۹۵	۵:۰۰
PCR	۳۵	۹۴	۰:۳۰
		۵۸	۰:۳۰
		۷۲	۰:۴۵
اکستنشن نهایی	۱	۷۲	۷
نگهداری		۱۰	∞

بهینه سازی PCR به ویژه آزمایش با دماهای متفاوت باید با توجه به مستر میکس و دستگاه PCR مورد استفاده انجام شود.

[2] . Clean room

،

تشخیص محصولات تکثیر شده:

۱- ژل آگارز ۱/۲ درصد در TAE (Tris-acetate-EDTA) یک درصد با تعداد چاهک مناسب تهیه کنید.
۲- ۲ میکرولیتر از بافر Loading ۶× به ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR اضافه نمایید.
۳- ۱۰ میکرولیتر از نمونه ها را داخل چاهک ها قرار دهید.
۴- جهت کنترل اندازه محصولات تکثیر شده، مارکر ۱۰۰ جفت باز توصیه می شود.
۵- نمونه را روی ژل الکتروفورز قرار دهید.
۶- پس از رنگ آمیزی با یک رنگ DNA مناسب با نور UV آنالیز کنید.

تفسیر نتایج بر اساس وجود یا عدم وجود محصول تکثیر شده است :اندازه مورد انتظار محصول مورد انتظار ۵۸۰ PCR جفت باز با دو پرایمر است. با این حال، وجود یک محصول PCR با اندازه مناسب جهت شناسایی جنس و گونه *تروپیله لپس* کافی نیست .یک مرحله تعیین توالی مورد نیاز است.

تعیین توالی محصول PCR:

اگر باند ۵۸۰ جفت باز تشخیص داده شود، محصول PCR باید توالی یابی گردد. روش در اینجا توضیح داده نشده است. بخشی از توالی های COI قابل دسترس در بانک ژن (با شماره های دسترسی EF025423 تا EF025468 وHQ533148 تا HQ533159) در آنالیز محصول جهت رسم درخت فیلوژنیک و تعیین گونه های *تروپیله لپس* استفاده می شود. با این روش واروا از نظر سکانس های COI خارج گروه قرار می گیرد (EF025469, 25394743).

آزمایشات سرولوژیک:

آزمایشات سرولوژیکی مناسب یا مرتبط با آلودگی جمعیت های زنبور عسل وجود ندارند.

الزامات واکسن:

هیچ واکسنی وجود ندارد.