มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10351-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10351-2007

การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง

DIAGNOSIS OF AMERICAN FOULBROOD IN BEE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220 **ISBN** _ _ _-_ _ _-_ _ _-_

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10351-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10351-2007

การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง

DIAGNOSIS OF AMERICAN FOULBROOD IN BEE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3 ถนนราชดำเนินนอก เขตพระนคร กรุงเทพฯ 10200

โทรศัพท์ 0 2283 1600 โทรสาร 0 2280 3877

www.acfs.go.th

ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 125 ตอนพิเศษ 3 ง

วันที่ 4 มกราคม พุทธศักราช 2551

คณะอนุกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างมาตรฐานด้านสุขอนามัยสัตว์ คณะที่ 2 :
คณะอนุกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างการชันสูตรโรคในผึ้ง

1.	อธิบดีกรมปศุสัตว์ (นางลัดดาวัลย์ รัตนนคร แทนอธิบดี)	ประธานอนุกรรมการ
2.	ผู้แทนกรมปศุสัตว์ (นางลัดดาวัลย์ รัตนนคร)	อนุกรรมการ
3.	ผู้แทนกรมส่งเสริมการเกษตร (นายอุดม จิรเศวตกุล)	อนุกรรมการ
4.	ผู้แทนสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ (นางวันทนีย์ เนรมิตมานสุข นางมนทกานติ์ วงศ์ภากร)	อนุกรรมการ
5.	ผู้แทนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (รองศาสตราจารย์สาวิตรี มาไลยพันธุ์)	อนุกรรมการ
6.	ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ศาสตราจารย์สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)	อนุกรรมการ
7.	ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร)	อนุกรรมการ
8.	ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (นายสมลักษณ์ วงศ์สมาโนดน์)	อนุกรรมการ
9.	ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง (ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมนึก บุญเกิด)	อนุกรรมการ
10.	ผู้แทนสมาคมผู้เลี้ยงผึ้งภาคเหนือแห่งประเทศไทย (นายศิริศักดิ์ เตียวตระกูล)	อนุกรรมการ
11.	ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นางอรทัย ศิลปนภาพร นางนันทนา โปษณเจริญ นางสาวยุพา เหล่าจินดาพันธ์)	อนุกรรมการ
12.	ผู้ทรงคุณวุฒิ หรือผู้แทนภาคเอกชน (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยงยุทธ ไวคกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัญชลี สวาสดิ์ธรรม)	อนุกรรมการ

13.	ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นางสาวดรุณี ทันตสุวรรณ นายสงขลา จุลกะเศียน)	อนุกรรมการและเลขานุการ
14.	ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (นางสาวมินตรา ลักขณา นางสาวสคราญมณี กระจ่างวงษ์)	อนุกรรมการและ ผู้ช่วยเลขานุการ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง กำหนดวิธีการชันสูตรเพื่อใช้รับรองการปลอดโรคอเมริกันฟาวล์บรูดของสินค้าผึ้งและผลิตภัณฑ์ และใช้เป็นคู่มือการชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในห้องปฏิบัติการให้เป็นไปอย่างถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งประกอบด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย วิธีโฮสท์ มิลค์ เทสต์ (Holst milk test) วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรส เพื่อส่งเสริมระบบการผลิตสินค้าผึ้งและผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย มีคุณภาพเหมาะสมต่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและระหว่างประเทศ และเป็นประโยชน์ในการประกาศ (notify) สถานะการระบาดของโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในประเทศและต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

OIE. 2004. American foulbrood. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.9.2. World Organisation for Animal Health., Paris, France.

ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :
การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง
พ.ศ. 2550

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 2/2550 เมื่อวันที่ 28 สิงหาคม 2550 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 3 เมษายน 2550 จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง ไว้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ 26 กันยายน พ.ศ. 2550

(ศาสตราจารย์ธีระ สูตะบุตร)
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้ง

1 ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย วิธีโฮสท์ มิลค์ เทสต์ (Holst milk test) วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรส

2 นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 ผึ้ง (honey bee) หมายถึง ผึ้งที่เลี้ยงเพื่อผลิตน้ำผึ้ง ซึ่งมีอยู่สองชนิดในประเทศไทย คือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และผึ้งพันธุ์ยุโรป (*Apis mellifera*) แต่ในมาตรฐานนี้จะหมายความถึงผึ้งพันธุ์ยุโรปเท่านั้น

2.2 โรคอเมริกันฟาวล์บรูด (American foulbrood) หมายถึง โรคระบาดในตัวอ่อนผึ้งระยะที่เป็นหนอนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae larvae* (*P.l. larvae*)

2.3 ตัวอ่อนผึ้ง (bee brood) หมายถึง ไข่ หนอน และดักแด้ในรังผึ้ง

2.4 ไขผึ้ง (beeswax) หมายถึง สารที่ผึ้งงานผลิตออกมาจากต่อมไขผึ้ง (wax glands) ในการสร้างรวงผึ้ง

2.5 หลอดรวงผึ้ง (cell) หมายถึง ช่องรูปหกเหลี่ยมด้านเท่า ซึ่งหลาย ๆ หลอดรวงผึ้ง จะประกอบกันเป็นรวงผึ้ง

2.6 รังผึ้ง (bee colony) หมายถึง ผึ้ง 1 รัง ซึ่งประกอบด้วย ผึ้งนางพญา ผึ้งงาน ผึ้งตัวผู้ รวงตัวอ่อนผึ้งและรวงอาหาร

2.7 น้ำผึ้ง (honey) หมายถึง ของเหลว ข้น รสหวาน ซึ่งผึ้งผลิตขึ้นจากน้ำหวานของดอกไม้ หรือจากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นไม้ หรือผลิตจากของเหลว (honey dew) ที่ขับออกมาจากแมลงวงศ์ Homoptera แล้วสะสมไว้ในรังผึ้ง

2.8 เกสรผึ้ง (bee pollen) หมายถึง เกสรดอกไม้ที่ผึ้งรวบรวมมาเลี้ยงตัวอ่อน

2.9 รอยัลเยลลี่ หรือ นมผึ้ง (royal jelly or bee milk) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ผึ้งงานผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนที่จะกลายเป็นผึ้งนางพญาต่อไป มีลักษณะเหมือนครีมข้นสีขาว แต่ไม่รวมถึงรอยัลเยลลี่ที่นำไปประเหยน้ำออกจนแห้ง

2.10 ฟาร์มผึ้ง (bee farm) หมายถึง สถานที่เลี้ยงผึ้ง เพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิตน้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จากผึ้ง

2.11 วิธีทดสอบเพื่อคัดกรองโรค หรือทดสอบแบบรวดเร็ว (screening test or rapid test) หมายถึง วิธีการตรวจโรคเบื้องต้น ที่สะดวก รวดเร็ว

2.12 วิธีทดสอบเพื่อยืนยันโรค (confirmation test) หมายถึง วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการยืนยันผลการทดสอบโรคเบื้องต้น และเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความจำเพาะและความไวสูง

2.13 ความไว (sensitivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกในกลุ่มตัวอย่างจากตัวอย่างที่ติดเชื้อ

2.14 ความจำเพาะ (specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบในกลุ่มตัวอย่างจากตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อ

3 การชันสูตรโรค

การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูดในผึ้งด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ วิธีทางพยาธิวิทยา วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน

เมื่อได้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว ให้สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางด้านการเลี้ยงผึ้ง เป็นผู้พิจารณาประวัติ วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคอเมริกันฟาวล์บรูดร่วมด้วยตามรายละเอียดในภาคผนวก ก เพื่อให้การรักษาและป้องกันโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 เก็บตัวอย่างรวงผึ้ง โดยเลือกรวงที่มีตัวอ่อนผึ้งเน่าตายอยู่เป็นจำนวนมากเท่าที่จะมากได้ ขนาดรวงประมาณ 20 cm^2 และไม่ควรมีน้ำผึ้งปนในตัวอย่างรวงผึ้ง ใส่ตัวอย่างในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

3.1.2 ถ้าไม่สามารถส่งตัวอย่างรวงผึ้งได้ ให้ส่งไม้ที่ใช้ตรวจหลอดรวงผึ้งแทนได้ เนื่องจากอาจมีเชื้อก่อโรคติดมากพอกับการชันสูตร

3.1.3 กรณีเก็บตัวอย่างผลิตผลจากผึ้ง ได้แก่ น้ำผึ้ง รอยัลเยลลี่ เกสรผึ้ง และไขผึ้ง เป็นต้น ใส่ตัวอย่างผลิตผลประมาณ 50 g ในภาชนะที่สะอาด ปิดสนิท แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการณ์โดยเร็ว

3.1.4 กรณีเก็บรักษาเชื้อ สามารถเก็บรักษาเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ได้นานถึง 6 เดือน หรือเก็บเชื้อในลักษณะเชื้อแห้งโดยผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครส 10 % สารสกัดยีสต์ (yeast extract) 5% โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 mol ความเป็นกรด-เบส (pH) 6.6 แล้วผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เซชั่น (lyophilisation) เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ได้นานหลายปี

3.1.5 ติดฉลากตัวอย่างโดยต้องมีข้อความที่อ่านได้ชัดเจนไม่ลอกหลุด และแสดงรายละเอียด ดังนี้ ประเภทตัวอย่าง ชื่อฟาร์ม เลขที่รัง สถานที่ วันที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจ และผู้เก็บตัวอย่าง

3.2 วิธีทดสอบเพื่อคัดกรองโรคหรือวิธีทดสอบแบบรวดเร็ว

3.2.1 วิธีทางพยาธิวิทยา

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโดยการตรวจหารอยโรคจากหลอดรวงผึ้ง หากเป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูดจะพบตัวอ่อนผึ้งที่ตายมีสีเข้มกว่าปกติ ยุบตัวราบติดผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง และเมื่อเน่าสลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำ บางกรณีอาจตรวจหาตัวอ่อนผึ้งที่ตายในรวงผึ้งยาก แนะนำให้ใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต หรือแสงที่มีช่วงคลื่นแสงใกล้อุลตร้าไวโอเลต (310 nm ถึง 400 nm) ช่วยในการตรวจหาตัวอ่อนผึ้งที่แห้งตาย หรือชิ้นส่วนของตัวอ่อนที่แห้งติดหลอดรวงผึ้ง (scale) ด้วยโรคอเมริกันฟาวล์บรูด โดยหากเป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูด ตัวอ่อนผึ้งจะเรืองแสงภายใต้ช่วงแสงดังกล่าว อย่างไรก็ดีต้องตรวจสอบอย่างรอบคอบ เนื่องจากน้ำผึ้งและเกสรผึ้งจะทำให้เกิดการเรืองแสงได้เช่นกัน

3.2.2 วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโดยตรวจดูสัณฐานวิทยา (morphology) ของ *P. l. larvae* ใช้เป็นวิธีตรวจแยกโรคอเมริกันฟาวล์บรูดออกจากโรคตัวอ่อนผึ้งเน่าที่เกิดจากสาเหตุอื่น แต่เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะต่ำ จึงใช้เป็นการชันสูตรโรคแบบรวดเร็วเท่านั้น

(1) หยดน้ำกลั่น 2 หยดลงบนตัวอ่อนผึ้งที่ตาย และเขี่ยไปมาในน้ำ

(2) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) นำของเหลวจากข้อ (1) และเกลี่ยหยดน้ำบนกระจกสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ

(3) ตั้งกระจกสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง แล้วลนกระจกสไลด์ด้วยเปลวไฟ เพื่อทำให้ตัวอย่างติดบนกระจกสไลด์ (heat fix)

(4) ย้อมตัวอย่างที่ติดบนกระจกสไลด์ด้วยสี carbol fuchsin นาน 30 s หรือย้อมด้วยสีย้อมสปอร์ชนิดอื่น ๆ

(5) ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง

(6) หยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปตรวจดูแบคทีเรียก่อโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope) ที่กำลังขยายอย่างน้อย 1 000 เท่า

(7) การแปลผล หากตัวอย่างที่ตรวจเป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูด จะเห็นสปอร์ของ *P. l. larvae* เป็นลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 1.3 µm x 0.6 µm ถ้าติดเชื้อในช่วง 10 วันแรก จะเห็นเซลล์ของแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นแท่งยาว (vegetative form) ถ้าย้อมเชื้อนี้ด้วยสีกรัม (Gram's stain) จะเห็นแบคทีเรียเป็นแท่งยาวติดสีน้ำเงินม่วง

3.2.3 การตรวจสปอร์แบคทีเรียก่อโรคจากน้ำผึ้ง

(1) นำตัวอย่างน้ำผึ้ง 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 ^{0}C ถึง 50 ^{0}C เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 ml แล้วเขย่าให้สปอร์ที่ปนอยู่ในน้ำผึ้งกระจายทั่วหลอด

(2) นำน้ำผึ้งที่เจือจางแล้วใส่ใน dialysis tube ขนาด 44 mm และจุ่ม dialysis tube ในภาชนะที่มีน้ำไหลผ่านนาน 18 h หรือแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ บ่มที่อุณหภูมิ 45 ^{0}C นาน 18 h โดยต้องเปลี่ยนน้ำในอ่างประมาณ 3 ครั้ง นำตัวอย่างใน dialysis tube มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2 000 ***g*** นาน 20 min

(3) ในกรณีที่ไม่ได้ใช้ขั้นตอน dialysis ให้นำน้ำผึ้งปั่นตกตะกอนที่ 3 000 ***g*** นาน 30 min

(4) นำตะกอนมาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 จนมีปริมาณ 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 10 min เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 2 000 ***g*** นาน 20 min

(5) นำตะกอน (อาจมีเชื้ออยู่) ที่ได้ในข้อ (4) ป้ายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เช่น brain heart infusion หรือนำไปป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่มี nalidixic acid ความเข้มข้น 3 µg/ml (nalidixic acid มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Paenibacillus alvei* (*P. alvei*))

(6) การแปลผล ตรวจดูรูปร่างและสีสปอร์ของเชื้อ หากตัวอย่างที่ตรวจมีเชื้อโรคอเมริกันฟาวล์บรูด จะเห็นโคโลนีของการเจริญของแบคทีเรียมีลักษณะ สีขาวครีม ทึบแสง ขนาดประมาณ 1 mm ถึง 3 mm ภายหลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34 °C ถึง 37 °C เป็นเวลา 2 วัน ถึง 4 วัน ถ้าย้อมเชื้อนี้ด้วยสีกรัม จะเห็นแบคทีเรียเป็นแท่งยาวติดสีน้ำเงินม่วง

3.2.4 วิธีโฮสท์ มิลค์ เทสต์ (Holst milk test)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบหาเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (protease) โดย *P. l. larvae* จะสร้างขึ้นเมื่อเป็นสปอร์ การทดสอบทำได้โดยนำตัวอ่อนผึ้งสดหรือซากที่แห้งติดหลอดรวงผึ้ง ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย skim milk 1% ปริมาณ 1 ml ถึง 4 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C ถ้ามีเชื้อ *P. l. larvae* ผสมอยู่จะเปลี่ยนสารละลายจากขุ่นเป็นใสในเวลา 10 min ถึง 20 min

3.3 วิธีทดสอบเพื่อยืนยันโรค

3.3.1 วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างรวงผึ้ง ประกอบด้วย ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) จากตัวอย่าง การเพาะเชื้อต่อ (subculture) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ บลัด อาการ์ (blood agar), เจ-มีเดียม (J-medium) หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ ที่ได้รับการยอมรับ หลังจากนั้นเป็นขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้ เพื่อพิสูจน์เชื้อที่พบว่าเป็น *P. l. larvae*

3.3.1.1 เทคนิคการเพาะเชื้อ (culture techniques)

การเตรียมตัวอย่าง

(1) กรณีตัวอย่างเป็นตัวอ่อนผึ้งหรือซากตัวอ่อนผึ้ง ให้นำตัวอย่างมาผสมกับน้ำกลั่นหรือ PBS (phosphate buffer saline) ที่ปลอดเชื้อ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม ปริมาณ 5 ml ถึง 10 ml ในหลอดทดลอง และบ่มที่อุณหภูมิ 80 ^{0}C นาน 10 min เพื่อทำลายแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์

(2) กรณีตัวอย่างเป็นน้ำผึ้งและรอยัลเยลลี่ ให้ปั่นเหวี่ยงและแยกน้ำออกจากน้ำผึ้งหรือรอยัลเยลลี่ก่อน ซึ่งจะช่วยให้ได้สปอร์ของแบคทีเรียมากขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบ หรือถ้าเป็นไขผึ้งอาจสกัดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนนำไปเพาะเชื้อ

(3) กรณีเป็นเกสรผึ้ง ให้นำตัวอย่างมาผสมกับน้ำกลั่น แล้วกรองสารละลายเกสรผึ้งด้วยกระดาษกรอง ก่อนนำไปเพาะเชื้อ

(4) ใช้สำลีพันปลายไม้หรือห่วงเขี่ยเชื้อ จุ่มตัวอย่างจากข้อ (1) ป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar หรือ J-medium และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34 ^{0}C ถึง 37 ^{0}C นาน 2 วัน ถึง 4 วัน

(5) การแปลผล หากพบแบคทีเรียเป็นโคโลนีขนาดเล็กทึบแสง ให้นำไปทดสอบยืนยันว่าเป็น *P. l. larvae* ด้วยวิธีทางชีวเคมีต่อไป

3.3.1.2 การทดสอบทางชีวเคมี

เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อก่อโรค (*P. l. larvae*) กับแบคทีเรียที่สร้างสปอร์อื่น ๆ โดยใช้คุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ *P. l. larvae* ประกอบด้วย ความสามารถของเชื้อในการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ การไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต การสร้างกรดจากกลูโคส (glucose) และ ทรีฮาโลส (trehalose) การไม่ย่อยสลายแป้ง การย่อยเคซีน การไม่ใช้ซิเตรท การเจริญในอาหารเหลว และการย่อยเจลาติน

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่เพาะแยกได้จากตัวอย่าง (ข้อ 3.3.1.1) ประมาณ 2 โคโลนี ดำเนินการดังต่อไปนี้

3.3.1.2.1 การทดสอบไนเตรตรีดักชัน (nitrate reduction test)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion with Thiamine (BHIT) (ตามภาคผนวก ค) โดยให้มี potassium nitrate 1 mg/l ถึง 2 mg/l

(2) เพาะแบคทีเรียที่สงสัยในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C รอให้เชื้อเจริญจนมีจำนวนมากพอ

(3) หยดสารละลาย sulphanilic acid-alpha-naphthyl reagent 1 หยด ถึง 2 หยด

(4) การแปลผล สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปหากเป็น *P. l. larvae* จะปรากฏสีแดง เนื่องจาก *P. l. larvae* สามารถเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้

3.3.1.2.2 การทดสอบคะตะเลส (catalase test)

(1) หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3% ลงบนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

(2) การแปลผล สังเกตการเกิดฟองอากาศ กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะไม่เกิดฟอง (แบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่มีออกซิเจนโดยทั่วไปจะเปลี่ยนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน และทำให้เกิดฟองอากาศ)

3.3.1.2.3 การทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียจากคาร์โบไฮเดรท (production of acid from carbohydrates)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ในหลอดทดลอง จำนวน 4 หลอด โดยเตรียมอาหารเหลว J-medium (ตามภาคผนวก ค) ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส และใส่สารผสมของ L(+)-arabinose 0.5%, D(+)-glucose 0.5%, D(+)-xylose 0.5% หรือ D(+)-trehalose 0.5% ในแต่ละหลอดแทน

(2) เพาะแบคทีเรียที่สงสัยในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) ในหลอดทดลองทั้ง 4 หลอด และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 14 วัน

(3) ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ จากข้อ (2) 1 ml หยดลงบนจานหลุม (spot plate) และหยด 0.04% alcoholic bromocresol purple 1 หยด

(4) การแปลผล สังเกตการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากเชื้อ *P. l. larvae* จะสร้างกรดจากกลูโคสและทรีฮาโลส ได้

3.3.1.2.4 การทดสอบการย่อยแป้ง (hydrolysis of starch)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ โดยเตรียม J-medium ปริมาณ 100 ml ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส แต่ผสมแป้ง (starch) 1 g ในน้ำกลั่น 10 ml แทน ทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ทิ้งไว้ให้เย็น เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 45 °C ให้เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

(2) เพาะแบคทีเรียที่สงสัยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 5 วัน ถึง 10 วัน

(3) เทสารละลายไอโอดีนให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 min ถึง 30 min

(4) การแปลผล ถ้าเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาวขุ่น แสดงว่าแบคทีเรียที่สงสัยเป็นเชื้อ *P. l. larvae* เนื่องจาก *P. l. larvae* จะไม่ย่อยสลายแป้ง ถ้าแป้งถูกย่อยจะเห็นเป็นวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.2.5 การทดสอบการย่อยเคซีน (hydrolysis of casein)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ โดยผสม skim milk 10% กับ วุ้น 3% และทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ทิ้งไว้ให้เย็น เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิ 45 ^{0}C ให้เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

(2) นำแบคทีเรียที่สงสัยที่มีอายุ 24 h มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 7 วัน

(3) การแปลผล กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะเห็นวงใสบริเวณด้านล่างและรอบ ๆ โคโลนี เนื่องจาก *P. l. larvae* ย่อยสลายเคซีน

3.3.1.2.6 การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ โดยเตรียมอาหาร J-medium ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส แต่เติมโซเดียมซิเตรท 2 g แทน แล้วทำให้ปลอดเชื้อ

(2) นำแบคทีเรียที่สงสัยที่มีอายุ 3 วัน ถึง 4 วัน มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 14 วัน ถึง 21 วัน

(3) นำเชื้อที่เจริญดีจากข้อ (2) ผสมกับ phenol red บน spot plate

(4) การแปลผล สังเกตการเปลี่ยนสีของ phenol red กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะไม่มีการเปลี่ยนสี เนื่องจากไม่ได้ใช้โซเดียมซิเตรท

3.3.1.2.7 การเจริญในอาหารเหลว (growth in nutrient broth)

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ในหลอดทดลอง โดยเตรียมอาหารเหลว nutrient broth ที่ประกอบด้วย beef extract 3 g, peptone 5 g และน้ำกลั่น 1 000 ml

(2) เพาะแบคทีเรียที่สงสัยในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 14 วัน

(3) ทำซ้ำข้อ (2) ประมาณ 10 ครั้ง

(4) การแปลผล กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะไม่สามารถเจริญได้ใน nutrient broth โดยเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีลักษณะใสเหมือนเดิม

3.3.1.2.8 การย่อยเจลาติน (hydrolysis of gelatin)

(1) เตรียมเจลาติน 12% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ในหลอดทดลอง

(2) เพาะแบคทีเรียที่สงสัยในเจลาติน ที่อุณหภูมิ 28 ^{0}C และตรวจดูการสลายตัวของเจลาติน ทุกๆ 3 วัน นาน 4 สัปดาห์ โดยก่อนอ่านผลทุกครั้ง นำหลอดทดลองไปไว้ที่อุณหภูมิ 20 ^{0}C นาน 4 h

(3) การแปลผล กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larv*ae จะพบเจลาตินมีลักษณะเหลวกว่าปกติ เนื่องจาก *P. l. larv*ae ย่อยเจลาตินได้

หมายเหตุ สามารถใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปอื่นๆ ที่ได้รับการยอมรับ แทนวิธีข้างต้นได้

3.3.2 วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *P. l. larvae* ส่วนใหญ่ใช้ polyclonal rabbit serum ได้แก่ วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน [1] (immunodiffusion test) วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescence antibody test; IFA) แต่การชันสูตรโรคด้วยวิธี IFA มักให้ผลคลาดเคลื่อน เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อที่ไม่ก่อโรค เช่น *P. alvei*

นอกจากนี้วิธีอีไลซา [2] (enzyme linked-immunosorbent assay; ELISA) ที่ใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *P. l. larvae* หรือ lateral flow device สามารถนำมาวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

---

[1] Peng .Y.S. & Peng K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, 33, 284-289.

[2] Olsen P.E., Grant G.A., Nelson D.L. & Rice W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, 36, 732-735.

3.3.3 วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

หลักการของวิธีนี้ คือ การตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ *P. l. larv*ae ประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ ขั้นตอนต่อมาเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบบทวีคูณจนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้ การตรวจเชื้อ P. l. larvae โดยใช้วิธี PCR สามารถทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA

วิธีการ

(1) นำ genomic DNA ที่สกัดจากตัวอย่างตามภาคผนวก ง ดูดสารละลายส่วนบนมาปริมาณ 1 µl ถึง 3 µl เพื่อนำไปเป็นต้นแบบของดีเอ็นเอ (template DNA) ใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย $MgCl_2$ 2 mmol/l และไพรเมอร์ (ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ในตารางที่ 1) จำนวน 50 pmol/µl, 25 mmol/l ของ dNTP[3] และ 1 U/ µl ถึง 1.25 U/ µl ของ Taq polymerase

(2) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง thermocycler ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 95 ^{0}C นาน 1 min ถึง 15 min

ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 93 ^{0}C นาน 1 min

55 ^{0}C นาน 30 s

72 ^{0}C นาน 1 min

ทำขั้นที่ 2 ซ้ำ เป็นจำนวน 30 รอบ

ขั้นที่ 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 72 ^{0}C นาน 5 min

(3) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟเรซิส (electrophoresis) บน agarose gel 0.8% แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide

(4) นำแผ่นเจลไปอ่านด้วยเครื่อง visible-UV gel transmission จะเห็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ agarose gel

[3] dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate) ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP และ dTTP เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบโรคอเมริกันฟาวล์บรูด

ทิศทาง (direction)	**ลำดับเบส (sequence)**	**ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จาก PCR (PCR-product size)**	**ระดับความจำเพาะ (specificity level)**
forward reverse	5'-AAG-TCG-AGC-GGA-CCT-TGT-GTT-TC-3' 5'-TCT-ATC-TCA-AAA-CCG-GTC-AGA-GG-3'	973 bp	species
forward reverse	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3' 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	1 106 bp	species
forward reverse	5'-CGA-GCG-GAC-CTT-GTG-TTT-CC-3' 5'-TCA-GTT-ATA-GGC-CAG-AAA-GC-3'	700 bp	subspecies

การแปลผล

ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะเห็นแถบเรืองแสงของดีเอ็นเอ ตามขนาดไพรเมอร์ที่ใช้ในตารางที่ 1

ภาคผนวก ก

วิทยาทางระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคอเมริกันฟาวล์บรูด

(ข้อ 3)

ก.1 วิทยาทางระบาด

โรคอเมริกันฟาวล์บรูดหรือเรียกว่าโรคตัวอ่อนผึ้งเน่าอเมริกัน เป็นโรคระบาดร้ายแรงในผึ้งพันธุ์ยุโรป (*Apis mellifera*) มีสาเหตุจากแบคทีเรียชื่อ *Paenibacillus larvae larvae (P. l. larvae)* ติดสีกรัมบวก vegetative cell มีรูปร่างเป็นแท่ง ปลายกลมมน มักจะเจริญต่อกันเป็นสาย มีขนาดยาวประมาณ 1.5 μm ถึง 6.0 μm กว้าง 0.5 μm (ภาพที่ ข.1) และในบางสภาพจะพบ giant whips (ภาพที่ ข.2) ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียนี้จะสร้างสปอร์หลายล้านสปอร์ในตัวอ่อนผึ้งที่เน่าตาย สปอร์มีรูปร่างรี มีความยาวเป็นสองเท่าของความกว้าง คือประมาณ 0.6 μm x 1.3 μm (ภาพที่ ข.3) สปอร์สามารถทนความร้อนและสารเคมีได้เป็นเวลายาวนาน ทำให้กำจัดโรคได้ยาก ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการกำจัดโรคนี้คือ การเผาทำลายรังผึ้งที่เป็นโรค พร้อมทั้งตัวอ่อนผึ้งและตัวเต็มวัย รวมทั้งทำความสะอาดอุปกรณ์เลี้ยงผึ้งต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพ

ด้วยเหตุที่โรคอเมริกันฟาวล์บรูดสามารถพบได้ในแหล่งที่มีการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก และมีผลต่อการเลี้ยงผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้ง ตลอดจนการค้าระหว่างประเทศ อีกทั้งเป็นโรคที่อยู่ในบัญชีโรคระบาดสัตว์ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health หรือ OIE) และเป็นโรคในกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ. 2538 ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 กรมปศุสัตว์และกรมส่งเสริมการเกษตร โดยการสนับสนุนของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้สำรวจโรคผึ้งทั่วประเทศ เมื่อ พ.ศ. 2546 ผลการศึกษาคือ ไม่พบโรคนี้

ก.2 พยาธิกำเนิด

ตัวอ่อนผึ้งติดเชื้อ *P. l. larvae* อาจเกิดจากการที่ผึ้งพี่เลี้ยง (nurse bee) เลี้ยงตัวอ่อนผึ้งด้วยอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของ *P. l. larvae* หรือจากสปอร์ที่คงค้างอยู่ในหลอดรวงผึ้งเดิม ถึงแม้ว่าตัวอ่อนของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้จะไวต่อการเป็นโรค แต่ในธรรมชาติมักพบตัวอ่อนของผึ้งงานติดเชื้อเป็นส่วนใหญ่ การไวต่อโรคอเมริกันฟาวล์บรูดของตัวอ่อนผึ้งจะลดลงตามอายุของตัวอ่อนผึ้งที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแพร่เชื้อในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนรวงผึ้งระหว่างรังผึ้ง การรวมรังผึ้ง การเคลื่อนย้ายรังผึ้งที่เป็นโรค การขโมยน้ำหวานของผึ้ง การใช้แหล่งอาหารและน้ำร่วมกันของผึ้ง การให้อาหารเสริมที่ปนเปื้อนเชื้อ การใช้ผึ้งนางพญาจากรังที่เป็นโรค และการใช้อุปกรณ์เลี้ยงผึ้งที่ปนเปื้อนเชื้อ *P. l. larvae*

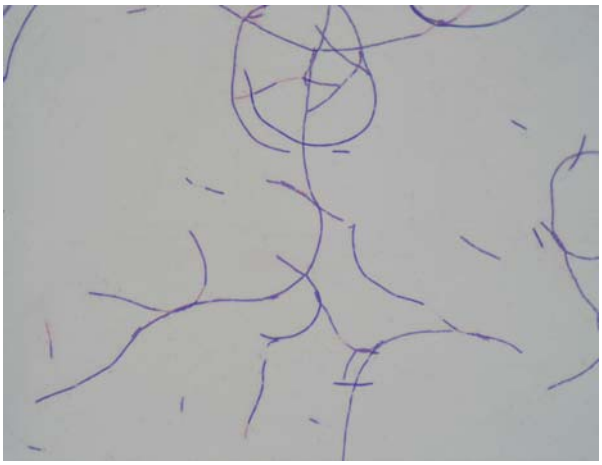
ก.3 อาการ

อาการของโรคอเมริกันฟาวล์บรูดสังเกตได้ง่ายจากลักษณะของตัวอ่อนผึ้งที่เน่าตายในรวงผึ้ง เนื่องจาก *P. l. larvae* สร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) มาย่อยตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนผึ้งตายภายใน 10 วัน ถึง 15 วัน หลังติดเชื้อ ตัวอ่อนผึ้งที่ตายด้วยโรคนี้จะมีสีเข้มกว่าปกติ ยุบตัวราบติดผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง (ภาพที่ ข.4) เมื่อเน่าสลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำ และเห็นฝาปิดหลอดรวงผึ้งมีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้เห็นรวงผึ้งในรังที่ติดเชื้อเป็นจุดด่างดำ เนื่องจากในรังผึ้งนั้นมีหลอดรวงผึ้งที่ไม่เป็นโรคมีการปิดฝาปนกับหลอดรวงผึ้งที่เป็นโรคมีการเกิดรูพรุน อย่างไรก็ดีลักษณะเช่นนี้อาจพบในรังผึ้งที่เป็นโรคอื่น ๆ ด้วย (ภาพที่ ข.5)

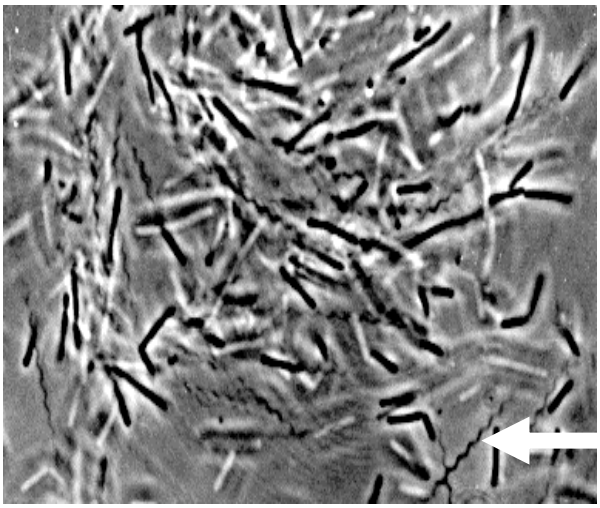
โรคอเมริกันฟาวล์บรูดมักเกิดกับตัวอ่อนผึ้งที่หลอดรวงผึ้งเพิ่งปิดเป็นส่วนใหญ่ โดยฝาปิดหลอดรวงผึ้งจะมีลักษณะบุ๋ม สีคล้ำ และมีรูเล็กหลาย ๆ รู รูปร่างไม่แน่นอน เมื่อเปิดฝาปิดจะเห็นตัวอ่อนผึ้งในหลอดรวงผึ้งนอนตายในท่าปกติ คือนอนหงายยาวตามหลอดรวงผึ้ง ในลักษณะหันหัวออก สีของตัวอ่อนเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล และเน่าสลาย มีกลิ่นเหม็น ถ้าใช้ไม้เขี่ยตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวยืดเป็นสายยาว ติดไม้นั้นออกมา (ภาพที่ ข.6) ต่อมาตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะยุบตัวแห้งลงในท่าเดิมและกลายเป็นสะเก็ด (scale) ติดแน่นอยู่กับผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง และถ้าตัวอ่อนผึ้งนั้นตายในระยะดักแด้ จะเห็นส่วนลิ้น (pupal tongue) ยื่นตั้งขึ้นมาจากสะเก็ดนั้น สะเก็ดดังกล่าวจะมีสปอร์ของ *P. l. larvae* อยู่เป็นจำนวนมาก และติดแน่นกับผนังหลอดรวงผึ้ง โดยผึ้งงานไม่สามารถนำออกไปทิ้งนอกรังได้

ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูด

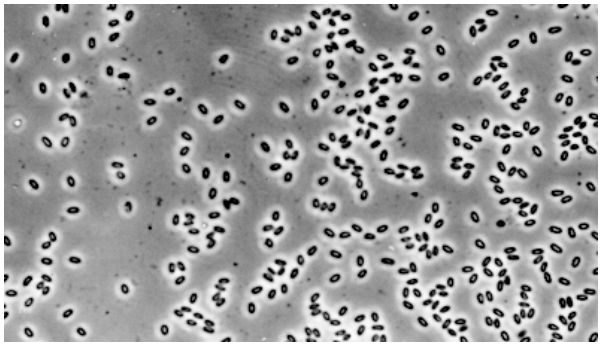
(ภาคผนวก ก)



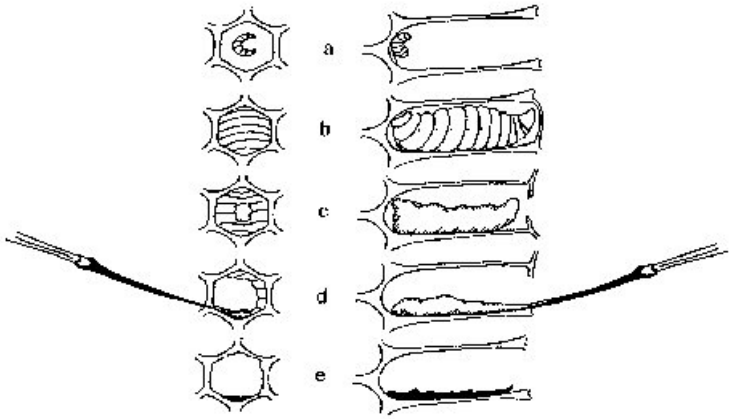
ภาพที่ ข.1 แสดง vegetative cell ของ *P. l. larvae* ย้อมติดสีกรัมเป็นสีน้ำเงิน กำลังขยาย 1 000 เท่า
ที่มา : นางวันทนีย์ เนรมิตมานสุข



ภาพที่ ข.2 แสดง flagella bundles หรือ giant whips ของ *P. l. larvae* ดังตำแหน่งลูกศร
กำลังขยาย 1 000 เท่า
ที่มา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร



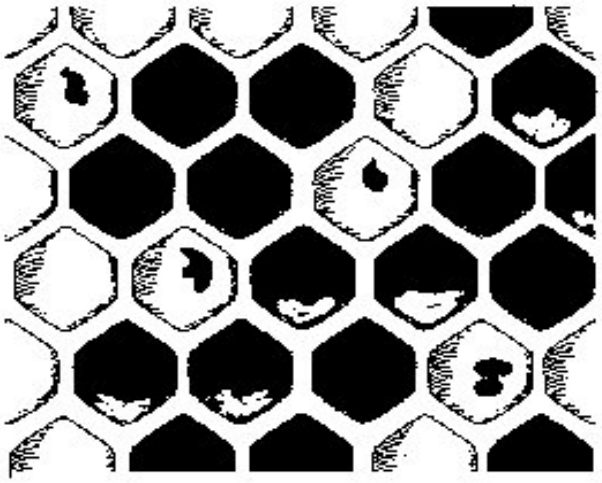
ภาพที่ ข.3 สปอร์ของเชื้ออเมริกันฟาวล์บรูด *P. l. larvae* กำลังขยาย 1 000 เท่า
ที่มา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร



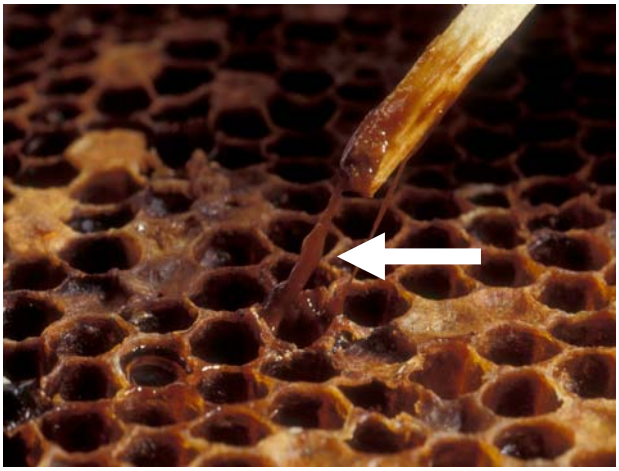
ภาพที่ ข.4 พยาธิกำเนิดของโรคอเมริกันฟาวล์บรูด

a) หนอนผึ้งที่มีการติดเชื้อ
b) หนอนผึ้งเจริญเป็น prepupa
c) ลักษณะหนอนผึ้งจะยุบและฝาปิดรวงจะบุ๋มหรือเป็นรู ๆ
d) หนอนผึ้งที่ติดเชื้อจะเละเนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์ที่หลั่งจากแบคทีเรียก่อโรค
e) หนอนผึ้งที่ตายจะแห้งเป็นสะเก็ด (scale) ติดผนังหลอดรวงผึ้งด้านล่าง

ที่มา : OIE, 2004



ภาพที่ ข.5 ลักษณะภายนอกของรังผึ้งที่เป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูด
ที่มา : OIE, 2004



ภาพที่ ข.6 ตัวหนอนที่ติดเชื้อและเน่า จะมีลักษณะเป็นยางเหนียว (ลูกศร) สามารถดึงให้ยาวออกมาได้ประมาณ 2.5 cm

ที่มา : Mr. Mike Brown

ภาคผนวก ค

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

(ข้อ 3.2.3. ข้อ 3.3.1.1 และ ข้อ 3.3.1.2)

ค.1 การเตรียม J-medium [4]

tryptone	5	g
yeast extract	15	g
dipotassium hydrogen phosphate [K_2HPO_4]	3	g
agar	20	g
distilled water	1 000	ml

(1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน ปรับให้ได้ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.3 ถึง 7.5

(2) นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 min

(3) ขณะอาหารเลี้ยงเชื้อยังอุ่นอยู่ (อุณหภูมิ 45 °C ถึง 50 °C) เติมกลูโคส 10% ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 20 ml

(4) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานแก้ว

ค. 2 การเตรียม Brain Heart Infusion with Thiamine (BHIT)

brain heart infusion broth	18.5	g
agar	5	g
thiamine hydrochloride	0.1	g/l
distilled water	400	ml

(1) ละลาย brain heart infusion broth และ agar ในน้ำกลั่นให้เข้ากัน ปรับปริมาณด้วยการเติมน้ำกลั่นเป็น 500 ml

(2) นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 min

(3) เติม thiamine hydrochloride (ความเข้มข้น 0.1 g/l) 0.5 ml (ความเข้มข้นสุดท้ายจะเท่ากับ 0.1 mg/l)

(4) ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานแก้ว

---

[4] Hornitzky M.A.Z. & Nicholls P.J. (1993). J-medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J. Apic. Res.*, 32 (1), 51-52.

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

(ข้อ 3.3.3.1(1))

ง.1 สารเคมี

50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 8.0

lysozyme

10% SDS

สารละลายฟีนอลอิ่มตัว

สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 ตามลำดับ

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1

3M sodium acetate pH 5.2

ethanol

RNase A 10 mg/ml

TE buffer

ง.2 ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

(1) นำแบคทีเรียที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาวล์บรูด บ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ถึง 10% ที่ 35 °C ถึง 37 °C นาน 4 วัน

(2) กรณีที่สกัดดีเอ็นเอจากผึ้งหรือตัวอ่อนผึ้งที่ตาย จะนำตัวอย่างดังกล่าวมาบดในสารละลาย phosphate buffer saline 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 800 ***g*** เป็นเวลา 10 min แล้วนำสารละลายด้านบน หรือ supernatant ปริมาตร 200 µl ไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 min แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 14 500 ***g*** เป็นเวลา 2 min และปิเปต 10 µl สำหรับเป็น template สำหรับ PCR

(3) ปั่นเก็บเซลล์ 3 ครั้ง ที่ 2 000 ***g*** นาน 10 min ที่อุณหภูมิ 4 °C (ข้อสังเกต: ควรคำนวณค่าและแปลงหน่วยเป็น ***g*** เนื่องมาจากว่าค่าแรงเหวี่ยง rpm จะมีความแตกต่างกันระหว่างเครื่อง centrifuge ขึ้นกับขนาด motor) ดูดสารส่วนใสทิ้ง

(4) กระจายเซลล์ในสารละลาย 50 mM Tris และ 5 mM EDTA pH 8.0 ปริมาณหนึ่งในสิบของปริมาตรอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (450 µl) ที่มี lysozyme 2 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 min

(5) เติม 10% SDS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5% (22.5 µl) ผสมให้เข้ากันเซลล์จะแตก โดยสังเกตได้ส่วนที่มีความหนืดและส่วนใสของสารละลายในหลอด

(6) เติมสารละลายฟีนอลอิ่มตัวประมาณเท่าตัว ผสมให้เข้ากันด้วยการปิดฝาหลอดแล้วพลิกไปมาหลาย ๆ ครั้งและปั่นในเครื่อง microcentrifuge นาน 3 min ถึง 5 min เพื่อแยกชั้นน้ำและฟีนอล ส่วนใสชั้นบน (aqueous phase) จะมีดีเอ็นเอละลายอยู่

(7) ดูดสารส่วนใสข้างบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอิ่มตัวจนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นฟีนอล (ชั้นล่าง) กับส่วนใสชั้นบน (aqueous phase)

(8) ดูดส่วนใส (ประมาณ 400 µl) มาเติม 3 M sodium acetate 40 µl และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม ethanol 2 เท่าโดยปริมาตร (880 µl)

(9) เก็บที่ -20 °C หรือ -70 °C นาน 30 min ปั่นเก็บดีเอ็นเอที่ 12 000 ***g*** นาน 15 min

(10) ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งและละลายด้วย TE buffer 100 µl เติม RNase A (10 mg/ml) 2 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 min

(11) สกัดด้วยฟีนอลอิ่มตัวตามด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนด้วย ethanol ล้างตะกอน 1 ครั้ง ถึง 2 ครั้ง ด้วย 70% ethanol

(12) ทำให้แห้งและละลายใน TE buffer 100 µl

หมายเหตุ การสกัดดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยใช้วิธีการมาตรฐานอื่นที่เทียบเท่าวิธีการนี้

ภาคผนวก จ

หน่วย

หน่วยและสัญลักษณ์ที่ใช้ในมาตรฐานนี้ และหน่วยที่ SI (International System of Units หรือ *Le Système International d' Unités*) ยอมรับให้ใช้ได้ มีดังนี้

รายการ	ชื่อหน่วย	สัญลักษณ์หน่วย
มวล	กรัม (gram)	g
	มิลลิกรัม (milligram)	mg
ปริมาตร	มิลลิลิตร (milliliter)	ml
	ไมโครลิตร (microliter)	µl
ความยาว	เซนติเมตร (centimeter)	cm
	ไมโครเมตร (micrometer)	µm
เวลา	ชั่วโมง (hour)	h
	นาที (minute)	min
	วินาที (second)	s
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส (degree Celsius)	^{o}C
ปริมาณสาร	โมล (mole)	mol
	โมลาร์ (molar)	M
	มิลลิโมลาร์ (millimolar)	mM
ความเข้มข้นของสาร	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (milligram per milliliter)	mg/ml
	พิโคโมล/ไมโครลิตร (picomole per microliter)	pmol/µl
	ยูนิต/ไมโครลิตร (unit per microliter)	U/µl
	มิลลิโมล/ลิตร (millimole per liter)	mmol/l
ค่าแรงเหวี่ยง	แกรวิตี้ (gravity)	***g***