



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10350-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10350-2007

การชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูดในผึ้ง

DIAGNOSIS OF EUROPEAN FOULBROOD IN BEE

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ICS 11.220

ISBN _ _ _ - _ _ _ - _ _ _ -



มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มกอช. 10350-2550

THAI AGRICULTURAL COMMODITY AND FOOD STANDARD

TACFS 10350-2007

การชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรู๊ดในผึ้ง

DIAGNOSIS OF EUROPEAN 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

คณะกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างมาตรฐานด้านสุขอนามัยสัตว์ คณะที่ 2 :

คณะกรรมการเฉพาะกิจพิจารณาร่างการขึ้นสูตรโรคในผึ้ง

- | | |
|--|------------------|
| 1. อธิบดีกรมปศุสัตว์
(นางลัดดาวัลย์ รัตนนคร แทนอธิบดี) | ประธานอนุกรรมการ |
| 2. ผู้แทนกรมปศุสัตว์
(นางลัดดาวัลย์ รัตนนคร) | อนุกรรมการ |
| 3. ผู้แทนกรมส่งเสริมการเกษตร
(นายอุดม จิรเศวตกุล) | อนุกรรมการ |
| 4. ผู้แทนสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์
(นางวันทนี นรมิตมานสุข
นางมนทกานต์ วงศ์ภากร) | อนุกรรมการ |
| 5. ผู้แทนคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(รองศาสตราจารย์สาวตรี มาลัยพันธุ์) | อนุกรรมการ |
| 6. ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ลิวิวัฒน์ วงษ์ศิริ) | อนุกรรมการ |
| 7. ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล) | อนุกรรมการ |
| 8. ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
(นายสมลักษณ์ วงศ์สมาโนดน์) | อนุกรรมการ |
| 9. ผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สมนึก บุญเกิด) | อนุกรรมการ |
| 10. ผู้แทนสมาคมผู้เลี้ยงผึ้งภาคเหนือแห่งประเทศไทย
(นายศิริศักดิ์ เตียวตระกูล) | อนุกรรมการ |
| 11. ผู้แทนสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางอรทัย ศิลปภาพร
นางนันทนา โพชนเจริญ
นางสาวยุพา เหล่าจินดาพันธ์) | อนุกรรมการ |
| 12. ผู้ทรงคุณวุฒิ หรือผู้แทนภาคเอกชน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยงยุทธ ไวกุล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์อัญชลี สวัสดิ์ธรรม) | อนุกรรมการ |

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 13. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวตรุณี ทันทสุวรรณ
นายสงขลา จุลกะเตียน) | อนุกรรมการและเลขานุการ |
| 14. ผู้แทนสำนักมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ
สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ
(นางสาวมินตรา ลักขณา
นางสาวศศราญมณี กระจำวงศ์) | อนุกรรมการและ
ผู้ช่วยเลขานุการ |

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การขนส่งโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในผึ้ง กำหนดวิธีการขนส่งเพื่อใช้รับรองการปลอดโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตของสินค้าผึ้งและผลิตภัณฑ์ และใช้เป็นคู่มือการขนส่งโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในห้องปฏิบัติการให้เป็นไปอย่างถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งประกอบด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันแบบจับกลุ่ม และวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์ เพื่อส่งเสริมระบบการผลิตสินค้าผึ้งและผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัย มีคุณภาพเหมาะสมต่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและระหว่างประเทศ และเป็นประโยชน์ในการประกาศ (notify) สถานะการระบาดของโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในประเทศและต่อองค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ

มาตรฐานนี้กำหนดขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารต่อไปนี้เป็นแนวทาง

OIE. 2004. European foulbrood. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.9.3. World Organisation for Animal Health., Paris, France.



ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :

การชั้นสูตรโรครุโรเปียนฟาวล์บรุดในผึ่ง

พ.ศ. 2550

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ 2/2550 เมื่อวันที่ 28 สิงหาคม 2550 มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรครุโรเปียนฟาวล์บรุดในผึ่ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวก สะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

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

ประกาศ ณ วันที่ ๑๖ กันยายน พ.ศ. 2550

(ศาสตราจารย์ธีระ สูตะบุตร)

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

การชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในผึ้ง

1 ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในผึ้งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันแบบจับกลุ่ม และวิธีปฏิบัติกริยาห้วงโซ่พอลิเมอร์

2 นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

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

2.2 โรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต (European foulbrood) หมายถึง โรคระบาดในตัวอ่อนผึ้งระยะที่เป็นหนอนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Melissococcus pluton* (*M. pluton*)

2.3 ตัวอ่อนผึ้ง (bee brood) หมายถึง ไข่ หนอน และดักแด้ในรังผึ้ง

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

2.5 หลอดรวงผึ้ง (cell) หมายถึง ช่องรูปหกเหลี่ยมด้านเท่า ซึ่งหลายๆ หลอดรวงผึ้ง จะประกอบกันเป็นรวงผึ้ง

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

2.7 น้ำผึ้ง (honey) หมายถึง ของเหลว ชัน 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 แต่ไม่รวมถึงรอยัลเยลลี่ที่นำไปประเหยน้าออกจนแห้ง

2.10 ฟาร์มผึ้ง (bee farm) หมายถึง สถานที่เลี้ยงผึ้ง เพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิตน้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์อื่นๆ 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

การชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตในผึ้งด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ วิธีทางพยาธิวิทยา วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน

เมื่อได้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว ให้สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางด้านการเลี้ยงผึ้ง เป็นผู้พิจารณาประวัติ วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตร่วมด้วยตามรายละเอียดในภาคผนวก ก เพื่อให้การรักษาและป้องกันโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 เก็บตัวอย่างรวงผึ้ง โดยเลือกรวงที่มีตัวอ่อนผึ้งตายอยู่เป็นจำนวนมากเท่าที่จะมากได้ ขนาดรวงประมาณ 20 cm² และไม่ควรมีน้ำผึ้งปนในตัวอย่างรวงผึ้ง ใส่ตัวอย่างในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

3.1.2 กรณีเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากผึ้ง ได้แก่ น้ำผึ้ง รอยัลเยลลี่ เกสรผึ้ง และไขผึ้ง เป็นต้น ใส่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประมาณ 50 g ในภาชนะที่สะอาดปิดสนิท แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

3.1.3 กรณีเก็บรักษาเชื้อ สามารถเก็บรักษาเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นานถึง 6 เดือน หรือเก็บเชื้อในลักษณะเชื้อแห้งโดยผสมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครส 10 % สารสกัดยีสต์ (yeast extract) 5% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄)

0.1 mol ความเป็นกรด-เบส (pH) 6.6 แล้วผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีไลโอไฟล์เซชัน (lyophilisation) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ได้นานหลายปี

3.1.4 ตีฉลากตัวอย่างโดยต้องมีข้อความที่อ่านได้ชัดเจนไม่ลอกหลุด และแสดงรายละเอียด ดังนี้ ประเภทตัวอย่าง ชื่อฟาร์ม เลขที่รัง สถานที่ วันที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจ และผู้เก็บตัวอย่าง

3.2 วิธีทดสอบเพื่อคัดกรองโรคหรือวิธีทดสอบแบบรวดเร็ว

3.2.1 วิธีทางพยาธิวิทยา

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโดยการตรวจหารอยโรคจากตัวอ่อนผึ้ง การชันสูตรโรคยูโรเปียนฟาล์บริดจ์นี้ให้ใช้ตัวอ่อนผึ้งที่เพิ่งตาย

3.2.1.1 ตรวจดูรอยโรคด้วยตาเปล่า หากเป็นโรคยูโรเปียนฟาล์บริดจ์จะพบตัวอ่อนผึ้งที่ตายมีลักษณะอ่อนนุ่มเห็นเส้นแบ่งปล้องลำตัวชัดเจน มีลักษณะบิดเบี้ยวจากปกติ และสีของตัวอ่อนเปลี่ยนจากขาวเป็นเหลือง แล้วกลายเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มไม่ติดแน่นกับผนังหลอดรวงผึ้ง

3.2.1.2 ตรวจดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ปากคีบปลายแหลมดึงตัวอ่อนผึ้งที่เป็นโรคออกจากหลอดรวงผึ้ง วางบนกระจกสไลด์ แล้วใช้ปากคีบเกลี่ยเปิดส่วนท้อง นำส่วนที่เป็นทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid-gut) ออกมา หากเป็นโรคยูโรเปียนฟาล์บริดจ์ จะเห็นแบคทีเรีย (*M. pluton*) เป็นกลุ่มๆ สีขาวทึบภายในทางเดินอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนผึ้งปกติซึ่งภายในทางเดินอาหารเป็นสีน้ำตาลอ่อนเนื่องจากมีเกสรผึ้ง (bee pollen) ปนอยู่ด้วย

นำส่วนที่บรรจุอยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลาง มาเกลี่ยบนสไลด์ และหยดสารละลายนิโกรซิน (nigrosin) 5% เกลี่ยให้เข้ากัน แล้วทำให้แห้งด้วยเปลวไฟ จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายอย่างน้อย 1 000 เท่า ถ้าแบคทีเรียนั้นเป็น *M. pluton* จะเห็นเซลล์รูปกลมรีปลายแหลมสองข้าง (lanceolate cocci) ขนาดประมาณ 0.5 µm x 1.0 µm อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ เป็นกลุ่ม หรือเรียงตัวเป็นสาย (ภาพที่ ข.1.1) นอกจากนั้นอาจพบแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Paenibacillus alvei* (*P. alvei*) และ *Bacterium Eurydice* (*B. eurydice*) อยู่ร่วมด้วย

3.2.2 วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างรวงผึ้ง ประกอบด้วย ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) จากตัวอย่าง การเพาะเชื้อต่อ (subculture) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นนำไปทดสอบ ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน หรือ วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์ เพื่อพิสูจน์เชื้อที่พบว่าเป็น *M. pluton*

เทคนิคการเพาะเชื้อ (culture technique) มีขั้นตอนดังนี้

- (1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็ม พลูตัน อาการ์ (*M. pluton* agar) ตามภาคผนวก ค
- (2) นำตัวอย่างที่ติดเชื้อ หรือชิ้นส่วนทางเดินอาหารส่วนกลาง ป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) แล้วบ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ถึง 10% ที่อุณหภูมิ 35 °C ถึง 37 °C นาน 4 วัน
- (3) กรณีที่ไม่สามารถส่งตัวอย่างตรวจได้ทันที สามารถนำตัวอย่างไปเกลี่ยบนสไลด์ ทำให้แห้ง แล้วเก็บสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ -20 °C จะสามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นานหลายปี วิธีนี้จะทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจติดมากับซากตัวอย่าง ทำให้เหลือแต่เชื้อที่ก่อโรคคือ *M. pluton*
- (4) การแปลผล หากเป็นเชื้อ *M. pluton* จะพบว่า เชื้อสามารถเจริญเติบโตในสภาพบรรยากาศที่ไร้ออกซิเจน โดยทั่วไปเมื่อเชื้อ *M. pluton* เจริญเต็มที่ จะเห็นเป็นโคโลนีเล็กๆ สีขาวขุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเชื้อมีรูปกลมรีปลายแหลมสองข้าง (lanceolate cocci) ค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารที่ใช้เพาะเชื้ออาจลดลงถึง 5.5 จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน หรือ วิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอร์ต่อไป

แบคทีเรียอื่นๆ ที่สามารถพบในตัวอย่างที่เป็นโรครูโรเปียนฟาวล์บรูต เช่น เชื้อ *B. eurydice* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปร่างแบบแท่งปลายเหลี่ยม (square-ended rod) ปกติพบอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และมักพบในทางเดินอาหารของตัวอย่างด้วย โดยจะพบในปริมาณที่ต่ำ อย่างไรก็ตามจะพบแบคทีเรียชนิดนี้จำนวนมากในตัวอย่างที่ติดเชื้อ *M. pluton*

เชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) หรือ *Streptococcus faecalis* เป็นเชื้อที่มีพื้นฐานวิทยาศาสตร์กับเชื้อ *M. pluton* แต่มีแบบแผนการเจริญ และมีปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีต่างกัน ซึ่ง *E. faecalis* มักจะเป็นสาเหตุของกลิ่นเน่า และเจริญได้ดีในสภาวะที่มี หรือไม่มีออกซิเจน ซึ่งอาจเรียกว่าเป็น facultative bacteria โคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้จะมีขนาดเล็กใส สามารถเห็นได้หลังจากเพาะเชื้อภายใน 24 h ซึ่งเชื้อจะเจริญได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อทั่วไป ทั้งที่มีและไม่มีคาร์โบไฮเดรต ความแตกต่างของความสามารถในการเจริญของเชื้อสองชนิดนี้ สามารถทำให้แยกเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกันได้ นอกจากนี้ถ้ามีน้ำตาลกลูโคสรวมอยู่ด้วยในอาหารที่เลี้ยง *E. faecalis* เชื้อจะสร้างกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส ของอาหารลดลงเป็น 4 การตรวจพบ *E. faecalis* ในตัวอย่าง อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการติดเชื้อ *M. pluton* ได้ เนื่องจาก *E. faecalis* มักจะเจริญร่วมกับ *M. pluton* ในตัวอย่าง แต่จะมีปริมาณน้อยกว่า ดังนั้น ขั้นตอนการเจือจางเชื้อก่อนเพาะลงบนอาหารจึงมีความสำคัญ ทำให้สามารถแยกเชื้อก่อโรคได้ง่ายขึ้น เพราะถ้าหากมีเชื้อ *E. faecalis* ในปริมาณมากอยู่จะสร้างกรดซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *M. pluton* ในห้องปฏิบัติการ เชื้อ *P. alvei* หรือ *Bacillus alvei* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่ง ที่มักพบในตัวอย่างที่ติดเชื้อโรโรเปียนฟาวล์บรูต โดยจะเจริญในตัวอย่างที่ตายแล้ว และเชื้อนี้จะสร้างสปอร์เมื่ออายุมากขึ้น ดังนั้นหากพบสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ในรังอาจบ่งชี้ได้ว่า มีการระบาดของโรครูโรเปียนฟาวล์บรูต *P. alvei* เจริญได้ดีใน

สภาวะที่แตกต่างจากเชื้อ *M. pluton* โดยจะสร้างโคโลนีใสๆ กระจายไปทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีกลิ่นเหม็น

3.2.3 วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันแบบจับกลุ่ม (tube agglutination test)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *M. pluton* ในมาตรฐานนี้แนะนำให้ใช้วิธีการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี¹

3.2.3.1 การเตรียมแอนติบอดี

- (1) นำสารละลายเชื้อ *M. pluton* 1 ml (โดยใช้เป็นแอนติเจน) ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน
- (2) ฉีดสารผสมจากข้อ 1 เข้ากระต่ายทางกล้ามเนื้อหรือทางใต้ผิวหนังโดยแบ่งฉีดหลายๆ จุด จุดละ 0.1 ml ถึง 0.2 ml รอนานประมาณ 14 วัน ถึง 21 วัน เพื่อให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *M. pluton*
- (3) เจาะเก็บเลือดกระต่าย แยกซีรัม แล้วทดสอบหาระดับแอนติบอดี หากพบว่ามีแอนติบอดีในระดับสูง ให้เก็บซีรัมที่ได้มาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2.3.2 การทดสอบการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี

นำส่วนผสมของแบคทีเรียที่มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.25 mg/ml ผสมกับแอนติบอดีในข้อ 3.2.3.1 วิเคราะห์หาจุดยุติ (end point) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 h อ่านผลโดยดูหลอดสุดท้ายที่เกิดการจับกลุ่มของแอนติเจนและแอนติบอดี

นอกจากนี้วิธีอีไลซ่า² (enzyme linked-immunosorbent assay; ELISA) ที่ใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *M. pluton* หรือ lateral flow device สามารถนำมาวินิจฉัยโรคได้อย่างแม่นยำได้

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 วิธีทดสอบเพื่อยืนยันโรคโดยวิธีปฏิกิริยาห่วงโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

หลักการของวิธีนี้ คือ การตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ *M. pluton* ประกอบด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ ขั้นตอนต่อมาเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบบทวีคูณจนมีจำนวนมากพอที่จะตรวจพบได้ การตรวจเชื้อ *M. pluton* โดยใช้วิธี PCR สามารถทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วนของยีน 16S rRNA

วิธีการ (ตามวิธีของ Govan *et al.*, 1998)

- (1) นำ genomic DNA ที่สกัดจากตัวอย่างตามภาคผนวก ง ดูดสารละลายส่วนบนมาปริมาณ 1 µl ถึง 3 µl เพื่อนำไปเป็นต้นแบบของดีเอ็นเอ (template DNA) ใน reaction mixture ที่ประกอบด้วย MgCl₂ 2 mmol/l และไพรเมอร์ (ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ในตารางที่ 1) จำนวน 50 pmol/µl, 25 mmol/l ของ dNTP³ และ 1 U/ µl ของ Taq polymerase
- (2) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง thermocycler ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ	95 °C นาน 1 min
ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ	93 °C นาน 1 min
	55 °C นาน 30 s
	72 °C นาน 1 min
ทำขั้นที่ 2 ซ้ำอีก 30 รอบ	
ขั้นที่ 3 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ	72 °C นาน 5 min
- (3) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (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 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต

ทิศทาง (direction)	ลำดับเบส (sequence)	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ จาก PCR (PCR-product size)	ระดับ ความจำเพาะ (specificity level)
forward	5' GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC 3'	812 bp	species
reverse	5' TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG 3'		

การแปลผล

ถ้าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อ *M. pluton* จะเห็นแถบเรืองแสงของ ดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง 812 bp

ภาคผนวก ก

วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต

(ข้อ 3)

ก.1 วิทยาการระบาด

โรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตหรือเรียกว่าโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน เป็นโรคระบาดร้ายแรงในผึ้งพันธุ์ยุโรป (*Apis mellifera*) มีสาเหตุจากแบคทีเรียชื่อ *Melissococcus pluton* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดไม่สร้างสปอร์ และติดสีกัมบวัก ลักษณะคล้ายลูกปัด มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว แต่อาจต่อกันเป็นสายหรือเป็นกลุ่ม โรคนี้จะทำให้ตัวอ่อนผึ้งตาย และเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ถ้ารวงผึ้งมีการติดเชื้ออย่างรุนแรงจะมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว โรคนี้พบได้ในแหล่งการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก พบว่า *M. pluton* ที่พบทั่วโลกมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นสายพันธุ์ที่พบในประเทศบราซิลและสายพันธุ์ที่พบในผึ้งชนิดอื่น เช่น *Apis laboriosa* จะมีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งส่วนมากจะพบในช่วงก่อนการสิ้นสุดของฤดูดอกไม้บาน (nectar flow) แต่ในประเทศไทยมักพบหลังฤดูดอกไม้บาน

ด้วยเหตุที่โรคนี้มีความสำคัญต่อการเลี้ยงผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้ง ตลอดจนการค้าระหว่างประเทศ อีกทั้งเป็นโรคที่อยู่ในบัญชีโรคระบาดสัตว์ขององค์การโรคระบาดสัตว์ระหว่างประเทศ (World Organisation for Animal Health หรือ OIE) และเป็นโรคในกฎกระทรวงว่าด้วยโรคระบาดสัตว์เพิ่มเติม พ.ศ. 2538 ภายใต้พระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 กรมปศุสัตว์และกรมส่งเสริมการเกษตร โดยการสนับสนุนของสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้สำรวจโรคผึ้งทั่วประเทศ เมื่อ พ.ศ. 2546 ปรากฏว่า ตรวจพบโรคนี้ 8.06 % ของจำนวนตัวอย่างที่สำรวจทั้งหมด แต่ยังไม่พบวาระบาด

ก.2 พยาธิกำเนิด

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. pluton* พบว่าเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนในปริมาณน้อย และต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายตัวอ่อนผึ้งจะเจริญในทางเดินอาหาร ดังนั้น เมื่อตัวอ่อนผึ้งถ่ายของเสียจะมีเชื้อปนเปื้อนออกมาด้วยและติดอยู่ในหลอดรวงผึ้ง เชื้อยังคงมีชีวิตอยู่ในหลอดรวงผึ้งและสามารถก่อโรคได้อีกเป็นเวลาหลายปี ถึงแม้ว่าเมื่อผึ้งงานทำความสะอาดหลอดรวงผึ้ง และเชื้อก่อโรคส่วนหนึ่งถูกกำจัดไป แต่ในขณะเดียวกันอาจทำให้เกิดการแพร่ของเชื้อจากหลอดรวงผึ้งหนึ่งไปยังอีกหลอดรวงผึ้งหนึ่งได้ โดย *M. pluton* จะติดไปกับผึ้งงาน

ก.3 อาการ

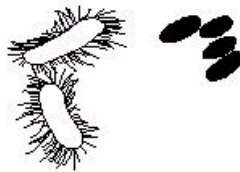
ส่วนใหญ่โรคยูโรเปียนฟาวล์บรูตพบได้ในตัวอ่อนผึ้งในช่วงที่ฝาหลอดรวงผึ้ง ยังไม่ปิด เมื่อตัวอ่อนผึ้งติดเชื้อ มักจะตายที่อายุประมาณ 4 วัน ถึง 5 วัน ตัวอ่อนผึ้งที่มีอายุน้อยจะสามารถต้านทานโรคได้ดีกว่าตัวอ่อนผึ้งที่มีอายุน้อย ส่วนมากตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อจะตายในหลอดรวงผึ้งแบบผิดปกติ (ตัวจะบิดเบี้ยวไม่เป็นรูปตัวซี (C)) ตัวอ่อนผึ้งที่ติดเชื้อตายจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นเหลือง ในที่สุดเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ ข.2) แล้วเน่า มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ถ้าใช้ไม้เขี่ยตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะมีลักษณะเป็นของเหลว แต่จะไม่เหนียวเป็นสาย

ยาวติดไม้ออกมา ต่อมาตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะยุบตัวแห้งลงกลายเป็นสะเก็ด (scale) อยู่ในหลอดรวงผึ้ง สะเก็ดดังกล่าวจะไม่ติดแน่นอยู่กับผนังของหลอดรวงผึ้ง และผึ้งงานสามารถนำตัวอ่อนผึ้งที่แห้งกลายเป็นสะเก็ดออกไปทิ้งนอกรังได้ ซึ่งแตกต่างจากโรคอเมริกันฟาล์บริดที่สะเก็ดจะติดแน่นในหลอดรวงผึ้ง

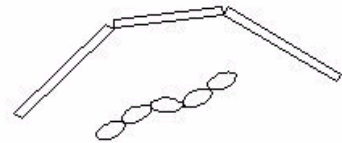
ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการชั้นสูตรโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต
 (ข้อ 3.2 และ ภาคผนวก ก)



ข.1.1



ข.1.2



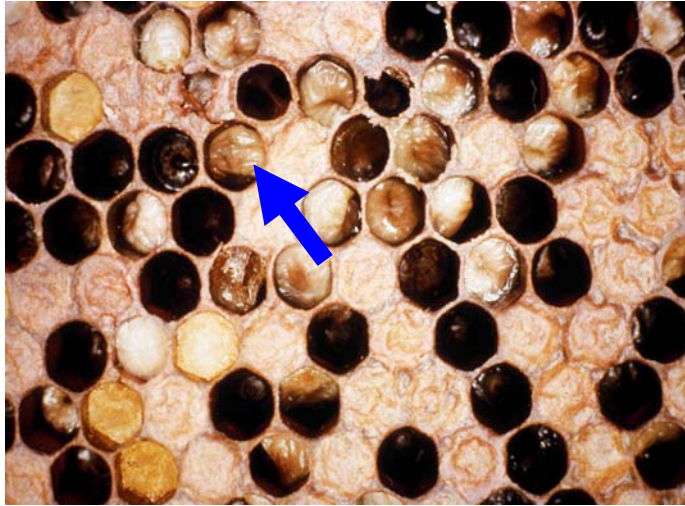
ข.1.3

ภาพที่ ข.1 แบคทีเรียที่พบในตัวอ่อนผึ้งที่เป็นโรคตัวอ่อนผึ้งเน่ายูโรเปียน
 ที่มา : OIE, 2004

ข.1.1 *M. pluton*: เชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นเส้นสาย หรือเป็นกลุ่ม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือน *Enterococcus faecalis* ที่มักเป็นเชื้อแทรกซ้อนทั่วไป

ข.1.2 *Paenibacillus alvei*: เซลล์เป็นรูปแท่ง และแท่งเซลล์รวมแฟลกเจลลา มีขนาด $2.0\ \mu\text{m}$ ถึง $7.0\ \mu\text{m}$ x $0.8\ \mu\text{m}$ ถึง $1.2\ \mu\text{m}$ ส่วนที่เห็นเป็นรูปรีสีดำคือสปอร์ ซึ่งเรียงขนานติดกัน ทั้งเซลล์รูปแท่ง และสปอร์จะมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาวล์บรูต (*P. larvae larvae*)

ข.1.3 *Bacterium eurydice*: เซลล์เป็นรูปแท่งผอมยาวปลายตัดเมื่ออยู่ในตัวอ่อนผึ้ง แต่อาจมีรูปร่างกลมต่อกันเป็นสาย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารบางชนิด



ภาพที่ ข.2 ตัวอ่อนผึ้งในรวงผึ้งที่เป็นโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต
ที่มา : Mr. Mike Brown

ตัวอ่อนผึ้งปกติจะมีสีขาว มีลักษณะเป็นรูปตัวซีและไม่พบเส้นแบ่งปล้อง ในขณะที่ตัวอ่อนผึ้งที่เป็นโรคยูโรเปียนฟาวล์บรูต ที่ตายในหลอดรวงผึ้ง จะมีลักษณะเห็นเส้นแบ่งปล้องลำตัวชัดเจน และตายในท่าผิดปกติ โดยตัวจะบิดเบี้ยวไม่เป็นรูปตัวซี ดังตำแหน่งลูกศร

ภาคผนวก ค
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
(ข้อ 3.2.2.1 (1))

ค.1 การเตรียม เอ็ม พลูตัน อาการ์

ค.1.1 สารเคมี

yeast extract หรือ peptone	10	g
cysteine หรือ cystine	1	g
glucose หรือ fructose	10	g
soluble starch	10	g
KH_2PO_4	13.5	g
agar	15	g
distilled water	900	ml

ค.1.2 วิธีการเตรียม

- (1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน ปรับความเป็นกรด-เบส สุดท้ายให้เท่ากับ 6.6
- (2) นึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 116 °C นาน 20 min
- (3) ตั้งอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ จนมีอุณหภูมิ 45 °C จึงเทลงในจานแก้ว (culture plate)

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

(ข้อ 3.3.1.1(1))

ง.1 สารเคมี

50 mM Tris, 5 mM EDTA pH 8.0

lysozyme

10% SDS

สารละลายฟีนอลอิมิตัว

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

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1

3 M sodium acetate pH 5.2

ethanol

RNase A 10 mg/ml

TE buffer

ง.2 ขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ

- (1) นำแบคทีเรียที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาล์บริด 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: ควรคำนวณค่า และแปลงหน่วยเป็น g เนื่องจากค่าแรงเหวี่ยง rpm จะมีความแตกต่างกันระหว่างเครื่อง centrifuge ขึ้นกับขนาด motor) จากนั้นดูดสารส่วนใสทิ้ง
- (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) ผสมให้เข้ากันเซลล์จะแตกโดยสังเกตุดังกล่าวที่มีความหนืดและส่วนใสของสารละลายในหลอด

- (6) เติมสารละลายฟีนอลอิมิตัวประมาณเท่าตัว ผสมให้เข้ากันด้วยการปิดฝาหลอดแล้วพลิกไปมาหลาย ๆ ครั้งและปั่นในเครื่อง microcentrifuge นาน 3 min ถึง 5 min เพื่อแยกชั้นน้ำและฟีนอล ส่วนใสชั้นบน (aqueous phase) จะมีดีเอ็นเอละลายอยู่
- (7) ดูดสารส่วนใสข้างบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลอิมิตัวจนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นฟีนอล (ชั้นล่าง) กับส่วนใสชั้นบน (aqueous phase)
- (8) ดูดส่วนใส (ประมาณ 400 μ l) มาเติม 3 M sodium acetate 40 μ l และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม ethanol 2 เท่าโดยปริมาตร (880 μ l)
- (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 μ l เติม RNase A (10 mg/ml) 2 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 min
- (11) สกัดด้วยฟีนอลอิมิตัวตามด้วยสารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม และคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ และตกตะกอนด้วย ethanol ล้างตะกอน 1 ครั้ง ถึง 2 ครั้ง ด้วย 70% ethanol
- (12) ทำให้แห้งและละลายใน TE buffer 100 μ l

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)	°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	แกรวิตี (gravity)	<i>g</i>