

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

อุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ในประเทศไทย ถูกนำมาเลี้ยงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 เป็นผึ้งพันธุ์อิตาเลียนนำเข้ามาจากประเทศออสเตรีย จากนั้นแพร่กระจายไปยังทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดย สิริวัฒน์ และสุรรัตน์ (2555) ได้อธิบายว่าผึ้งพันธุ์จัดเป็นแมลงที่อยู่ในอันดับ Hymenoptera และอยู่ในสกุล *Apis* สปีชีส์ *mellifera* ดังนี้

Kingdom: Metazoa animal

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Order: Hymenoptera

Super family: Apoidea

Family: Apidae

Subfamily: Apinae

Genus: *Apis*

Species: *mellifera*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © Chiang Mai University
All rights reserved

วัตถุประสงค์สำคัญของการเลี้ยงผึ้งพันธุ์

1. การเลี้ยงผึ้งเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์จากผึ้ง ได้แก่ น้ำผึ้ง (honey) ไขผึ้ง (bee wax) นมผึ้ง หรือ รอยัลเจลลี่ (royal jelly) เกสรผึ้งหรือเรณู (pollen) โปรโพลิส หรือยางไม้ (propolis) และ พิษผึ้ง (bee venom) (สิริวัฒน์และคณะ, 2551)

2. การเลี้ยงผึ้งเพื่อผสมเกสรพืช

การเลี้ยงผึ้งเพื่อผสมเกสรพืช โดยเฉพาะพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทำให้พืชผลมีผลผลิตทั้งคุณภาพ และปริมาณที่สูงขึ้น (หลวงบุเรศบำรุงการ, 2524)

3. การเลี้ยงผึ้งเพื่อศึกษา และเพื่อความเพลิดเพลิน

การเลี้ยงผึ้งเพื่อศึกษา และดูเล่นเป็นการเลี้ยงผึ้งเพียงไม่กี่รัง เพื่อการศึกษานิเวศวิทยา และธรรมชาติในการใช้ชีวิตของผึ้ง ส่วนน้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์จากผึ้งเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยง และสร้างรายได้ให้แก่ผู้เลี้ยง (พิชัย, 2551)

การเลี้ยงผึ้งพันธุ์ประสบปัญหาการเข้าทำลายของไรปรสิต และโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งส่งผลต่อการลดจำนวนประชากรผึ้ง เช่น โรคชอล์คบรูด (chalkbrood disease) เกิดจากเชื้อรา โรคอเมริกันฟาล์วบรูด (american foulbrood disease) และโรคยุโรปเบียนฟาล์วบรูด (european foulbrood disease) จากเชื้อแบคทีเรีย โรคแซคบรูด (sacbrood disease) จากเชื้อไวรัส และโรคโนซีมา (nosema disease) เกิดจากเชื้อไมโครสปอริเดีย เข้าไปทำลายในลำไส้ส่งผลให้กระเพาะอาหารทำงานผิดปกติ (Tarpy and Keller, 2007) ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถระบดไปรังอื่น ๆ ได้ง่าย เมื่อปัจจัยทางสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวย

โรคโนซีมาเป็นหนึ่งในโรคผึ้งที่แพร่หลายอยู่ทั่วโลก ยิ่งไปกว่านั้นโรคโนซีมามีส่วนเกี่ยวข้องในปรากฏการณ์ของการล่มสลายในกลุ่มประชากรผึ้ง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2007 เกิดความตระหนักเรื่องโรคโนซีมาในกลุ่มนักวิจัยที่เกี่ยวข้อง และสมาคมผู้เลี้ยงผึ้ง จึงเกิดการสร้างกลุ่มคณะทำงานวิจัย และระดมงบประมาณสำหรับศึกษาวิจัยโรคโนซีมา เพื่อเร่งช่วยเหลือกลุ่มผู้เลี้ยงผึ้ง (Higes *et al.*, 2013) โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปัจจัยการเกิดโรค ตลอดจนการเข้าทำลายของเชื้อเพื่อนำไปสู่การค้นคว้าวิธีการควบคุม ป้องกันกำจัด และรักษาโรคโนซีมาในผึ้งได้อย่างถูกต้อง

สำหรับอุตสาหกรรมผึ้งไทย ตลอดช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา ได้ประสบปัญหาการตายของผึ้ง ซึ่งมีสาเหตุมาจากโรคโนซีมา โดยผู้เลี้ยงผึ้งไม่ทราบสาเหตุการตายของผึ้งที่ออกมาตายเป็นจำนวนมากอยู่บริเวณหน้ารัง จึงสันนิษฐานสาเหตุการตายไปหลายปัจจัย เช่น เกิดจากการถูกสารเคมีที่มาจากแหล่งเก็บอาหารของผึ้งงาน หรืออาจเกิดการขับออกจากกลุ่มผึ้งในรังเดียวกัน โดยการถูกกำจัดด้วยผึ้ง

ที่มีความแข็งแรงกว่า เป็นต้น เนื่องจากผู้เลี้ยงผึ้งไม่มีความรู้เรื่องโรค จึงไม่สามารถทราบปัญหาต้นเหตุ และไม่ได้มีมาตรการในการป้องกันรักษาโรคโนซีมา ไม่เพียงก่อโรคให้กับผึ้งพันธุ์ แต่ยังมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์ผึ้ง เช่น ส่งผลต่อการลดกิจกรรมในการเก็บน้ำหวานอย่างมีนัยสำคัญ (Higes *et al.*, 2013)

โรคโนซีมา (nosemosis หรือ nosematosis โดยทั่วไปจะเรียกว่า nosema) ในประเทศไทย โรคโนซีมาจัดเป็นโรคระบาดตามมาตรา 4 แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ตามกฎกระทรวงฉบับที่ 21 (พ.ศ. 2528) เชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายผึ้งพันธุ์มี 2 ชนิด ได้แก่ *N. ceranae* และ *N. apis* เชื้อทั้งสองชนิดเป็นเชื้อในกลุ่ม Microsporidia ที่อยู่ในอาณาจักรเชื้อรา อนุกรมวิธานของโนซีมา มีการจัดเรียงตามลำดับชั้นโดยเริ่มจาก Domain ไปจนถึง Species (MeSH, 2013) ดังนี้

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Phylum: Microsporidia

Class: Microsporea

Order: Microsporida

Family: Apansporoblastina

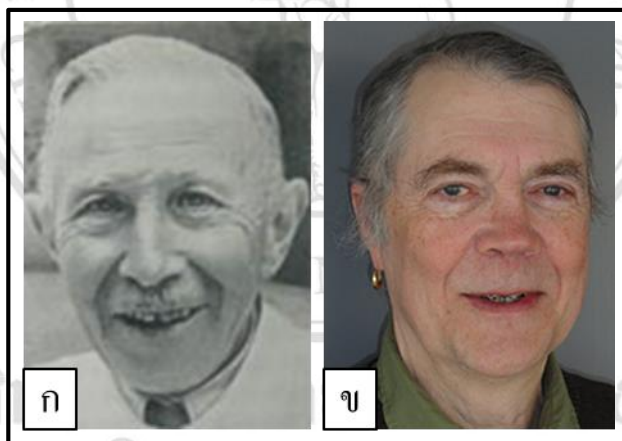
Genus: *Nosema*

Species: *Nosema apis*, *Nosema ceranae*

ประวัติความเป็นมาของโรคโนซีมา

แต่เดิมในปี ค.ศ. 1882 พบการตายของผึ้งเป็นจำนวนมากโดยไม่ทราบสาเหตุในประเทศสหรัฐอเมริกา (Gochbauer *et al.*, 1975; Lotfi *et al.*, 2009) ในปี ค.ศ. 1907 ได้พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อโนซีมาชนิด *N. apis* โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Prof. Dr. Enoch Zander (Kilani, 2012) (ภาพที่ 1-ก) ทำให้เชื้อ *N. apis* เป็นที่รู้จักในวงการผึ้งเป็นระยะเวลานานกว่า 20 ปี (Aydin *et al.*, 2006) เชื่อดังกล่าวสร้างความเสียหายในผึ้งพันธุ์ (Huang *et al.*, 2012) ซึ่งทำให้อัตราการมีชีวิตของผึ้งลดลงโดย

คิดเป็น 22 – 44 เปอร์เซ็นต์ (Hassainein, 1952; Laydin *et al.*, 2006) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 พบโรคโนซีมาสายพันธุ์ใหม่ในผึ้งโพรง คือเชื้อชนิด *Nosema ceranae* โดยการค้นพบของ Prof. Ingemar Fries (ภาพที่ 1-ข) ซึ่งเป็นนักวิจัยเรื่องโรค และโรคที่เกิดจากไรปรสิตผึ้ง ในภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศสวีเดน แต่เดิมเชื้อ *N. ceranae* มักเข้าทำลายผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และพบว่าสามารถก่อโรคในผึ้งพันธุ์ได้ในสภาพห้องปฏิบัติการ (Fries *et al.*, 1984, 1996: ภาณุวรรณ, 2553) ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานว่าเชื้อ *N. ceranae* ได้ลุกลามเข้าทำลายผึ้งพันธุ์ในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงผึ้งของประเทศไต้หวันอย่างรวดเร็ว สำหรับการแพร่ระบาดของ *N. ceranae* นั้น เกิดขึ้นมานานกว่า 10 ปี เช่น พบการเข้าทำลายผึ้งพันธุ์ในประเทศฟินแลนด์ ในปี ค.ศ. 1998 (Paxton *et al.*, 2007) นอกจากนี้พบเชื้อชนิดนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1995 (Chen *et al.*, 2008) จากนั้นไม่นานพบการติดเชื้อชนิด *N. ceranae* ในผึ้งพันธุ์ไปยังประเทศต่าง ๆ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา จีน และประเทศอื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงผึ้ง (Huang *et al.*, 2012)



ภาพที่ 1 ผู้ค้นพบโรคโนซีมาสาเหตุการตายของผึ้ง

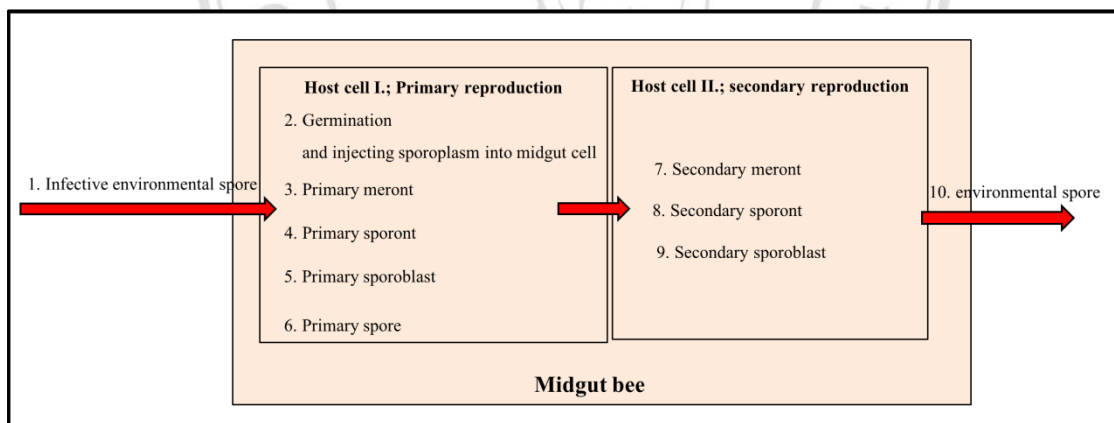
ก. Prof. Dr. Enoch Zander ผู้ค้นพบโรคโนซีมาชนิด *N. apis*

ข. Prof. Ingemar Fries ผู้ค้นพบโรคโนซีมาชนิด *N. ceranae*

วงจรชีวิตของโนซิมาในลำไส้ผึ้ง

เชื้อโนซิมา มีการดำรงชีวิตทั้งในฟอรัมของสปอร์ (spore form) และฟอรัมของเส้นใย (vegetative form) สำหรับ spore form จะเป็น single cell และถูกหุ้มด้วยผนังสปอร์เพื่อป้องกันต่อสภาพแวดล้อมภายนอก ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในรวงรัง และอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงผึ้งนานหลายปี (Webster, 2012)

เมื่อสปอร์ของโรคโนซิมาเข้าสู่ตัวผึ้งผ่านทางปาก เชื้อทั้ง 2 ชนิด จะมีการพัฒนาการเจริญเติบโต โดยการขยายพันธุ์จะมี 2 ระยะ คือ primary reproduction และ secondary reproduction สำหรับ primary reproduction เป็นระยะที่ทำหน้าที่ในการแพร่กระจายเชื้อโรคไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกัน ขณะที่ secondary reproduction เป็นระยะของการพัฒนาของสปอร์ที่สมบูรณ์ และขั้นตอนสุดท้ายของการพัฒนาเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ เพื่อออกนอกโฮสต์เก่า และเข้าอาศัยโฮสต์ใหม่ต่อไป (Solter, 2012) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของโรคโนซิมาในเซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง (ดัดแปลงจาก Solter, 2012)

จากภาพที่ 2 ในระยะที่ 1 คือ primary reproduction เป็นการพัฒนา และเจริญเติบโตภายในเซลล์โฮสต์ครั้งแรก ก่อนมุ่งสู่เซลล์โฮสต์ข้างเคียงของลำไส้ส่วนกลาง สปอร์จะผ่านเข้าสู่ลำไส้ส่วนกลางโดยการกินของผึ้ง (infective environmental spore) จากนั้นเกิดการงอกของสปอร์โดยจะผลิต polar filament ออกสำหรับเป็นสะพานยื่นให้ sporoplasm เคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง (germination) ต่อมา primary meront (ระยะก่อนที่เป็น ระยะ Asexual Reproduction ซึ่งเป็น

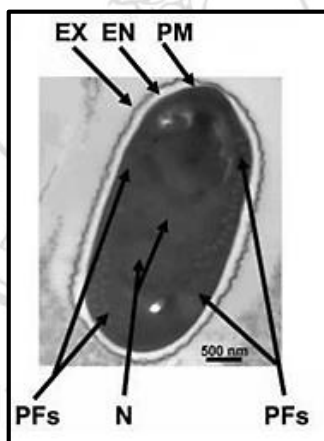
single-celled) มีการพัฒนาเซลล์เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับสร้างสปอร์เริ่มต้น (primary meront) และเป็นขั้นตอนแรกของ vegetative stage จากนั้น sporont เริ่มสร้างสปอร์ และมีการแบ่งตัวหลายครั้ง (primary sporont) ในแต่ละ sporont จะผลิต sporoblasts จาก 1 เป็น 2 เซลล์ แต่ยังไม่เกิดสปอร์ที่สมบูรณ์ (primary sporoblasts) จากนั้นมีการสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เนื่องจากยังไม่เป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ (primary spores) polar filament จึงมีลักษณะสั้น ต่อมา primary spores ใช้ polar filament แทะเข้าไปยังเซลล์อาศัยที่อยู่ถัดไป นำไปสู่การพัฒนาเซลล์ในระยะที่ 2 คือ secondary reproduction โดยเกิดการเจริญเติบโตของ sporoblasts ที่ถูกปล่อยออกจาก primary spores จึงกลายเป็น secondary meront จากนั้นเกิดการแบ่งตัวของ secondary meront เกิดเป็น secondary sporont ใน 1 sporont จะผลิต secondary sporont ออกเป็น 2 เซลล์ (secondary sporoblast) ก่อนจะพัฒนาไปเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ (infective environmental spores) (Solter, 2012)

สำหรับเชื้อ *N. ceranae* จะเพิ่มปริมาณ เมื่ออยู่ในรูปแบบของ vegetative form ภายในผึ้ง โดยไม่มีการผลิตสปอร์ นอกจากนี้สามารถมองเห็นสปอร์เมื่ออยู่ในเนื้อเยื่อของลำไส้ Raquel Martin-Hernandez (2009) ได้กล่าวว่าเชื้อชนิด *N. ceranae* ในรูปแบบของ vegetative form มีความสามารถในการผลิตสปอร์มากกว่าชนิด *N. apis*

วงจรชีวิตในการสืบพันธุ์ของเชื้อมักเกิดขึ้นเพียงไม่กี่วัน โดยมีการเพิ่มขนาดของสปอร์ในผึ้งงานที่มีอายุน้อย Yefimenko (1994) ได้พบว่าผึ้งที่มีอายุน้อยได้รับสปอร์ของเชื้อ แต่ยังไม่มีการพัฒนาของสปอร์ จนกว่าจะถึงวัยออกหาอาหาร เมื่ออายุประมาณ 20 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนสปอร์เฉลี่ยที่พบในผึ้งงานที่มีหน้าที่ออกหาอาหาร มีสปอร์สูงถึง 10 - 20 เท่า เมื่อเทียบกับผึ้งที่มีหน้าที่ดูแลรัง (house bees)

รูปร่างลักษณะสปอร์ของโนซีมา

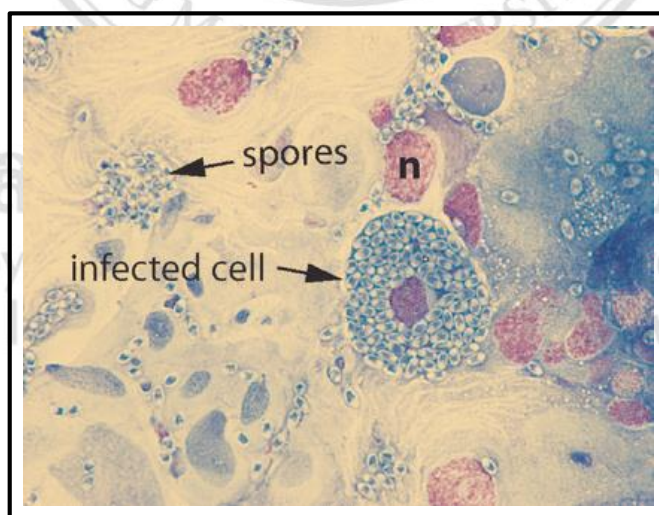
สปอร์ของเชื้อโนซีมามีรูปร่างคล้ายไส้กรอก หรือเมล็ดข้าว โดยสปอร์ของเชื้อชนิด *N. apis* มีความกว้างประมาณ 2.0-4.0 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 4-6 ไมโครเมตร (Cushman, 2006) เชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 6 ปี เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำ (สิริวัฒน์ และสุริรัตน์, 2555) ส่วนสปอร์ของเชื้อชนิด *N. ceranae* มีความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 2.0-2.5 ไมโครเมตร และมีความยาวเฉลี่ย 3.9-5.3 ไมโครเมตร โดยมีขนาดเล็กกว่าชนิด *N. apis* เพียงเล็กน้อย สปอร์โนซีมาทั้ง 2 ชนิด สามารถมองเห็นชัดเจนได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400-1,000 เท่า เมื่อผ่าตัดตามยาว จะพบผนังของสปอร์ ซึ่งประกอบด้วยผนังชั้นนอก (exospore) มีความหนาประมาณ 48-53 นาโนเมตร ถัดมาเป็นผนังชั้นใน (endospore) และ sporoplasm ที่ห่อหุ้มด้วย plasma membrane และภายในสปอร์มี 2 นิวเคลียส (Chen *et al.*, 2009) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ภาพแสดงโครงสร้างภายในของสปอร์โนซีมา ชนิด *N. ceranae* โดยแสดงส่วนประกอบตามสัญลักษณ์ ได้แก่ EN = endospore, EX = exospore, PM = plasma membrane, N = nucleus และ PFs = 20-22 isofilar coils of the polar filament (Chen *et al.*, 2009)

ลักษณะการเข้าทำลายของโรคโนซิมา

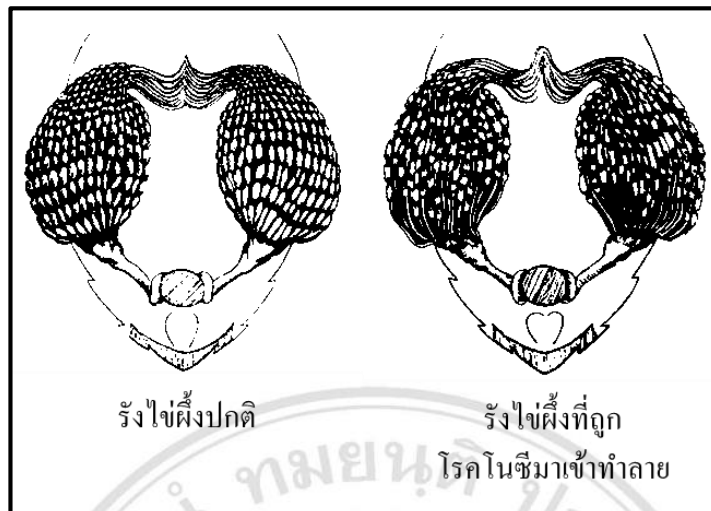
การขนถ่ายเชื้อ *Nosema* spp. สามารถเกิดขึ้นระหว่างการแลกเปลี่ยนอาหาร (trophallaxis) และน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ (Rinderer and Sylvester, 1978; Traver and Fell, 2014) นอกจากนี้ยังสามารถรับเชื้อได้จากการทำความสะอาดเส้นขน หลอดรวงผึ้ง (Mussen, 2011) และการกำจัดมูลออกจากรัง ซึ่งมีโอกาสรับสปอร์บางส่วนที่ปนกับมูล จากนั้นสปอร์จะเคลื่อนที่ผ่านหลอดคอ (esophagus) และกระเพาะพักอาหาร (crop) เข้าสู่ลำไส้ส่วนกลาง (Webster, 2012) (ภาพที่ 4) ตรงบริเวณ proventricular valve (Mussen, 2011) สำหรับภายในลำไส้ส่วนกลางจะผลิตเอนไซม์ไปย่อยเกสร และน้ำหวานที่ผึ้งได้กินเข้าไป เพื่อเป็นสารอาหาร (Webster, 2012) เนื่องจากสปอร์มีผนังหนา ทำให้เอนไซม์ในกระเพาะไม่สามารถย่อยได้สำเร็จ อีกทั้งลักษณะทางสรีระ และสารชีวเคมีภายในของผึ้งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสปอร์ (Mussen, 2011) กระตุ้นให้เกิดการงอกอย่างรวดเร็ว โดยสปอร์จะผลัด และใช้ tubular polar filament (Geoff *et al.*, 2010) เข้าบริเวณส่วนของ peritrophic membrane เพื่อขนส่ง sporoplasm ไปยังเซลล์ลำไส้ (epithelial cell) (Webster, 2012) จากนั้น vegetative body จะเกิดเซลล์ใหม่ขึ้นมา แต่ส่วนใหญ่การเกิดฟอรัมของ vegetative body จะไม่ประสบผลสำเร็จภายในลำไส้ผึ้ง (Solter, 2012)



ภาพที่ 4 การย้อมสี Giemsa-stain, Stained blue-white ของสปอร์โนซิมา อาศัยในเซลล์ลำไส้ผึ้ง ส่วน Stained red คือ นิวเคลียสของเซลล์ ลำไส้ผึ้ง (Gisder *et al.*, 2010)

สำหรับสปอร์ดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการดูดซับธาตุอาหารที่ได้จากการย่อยอาหารด้วย เอนไซม์บริเวณลำไส้ส่วนกลาง เพื่อใช้เป็นพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ของสปอร์ เมื่อสปอร์มีขนาดใหญ่ จะเพิ่มปริมาณ โดยการแบ่งตัว จากนั้นสปอร์สังยีน polar filament ซึ่งมีลักษณะ ยาว และเคลื่อนที่ได้เร็ว (Webster, 2012) ไปยังเซลล์อาศัยที่อยู่ติดกัน ทำให้สามารถเข้าอาศัย และ เจริญเติบโตภายในเซลล์ใหม่ต่อไป (Mussen, 2011) จากนั้นสปอร์เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วจนทั่ว epithelial cell ระยะเวลา 6-10 วัน (Solter, 2012) และนอกจากนี้สปอร์มีการปล่อยเอนไซม์เข้าไป ทำลายระบบย่อยอาหาร ทำให้กระบวนการทำงานผิดปกติ การเจริญเติบโต และเกิดเซลล์ใหม่ของ สปอร์ขึ้นมาจำนวนมาก ทำให้เกิดการแตกออกของเซลล์อาศัย สปอร์ใหม่จะเข้าไปงอก และอาศัย เซลล์อื่น ๆ ต่อไป บางส่วนจะเคลื่อนที่ไปยัง rectum จากนั้นออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกโดยการปนไป กับมูล (Webster, 2012) สปอร์สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 6 ปี ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Cushman, 2006) เมื่อเกิดการระบาดทำให้ผึ้งตายเป็นจำนวนมาก เกษตรกรจะสูญเสียประชากรผึ้งใน รุนถัดไป อีกทั้งยังสูญเสียผึ้งงานที่ออกหาน้ำหวาน และเกสร (Gajger *et al.*, 2011; Smart and Walter, 2011) เชื้อโนซีมาทั้งชนิด *N. ceranae* และ *N. apis* เข้าทำลายในเซลล์บุผิวของลำไส้ส่วนกลางของผึ้ง นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อชนิด *N. ceranae* เข้าทำลายใน basal cells ตลอดจน hypopharyngeal และ ต่อมน้ำลาย (salivary glands) แต่เข้าทำลายในก้อนไขมัน (fat bodies) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (20 เปอร์เซ็นต์) ขณะที่ไม่พบการติดเชื้อในเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cells) ผึ้งงานตัวเต็มวัยที่มีอายุน้อยจะมี โอกาสติดเชื้อได้มากกว่าผึ้งที่มีอายุมาก เนื่องจากมีหน้าที่ในการทำความสะอาดรัง และขนส่งอาหาร จึงสามารถติดเชื้อได้อย่างรวดเร็ว (Higes, 2007)

Alaux *et al.* (2010) ทดสอบการติดเชื้อชนิด *N. ceranae* ในผึ้งแม่รัง เป็นเวลา 8 วัน พบว่า เชื้อไม่มีผลกระทบต่อ fat body ซึ่งเป็นแหล่งจำหน่ายพลังงานภายในร่างกาย แต่พบการเปลี่ยนแปลง ของไวเทลโลจีนิน (vitellogenin) ซึ่งเป็น โปรตีนตั้งต้นสำหรับการผลิตไข่ และ mandibular pheromones ของผึ้งแม่รัง นอกจากนี้ Hassanein (1951) ได้อธิบายว่าเมื่อเชื้อสร้างความเสียหายให้กับ รังไข่ ทำให้เกิดกระบวนการวางไข่ไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้เกิดจากเซลล์อาหารในการหล่อเลี้ยงรังไข่สลายตัว ไป ทำให้หยุดพัฒนา และเจริญเติบโต ส่งผลให้เซลล์ไข่มีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ความเสียหายที่ส่งผลต่อสรีรวิทยาของรังไข่ของผึ้งแม่รังที่ถูกทำลายด้วย *N. apis* เมื่อเปรียบเทียบกับรังไข่ผึ้งแม่รังที่ไม่ได้รับเชื้อ (ดัดแปลงจาก Hassanein, 1951)

การจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อโนซิมา

ขนาดสปอร์ชนิด *N. ceranae* มีขนาดเล็กกว่าชนิด *N. apis* เล็กน้อย ซึ่งทั้ง 2 ชนิด มีรูปร่างสมมาตรกัน และปลายทั้งสองข้างมีลักษณะมน ส่วน coils of polar filament ของชนิด *N. ceranae* มีจำนวนน้อยกว่า *N. apis* นอกจากนี้ *N. ceranae* มีความต้านทานต่ออุณหภูมิสูง (Huang *et al.*, 2012) มีรายงานว่า 90 เปอร์เซ็นต์เชื้อชนิด *N. ceranae* สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ขณะที่เชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* มีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 6 เดือน สปอร์สามารถมีชีวิตอยู่ได้ 64 เปอร์เซ็นต์ และหากเก็บทิ้งไว้นาน 12 เดือน อัตราการรอดชีวิตจะลดลงเหลือเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ (Fenoy *et al.*, 2009) ส่วนลักษณะอาการ เช่น การถ่ายมูลออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบในและบริเวณนอกกรังนั้น มักเป็นอาการของการติดเชื้อใน *N. apis* ส่วน *N. ceranae* นั้นมักเกิดเป็นครั้งคราวแต่จะสังเกตอาการได้ไม่ชัดเจนเหมือนการติดเชื้อด้วย *N. apis* นอกจากนี้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อเกิดการติดเชื้อในผึ้ง พบลำไส้ของผึ้งมีลักษณะสีขาวขุ่น (Mussen, 2011) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สรุปความแตกต่างของโรคโนซีมา *N. ceranae* กับ *N. apis* ที่เข้าก่อโรคในผึ้ง (Cushman, 2006; Fenoy *et al.*, 2009; Mussen, 2011; Huang *et al.*, 2012)

ลักษณะความแตกต่าง	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
มูล หรืออุจจาระ	พบบริเวณใน และนอกรังผึ้ง	ไม่พบมูลเประะเปื้อน
ขนาดสปอร์	6.0×3.0 ไมโครเมตร	4.4×2.2 ไมโครเมตร
ความรุนแรงของการแสดงของโรค	มากกว่า 8 วัน	ภายในระยะเวลา 8 วัน
Polar filament coils	มากกว่า 30	ระหว่าง 20 - 30
Yielded the expected amplicon sizes	321 bp	218 bp
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์โนซีมา (spore morphology)	Ends rounded, symmetrical	Ends sharper, less symmetrical
ความทนทานต่ออุณหภูมิสูง	ต่ำ	สูง
ความทนทานต่อสภาพแช่แข็ง	สูง	ต่ำ
ความผันผวนตามฤดูกาล	บางโอกาส	ทุกฤดูกาล
การถ่ายมูลใน และนอกรัง	✓	X
ถ้าได้มีลักษณะสีขาวขุ่น	✓	X
ความรุนแรงในการก่อโรค	ต่ำ	สูง
เกิดการเพิ่มระดับของ JH	✓	unknown
การใช้พลังงานหลังการก่อโรค	ต่ำ	สูง
มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของผึ้งหลังจากติดเชื้อ (immunosuppression)	✓	X

การแพร่ระบาดของโรคโนซีมา

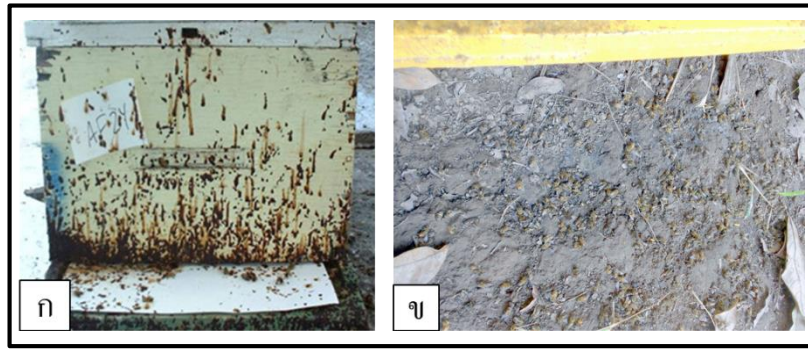
เมื่อผึ้งได้รับเชื้อสาเหตุ ทำให้เกิดการลดจำนวนประชากรผึ้ง (Cushman, 2006) นอกจากนี้ Suwannapong *et al.* (2011) รายงานว่าพบผึ้งมีอัตราการตายสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อได้รับสปอร์ของเชื้อโนซีมาในปริมาณ 20,000 และ 40,000 สปอร์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ สำหรับการแพร่ระบาดของเชื้อชนิด *N. apis* จะพบในช่วงฤดูฝน และฤดูหนาว (Canadian Association of Professional Apiculturists, 2012) โดยพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ. 1882 ช่วงฤดูหนาวในพื้นที่เลี้ยงผึ้งจำนวน 27 รัฐ ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Gochbauer *et al.*, 1975; Lotfi *et al.*, 2009) มีรายงานพบเชื้อชนิด *N. apis* เป็นระยะเวลานานกว่า 20 ปี (Aydin *et al.*, 2006) เชื้อชนิดนี้มีอัตราการเกิดโรคเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (Bougeois, 2010) มีรายงานพบ เชื้อ *N. apis* ทั่วพื้นที่การเลี้ยงผึ้งของสหรัฐอเมริกา และทวีปยุโรป (Bailey, 1981; Matheson, 1993) ส่วนการแพร่ระบาดของเชื้อชนิด *N. ceranae* นั้น เกิดขึ้นมานานกว่า 10 ปี (Paxton *et al.*, 2007) เช่น พบในประเทศฟินแลนด์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 และเชื้อ *N. ceranae* ถูกตรวจพบในหลายประเทศในทวีปยุโรป มีความเกี่ยวข้องกับปรากฏการณ์ในการลดจำนวนประชากรผึ้ง (Higes *et al.*, 2013) ต่อมา มีรายงานพบว่าเริ่มพบผึ้งติดเชื้อชนิด *N. ceranae* ในสหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี 1995-2007 (Chen *et al.*, 2008) และในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานว่าเชื้อ *N. ceranae* ได้ถูกลำเลียงเข้ามาทำลายผึ้งพันธุ์ในสภาพพื้นที่ที่มีการเลี้ยงผึ้งของประเทศไต้หวันอย่างรวดเร็ว (Huang *et al.*, 2007) หลังจากนั้นไม่นานพบการติดเชื้อชนิด *N. ceranae* ในผึ้งพันธุ์แพร่กระจายไปยังประเทศ จีน และประเทศอื่น ๆ ที่มีการเลี้ยงผึ้ง (Huang *et al.*, 2012) ในปัจจุบัน *N. ceranae* กลับสร้างปัญหาให้กับวงการเลี้ยงผึ้ง เนื่องจาก *N. ceranae* มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างไปจาก *N. apis* ซึ่งสร้างความเสียหายกับผึ้งในช่วงฤดูร้อน (Martin-Hernandez *et al.*, 2007)

การแพร่กระจายสปอร์ของโรคโนซีมาทั้ง 2 ชนิดมีหลายทาง ได้แก่ มูลขี้ผึ้งของผึ้ง หลอดรวงที่ใช้เก็บเกสรผึ้ง และบริเวณ tibia ของขาหลังมือวิยะที่ใช้ในการการเก็บเกสร (pollen basket หรือ corbicular) ซึ่งเป็นตัวแพร่เชื้อได้เป็นอย่างดี (Rinderer and Sylvester, 1978; Malone *et al.*, 1995; Malone and Stefanovic, 1999; Higes *et al.*, 2007; Martin-Hernandez *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008b)

ความรุนแรงของโรค

การศึกษาในประเทศสเปน พบว่าผึ้ง (*Apis mellifera iberica*) ที่ได้รับเชื้อโนซีมาชนิด *N. ceranae* มีอัตราการตายประมาณ 94.1-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7-8 วัน ซึ่งแสดงอาการได้เร็วกว่าเชื้อชนิด *N. apis* แสดงว่าเชื้อชนิด *N. ceranae* มีความรุนแรงมากกว่าเชื้อชนิด *N. apis* (Higes *et al.*, 2007) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อ *N. ceranae* สามารถเข้าก่อโรคในผึ้งหลายชนิด ได้แก่ *A. mellifera*, *A. cerana* และ *A. dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010) แต่รายงานผลการทดลองของ Forsgren and Fries (2010) กลับไม่พบความแตกต่างในความรุนแรงของเชื้อทั้งสองชนิด ความรุนแรงของโรคโนซีมาอาจขึ้นอยู่กับกระบวนการขนถ่ายเชื้อ เมื่อเชื้อแพร่กระจายเข้าสู่ผึ้งแล้ว การผลิตสเปอร์จะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานในฉบับอื่นๆ ที่กล่าวถึงความรุนแรงของการตายของผึ้งด้วยโรคโนซีมาในระดับสูง และรวดเร็ว ขณะที่ Huang *et al.* (2012) ให้ความเห็นว่าความรุนแรงในการเกิดโรค อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ผึ้ง และปัจจัยเสริมอื่น ๆ Oliver (2013) รายงานว่า *N. ceranae* มีการเข้าทำลาย ความรุนแรงของโรค และการระบาดวิทยา แตกต่างจาก *N. apis* (Oliver, 2013) นอกจากนี้มีรายงานพบเชื้อชนิด *N. ceranae* เข้าทำลายตรงบริเวณ basal cells ตลอดจน hypopharyngeal salivary glands และท่อทางเดินอาหาร ยกเว้น muscle tissue (Higes, 2007) สเปอร์บางส่วนที่ถูกปลดปล่อยไปยังลำไส้ส่วนท้าย และปะปนไปกับมูลผึ้ง เพื่อออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก เพื่อหาโฮสต์ใหม่อาศัยต่อไป จากความเสียหายในลักษณะดังกล่าวมักเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *N. apis* สร้างความเสียหายแบบ secondary infections ซึ่งพบมูลเประอะเปื้อนอยู่บริเวณรัง และนอกรัง เมื่อตรวจสอบแล้วพบสเปอร์มากกว่า 1 ล้านสเปอร์ต่อผึ้ง แต่ไม่พบอาการดังกล่าวในผึ้งที่ติดเชื้อ *N. ceranae* (Mussen, 2011) (ภาพที่ 6)

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 6 ความรุนแรงของโรคโนซิมาที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ

- ก. การถ่ายมูลของผึ้งที่ติดเชื้อ *N. apis* (Canada Agriculture and Food Museum, 2014)
 ข. การตายของผึ้งเป็นจำนวนมากที่ติดเชื้อมด้วย *N. ceranae*

ปัจจัยของการเกิดโรค

การเกิดโรคในผึ้ง โดยเฉพาะปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคติดต่อ ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัยมาเกี่ยวข้อง และอาจพิจารณาได้จากปัจจัย 3 ประการ ดังนี้

1. ผึ้ง

- 1.1 อายุของผึ้ง อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคได้ มีรายงานว่าเชื้อโนซิมา มักเข้าทำลายเฉพาะผึ้งงานตัวเต็มวัยเท่านั้น (Bourgeois *et al.*, 2010) ส่วนใหญ่ผึ้งงานตัวเต็มวัยที่มีอายุน้อยมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อมได้ง่ายกว่าผึ้งงานที่มีอายุมาก (Webster, 2004) หากแต่ในผึ้งงานตัวเต็มวัยที่มีอายุน้อยได้รับสปอร์ของเชื้อเข้าไป สปอร์ยังไม่มีการพัฒนา จนกว่าจะถึงวัยออกหา และเก็บอาหาร เมื่ออายุประมาณ 20 วัน (Oliver, 2013) ซึ่งส่งผลกระทบต่อกำลังการผลิตน้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์จากผึ้ง เป็นต้น (Woyke, 1984; Szabo and Lefkovitch, 1989; Eckert *et al.*, 1994; Higes *et al.*, 2013)
- 1.2 ปัจจัยทางกายภาพ และเคมีภายในลำไส้ส่วนกลางของผึ้งมีความเหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ จึงทำให้สปอร์ดำรงชีวิต และเพิ่มปริมาณภายในเซลล์ของท่ออาหารส่วนกลาง (Mussen, 2011)

2. เชื้อก่อโรค

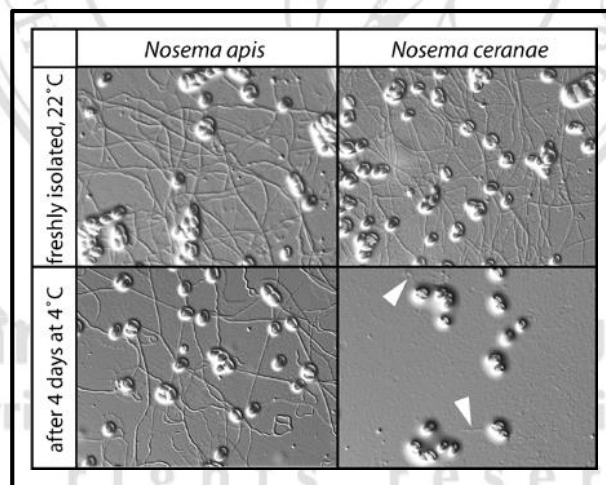
- 2.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้ออาจมีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อความอยู่รอดของผึ้งที่ติดเชื้อ โดยอธิบายว่าเมื่อได้รับสปอร์ของเชื้อโนซิมาเป็นจำนวนมากมีผลต่ออัตราการมีชีวิตของผึ้งรุ่นถัดไป เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับอายุ ขณะที่ไขของผึ้งได้รับเชื้อ แล้วพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย จะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดลดลง หรือวงจรชีวิตของผึ้งที่ได้รับเชื้อสั้นลง เมื่อเปรียบเทียบกับผึ้งที่ไม่มีการติดเชื้อ อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงในระดับ juvenile hormone (JH) หลังจากได้รับเชื้อโนซิมา โดยจะมีพฤติกรรมกินวัย เช่น มีพฤติกรรมออกหาอาหาร แทนที่มีหน้าที่ในการดูแลตัวอ่อน ผึ้งงานตัวเต็มวัยอายุน้อยที่มีหน้าที่ดูแลตัวอ่อน หากได้รับเชื้อโนซิมาเข้าไปจะไม่สามารถย่อยอาหาร และไม่สามารถผลิตนมผึ้งไว้เลี้ยงตัวอ่อนได้ นอกจากนี้ยังมีอายุสั้น ซึ่งมีชีวิตอยู่ได้เพียง 78 เปอร์เซ็นต์ของช่วงชีวิตทั้งหมด (Higes *et al.*, 2013)
- 2.2 มีรายงานว่าผนังเซลล์ของสปอร์โนซิมามีความหนาแน่น ทำให้เชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่อยู่ในการเพาะย่อยอาหารส่วนกลางไม่สามารถย่อยสปอร์ได้ จึงสามารถอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของผึ้งได้ (Mussen, 2011)
- 2.3 จากการทดลองของ Higes *et al.* (2007) พบว่าผึ้งสายพันธุ์ (*Apis mellifera iberica*) มีอัตราการตายมากถึง 94.1-100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้รับเชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* เพียง 7-8 วัน ซึ่งจะมีความรุนแรงกว่าเชื้อชนิด *N. apis*

3. สิ่งแวดล้อม

- 3.1 ความรุนแรงของการก่อโรคอาจต้องอาศัยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ช่วยให้เชื้ออำนวยความสะดวกในการพัฒนา การขยายพันธุ์ ตลอดจนการแพร่กระจายเชื้อ จากประสบการณ์ของ Mussen (2011) พบว่าในช่วงฤดูหนาวของรัฐมนตรีนิโซตา ประเทศสหรัฐอเมริกา พบกลุ่มประชากรของผึ้งตายด้วยโรคโนซิมามากที่สุด โดยสปอร์มีปริมาณมากกว่า 10 ล้านสปอร์ต่อตัว ทำให้สูญเสียผึ้งแม้มัง และกลุ่มประชากรผึ้งเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อโนซิมา ในช่วงฤดูใบไม้

ผลิ โดยผู้เลี้ยงผึ้งพบการถ่ายมูลของผึ้งตามบริเวณภายในรัง และนอกรัง สำหรับเชื้อ *N. ceranae* พบการติดเชื้อ และแพร่ระบาดได้ตลอดทั้งปี

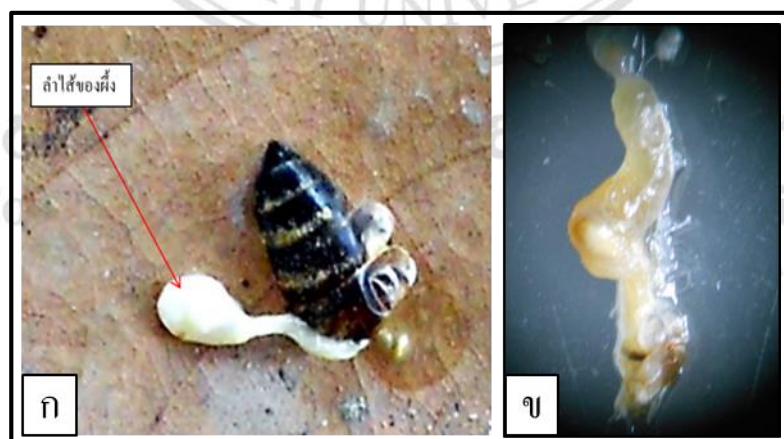
3.2 มีรายงานว่าเชื้อชนิด *N. ceranae* และชนิด *N. apis* มีความสามารถในการพัฒนาการเจริญเติบโตในอุณหภูมิเท่ากันได้แตกต่างกัน เช่น เมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ชนิดไว้ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส *N. ceranae* จะผลิตสปอร์ได้เร็วกว่าเชื้อ *N. apis* อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ก็สร้างความเสียหายให้กับผึ้งอย่างมาก (Forsgren and Fries, 2010) ขณะที่งานทดลองของ Martin-Hernandez *et al.* (2009) พบว่าเชื้อชนิด *N. ceranae* สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรือ 77 องศาฟาเรนไฮต์ ซึ่งเร็วกว่า *N. apis* นอกจากนี้ยังพบว่า *N. apis* มีชีวิตอยู่ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส หรือ 77 องศาฟาเรนไฮต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gisder *et al.*, 2010 พบว่าเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* มีความสามารถในการดำรงชีวิต และเจริญเติบโตได้ดี ที่อุณหภูมิ +4 องศาเซลเซียสขึ้นไป (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงการงอก filament ของสปอร์โนซิมา 2 สองชนิด โดยเชื้อ *N. apis* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ *N. ceranae* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิต่ำตั้งแต่ 4 (≥ 4 องศาเซลเซียส) เนื่องจากไม่เกิดการงอกของ polar filament ซึ่งมีหน้าที่ในการขนถ่าย sporoplasms (Gisder *et al.*, 2010)

ลักษณะอาการ และพฤติกรรมของผึ้งที่ติดเชื้อโนซีมา

เชื้อโนซีมาเข้าก่อโรคนในผึ้งผ่านทางกรินอาหาร โดยเชื้อจะปนกับอาหารที่เก็บมาจากแหล่งเก็บอาหาร (Geoff *et al.*, 2010) ผึ้งงาน (foragers bees) ที่ได้รับเชื้อจะลดความกระตือรือร้นในการออกหา และเก็บอาหาร (Bourgeois, 2010) อาการเริ่มแรกของผึ้งที่ติดเชื้อด้วยโรคโนซีมา จะเกิดภาวะความเครียดของการกินอาหาร จากนั้นจะหยุดกินอาหาร และตายในที่สุด ผึ้งงานที่มีหน้าที่ดูแลรัง (house bees) เมื่อได้รับเชื้อ แสดงการตายโดยการจมลงในถาดน้ำเชื่อม จากนั้นจำนวนประชากรผึ้งงานลดลงอย่างต่อเนื่อง (Oliver, 2013) ลักษณะทั่วไปของผึ้งที่ติดเชื้อ พบว่าอวัยวะส่วนท้องมีลักษณะบวม ส่วนลำไส้มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น (ภาพที่ 8) ผึ้งที่เป็นโรคมักมีการเคลื่อนไหวของอวัยวะส่วนปีกไม่สัมพันธ์กัน และวงจรชีวิตของผึ้งสั้นลง (Rinderer and Sylvester, 1978) นอกจากนี้เชื้อโนซีมายังสามารถก่อโรคกับผึ้งแมมริงได้อีกด้วย (Webster, 2004) ผึ้งแมมริงที่เป็นโรค ส่งผลให้อัตรการวางไข่ลดลง อย่างไรก็ตามสัดส่วนการก่อโรคส่วนใหญ่มักพบในผึ้งงานมากกว่าผึ้งแมมริง เนื่องจากผึ้งงานมีพฤติกรรมชอบทำความสะอาดรัง ดังนั้นจึงมีโอกาสติดเชื้อได้มากกว่า (Cushman, 2006) เชื้อโนซีมาทั้งชนิด *N. ceranae* และชนิด *N. apis* เมื่อได้เข้าทำลายแล้วมักเกิดการระบาดอย่างหนัก ส่งผลให้การผลิตน้ำผึ้งลดลง และมีความเสียหายต่อกิจกรรมในการออกหาอาหาร จึงทำให้กิจกรรมในการผสมเกสรพืชน้อยลงตามไปด้วย



ภาพที่ 8 การเปรียบเทียบลักษณะลำไส้ที่ถูกโรคโนซีมาเข้าทำลาย กับลำไส้ปกติ
ก. ลำไส้ของผึ้งพันธุ์ที่ถูกโรคโนซีมาเข้าทำลาย มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น
ข. ลำไส้ของผึ้งพันธุ์ปกติ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลส้ม

1. ลักษณะอาการ และพฤติกรรมของผึ้งที่เป็นโรคโนซีมาชนิด *N. ceranae*

เชื้อโนซีมาชนิด *N. ceranae* เมื่อผึ้งได้รับเชื้อส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในการกินอาหารอย่างมีนัยสำคัญ โดยผึ้งเพิ่มการตอบสนองต่อน้ำตาลซูโครส แต่ลดการแบ่งปันในการให้อาหารในวงสังคมกลุ่มผึ้งเดียวกัน (Naug and Gibbs, 2009) นอกจากนี้โรคโนซีมาชนิดนี้ยังทำให้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผึ้งที่ออกหาอาหาร และทำให้พลังงานของผึ้งในการทำกิจกรรมในชีวิตประจำวันลดลงกว่าผึ้งปกติ (Mayack and Naug, 2010) อีกทั้งทำให้เกิดการลดพลังงานในการบินของผึ้งงานที่มีหน้าที่ออกหาอาหาร ประมาณสองในสามเท่า เมื่อเทียบกับผึ้งที่ไม่ติดเชื้อ (Kralj and Fuchs, 2010) นอกจากนี้มีรายงานว่า *N. ceranae* สามารถเข้าก่อโรคให้กับผึ้งแม่วงได้ ในระยะเวลาอันสั้น สำหรับการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของผึ้งหลังจากได้รับเชื้อ พบว่าผึ้งไม่เพิ่มจำนวนกลุ่มประชากร เนื่องจากผึ้งงานตายก่อนอายุขัย ทำให้เกิดการลดจำนวนตัวผึ้งในกลุ่มประชากรเป็นจำนวนมาก (Oliver, 2013)

รายงานผลการวิจัยของ Woyciechowski and Kozlowski (1998) พบว่าการติดเชื้อขึ้นอยู่กับพฤติกรรมออกหาแหล่งอาหารนั้น ๆ ซึ่งอาจทำให้ผึ้งงานมีอายุขัยสั้นลง นอกจากนี้ผึ้งที่ติดเชื้อบางทีจะบินออกมาตายบริเวณนอกรัง เพื่อช่วยป้องกันการแพร่ระบาดไปยังผึ้งงานตัวอื่น ๆ ส่วนอาการอื่น ๆ มีรายงานว่าผึ้งที่เป็นโรคส่วนใหญ่จะจมน้ำตายในถาดน้ำเชื่อมเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม Mayak and Naug (2009) อธิบายว่าเชื้อ *N. ceranae* ก่อให้เกิดภาวะความเครียดของพลังงาน ซึ่งจะขัดขวางความเครียดโดยการกิน ขณะที่ Kralj and Fuchs (2010) ได้ศึกษาพฤติกรรมของผึ้งที่ติดเชื้อชนิด *N. ceranae* โดยปล่อยให้ผึ้งที่ได้รับเชื้อบินออกจากรังและกลับเข้าสู่อัง พบว่าผึ้งที่ติดเชื้อใช้ระยะทางในการบินเข้าออก ประมาณ 6 - 10 เมตร ผึ้งบางตัวไม่สามารถบินกลับเข้ารังได้ ซึ่งผึ้งปกติบินเข้าออกรัง โดยใช้ระยะทางประมาณ 30 เมตร แล้วกลับเข้ารัง บางทีพฤติกรรมของผึ้งที่ติดเชื้ออาจเกิดจากการขาดโปรตีนไปหล่อเลี้ยงสมอง จึงส่งผลต่อพฤติกรรมในการดำเนินชีวิตเปลี่ยนไป ขณะเดียวกัน Mayack and Naug (2010) ได้เปรียบเทียบผลของการศึกษาภาวะความเครียดของพลังงาน ระหว่างผึ้งปกติ กับผึ้งที่ติดเชื้อชนิด *N. ceranae* พบว่าเกิดความเครียดของระดับพลังงาน ซึ่งให้เหตุผลประกอบดังนี้

- A. ผีเสื้อที่ติดเชื้อชนิด *N. ceranae* มีการตอบสนองต่อสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่ำ
- B. ผีเสื้อที่ติดเชื้อชนิด *N. ceranae* แสดงการกินสารละลายน้ำตาลซูโครส ได้มากถึง 87 ไมโครลิตร คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่ผีเสื้อปกติกินได้เพียง 60 ไมโครลิตร ดังนั้นสรุปได้ว่า *N. ceranae* เป็นสาเหตุทำให้ผีเสื้อกินอาหารได้มาก
- C. สำหรับชุดควบคุมสามารถกินอาหารได้ 5, 10, 20 และ 30 ไมโครลิตรตามลำดับ และมีชีวิตรอดได้ดีกว่าผีเสื้อที่ติดเชื้อ ผีเสื้อที่ติดเชื้อมากกว่า ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหลักของช่วงอายุขัยของผีเสื้อสั้นลง

2. ลักษณะอาการ และพฤติกรรมของผีเสื้อที่ติดเชื้อ *N. apis*

อาการของโรคโนซีมาชนิด *N. apis* โดยทั่วไปจะพบการตายของผึ้งงานเป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับอาการติดเชื้อชนิด *N. ceranae* แต่พบอาการท้องเสีย และพบคราบมูลสีเหลืองเป็นจุด ๆ ปรืออะเปื้อนตามบริเวณหน้ารังด้านนอก ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันว่าการย่อยของระบบทางเดินอาหารผิดปกติ มีอาการท้องป่อง หรือบวม ปีกไม่สัมผัสกัน และอ่อนแอ อาการคล้ายกับผีเสื้อที่ติดเชื้อไวรัสแบบเรื้อรัง นอกจากนี้ผีเสื้อที่ติดเชื้อ *N. apis* มักจะไม่ชอบรวมกลุ่ม (Cushman, 2006) ในปี ค.ศ. 1990 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ T.P. Liu ได้ศึกษาเชื้อโนซีมาชนิด *N. apis* ที่ส่งผลกระทบต่อผึ้งงาน และผึ้งแม่รังในประเทศแคนาดา พบว่าผึ้งงานที่ติดเชื้อด้วย *N. apis* เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในของเซลล์บุผิวของท่อทางเดินอาหาร ต่อม hypopharyngeal และ ต่อม corpora allata (แหล่งผลิต juvenile hormone) ส่วนผึ้งแม่รังหลังจากติดเชื้อชนิด *N. apis* เป็นเวลา 7 วัน เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์สืบพันธุ์ เนื่องจากกลุ่มไขมีลักษณะเป็นรอยย่น เพราะภายใน ooplasm เกิดการสลายตัวของโปรตีนโยล์ค (yolk) อีกทั้งไขมีขนาดเล็ก ทำให้เกิดการฟ่อของกลุ่มไข อาจเพราะกระบวนการของโรควิทยา อาทิเช่น การขาดโปรตีนในการหล่อเลี้ยงเซลล์ไข่ และระดับที่เพิ่มขึ้นของ juvenile hormone ที่เป็นผลมาจากการติดเชื้อ *N. apis* (Higes *et al.*, 2007) มีรายงานว่าผึ้งงานที่ติดเชื้อด้วย *N. apis* จะทำให้ hypopharyngeal glands มีขนาดเล็ก และมีพฤติกรรมโตเต็มวัยเร็วกว่าผึ้งปกติ (Wang and Moeller, 1970) โดยผึ้งงานตัวเต็มวัย

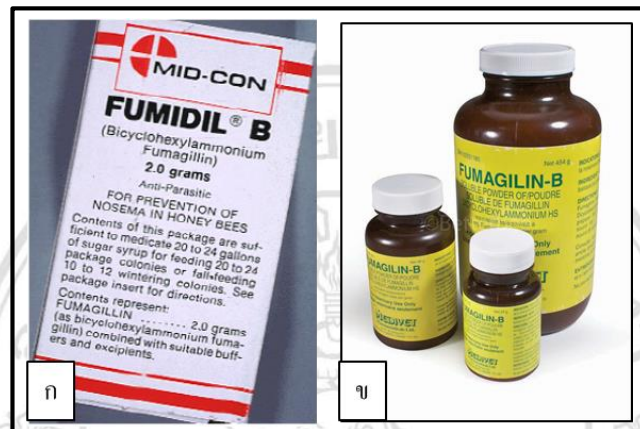
ที่มีอายุน้อย เมื่อติดเชื่อจะมีพฤติกรรมการเดินร่า เพื่อสื่อสารบอกตำแหน่งของแหล่งอาหาร และแสดงการบินเร็วกว่าผึ้งปกติที่มีอายุเท่ากัน เป็นต้น (Alaux *et al.*, 2010) สำหรับการติดเชื่อในผึ้งงาน (nurse worker bees) พบว่าจะมีพฤติกรรมการป้อนอาหารผึ้งแม่รังน้อยลง เนื่องจากกิจกรรมในการผลิตนมผึ้งให้ผึ้งแม่รังลดลง (Webster *et al.*, 2004) สำหรับการรายงานผลการศึกษาของ Woyciechowski and Kozłowski (1998) ได้อธิบายว่าผึ้งงานที่ติดเชื่อ *N. apis* มีพฤติกรรมในการออกหาอาหารบ่อยกว่าผึ้งงานที่ไม่ได้รับเชื่อในสภาพอากาศไม่เอื้ออำนวย

การควบคุม และป้องกันกำจัดโรคโนซิมา

1. การควบคุมโดยวิธีเขตกรรม (Cultural control)
 - 1.1 การทำความสะอาด (sanitation) เป็นวิธีที่ดีที่สุด เช่น การทำความสะอาดมูลที่เประเปื้อนในบริเวณรัง และนอกรัง ยกตัวอย่างเช่น ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ระหว่างช่วงฤดูหนาว เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการทำความสะอาดรัง และเครื่องมืออุปกรณ์สำหรับเลี้ยงผึ้งที่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อโนซิมา (Mussen, 2011)
 - 1.2 การจัดการฟาร์มทั่วไป (general farm management) เมื่อเกิดการระบาดของโรคโนซิมา ให้นำรังที่มีผึ้งเป็นโรคเคลื่อนย้ายออกห่างรังปกติ หรือให้นำออกไปจากพื้นที่ตั้งรังทันที (ไม่รวมผึ้งปกติปนไว้กับผึ้งที่เป็นโรค) เพื่อป้องกันการถ่ายทอดเชื้อ ห้ามเคลื่อนย้ายรังผึ้งที่ปนเปื้อนเชื้อไปยังที่อื่น ๆ (สิริวัฒน์ และสุริรัตน์, 2555)
2. การควบคุมโดยวิธีกายภาพ (Physical control)
 - 2.1 การฉายรังสี electron-beam ในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สามารถฆ่าสปอร์ของเชื้อโนซิมาได้ แต่วิธีการนี้ไม่นิยมปฏิบัติในวงการผึ้ง (Cushman, 2006; Mussen, 2011)
 - 2.2 การใช้รังสี UV ฆ่าสปอร์ เมื่อสปอร์ถูกฆ่าสปอร์จะเปลี่ยนเป็นสีแดงสดด้วย fluorescent stain รังสี UV มีประสิทธิภาพในการฆ่าสปอร์โนซิมา ทำให้ไม่เกิด

- สารตกค้างในอุปกรณ์เลี้ยงผึ้ง (Webster, 2012) ดังนั้นสามารถนำรังผึ้งไปตากแดด
หลีกเลี่ยงสถานที่เปียกชื้น เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ
- 2.3 สำหรับเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ
ประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (สิริวัฒน์ และสุริรัตน์, 2555) ดังนั้น
ถ้าเกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรง สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการเผารังผึ้ง (วิธีการนี้
เกษตรกรไม่นิยมปฏิบัติ) ส่วนชนิด *N. ceranae* สามารถทำลายได้ด้วยอุณหภูมิต่ำ
กว่า 0 องศาเซลเซียส (Mussen, 2011)
- 2.4 การควบคุม การป้องกันกำจัด และรักษาโรคโนซิมานั้น ขึ้นอยู่กับช่วงเวลา
ที่เหมาะสม เช่น เชื้อชนิด *N. apis* ในทวีปยุโรป มีความทนทานต่อปัจจัยต่าง ๆ
ยกเว้นแสงแดด และเชื้อมีชีวิตอยู่ได้นานหลายปี ในทางตรงข้ามเชื้อ *N. ceranae*
ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียเขตร้อน สปอร์จะอ่อนแอต่อสภาพอากาศที่หนาวเย็น
ดังนั้นสามารถฆ่าเชื้อชนิด *N. ceranae* ได้โดยการแช่อุปกรณ์ เครื่องมือ และ
รังผึ้งไว้ในตู้แช่แข็งในอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส (Mussen, 2011)
3. การควบคุมโดยสารเคมี (Chemical control)
- 3.1 การใช้สารรมควันที่มีส่วนผสมของกรดอะซิติก (Acetic acid) ในความเข้มข้น 80
เปอร์เซ็นต์ ฆ่าสปอร์ของเชื้อโนซิมา โดยทำการวางรังผึ้ง ซ้อนกันเป็นชั้น ๆ
จำนวน 5 ชั้น แล้วใช้สารรมที่มีส่วนผสมของกรดอะซิติก 80 เปอร์เซ็นต์ ใน
ปริมาณ 150 มิลลิลิตร นาน 2-3 ชั่วโมงต่อ 1 สัปดาห์ (Cushman, 2006)
- 3.2 การใช้ Fumagillin (Bicyclohexylammonium fumagillin) ชื่อทางการค้า
Fumagillin B, Fumidil B (สิริวัฒน์ และสุริรัตน์, 2555) (ภาพที่ 9) หรือ
Amebacilin, Fugilin และ Fumidil เช่น รัฐมินนิโซตา ในประเทศสหรัฐอเมริกา
ช่วงเดือนเมษายน มักพบปริมาณสปอร์มากกว่า 1 ล้านสปอร์ต่อตัว ผู้เลี้ยงผึ้งมัก
ใช้สารฟูมาจิลลินในการรักษาโรคในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ส่วน (น้ำเชื่อม 2 ส่วนต่อ
ฟูมาจิลลิน 1 ส่วน) ส่วน *N. ceranae* มีการใช้สารฟูมาจิลลินในอัตราส่วนที่ต่างกัน
ออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการติดเชื้อ ในการนี้ปัญหาส่วนใหญ่มัก
เกิดกับผู้เลี้ยงผึ้งในต่างประเทศ ซึ่งมีการใช้สารฟูมาจิลลินตามความพอใจ ซึ่งเป็น

สาเหตุให้เกิดการต้านทานต่อสารฟูมาจีลินได้ (Mussen, 2011) จากคำแนะนำการใช้สารฟูมาจีลินเพื่อรักษาโรคโนซีมาในผึ้งของ สิริวัฒน์ และสุรรัตน์ (2555) ได้กล่าวว่าให้ใช้ในอัตราส่วน 0.1 ต่อ 1 โดยทำการผสมสารฟูมาจีลิน 0.1 กรัมต่อน้ำเชื่อม 1 แกลลอน ซึ่งใช้ได้กับการระบาดของโรคโนซีมาที่ไม่รุนแรง



ภาพที่ 9 ผลิตภัณฑ์สารปฏิชีวนะ ใช้รักษาโรคโนซีมาในผึ้ง

ก. ชื่อการค้า Fumidil B

ข. ชื่อการค้า Fumagillin B

4. การบริหารจัดการแบบวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management : IPM)

สำหรับการควบคุมดูแลรักษา และป้องกันกำจัดเชื้อโรคผึ้ง ต้องอาศัยการจัดการที่ดี ให้ผึ้งมีสุขภาพแข็งแรงอยู่เสมอ หรือต้องให้น้ำหวานเสริมเพื่อให้ผึ้งมีแหล่งอาหารที่เพียงพอ อาจจำเป็นต้องนำหลักการของการบริหารจัดการแบบวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management: IPM) เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยเอาวิธีการควบคุมหลายๆ วิธีมาใช้ร่วมกัน ในพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการควบคุมดูแลรักษา และป้องกันกำจัดเชื้อโรคผึ้ง เช่น มีการใช้วิธีการจัดการแบบวิธีผสมผสานมาใช้ พื้นที่ที่มีการเลี้ยงผึ้งหลายรัฐในแถบ Middle Atlantic states ของประเทศสหรัฐอเมริกา ในการจัดการดังกล่าวสามารถควบคุมศัตรูของผึ้งได้หลายชนิด รวมถึงโรคโนซีมา (Virginiaitech, 2009)

การวินิจฉัยโรคโนซิมา

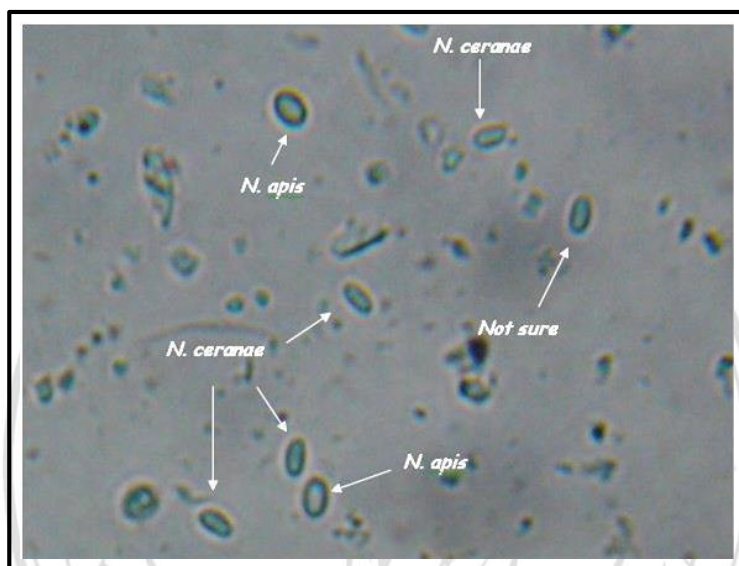
จากการตรวจเอกสารผลการรายงานของโรคโนซิมา พบการนำเสนอรายงานไปในทิศทางต่างกัน และนักวิจัยยังคงมีความพยายามในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของโรคชนิดนี้ ทั้งในด้าน methodologies และ pathology แม้กระทั่งการตรวจสอบทางชีวภาพ และทางสัตวแพทย์ (Higes *et al.*, 2013) การวินิจฉัยโรคโนซิมาเป็นเรื่องยากที่จะคาดการณ์โรคล่วงหน้า และซึ่งปัจจุบันยังไม่มีวิธีการสำหรับวินิจฉัยโรคโดยปราศจากเครื่องมือ และอุปกรณ์ จึงจำเป็นต้องนำตัวอย่างมาพิสูจน์ และตรวจสอบโดยการใช้อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ (Mussen, 2011)

1. การตรวจสอบโรคโนซิมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อโนซิมาเบื้องต้น สามารถทำได้โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวนด์ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ค่อนข้างไม่มีความแม่นยำในการบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อโนซิมาทั้งสองชนิดนี้ (Bourgeois *et al.*, 2010) เนื่องจากเชื้อโนซิมาไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า จึงต้องตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 – 1000 เท่า ทำให้สามารถมองเห็นสปอร์ของโนซิมาได้อย่างชัดเจน (Cushman, 2006) ซึ่งมีรายงานว่าขนาดของสปอร์ของเชื้อโนซิมา 2 ชนิด มีความใกล้เคียงกัน โดยสปอร์ของโนซิมาชนิด *N. ceranae* มีความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 2.0 - 2.5 ไมโครเมตร และมีความยาวเฉลี่ย 3.9 - 5.3 ไมโครเมตร (Chen *et al.*, 2009) ส่วนชนิด *N. apis* มีความกว้างประมาณ 3 - 4 ไมโครเมตร และมีความยาวประมาณ 5 - 7 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* เพียงเล็กน้อย (OIE, 2008) สปอร์ของเชื้อโนซิมามีรูปร่างคล้ายไส้กรอก หรือเมล็ดข้าว (Cushman, 2006) อย่างไรก็ตามสปอร์ของเชื้อชนิด *N. apis* จะมีรูปร่างกลมกว่าสปอร์ของ *N. ceranae* (Chen *et al.*, 2009) (ภาพที่ 10)

การจำแนกชนิดโนซิมาในสิ่งได้รับการดำเนินการแบบดั้งเดิม ทำได้โดยการตรวจสอบสปอร์ด้วย light microscope ซึ่งวิธีการนี้เป็นเรื่องยากในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ (Chen *et al.*, 2013) นอกจากนี้การใช้ transmission electron microscopy (TEM) เป็นวิธีการใช้นับ polar filament coils ของสปอร์โนซิมาสองชนิดนี้ (Chen *et al.*, 2009; Fries, 2010) แต่ปัจจุบันมีการใช้ standard duplex (Martin-Hernandez *et al.*, 2007) และ real-time PCR

(Bourgeois *et al.*, 2010) ใช้ตรวจสอบการพัฒนาเชื้อโนซิมา *N. apis* และ *N. ceranae* อย่างไรก็ดี ตาม เทคนิคเหล่านี้จะค่อนข้างช้าหรือต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ และจำเป็นต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการเท่านั้น



ภาพที่ 10 รูปร่างของสปอร์โนซิมาทั้งชนิด *N. ceranae* และ ชนิด *N. apis* แต่การจำแนกรูปร่างต้องอาศัยความชำนาญในการวิเคราะห์ (Oliver, 2012)

2. การตรวจสอบด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)

การวินิจฉัยโรคโนซิมาในอดีต สามารถตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้นับปริมาณสปอร์ของเชื้อได้ แต่ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อสาเหตุทั้งสองในลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Fries *et al.*, 2006) ยิ่งไปกว่านั้นการวิเคราะห์เชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่สามารถตรวจสอบการก่อโรคได้ และใช้ระยะเวลานานในการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ (Mollah *et al.*, 2010) ในทางตรงข้ามการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อโนซิมา แต่ไม่สามารถทราบถึงปริมาณจำนวนสปอร์ของเชื้อได้ (Higes *et al.*, 2006; Martin-Hernandez *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008) การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR สามารถจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ (Higes *et al.*, 2006) และแยกความ

แตกต่างระหว่างชนิดของโนซิมาได้ เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว สะดวก แม่นยำ และเชื่อถือได้ (Fries *et al.*, 2006; Bourgeois, 2010) นอกจากนี้การวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม microsporidia (*N. apis* และ *N. ceranae*) ที่ถูกต้องนั้น จำเป็นต้องอาศัยการศึกษาตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เป็นโรคโนซิมา วิธีการนี้เป็นทางเลือกใหม่ที่มีประโยชน์สำหรับการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุ เพื่อประโยชน์ให้กับผู้เลี้ยงทั่วโลก

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลนั้นมีหลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานวิจัย และศักยภาพของอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่มีในห้องปฏิบัติการ Huang *et al.*, 2013 ทำการศึกษาความต้านทานของเชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* ต่อสารฟุนิซิลิน และทำการเปรียบเทียบระดับความต้านทานกับ *N. apis* และ *N. bombi* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วย Chelex ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะถูกผสมกับ Chelex buffer (5% Chelex, 5% Tween20 และ 1 ng/ml proteinase K) นอกจากนี้บางงานวิจัย เพื่อความสะดวก และรวดเร็ว จึงได้ใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปในการสกัดดีเอ็นเอ เช่น การตรวจสอบการติดเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* ในผึ้งงาน และผึ้งแม่รัง (*A. mellifera*) โดยทำการวิเคราะห์การติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR ได้ใช้ชุดสำเร็จสกัดดีเอ็นเอ จากผลิตภัณฑ์ Wizard® Genomic DNA Purification Kit บริษัท Promega ในเมืองแมดิสัน ของรัฐวิสคอนซิน ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพ และความเร็วของงานวิจัย ขณะที่ Nabian *et al.* (2011) ได้ใช้ชุดสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ (Pure PCR template preparation kit: catalog no. 1796828; Roche Diagnostic) ในการตรวจสอบโนซิมาชนิด *N. ceranae* ในผึ้งพันธุ์ ซึ่งเป็นการตรวจสอบเชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* ในพื้นที่ประเทศอิหร่านเป็นครั้งแรก ขณะที่หลายงานวิจัยได้คิดค้น และดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย เพื่อความเร็ว และประหยัดทุนวิจัย เช่น งานวิจัยของ Mollah *et al.* (2010) ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีการใช้ชุดสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ (spore germination extraction kit method) กับดัดแปลงวิธีสกัดดีเอ็นเอจากวิธีของ Hawke's Bay Regional Council (HBRC) โดยทำการนำเอาส่วน

ท้องของผึ้งที่ติดเชื้อโนซีมาเพียง 1 ตัว มาทำการชะล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของ hexadecyltrimethyl ammonium bromide ที่ความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ trishydroxymethyl aminomethane ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ethylenediamine tetra-acetic acid เข้มข้น 0.01 โมลาร์ และ NaCl, ใน dd H₂O ที่ความเข้มข้น 1.1 โมลาร์ จากนั้นจะถูกไทเทรตกับบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ผสมกับสารละลาย Proteinase K (20 mg/mL) ในปริมาณ 4 ไมโครลิตร โดยทำการบดให้ละเอียด จากนั้นย้ายชิ้นส่วนที่ได้จากการบดลงสู่ microcentrifuge tube เพื่อนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้ตัวอย่างเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับสกัดดีเอ็นเอ หรือนำไปปฏิบัติตามขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอทันที จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่ถูกสกัดจาก HBRC สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนกว่าวิธีการใช้ชุดสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ โดยเทียบจากความชัดของ PCR product และมีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบจากประสบการณ์ในการปฏิบัติงานจริง โดยคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายของวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี HBRC ยังถูกกว่าวิธีการใช้ชุดสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ

2.2 ไพโรเมอร์

ไพโรเมอร์ที่ใช้ในกระบวนการ PCR มีนักวิจัยหลายคนได้รายงานไว้ เช่น Webster *et al.* (2004) ได้ศึกษาการติดโรคโนซีมาชนิด *N. apis* ในผึ้งงาน และผึ้งแม่รัง เพื่อเปรียบเทียบความไวในการติดโรคโนซีมาชนิด *N. apis* ระหว่างผึ้งงาน กับผึ้งแม่รัง โดยใช้ไพโรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของโนซีมาชนิด *N. apis* ได้แก่ Primers NosA-F (5'- CCG ACG ATG TGA TAT GAG ATG -3') และ Primers NosA-R (5'- CAC TAT TAT CAT CCT CAG ATC ATA -3') ซึ่งปรากฏขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอเท่ากับ 209 คู่เบส

ขณะที่ Gisder *et al.* (2010) ได้ศึกษาการจำแนกชนิด และหาความรุนแรง เพื่อหาลักษณะเฉพาะของชนิดโนซีมาที่เข้าทำลายผึ้งพันธุ์ ในประเทศเยอรมันนี โดยใช้เทคนิค

PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) ใช้ไพรเมอร์ nos-16S-fw (5'-CGTAGACGCT ATTCCCTAA GATT-3') แสดงแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 422 - 444 คู่เบส ส่วน nos-16S-rv (5'-CTCCCAACTA TACAG TACACCTCATA-3' แสดงแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 884 - 909 คู่เบส

สำหรับการใช้เทคนิค multiplex PCR เพื่อวินิจฉัย และบอกปริมาณการติดเชื้อโรคโนซิมาในผึ้งพันธุ์มีความไว รวดเร็ว ประหยัด ง่าย และน่าเชื่อถือกว่าวิธี standard PCR-based ใช้ตรวจสอบโนซิมาในห้องปฏิบัติการ กรณีที่ไม่สามารถใช้วิธี real-time PCR ได้ แต่อย่างไรก็ตาม real-time PCR ยังมีประสิทธิภาพสูงกว่า ซึ่ง Bourgeois *et al.* (2010) อธิบายว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค real-time PCR มีศักยภาพในการตรวจสอบโรคโนซิมาได้ในระดับต่ำที่สุดเท่ากับ 1 สปอร์ต่อผึ้ง 1 ตัว

สำหรับในงานวิจัยครั้งนี้ได้ตรวจสอบความชุกของโรคโนซิมาในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน และจังหวัดแพร่ ใช้ไพรเมอร์ 218 MITOC มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิด *N. ceranae* (218MITOC FOR 5'-CGGCGACGATGTATTATGAAA-ATATTTAA-3') และ (218 MITOC REV 5'-CCCGGTCATTCTCAAAA-AACCG-3' สำหรับผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ จะมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 218-219 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ 321 APIS มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิด *N. apis* (321APIS FOR 5'-G GGGGCATATC TTTGACGTACTATGTA-3' และ (321APIS REV 5'-GGGGGGCGTTTAAATGT AAACAAACAACACTAT-3') โดยปรากฏขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 321 คู่เบส ถูกออกแบบมาจาก GenBank; (<http://www.ncbi.nih.gov>)

งานวิจัยของ Ptaszynska *et al.* (2014) ได้ตรวจสอบโรคโนซิมาในผึ้ง โดยใช้วิธี loop-mediated isothermal amplifications (LAMP) ซึ่งเป้าหมายของการศึกษาครั้งนี้ คือการพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อแบบใหม่ เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว โดยใช้อุปกรณ์ตรวจสอบที่สามารถเคลื่อนย้ายสะดวก สำหรับหาความแตกต่างชนิดของโนซิมาในล้านเลี้ยงผึ้ง ซึ่งพบที่มีความรวดเร็วในการตรวจสอบมีมากถึง 10^3 เท่า และเร็วกว่าการทำ PCR ขึ้นต้น (standard PCR) ซึ่งเหมาะกับประเทศที่มีทุนวิจัยน้อย มีรายงานว่า LAMP เป็นวิธีที่ถูกพัฒนานำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดโนซิมา ซึ่งมีความสามารถในการระบุชนิด

และบอกความแตกต่างระหว่างชนิด *N. apis* และ *N. ceranae* การตรวจสอบเชื้อด้วย loop-mediated isothermal amplification (LAMP) มีประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก (Notomi *et al.*, 2000) โดยมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างรวดเร็ว LAMP มีความไวในการคัดลอกยีน มากถึง 10^9 เท่า ภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที เนื่องจากมีความรวดเร็ว และใช้ช่วงเวลาสั้น ๆ ในการตรวจชนิดของเชื้อ ตลอดจนถึงเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส โปรโตซัว และเชื้อรา นอกจากนี้ LAMP สามารถใช้ระบุชนิดของเชื้อโนซีมา และสามารถใช้กับสภาพพื้นที่ที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนา (Ptaszynska *et al.*, 2014)

2.3 ปฏิกริยา PCR

ปฏิกริยา PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็น ดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้มีดังนี้

Deoxynucleotides (dNTPs)	นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
DNA polymerase	เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ มีหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกริยาเชื่อมต่อกับ นิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
Primer	เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ การทำ PCR จึงจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน เพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ
PCR buffer	เป็นสารละลายที่ใช้ควบคุมสถานะของการทำปฏิกริยาให้เหมาะสม เช่น pH และ เกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย
Template DNA	เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ หรือชิ้นส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ

จากการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละสองสายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์หนึ่งคู่ ปฏิกริยามี 3 ขั้นตอน และต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ก่อนปฏิบัติต้องทำการอุ่นเครื่องก่อนทำ (preheat) อุณหภูมิต้องมากกว่า 90 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที จากนั้นสามารถทำ ขั้นตอนแรก (denaturing) ถึงขั้นตอนสุดท้ายดังนี้

ขั้นตอนแรก เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 92 – 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง และจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสมสำหรับการจับกันระหว่าง primer ซึ่งเป็น DNA สายสั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะกับบริเวณของ DNA ที่ต้องการทำการศึกษา กับ DNA สายเดี่ยว (primer annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ตามข้อมูลของดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase กล่าวคือ เป็นการเติมเอนไซม์ลงไป และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้เกิดการสร้าง DNA ทดลองสามารถเพิ่มปริมาณ DNA เฉพาะสายมีความยาว 110 คู่เบสได้ ปริมาณเพิ่มขึ้นจากเดิม 220,000 เท่า ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เอนไซม์ DNA polymerase ที่ดีควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

ก่อนสิ้นสุดการทำ PCR จะมีการปรับอุณหภูมิอีกครั้ง โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที สุดท้ายให้ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้หยุดอยู่กับที่ หรือเป็นการพักอุณหภูมิ (Pause) โดยทั้งสามขั้นตอน จะนับเป็นหนึ่งรอบ (One cycle) ให้ผลผลิตดีเอ็นเอสายคู่ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็น

สองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ จากขั้นตอนที่ 1-3 หมุนเวียนไปอีกหลายรอบ จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้มากมาย เช่น ปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า จากสมการ 2^n เมื่อ n แทนจำนวนรอบ (บุญญานาถ, 2013)

2.4 การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เป็นวิธีการสำคัญในการแยกโปรตีน ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ โดยขนาดโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกถูกแยกออกจากกัน ด้วยการทำงานของสนามไฟฟ้าจากโมเลกุลประจุลบไปยังประจุบวก โดยการเคลื่อนย้ายโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ซึ่งนิยามไว้ว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งใช้บอกความแตกต่างของกรดนิวคลีอิก และชนิดโปรตีนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ทั่วไปมักใช้ ethidium bromide หรือ SYBR Green ลงใน agarose gels เพื่อใช้ย้อม (Yilmaz *et al.*, 2012)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Webster *et al.* (2004) ได้เปรียบเทียบความไวในการติดเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* ระหว่างผึ้งงาน กับผึ้งแม่รัง โดยให้ผึ้งงาน และผึ้งแม่รังจะถูกป้อนอาหารที่มีเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* ผสมอยู่กับสารละลายซูโครส และนำไปเลี้ยงในกรงบรรจุผึ้ง หลังจาก 3-7 วันก็นำมาป้อนอาหารที่ผสมเชื้อโนซิมาอีกครั้ง จากนั้นนำเอาลำไส้ผึ้งงาน และผึ้งแม่รังที่มีเชื้ออยู่มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำไปสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอของโนซิมาชนิด *N. apis* ทั้งนี้การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ให้ผลเร็วกว่า การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลการตรวจสอบพบว่าการติดเชื้อโนซิมาชนิด *N. apis* ได้ทั้งผึ้งงาน และผึ้งแม่รัง สำหรับผึ้งแม่รัง พบการติดเชื้อมากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ผึ้งงานพบการติดเชื้อ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างผึ้ง 2 วรรณะนี้ ($X^2=0.65$) แสดงว่าเชื้อ *N. apis* มีความไวในการเข้าทำลายผึ้งทั้ง 2 วรรณะได้ใกล้เคียงกัน ต่อมา Bourgeois *et al.* (2010) ได้ตรวจสอบอุบัติการณ์ของโรคโนซิมาในประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้เทคนิค PCR แบบ Real-time PCR

เปรียบเทียบกับ การนับจำนวนสปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 2008 ถึง เดือนมีนาคม ปี ค.ศ. 2009 ผลการตรวจสอบพบการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากรผึ้งอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากข้อจำกัดในการสุ่มตัวอย่าง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่มประชากรในพื้นที่เลี้ยงผึ้ง 5 กลุ่มตัวอย่าง เป็นตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน พบปริมาณสปอร์ของ *N. apis* เท่ากับ 1212 ± 148 สปอร์ต่อตัว ขณะที่เชื้อชนิด *N. ceranae* พบปริมาณเท่ากับ $51,073 \pm 31,155$ สปอร์ต่อตัว ต่อมาในเดือนเมษายน ไม่พบเชื้อโนซีมาชนิด *N. apis* แต่พบสปอร์ชนิด *N. ceranae* ในปริมาณ $11,824 \pm 6,304$ สปอร์ต่อตัว การเปลี่ยนแปลงระดับของเชื้อ *N. ceranae* บางเดือนพบปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้น แต่บางเดือนพบปริมาณน้อยลง ลักษณะการเพิ่มลดปริมาณสปอร์ของเชื้อโนซีมาแสดงถึงความจำเป็นที่ต้องมีการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว วิธีการตรวจสอบความเป็นโรคนี้เป็นการเปิดโอกาสในการศึกษาความต้านทานของโรค และการปรับปรุงแก้ไขในการจัดการโรคในผึ้งได้ ขณะเดียวกัน Chen *et al.* (2009) ได้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเข้าทำลายของเชื้อ *N. ceranae* ในส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะภายในของผึ้ง โดยใช้วิธีชีวโมเลกุล Polymerase chain reaction (PCR) โดยพบว่าสปอร์มีขนาด $4.4 - 2.2$ ไมโครเมตร มี coils of the polar filament ภายในสปอร์โนซีมาจำนวน 18 – 21 หลังจากได้ตรวจสอบการติดเชื้อโดย PCR พบว่านอกจากจะเข้าทำลายในลำไส้ส่วนกลาง แล้วยังพบการเข้าทำลายของเชื้อ *N. ceranae* ในต่อม hypopharyngeal ต่อมน้ำลาย Malpighian tubules และ fat body นอกจากนี้พบว่าสายวิวัฒนาการของ *N. ceranae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Nosema vespula* มากกว่า *N. apis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เข้าทำลายผึ้งเช่นเดียวกัน ขณะที่ Invernizzi *et al.* (2009) ได้ตรวจสอบความชุกในการแพร่กระจายของโรคโนซีมาชนิด *N. ceranae* ที่ก่อโรคในผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ในประเทศอูรุกวัย โดยใช้วิธี PCR-RFLP diagnosis เป็นตัวอย่างของปี ค.ศ. 1990 จำนวน 1 ตัวอย่าง ปี 2004 จำนวน 2 ตัวอย่าง และในปี ค.ศ. 2007 -2008 จำนวน 26 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 29 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อชนิด *N. ceranae* ทั้งหมด ที่เข้าทำลายในผึ้งพันธุ์ ต่อมา Forsgren and Fries (2010) ได้ทำการเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อโนซีมาทั้งสองชนิด (*N. ceranae* และ *N. apis*) การตรวจสอบด้วยเทคนิค qPCR พบว่า อัตราการตายที่ผึ้งติดเชื้อโนซีมาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันมากนัก โดยผึ้งที่ติดเชื้อ *N. ceranae* จะมีอัตราการตายไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับผึ้งที่ติดเชื้อ *N. apis* ในปีเดียวกัน Gisder *et al.* (2010) ได้ศึกษาอัตราการติดเชื้อของโนซีมา *N. ceranae* และ *N. apis* เป็นระยะเวลา 5 ปี ในประเทศเยอรมนี ทั้งหมด 220 ฟาร์ม ได้ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 1,997 ตัวอย่าง โดยตรวจสอบ

ด้วยวิธี PCR แบบ restriction fragment length polymorphism (RFLP) จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายของกลุ่มประชากรผึ้ง ระดับที่ตรวจพบการติดเชื้อทั้งสองชนิด และพบว่า *N. apis* ยังคงแพร่กระจายมากกว่าเชื้อ *N. ceranae* อยู่ในกลุ่มประชากรผึ้ง เนื่องจากปัจจัยทางภูมิอากาศที่จำกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เชื้อชนิด *N. ceranae* มีการชะลอการงอกของ polar filament และอ่อนต่ออุณหภูมิต่ำ ต่อมาผลการตรวจสอบของ Nabian *et al.* (2011) ได้ตรวจสอบเชื้อ *N. ceranae* ที่เข้าทำลายผึ้งพันธุ์ ในลานเลี้ยงผึ้ง ประเทศอิหร่านเป็นครั้งแรกโดยตรวจสอบด้วยวิธี PCR จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างที่ตรวจสอบทั้งหมดเป็นเชื้อ *N. ceranae* แสดงให้เห็นว่าในประเทศอิหร่านเกิดการระบาดของเชื้อ *N. ceranae* ขณะทำงานวิจัยของ Yang, 2013 ได้ตรวจสอบโรคโนซีมา โดยใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบชนิด *N. ceranae* และชนิด *N. apis* พบว่าเป็นชนิด *N. ceranae* 70 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบในผึ้ง (*A. c. cerana*) โดยไม่พบเชื้อ *N. apis* นอกจากนี้ยังพบเชื้อชนิด *N. ceranae* ติดเชื้อในผึ้งชนิด *A. c. cerana* และชนิด *A. m. ligustica* นอกจากนี้นงานวิจัยของ Ptaszynska *et al.* (2014) ได้ตรวจสอบโรคโนซีมาในผึ้ง พบการติดเชื้อชนิด *N. ceranae* และ *N. apis* ในตัวอย่างผึ้งเดียวกัน (Co-infection) โดยการตรวจสอบด้วยวิธี loop-mediated isothermal amplifications (LAMP)