

ประกาศคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ :

การชั้นสูตรโรคอเมริกันฟาล์บรูคในผึ้ง

พ.ศ. ๒๕๕๐

ด้วยคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ในการประชุมครั้งที่ ๒/๒๕๕๐ เมื่อวันที่ ๒๘ สิงหาคม ๒๕๕๐ มีมติเห็นชอบให้กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรคอเมริกันฟาล์บรูคในผึ้ง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพ การอำนวยความสะดวกทางการค้า และการคุ้มครองผู้บริโภค

ดังนั้น อาศัยอำนาจของคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งแต่งตั้งโดยมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ ๓ เมษายน ๒๕๕๐ จึงออกประกาศกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ เรื่อง การชั้นสูตรโรคอเมริกันฟาล์บรูคในผึ้ง ไว้เป็นมาตรฐานสมัครใจ ดังมีรายละเอียดแนบท้ายประกาศนี้

ประกาศ ณ วันที่ ๒๖ กันยายน พ.ศ. ๒๕๕๐

ธีระ สูตะบุตร

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ประธานคณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ การชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูตในผึ้ง

1 ขอบข่าย

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ กำหนดรายละเอียดที่สำคัญเกี่ยวกับการชันสูตรโรคอเมริกันฟาวล์บรูตในผึ้งทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ วิธีตรวจหาสปอร์ของแบคทีเรีย วิธีโฮสต์ มิลค์ เทสต์ (Holst milk test) วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน และวิธีปฏิบัติห้วงโซ่พอลิเมอเรส

2 นิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาตินี้ มีดังต่อไปนี้

- ผึ้ง (honey bee) หมายถึง ผึ้งที่เลี้ยงเพื่อผลิตน้ำผึ้ง ซึ่งมีอยู่สองชนิดในประเทศไทย คือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และผึ้งพันธุ์ยุโรป (*Apis mellifera*) แต่ในมาตรฐานนี้จะหมายความถึงผึ้งพันธุ์ยุโรปเท่านั้น
- โรคอเมริกันฟาวล์บรูต (American foulbrood) หมายถึง โรคระบาดในตัวอ่อนผึ้งระยะที่เป็นหนอนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae larvae* (*P.l. larvae*)
- ตัวอ่อนผึ้ง (bee brood) หมายถึง ไข่ หนอน และดักแด้ในรังผึ้ง
- ไขผึ้ง (beeswax) หมายถึง สารที่ผึ้งงานผลิตออกมาจากต่อมไขผึ้ง (wax glands) ในการสร้างรวงผึ้ง
- หลอดรวงผึ้ง (cell) หมายถึง ช่องรูปหกเหลี่ยมด้านเท่า ซึ่งหลายๆ หลอดรวงผึ้ง จะประกอบกันเป็นรวงผึ้ง
- รังผึ้ง (bee colony) หมายถึง ผึ้ง 1 รัง ซึ่งประกอบด้วย ผึ้งนางพญา ผึ้งงาน ผึ้งตัวผู้ รวงตัวอ่อนผึ้งและรวงอาหาร
- น้ำผึ้ง (honey) หมายถึง ของเหลว ชัน รสหวาน ซึ่งผึ้งผลิตขึ้นจากน้ำหวานของดอกไม้ หรือจากส่วนใดส่วนหนึ่งของต้นไม้อ หรือผลิตจากของเหลว (honey dew) ที่ขับออกมาจากแมลงวงศ์ Homoptera แล้วสะสมไว้ในรังผึ้ง
- 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 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

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

เมื่อได้ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการแล้ว ให้สัตวแพทย์หรือผู้เชี่ยวชาญทางด้านการศึกษาผึ้ง เป็นผู้พิจารณาประวัติ วิทยาการระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคคอแมริกันฟาล์บรูตร่วมด้วยตามรายละเอียดในภาคผนวก ก เพื่อให้การรักษาและป้องกันโรคเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 เก็บตัวอย่างรวงผึ้ง โดยเลือกรวงที่มีตัวอ่อนผึ้งเน่าตายอยู่เป็นจำนวนมากเท่าที่จะมากได้ ขนาดรวงประมาณ 20 cm² และไม่ควรมีน้ำผึ้งปนในตัวอย่างรวงผึ้ง ใส่ตัวอย่างในภาชนะปิดสนิท แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการโดยเร็ว

3.1.2 ถ้าไม่สามารถส่งตัวอย่างรวงผึ้งได้ ให้ส่งไม้ที่ใช้ตรวจหลอดรวงผึ้งแทนได้ เนื่องจากอาจมีเชื้อก่อโรคติดมากพอกับการชันสูตร

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

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

3.1.5 ตัดฉลากตัวอย่างโดยต้องมีข้อความที่อ่านได้ชัดเจนไม่ลอกหลุด และแสดงรายละเอียด ดังนี้ ประเภทตัวอย่าง ชื่อฟาร์ม เลขที่รัง สถานที่ วันที่เก็บตัวอย่างส่งตรวจ และผู้เก็บตัวอย่าง

3.2 วิธีทดสอบเพื่อคัดกรองโรคหรือวิธีทดสอบแบบรวดเร็ว

3.2.1 วิธีทางพยาธิวิทยา

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโดยการตรวจหารอยโรคจากหลอดรวงผึ้ง หากเป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูตจะพบตัวอ่อนผึ้งที่ตายมีสีเข้มกว่าปกติ ยุบตัวราบติดผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง และเมื่อเน่าสลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำ บางกรณีอาจตรวจหาตัวอ่อนผึ้งที่ตายในรวงผึ้งยาก แนะนำให้ใช้แสงอุลตราไวโอเล็ต หรือแสงที่มีช่วงคลื่นแสงใกล้อุลตราไวโอเล็ต (310 nm ถึง 400 nm) ช่วยในการตรวจหาตัวอ่อนผึ้งที่แห้งตาย หรือชิ้นส่วนของตัวอ่อนที่แห้งติดหลอดรวงผึ้ง (scale) ด้วยโรคอเมริกันฟาวล์บรูต โดยหากเป็นโรคอเมริกันฟาวล์บรูต ตัวอ่อนผึ้งจะเรืองแสงภายใต้ช่วงแสงดังกล่าว อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องตรวจสอบอย่างรอบคอบ เนื่องจากน้ำผึ้งและเกสรผึ้งจะทำให้เกิดการเรืองแสงได้เช่นกัน

3.2.2 วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบโดยตรวจดูสัณฐานวิทยา (morphology) ของ *P. I. larvae* ใช้เป็นวิธีตรวจแยกโรคอเมริกันฟาวล์บรูตออกจากโรคตัวอ่อนผึ้งเน่าที่เกิดจากสาเหตุอื่น แต่เนื่องจากวิธีนี้มีความจำเพาะต่ำ จึงใช้เป็นการชันสูตรโรคแบบรวดเร็วเท่านั้น

- (1) หยดน้ำกลั่น 2 หยดลงบนตัวอ่อนผึ้งที่ตาย และเปียกไปมาในน้ำ
- (2) ใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) นำของเหลวจากข้อ (1) และเกลี่ยหยดน้ำบนกระจกสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ
- (3) ตั้งกระจกสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง แล้วลนกระจกสไลด์ด้วยเปลวไฟ เพื่อทำให้ตัวอย่างติดบนกระจกสไลด์ (heat fix)
- (4) ย้อมตัวอย่างที่ติดบนกระจกสไลด์ด้วยสี carbol fuchsin นาน 30 s หรือย้อมด้วยสีย้อมสปอร์ชนิดอื่น ๆ
- (5) ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง
- (6) หยดน้ำมัน (immersion oil) ลงบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปตรวจดูแบบที่เรียกว่าโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (light microscope) ที่กำลังขยายอย่างน้อย 1 000 เท่า

- (7) การแปลผล หากตัวอย่างที่ตรวจเป็นโรคมะเร็งอเมริกันฟาล์บรูต จะเห็นสปอร์ของ *P. l. larvae* เป็นลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ $1.3 \mu\text{m} \times 0.6 \mu\text{m}$ ถ้าติดเชื้อในช่วง 10 วันแรก จะเห็นเซลล์ของแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นแท่งยาว (vegetative form) ถ้าย้อมเชื้อนี้ด้วยสีแกรม (Gram's stain) จะเห็นแบคทีเรียเป็นแท่งยาวติดสีน้ำเงินม่วง

3.2.3 การตรวจสอบสปอร์แบคทีเรียก่อโรคจากน้ำผึ้ง

- (1) นำตัวอย่างน้ำผึ้ง 25 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45°C ถึง 50°C เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 25 ml แล้วเขย่าให้สปอร์ที่ปนอยู่ในน้ำผึ้งกระจายทั่วหลอด
- (2) นำน้ำผึ้งที่เจือจางแล้วใส่ใน dialysis tube ขนาด 44 mm และจุ่ม dialysis tube ในภาชนะที่มีน้ำไหลผ่านนาน 18 h หรือแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C นาน 18 h โดยต้องเปลี่ยนน้ำในอ่างประมาณ 3 ครั้ง นำตัวอย่างใน dialysis tube มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2 000 g นาน 20 min
- (3) ในกรณีที่ไม้ได้ใช้ขั้นตอน dialysis ให้นำน้ำผึ้งปั่นตกตะกอนที่ 3 000 g นาน 30 min
- (4) นำตะกอนมาผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 จนมีปริมาณ 10 ml บ่มที่อุณหภูมิ 80°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 $3 \mu\text{g/ml}$ (nalidixic acid มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Paenibacillus alvei* (*P. alvei*))
- (6) การแปลผล ตรวจสอบรูปร่างและสีสปอร์ของเชื้อ หากตัวอย่างที่ตรวจมีเชื้อโรคมะเร็งอเมริกันฟาล์บรูต จะเห็นโคโลนีของการเจริญของแบคทีเรียมีลักษณะ สีขาวครีม ทึบแสง ขนาดประมาณ 1 mm ถึง 3 mm ภายหลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 34°C ถึง 37°C เป็นเวลา 2 วัน ถึง 4 วัน ถ้าย้อมเชื้อนี้ด้วยสีแกรม จะเห็นแบคทีเรียเป็นแท่งยาวติดสีน้ำเงินม่วง

3.2.4 วิธีโฮสต์ มิลค์ เทสต์ (Holst milk test)

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบหาเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (protease) โดย *P. l. larvae* จะสร้างขึ้นเมื่อเป็นสปอร์ การทดสอบทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำผึ้งสดหรือซากที่แห้งติดหลอดตรวจผึ้ง ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย skim milk 1% ปริมาณ 1 ml ถึง 4 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ถ้ามีเชื้อ *P. l. larvae* ผสมอยู่ จะเปลี่ยนสารละลายจากขุ่นเป็นใสในเวลา 10 min ถึง 20 min

3.3 วิธีทดสอบเพื่อยืนยันโรค

3.3.1 วิธีทางวิทยาแบคทีเรีย

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบแบคทีเรียก่อโรคจากตัวอย่างรังผึ้ง ประกอบด้วย ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) จากตัวอย่าง การเพาะเชื้อต่อ (subculture) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ บลัด อาการ์ (blood agar), เจ-มีเดียม (J-medium) หรืออาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ 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 °C นาน 10 min เพื่อทำลายแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์
- (2) กรณีตัวอย่างเป็นน้ำผึ้งและรอยัลเยลลี่ ให้ปั่นเหวี่ยงและแยกน้ำออกจากน้ำผึ้งหรือรอยัลเยลลี่ก่อน ซึ่งจะช่วยให้ได้สปอร์ของแบคทีเรียมากขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบ หรือถ้าเป็นไขผึ้งอาจสกัดด้วยคลอโรฟอร์มก่อนนำไปเพาะเชื้อ
- (3) กรณีเป็นเกสรผึ้ง ให้นำตัวอย่างมาผสมกับน้ำกลั่น แล้วกรองสารละลายเกสรผึ้งด้วยกระดาษกรอง ก่อนนำไปเพาะเชื้อ
- (4) ใช้สำลีพันปลายไม้หรือหวงเย็บเชื้อ จุ่มตัวอย่างจากข้อ (1) ป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar หรือ J-medium และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34 °C ถึง 37 °C นาน 2 วัน ถึง 4 วัน
- (5) การแปลผล หากพบแบคทีเรียเป็นโคโลนีขนาดเล็กทึบแสง ให้นำไปทดสอบยืนยันว่าเป็น *P. l. larvae* ด้วยวิธีทางชีวเคมีต่อไป

3.3.1.2 การทดสอบทางชีวเคมี

เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อก่อโรค (*P. l. larvae*) กับแบคทีเรียที่สร้างสปอร์อื่นๆ 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 การทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียจากคาร์โบไฮเดรต (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) เติสารละลายไอโอดีนให้ท่วมอาหารเลี้ยงเชื้อ 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 °C ให้เทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- (2) นำแบคทีเรียที่สงสัยที่มีอายุ 24 h มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 7 วัน
- (3) การแปลผล กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะเห็นวงใสบริเวณด้านล่างและรอบๆ โคโลนี เนื่องจาก *P. l. larvae* ย่อยสลายเคซีน

3.3.1.2.6 การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization)

- (1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทดสอบนี้ โดยเตรียมอาหาร J-medium ที่ไม่มีน้ำตาล กลูโคส แต่เติมโซเดียมซิเตรท 2 g แทน แล้วทำให้ปลอดเชื้อ
- (2) นำแบคทีเรียที่สงสัยที่มีอายุ 3 วัน ถึง 4 วัน มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °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 °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 °C และตรวจดูการสลายตัวของเจลาติน ทุกๆ 3 วัน นาน 4 สัปดาห์ โดยก่อนอ่านผลทุกครั้ง นำหลอดทดลองไปไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C นาน 4 h
- (3) การแปลผล กรณีที่เป็นเชื้อ *P. l. larvae* จะพบเจลาตินมีลักษณะเหลวกว่าปกติ เนื่องจาก *P. l. larvae* ย่อยเจลาตินได้

หมายเหตุ สามารถใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปอื่นๆ ที่ได้รับการยอมรับ แทนวิธีข้างต้นได้

3.3.2 วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

หลักการของวิธีนี้ คือ การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *P. l. larvae* ส่วนใหญ่ใช้ polyclonal rabbit serum ได้แก่ วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน¹ (immunodiffusion test) วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence antibody test; IFA) แต่การชันสูตรโรคด้วยวิธี IFA มักให้ผลคลาดเคลื่อน เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อที่ไม่ก่อโรค เช่น *P. alvei*

นอกจากนี้วิธีอีไลซา² (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 วิธีปฏิบัติห้วงโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

หลักการของวิธีนี้ คือ การตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ *P. l. larvae* 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 MgCl₂ 2 mmol/l และไพรเมอร์ (ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ในตารางที่ 1) จำนวน 50 pmol/µl, 25 mmol/l ของ dNTP³ และ 1 U/ µl ถึง 1.25 U/ µl ของ Taq polymerase
- (2) ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง thermocycler ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ	95 °C	นาน 1 min ถึง 15 min
ขั้นที่ 2 บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ	93 °C	นาน 1 min
	55 °C	นาน 30 s
	72 °C	นาน 1 min

ทำขั้นที่ 2 ซ้ำ เป็นจำนวน 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 เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

ตารางที่ 1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบโรคอเมริกันฟาวล์บรูต

ทิศทาง (direction)	ลำดับเบส (sequence)	ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ จาก PCR (PCR-product size)	ระดับ ความจำเพาะ (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 ตามขนาดโพรเมอร์ที่ใช้ในตารางที่ 1

ภาคผนวก ก

วิทยาทางระบาด พยาธิกำเนิด และอาการของโรคอเมริกันฟาวล์บรูต

(ข้อ 3)

ก.1 วิทยาทางระบาด

โรคอเมริกันฟาวล์บรูตหรือเรียกว่าโรคตัวอ่อนผึ้งเน่าอเมริกัน 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 รวมทั้งทำความสะอาดอุปกรณ์เลี้ยงผึ้งต่างๆ อย่างมีประสิทธิภาพ

ด้วยเหตุที่โรคอเมริกันฟาวล์บรูตสามารถพบได้ในแหล่งที่มีการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก 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* หรือจากสปอร์ที่ค้างอยู่ในหลอดรวงผึ้งเดิม ถึงแม้ว่าตัวอ่อนของผึ้งนางพญา ผึ้งงาน และผึ้งตัวผู้จะไวต่อการเป็นโรค แต่ในธรรมชาติมักพบตัวอ่อนของผึ้งงานติดเชื้อเป็นส่วนใหญ่ การไวต่อโรคอเมริกันฟาวล์บรูตของตัวอ่อนผึ้งจะลดลงตามอายุของตัวอ่อนผึ้งที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การแพร่เชื้อในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งอาจเกิดจากการแลกเปลี่ยนรวงผึ้งระหว่างรังผึ้ง การรวมรังผึ้ง การเคลื่อนย้ายรังผึ้งที่เป็นโรค การขโมยน้ำหวานของผึ้ง การใช้แหล่งอาหารและน้ำร่วมกันของผึ้ง การให้อาหารเสริมที่ปนเปื้อนเชื้อ การใช้ผึ้งนางพญาจากรังที่เป็นโรค และการใช้อุปกรณ์เลี้ยงผึ้งที่ปนเปื้อนเชื้อ *P. l. larvae*

ก.3 อาการ

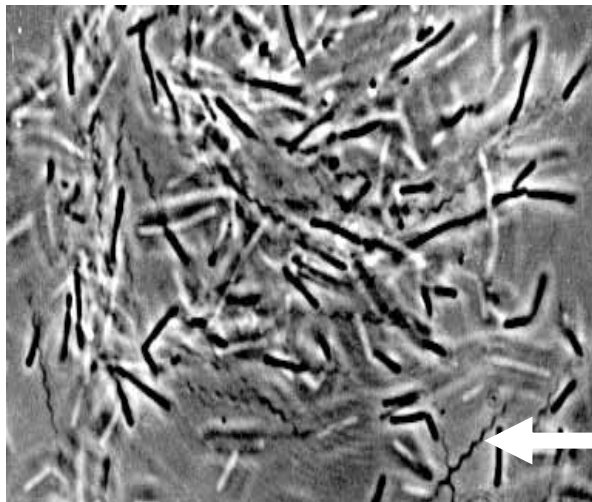
อาการของโรคอเมริกันฟาวล์บรูตสังเกตได้ง่ายจากลักษณะของตัวอ่อนผึ้งที่เน่าตายในรวงผึ้ง เนื่องจาก *P. I. larvae* สร้างเอนไซม์โปรตีเอส (protease) มาย่อยตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนผึ้งตายภายใน 10 วัน ถึง 15 วัน หลังติดเชื้อ ตัวอ่อนผึ้งที่ตายด้วยโรคนี้จะมีสีเข้มกว่าปกติ ยุบตัวราบติดผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง (ภาพที่ ข.4) เมื่อเน่าสลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำ และเห็นฝาปิดหลอดรวงผึ้งมีลักษณะเป็นรูพรุน ทำให้เห็นรวงผึ้งในรังที่ติดเชื้อเป็นจุดต่างดำ เนื่องจากในรังผึ้งนั้นมีหลอดรวงผึ้งที่ไม่เป็นโรคมักการปิดฝาปนกับหลอดรวงผึ้งที่เป็นโรคมักการเกิดรูพรุน อย่างไรก็ตามก็ตีลักษณะเช่นนี้อาจพบในรังผึ้งที่เป็นโรคอื่นๆ ด้วย (ภาพที่ ข.5)

โรคอเมริกันฟาวล์บรูตมักเกิดกับตัวอ่อนผึ้งที่หลอดรวงผึ้งเพิ่งปิดเป็นส่วนใหญ่ โดยฝาปิดหลอดรวงผึ้งจะมีลักษณะบวม สีคล้ำ และมีรูเล็กหลายรู รู รูปร่างไม่แน่นอน เมื่อเปิดฝาปิดจะเห็นตัวอ่อนผึ้งในหลอดรวงผึ้งนอนตายในท่าปกติ คือนอนหงายยาวตามหลอดรวงผึ้ง ในลักษณะหันหัวออก สีของตัวอ่อนเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล และเน่าสลาย มีกลิ่นเหม็น ถ้าใช้ไม้เขี่ยตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวยืดเป็นสายยาว ติดไม้เขี่ยออกมา (ภาพที่ ข.6) ต่อมาตัวอ่อนผึ้งที่เน่าจะยุบตัวแห้งลงในท่าเดิมและกลายเป็นสะเก็ด (scale) ติดแน่นอยู่กับผนังด้านล่างของหลอดรวงผึ้ง และถ้าตัวอ่อนผึ้งนั้นตายในระยะดักแต้ จะเห็นส่วนลิ้น (pupal tongue) ยื่นตั้งขึ้นมาจากสะเก็ดนั้น สะเก็ดดังกล่าวจะมีสปอร์ของ *P. I. larvae* อยู่เป็นจำนวนมาก และติดแน่นกับผนังหลอดรวงผึ้ง โดยผึ้งงานไม่สามารถนำออกไปทิ้งนอกรังได้

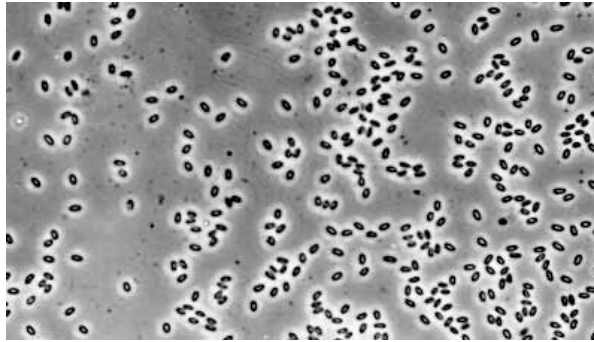
ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการชั้นสูตรโรคอเมริกัณฟาล์บรูต
 (ภาคผนวก ก)



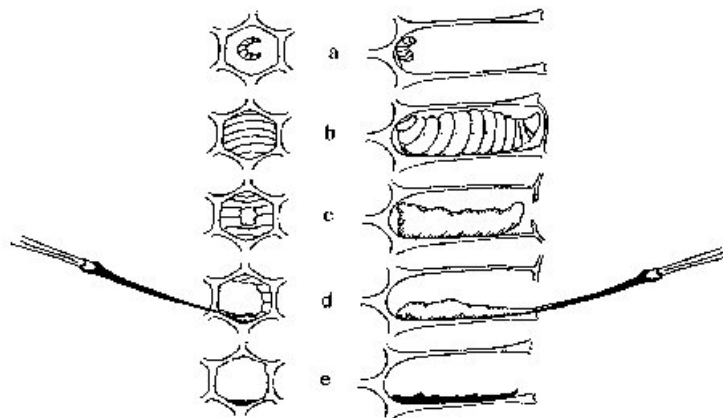
ภาพที่ ข.1 แสดง vegetative cell ของ *P. l. larvae* ย้อมติดสีกรัมเป็นสีน้ำเงิน กำลังขยาย 1 000 เท่า
 ที่มา : นางวันทนี นรมิตมานสุข



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



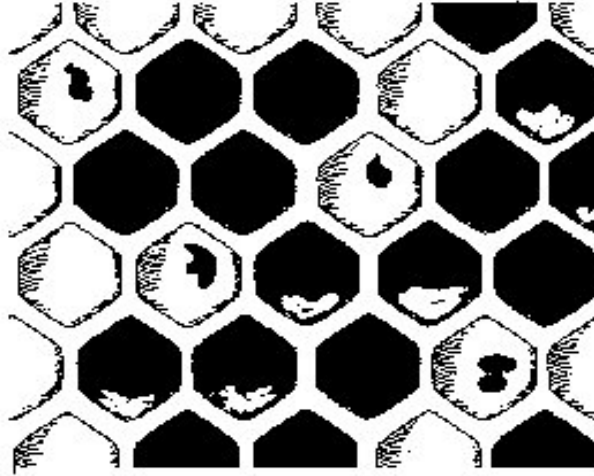
ภาพที่ ข.3 สปอร์ของเชื้ออเมริกันฟาวล์บรูต *P. l. larvae* กำลังขยาย 1 000 เท่า
ที่มา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล



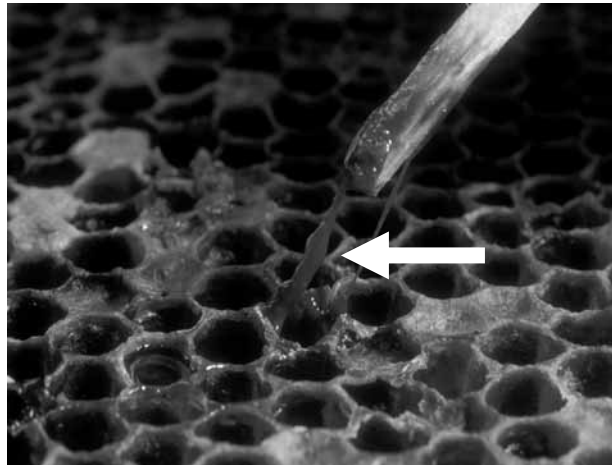
ภาพที่ ข.4 พยาธิกำเนิดของโรคอเมริกันฟาวล์บรูต

- a) หนอนผีเสื้อที่มีการติดเชื้อ
- b) หนอนผีเสื้อเจริญเป็น prepupa
- c) ลักษณะหนอนผีเสื้อจะยุบและฝาปิดตรงจะบวมหรือเป็นรูๆ
- d) หนอนผีเสื้อที่ติดเชื้อจะและเนื่องจากการย่อยสลายของเอนไซม์ที่หลั่งจากแบคทีเรียก่อโรค
- e) หนอนผีเสื้อที่ตายจะแห้งเป็นสะเก็ด (scale) ติดผนังหลอดตรงผีเสื้อด้านล่าง

ที่มา : OIE, 2004



ภาพที่ ข.5 ลักษณะภายนอกของรังผึ้งที่เป็นโรคอเมริกันฟิวส์รูต
ที่มา : OIE, 2004



ภาพที่ ข.6 ตั๊กหนอนที่ติดเชื้อและเน่า จะมีลักษณะเป็นยางเหนียว (ลูกศร) สามารถดึงให้ยาวออกมาได้
ประมาณ 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-medium⁴

tryptone	5	g
yeast extract	15	g
dipotassium hydrogen phosphate [K ₂ HPO ₄]	3	g
agar	20	g
distilled water	1 000	ml

- (1) ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นให้ละลายเข้ากัน ปรับให้ได้ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.3 ถึง 7.5
- (2) ึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 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) ึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 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

สารละลายฟีนอลอิมิตัว

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 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาล์บริด บ่มในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ถึง 10% ที่ 35 °C ถึง 37 °C นาน 4 วัน
- (2) กรณีสกัดดีเอ็นเอจากผึ้งหรือตัวอ่อนผึ้งที่ตาย 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 เนื่องจากว่าค่าแรงเหวี่ยง 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) ผสมให้เข้ากันเซลล์จะแตกโดยสังเกตได้ส่วนที่มีความหนืดและส่วนใสของสารละลายในหลอด

- (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/ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ 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)	μ l
ความยาว	เซนติเมตร (centimeter)	cm
	ไมโครเมตร (micrometer)	μ m
เวลา	ชั่วโมง (hour)	h
	นาที (minute)	min
	วินาที (second)	s
อุณหภูมิ	องศาเซลเซียส (degree Celsius)	$^{\circ}$ 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/ μ l
	ยูนิต/ไมโครลิตร (unit per microliter)	U/ μ l
	มิลลิโมล/ลิตร (millimole per liter)	mmol/l
ค่าแรงเหวี่ยง	แกรวิตี้ (gravity)	<i>g</i>