

ประสิทธิภาพของเทคนิค ELISA ในการตรวจเชื้อ *Nosema bombycis* N. ของไหมหม่อน (*Bombyx mori* L.)

The efficiency of ELISA technique in *Nosema bombycis* N. of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) detection

เดือนเพ็ญ วงศ์สอน (Duanpen Wongsorn)^{1, 3}

สิวลัย สิริมงคลรัตน์ (Sivilai Sirimungkararat)^{2, 3, 4, *}

รชนี สงประยูร (Ratchanee Hongprayoon)⁵

บทคัดย่อ

โรคเพบรินมีเชื้อสาเหตุคือ เชื้อโปรโตซัว *Nosema bombycis* N. จัดเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ไหม (*Bombyx mori* L.) มากที่สุด เนื่องจากเป็นโรคที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ไปยังรุ่นต่อไปได้อย่างต่อเนื่อง จากการสุ่มนำไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลิง” มาศึกษาลักษณะอาการโรคเพบรินในสภาพห้องปฏิบัติการในหนึ่งชั่วรุ่น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ 21.5 – 26 องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ 38 – 91 เปอร์เซ็นต์) ลักษณะอาการที่ตรวจพบสปอร์ของเชื้อในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย มีจำนวน 15 ใน 20 อาการ ซึ่งเมื่อนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast พบจำนวนสปอร์เฉลี่ยเชื้ออยู่ระหว่าง 1.77×10^6 – 2.42×10^8 สปอร์ต่อตัวและมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 2.10 – 2.50×4.13 – 4.57 ไมโครเมตร โดยลักษณะอาการที่พบมากที่สุดคือ หนอนที่มีอาการคล้ายปกติ ซึ่งตรวจพบมีการติดเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation (SDGC) ปรากฏว่าสปอร์ของเชื้อส่วนใหญ่อยู่ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาล 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) สำหรับความเข้มข้นของเชื้อที่ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรนั้นเหมาะสมในการนำมาผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งค่า titer รวมของแอนติเจนที่ 10^1 – 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมีค่าเท่ากับ 1:50 และที่ความเข้มข้นของแอนติเจน 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรมีค่า titer เท่ากับ 1:3,500 นอกจากนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้นี้มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อเชื้อโปรโตซัว *N. bombycis* ไอโซเลตแม่หลิง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อสาเหตุโรคไหมชนิดอื่นๆ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamaris* และ *Metarhizium anisopliae* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* และ *S. sciuri* และเชื้อไวรัส Nucleopolyhedrovirus (NPV) เมื่อนำแอนติซีรัมที่ได้นี้มาทดสอบและพัฒนาเพื่อ

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 4000

³ สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE) และ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁵ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

* Corresponding author, e-mail: sivilai@kku.ac.th

ตรวจหาเชื้อ *N. bombycis* ด้วยเทคนิค indirect ELISA นั้น โดยการพัฒนาเปรียบเทียบกับวิธีที่ได้พัฒนามาก่อนแล้ว (วิธีเดิม: IP 1) ทั้งนี้ได้พิจารณาขั้นตอนสำคัญของเทคนิค indirect ELISA อย่างเป็นลำดับ และใช้ผลการทดลองที่ดีที่สุดจากขั้นตอนแรกไปพัฒนาในขั้นตอนต่อไปอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลสุดท้ายที่ดีที่สุด โดยเริ่มต้นจากการศึกษาชนิดและความเข้มข้น รวมทั้งอุณหภูมิและเวลาในการบ่ม blocking solution แสดงให้เห็นว่า BSA (bovine serum albumin) 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีที่สุด

Abstract

Pebrine disease caused by *Nosema bombycis* N. is the most devastating disease of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.), which transmits continuously through eggs by generation to generation. The infected silkworm “Mae Ling” variety was randomly selected and studied on pebrine symptom development for one generation in laboratory at 25°C (21.5–26°C, R.H. 38–91%). Numbers of pebrine symptoms containing spores were 15 from total 20 symptoms. The infected samples were observed using phase contrast microscope and found the average spores of $1.77 \times 10^6 \rightarrow 2.42 \times 10^8$ spores/larva with the average spore size of $2.10 - 2.50 \times 4.13 - 4.57 \mu\text{m}$. The most appearance infected symptom was the resembled healthy larva; which had 10 percent of infection. The spore suspension of *N. bombycis* was purified using sucrose density gradient centrifugation (SDGC). Most spores located at sucrose level concentration of 40–50 % (w/w). Suitable concentration of antigen for polyclonal antibody production was evaluated and found that the spore concentration of 1×10^9 spores/ml was the most properly. The titer value of this antiserum at $10^1 - 10^6$ spores/ml of antigen was 1:50 and at 10^6 spores/ml of antigen the titer value was 1:3,500. In addition, the produced antiserum in this present study was highly specific to protozoa *N. bombycis* (Mae Ling isolate) but not cross reaction to other silkworm pathogens, fungi: *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Metarhizium anisopliae*, bacteria: *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri* and virus: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). This antiserum was tested and developed for *N. bombycis* detection using indirect ELISA to compare with the previous method (IP 1). The developed detection technique was considered consequently based on the important steps in series. The best result obtained from the beginning steps was used to develop continuously in next steps in series, in order to derive the best final procedure. The result of type and concentration including temperature and time interval for incubation of blocking solution exhibited that the 1% BSA (bovine serum albumin) and 2 hr of blocking time at 37°C were the most effectiveness.

คำสำคัญ: เชื้อโปรโตซัว (*Nosema bombycis*), ไหมหม่อน, ELISA

Keywords: ELISA, mulberry silkworm, *Nosema bombycis*

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการเลี้ยงไหมมาอย่างยาวนานกว่า 3,000 ปี โดยเฉพาะไหมบ้าน (*Bombyx mori* L.) ในการเลี้ยงไหมนั้นมักจะพบปัญหาโรคและแมลงศัตรู ซึ่งทำให้ผลผลิตไหมลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะโรคเพรินจัดว่าเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ไหมมากที่สุด เนื่องจากเป็นโรคที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ไปยังรุ่นต่อไปได้อย่างต่อเนื่องหลายชั่วรุ่น (generation) ซึ่งเชื้อสาเหตุคือ เชื้อโปรโตซัว *Nosema bombycis* N. โดยเมื่อมีการระบาดแล้วสามารถทำให้ผลผลิตไหมลดลงได้อย่างมากมาย (Tatsuke, 1971) และสามารถแพร่ระบาดไปทั่วโลก ซึ่งเชื้อนี้สามารถเข้าทำลายหนอนได้ทุกระยะการเจริญเติบโต (ศิริวิสัย, 2546; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2535) สำหรับการป้องกันกำจัดที่ปฏิบัติกันมาในขั้นต้นนั้น นิยมตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาสปอร์ของเชื้อโดยตรง แต่เนื่องจากการขาดประสบการณ์หรือขาดความชำนาญของผู้ตรวจ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบการแพร่ระบาดของเชื้อนี้เสมอมา เพราะหากเชื้อสาเหตุโรคนี้นี้มีจริงแต่ผลจากการตรวจไม่พบ ทั้งนี้เนื่องมาจากจุดอ่อนของวิธีการหรือประสบการณ์ของผู้ตรวจ ก็จะกลายเป็นแหล่งแพร่ระบาดของโรคได้อย่างรุนแรง ในปัจจุบันทั้งในประเทศและต่างประเทศได้มีการพัฒนาวิธีทางด้านชีวโมเลกุล เช่น เทคนิค PCR (Hatakeyama and Hayasaka, 2003; Lawan et al., 2006) รวมทั้งวิธีด้านเซรุ่มวิทยา เช่น Latex agglutination test (Baig et al., 1992; Shamim et al., 1997) ซึ่งในประเทศไทยนั้นการใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคนี้นี้ ได้มีการศึกษาโดยทีมงานวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ด้วยการเริ่มจากงานของ Papirom et al. (2005) ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยการใช้เทคนิค ELISA test ในการตรวจหาเชื้อ *N. bombycis* ในเบื้องต้น จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่ต้องรีบดำเนินการศึกษาค้นคว้าวิจัยต่อ เพื่อปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งจะสามารถนำไปสู่การพัฒนาต่อไปจนได้เป็นชุดตรวจสำเร็จรูปในอนาคต ที่สามารถนำไปใช้ตรวจในภาคสนามอย่างได้ผล อันจะเป็นการช่วยสร้าง

องค์ความรู้และเทคนิคเพื่อการพึ่งพาตนเอง อีกทั้งเพื่อสร้างกลไกการลดและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคเพรินของไหมในประเทศไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพหนึ่งต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคเพรินในไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง

โดยสุ่มหนอนพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลัง” ที่เป็นโรคเพรินวัย 1 แรกฟักออกมาจากไข่ มาเพาะเลี้ยงในตะกร้า ขนาด 29 x 37 x 10 เซนติเมตร จำนวนตะกร้าละ 150 ตัว ด้วยใบหม่อนพันธุ์ บุรีรัมย์ 60 ให้อาหาร 3 มื้อ คือ เช้า เที่ยง และเย็น ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (21.5 – 26 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 38 – 91 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาลักษณะอาการของโรคในระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแยกตามอาการที่ปรากฏในทุกระยะการเจริญเติบโต ทั้งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต เก็บใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลต่างๆ คือ วันเดือนปี ชื่อพันธุ์ ลักษณะอาการไหม ระยะการเจริญเติบโต จากนั้นนำไปตรวจหาเชื้อโดยทันที หากยังไม่สามารถตรวจสอบได้ให้เก็บตัวอย่างไว้ตรวจในระยะสั้นโดยเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส หรือที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อจำเป็นต้องเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน เพื่อรอการตรวจต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณและการทำสปอร์ของเชื้อ *Nosema bombycis* ให้บริสุทธิ์

โดยการเพาะเลี้ยงไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลัง” และเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยการปลูกเชื้อให้กับหนอนไหมวัย 2 ด้วยความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิตร (ประยุกต์ตาม Kawarabata and Hayasaka, 1987) ในสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อในตัวหนอนไหม และเพาะเลี้ยงด้วยใบหม่อนพันธุ์ บุรีรัมย์ 60 ดัดแปลงตามวิธีการเลี้ยงของกรมส่งเสริมการเกษตร (2538) นำมาตรวจหาสปอร์ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บรวบรวมและแยกเก็บตัวที่ติดเชื้อใส่ขวดปากกว้างปิดฝา เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (ประมาณ 4 องศาเซลเซียส) นำมาทำให้บริสุทธิ์บาง

ส่วน(crude purification) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำ sucrose density gradient centrifugation (SDGC) โดยใช้น้ำตาล sucrose ที่ความเข้มข้น 30–60 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) และเก็บสปอร์ของเชื้อโปรโตซัวที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาทดลองและผลิตแอนติซีรัมต่อไป

3. การผลิตแอนติซีรัมและการหาไตเตอร์ของแอนติซีรัม

แอนติเจน(สปอร์)ของเชื้อ *N. bombycis* ที่ผลิตได้นำมาผลิตแอนติซีรัม โดยฉีดให้กระต่ายด้วยความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้น 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อทุก 7 วัน ติดต่อกัน 5 ครั้ง หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย 7 วัน จึงเก็บเลือดจากกระต่ายทั้งนี้ให้เก็บเลือดที่ต้องการแอนติซีรัมห่างกันครั้งละ 7 วัน เลือดที่เก็บได้แต่ละครั้งนำมาตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของแอนติบอดีในแอนติซีรัม (titer) ด้วยวิธี indirect ELISA (ประยุกต์ตามวิธีของสุกานดา, 2547) ตรวจผลความเข้มข้นของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ coating buffer และ นอร์มอลซีรัมเป็น negative control

4. การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการ

นำเชื้อ *N. bombycis* และเชื้อสาเหตุชนิดต่างๆ ที่ก่อให้เกิดโรคกับไหมป่าและโดยเฉพาะอย่างยิ่งไหมบ้าน ได้แก่ เชื้อไวรัส (NPV, nucleopolyhedrovirus) ความเข้มข้น 10^1 , 10^3 และ 10^6 ผลิตโปรตีน (PIB) ต่อ มิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ชนิด (*Bacillus thuringiensis* (Bt), *Serratia marcescens* (ทำให้เกิดโรคกับไหมทาชาร์), *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri*) ที่ความเข้มข้น 10 , 10^3 และ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อราจำนวน 3 ชนิด (*Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Metarhizium anisopliae*) ที่ความเข้มข้น 10^1 , 10^3 และ 10^6 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ใช้แอนติซีรัมที่เจือจางใน conjugate buffer อัตรา 1:50

5. การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Nosema bombycis* โดยอาศัยเทคนิค ELISA

5.1 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ blocking solution

นำเชื้อ *N. bombycis* มาปรับให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรโดยเจือจางด้วย coating buffer ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ใช้แอนติซีรัมที่เจือจางใน conjugate buffer อัตรา 1:200 และเปรียบเทียบ blocking solution ระหว่าง BSA (albumin from bovine serum, lyophilized; Fluka) ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ กับ skim milk (Difco™) ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อ หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (ประยุกต์ตามสุกานดา, 2547 และ Shamim, 1997) โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ และค่า F-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งประกอบด้วย 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 BSA 1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 2 BSA 2 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 BSA 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 skim milk 1 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 5 skim milk 3 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 6 skim milk 5 เปอร์เซ็นต์

5.2 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการบ่ม

blocking solution

ปรับสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการเจือจางโดยใช้ coating buffer ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้แอนติซีรัมที่เจือจางใน conjugate buffer อัตรา 1:200 ใช้ blocking solution ที่ได้จากข้อ 5.1 (BSA 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เปรียบเทียบการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง และที่ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง วางแผน

การทดลองและวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยแบ่งเป็น 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง,
กรรมวิธีที่ 2 37 องศาเซลเซียส เวลา 2 ชั่วโมง,
กรรมวิธีที่ 3 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง,
กรรมวิธีที่ 4 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง,
กรรมวิธีที่ 5 4 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง

ผลการวิจัย

1. ลักษณะอาการของโรคเพบรินในไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง

จากการสุ่มใช้ไหมพันธุ์ไทยพื้นเมืองพันธุ์ “แม่หลิง” เป็นตัวแทนในการศึกษาลักษณะอาการของโรคเพบรินที่เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิ 21.5 – 26 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 38 – 91 เปอร์เซ็นต์ พบลักษณะอาการผิดปกติของไหมในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยทั้งหมด 20 อาการ แยกเป็นลักษณะอาการที่พบในระยะหนอนจำนวน 15 อาการ ซึ่งพบสปอร์ของเชื้อจำนวน 12 อาการ โดยอาการ

ที่พบมากที่สุดคืออาการคล้ายปกติในหนอนวัย 5 โดยพบการติดเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ หนอนวัย 5 ที่ยังมีชีวิตลอกคราบไม่สมบูรณ์ มีการติดเชื้อ 71.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในระยะหนอนนี้พบสปอร์ของเชื้ออยู่ระหว่าง $1.27 \times 10^7 - >2.42 \times 10^8$ สปอร์ต่อตัว ขนาดสปอร์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง $2.10 - 2.50 \times 4.13 - 4.57$ ไมโครเมตร ส่วนในระยะดักแด้พบ 3 อาการ ตรวจพบสปอร์ของเชื้อเพียงอาการเดียวคือ ไม่สร้างรัง ลำตัวบิดเบี้ยวไม่สมบูรณ์ โดยมีการติดเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ มีสปอร์ของเชื้อมากกว่า 2.42×10^8 สปอร์ต่อตัว ขนาดสปอร์เฉลี่ย 2.23×4.39 ไมโครเมตร และในระยะตัวเต็มวัย พบสปอร์ของเชื้อในเพศเมีย (1.18×10^7 สปอร์ต่อตัว) มากกว่าในเพศผู้ (1.77×10^6 สปอร์ต่อตัว) รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเพศเมีย (30 เปอร์เซ็นต์) ก็ยังคงมากกว่าในเพศผู้ (10 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีขนาดสปอร์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง $2.11 - 2.31 \times 4.27 - 4.31$ ไมโครเมตร โดยจากลักษณะผิดปกติของไหม (ระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ทั้งหมด 20 อาการ แต่ตรวจพบสปอร์ของเชื้อจำนวน 15 อาการ โดยมีจำนวนสปอร์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง $1.77 \times 10^6 - >2.42 \times 10^8$ สปอร์ต่อตัว ขนาดสปอร์เฉลี่ย $2.10 - 2.50 \times 4.13 - 4.57$ ไมโครเมตร (ตารางที่ 1)

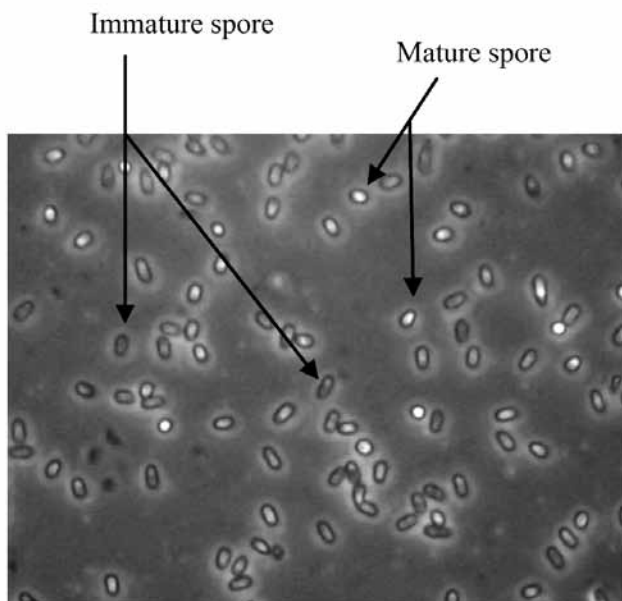
ตารางที่ 1. ลักษณะอาการและการติดเชื้อของไหม จำนวนและขนาดสปอร์ของเชื้อโปรโตซัว ในไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่เหล็ก” ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 38 – 91 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะอาการ	จำนวน (ตัว)	ระยะการเจริญเติบโต /วัย	สปอร์เชื้อ/ตัว (สปอร์)	การติดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดสปอร์เฉลี่ย (ไมโครเมตร)
- ดาย ลอกคราบ ไม่สมบูรณ์	2	หนอน : วัย 4	$>1.21 \times 10^8$	50.00	2.12 x 4.40
- ดาย ลำตัวเห้ง สีเหลือง-คล้ำ	3	หนอน : วัย 4	-	-	-
- ดาย ลำตัวหดสั้น สีเหลือง	4	หนอน : วัย 4	$>1.21 \times 10^8$	50.00	2.35 x 4.13
- ดาย ลำตัวหดสั้น แห้ง สีน้ำตาล	3	หนอน : วัย 4	$>1.21 \times 10^8$	66.67	2.33 x 4.47
- ดาย ลำตัวเหี่ยว สีเหลืองจางๆ	2	หนอน : วัย 4	$>1.21 \times 10^8$	50.00	2.21x4.32
- มีชีวิต ลำตัวเล็ก ไม่สม่ำเสมอ	10	หนอน : วัย 4	$>1.21 \times 10^8$	50.00	2.32 x 4.42
- มีชีวิต ลอกคราบ ไม่สมบูรณ์	7	หนอน : วัย 4	1.27×10^7	71.43	2.10x4.16
- ดาย คล้ายปกติ ลำตัวสีขาว-เหลืองอ่อน	4	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	50.00	2.27x4.44
- ดาย ลำตัวหดสั้น แห้ง สีเหลือง-น้ำตาล	8	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	50.00	2.13x4.19
- มีชีวิต ลำตัวอ่อนบวม กะโหลกเคลื่อนที่ช้าไม่กินอาหาร	18	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	100.00	2.40 x 4.25
- ดาย ลำตัวมีลักษณะบวม สีคล้ำ-ดำ	2	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	50.00	2.11 x 4.45
- มีชีวิต คล้ายปกติ	20	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	10.00	2.24 x 4.28
- ดาย พบมีลำตัวมีลักษณะบาง มองเห็นระบบเลือดชัดเจน	3	หนอน : วัย 5	-	-	-
- มีชีวิต เจริญเติบโตช้า ตัวเล็กผิดปกติ	10	หนอน : วัย 5	$>2.42 \times 10^8$	40.00	2.50 x 4.57
- มีชีวิต บริเวณส่วนหัวบวมโต บริเวณก้นมีน้ำใส	1	หนอน : วัย 5	-	-	-
- ไม่สร้างรัง ลำตัวมีสีขาว ไม่สมบูรณ์	3	ดักแด้	$>2.42 \times 10^8$	100.00	2.23x4.39
- ไม่สร้างรัง คล้ายปกติ	6	ดักแด้	-	-	-
- ดายคางรัง สีดำ กลิ่นเหม็น	5	ดักแด้	-	-	-
- คล้ายปกติ	10	ตัวเต็มวัยเพศเมีย	1.18×10^7	30.00	2.11x4.31
- คล้ายปกติ	10	ตัวเต็มวัยเพศผู้	1.77×10^6	10.00	2.31x4.27

2. การเพิ่มปริมาณและการทำสปอร์ของเชื้อ *Nosema bombycis* ให้บริสุทธิ์

หนอนไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลิง” ที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ *N. bombycis* นั้นพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณได้ดี และเมื่อรวบรวมหนอนที่ตรวจพบเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation (SDGC) โดยใช้น้ำตาล sucrose ที่ความเข้มข้น 30–60 เปอร์เซ็นต์ พบชั้นต่างๆ 5 ชั้น ที่ระดับน้ำตาล sucrose แตกต่างกัน และพบสปอร์

ของเชื้ออยู่ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาล sucrose ที่ 40–50 เปอร์เซ็นต์ และมีสปอร์ของเชื้อ โปรโตซัวที่ค่อนข้างบริสุทธิ์จำนวนมาก ซึ่งประกอบไปด้วยสปอร์ที่แก่ (mature spore) และสปอร์ที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ (immature spore) (รูปที่ 1) นำชั้นที่พบสปอร์ไปเจดน้ำตาล sucrose ที่ติดค้างอยู่ออกโดยการ dialysis จากนั้นนำไปนับจำนวนสปอร์ และเก็บสปอร์ของเชื้อโปรโตซัวที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาและการผลิตแอนติซีรั่มต่อไป



รูปที่ 1. สปอร์ของเชื้อโปรโตซัว *Nosema bombycis* ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

3. ไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่ผลิตจากเชื้อ *Nosema bombycis*

เมื่อนำแอนติซีรั่มที่ผลิตจากสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* มาทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม โดยทดสอบกับเชื้อที่ความเข้มข้น 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าเชื้อทุกความเข้มข้นทำปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวกกับแอนติซีรั่มเจือจางที่ 1:50 ในขณะที่แอนติซีรั่มเจือจาง

1:100, 1:250, 1:500 และ 1:1,000 สามารถเกิดปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวกเฉพาะกับเชื้อที่ความเข้มข้น 10^2 – 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนแอนติซีรั่มที่ระดัการเจือจาง 1:1,500, 1:2,000 และ 1:2,500 นั้นให้ปฏิกิริยาที่เป็นบวกเฉพาะเชื้อที่ความเข้มข้น 10^3 – 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับแอนติซีรั่มระดัการเจือจาง 1:3,000 และ 1:3,500 นั้นเชื้อที่ความเข้มข้น 10^5 – 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. ไตเตอร์ของแอนติซีรั่มที่ผลิตจากเชื้อ *Nosema bombycis* ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ secondary antibody เจือจาง 1:20,000

แอนติเจน (สปอร์/มล.)	ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) ^{1/}									
	ความเข้มข้นของแอนติซีรั่ม (แอนติซีรั่ม : conjugate buffer) ^{2/}									
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:1,500	1:2,000	1:2,500	1:3,000	1:3,500
10 ¹	0.335	0.319	0.305	0.290	0.272	0.261	0.244	0.206	0.184	0.168
10 ²	0.390	0.378	0.378	0.363	0.346	0.326	0.305	0.288	0.240	0.215
10 ³	0.466	0.440	0.441	0.417	0.408	0.394	0.374	0.365	0.332	0.294
10 ⁴	0.581	0.551	0.535	0.499	0.468	0.441	0.411	0.350	0.327	0.283
10 ⁵	0.827	0.760	0.686	0.626	0.591	0.523	0.481	0.426	0.387	0.358
10 ⁶	1.045	0.957	0.888	0.825	0.731	0.642	0.607	0.540	0.489	0.395
นอร์มอลซีรั่ม ^{3/}	0.170	0.163	0.162	0.159	0.152	0.166	0.157	0.159	0.163	0.151
Coating buffer	0.180	0.169	0.175	0.173	0.173	0.183	0.164	0.177	0.182	0.166

^{1/} ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ตัวเลขมีค่าสูงกว่า 0.334 ขึ้นไปมีค่าเป็นบวก

^{2/} แอนติซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer

^{3/} นอร์มอลซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:200

4. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีการ

เมื่อนำเชื้อต่างๆ ที่ทำให้เกิดโรคของไหม ป่าและไหมบ้านที่ตรวจพบในประเทศไทยได้แก่เชื้อโปรโตซัว *N. bombycis*, เชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Metarhizium anisopliae* ความเข้มข้น 10¹, 10³ และ 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อไวรัส *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) ความเข้มข้น 10¹, 10³ และ 10⁶ ผลึกโปรตีน (PIB) ต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri* ที่ความเข้มข้น 10¹, 10³ และ 10⁶ เซลล์

ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับ แอนติซีรั่มเจือจาง 1:50 และใช้ secondary antibody ที่เจือจาง 1:20,000 ผลปรากฏว่าแอนติซีรั่มดังกล่าว สามารถทำปฏิกิริยาอย่างชัดเจนกับเชื้อ *N. bombycis* ที่ได้จากไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลิง” โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10¹, 10³ และ 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 0.462, 0.602 และ 0.955 แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อสาเหตุโรคไหมชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัมของเชื้อ *Nosema bombycis* กับเชื้อสาเหตุโรคไหมชนิดต่างๆ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรัมเจือจาง 1:50 และ secondary antibody เจือจาง 1:20,000

เชื้อสาเหตุโรคไหม ^{2/}	ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) ^{1/}		
	ความเข้มข้นของแอนติเจน ^{3/}		
	10 ¹	10 ³	10 ⁶
<i>Aspergillus flavus</i>	0.243	0.247	0.382
<i>Aspergillus tamarii</i>	0.241	0.243	0.379
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0.234	0.239	0.254
<i>Nosema bombycis</i> ^{4/}	0.462	0.602	0.955
<i>Nucleopolyhedrovirus</i>	0.273	0.288	0.343
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.237	0.242	0.274
<i>Serratia marcescens</i>	0.234	0.245	0.309
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.227	0.230	0.349
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0.243	0.229	0.364
Coating buffer	0.202	0.203	0.209

^{1/} ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ตัวเลขที่มีค่าตั้งแต่ 0.409 ขึ้นไป มีค่าเป็นบวก

^{2/} เชื้อสาเหตุโรคของไหมที่ตรวจพบในประเทศไทย

^{3/} เชื้อโปรโตซัว *Nosema bombycis* = สปอร์/มล., เชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Metarhizium anisopliae* = สปอร์/มล., เชื้อไวรัส *Nucleopolyhedrovirus* = ผลิตโปรตีน (PIB)/มล., เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. sciuri* = เซลล์/มล.

^{4/} เชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลตจากไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลิง”

5. การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Nosema bombycis* โดยอัยเทคนิค ELISA

5.1 ชนิดและความเข้มข้นของ blocking solution

เมื่อนำเชื้อ *N. bombycis* ที่ความเข้มข้น 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทดสอบกับ blocking solution คือ BSA (ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์) และ skim milk (ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) เพื่อลด background ของนอร์มอลซีรัมและ coating buffer พบว่าทุกความเข้มข้นของ BSA ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรสูงกว่าการใช้ skim milk ในทุกๆ ความเข้มข้น โดย BSA ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าที่สูงที่สุด (0.624) รองลงมาคือ BSA 3 เปอร์เซ็นต์ (0.540) และ

2 เปอร์เซ็นต์ (0.272) ตามลำดับ และค่าปฏิกิริยาของแอนติเจนกับนอร์มอลซีรัมนั้น พบว่าการใช้ skim milk ให้ค่าต่ำกว่าการใช้ BSA ทุกความเข้มข้น โดย skim milk 5 เปอร์เซ็นต์ให้ค่าต่ำที่สุด (0.079) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) กับ 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 0.086 และ 0.084 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้ skim milk ทุกความเข้มข้นให้ค่าที่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ BSA ทุกความเข้มข้น นอกจากนั้นการทำปฏิกิริยาระหว่าง coating buffer กับแอนติซีรัม พบว่าการใช้ skim milk 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าเฉลี่ยต่ำที่สุด (0.070) และการใช้ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ยังคงให้ค่าเฉลี่ยสูงที่สุด (0.121) ในด้านค่า binding ratio (อัตราส่วนระหว่างค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน

กับแอนติซีรั่มต่อค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับนอร์มอลซีรั่ม พบว่า BSA 1 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าสูงสุดเท่ากันคือ 3.63 โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการใช้ skim milk 5 เปอร์เซ็นต์ (3.24) ขณะที่ skim milk 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าต่ำที่สุด (1.53) (ตารางที่ 4) ดังนั้น BSA 1 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น blocking solution ต่อไป

5.2 อุณหภูมิและเวลาในการบ่ม blocking solution

เมื่อนำ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น blocking solution ที่เหมาะสมมาศึกษาเปรียบเทียบหาอุณหภูมิและเวลาในการ block ที่ดีและเหมาะสมที่สุด โดยเปรียบเทียบการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง และ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อพิจารณาค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโน

เมตร แสดงให้เห็นว่าการ block ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงให้ค่าสูงที่สุด (0.828) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (0.794) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง, 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ซึ่งที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมงให้ค่าต่ำที่สุด (0.519) ส่วนการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับนอร์มอลซีรั่มนั้นที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงให้ค่าต่ำที่สุด (0.122) และที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมงให้ค่าสูงที่สุด (0.140) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการ block ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่า 0.138 และ 0.139 ตามลำดับ และการทำปฏิกิริยาระหว่าง coating buffer กับแอนติซีรั่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงยังคงให้ค่าต่ำที่สุด (0.138) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการ block

ตารางที่ 4. ชนิดและความเข้มข้นของ blocking solution ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Nosema bombycis* กับแอนติซีรั่ม ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มเจือจาง 1:200

Blocking solution	ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) ^{1/}			
	แอนติเจน ^{2/} : แอนติซีรั่ม ^{3/}	แอนติเจน ^{2/} : นอร์มอลซีรั่ม ^{4/}	Coating buffer : แอนติซีรั่ม ^{3/}	Binding ratio
BSA ^{5/} 1 %	0.624a	0.172a	0.121a	3.63a
BSA ^{5/} 2 %	0.272c	0.152a	0.117a	1.79cd
BSA ^{5/} 3 %	0.540b	0.149a	0.115ab	3.63a
Skim milk 1 %	0.132d	0.086b	0.109ab	1.53d
Skim milk 3 %	0.208cd	0.084b	0.092bc	2.48bc
Skim milk 5 %	0.256cd	0.079b	0.070c	3.24ab
F-test	**	**	**	**
CV. (%)	22.35	13.89	13.69	18.04

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (DMRT)

^{1/} ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

^{2/} แอนติเจน : เชื้อ *Nosema bombycis* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิตร

^{3/} แอนติซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:200

^{4/} นอร์มอลซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:200

^{5/} BSA : albumin from bovine serum

ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งการ block ที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงให้ค่าสูงสุด (0.212) เมื่อพิจารณาจากค่า binding ratio พบว่าที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงให้ค่าสูงสุด (6.00) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง (5.70) แต่มีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติกับการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง (5.38) 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง (5.43) และที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าต่ำที่สุด (4.27) (ตารางที่ 5) จากข้อมูลดังกล่าวโดยเฉพาะจากค่า binding ratio จะเห็นว่าการ block ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 5. อุณหภูมิและเวลาในการ block ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Nosema bombycis* กับ แอนติซีรั่ม ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มเจือจาง 1:200 และ secondary antibody เจือจาง 1:20,000

อุณหภูมิและเวลา ในการ block	ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) ^{1/}			
	แอนติเจน ^{2/} : แอนติซีรั่ม ^{3/}	แอนติเจน ^{2/} : นอร์มอลซีรั่ม ^{4/}	Coating buffer : แอนติซีรั่ม ^{3/}	Binding ratio
37°ซ 1 ชม.	0.519d	0.122c	0.138c	4.27c
37°ซ 2 ชม.	0.828a	0.138ab	0.140c	6.00a
37°ซ 3 ชม.	0.762b	0.140a	0.149b	5.43b
37°ซ 4 ชม.	0.794ab	0.139a	0.146bc	5.70ab
4°ซ 12 ชม.	0.711c	0.132b	0.212a	5.38b
F-test	**	**	**	**
CV. (%)	3.12	2.96	2.86	5.37

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (DMRT)

^{1/} ค่าการดูดกลืนแสง (λ 405 nm) เฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

^{2/} แอนติเจน : เชื้อ *Nosema bombycis* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

^{3/} แอนติซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:200

^{4/} นอร์มอลซีรั่ม : เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:200

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะอาการของโรคเพบรินที่เกิดจากเชื้อ *N. bombycis* ในหนอนไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “แม่หลัง” ที่นำมาเป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 38 – 91 เปอร์เซ็นต์ ไหม (หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) มีลักษณะอาการผิดปกติถึง 20 อาการ แต่ที่ตรวจพบสปอร์ของเชื้อนั้นจำนวน 15 อาการ ซึ่งมีจำนวนสปอร์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง $1.77 \times 10^6 - 2.42 \times 10^8$ สปอร์ต่อตัว ขนาดสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ $2.10 - 2.50 \times 4.13 - 4.57$

ไมโครเมตร โดยลักษณะที่พบมากที่สุดคือ หนอนที่มีลักษณะคล้ายปกติแต่กลับพบมีการติดเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือหนอนที่มีลักษณะลำตัวอ่อนปวกเปียก เคลื่อนที่ช้า ไม่กินอาหาร ซึ่งลักษณะนี้มีการติดเชื้อ 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับสมศรี และคณะ (2534) ที่รายงานว่าการเชื้อสาเหตุโรคเพบรินไม่สามารถทำให้หนอนตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลักษณะอาการของไหมที่ตรวจพบสปอร์ของเชื้อจะแตกต่างกันไป เช่น AICAF (1995) ได้รายงานถึงอาการของหนอนว่ามีผนังลำตัวเหนียว ย่อยสลายช้า นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง “หน้าด่าง” มีอาการเฉพาะของโรค (typical

symptom) คือ มีส่วนท้ายของลำตัวสีเหลืองมากกว่าบริเวณอื่นของลำตัว ผันงลำตัวค่อนข้างมัน มองเห็นเส้นเลือดด้านหลังได้ชัดเจน (Sirimungkararat et al., 2002; สุกานดา, 2547) แต่จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่พบอาการกันเหลือง อาจจะเป็นไปได้ว่าไหมที่นำมาทดลองเป็นไหมต่างสายพันธุ์กัน และสภาพแวดล้อมที่ทำให้การทดลองก็มีความแตกต่างกันด้วย ลักษณะอาการที่ปรากฏจึงแตกต่างกัน เมื่อนำเชื้อ *N. bombycis* มาเพิ่มปริมาณพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณได้ดี และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDGC นั้น สปอร์ของเชื้อที่ค่อนข้างบริสุทธิ์พบอยู่ที่ชั้นของสารละลายน้ำตาล sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 40 – 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักค่อน้ำหนัก) โดยมีทั้งสปอร์ที่แก่และสปอร์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปอร์ที่แก่และสปอร์ที่ไม่เจริญเต็มที่ได้ โดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast โดยสปอร์ที่แก่มีลักษณะสะท้อนแสงเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่สปอร์ที่ไม่เจริญเต็มที่มองเห็นเป็นสีดำทึบแสง (Undeen and Solter, 1996; Maddox et al., 2000) เมื่อนำเชื้อเชื้อ *N. bombycis* บริสุทธิ์สาเหตุโรคเพรินของไหมที่ได้นำมาฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กระต่าย พบว่ามีคุณสมบัติที่ดีและสามารถใช้ผลิตแอนติซีรัมของเชื้อชนิดนี้ได้ โดยในการผลิตแอนติซีรัมนี้ได้ใช้วิธีการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อของกระต่ายเป็นช่วงๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นอย่างช้าๆ และไม่เกิดการช็อก ซึ่ง Ball และคณะ (1990, อ้างถึงโดยปัทมวรรณ, 2546) รายงานว่าวิธีการเตรียมแอนติเจนมีผลต่อคุณภาพของแอนติซีรัม โดยแอนติซีรัมที่ได้จากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองเป็นเวลานานและสม่ำเสมอจะมีค่า titer สูงกว่าแอนติซีรัมที่ได้จากการกระตุ้นในระยะสั้นๆ และยังสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างสายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับกระตุ้นในระยะสั้น ซึ่งแอนติซีรัมที่ได้นี้ได้นำมาทดสอบหาความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่เหมาะสม (titer) โดยการทดสอบกับเชื้อ *N. bombycis* ที่ความเข้มข้น 10^1 - 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อ 10^5 - 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ค่าเป็นบวกในทุกระดับการเจือจางของแอนติซีรัม

นอกจากนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อ *N. bombycis* มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อเชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลตเดียวกัน (แม่หลัง) คือ สามารถทำปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวกกับเชื้อ *N. bombycis* เท่านั้น และที่ทุกระดับความเข้มข้นในขณะเดียวกันก็ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อสาเหตุโรคไหมชนิดอื่นอย่างชัดเจน เมื่อนำแอนติซีรัมที่ได้มาทดสอบหา blocking solution ที่เหมาะสม พบว่า ในการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติซีรัมนั้น การใช้ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น blocking solution ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรสูงที่สุด (0.624) ส่วนการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับนอร์มอลซีรัมนั้นเมื่อพิจารณาจากค่าต่ำที่สุด พบว่าการใช้ skim milk 5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าต่ำที่สุด (0.079) เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยาของ coating buffer กับแอนติซีรัม การ block ด้วย skim milk 5 เปอร์เซ็นต์ (0.070) ก็ยังคงให้ค่าต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากค่า binding ratio ซึ่งค่านี้จะสามารถบอกความแตกต่างระหว่างการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติซีรัม (positive control) ต่อการทำปฏิกิริยาของแอนติเจนกับนอร์มอลซีรัม (negative control) โดยที่ค่า binding ratio นี้หากมีค่าสูงจะยิ่งดี เนื่องจากจะสามารถบ่งบอกความแตกต่างของ positive control กับ negative control ได้ดี ทั้งนี้พบว่าการ block ด้วย BSA 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถบอกความแตกต่างได้มากที่สุด ซึ่งเหมาะสมมากที่สุดที่จะนำมาใช้ในการ block โดยที่ค่า binding ratio ที่ได้จาก BSA ทั้งสองความเข้มข้นนี้มีค่าเท่ากันคือ 3.63 แต่เพื่อการลดต้นทุนในการทดสอบจึงเลือกใช้ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นการศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการบ่ม blocking solution พบว่าการ block ด้วย BSA 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ให้ค่าปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติซีรัมสูงที่สุด (0.828) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง (0.794) สำหรับการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับนอร์มอลซีรัม และปฏิกิริยาระหว่าง coating buffer กับแอนติซีรัม ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ยังคงให้ค่าต่ำที่สุดเท่ากับ 0.138 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง (0.140) เมื่อ

พิจารณาจากค่า binding ratio ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ให้ค่าที่สูงที่สุดคือ 6.00 รองลงมาคือ การ block ที่ 37 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (5.70) โดยที่ 2 และ 4 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นจึงเลือก block ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการทดสอบ ครั้งต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Shamim et al. (1997) ที่ใช้ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ เป็น blocking solution และใช้เวลาในการ block 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ในการทดสอบ ELISA ของเชื้อ *N. bombycis* นอกจากนี้ Kawarabata และ Hayasaka (1987) ได้ใช้ BSA 1 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ในการ block เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *N. bombycis* กับแอนติซีรัมของเชื้อนี้ อย่างไรก็ตาม สุกานดา (2547) กลับรายงานว่าการใช้ BSA 3 เปอร์เซ็นต์ block ที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ให้ผลที่ดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE) และกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538. การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2535. โรคและแมลงศัตรูไหม. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ.

- ปัทมวรรณ มณีสุวรรณ. 2546. การพัฒนาเทคนิค Enzyme link immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subs. *Citrulli*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ศิวาลัย สิริมังกรรัตน์. 2546. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุกานดา ภาภิรมย์. 2547. การผลิตแอนติซีรัม เพื่อการตรวจสอบเชื้อ *Nosema bombycis* N. สาเหตุโรคเพรินของไหม *Bombyx mori* L. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมศรี กันตรัตนากุล บังอร นาคอบ และ ภิรมย์ การเกิดกลาง. 2534. การศึกษาโรคเพรินในหนอนไหม *Bombyx mori* L. ลักษณะการเป็นโรคในไหมพันธุ์ไทย. รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 29. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- AICAF. 1995. *Sericulture in the tropics*. Association for International Cooperation of Agriculture & Forestry: Tokyo.
- Baig, M., Datta, R.K., Nataraju, B., Samson, M.V. and Sivaprasad, V. 1992. Protein a-linked latex antisera test for the detection of *Nosema bombycis* Naegeli spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 60: 312-313.
- Hatakeyama, Y. and Hayasaka, S. 2003. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR. **Journal of Invertebrate Pathology** 82: 148-151.
- Kawarabata, T. and Hayasaka, S. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of strains of

- Nosema bombycis* (Microspora : nematidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 50: 118-123.
- Lawan, M., Sirimungkarakat, S., Urairong, H., Chuprayoon, S. and Bunnag, S. 2006. Effect of specific primers on the detection of *Nosema bombycis* N. in Thai native silkworm varieties using DNA polymerase chain reaction (PCR) technique. **Asia-Pacific Congress of Sericulture & Insect Biotechnology**. 11-14 October 2006. Sangju National University. Sangju, Korea.
- Maddox, J.V., Brooks, W.M. and Solter, L.F. 2000. Bioassay of microsporidia, pp. 202-207. In Navon, A., and K.R.S. Ascherceds (eds.), **Bioassay of entomopathogenic microbes and Nematodes**. CABI Publishing: New York.
- Papirom, S., Sirimungkarakat, S., Sirithorn, P., Chuprayoon, S. and Lawan, M. 2005. *Nosema bombycis*, a causal agent of pebrine disease of Thai silkworm variety and the detection by ELISA test. **BioThailand 2005. 2-5 November 2005**. The Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.
- Shamim, M., Ghosh, D., Baig, M., Nataraju, B., Datta, R.K. and Gupta, S.K. 1997. Production of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* and their utility for detection of pebrine infection in *Bombyx mori* L. **Journal of Immunoassay** 18(4): 357-370.
- Sirimungkarakat, S., Chuprayoon, S., Sirithorn, P., Papirom, S., Lawan, M., Prommeechai, N., Sopa, S., Limwanich, C. and Khwanphuek, S. 2002. Transovarial transmission of microsporidian in the multivoltine Thai silkworm and chemical effect on its spore. **Proceeding of the XIXth Congress of the International Sericultural Commission. 21-25th September 2002**. The Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok, Thailand.
- Tatsuke, K. 1971. **Pebrine disease of silkworm**. Oversea Technique Cooperation Agency: n.p.
- Undeen, A.H. and Solter, L.F. 1996. The sugar content and density of living and dead microsporidian (Protozoa : Microspora) spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 67: 80-91.