บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. ชีวประวัติของไหม

ไหมหม่อนหรือไหมบ้านมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* L. อยู่ในไฟลัม (phylum) Arthropoda ชั้น (class) Insecta ชั้นย่อย (subclass) Pterygota ดิวิชั่น (division) Endopterygota อันดับ (Order) Lepidoptera วงศ์ (family) Bombycidae สกุล (genus) *Bombyx* ชนิด (species) *mori* (United Nations, 1993; สมโพธิ และคณะ, 2538) สันนิษฐานว่ามีวิวัฒนาการมาจากไหมป่า *B. mandarina* (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2538) ซึ่งผีเสื้อที่อยู่ในตระกูลนี้มีลักษณะพิเศษคือ ตัวหนอนมีการพ่นเส้นใยเพื่อใช้ในการทำรังห่อหุ้มตัวเอง แล้วลอกคราบเป็นดักแด้อยู่ภายในรังนั้น เป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) จากไหมแรกฟักจนเป็นรังไหมใช้เวลาประมาณ 24-29 วัน ระยะหนอนมี 5 วัย ตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 20-25 วัน ออกไข่ครั้งละ 400-600 ฟอง ตลอดวงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 42-53 วัน (นิรนาม, 2548ก) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงระหว่าง 26-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-85 เปอร์เซ็นต์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548)

ประเทศไทยมีการส่งเสริมการเลี้ยงไหม 2 ชนิด คือ การเลี้ยงไหมพันธุ์ไทย หรือ พันธุ์ไทยลูกผสม เพื่อผลิตเส้นไหม และการเลี้ยงไหมพันธุ์ลูกผสมต่างประเทศ เพื่อผลิตรังไหมส่งจำหน่ายโรงงานสาวไหม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) ในปี 2552 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกหม่อนรวมทั้งหมด 106,050 ไร่ และมีเกษตรกรปลูกหม่อนและเลี้ยงไหม 93,785 ราย (กรมหม่อนไหม, 2553) ซึ่งจากข้อมูลของอภิชาติ และถิรวีร์ (2547) รายงานว่าในช่วง 5 ปี ที่ผ่านมา (ปี 2542-2546) การนำเข้าเส้นไหมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มจาก 223.50 ตัน ในปี 2542 เป็น 324.90 ตัน ในปี 2546 หรือเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 4.17 ต่อปี แต่การนำเข้าผ้าไหมลดลงโดยมีการนำเข้า 335.10 ตัน ในปี 2542 แล้วลดลงเหลือ 67.88 ตันในปี 2546 หรือลดลงเฉลี่ยร้อยละ 39.30 ต่อปี ส่วนใหญ่เป็นการนำเข้าจากประเทศจีน ส่วนการส่งออกเส้นไหมมีแนวโน้มลดลงจาก 17.7 ตัน ในปี 2542 เหลือ 2.21 ตัน ในปี 2546 หรือลดลงร้อยละ 40.35 สำหรับการส่งออกผ้าไหมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยในปี 2542 มีการส่งออกจำนวน 145.50 ตัน และเพิ่มขึ้นเป็น 159.23 ตัน ในปี 2546 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.08 ประเทศคู่ค้าที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เบลเยี่ยม สหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส อิตาลี และออสเตรเลีย และในปี 2552 มีรายงานการนำเข้าไหมจากต่างประเทศทั้งสิ้น 361.41 ตัน คิดเป็นมูลค่าทั้งสิ้น 281.42 ล้านบาท โดยเป็นเส้นไหมและผ้าทอจำนวน 85.45 และ 56.81 ตัน และ

คิดเป็นมูลค่า 85.98 และ 125.54 ล้านบาท ตามลำดับ มีปริมาณและมูลค่าที่ลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่ปี 2547 เช่นเดียวกันกับปริมาณการส่งออกไหมในปีเดียวกัน พบว่ามีปริมาณทั้งสิ้น 381.43 ตัน คิดเป็นมูลค่า 471.52 ล้านบาท เป็นเส้นไหมและผ้าทอจำนวน 0.54 และ 106.53 ตัน คิดเป็นมูลค่า 0.55 และ 329.29 ล้านบาท ตามลำดับ (กรมหม่อนไหม, 2553) แสดงได้ว่าอาชีพการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมยังมีลู่ทางที่สามารถพัฒนาการผลิตเพื่อลดการนำเข้าจากต่างประเทศได้ และเป็นอาชีพเกษตรอาชีพหนึ่งที่สามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกรได้ในแต่ละปีเป็นจำนวนไม่น้อย พันธุ์ไหมที่นิยมในปัจจุบันได้แก่ พันธุ์ไหมไทยลูกผสม ได้แก่ พันธุ์ กสก.2 และ กสก.6 และพันธุ์ไหมลูกผสมต่างประเทศ ได้แก่ พันธุ์ กสก.1 กสก.5 และดอกบัว นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ที่ผลิตโดยบริษัทเอกชน เช่น พันธุ์จุลไหมไทย พันธุ์จิมทอมป์สัน ซึ่งสามารถเลี้ยงไหมได้ในทุกภาคของประเทศไทย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548)

2. โรคของไหม (กรมส่งเสริมการเกษตร 2538; นิรนาม, 2548ข; ศิวิลัย, 2546; นิรนาม, ม.ป.ป.)

โรคไหมเป็นอุปสรรคสำคัญในการเลี้ยงไหมไม่เฉพาะในประเทศไทย ในต่างประเทศเคยพบว่า การเลี้ยงไหมต้องประสบกับความล้มเหลวเนื่องมาจากไหมเป็นโรค เช่น ในฝรั่งเศสปี 1845 เกิดโรคเพบริน (Pebrine) ระบาด โรคนี้ระบาดไปทั่วประเทศในเวลา 5-6 ปี โรคนี้ระบาดรุนแรงมากจนทำให้อาชีพการเลี้ยงไหมต้องหยุดชะงัก จำเป็นต้องสั่งไข่ไหมจากต่างประเทศมาเลี้ยง แต่ต่อมาก็มีการแก้ไขปัญหานี้ได้ เมื่อ Louis Pasteur ได้พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรค และพบวิธีการป้องกำจัดอย่างได้ผลในทวีปเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น ที่เคยประสบปัญหาโรคเพบรินมาแล้วเหมือนกัน เนื่องจากระยะเวลาในการเลี้ยงไหมแต่ละรุ่นเป็นช่วงสั้นๆ เมื่อไหมเป็นโรค การแก้ไขหรือรักษาทำได้ลำบาก ในกรณีที่ทำได้ต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายมากขึ้น ซึ่งในแง่หลักเศรษฐศาสตร์ถือว่าเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ทำให้ได้รับผลกำไรตอบแทนน้อยลงหรือขาดทุน จนไม่สามารถดำเนินกิจการต่อไปได้ ฉะนั้นวิธีที่ดีที่สุดจึงไม่ใช่อยู่ที่การรักษาไหมที่เป็นโรค แต่เป็นการป้องกันไม่ให้ไหมเกิดโรค ถ้าผู้ที่มีอาชีพเลี้ยงไหมได้เล็งเห็นความสำคัญของการป้องกันโรคมากว่าที่เป็นอยู่ จะเป็นการช่วยให้การเลี้ยงไหมขยายตัวออกไปเรื่อย ๆ จนทัดเทียมกับต่างประเทศที่ได้ประสบผลสำเร็จมาแล้ว (นิรนาม, ม.ป.ป.)

โรคไหม หมายถึง อาการผิดปกติของไหมทางสรีรวิทยา เช่น การผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ระบบหมุนเวียนโลหิต มีผลทำให้หนอนไหมมีลักษณะที่ผิดปกติหรืออาจตายได้ และจะทำให้ผลผลิตรังไหมลดลงเป็นอย่างมาก การเลี้ยงไหมมักมีปัญหาเกี่ยวกับโรคที่เกิดขึ้นกับหนอนไหม เชื้อโรคแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตและวงจรชีวิตของไหมที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตและการส่งออกสินค้าผลิตภัณฑ์ไหมทั้งในเชิงการค้าและอุตสาหกรรม

สาเหตุของการเกิดโรค

เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต ได้แก่ สภาพแวดล้อม พิษจากสารเคมีต่าง ๆ คุณภาพและปริมาณใบหม่อน หรือ การปฏิบัติอันทำให้เกิดบาดแผล เป็นต้น

เกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว เชื้อรา

การนำเชื้อโรคเข้าสู่ห้องเลี้ยงไหมและตัวไหม มี 2 ลักษณะ โดยการอาศัยลมพัดพา เช่น สปอร์ของเชื้อราชนิดต่างๆ นอกจากนี้มนุษย์ยังเป็นตัวนำเชื้อโรคโดยติดไปกับร่างกาย เครื่องนุ่งห่ม ใบหม่อนหรืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่มนุษย์นำเข้าไป รวมไปถึงอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไหม ทำให้หนอนไหมแสดงอาการผิดปกติต่างๆ เช่น เบื่ออาหาร เจริญเติบโตผิดปกติ สำรอกน้ำย่อย ลอกคราบไม่สมบูรณ์ ตัวอ่อนปวกเปียก เป็นต้น อาการผิดปกติดังกล่าวจะแสดงให้เห็นมากหรือน้อยย่อมขึ้นอยู่กับเชื้อสาเหตุ วัยและพันธุ์ไหม และสภาพแวดล้อม ส่วนใหญ่แล้วจะแสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรงในหนอนไหมระยะวัยอ่อนมากกว่าไหมวัยแก่ และจะรุนแรงกับไหมพันธุ์ลูกผสมมากกว่าไหมพันธุ์ไทยพื้นเมือง แล้วแต่ชนิดของเชื้อที่เข้าทำลายหนอนไหมด้วยโรคที่ทำลายตัวไหมมีหลายชนิด ซึ่งเกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อโปรโตซัว ซึ่งโรคที่สำคัญ ๆ ได้แก่

โรคหัวส่อง (flacherie: *Cypovirus*, CPV) เกิดจากเชื้อไวรัส เมื่อหนอนไหมเป็นโรคจะเบื่ออาหาร สำรอกน้ำย่อย และถ่ายมูลติดกันเป็นสายคล้ายลูกประคำออกมา ส่วนอกด้านบนของหนอนจะใส เมื่อส่องกับแสงจะโปร่งใส เมื่อเป็นมากเชื้อไวรัสจะทำลายกระเพาะอาหาร ทำให้เซลล์ที่กระเพาะแตกเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นเห็นได้ชัด ลักษณะภายนอกของหนอนไหม มีอาการท้องเดินมูลมีสีขาวขุ่น สำรอกน้ำย่อยมาก หลังจากตายผนังลำตัวจะเหนียวไม่แตกง่าย แต่อวัยวะภายในจะเน่าเละเป็นน้ำสีคล้ำ ๆ มักเป็นมากในหนอนวัยแก่

โรคตัวเหลืองหรือโรคเต้อ (grasserie: *Nucleopolyhedrovirus*, NPV) เกิดจากเชื้อไวรัสอีกชนิดหนึ่ง เมื่อหนอนไหมเป็นโรคแต่ละปล้องของลำตัวจะบวมเป่ง ผนังลำตัวเปราะบางแตกง่าย ลำตัวเมื่อแตกจะพบน้ำสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมทะลักออกมา ไหมมีอาการเบื่ออาหาร และไต่ออกจากกลุ่ม มักเป็นมากกับหนอนไหมวัยแก่

โรคมัมมี่ (muscardine) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทำให้ไหมตาย โดยเข้าทางผนังลำตัว หลังจากไหมตาย เชื้อราจะเจริญออกมาจากตัวหนอน สภาพซากหนอนไม่เน่า มีลักษณะแห้งแข็งเป็นมัมมี่

โรคเพบริน (pebrine) โรคนี้มีเชื้อโปรโตซัวเป็นสาเหตุ ซึ่งเชื้อนี้สามารถทำลายไหมได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และสามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ได้ หนอนที่เป็นโรคมักมีขนาดตัวเล็กลง เบื่ออาหาร ลอกคราบไม่สมบูรณ์ หนอนไหมวัยแก่ถ้าได้รับเชื้อสามารถเจริญเติบโตต่อไปจนเป็นผีเสื้อวางไข่ได้ และเป็นไข่ที่มีเชื้อโรคเพบรินแฝงอยู่ ทำให้เกิดความเสียหายกับงานผลิตไข่ไหม

อย่างร้ายแรง เพราะไข่ไหมที่ได้จะไม่แข็งแรง มีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำ เฉพาะอย่างยิ่งเมื่อฟักออกมาหนอนก็ติดเชื้อ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดผ่านทางไข่จากแม่ผีเสื้อ

3. โรคเพบริน

3.1 ประวัติโรคเพบริน

โรคเพบรินเป็นโรคที่ทำความเสียหายให้แก่ไหมมากที่สุด และก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมทั่วโลก เป็นโรคที่ร้ายแรงและทำความเสียหายให้แก่ไหมมากที่สุด เชื้อนี้เข้าทำลายหนอนไหมทุกระยะการเจริญเติบโต ไหมวัยอ่อนเป็นโรคได้รุนแรงกว่าไหมในระยะวัยแก่ ไหมวัยอ่อนเมื่อเป็นโรคแล้วจะตายไม่สามารถเจริญเติบโตจนครบชีพจักรได้ ส่วนไหมวัยแก่เมื่อติดโรคยังสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ แต่จะไปแสดงอาการในรุ่นต่อไป (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2535) โดยโรคนี้เกิดจากเชื้อโปรโตซัว *Nosema bombycis* Naegeli ซึ่งมีรายงานการระบาดครั้งแรกที่เมือง province de Vaucleuse ประเทศฝรั่งเศสในปี ค.ศ. 1845 มีผลทำให้ผลผลิตรังไหมลดลงอย่างมากจาก 10,000,000 กิโลกรัม เหลือเพียง 4,000,000 กิโลกรัม ถัดมาอีก 1 ปี โรคนี้ได้แพร่ระบาดไปยังเมืองต่างๆ อีกหลายเมือง (Tatsuke, 1971; สมศรี และคณะ, 2534) และภายในระยะเวลา 5-6 ปี โรคนี้ได้แพร่ระบาดไปทั่วประเทศฝรั่งเศส จากนั้นแพร่ระบาดไปในประเทศอิตาลี สเปน ซีเรีย และโรมาเนีย ในปี ค.ศ. 1856 โรคเพบรินได้ทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมในประเทศฝรั่งเศสถึงจุดล้มเหลว (สุมณี, ม.ป.ป.) และโรคเพบรินนี้ยังได้แพร่ระบาดไปยังแหล่งที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมทั่วโลก

ในปี ค.ศ. 1849 Guerin Meneville ชาวฝรั่งเศสได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคเพบรินว่า Hematozoid เพราะอยู่ในระบบเลือดของหนอนไหม ต่อมา Naegeli ชาวเยอรมันได้ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ว่า *Nosema bombycis* ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1865 ใช้ระยะเวลานานถึง 5 ปี ที่ Louis Pasteur ได้ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเรื่องนี้ โดยเริ่มจากแหล่งที่มีการเลี้ยงไหมทางตอนใต้ของประเทศฝรั่งเศสในปี 1870 จึงได้ตั้งชื่อโรคนี้ว่า Maladie Corpusculaier (Corpused disease) และได้ศึกษาค้นคว้ารายละเอียดถึงการเจริญเติบโตตลอดจนการติดต่อโรค และพบว่าโรคนี้ถ่ายทอดทางผีเสื้อผ่านทางไข่ จึงได้แนะนำวิธีการป้องกันโรค จากความรู้ด้านนี้ทำให้การเลี้ยงไหมในยุโรปฟื้นฟูขึ้นอีกครั้ง ในปี ค.ศ. 1884 Balbian ชาวฝรั่งเศส ได้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเพบรินเป็นโปรโตซัว ต่อมาในปี 1909 Stempell ชาวเยอรมันได้ศึกษาถึงลักษณะและชีพจักรของเชื้อเพบริน ซึ่งสรุปได้ว่า Louise Pasteur เป็นผู้พบว่าโรคเพบรินถ่ายทอดจากแม่ผีเสื้อไปยังลูกผ่านทางไข่ และ Stampell เป็นผู้ศึกษาทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับโรคเพบรินนี้ และในปลายศตวรรษที่ 19 หลังจากทุกประเทศที่เลี้ยงไหมในทวีปยุโรปถูกคุกคามจากโรคเพบริน ญี่ปุ่นเป็นประเทศเดียวที่ยัง

ผลิตไข่ไหมที่ปลอดโรคออกจำหน่ายได้ แต่ก็อยู่ได้ไม่นาน ปี ค.ศ. 1866 ก็พบว่าไข่ไหมที่ผลิตได้ในประเทศไม่ปลอดโรค ในปี ค.ศ. 1885 ญี่ปุ่นจึงออกกฎหมายควบคุมโรคเพบริน และกฎหมายควบคุมเพบรินในญี่ปุ่นตราออกเป็นพระราชบัญญัติเมื่อปี ค.ศ. 1897 (สุมณี, ม.ป.ป.)

สำหรับในประเทศไทยนั้นในปี พ.ศ. 2508 กองค้นคว้าทดลอง กรมกสิกรรม ได้จัดให้มีการอบรมการตรวจโรคเพบรินขึ้น และต่อมาในปี พ.ศ. 2513 มีผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่น ดร.กินจิ อูเอดะ ได้เข้ามาสำรวจโรคเพบรินในประเทศไทย และมีรายงานว่าได้ตรวจพบเชื้อโรคเพบรินในหลายจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สมศรี และคณะ, 2534) และจากการศึกษาของศิวิลัย และคณะ (2546) โดยได้มีการสุ่มสำรวจถึงสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคเพบรินในเขตจังหวัดขอนแก่น พบว่าโรคเพบรินของไหมมีการแพร่ระบาดสูงถึง 92.85 เปอร์เซ็นต์

3.2 เชื้อสาเหตุ

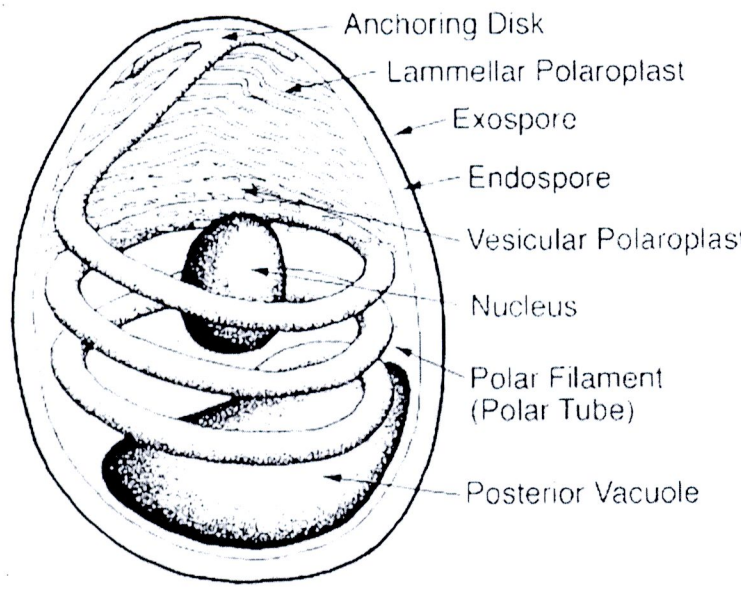
โรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อโปรโตซัวไมโครสปอริเดีย (microsporidia) สกุล *Nosema* ชนิด *bombycis* วงศ์ Nosematidae ซึ่งเป็นสมาชิกของชั้น Microsporea ไฟลัม Microspora หรือที่นิยมเรียกว่า Microsporidia (Iiyama, 2003) ซึ่งเชื้อนี้เป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryote) ขนาดเล็กและเป็นจุลินทรีย์ตัวเบียนที่อาศัยและเข้าทำลายภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (obligate intracellular parasite) (Huang et al., 2004) มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตด้วยกันคือ มี small subunit rRNA (SSU-rRNA) gene ที่มีขนาดเล็กกว่าพวกยูคาริโอตโดยทั่วๆไป (Nageswara Rao et al., 2004) คือ มีไรโบโซม (ribosome) ขนาด 70S (50S และ 30S) เท่ากันกับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (Ishihara and Hayashi, 1968) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียนั้นจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต (prokaryote)

3.2.1 รูปร่าง ลักษณะ และสัณฐานวิทยา (นิรนาม, ม.ป.ป.)

สปอร์ของเชื้อมีลักษณะกลมรี มีขนาด 3.7 x 2.0 ไมโครเมตร โปร่งแสงห่อหุ้มด้วยผนัง 2 ชั้น มีลักษณะเป็นมันและสะท้อนแสง ผนังชั้นแรกเรียก shell หรือ spore membrane ชั้นถัดไปเป็น protoplasmic membrane ถัดเข้าไปเป็นชั้น sporoplasm และ vacuole ในชั้นของ sporoplasm มี nucleus 2 อัน ประกอบด้วย polar capsule มีขนาด 1.5-2.0 x 0.8-1.0 ไมโครเมตร ซึ่งปลายด้านหนึ่งมีรูเปิด (micropile) สู่ภายนอกที่ผนังของสปอร์ใน polar capsule ประกอบด้วย polar filament มีลักษณะเป็นเกลียวขดอยู่ภายใน มีความยาวเฉลี่ย 124.4 ไมโครเมตร หรือ 30 เท่าของขนาดความยาวของสปอร์

เมื่อหนอนไหมกินสปอร์ของ protozoa nucleus 2 อัน ใน sporoplasm จะแบ่งตัวออกเป็น 4 อัน polar filament จะยื่นออกมาทาง micropile และฝังตัวอยู่ใน epitheleal cell ของอวัยวะย่อยอาหาร nucleus 2 อันจะแยกออกมาภายนอกสปอร์ อีก 2 อันยังคงอยู่ใน nucleus 2 อัน

ที่แยกออกมาจะมี ลักษณะคล้ายอะมีบา รูปร่างกลม (globular shape) ขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร และไม่มีผนังหุ้มเป็นระยะที่เรียกว่า planont ซึ่งจะเพิ่มปริมาณโดยการแบ่งตัว จากนั้นเข้าไปในเลือด กระจายไปทั่วตัว ทำลายเนื้อเยื่อ และอวัยวะของหนอนไหม ในขณะที่ planont เกาะติดกับ cell จะหยุดการเคลื่อนไหวและผนังมาหุ้ม เรียกระยะนี้ว่า meront มีลักษณะกลมหรือรูปทรงกระบอก มีขนาดใหญ่กว่า planont และขนาดไม่สม่ำเสมอ meront จะไม่อยู่กับที่ เคลื่อนย้ายที่เสมอระหว่างเซลล์ข้างเคียงเมื่อไปติดกับเซลล์โดยมี protoplasm เป็นตัวเชื่อม จะเปลี่ยนลักษณะเป็นเส้นหรือแถบ (band form) และเริ่มฟอร์มเป็นสปอร์ ในระยะนี้เรียบร้อยแล้วจะพบว่าในสปอร์มี nucleus 2 อัน (นิรนาม, ม.ป.ป.) อย่างไรก็ตาม สปอร์มีรายงานถึงขนาดที่แตกต่างกัน กล่าวคือ Tatsuke (1971) และ Jolly (1986) พบว่ามีขนาด 2.0-2.3 x 3.4-3.8 ไมโครเมตร FAO (1998) ระบุไว้ว่ามีขนาด 1.5-2.5 x 3.0-4.0 ไมโครเมตร สุมณี (ม.ป.ป.) รายงานว่ามีขนาด 3.7 x 2.0 ไมโครเมตร และมีขนาด 1.99-2.05 x 3.93-4.10 ไมโครเมตร (ศิวิลัย และคณะ, 2546) รูปร่างและลักษณะสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ดังแสดงในภาพที่ 1 (Keeling and Fast, 2002) จากการศึกษาโปรตีนที่ละลายได้บางส่วนของสปอร์ *N. bombycis* จากหนอนไหม *B. mori* เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS polyacrylamide gel electrophoresis พบแถบเปปไทด์ส่วนใหญ่ 3 ชนิดที่มีขนาด 68, 94 และ 100 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์โปรตีนจากสปอร์ที่ละลายได้อย่างสมบูรณ์ พบว่าแถบเปปไทด์อยู่ในช่วง 17-68 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนที่มีขนาด 17 กิโลดาลตันนั้นแสดงคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสสูงมาก (Sironmani, 1999)

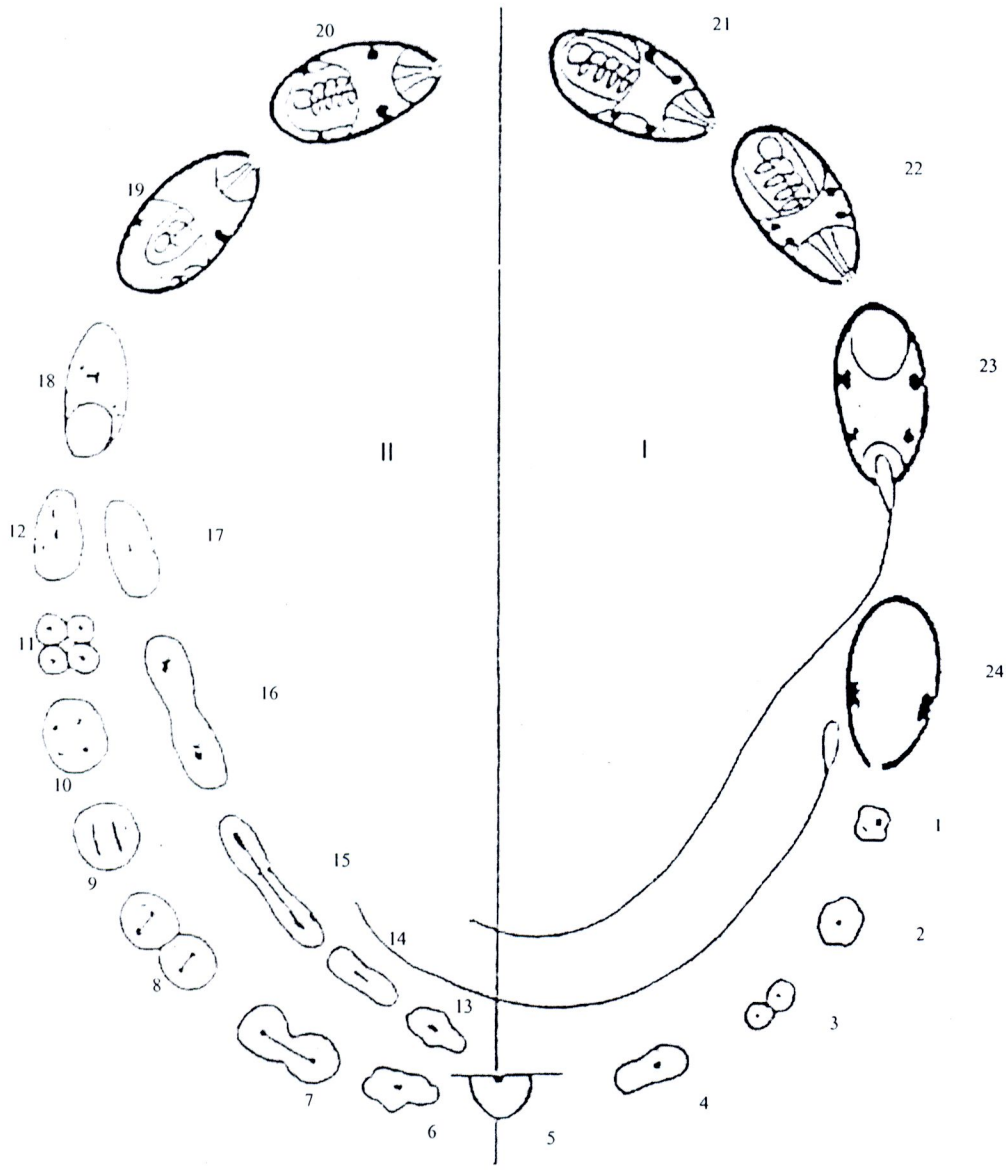


ภาพที่ 1 ลักษณะสปอร์ของเชื้อ *Nosema bombycis* สาเหตุโรคเพบริน

ที่มา : Keeling และ Fast (2002)

3.2.2 วงจรชีวิต (Boucias and Pendland, 1998; ศิวิลัย, 2546; สุมณี, ม.ป.ป.)

เชื้อ *N. bombycis* จัดเป็น type species ของสกุล *Nosema* เชื้อสกุลนี้มีวงจรชีวิตแบบ disporous ซึ่งผลิตสปอร์ได้ 2 แบบ หลังจากที่หนอนไหมกินเชื้อเข้าไปในลำไส้ นิวเคลียส 2 อัน ในสปอโรพลาสซึม จะแบ่งตัวออกเป็น 4 ขณะเดียวกันโพลาร์ฟิลาเมนท์จะยื่นโพลาร์ทิวป์ (polar tube) แทงเข้าไปในเซลล์บุผิว (epithelium cell) ของลำไส้ สปอโรพลาสซึมมีการเคลื่อนตัวออกมาทางท่อโพลาร์ทิวป์ โดยนิวเคลียส 2 อันออกมาพร้อมกับสปอโรพลาสซึม ส่วนอีก 2 อัน ยังติดอยู่ที่เปลือกสปอร์ และส่งสปอโรพลาสซึมเข้าไปยังเซลล์ทางเดินอาหารส่วนกลาง สปอโรพลาสซึมจะเกิดกระบวนการไซโตไคเนซิส (cytokinesis) ภายในเซลล์ของแมลงอาศัย (host) ที่เข้าไปนี้ นิวเคลียส 2 อัน ที่ออกมาจะรวมตัวกันมีลักษณะเป็นอะมีบา ซึ่งการเจริญระยะนี้เรียกว่า พลานอนท์ (planont) มีรูปร่างกลมขนาด 0.5-1.5 ไมโครเมตร ไม่มีผนังหุ้ม สามารถขยายตัวเพิ่มปริมาณโดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (division) เข้าไปอยู่ในกระแสเลือดและอาศัยการไหลเวียนของเลือดแพร่กระจายไปทั่วตัวของแมลงอาศัย สัมผัสกับเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ เช่น กล้ามเนื้อ ไขมัน ต่อมไหม ผนังลำตัว ลำไส้ ท่อขับถ่ายของเสีย (malpighian tubule) ตลอดจนรังไข่ เมื่อพลานอนท์แทงเข้าไปในเซลล์ที่สัมผัสอยู่ จะหยุดการเคลื่อนไหวและสร้างผนังขึ้น เรียกระยะนี้ว่าเมอรอนท์ (meront) หรือชิซอนท์ (schizont) ซึ่งจะปรากฏประมาณ 2-3 วันหลังจากได้รับเชื้อ เมอรอนท์ได้รับอาหารจากเซลล์ที่อาศัยอยู่ จะอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ ไม่เข้าไปอยู่ในนิวเคลียสหรือผนังของเซลล์ และไม่เคลื่อนย้ายเข้าเซลล์ข้างเคียง มีนิวเคลียสเดียว (uninucleate meront) ซึ่งเซลล์ที่มีนิวเคลียสเดียวนี้เมื่อผ่านขั้นตอนพลาสโมโกนี (plasmogony) จะสร้างเป็น diplokaryotic cell เพิ่มปริมาณโดยการแตกหน่อและแบ่งตัว เป็นเมอรอนท์ที่มี 2 นิวเคลียส (binucleate), 4 นิวเคลียส (tetranucleate) และ 8 นิวเคลียส (octonucleate) และ เมื่อเพิ่มปริมาณจนเต็มเซลล์จึงเปลี่ยนตัวเองสร้างเป็นสปอรอนท์ (sporont) ซึ่งมีนิวเคลียส 2 อัน (diplokaryotic nuclei) โดยสปอรอนท์มีผนังพลาสมาเล็มม่า (plasmalemma) ที่หนา และมีการแบ่งตัวไปเป็นสปอโรบลาสท์ที่มี 2 นิวเคลียส (binucleate sporoblast) 2 อัน โดยที่สปอโรบลาสท์ที่สร้างขึ้นในเซลล์บุผิวจะเป็นจุดเริ่มต้นในการผลิต primary spore สปอร์ที่อยู่ในเซลล์เหล่านี้จะงอกและปล่อยโพลาร์ทิวป์สั้น ๆ (short polar tube) ออกมา เพื่อส่งสปอโรพลาสซึมไปยังเซลล์ข้างเคียง จึงเป็นการแพร่ระบาดไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ ต่อไป วงจรชีวิตของเชื้อ *N. bombycis* ดังแสดงในภาพที่ 2



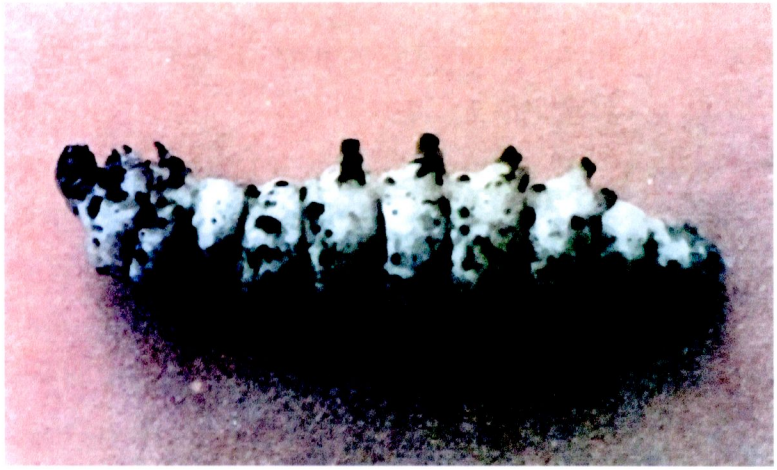
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *Nosema bombycis* ในหนอนไหม

I ระยะนอกเซลล์ II ระยะในเซลล์ 1-4 พลานอนท์, 5-17 เมอรอนท์, 18-20 ระยะของการสร้างสปอร์, 21-22 สปอร์ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงอาศัยตัวใหม่, 23 การโผล่ออกของโพลาร์ ฟิลาเมนท์, 24 นิวเคลียส 2 อัน และสปอโรพลาสซึมหลุดออกมาจากสปอร์ในลักษณะคล้ายอะมีบา

ที่มา: Steinhaus (1949)

3.3 ลักษณะอาการของโรค (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2535; สุมณี, ม.ป.ป.)

หนอนไหมที่เป็นโรคจะมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ จะแสดงอาการเฉียบพลันและรุนแรงในหนอนไหมวัยอ่อนมากกว่าไหมวัยแก่ ไหมจะนอนช้ากว่าปกติในระยะวัย 2 และวัย 3 ไม่ลอกคราบ หรือลอกคราบไม่สมบูรณ์ เมื่อเป็นมากไหมจะหยุดกินอาหารลำตัวจะหดสั้นแคระแกรนและตายในที่สุด ในหนอนไหมวัยแก่ที่เป็นโรคเพบริน หลังจากลอกคราบ ถ้านำมาผ่าตรวจต่อมไหม (silk gland) จะพบว่ามีลักษณะขุ่นไม่ใสเหมือนไหมที่ไม่เป็นโรค บนลำตัวของไหมพันธุ์ยุโรปที่เป็นโรคนี้มักมีจุดสีน้ำตาลดำ มีขนาดไม่เท่ากันและรูปร่างไม่แน่นอน เรียกว่า pepper like spot (AICAF, 1995; Iiyama, 2003) (ภาพที่ 3) สำหรับไหมพันธุ์ญี่ปุ่นและไหมพันธุ์พื้นเมือง (polyvoltine) มักไม่ค่อยพบลักษณะเช่นนี้ (นิรนาม, ม.ป.ป.; สุกานดา, 2547) และยังพบทางเดินอาหารส่วนกลางเป็นสีขาวขุ่น บางครั้งอาจพบลักษณะขาวขุ่นในต่อมผลิตไหมด้วย (AICAF, 1995) ถ้าไหมที่ฟักออกจากไข่ที่ได้รับเชื้อนี้ จะแสดงอาการตอนวัยแก่ ถ้าผีเสื้อเป็นโรคจะสังเกตเห็นได้ง่ายที่ดักแด้มีผนังลำตัวด้านนอกไม่มัน บริเวณส่วนท้องอ่อนนุ่ม ขนาดรูปร่างผิดปกติ บิดเบี้ยว ยาวหรือสั้นผิดปกติ (ภาพที่ 4) (สุกานดา, 2547) ปีกผีเสื้อจะยับยู่ยี่ ปีกไม่แผ่ เกล็ดของปีกจะหลุดร่วงง่าย วางไข่น้อยไม่เป็นระเบียบ ถ้ามีการผสมพันธุ์ ไข่จะไม่ฟัก เพราะไข่แดงถูกทำลาย เมื่อหนอนไหมตาย ผนังเหนียวย่อยสลายช้า หนอนไหมอาจตายตั้งแต่ระยะวัยอ่อน วัยแก่ ไหมสุกหรือตายในจ่อขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่หนอนได้รับเชื้อ ปริมาณ ความรุนแรงของเชื้อ ตลอดจนสภาพแวดล้อม



ภาพที่ 3 อาการ pepper like spot ของหนอนไหมที่เป็นโรคเพบริน

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (2535)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 ดักแด้ไหมที่เป็นโรคเพบริน แสดงอาการบิดเบี้ยว ผนังลำตัวไม่มัน
ที่มา: สุกานดา (2547)

3.4 การถ่ายทอดและความรุนแรงของเชื้อ (นิรนาม, ม.ป.ป.)

โรคนี้มีการติดต่อหรือถ่ายทอดเชื้อสู่ไหมได้ 2 ทางคือ ทางปาก (oral transmission) การติดต่อทางปากเกิดจากไหมกินสปอร์ของเชื้อที่ติดกับ ใบหม่อน อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยง ไหมที่เป็นโรคตาย หรือมูลไหม เป็นแหล่งของเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของการแพร่กระจายเชื้อไปยังหนอนไหม เมื่อเชื้อถูกกินเข้าไปเชื้อจะเข้าไปเจริญและทำลายหนอนไหม ส่วนการถ่ายทอดผ่านทางไข่ (trans-ovum transmission) นั้น เกิดจากการติดต่อหรือถ่ายทอดมาจากแม่ผีเสื้อ โดยที่เชื้อผ่านเข้าไปอยู่ในรังไข่ของแม่ผีเสื้อที่ติดเชื้อ โดยได้รับเชื้อในขณะที่เป็นหนอนวัย 4 และวัย 5 ซึ่งหนอนไหมที่ฟักออกจากไข่ที่ติดเชื้อจะเป็นโรคทันที และแสดงอาการของโรคในระยะวัย 2 และวัย 3 เมื่อหนอนเจริญเติบโตถึงวัยที่ 3 ก็จะตาย ไข่ไหมที่ติดเชื้อในอัตราสูงจะเป็นไข่ที่ไม่ได้รับการผสมและไม่สามารถฟักออก ถ้าติดเชื้อในอัตราต่ำ ไข่จะสามารถฟักออกเป็นตัว แต่หนอนไหมที่ฟักออกมาได้จะเป็นโรคตายในเวลาต่อมา จึงไม่สามารถเติบโตต่อไปจนครบชีพจักรได้

หนอนไหมที่เป็นโรคเพบรินจะขับถ่ายสปอร์ออกมาพร้อมกับมูล ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อและเป็นสาเหตุทำให้โรคแพร่ระบาดได้อย่างดีอีกทางหนึ่ง หนอนไหมที่เป็นโรคในระยะวัย 1 และวัย 2 จะเจริญเติบโตได้ตามปกติจนถึงวัย 3 จึงเริ่มแสดงอาการในช่วงปลายวัย 4 หรือต้นวัย 5 และจะตายตั้งแต่วัย 5 เรื่อยไปจนกระทั่งทำรัง หนอนไหมที่ติดเชื้อสาเหตุโรคในวัย 4 และ 5 จะไม่แสดงอาการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุด
วันที่ 26 ส.ค. 2548
เลขทะเบียน 203356
เลขเรียกหนังสือ

สามารถถ่ายทอดติดต่อไปถึงไข่ได้ รวมทั้งแหล่งแพร่เชื้ออื่นๆ เช่น หนอนไหมที่เป็นโรคและตาย เพราะโรคเพบริน การแพร่ระบาดในแหล่งเลี้ยงไหมจะเป็นไปได้เร็วมาก หนอนไหมอาจได้รับเชื้อสาเหตุจากใบหม่อนที่ปนเปื้อนเชื้อโดยผีเสื้อและแมลงศัตรูทางการเกษตรอื่นๆ นอกจากนี้การทิ้งเศษใบหม่อน หนอนติดเชื้อ ที่ไม่ได้ผ่านการทำปุ๋ยหมักในแปลงหม่อน จะเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อได้ การฟักไข่ไหมโดยไม่ได้ทำความสะอาดฆ่าเชื้อในห้อง ภาชนะและอุปกรณ์การฟักไข่อาจทำให้หนอนที่ฟักออกมาได้รับเชื้อเข้าไป นอกจากนี้สเกล (scale) ที่ปีกและปัสสาวะของผีเสื้อหนอนไหม ก็เป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อได้ รวมถึงการเลี้ยงไหมแบบแออัดในภาชนะเลี้ยงไหมจะทำให้การแพร่ระบาดเร็วขึ้น (Bhat et al., 2009)

3.4.1 แมลงอาศัยหลัก

แมลงที่จัดเป็นแมลงอาศัยหลักที่สำคัญของเชื้อสาเหตุโรคเพบริน *N. bombycis* ได้แก่ ไหมหม่อนหรือไหมบ้าน *B. mori* ซึ่งจากการศึกษาของ Patil และ Bai (1989) ในไหมพันธุ์ที่มีการฟักออกตลอดปี (multivoltine) 2 สายพันธุ์ และพันธุ์ที่มีการฟักออก 2 ครั้งต่อปี (bivoltine) 4 สายพันธุ์ ถึงความอ่อนแอต่อเชื้อ *N. bombycis* นั้น แสดงให้เห็นว่า ไหมพันธุ์ที่มีการฟักออกตลอดปีมีความต้านทานต่อเชื้อสูงกว่าพันธุ์ที่มีการฟักออก 2 ครั้งต่อปี ส่วน Mei และ Jin (1989) ได้ศึกษาถึงความรุนแรงของเชื้อ *N. bombycis* ต่อหนอนไหมและหนอน *Hemerophila* ซึ่งพบว่าเชื้อ *N. bombycis* นี้มีความรุนแรงต่อหนอนไหมมากกว่าหนอน *Hemerophila* อย่างชัดเจน โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 6.9×10^{2} สปอร์ต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าหนอนไหมรุ่นต่อมาในช่วงวัย 3 มีการติดเชื้อ 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความรุนแรงของโรคจากรายงานของ AICAF (1995) สรุปว่าถ้าหากมีการติดเชื้ออย่างรุนแรง หนอนไหมที่ฟักออกจากไข่ที่ติดเชื้อจะตายทันทีภายหลังจากที่ฟักออกมา แต่หากมีการติดเชื้อไม่รุนแรง หนอนไหมที่ฟักออกมาจะมีการเจริญเติบโตไม่เป็นปกติ และจะตายหลังจากวัย 3 แต่ถ้าหากติดเชื้อในช่วงวัย 1 และ 2 โดยการกินสปอร์ของเชื้อเข้าไป หนอนจะตายในช่วงระหว่างลอกคราบครั้งที่ 4 (เข้าสู่วัย 5) จนกระทั่งเข้าจ่อ ซึ่งในระยะนี้จะตรวจพบสปอร์จำนวนมากทั้งในตัวหนอนและมูลไหม สำหรับการติดเชื้อในวัย 4 และ 5 หนอนจะไม่แสดงอาการผิดปกติ สามารถทำรังได้ตามปกติ และฟักออกเป็นผีเสื้อได้ แต่ไข่ที่วางโดยแม่ผีเสื้อเหล่านี้จะติดเชื้อด้วย นอกจากนั้น Han และ Watanabe (1988) ยังรายงานว่า เชื้อ *N. bombycis* สามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่ไปยังรุ่นลูกหลานได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในตัวหนอนชั่วรุ่น (generation) ที่ 1 ที่ได้รับเชื้อโดยการถ่ายทอดผ่านทางไข่นั้น การติดเชื้อจะเป็นแบบเฉียบพลันและรุนแรง และหนอนส่วนมากจะตายในช่วงปลายวัย 3 แต่หากมีการผสมพันธุ์กันระหว่างผีเสื้อตัวผู้ที่ติดเชื้อกับตัวเมียที่ไม่ติดเชื้อ จะไม่พบการถ่ายทอดผ่านทางการผสมพันธุ์ สอดคล้องกับงานของ Patil และคณะ (1999) ที่พบว่าผีเสื้อตัวเมียที่ติดเชื้อเมื่อนำไปผสมพันธุ์กับผีเสื้อตัวผู้ที่ไม่ติดและติดเชื้อ จะพบเปอร์เซ็นต์หนอนที่

ฟักออกมาจากไข่ติดเชื้อสูงถึง 95.0 และ 96.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่นำผีเสื้อตัวผู้ที่ติดเชื้อเมื่อนำไปผสมพันธุ์กับผีเสื้อตัวเมียที่ไม่ติดเชื้อ กลับไม่พบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่เลย แต่สามารถตรวจพบสปอร์ของเชื้อเป็นจำนวนมากในส่วนรับอวัยวะสืบพันธุ์ตัวผู้ (bursa copulatrix) แต่ไม่พบในถุงเก็บอสุจิ (spermatheca) ของผีเสื้อตัวเมียที่ไม่ติดเชื้อ ที่ได้รับการผสมพันธุ์กับผีสื้อตัวผู้ที่ติดเชื้อดังกล่าว และจากการนำอัณฑะ (testis) ของผีเสื้อตัวผู้ที่ติดเชื้อมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบสปอร์ของเชื้อใน spermatocyte และ spermatid แต่ไม่พบในอสุจิ (sperm) ตรงกับผลการศึกษาของ Patil และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงบทบาทของผีเสื้อไหมตัวผู้ในการแพร่ระบาดของโรคเพบริน โดยศึกษาภาคตัดขวางของอัณฑะ (testis) ผีเสื้อหนอนไหมตัวผู้ที่ติดเชื้อ *N. bombycis* พบว่ามีสปอร์อยู่บริเวณเยื่อหุ้มอัณฑะ (peritoneal sheath) และ spermatid แต่ไม่พบสปอร์ใน sperm พบสปอร์จำนวนมากที่ส่วน bursa copulatrix ของแม่ผีเสื้อปกติ จับคู่กับผีเสื้อตัวผู้ที่ติดเชื้อ *N. bombycis* ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรกของการติดเชื้อผ่านการผสมพันธุ์ (venereal transmission) แต่ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่

3.4.2 แมลงอาศัยชนิดอื่น

นอกจากเชื้อ *N. bombycis* จะเข้าทำลายหนอนไหมแล้ว เชื้อ *N. bombycis* นี้ยังเข้าทำลายแมลงอาศัยได้อีกหลายชนิด ซึ่ง Kashkarova และ Khakhanov (1980a) ได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการใน Tashkent ประเทศรัสเซีย เพื่อประเมินผลของเชื้อ *N. bombycis* ต่อหนอนผีเสื้อในท้องถิ่น 7 ชนิด คือ *Agrotis segetum*, หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*), หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*), *Autographa gamma*, หนอนกะหล่ำใหญ่ (*Pieris brassicae*), หนอนผีเสื้อกะหล่ำ (*P. rapae*) และ *Lymantria dispar* โดยการปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยของสปอร์ พบว่าเฉพาะ *L. dispar* เท่านั้นที่ไม่อ่อนแอต่อเชื้อนี้ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบพัฒนาการของเชื้อทุกระยะใน ตัวหนอน ดักแด้ที่ผิดรูปร่าง และตัวต็มวัยที่ฟักออกมาจากดักแด้ที่รอดชีวิต ซึ่งจะให้ลูกหลานที่ติดเชื้อ ยกเว้นหนอนผีเสื้อหนอนกะหล่ำ และ *P. rapae* ที่ไม่สามารถสืบพันธุ์ภายในห้องปฏิบัติการได้ต่อไป (Kashkarova and Khakhanov, 1980b) และ Chandra (1987) รายงานว่าหนอน *Diacrisia obliqua* Walker ที่ปกติ เมื่อให้กินใบหม่อนที่ผสมด้วยสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ความเข้มข้น 4.6×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำหนอนจำนวน 400 ตัว มาตรวจสอบทีละตัวเพื่อดูพัฒนาการของเชื้อ พบว่ามีการติดเชื้อ 85.0 เปอร์เซ็นต์ และมีการตาย 66.25 เปอร์เซ็นต์ มีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่ในรุ่นต่อไป 94.3 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การตายของ *D. obliqua* ขึ้นอยู่กับการถ่ายทอดผ่านทางไข่ของเชื้อ ซึ่งเป็นแสดงให้เห็นถึงลักษณะของความรุนแรงของเชื้อในแมลงอาศัยชนิดใหม่ นอกจากนั้นมีรายงานว่าการถ่ายทอดเชื้อ *Nosema* sp. ที่เข้าทำลายหนอนไหมทาร์ซาร์ *Anthereae mylitta* D. มีลักษณะเฉพาะตัว คือ ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อจากแม่ผีเสื้อ

ไปสู่รุ่นลูกผ่านทางไข่ส่วนใหญ่มีค่า 85-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับของการถ่ายทอดและการเข้าทำลายในรุ่นลูกพบว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นของเชื้อที่เข้าทำลายแม่ผีเสื้อ ส่วนในผีเสื้อเพศผู้ไม่พบการถ่ายทอดแบบนี้ (Griyaghey and Sengupta, 2000) และยังมีข้อมูลที่แสดงว่าเชื้อ *N. bombycis* เข้าทำลายหนอนใยผัก (Diamondback moth; *Plutella xylostella*) ในประเทศมาเลเซีย โดยพบเชื้อสาเหตุโรคมากในเขตปลูกกะหล่ำปลีที่อยู่ในที่สูงหรือในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเชื้อ *N. bombycis* นี้มีประโยชน์ในการใช้ควบคุมหนอนใยผักโดยชีววิธี แต่ก็มีข้อเสียคือ เชื้อจะฆ่าตัวเบียนที่เข้าไปเบียนอยู่ในตัวหนอนของหนอนใยผัก ทำให้เป็นปัญหาอย่างมากในการเพิ่มปริมาณตัวเบียนของหนอนใยผักที่สำคัญ 3 ชนิด ในห้องปฏิบัติการ คือ *Cotesia plutellae* Kurdjumov, *Diadegma semiclausum* Hellen และ *Diadromus substilicornis* (Idris et al., 1997; Idris and Sajap, 2001) นอกจากนี้มีรายงานการพบเชื้อ *N. bombycis* ในหนอนกระทู้ (lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata*) ซึ่งสปอร์ของเชื้อที่มีรูปร่างคล้ายไข่ขนาด 3.60 x 2.11 ไมโครเมตร สามารถเข้าทำลายหนอนไหมและถ่ายทอดผ่านทางไข่สู่รุ่นลูกได้ แต่มีความรุนแรงน้อยกว่า *N. bombycis* สายพันธุ์มาตรฐาน (Iwano and Ishihara, 1991) สำหรับ สุชลวัจน์ และวัชรี (ม.ป.ป.) ได้ผลิตขยายไมโครสปอร์ริเดีย (โปรโตซัว) สกุล *Vairimorpha* spp. จากหนอนกระทู้ผัก โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 3 และใช้ความเข้มข้นของโปรโตซัวอัตรา 1.2 x 10^4 สปอร์ต่อตัว จากวิธีการเก็บสปอร์จากตัวหนอนที่ใกล้ตายและเพาะไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวสปอร์ได้มากที่สุดเฉลี่ย 1.34 x 10^{10} สปอร์ต่อตัว ส่วน Tsai และคณะ (2003) ยังได้แยก *Nosema* จากหนอนผีเสื้อ 5 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก และหนอนผีเสื้อกะหล่ำ และพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตในการทดลองนี้สามารถติดเชื้อและเพิ่มปริมาณได้ในหนอนกระทู้ผัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไอโซเลตจากหนอนกระทู้หอมมีความรุนแรงกับหนอนกระทู้ผักในขณะที่ ไอโซเลตของหนอนใยผักมีความรุนแรงต่ำที่สุด อีกทั้ง Idris และ Sajap (2003) ยังได้ศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *N. bombycis* ในหนอนใยผัก จากบริเวณพื้นที่ Cameron และ Serdang-Gombak ในประเทศมาเลเซียช่วงเดือนตุลาคม 1998 ถึง เดือนเมษายน 1999 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ *Nosema* ในระยะหนอนในพื้นที่ Cameron ให้ค่าที่สูงกว่า Serdang-Gombak ทั้ง 2 ฤดู นอกจากนั้นยังมีการศึกษาโดย Ku และคณะ (2007) ถึงไอโซเลตของเชื้อ microsporidian, PX2 จากผีเสื้อหนอนใยผัก อีกทั้งได้เปรียบเทียบกับไอโซเลต PX1 *N. spodopterae* และ *N. bombycis* ซึ่งพบยีน PX1 มีลักษณะที่ใกล้เคียงกับ *N. bombycis* และ *N. spodopterae* ทั้งยังมีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ *N. ceranae* ซึ่งเป็นปรสิตของผึ้ง *Apis mellifera* ในยุโรป จากการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบสปอร์ใน pollen basket ของผึ้งและเกสรที่เก็บได้จากการดักเกสรดอกไม้ โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนลำแสงส่องผ่าน และเทคนิค PCR โดยสปอร์ดังกล่าวทำให้เกิดการแพร่ระบาดของ *Nosema* ใน corbicular pollen ซึ่งผู้เลี้ยงผึ้งต้องระมัดระวังให้มาก (Higes et al., 2007)

3.4.3 อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงไหม

การเลี้ยงไหมแออัดกันในภาชนะเลี้ยงไหมทำให้การแพร่ระบาดของโรคเพบรินเร็วขึ้น (Bhat et al., 2009) อีกทั้งการรักษาความสะอาดในโรงเลี้ยงไหม และอุปกรณ์ในการใช้เลี้ยงไหมก็เป็นอีกปัจจัยที่ต้องพิจารณาถึง โดยการใช้สารเคมีอาทิ ฟอร์มาลีน (formaldehyde) ปูนคลอลีน (calcium hypochlorite) ด่างทับทิม (potassium permanganate) ปูนขาว (calcium oxide) โซดาไฟ (sodium hydroxide) เพื่อลดปริมาณการสะสมของโรคในโรงเรือนและในอุปกรณ์การเพาะเลี้ยง (ศิวิลัย และ สฤษดิพร, 2544)

3.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรค

3.5.1 เชื้อสาเหตุ

ในปัจจุบันพบว่าเชื้อก่อโรคมีความซับซ้อนมากขึ้น เนื่องจากมีการเข้าทำลายหนอนไหมด้วย microsporidium หลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Vairimorpha, Pleistophora* และ *Thelohamia* เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดทำให้เกิดโรคได้แตกต่างกันไป (Bhat et. al., 2009) ชนิดของเชื้อสาเหตุก็มีผลต่อความรุนแรงของโรคเพบรินเช่นกัน โดยจากการทดสอบการถ่ายทอดของเชื้อทางไข่ (transovarial transmission) ในเชื้อ *N. bombycis* และ *Nosema* sp. M11 ของ Han และ Watanabe (1988) พบว่า เชื้อ *N. bombycis* สามารถถ่ายทอดสู่ไข่ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Nosema* sp. M11 สามารถถ่ายถอดเชื้อได้เพียง 1.2 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งปริมาณของเชื้อก็ยังมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อเช่นกัน โดยจากการทดลองของ Revi และคณะ (1999a) เมื่อปลูกเชื้อ *N. bombycis* กับหนอนวัยไหม (*B. mori*) วัย 4 ที่ความเข้มข้น 0.66 x 10^7และ 0.34 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรนั้น หนอนไหมจะเข้าดักแด้ได้ 23.5 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในกรรมวิธีควบคุมหนอนไหมสามารถเข้าดักแด้ได้ถึง 92.5 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งเมื่อปลูกเชื้อกับหนอนไหมวัย 5 ด้วยเชื้อ *N. bombycis* ที่ความเข้มข้น 5.40 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพียง 20.5 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้น 0.66 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย 71 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบว่าที่ 5.40 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่เพียง 36.89 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ 99.96 เปอร์เซ็นต์ (Ravi et. al., 1999b)

3.5.2 แมลงอาศัย

สายพันธุ์ของหนอนไหมก็มีผลต่อความรุนแรงของโรคเพบรินเช่นกัน โดยพบว่าไหมพันธุ์จีนจะต้านทานโรคได้มากกว่าสายพันธุ์ญี่ปุ่นและยุโรป ตามลำดับ ส่วนในอินเดียพันธุ์ Lamerin เป็นพันธุ์ที่ถือว่าทนทานต่อโรคเพบริน เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ bivotine และ multivotine อื่นๆ (Bhat et. al., 2009) โดยเฉพาะพันธุ์ไทยพื้นเมือง (polyvoltine) ที่มีความต้านทานต่อโรคอยู่แล้ว (Patil and Bai, 1989)

3.5.3 แมลงชนิดอื่น

แมลงอาศัยชนิดอื่นนั้นอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ที่ส่งผลถึงการแพร่กระจายของเชื้อ *Nosema* sp. รวมทั้ง *N. bombycis* โดยจากการศึกษาพบว่ามีแมลงหลายชนิดด้วยกัน ที่เชื้อสามารถเข้าทำลายได้โดยในไต้หวันพบผีเสื้อ *Eurema blanda arsakia* พบการแพร่ระบาดของ microsporidiosis อย่างหนัก ซึ่งเป็นผลให้ประชากรผีเสื้อลดลงอย่างมาก (Tsai et al., 2009) รวมทั้งในประเทศเกาหลีพบเชื้อ *Nosema* sp. ในผีเสื้อหนอนกะหล่ำ (*P. rapae*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่แพร่ระบาดในแปลงปลูกสมุนไพร (brassicas) (Choi et al., 2002) รวมทั้ง Tsai และคณะ (2003) ยังได้แยกเชื้อ Microsporidian จากหนอนผีเสื้อ 5 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก และหนอนผีเสื้อกะหล่ำปลี อีกทั้งยังพบเชื้อ *N. bombycis* ในหนอนกระทู้ (lawn grass cutworm) และยังสามารถเข้าทำลายหนอนไหม รวมทั้งสามารถถ่ายทอดผ่านทางไข่สู่รุ่นลูกได้ แต่มีความรุนแรงน้อยกว่า *N. bombycis* สายพันธุ์มาตรฐาน (Iwano and Ishihara, 1991) จากการพบการแพร่ระบาดของของโรคเพบรินในแมลงศัตรูชนิดต่างๆ รวมทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้ในแมลงอาศัยนั้น รวมถึงยังสามารถกลับเข้าทำลายหนอนไหมได้ จึงเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มอัตราความเสี่ยงที่เชื้อจะแพร่ระบาดในแปลงปลูกพืชอาหาร รวมทั้งในพื้นที่การเลี้ยงไหม

3.5.4 สิ่งแวดล้อม

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อความรุนแรงของเชื้อ โดยในประเทศอินเดียจะพบการแพร่ระบาดของโรคเพบรินน้อยในฤดูร้อน แต่จะพบมากในฤดูหนาว ซึ่งเป็นไปได้ที่ในฤดูหนาวและฤดูฝนในประเทศแถบร้อนจะมีการเจริญของเชื้อมาก ส่วนเขตหนาวของประเทศอินเดีย เช่นในแคว้นแคชเมียร์ พบโรคเพบรินมากในช่วงฤดูร้อนและน้อยในฤดูใบไม้ผลิ ส่วนความคงทนของสปอร์โรคเพบรินในสภาพแวดล้อมนั้น สปอร์สามารถอยู่ในดินที่มีความชื้นถึง 225 วัน และในกองปุ๋ยหมักที่มีความชื้นได้ 135 วัน (Bhat et. al., 2009) และจากการทดสอบของ Chakrabatri และ Manna (2008) พบว่าอุณหภูมิและความชื้นมีผลโดยตรงกับเชื้อ โดยที่อุณหภูมิ 28.5-34.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 55-81 เปอร์เซ็นต์เชื้อจะเพิ่มปริมาณสูง โดยดูจากอัตราการตายของ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนอน และที่อุณหภูมิ 25.0-28.0 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65-72 เปอร์เซ็นต์เชื้อจะเพิ่มปริมาณช้าลง

4. การวินิจฉัยโรคเพบริน

4.1 การใช้กล้องจุลทรรศน์

การใช้กล้องจุลทรรศน์ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคเพบรินเป็นเทคนิคที่นิยมใช้มาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันในประเทศหรือหน่วยงานที่ยังไม่มีเทคนิคที่ทันสมัยกว่านี้ สามารถตรวจได้ทั้งระยะไข่ หนอน และแม่ผีเสื้อ แต่วิธีที่นิยมมากที่สุดคือการตรวจในแม่ผีเสื้อ เรียกวิธีนี้ว่า "mother moth examination" เนื่องมาจากการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่นั้น ไข่ที่ติดเชื้อจะต้องวางโดยแม่ผีเสื้อที่ติดเชื้อเท่านั้น และโดยทั่วไปหนอนไหมที่ติดเชื้อในระหว่างวัย 4 และ 5 จะมีชีวิตอยู่รอดจนถึงระยะตัวเต็มวัย และเชื้อเพิ่มปริมาณในเนื้อเยื่อของแมลงอาศัย มีการสร้างสปอร์ที่แข็งแรง (active) ในระยะผีเสื้อ และสามารถตรวจพบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นการตรวจแม่ผีเสื้อเท่านั้นที่ให้ผลที่แม่นยำในการตรวจโรคเพบริน และการตรวจโรคเพบรินที่ให้ผลแม่นยำสปอร์จะต้องแยกจากเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ (Fujiwara, 1994)

สำหรับวิธีการที่มีการนำมาใช้ตรวจสอบหาสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อีกวิธีหนึ่งคือ การย้อมสีสปอร์ โดยมีการใช้สี Giemsa ในการตรวจสอบเชื้อ *N. bombycis* ที่เข้าทำลายหนอนกระทู้หอม ซึ่งพบว่าการย้อมสปอร์ด้วยสี Giemsa นี้สามารถใช้ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อได้ โดยนิวเคลียส และ acidophilic organelle ในไซโทพลาสซึมของเชื้อจะย้อมติดสีแดง ในขณะที่ไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงิน (Idris et al., 1997) และสามารถแยกความแตกต่างของระยะ เมอรอนท์ สปอรอนท์ และสปอร์ ออกจากกันได้เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยดูจากความหนาของผนังเซลล์ของแต่ละระยะของเชื้อ (Tanaka and Kaya, 1993 อ้างถึงโดย Idris และคณะ, 1997) ส่วน Tang และคณะ (2002) ได้นำสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* เชื้อรา *Aspergillus flavus, Nomuraea rileyi* และเกสรของดอกกุหลาบ (*Rosa chinensis*) ที่เก็บไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายกับเชื้อ *N. bombycis* มาย้อมสีโดยใช้วิธี chromotrope 2R เพื่อศึกษาผลของการย้อมสีและเวลาที่เหมาะสมในการย้อม พบว่าเมื่อใช้วิธีการนี้ สปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ติดสีชมพู แต่เชื้อราและเกสรดอกกุหลาบไม่ติดสี ส่วนเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย้อมสปอร์ คือ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธี chromotrope 2R นี้สามารถใช้ตรวจสอบและจำแนกสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ภายในตัวหนอนไหมได้ และยังเป็นแนวทางที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้เป็นวิธีการย้อมที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง และมีความง่ายการนำไปใช้ รวมทั้งได้มีการศึกษาสภาวะที่มีผลต่อการ fix สปอร์เพื่อใช้ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตอนของเชื้อ *N. apis* และ *N. bombycis* ด้วย paraformaldehyde และเทคนิค formaldehyde ซึ่งให้ผลเทียบเท่าหรือ

ดีกว่า glutaraldehyde (Larsson, 2005) โดย Chakrabarti และ Manna (2006) ได้ศึกษาความแตกต่างของสปอร์เชื้อ *Nosema* spp. ที่ได้จากไหมบ้าน (ไหมหม่อน) ไหมทาซาร์ (*Antheraea mylitta* D.) ไหมอีรี่ (*Philosamia ricini* B.) และไหมมูก้า (*A. assamensis* Ww.)โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงธรรมดา พบว่า สปอร์ของเชื้อ *Nosema* spp. ที่ได้จากไหมทาซาร์และมูก้ามีอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้าง และปริมาตรของสปอร์มากที่สุด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนลำแสงส่องกราด (SEM) พบว่าผิวสปอร์ของเชื้อ *Nosema* spp. ที่ได้จากไหมหม่อนและไหมทาซาร์มีผิวสปอร์ที่เรียบ ขณะที่ผิวสปอร์ของเชื้อจากไหมอีรี่และไหมมูก้า มีผิวขรุขระและเป็นคลื่น เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (TEM) พบว่าผนังสปอร์ (exospore) ของ *Nosema* spp. จากไหมบ้านและไหมอีรี่มีความหนาสม่ำเสมอ ในขณะที่จากไหม ทาซาร์และมูก้ามีลักษณะเป็นลูกคลื่น จำนวนขดของ filament มีขนาดแตกต่างกันถึง 12 ลักษณะของเชื้อดังกล่าว รวมทั้งความแตกต่างของมุมที่เอียงทำมุมกับแกน polar filament ของสปอร์ จากการศึกษานี้พบ *Nosema* 3 species ใหม่ โดยให้ชื่อว่า *N. mylitta n.* sp. จากไหมทาซาร์ *N. ricini n.* sp. จากไหมอีรี่ และ *N. assamensis n.* sp. จากไหมมูก้า

4.2 การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology technique) เป็นเทคนิคที่มีความเจริญรุดหน้าอย่างรวดเร็ว และมีการประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในหลายสาขาวิชา ซึ่งในการใช้ ตรวจ แยก และจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต เชื้อสาเหตุโรคต่าง ๆ รวมไปถึงเชื้อ *N. bombycis* สาเหตุโรคเพบรินนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน คือ

4.2.1 การใช้เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบเชื้อ *N. bombycis* สาเหตุโรคเพบรินของไหม โดยมีเทคนิคต่าง ๆ เช่น latex agglutination test, ELISA test และ western blot เป็นต้น Mike และคณะ (1989) ได้ใช้ latex agglutination test เพื่อตรวจสอบสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis, Nosema* sp. M11 และ *Vairimorpha* sp. M12 ที่เข้าทำลายแม่ผีเสื้อ พบว่า slide agglutination test ที่มี monoclonal antibody-sensitized latex particle ที่เฉพาะเจาะจงต่อสปอร์เชื้อ *N. bombycis, Nosema* sp. M11 และ *Vairimorpha* sp. M12 สามารถจับกับตัวอย่างที่บดจากแม่ผีเสื้อที่ติดเชื้อ *N. bombycis*, *Nosema* sp. M11 และ *Vairimorpha* sp. M12 ตามลำดับ ซึ่งเทคนิคนี้เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคเพบริน ส่วน Yasunaga และคณะ (1992) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไมโครสปอริเดียที่เข้าทำลายหนอนกระทู้หอม (*Nosema* sp. Y9101) โดยใช้ latex adhesion test และใช้ latex particle ซึ่งจับกับแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (monoclonal antibody) และ โพลีโคลนอล แอนติบอดี (polyclonal antibody) ของ

เชื้อ Nosema ต่าง ๆ กัน พบว่าสปอร์ของเชื้อ *Nosema* sp. Y9101 เกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีของสปอร์เชื้อ *N. bombycis* NIS 001 จึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Nosema* sp. Y9101 นี้เป็นสายพันธุ์ (strain) หนึ่งของเชื้อ *N. bombycis* นอกจากนั้นการศึกษาของสุกานดา (2547) พบว่าการตรวจสอบเชื้อ *N. bombycis* ด้วยการใช้เทคนิค indirect-ELISA โดยใช้แอนติซีรั่ม (antiserum) ที่ได้จากการผลิตด้วยสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำ และแอนติซีรั่มที่ได้จากการผลิตด้วยสารแขวนลอยสปอร์ในด่าง มีความไวในการตรวจสอบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 9 และ 8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.2.1.1 Latex agglutination test

เป็นการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากแอนติเจนและแอนติบอดีมาเกาะกันเป็นร่างแหและตกตะกอนออกมาเช่นเดียวกับปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation) หากแต่แอนติเจนที่เกิดจากปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มนั้นจะเป็นพวกเซลล์ต่างๆ เช่น เม็ดเลือด แบคทีเรีย หรือแอนติเจนอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่ แต่ถ้าในกรณีที่แอนติเจนมีขนาดเล็ก เช่น อยู่ในรูปสารแขวนลอยไวรัส สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาได้ โดยนำแอนติเจนไปติดไว้บน carrier ที่มีขนาดใหญ่ระดับเซลล์ ก็จะสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นกัน

Latex agglutination วิธีนี้ได้มีการประยุกต์มาจากวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสของพืชและแมลงในประเทศญี่ปุ่น (Shimizu et al., 1983) ด้วยการใช้สารสังเคราะห์ซึ่งเป็น polymer ของ polystyrene latex bead เรียกว่า latex particle มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.81 ไมโครเมตร ซึ่งวิธี latex agglutination เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจสอบวินิจฉัย โดยการใช้ polystyrene latex bead เป็น carrier ของแอนติเจนหรือแอนติบอดี และ latex bead ที่ถูกเคลือบด้วยตัวทำปฏิกิริยาตัวใดตัวหนึ่งแล้วจะเรียกว่า sensitized latex แอนติบอดีที่นำมาใช้ก็ควรบริสุทธิ์ (purified IgG) เพื่อทำให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะเจาะจงดีขึ้น โดยพบว่าวิธีนี้ช่วยให้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ในปริมาณที่น้อยกว่าวิธี microprecipitin test หรือ immunodiffusion ถึง 100-1,000 เท่า (รัชนี, 2540)

การทดลองของ Shamim และคณะ (1997) ด้วยการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MCA) เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *N. bombycis* ของไหม ซึ่งเขาได้นำวิธี latex agglutination มาใช้ โดย MCA ที่นำมาใช้ทดสอบมี 4 ชุด คือ MA310, MA542, MA503 และ MA515 ส่วนเชื้อที่นำมาทดสอบร่วมได้แก่ เชื้อ *nucleopolyhedrovirus*, *Rhizobium, Azotobactor*, *B. thuringiensis* (Bt), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) และน้ำเลือดจากหนอนปกติ (normal hemolymph) เพื่อดูความเฉพาะเจาะจงของ MCA ต่อเชื้อสาเหตุโรคเพบริน ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำ MA503 และ MA515 ที่ความเข้มข้นระดับ 8.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถ

ตรวจพบตะกอนของเชื้อได้ดีที่สุด คือ สามารถเกิดปฏิกิริยาให้ผลเป็นบวกได้ที่ความเข้มข้นของแอนติเจนที่น้อยที่สุดคือ 1 x 10^5 สปอร์ต่อการทดสอบ และมากที่สุดที่สามารถสังเกตได้คือ ที่ความเข้มข้น 1 x 10^9 สปอร์ต่อการทดสอบ แต่ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 - 1 x 10^8 จะเกิดปฏิกริยาการตกตะกอนได้สูงสุด ในขณะที่ใช้แอนติเจนตัวอื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบร่วมที่ความเข้มข้น 1 x 10^8 สปอร์ต่อการทดสอบ และโปรตีนจากน้ำเลือดของหนอนไหมปกติที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อการทดสอบ ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับแอนติบอดี และเมื่อมีการประยุกต์ใช้ protein-A ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ร่วมกับวิธีดังกล่าวจะสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อ *N. bombycis* ได้ดีขึ้นที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 x 10^4 สปอร์ต่อการทดสอบ ในขณะที่หากไม่ได้เคลือบด้วย protein-A จะเกิดปฏิกิริยาได้ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1 x 10^5 สปอร์ต่อการทดสอบ

นอกจากนี้ Baig และคณะ (1992) ได้ทดสอบโดยการนำ protein-A ที่แยกได้มาจากเชื้อ *S. aureus* (Cowan's strain) มาเคลือบด้วย polystyrene latex bead ก่อน เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพและทำให้แอนติบอดีมีความเฉพาะเจาะจงสูงขึ้น ซึ่งเรียกว่า protein-A linked latex antisera (PALLAS) และมีรายงานว่า PALLAS นี้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า latex agglutination ที่ไม่ได้มีการเคลือบด้วย protein-A นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาใช้ latex polystyrene bead สีต่างๆ คือ สีขาว สีฟ้า และสีแดง (Bangs laboratory) แล้วเคลือบด้วย protein-A โดยได้มีการทดลองใช้ด้วยการผสมด้วยสาร glycine buffer saline (GBS) 25 ไมโครลิตร ร่วมกับสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ที่บริสุทธิ์ 25 ไมโครลิตรและ latex bead 25 ไมโครลิตรผลจากการสังเกตการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มด้วยตาเปล่า พบว่า latex polystyrene ที่หุ้มด้วย protein-A สามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างชัดเจนที่ระดับความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ที่ 1 x 10^6 สปอร์ต่อการทดสอบ และพบว่ามีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า latex polystyrene ที่ไม่ได้หุ้มด้วย protein-A ได้ถึง 10 เท่า

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับขนาดอนุภาคของ polystyrene latex พบว่ามีความสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาในการเกิดการเกาะกลุ่มกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน ซึ่งมีการทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค polystyrene latex ระหว่าง 0.12-1.00 ไมโครกรัม และสรุปได้ว่าที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.81 ไมโครเมตร ให้ผลต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด (Hayasaka and Ayuzawa, 1987)

4.2.1.2 Gel diffusion technique

วิธีนี้เป็นการทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีภายในวุ้นกึ่งแข็ง (semisolid) โดยแอนติเจนและแอนติบอดีมีการซึมผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นเข้าหากันจนถึงบริเวณที่มีสัดส่วนพอเหมาะกัน แอนติเจนและแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยารวมตัว

กันเห็นเป็นเส้นตะกอนสีขาวขุ่น เส้นตะกอนแต่ละเส้นแสดงถึงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแต่ละคู่ (นภาธร, 2543) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ต้องการความสมดุลของระดับความเข้มข้นของแอนติเจนและแอนติบอดี เพราะหากมีอย่างใดอย่างหนึ่งมากเกินไปจะไม่สามารถเห็นแถบของปฏิกิริยาได้ Knell และ Zam (1978) ได้นำเทคนิค double immunodiffusion มาใช้ในการตรวจสอบเพื่อแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ microsporidia 6 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อ *N. bombycis, N. algerae, N. plodiae* และเชื้ออีก 3 ไอโซเลต ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อ *N. necatrix* คือ *Nosema* sp. 942, *Nosema* sp. 954, *Nosema* sp. 960 โดยสปอร์ถูกทำให้แตกใน MSK Braun cell homogenizer เพื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจน ผลการทดลองพบว่า เกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างเชื้อ *N. plodiae, Nosema* sp. 942 และ *Nosema* sp. 960 ในขณะที่เชื้อ *Nosema* sp. 954, *N. bombycis* และ *N. algerae* ไม่มีความสัมพันธ์กัน

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาเพื่อการวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันของเชื้อ *N. bombycis* โดย agar gel diffusion test, immunofluorescence technique และ agglutination test ซึ่งพบว่า agar gel diffusion test ให้ผลเป็นลบ โดยไม่สามารถมองเห็นการตกตะกอนได้เลย อาจเนื่องจากคุณสมบัติของแอนติเจนที่ไม่สามารถละลายได้ จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ ทำให้ไม่สามารถแพร่ผ่านวุ้นไปได้ ในขณะที่การตรวจสอบด้วย agglutination test ให้ผลเป็นบวก ซึ่งได้ตรวจสอบยืนยันผลอีกครั้งด้วย indirect fluorescent antibody test และ ELISA test (Sengupta et al., 1993)

4.2.1.3 ELISA test

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) เป็นการทดสอบประเภทภูมิคุ้มกันโรค (immunoassay) ที่ใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลาก แอนติบอดีหรือแอนติเจนจะติดอยู่กับวัสดุที่เป็นของแข็ง (solid phase assay) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการตรวจสอบไวรัส แบคทีเรีย ไฟโตพลาสมา และเชื้อรา หลักการของวิธีนี้โดยทั่วไปคือ การติดฉลากแอนติบอดีด้วยเอนไซม์ เมื่อให้แอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ติดฉลากแล้วสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยการเติมสับสเตรท (substrate) ลงไป ผลที่เกิดขึ้นคือ การเปลี่ยนสีของสับสเตรทซึ่งสามารถอ่านได้ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer) เอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ alkaline phosphatase ซึ่งเมื่อเติม n-nitrophenyl phosphate ที่เป็นสับสเตรทลงไป สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ทำให้มองเห็นปฏิกิริยาได้ชัดเจน สามารถแบ่ง ELISA test ออกเป็น 2 วิธีการหลักๆ คือ (รัชนี, 2540)

1. Direct-ELISA test วิธีนี้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนจะถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติเจนแล้วสามารถตรวจสอบผลของปฏิกิริยาได้โดยการเติมสับสเตรท

2. Indirect-ELISA test วิธีนี้จะต้องใช้ enzyme-labelled secondary antibody ในการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่ต้องการศึกษา (primary antibody)

ซึ่งวิธี indirect-ELISA นั้น มีข้อได้เปรียบกว่าวิธี direct-ELISA เนื่องจากสามารถใช้ conjugate ชนิดเดียวสำหรับการตรวจหาแอนติเจนได้หลายๆ ชนิด โดยมีข้อแม้ว่าแอนติบอดีจำเพาะตัวที่ 2 นั้น จะต้องได้มาจากสัตว์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ผลิตแอนติบอดีจำเพาะตัวที่ 1 นอกจากนี้โดยปกติแล้ววิธี indirect-ELISA จะมีความไวกว่าวิธี direct-ELISA ในการตรวจหาแอนติเจนชนิดเดียวกัน (นภาธร, 2530)

ผลจากการศึกษาของ Kawarabata และ Hayasaka (1987) โดยใช้เชื้อ microsporidia ที่ได้จากหนอนไหมจำนวน 8 ไอโซเลต คือ เชื้อ *N. bombycis* ไอโซเลต NIS 001 ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานในญี่ปุ่น, และอีก 7 ไอโซเลต คือ NIS 402, NIS 408, NIS 520, NIS 611, NIS M11, NIS Sakusan และ NIS M12 ปลูกเชื้อให้แก่ไหมในวัย 2 พันธุ์ 137x137 เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ จากการศึกษาเกี่ยวกับแอนติเจน (สารแขวนลอยของผิวสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* ในสารละลายด่าง) และการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าจะมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากที่สุดเมื่อใช้แอนติซีรั่ม (antiserum) ของเชื้อเจือจางอัตรา 1:500 และใช้ goat anti rabbit IgG conjugate เจือจางอัตรา 1:1,000 และความเข้มข้นของโปรตีนจากผิวสปอร์ที่ได้จากการละลายในด่างน้อยที่สุดเท่ากับ 600 นาโนกรัม ปริมาณเทียบเท่ากับแอนติเจนที่ได้จากสปอร์จำนวน 7,000 สปอร์ ผลการตรวจด้วยวิธี ELISA กับสปอร์ของเชื้อ microsporodia ที่สามารถทำให้เกิดโรคกับไหม โดยใช้แอนติบอดีของแอนติเจนที่ผลิตจากผิวสปอร์ (สปอร์ละลายด้วยด่าง) พบว่า แอนติเจนที่ผลิตจากผิวสปอร์เชื้อไอโซเลต NIS 001, NIS 408 และ NIS 520 มีปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีของเชื้อ *N. bombycis* (anti- *N. bombycis*) คล้ายกัน ส่วนที่เกิดปฏิกิริยาได้ระดับปานกลาง คือ แอนติเจนจากผิวสปอร์ของเชื้อไอโซเลต NIS M11, NIS 402, NIS Sakusa และ NIS 611 กับแอนติบอดีจากเชื้อไอโซเลต NIS 001 ในขณะที่แอนติเจนจากผิวสปอร์ของเชื้อ NIS M12 ให้ผลแตกต่างอย่างมากกับเชื้อ *Nosema* sp. ไอโซเลตอื่นๆ

Mike และคณะ (1988) ได้มีการศึกษานำเซลล์ม้ามจากหนูสายพันธุ์ BALB/C ที่ได้รับการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันด้วยสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* (Nb), *Nosema* sp. (M11) และ *Varimorpha* sp. (M12) โดยการนำมาเชื่อมกับเซลล์มะเร็ง (myeloma cell) NS-1 แล้วได้เป็นเซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) ที่มีความเสถียร 3 โคลน ซึ่งสามารถผลิตแอนติบอดีได้ 3 ชนิด คือ N321, E324 และ T240 เมื่อนำแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดไปตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า แอนติบอดีดังกล่าวมีความเฉพาะเจาะจงต่อสปอร์ของเชื้อ Nb, M11 และ M12 ตามลำดับ

ต่อมา Miyamoto (1989)ได้นำเทคนิค enzyme immunoassay (EIA) มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *N. bombycis* ซึ่งจะทำการทดลองในหลอด centrifuge พบว่า เมื่อใช้ rabbit anti – *N. bombycis* spore γ-globulin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ sheep anti-rabbit เจือจางด้วย conjugate buffer อัตรา 1:50 สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ความเข้มข้นของสปอร์ที่ต่ำสุด คือ 2×10^5 สปอร์ต่อหลอด ที่ค่าการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Ke และคณะ (1990) พบว่า เมื่อนำ เซลล์ลูกผสม (hybridoma cell) ที่ได้จากการนำเซลล์ม้ามจากหนูสายพันธุ์ BALB/C ซึ่งได้รับการกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันด้วยสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* เพื่อให้สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ของแอนติเจนที่ได้จากผิวสปอร์ของเชื้อ *N. bombycis* เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนได้ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดเทียบเท่ากับสปอร์ที่ละลายในด่างจำนวน 400 สปอร์ และเมื่อนำโมโนโคลนอลของเชื้อ *N. bombycis* ที่ผลิตได้ไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ microsporidia อีก 6 ไอโซเลต ปรากฏว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *N. bombycis* 2 ไอโซเลต, *N. pyrausta* และ *N. furnacalis* ในขณะที่เกิดปฏิกิริยาน้อยมากกับเชื้อ *N. liturae* และ *N. antheraeae* แต่ไม่สามารถสังเกตพบการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยสปอร์ของเชื้อ *N. locustae*

4.2.1.4 Immunofluorescense technique

เทคนิคนี้เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้เพื่อการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลาก เป็นสารที่สามารถติดฉลากกับแอนติเจนหรือแอนติบอดีได้โดยไม่ทำให้คุณสมบัติเสียไป สารเรืองแสงที่นิยมใช้คือ fluorescent และ rhodamine ซึ่งอยู่ในรูปของ fluorescent isothiocyanate (FITC) และ tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) ตามลำดับ สารเรืองแสงเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สามารถดูดซับ (absorb) แสงสีหนึ่ง และปล่อย (emit) แสงอีกสีหนึ่งออกมา สารเรืองแสงทำหน้าที่ดูดซับแสงที่มีความยาวคลื่นน้อยซึ่งมีพลังงานสูง และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นมากกว่าซึ่งมีพลังงานต่ำกว่าออกมา โดย FITC สามารถดูดซับแสงความยาวคลื่น 490 - 495 นาโนเมตร และปล่อยแสงความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งเป็นแสงสีเขียวได้มากที่สุด ส่วน TRITC ดูดซับแสงความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และปล่อยแสงความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ซึ่งเป็นแสงสีแดงได้มากที่สุด (นภาธร, 2543) ข้อดีของการตรวจสอบโดยวิธีนี้ได้แก่ สามารถตรวจสอบแอนติเจนที่มีปริมาณน้อยได้ และยังใช้ได้กับตัวอย่างที่ทึบแสง (opaque object) แต่ข้อจำกัดของวิธีการ คือ จำเป็นต้องตรวจผลดูการเรืองแสงของตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope) และพบว่าแสงที่เรืองออกมานั้นจะค่อยๆ เลือนหายไป (fading) ในช่วงที่มีการให้แสง UV (รัชนี, 2540)

Sato และคณะ (1981) ได้ศึกษาเชื้อ *N. bombycis* และเชื้อ microsporidia อีก 7 ชนิดที่แยกได้จากหนอนไหมโดยเทคนิค indirect fluorescent antibody ซึ่งเชื้อ microsporidia เหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้ง ความสามารถในการทำให้เกิดโรค เนื้อเยื่อเป้าหมายที่เข้าทำลาย และลักษณะสัณฐานวิทยาของสปอร์ จากการศึกษาพบว่ามีเชื้อ microsporidia 4 ชนิดที่มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาเหมือนกับเชื้อ *N. bombycis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามสปอร์ของเชื้อ microsporidia อีก 3 ชนิด เกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติซีรั่มที่ได้จากตัวมันเองเท่านั้น (homologous antiserum) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เทคนิคนี้ดูเหมือนจะเป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์ที่สุดในการจำแนกชนิดของ microsporidia ที่เข้าทำลายในหนอนไหมได้

4.2.2 PCR technique

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA) โดยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอที่ใช้เป็นต้นแบบในสภาพหลอดทดลอง ภายในระยะเวลาอันสั้น เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1985 โดย Kary Mullis และคณะ จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย ปัจจุบันเทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้าน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA เป็นต้น (พิสสวรรณ, 2540)

การทดลองของ Kawakami และคณะ (2001) โดยการนำเทคนิค PCR และการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เฉพาะเจาะจงมาช่วยในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคเพบริน โดยใช้เชื้อ microsporidia 16 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย *N. bombycis* 7 ตัวอย่าง เชื้อโปรโตซัวสกุล *Nosema* 5 ตัวอย่าง สกุล *Vairimorpha* 3 ตัวอย่าง และสกุล *Pleistophora* 1 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ KAI 01 และ KAI 02 มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *N. bombycis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากไหม *B. mori* คือ *Nb* NIS 001, *Nb* SES-NU, *Nb* Bansal, *Nb* Anekal และ *Nb* Zhenjiang โดยพบว่ามีผลผลิตที่ได้จาก PCR เกิดขึ้น น้ำหนักโมเลกุลของผลผลิตที่ได้มีค่าประมาณ 860 คู่เบส (bp) ในขณะที่อีก 2 สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงชนิดอื่น (wild insect) คือ *Nb* Sd-NU-IW 8401 และ *Nb* Y9101 รวมทั้งกลุ่มของสกุล *Nosema* ชนิดอื่นๆ (*N. apis*, *N. furnacalis*, *N. mylittensis*, *N. tyriae*, *Nosema* sp.) สกุล *Vairimorpha* (*Vairimorpha* sp. NIS-M11, *Vairimorpha* sp. NIS-M12, *V. necatrix*) และสกุล *Pleistophora* (*Pliestophora* sp. Sd-NU-IW8201) พบว่าไม่เกิดการสร้างผลผลิตที่ได้จาก PCR ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kawakami และคณะ (1995) ที่มีการทดลองใช้ไพรเมอร์ KAI 01 และ KAI 02 ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ microsporidia 6 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *N. bombycis* (Nb)

3 สายพันธุ์ (strain) คือ SES-NU และ NIS-001 ซึ่งเป็น reference strain และ Sd-NU-IW 8401 ซึ่งแยกได้จาก *Spodoptera depravata* ส่วนอีก 3 ชนิด คือ *Nosema* sp. ไอโซเลต NIS M11, *Vairimorpha* ไอโซเลต NIS-M12 และ *Pleistophora* sp. ไอโซเลต P1-NU ผลการทดลองที่ได้คือ เชื้อ *N. bombycis* สายพันธุ์ SES-NU และ NIS-001 เท่านั้นที่สามารถให้ผลผลิตจาก PCR รวมทั้ง Klee และคณะ (2006) ได้พัฒนาวิธีการทำ PCR เพื่อใช้ตรวจสอบ *Nosema bombi* ในผึ้ง bumble bee ให้แม่นยำโดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ rRNA ยีนซึ่งพบว่ามีเพียง ไพรเมอร์คู่ Nbombi-SSU-Jf1/Jr1 ที่แยกความแตกต่างของ *Nosema bombi* (323 bp amplicon) ออก จากปรสิตของผึ้งชนิดอื่นๆ ได้ การใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ร่วมกัน (Nbombi-SSU-Jf1/Jr1 และ ITS-f2/r2) จะเพิ่มความจำเพาะและความแม่นยำในการตรวจเชื้อ *Nosema bombi* ในทุกระยะของการ พัฒนาการของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และการใช้ไพรเมอร์หลายชนิด (multiprimer) นั้นก็เป็นอีกวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหนอนไหมและไข่ของหนอนไหม ที่ติดเชื้อ *N. bombycis* (Hatakeyama and Hayasaka, 2002; 2003)

4.2.3 การใช้ดีเอ็นเอติดตาม

ดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) หมายถึง ดีเอ็นเอชิ้นส่วนจำเพาะที่นำมาใช้เป็นตัวกลาง ติดตามดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่สนใจจะตรวจสอบหรือตรวจหา โดยทำให้ดีเอ็นเอติดตามอยู่ใน สภาพสายเดี่ยว แล้วไปจับคู่กับดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบที่ทำให้เป็นเส้น เดี่ยวแล้วเช่นกัน ซึ่งดีเอ็นเอจะจับคู่กันถ้าเป็นเบสคู่สมกัน ถ้าหากติดฉลากดีเอ็นเอที่เป็นตัวติดตาม ด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารไร้กัมมันตภาพรังสี ก็จะสามารถตรวจพบดีเอ็นเอชนิดที่ต้องการ ได้ เทคนิคนี้มีความไวในการตรวจสอบหาดีเอ็นเอในระดับพิโคกรัม (pg) และมีข้อดี คือ ดีเอ็นเอมี ความคงทนและคงสภาพอยู่ได้ในสภาวะต่าง ๆ กัน ตรวจสอบดีเอ็นเอเฉพาะชนิดได้ทั้งในระดับ กว้างและเฉพาะเจาะจง แต่มีข้อด้อยคือ ต้องมีความชำนาญเฉพาะด้านทั้งปฏิบัติและแปลผล สารเคมี มีราคาแพง และสารเคมีหลายชนิดอันตราย เทคนิคบางอย่างมีความสลับซับซ้อนใช้เวลานาน (สุรินทร์, 2543)

Malone และ McIvor (1995) ได้ตรวจสอบเชื้อไมโครสปอริเดีย 2 ชนิด คือ *N. bombycis* และ *N. costelytrae* ด้วยการใช้ดีเอ็นเอติดตาม 2 ชนิดที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยนำ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นมาจับ (hybridize) อย่างเฉพาะเจาะจงกับ genomic DNA ของเชื้อ *N. bombycis* และ *N. costelytrae* พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 ชนิดไม่จับกับดีเอ็นเอของเชื้อไมโคร สปอริเดียอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ คือ *N. apis*, *Vairimorpha* sp. จากผีเสื้อหนอนกะหล่ำ (*P. rapae*) และเชื้อ *Vavraia oncoperae* 2 ไอโซเลต ซึ่งไอโซเลตแรกแยกได้จาก New Zealand grass grub, (*Costelytra zealandica*) และอีกไอโซเลตได้จาก porina caterpillar (*Wiseana* spp.) และพบว่า ดีเอ็น

เอติดตามของเชื้อ *N. bombycis* ไม่จับกับ genomic DNA ที่ได้จากเชื้อ *N. costelytrae* หรือกับดีเอ็นเอที่ได้จากหนอนไหม ซึ่งเป็นแมลงอาศัยหลัก (primary insect host) ของเชื้อ *N. bombycis* ในทำนองเดียวกันดีเอ็นเอติดตามสำหรับเชื้อ *N. costelytrae* ก็ไม่จับกับ genomic DNA ที่ได้จากเชื้อ *N. bombycis* หรือกับดีเอ็นเอที่ได้จาก New Zealand grass grub ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิคดีเอ็นเอติดตามเป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจง และสามารถใช้แยกเชื้อ *N. bombycis* ออกจากเชื้อไมโครสปอริเดียอื่น ๆ ได้

4.2.4 การใช้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ (ทรงศักดิ์, 2539; รสนา, 2539)

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เป็นเทคนิคในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอของสารพันธุกรรม โดยทั่วไปมีวิธีการหาลำดับอยู่ 2 วิธีคือ วิธีทางเคมี (chemical degradation method) ของ A.M. Maxam และ W. Gilbert ในปี 1977 ที่มหาวิทยาลัยฮาวาร์ด และวิธีทางเอนไซม์ (enzymatic method หรือ dideoxytermination method) ของ F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson ในปี 1977 ที่ M.R.C. Lab. แคมบริดจ์ ในอังกฤษ มีหลักการสำคัญคือ ต้องแยกดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสออกเป็นสายเดี่ยว ติดฉลากสายดีเอ็นเอด้วย ^{32}p เพื่อสะดวกในการติดตาม หรือตัดสายดีเอ็นเอให้ขาดตรงเบสหนึ่งเบสใดอย่างจำเพาะ และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เป็นสัดส่วนกับขนาดของโมเลกุล โดยไม่ขึ้นกับชนิดของเบสที่มีในชิ้นดีเอ็นเอนั้นๆ โดยบอกความแตกต่างได้แม้ว่าชิ้นดีเอ็นเอแต่ละชิ้นนั้นจะมีขนาดต่างกันเพียง 1 เบส เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอดังกล่าวไม่ยาวมากนัก ประมาณไม่เกิน 500 เบส ซึ่งวิธีการทั้งคู่จะให้ผลเป็นชิ้นของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันโดยมีจุดเริ่มที่เดียวกัน แตกต่างที่จุดสิ้นสุดซึ่งเป็นแบบสุ่ม

ปัจจุบันนี้สามารถที่จะทำการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) ซึ่งจะใช้สารเรืองแสง (fluorochrome) ติดฉลากเข้าที่ปลาย 5' ของไพรเมอร์ (primer) หรือดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) แทนการใช้สารรังสีหรือสารปลอดรังสีชนิดอื่น โดยใช้วิธีการทางเอนไซม์ของ Sanger เช่นเดียวกัน ซึ่งเครื่องมือดังกล่าวจะมีกล้องพิเศษ (CCD-camera) คอยตรวจจับการเรืองแสง เมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอติดฉลากสาร fluorochrome เคลื่อนตัวผ่านลำแสงเลเซอร์ มีการแสดงลำดับเบสในรูปกราฟแบบ real time และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย ซึ่งจะทำให้ประหยัดเวลากว่าวิธีทั่วไป และไม่ต้องกลัวอันตรายอันเกิดจากการใช้สารรังสี อย่างไรก็ดีเทคนิคนี้ยังมีต้นทุนสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของฮาร์ดแวร์ (hardware) เช่น ตัวเครื่องโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลและควบคุมการทำงานของเครื่อง มีราคาแพงมาก

การหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) การหาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์นี้ได้มีการดัดแปลงไปอีกมากมาย เพื่อให้สามารถอ่านลำดับเบสได้มากขึ้นในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง เช่น การใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่างกันแบบต่อเนื่อง (buffer gradient) ให้เจลที่มีความเข้มข้นต่างกันแบบต่อเนื่อง (gradient gel) ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าที่ต่างกันแบบต่อเนื่อง (field strength gradient) ใช้เจลที่มีความหนาบางไม่เท่ากัน (wedge shape gel) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้สารเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งมีใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง และเทคนิคนี้เป็นที่รู้จักกันดี มีกลุ่มนักวิจัยกลุ่มหนึ่ง นำโดย Prober และคณะ ในปี 1987 ได้พัฒนาวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องนี้ให้ทำได้ง่ายขึ้น โดยใช้สีเรืองแสง 4 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน เป็นสีในกลุ่ม succinylfluorescein ซึ่งสีทั้งสี่ชนิดต่างกันเพียงหมู่เมธิล (methyl) หรือไฮโดรเจน (hydrogen) เท่านั้น ทำให้ขนาดและการเคลื่อนไหวในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่แตกต่างกัน ใช้สีแต่ละตัวต่อเข้ากับไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dideoxynucleotide; ddNTP) แต่ละตัว (ddATP, ddCTP, ddGTP และ ddTTP) แล้วจึงทำปฏิกิริยาให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยสุ่ม โดยใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตทั้งสี่ชนิดลงไปในหลอดเดียวกัน ให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยสุ่ม โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ไม่ต้องแยกปฏิกิริยาเป็น 4 หลอด เนื่องจากไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดต่ออยู่กับสีเรืองแสงที่ต่างกันอยู่แล้ว เมื่อจบปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจจับคลื่นแสงที่เปล่งออกมาโดยสีแต่ละชนิดด้วยระบบเลเซอร์ บันทึกข้อมูลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

สำหรับข้อมูลลำดับเบสที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างนั้น สามารถสืบค้นได้จากฐานข้อมูลของ nucleotide sequence ที่ได้มีการรวบรวมไว้ เช่น GenBank ซึ่งรวบรวมโดย National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา (www.ncbi.nlm.nih.gov) และยังมีฐานข้อมูลของ European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ประเทศสหราชอาณาจักร (www.ebi.ac.uk) และ DNA Database of Japan (DDBJ) ประเทศญี่ปุ่น (www.ddbj.nig.ac.jp/) เป็นต้น โดยในฐานข้อมูลเหล่านี้มีลำดับเบสของยีน (gene) ต่างๆ ของสิ่งที่มีชีวิตที่ได้รวบรวมไว้อย่างเป็นระบบและเอื้ออำนวยต่อนักวิทยาศาสตร์จากทั่วโลกที่ต้องการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษากับลำดับเบสที่มีอยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรมที่ใช้เปรียบเทียบลำดับเบส ตัวอย่างเช่น FASTA หรือ BLAST เป็นต้น

ในการใช้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของ small subunit rRNA นั้นเป็นเทคนิคที่สะดวกในการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเพบรินของไหม มีความรวดเร็ว และมีความไวสูง

สำหรับใช้แยกสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันออกจากกันอย่างชัดเจน (Tsai et al., 2003) ซึ่งมีรายงานการศึกษาในต่างประเทศ โดย Pieniazek และคณะ (1996) ว่าเชื้อ *N. bombycis* และ *N. trichoplusiae* เป็นชนิดเดียวกันโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน small subunit rRNA ส่วน Hatakeyama และคณะ (1997) ได้จัดจำแนกเชื้อไมโครสปอร์ริเดียที่เข้าทำลายหนอนไหม *B. mori* ซึ่งได้แก่เชื้อ *N. bombycis* SES-NU, *N. bombycis* Sd-NU-IW8401, *Nosema* sp. NIS-M11, *Vairimorpha* sp. NIS-M12 และ *Pleistophora* sp. Sd-NU-IW8201 ด้วยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA พบว่าลำดับเบสของ small subunit rRNA ของเชื้อ *N. bombycis* SES-NU และเชื้อ *N. bombycis* Sd-NU-IW8401 มีความเหมือนกัน 99.2 เปอร์เซ็นต์, ระหว่าง NIS-M11 และ NIS-M12 96.7 เปอร์เซ็นต์ และระหว่าง *N. bombycis* SES-NU และ NIS-M11 85.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Pleistophora* sp. Sd-NU-IW8201 มีความเหมือนกับเชื้ออื่น ๆ ที่นำมาทดสอบน้อยที่สุด และได้มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อไมโครสปอริเดียไอโซเลตใหม่ 3 ไอโซเลตที่เข้าทำลายหนอนไหม โดยใช้การหาข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) พบว่าเชื้อไมโครสปอริเดียไอโซเลต NIK-2r อยู่ใน clade ที่มีเชื้อสกุล *Nosema* เกือบทั้งหมด ซึ่งเป็นกลุ่มไอโซเลตของ *Nosema* ที่ทำลายเฉพาะแมลงกลุ่มผีเสื้อ (lepidopteran host) และหลักฐานทางโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าเป็น type species ของเชื้อ *N. bombycis* ในขณะที่ไอโซเลต NIK-4m และ NIK-3h อยู่ใน clade ที่มีเชื้อสกุล *Vairimorpha* เกือบทั้งหมด รวมทั้งกลุ่ม *Nosema* ที่สามารถทำลายกลุ่มผีเสื้อและกลุ่มที่ไม่ใช่ผีเสื้อ โดยที่ไอโซเลต NIK-4m และ NIK-3h นี้จัดเป็นเชื้อ *Vairimorpha* spp. (Nageswara et al., 2004) ส่วน Huang และคณะ (2004) ได้มีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ของ type species ของเชื้อ *N. bombycis* ได้สำเร็จ โดยพบว่ามีขนาด 4,301 คู่เบส (bp) ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสของ large subunit gene (LSUrRNA: 2497 คู่เบส, GenBank accession no. AY211393), internal transcribed spacer (ITS: 179 คู่เบส, GenBank accession no. AY211394), small subunit gene (SSUrRNA: 1,232 คู่เบส, GenBank accession no. D85503), intergenic spacer (IGS: 279 คู่เบส), และ บริเวณ 5S (114 คู่เบส) ซึ่งเป็นการค้นพบใหม่ ซึ่งการหาข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอจาก rRNA gene ที่สมบูรณ์ของเชื้อไมโครสปอริเดียนั้นทำได้ยาก เพราะเชื้อไมโครสปอริเดียเป็นเชื้อที่มีความหลากหลายสูงมาก จึงทำให้การออกแบบชุดไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการใช้ได้ยาก

4.2.5 การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่น ๆ

นอกเหนือจากเทคนิคต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีการศึกษาการใช้เทคนิคอื่น ๆ ทางชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกหรือตรวจสอบเชื้อ *N. bombycis* สาเหตุโรคเพบรินของไหม เช่น Malone และ McIvor (1993) ได้ใช้เทคนิค pulse field gel electrophoresis (PFGE) เพื่อใช้จำแนกเชื้อ

ไมโครสปอริเดีย 4 ไอโซเลต ที่แยกได้จากแมลงศัตรูพืชออกจากกัน ส่วน Kawakami และคณะ (1994) ได้ใช้เทคนิค pulse field gel electrophoresis ศึกษา chromosomal DNA จากสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม คือ เชื้อ *N. bombycis* สายพันธุ์ M12-NU และ *Pleistophora* sp. สายพันธุ์ P1-NU (แยกได้จากผีเสื้อหนอนกระทู้ *S. depravata*) พบว่าโครโมโซมของเชื้อดังกล่าวมีความหลากหลายทั้งในด้านจำนวนและขนาด นอกจากนั้น Tsai และคณะ (2003) ได้มีการใช้เทคนิคหลายอย่างในการอธิบายลักษณะของเชื้อไมโครสปอริเดียที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อศัตรูพืช 5 ชนิดในไต้หวัน คือ หนอนกระทู้ผัก, หนอนกระทู้หอม, หนอนเจาะสมอฝ้าย, หนอนใยผัก และ หนอนผีเสื้อหนอนกะหล่ำ ซึ่งนำมาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์, ความสามารถในการเข้าทำลายหนอนกระทู้ผัก, รูปแบบของแถบที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค western blot, การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน small subunit rRNA gene และเทคนิค random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) ซึ่งพบว่าเชื้อทุกไอโซเลตสามารถเข้าทำลายและเพิ่มปริมาณในตัวหนอนกระทู้ผักได้ โดยเชื้อที่แยกได้จากหนอนกระทู้หอมมีความรุนแรงต่อหนอนกระทู้ผักมากที่สุด ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากหนอนใยผักมีความรุนแรงต่ำที่สุด ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ สปอร์หรือลำดับเบสในส่วนของ small subunit rRNA ของเชื้อเหล่านี้ ข้อมูลลำดับเบสของ small subunit rRNA สามารถยืนยันว่าเชื้อเหล่านี้เป็นสมาชิกของเชื้อในสกุล *Nosema* และบนพื้นฐานของการทำ western blot แล้วจับด้วย rabbit anti-*N. spodopterae* spore antiserum พบว่าสามารถแบ่งแยกได้เป็น 3 serotype คือ *N. spodopterae* (ไอโซเลต *S. litura*) และ ไอโซเลต *Pieris* spp., ไอโซเลต *S. exigua* และไอโซเลต *H. armigera*, และไอโซเลต *P. xylostella* ส่วนการเพิ่มปริมาณด้วย RAPD-PCR โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ 60 ชนิด ที่ให้รูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ชัดเจนสำหรับใช้จัดจำแนกรวมถึงใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ phylogenetic ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต จากการวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์สามารถแยกไอโซเลตต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกันกับ serotype โดย *N. spodopterae* และ ไอโซเลต *Pieris* spp., ไอโซเลต *S. exigua*, และ ไอโซเลต *H. armigera* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ *N. bombycis* พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากไอโซเลต *P. xylostella* และ *N. bombycis* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณให้ผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลต *P. xylostella* เป็นเชื้อ *N. spodopterae* ส่วนตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน (taxonomy position) ของไอโซเลต *P. xylostella* นั้นยังต้องการการวิเคราะห์ให้กระจ่างขึ้น อีกทั้ง Tsai และคณะ (2009) ได้ศึกษาความแตกต่างด้านชีวโมเลกุลและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Nosema* ที่ได้จากหนอนผีเสื้อ *E. blanda arsakia* โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ rRNA

ยีนทั้งหมด 4,428 คู่เบส (GenBank Accession No. EU3385434) การเรียงตัวของยีน rRNA ยีนเป็น LSU rRNA-ITS-SSU rRNA-IGS-5S ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. bombycis* และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับเบสของ rRNA ยีน พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. bombycis*, *N. plutellae*, *N. spodopterae* และ *N. antheraeae* สำหรับ Xu และคณะ (2010) ได้ศึกษาถึงเทคนิคการจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *N. bombycis* โดยใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุล (molecular marker) จาก miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) ซึ่งเคยใช้บ่งชี้สิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ไส้เดือนฝอย *Caennorhaditis elegans* ยุง มนุษย์ และเชื้อรา เป็นต้น ในการศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค MITE-AFLP ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างของ *N. bombycis* จำนวน 3 ไอโซเลต จากประเทศจีนได้ โดยผลการศึกษาได้โมเลกุลเครื่องหมาย *NbME5* ต่อมาพัฒนาเป็น *NbME* ซึ่งมีศักยภาพในการศึกษาด้านความแตกต่างในระดับไอโซเลตของเชื้อ *N. bombycis*