

ตรวจสอบการแพร่กระจายของโรคโนซีมาในผึ้งพันธุ์ ณ ลานเลี้ยงผึ้งพันธุ์
จังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และแพร่

**Detection of Wide-Spread Nosema Disease in Honey Bee (*Apis mellifera*)
in Chiang Mai, Lamphun and Phrae provinces**

กฤติมา ป้อตะมา¹ และ พัชรินทร์ ครุฑเมือง^{1*}

Krittimar Portama¹ and Patcharin Krutmuang^{1*}

Abstract

The prevalence of nosemosis in honey bees (*Apis mellifera* L.) in relation to the distribution of diseases in the climate conditions of northern Thailand was determined. Worker honey bees were collected from 10 apiaries from July to November, 2013, in Chiang Mai, Lamphun and Phrae provinces. Standard methods for the detection of nosemosis in the field and in the laboratory were used. The results revealed that in November the percentage of mortality as seen from dead worker bees found outside the collected in front of colonies in Chiang Mai, Lamphun and Phrae provinces was 50, 50, and 70 percent, respectively. However, in the laboratory the highest number of nosema spores counted in the month of November from Chiang Mai, Lamphun and Phrae provinces was found to be 1.98, 1.48, and 8.92 million spores per milliliter, respectively. The distribution of the disease in the three provinces was found to increase in each month of study probably due to environmental factors such as temperature and relative humidity which enhanced growth and thus increase the number of spores, as well as the spread of the disease.

Keywords : Nosema disease, Honey Bee

¹ ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

รับเรื่อง : สิงหาคม 2557

* Corresponding author: patcharin.k@cmu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษารั้วนี้ได้ตรวจสอบความชุกของโรคโนซีมาในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) และการแพร่กระจายของโรคที่เกี่ยวข้องกับสภาพภูมิอากาศ ในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยโดยสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานจำนวน 10 ล้านเลี้ยงผึ้งตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556 ของพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ ในสภาพภาคสนามและห้องปฏิบัติการจะใช้วิธีการตรวจสอบโรคเบื้องต้นผลการศึกษาพบว่า จากการเก็บตัวอย่างผึ้งตายหน้ารัง ผึ้งงานมีอัตราการตายของเดือนพฤศจิกายนในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ คิดเป็นร้อยละ 50, 50, และ 70 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการนับสปอร์โนซีมาในห้องปฏิบัติการ พบปริมาณสูงสุดในเดือนพฤศจิกายนทั้งจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ โดยพบในปริมาณ 1.98, 1.48, และ 8.92 ล้านสปอร์ต่อมิลลิกรัม ตามลำดับการกระจายของโรคโนซีมาใน 3 จังหวัด เพิ่มขึ้นในแต่ละเดือนของการศึกษา อาจเป็นเพราะปัจจัยจากสภาพแวดล้อมเช่นอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ และเพิ่มจำนวนของสปอร์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของโรค

คำนำ

เชื้อโนซีมาที่เข้าทำลายผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) มี 2 สปีชีส์ได้แก่ *Nosemaceranae* และ *Nosemaapis* จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไมโครสปอริเดียก่อให้เกิดโรค ที่เรียกว่าโรคโนซีมา (Nosemosis หรือ Nosematosis) (Bougeois *et al.*, 2010) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายในผึ้งตัวเต็มวัย โดยเข้าไปทำลายหรือก่อโรคในลำไส้ส่วนกลาง (Fries, 1988) เนื่องจากสภาพปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี ในลำไส้ส่วนกลางมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตกระตุ้นให้เกิดการออกของสปอร์อย่างรวดเร็ว หลังจากทีสปอร์เข้าสู่ตำแหน่งของลำไส้ส่วนกลาง โดยสปอร์มีโครงสร้างของ polar filament หรือ polar tube ซึ่งใช้สำหรับเจาะ และส่งถ่าย sporoplasm เข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิว (Gajger *et al.*, 2011) จากนั้นสปอร์จะเพิ่มปริมาณ และขยายขนาดทันทีภายในระยะเวลา 6-10 วัน โดยเข้าไปสังเคราะห์ RNA ซึ่งภายในเซลล์ มีการปล่อยเอนไซม์เข้าไปทำลายระบบย่อยอาหาร ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานผิดปกติ ผังเซลล์ของสปอร์มีความหนา ทำให้เอนไซม์ในกระเพาะย่อยอาหารของแมลงไม่สามารถย่อยสปอร์ได้ ดังนั้นสปอร์จึงถูกขับออกมาปะปนกับมูล เห็นเป็นคราบสีน้ำตาล ผึ้งที่ถูกเชือดังกล่าว เข้าทำลายในระยะเริ่มต้นไม่แสดงอาการจนกระทั่งผึ้งมีอาการท้องเสีย โดยพบมูลบริเวณรัง (กรณีเกิดการระบาด) ปล้องท้องมีลักษณะยัดและบวมผิดปกติ (Higeset *et al.*, 2006) เมื่อถึงส่วนหัวกับส่วนนอกออกจากกันพบว่าท่อทางเดินอาหารมีลักษณะบวมโต และมีสีขาวขุ่น ส่วนใหญ่พบคราบอุจจาระสีน้ำตาล

บริเวณหน้ารัง ส่งผลให้จำนวนประชากรผึ้งลดลงมีการพัฒนาารังร้าง วงจรชีวิตของผึ้งที่เป็นโรคส่งผล (Mussen, 2011) และก่อโรคให้กับผึ้งตัวเต็มวัยเท่านั้น (Canadian association of professional apiculturists, 2012) ส่วนใหญ่พบในผึ้งงานเพราะว่าผึ้งงานมีพฤติกรรมชอบทำความสะอาดรัง ดังนั้นจะมีโอกาสติดเชื้อได้มากกว่า ผึ้งวรรณะอื่น (Bougeois *et al.*, 2010) และผึ้งงานที่มีอายุน้อย มักมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่ายกว่าผึ้งที่มีอายุมาก (Webster *et al.*, 2004) นอกจากนี้ เชื้อดังกล่าวสามารถเข้าทำลายผึ้งแม่วังได้ ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ทำให้อัตราการวางไข่ลดลง (Bougeois *et al.*, 2010) ผู้เลี้ยงผึ้งจึงต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาและใช้ระยะเวลานานในการรักษาโรคดังกล่าว สำหรับประเทศไทยโรคโนซีมาจัดเป็นโรคระบาดตามมาตรา 4 แห่งพระราชบัญญัติโรคระบาดสัตว์ พ.ศ. 2499 ตามกฎกระทรวงฉบับที่ 21 (พ.ศ. 2528) การแพร่ระบาดของโรคโนซีมาทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ได้แก่ ต้นทุนการเลี้ยงผึ้งสูงขึ้น น้ำผึ้งที่ได้มีปริมาณลดลง เชื้อโนซีมาสามารถมีชีวิตอยู่นานถึง 6 ปี CBKA NEWSLETTER (2008) กล่าวว่าเชื้อโนซีมาสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิต่ำ ทำให้พบรายงานการแพร่ระบาดของโรคโนซีมาทุกปี ในพื้นที่ที่มีการเลี้ยงผึ้งทั่วโลกดังนั้นวิธีการตรวจสอบความ เป็นโรค จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยต้องทำการเก็บตัวอย่างผึ้งมาพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการ คณะผู้วิจัยจึงหาวิธีการเก็บตัวอย่างผึ้งมาพิสูจน์โรค เพื่อให้ข้อมูลกับผู้เลี้ยง ผึ้งนำไปปฏิบัติได้อย่างถูกต้อง เพื่อป้องกันการสูญเสีย ประชากรผึ้ง และลดต้นทุนการใช้สารเคมีกำจัดโรคโนซีมา

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในภาคสนาม

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ใน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่โดยสุ่มเลือกพื้นที่ตั้งรังผึ้งในแต่ละจังหวัดจังหวัดละ 10 ลานเลี้ยงผึ้ง (ภาพที่ 1) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งจากรังผึ้งจำนวน 3 รังในแต่ละลานเลี้ยงผึ้งตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556 รวมระยะเวลา 5 เดือน เพื่อใช้ในการตรวจสอบ

ทำการสุ่มตัวอย่างผึ้งจากรังผึ้งพันธุ์ที่กำหนดไว้จำนวน 60 ตัวต่อรัง จำนวนรังที่สุ่ม 3 รัง โดยใช้สวิงโฉบ

ผึ้งเก็บผึ้งที่บินเข้าออกหน้ารัง ให้ได้จำนวนผึ้งที่กำหนด จากนั้นนำตัวอย่างผึ้งแช่ลงในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ เข้าทำลาย หรือเพื่อฆ่าเชื้ออื่น ๆ ที่อาจปนเปื้อนอยู่ภายนอก

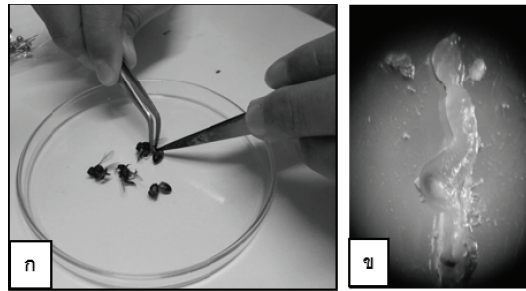
กรณีที่พบผึ้งตายหน้ารัง จะเก็บตัวอย่างจุ่มในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ 2) จากนั้นนำตัวอย่างบรรจุลงภาชนะบรรจุ ปิดฝา ให้มิดชิด บันทึกหมายเลขตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง และชื่อเจ้าของลานเลี้ยงผึ้งอย่างชัดเจน นำมาแช่ในภาชนะเก็บความเย็นเพื่อนำมาตรวจสอบภายใต้ห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งบันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างลานตั้งรังผึ้ง (ทิศทางการตั้งรังผึ้งขึ้นอยู่กับลักษณะทางภูมิศาสตร์ของแต่ละพื้นที่)



ภาพที่ 2 แสดงวิธีการเก็บตัวอย่างผึ้ง (ก) ใช้สวิงเก็บตัวอย่างผึ้ง (ข) แช่ตัวอย่างผึ้งในแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 วิธีตรวจสอบสปอร์โนซีมา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์(ก) แสดงการแยกส่วนท้องออกเพื่อนำเอาเฉพาะลำไส้มาบด (ข) ลำไส้ของผึ้ง

การตรวจสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

สุ่มตัวอย่างผึ้งจำนวน 5 ตัวต่อรัง นำมาผ่าตัดส่วนท้องเพื่อนำเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนกลาง และหลังออกมาจากนั้นบดให้ละเอียดโดยผสมกับน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรหยดตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และตรวจหาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าเพื่อดูลักษณะของสปอร์ (ภาพที่ 3) เมื่อตรวจพบว่าตัวอย่างผึ้งมีสปอร์ของโนซีมาจึงทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Hemacytometer

ผลและวิจารณ์

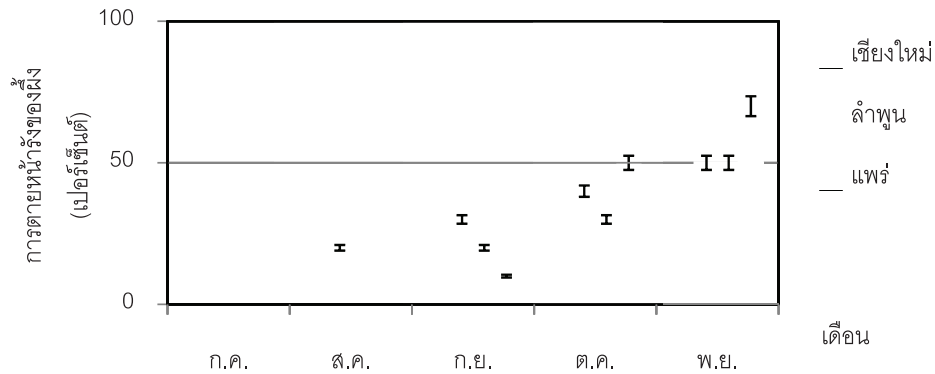
เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในภาคสนาม

จากการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์เพื่อตรวจสอบการแพร่ระบาดของโรคโนซีมาในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ จังหวัดละ 10 ลานเลี้ยงผึ้ง โดยสังเกตจากการตายเป็นจำนวนมากที่ไม่ทราบสาเหตุบริเวณหน้ารังผึ้ง ขณะสำรวจพบว่าในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ช่วงเดือนกรกฎาคม ไม่พบผึ้งตายบริเวณหน้ารัง ในเดือนสิงหาคมสำรวจจากจำนวน 10 ลานเลี้ยงผึ้ง พบการตายบริเวณหน้ารังคิดเป็นร้อยละ 20 ต่อมาเดือนกันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน พบผึ้งตายบริเวณหน้ารัง คิดเป็นร้อยละ 30, 40 และ 50 ตามลำดับขณะเดียวกันจังหวัดลำพูน ในเดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคม ไม่พบการตายของผึ้งบริเวณหน้ารัง ต่อมาเดือนกันยายน และตุลาคม พบผึ้งตายบริเวณหน้ารังคิดเป็นร้อยละ 20 และ 30 ส่วนเดือนพฤศจิกายน พบผึ้งตายมากถึงร้อยละ 50 สำหรับจังหวัดแพร่ ช่วงเดือนกรกฎาคม และเดือนสิงหาคมไม่พบการตายของผึ้งหน้ารัง

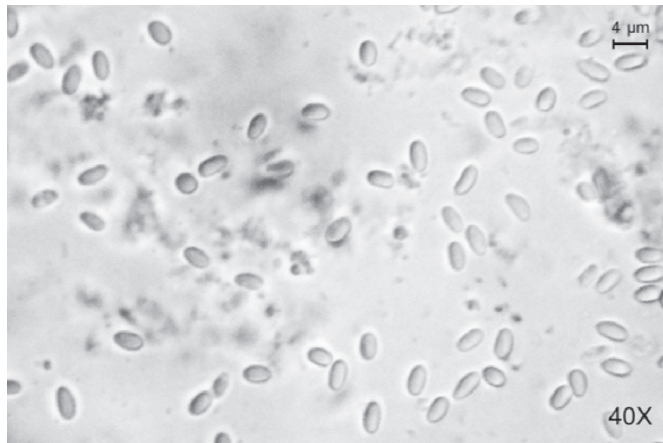
ต่อมาเดือนกันยายน พบผึ้งตายหน้ารังโดยคิดเป็นร้อยละ 10 ของลานเลี้ยงผึ้งตัวอย่างส่วนเดือนตุลาคม และเดือนพฤศจิกายนพบอัตราการตายมากถึงร้อยละ 50 และ 70 ตามลำดับ (ภาพที่ 4)

เมื่อพบอัตราการตายมากถึงร้อยละ 50 ขึ้นไปแสดงถึงการติดเชื้อ และเกิดการแพร่กระจายของโรคอย่างรุนแรง (Mussen, 2011) แสดงว่าจังหวัดแพร่ในช่วงเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรง คิดเป็นร้อยละ 50 และ 70 จากพื้นที่ 10 ลานเลี้ยงผึ้ง ส่วนจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูนเกิดการระบาดของโรคในเดือนพฤศจิกายน พบอัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 50

การเก็บตัวอย่างผึ้งที่ตายหน้ารังในแต่ละพื้นที่นั้น ไม่พบมูลเปราะเปื้อนบริเวณใน และนอกรังจึงสันนิษฐานได้ว่าผึ้งที่ตายนี้อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อ *N.ceranae* เพราะโดยทั่วไป หากตายด้วยเชื้อ *N. apis* จะพบมูลเปราะเปื้อนเป็นจุดสีน้ำตาลภายในรังและนอกรังผึ้ง จะไม่พบอาการดังกล่าวในเชื้อที่เกิดจาก *N. ceranae* (Mussen, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการแพร่กระจายของเชื้อโนซีมาชนิด *N. ceranae* มีความรุนแรงมากในหลายพื้นที่ทั่วโลก สำหรับแหล่งที่มีการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ (Higeset *al.*, 2008; Inverniziet *al.*, 2009) จากผลการทดลองของ Chaimaneeet *al.* (2013) พบความรุนแรงของเชื้อ *N.ceranae* ที่สามารถเข้าทำลายผึ้งได้หลายชนิด เช่น ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ผึ้งโพรง (*A. cerana*) และ ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) เป็นต้น



ภาพที่ 4 เปอร์เซนต์การตายของผีเสื้อพันธุ์บริเวณหนำร้องในพื้นที่เก็บตัวอย่างผีเสื้อของ 3 จังหวัดภาคเหนือตอนบน (เชียงใหม่ ลำพูน และ แพร่) ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556



ภาพที่ 5 ลักษณะสปอร์ของเชื้อโนซีมาได้จากการบดตัวอย่างลำไส้ของผีเสื้อพันธุ์ที่ถูกเชื้อโนซีมาเข้าทำลาย

การตายของผีเสื้อที่ได้จากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างที่ผ่านมานั้น ไม่พบมูลเประเปื้อนบริเวณหนำร้อง จึงทำให้ไม่ทราบถึงสาเหตุการตายของผีเสื้อที่แท้จริง ส่วนลักษณะการตายของผีเสื้อที่บริเวณหนำร้อง ยังชี้วัดไม่ได้ว่าตายด้วยสาเหตุโรคโนซีมาหรือไม่ ดังนั้นเพื่อความแม่นยำ จึงต้องนำตัวอย่างผีเสื้อพันธุ์ที่ตายบริเวณหนำร้อง ไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบสปอร์ของโนซีมา และนับปริมาณสปอร์ด้วย Hemacytometer ต่อไป

การตรวจสอบตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

1. ลักษณะสปอร์

สปอร์ของโนซีมามีรูปร่างคล้ายเมล็ดข้าวสารมีความกว้างเฉลี่ย 2 ไมโครเมตร ความยาวเฉลี่ย 4

ไมโครเมตรแต่ละสปอร์เป็นอิสระต่อกันโดยเคลื่อนที่ไปตามสารละลายของเหลวแบบไม่มีทิศทาง (ภาพที่ 5)

จากการวัดขนาดของสปอร์ พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อโนซีมาชนิด *N. Ceranae* ซึ่งมีความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 2.0-2.5 ไมโครเมตร และมีความยาวเฉลี่ย 3.9-5.3 ไมโครเมตร (Chen *et al.*, 2009) จากการสันนิษฐานขั้นต้น จึงจำแนกได้ว่าตัวอย่างที่ตรวจสอบนั้นเป็น *N. ceranae* ส่วนสปอร์ของชนิด *N. apis* มีความยาวประมาณ 5-7 ไมโครเมตรและมีความกว้างประมาณ 3-4 ไมโครเมตรโดยมีขนาดใหญ่มากกว่าเชื้อโนซีมาชนิด *N. ceranae* เพียงเล็กน้อย (OIE, 2008) อย่างไรก็ตามเพื่อความแม่นยำ และความน่าเชื่อถือ จึงต้องนำไปตรวจสอบชนิดของโนซีมาด้วยเทคนิค PCR ต่อไป (Bougeois *et al.*, 2010)

2. ปริมาณสปอร์โนซีมา

การกระจายตัวของเชื้อโนซีมาแต่ละสถานที่ และแต่ละเดือนมีความแตกต่างกัน ซึ่งแต่ละจังหวัดพบลานเลี้ยงผึ้ง ที่พบสปอร์โนซีมาเพิ่มขึ้นโดยจังหวัดแพร่ พบปริมาณสปอร์มากที่สุดซึ่งต่างกับจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน (P value = 0.047) โดยพบปริมาณสปอร์มากกว่า 1 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตั้งแต่เดือนกันยายน จนถึงเดือนพฤศจิกายน คิดเป็นปริมาณสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 5.06 ± 0.31 , 3.82 ± 0.23 และ 8.92 ± 0.29 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือจังหวัดเชียงใหม่ พบปริมาณสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 1.10 ± 0.09 , 1.72 ± 0.10 และ 1.98 ± 0.09 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ถัดมาจังหวัดลำพูน พบปริมาณสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.08 ± 0.01 , 1.37 ± 0.08 และ 1.48 ± 0.07 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bourgeois *et al.* (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาดัชนีการระบาดของโรคโนซีมาในประเทศสหรัฐอเมริกา และพบว่าในช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 2008 ถึงเดือนมีนาคม ปี ค.ศ. 2009 ผลการตรวจสอบพบการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มประชากรผึ้งอันเนื่องมาจากการก่อโรคโนซีมาอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าในเดือนพฤศจิกายน พบปริมาณสปอร์ของ *N. apis* เท่ากับ $1,212 \pm 148$ สปอร์ต่อตัว ขณะที่เชื้อชนิด *N. ceranae* พบปริมาณเท่ากับ $51,073 \pm 31,155$ สปอร์ต่อตัว ต่อมาในเดือนเมษายนไม่พบสปอร์ของเชื้อโนซีมาชนิด *N. apis* แต่พบสปอร์ของ *N. ceranae* ในปริมาณเท่ากับ $11,824 \pm 6,304$ สปอร์ต่อตัว เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับการติดเชื้อชนิด *N. Ceranae* ในผึ้ง ซึ่งบางเดือนพบปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้น แต่บางเดือนพบปริมาณน้อยลง ลักษณะการเพิ่มลดปริมาณสปอร์เชื้อโนซีมาแสดงถึงความจำเป็นที่ต้องมีการตรวจสอบอย่างรวดเร็ว ซึ่ง Mussen (2011) ได้อธิบายว่า ถ้าพบปริมาณสปอร์เฉลี่ยมากกว่า 1 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเกิดการระบาดอย่างหนักของเชื้อสาเหตุในประชากรผึ้ง และมีแนวโน้มที่จะกระจายตัวเพิ่มขึ้น ถ้าผู้เลี้ยงผึ้งไม่หาวิธีป้องกันกำจัดอย่างไรก็ตามปริมาณสปอร์ที่พบนั้นขึ้นอยู่กับช่วงเวลาในการก่อโรค และการขนถ่ายเชื้อเมื่อเชื้อสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ผึ้ง ทำให้การผลิตสปอร์จะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว (Forsgen and Fries, 2010)

สำหรับลานเลี้ยงผึ้งทั้ง 3 จังหวัด ควรทำการจัดการรังอุปกรณ์ประกอบการเลี้ยง และพื้นที่ตั้งรังผึ้งให้สะอาดก่อนถึงเดือนกรกฎาคม เนื่องจากเริ่มพบเชื้อสาเหตุ ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ 0.42 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่ไม่พบในพื้นที่จังหวัดลำพูน และจังหวัดแพร่ จากนั้นมีการพบปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงเดือนกันยายน ถึงพฤศจิกายน ซึ่งต่างกันอย่งมีนัยสำคัญ (P value = 0.026) ทั้งนี้อาจมีปัจจัยอื่น ๆ มาเกี่ยวข้อง และสนับสนุนต่อกระบวนการในการแพร่เชื้อโนซีมา เช่น อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น ขณะที่ Huang (2012) ให้ความเห็นว่าความรุนแรงในการเกิดโรค อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ผึ้ง และปัจจัยเสริมอื่น ๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ และสภาพภูมิประเทศของลานเลี้ยงผึ้ง

การนำตัวอย่างผึ้งไปตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจสอบหาสปอร์ของโนซีมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวนด์ ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อสาเหตุในลักษณะรูปร่างของสปอร์ได้ ดังนั้นวิธีที่สามารถแยกชนิดของเชื้อโนซีมาได้ คือ นำไปตรวจสอบชนิด ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อไป และแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของโนซีมาได้ ด้วยขนาดของดีเอ็นเอ (Smart and Walter, 2011)

3. อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และการแพร่เชื้อโนซีมา

อุณหภูมิเฉลี่ย และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยในแต่ละเดือนของพื้นที่ 3 จังหวัด ไม่มีความสม่ำเสมอกันโดยพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ช่วงเดือนกรกฎาคม และสิงหาคม อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 27.77 และ 26.65 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 87.29 และ 81.20 เปอร์เซ็นต์ พบปริมาณสปอร์เฉลี่ย 0.42 ± 0.04 และ 0.84 ± 0.09 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อมาเดือนกันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน พบปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1.10 ± 0.09 , 1.72 ± 0.10 และ 1.98 ± 0.09 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนพื้นที่จังหวัดลำพูน ในเดือนกรกฎาคม ไม่พบสปอร์โนซีมา โดยวัดอุณหภูมิเฉลี่ยได้ 29.35 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 96.95 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาเดือนสิงหาคม พบปริมาณสปอร์ต่ำกว่า 10,000 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิเฉลี่ยวัดได้ 28.23 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย

เท่ากับ 97.32 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาเดือนกันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายนพบปริมาณสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.08 ± 0.01 , 1.37 ± 0.08 และ 1.48 ± 0.07 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับวัดอุณหภูมิเฉลี่ยได้ 27.10, 24.62 และ 24.06 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 76.00, 67.00 และ 65.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่จังหวัดแพร่ ในช่วงเดือนกรกฎาคมไม่พบปริมาณสปอร์โนซิมา อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 29.42 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยเท่ากับ 96.76 เปอร์เซ็นต์ และพบปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในช่วงเดือน สิงหาคม กันยายน ตุลาคม และเดือนพฤศจิกายน พบปริมาณสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 0.36 ± 0.04 , 5.06 ± 0.31 , 3.82 ± 0.23 และ 8.92 ± 0.29 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยวัดได้ 26.65, 23.66, 24.52 และ 23.20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และวัดความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยได้เท่ากับ 86.70, 69.00, 61.00 และ 53.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 6)

การสันนิษฐานจากการดูลักษณะสปอร์ของเชื้อสาเหตุว่าเป็น *N. ceranae* โดยพบปริมาณสปอร์มากในอุณหภูมิต่ำ และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ช่วงปลายฝนต้นหนาว ตั้งแต่เดือนกันยายน ถึงเดือนพฤศจิกายนในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ให้ผลต่างกับงานวิจัยของ Higeset *et al.* (2008) ใบบการแพร่กระจายของเชื้อ *N. ceranae* ในช่วงฤดูร้อนมากกว่าฤดูหนาวของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งหมายความว่า เชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* มีความทนทานต่อสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูง ในขณะที่ *N. apis* มีความทนทานต่อสภาพอากาศที่หนาวเย็น (Huang, 2012) ซึ่งมีรายงานว่าร้อยละ 90 เชื้อชนิด *N. ceranae* สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียสนาน 1 เดือน (Fenoyet *et al.*, 2009) ขณะที่เชื้อชนิด *N. apis* สามารถเจริญเติบโตในอุณหภูมิที่ต่ำสุด +3 องศาเซลเซียส (Forsgen and Fries, 2010) อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิเท่ากันที่ 25 องศาเซลเซียส เชื้อชนิด *N. ceranae* มีความสามารถในการขยายพันธุ์ได้เร็วกว่า *N. apis* (Martin-Hernandez *et al.*, 2009) การรายงานผลการแพร่กระจายของโรคโนซิมาในบางแหล่งพบว่าเชื้อโนซิมาชนิด *N. ceranae* สามารถเจริญเติบโต

และมีชีวิตอยู่ได้หลายฤดูกาลตั้งแต่ฤดูร้อนตลอดจนถึงฤดูใบไม้ผลิ (Mussen, 2011)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้านอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ พบว่าอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในชั้นบรรยากาศในเดือนกันยายน ถึงเดือนพฤศจิกายน เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเชื้อโนซิมา (ภาพที่ 6) ซึ่งยืนยันได้ว่าอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อโนซิมา โดยพบว่าอุณหภูมิในสภาพแวดล้อมของพื้นที่ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของโรคโนซิมาแบบผกผันในระดับต่ำ ($P = 0.046$) และเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ในชั้นบรรยากาศต่ำ มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของโรคโนซิมา แบบผกผันในระดับสูง ส่งผลให้การแพร่กระจายของโรคโนซิมาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.0027$) จึงทำให้จังหวัดแพร่พบปริมาณสปอร์ของเชื้อโนซิมาเท่ากับ 5.06 ± 0.31 , 3.82 ± 0.23 และ 8.92 ± 0.29 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับมากกว่าพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เท่ากับ 1.10 ± 0.09 , 1.72 ± 0.10 และ 1.98 ± 0.09 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจังหวัดลำพูนเท่ากับ 0.08 ± 0.01 , 1.37 ± 0.08 และ 1.48 ± 0.07 ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อุณหภูมิต่ำทำให้ความมีชีวิต การเจริญเติบโตของสปอร์ และการเพิ่มปริมาณของสปอร์โนซิมามากขึ้น ส่งผลต่อความรุนแรงในการติดเชื้อของผึ้งพันธุ์ ซึ่งผกผันกับอุณหภูมิสูงส่งผลให้ปริมาณของสปอร์ลดลง (Malone *et al.*, 2001) เชื้อชนิด *N. ceranae* สามารถเข้าทำลายผึ้งพันธุ์ได้ในช่วงระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้เร็วกว่าชนิด *N. apis* นอกจากนี้เชื้อชนิด *N. ceranae* สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส (Fenoyet *et al.*, 2009) บางรายงานผลการวิจัยจากต่างประเทศให้ผลที่มีความขัดแย้ง และแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากสภาพภูมิอากาศในแต่ละพื้นที่นั้น ๆ ตลอดจนปริมาณน้ำฝนที่ตก เพราะเชื้อโนซิมามักเกิดขึ้นหลังจากที่ฤดูฝนหมดไป (Razmarai and Karimi, 2010) ส่วนระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบระยะเวลาที่มีผลต่อความมีชีวิตของเชื้อโนซิมาของ Malone *et al.* (2001) โดยพบว่าระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อ

ต่อความมีชีวิตของเชื้อโนซีมา การเจริญเติบโต การเพิ่มปริมาณสปอร์ และการติดเชื้อที่รุนแรง ซึ่งไม่มีความเสี่ยงในการสร้างความเสียหายให้กับปริมาณประชากรผึ้งพันธุ์

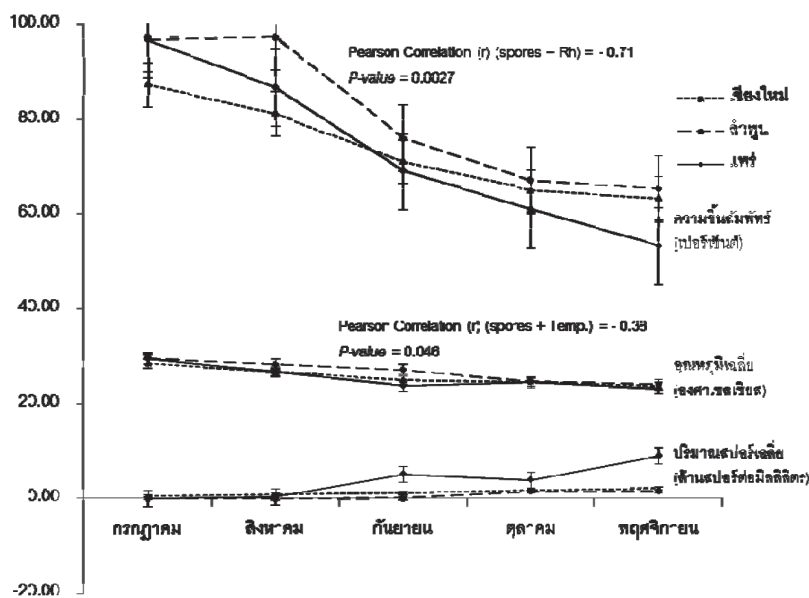
จากการสัมภาษณ์เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้ง ทำให้ทราบแนวคิดของผู้เลี้ยงผึ้งว่าผึ้งที่ตายอยู่บริเวณหัวรังนั้น ผู้เลี้ยงผึ้งคิดว่าเกิดจากการได้รับสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งเก็บอาหาร แล้วบินกลับมาตายที่บริเวณรัง ผึ้งที่ตายมีอาการส่วนท้องบวม ส่วนหัว ออก และท้องมีลักษณะมันเงาจากลักษณะดังกล่าวน่าจะเป็นอาการของผึ้งที่ตายด้วยโรคโนซีมาแต่เนื่องด้วยไม่มีความรู้เรื่องโรคผึ้ง ผู้เลี้ยงผึ้งจึงไม่ได้หาวิธีป้องกัน เมื่อไม่ทำการรักษาป้องกัน ทำให้มีการกระจายของโรคเพิ่มขึ้น ส่งผลกระทบและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ กรณีที่เกิดกับผึ้งแม่รังจะส่งผลให้อัตราการวางไข่ลดลง เนื่องจากระบบสืบพันธุ์เสื่อม (Hassanein, 1951) สำหรับผึ้งงานที่เป็นโรคโนซีมานั้นจะไม่กระตือรือร้นในการออกหาอาหาร (Bougeois et al., 2010) ถ้าผ่าส่วนท้องดูพบว่า ถ้าใส่จะมีสีขาวขุ่น ปกติจะมีสีน้ำตาลส้มหรือน้ำตาลเหลือง ทางผู้วิจัยได้แนะนำวิธีการป้องกันโดยให้ผู้เลี้ยงผึ้งดูแลประชากรผึ้งให้แข็งแรง และจัดการรังผึ้งให้มีความสะอาด ขณะที่พบการระบาดของโรคโนซีมา จะมีคำแนะนำให้ผู้เลี้ยงผึ้งนำไปปฏิบัติอยู่ 3 ขั้นตอนดังนี้ เมื่อพบลักษณะดังที่ได้กล่าวมาขั้นตอนแรก

ให้ทำการแยกและเคลื่อนย้ายรังที่เกิดโรคออกจากรังปกติ เพื่อป้องกันการติดเชื้อไปยังรังอื่น ๆ (Wongsiri and Diewwanit, 2012) ในต่างประเทศโรคโนซีมา รักษาด้วยสารฟลูมาจิลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน สำหรับประเทศไทยยังไม่มีหลักฐานการใช้สารเคมีรักษาโรคโนซีมา เนื่องจากประเทศไทย ยังไม่มีการนำเข้าสารฟลูมาจิลิน อย่างไรก็ตามมีรายงานพบสารฟลูมาจิลิน ตกค้างในน้ำผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้งในประเทศสหรัฐอเมริกา (Lopez et al., 2008) และสารนี้สกัดมาจากเชื้อราชนิด *Aspergillus fumigates* ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์ และสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Lowther and Matthews, 2000) นอกจากนี้มีรายงานว่า *N. ceranae* ยังมีความต้านทานต่อสารฟลูมาจิลิน (Huang et al., 2013) ทางคณะผู้วิจัยจึงไม่แนะนำให้ใช้สารดังกล่าว ดังนั้นวิธีการป้องกันที่ดีที่สุดต้องทำการรักษาความสะอาดรัง รวมถึงอุปกรณ์ที่ใช้ประกอบการเลี้ยงผึ้งทั้งหมด โดยการรมด้วยสารที่มีส่วนผสมของกรดอะซิติก (Acetic acid) 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอาหารในรังผึ้งที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ไม่ควรนำมาให้ผึ้งกิน เพราะทำให้เกิดโรคได้อีก (FAO, 2006) อย่างไรก็ตามเมื่อพบการเกิดโรค ผู้เลี้ยงผึ้งต้องแจ้งกรมปศุสัตว์หรือหน่วยงานเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทราบ เพื่อทำตามคำแนะนำของเจ้าหน้าที่อย่างเคร่งครัด

ตารางที่ 1 ปริมาณสปอร์เฉลี่ยของโนซีมา (ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร $\pm$ SE) ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และแพร่ระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2556

พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ปริมาณสปอร์เฉลี่ยของเชื้อโนซีมา (ล้านสปอร์ต่อมิลลิลิตร $\pm$ SE)				
	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน
เชียงใหม่	0.42 ^b $\pm$ 0.04	0.84 ^{ab} $\pm$ 0.09	1.10 ^{ab} $\pm$ 0.09	1.72 ^{ab} $\pm$ 0.10	1.98 ^a $\pm$ 0.09
ลำพูน	0 ^b	0 ^{ab}	0.08 ^{ab} $\pm$ 0.01	1.37 ^{ab} $\pm$ 0.08	1.48 ^a $\pm$ 0.07
แพร่	0 ^b	0.36 ^{ab} $\pm$ 0.04	5.06 ^{ab} $\pm$ 0.31	3.82 ^{ab} $\pm$ 0.23	8.92 ^a $\pm$ 0.29

^{a-b} ค่าเฉลี่ยตามแนวนอนอักษรต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ LSD



ภาพที่ 6. ผลอุณหภูมิเฉลี่ย ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย และปริมาณสปอร์เฉลี่ยของโนซีมา ในพื้นที่ 3 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2555

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากโครงการทดสอบประสิทธิภาพของไอระเหยจากพืช ในการควบคุมโรคของผึ้งในผึ้งพันธุ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ขอขอบคุณผู้เลี้ยงผึ้งที่ให้ความร่วมมือในการสำรวจ และเก็บตัวอย่างผึ้งเพื่อนำไปตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนถึงห้องปฏิบัติการโรคของแมลง ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Bourgeois, A.L., T.E. Rinderer, L.D. Beaman and R.G. Danko. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosemaapis* and *Nosemaceranae* in the honey bee. *Invertebr. Pathol. J.* 103: 53–58.
- Canadian association of professional apiculturists, CAPA. 2012. *Nosema disease – diagnosis and control.* Agriculture and Agri-Food Canada, Beaverlodge. 4pp.
- CBKA, NEWSLETTER. 2008. Samples of dead bees from Wales have recently been found to have died from *Nosemaceranae*. Carmarthenshire Beekeepers Association. 6 pp.
- Chaimanee, V., J.S. Pettis, Y.P. Chen, J.D. Evans, K.Khongphinitbunjong and P.Chantawannakul. 2013. Susceptibility of four different honey bee species to *Nosemaceranae*. *VET.Parasitol. J.* 193: 260–265.
- Chen, Y.P., J.D. Evans, C. Murphy, R. Gutell, M. Zuker, R.D. Gundersen and J.S. Pettis. 2009. Morphological molecular and phylogenetic characterization of *Nosemaceranae* a microsporidian

- parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. Euk. Microbiol. J. 56: 142–147.
- Fenoy, S., C. Rueda, M. Higes, R. Martin-Hernandez and C. Aguila. 2009. High-level resistance of *Nosemaceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Appl. Environ. Microbiol. 75: 6886–6889.
- Forsgren, E. and I. Fries. 2010. Comparative virulence of *Nosemaceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Vet. Parasitol. 170: 212–217.
- Fries, I. 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. Apidologie. 19: 319–328.
- FAO, Agricultural and food engineering technical report. 2006. Honey bee diseases and pests: a practical guide. FAO Information Division Food and agriculture organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla Rome, Italy. 42 pp.
- Gajger, I.T., Z. Kozaric, D. Berta, S. Nejedli and Z. Petrinc. 2011. Effect of herbal preparation nozevit on the mid-gut structure of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema* sp. Spores. Vet. Med. J. 56: 344–351.
- Hassanein, M. H. 1951. Studies on the effect of infection with *Nosema apis* on the physiology of the queen honey-bee. Q. J. Microsc. Sci. 92: 225–231.
- Higes, M., P. Palencia, H.R. Martin and A. Meana. 2006. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosemaceranae* (Microsporidia). Invertebr. Pathol. J. 94: 211–217.
- Higes, M., H.R. Martin, C. Botias, E.G. Bailon, A.V. Gonzalez-Porto, L. Barrios, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jimenez, P.P. Garcia and M. Aranzazu. 2008. How natural infection by *Nosemaceranae* causes honeybee colony collapse. Environ. Microbiol. J. 10: 2659–2669.
- Huang, Z. 2012. Effect of nosema on honey bee behavior and physiology. Department of Entomology. Michigan State University. 5 pp.
- Huang, W.F., L.F. Solte, P.M. Yau, and B.S. Imai. 2013. *Nosemaceranae* escapes fumagillin control in honeybees. PLOS Pathogens. 9 pp.
- Invernizzi, C., C. Abud, I.H. Tomasco, J. Harriet, G. Romallo, J. Campa, H. Katz, G. Gardiol and Y. Mendoza. 2009. Presence of *Nosemaceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. Invertebr. Pathol. J. 101: 150–153.
- Lopez, M.I., J.S. Pettis, I.B. Smith and P.S. Chu. 2008. Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. Agric. Food Chem. J. 56: 1553–1559.
- Lowther, W.T. and B.W. Matthews. 2000. Structure and functions of the methionine aminopeptidases. Biochim. Biophys. Acta. J. 1477: 157–167.

- Malone, L.A., H.S. Gatehouse and E.L. Tregidga. 2001. Effects of time, temperature, and honey on *Nosemaapis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Invertebr. Pathol. J.77: 258–268.
- Martin-Hernandez, R., A. Meana, P. Garcia-Palencia, P. Marin, C. Botias, E. Garrido-Bailon, L. Barrios and M. Higes. 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. Appl. Environ. Microbiol. 75: 2554–2557.
- Mussen, E.C. 2011. Diagnosing and treating nosema disease. The University of California, Davis. 4 pp.
- Nabian, S., K. Ahmad, M.H. Nazem Shirazi and A.G. Sadeghian. 2011. First detection of *Nosemaceranae*, a microsporidian protozoon of european honeybees (*Apis mellifera*) In Iran. Iran. Parasitol. J.6: 89 -95.
- Razmaraii, N. and H. Karimi. 2010. A survey of nosema of honey bee (*Apis mellifera*) in east azarbaijan province of Iran. Anim. Vet. Adv. J.9: 879-882.
- Smart, D.M. and S.S. Walter. 2011. *Nosemaceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). Invertebr. Pathol. J. 109: 148–151.
- OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.2.4. 2008. Nosemosis of honey bees. OIE, Paris, France. 4 pp.
- Webster, C.T., K.W. Pomper, G. Hunt, E.M. Thacker and S.C. Jones. 2004. *Nosemaapis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. Apidologie. 35: 49–54.
- Wongsiri, S. and S. Diewwanit. 2012. Biology of bees. Chulalongkorn University Press, Bangkok. 341pp. (in thai)