



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

American Foulbrood Spores in Honey Samples in Taiwan 【Research report】

台灣地區蜂蜜中美洲幼蟲病原孢子的檢測【研究報告】

Yue-Wen Chen^{1*}, Hao-Chun Cheng¹, and Chuen-Uei Huang²
陳裕文^{1*}、鄭浩均¹、黃淳維²

*通訊作者E-mail: chenyw@niu.edu.tw

Received: 2008/07/17 Accepted: 2008/07/24 Available online: 2008/10/01

Abstract

American foulbrood is a severe bacterial disease affecting larvae of the honeybee *Apis mellifera*. It is caused by spores of the *Paenibacillus larvae*. The disease is present worldwide and cases have been reported in almost all beekeeping regions. During 2005 and 2006 we carried out a nationwide study to assess the presence and the amount of *P. larvae* spores in honey samples from Taiwan. A total of 838 honey samples collected from apiaries in Taiwan, including 173 samples were collected in local market but originally imported from Thailand. The result showed that 208 samples were contaminated with *P. larvae* spores (24.8%). These spores that were detected yielded 219 isolates. We tested their susceptibility to oxytetracycline by disc-agar diffusion method. The results showed that the zones of inhibition of *P. larvae* isolates from Taiwan and Thailand were 43.0 ± 6.2 mm (mean \pm s.d., $n = 208$) and 43.3 ± 5.2 mm ($n = 11$), respectively. Both of them are significantly lower ($p < 0.05$) than the zones of the type strain of *P. larvae* (ATCC 9545). The criteria for susceptibility of isolates to oxytetracycline are discussed in this study.

摘要

美洲幼蟲病是危害蜜蜂最嚴重的細菌性疾病，病原為幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*)，其分佈遍及世界各主要養蜂地區。本研究廣泛收集2005年與2006年台灣各地養蜂場生產的蜂蜜與泰國進口蜂蜜樣品共838件，其中208件樣品 (24.8%) 被檢出含美洲幼蟲病原孢子，這些被檢出的病原接著被建立了219株幼蟲芽孢桿菌分離株，並以紙盤擴散法測試對羰四環素 (oxytetracycline) 的感受性，結果顯示台灣蜂蜜分離株的抑菌圈為 43.0 ± 6.2 mm (mean \pm s.d., $n = 208$)，泰國蜂蜜分離株則為 43.3 ± 5.2 mm ($n = 11$)，兩者抑菌圈均顯著小於 ($p < 0.05$) 模式品系 (ATCC 9545)，本文中已針對分離株對羰四環素的感受性討論之。

Key words: *Paenibacillus larvae*, American foulbrood, *Apis mellifera*, honey, oxytetracycline

關鍵詞: 幼蟲芽孢桿菌、美洲幼蟲病、西洋蜂、蜂蜜、羰四環素。

Full Text: [PDF\(0.4 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

台灣地區蜂蜜中美洲幼蟲病原孢子的檢測

陳裕文^{1*}、鄭浩均¹、黃淳維²

¹ 國立宜蘭大學動物科技系 宜蘭市 260 神農路 1 號

² 國立宜蘭大學園藝系 宜蘭市 260 神農路 1 號

摘要

美洲幼蟲病是危害蜜蜂最嚴重的細菌性疾病，病原為幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*)，其分佈遍及世界各主要養蜂地區。本研究廣泛收集 2005 年與 2006 年台灣各地養蜂場生產的蜂蜜與泰國進口蜂蜜樣品共 838 件，其中 208 件樣品 (24.8%) 被檢出含美洲幼蟲病原孢子，這些被檢出的病原接著被建立了 219 株幼蟲芽孢桿菌分離株，並以紙盤擴散法測試對羥四環素 (oxytetracycline) 的感受性，結果顯示台灣蜂蜜分離株的抑菌圈為 43.0 ± 6.2 mm (mean \pm s.d., $n = 208$)，泰國蜂蜜分離株則為 43.3 ± 5.2 mm ($n = 11$)，兩者抑菌圈均顯著小於 ($p < 0.05$) 模式品系 (ATCC 9545)，本文中已針對分離株對羥四環素的感受性討論之。

關鍵詞：幼蟲芽孢桿菌、美洲幼蟲病、西洋蜂、蜂蜜、羥四環素。

前言

美洲幼蟲病 (American foulbrood, 以下簡稱 AFB) 是西洋蜂 (*Apis mellifera*) 最嚴重的病害，染病蜂群若無妥善處理，除了該染病蜂群會滅亡外，還可能藉由人為管理或蜂群間的盜蜂與迷巢蜂等途徑 (Goodwin *et al.*, 1994)，迅速蔓延整個蜂場，造成重大損失。目前，全世界主要養蜂地區皆有 AFB 的發生 (Matheson, 1995)，台灣則於 1967 年首度發

現 AFB (Yen and Chyn, 1971)。

引發 AFB 的病原為一種可形成孢子的細菌－幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*) (Genersch *et al.*, 2006)，本菌只有孢子期具有感染力，成蜂對其具有抗性 (Riessberger-Gallé *et al.*, 2001)，病原孢子對蜜蜂幼蟲的致病力與蟲齡的大小關係密切；對西洋蜂 1 日齡幼蟲 LD₅₀ 為 21 個孢子，LD₉₅ 為 442 個孢子；對 2 日齡幼蟲的致病力大為減低，接種 4.5×10^4 個孢子只引起 37.2% 的死亡率 (Chen *et*

*論文聯繫人
e-mail: chenyw@niu.edu.tw

al., 1997), 而東方蜂 (*A. cerana*) 對本病則具有抗性 (Chen *et al.*, 2000)。感病的幼蟲通常於進入封蓋期 (capping stages) 後才會呈現典型美洲幼蟲病的病徵, 但接種高劑量孢子會造成部分幼蟲無法進入封蓋期 (Chen *et al.*, 2002b)。由於病原孢子的傳染力很高, 而且具有極強的環境抗逆性, 因此有發病紀錄的養蜂場不易完全根治, 而且 AFB 染病初期不易察覺, 一旦在蜂群中發現典型 AFB 病徵時, 通常已蔓延多數蜂群而不自知。為了早期偵測染病的蜂群, 許多研究探討蜂蜜中病原孢子的檢測法與防治意義 (Shimanuki and Knox, 1988; Hornitzky and Clark, 1991; Steinkraus and Morse, 1992; Nordström and Fries, 1995; Chen *et al.*, 2002a; Antúnez *et al.*, 2004; Pernal and Melathopoulos, 2006), 也有研究者建立成蜂體上病原孢子的檢測法 (Hornitzky and Karlovskis, 1989; Goodwin *et al.*, 1996), 而這些研究均指出被檢出含有病原孢子的蜂群, 多數並未發現典型 AFB 病徵, 因此具有早期偵測感病蜂群的意義。

脛四環素 (oxytetracycline) 具有控制 AFB 蔓延的效果 (Chen *et al.*, 2001), 美國、加拿大利用脛四環素防治 AFB 已超過 30 年, 近來當地已出現抗性菌株 (Miyagi *et al.*, 2000; Piccini and Zunino, 2001; Evans, 2003), 台灣雖然並未核准使用脛四環素作為 AFB 防治藥劑, 但早期仍有許多養蜂業者普遍使用脛四環素作為防治藥劑, 因此, 本文除了廣泛收集台灣地區的蜂蜜樣本以探討病原孢子在台灣的分佈狀況外, 並進一步從蜂蜜樣品中分離眾多的幼蟲芽孢桿菌分離株, 檢測其對脛四環素的感受性, 提供做為擬定防治策略的參考。

材料與方法

一、蜂蜜樣品的收集

本研究收集 2005 年與 2006 年台灣本土蜂蜜與泰國進口蜂蜜樣品, 每件樣品約 50~100 g; 台灣本土蜂蜜樣品又分為養蜂場採收蜜與單群蜜蜂儲蜜等 2 類, 前者為台灣蜂農於 2005 年與 2006 年流蜜期採收的蜂蜜, 樣品來源包括: 台灣各地養蜂產銷班提供班員當年度採收蜜樣品, 蜂蜜濃縮業者提供台灣蜂農委託濃縮加工的蜂蜜樣品, 參加 2005 與 2006 年全國龍眼蜂蜜評鑑比賽樣品 (苗栗區農業改良場主辦), 參加 2006 年新竹縣蜂蜜評鑑比賽樣品 (新竹縣農會舉辦); 單群蜜蜂儲蜜樣品則委請全國各地蜂農抽樣其飼養蜂群的儲蜜, 每處蜂場約抽樣 3~5 群蜜蜂, 以單一蜂群的儲蜜為一樣品, 採樣時以鐵製湯匙擠壓巢片上方的儲蜜區, 將流出的蜂蜜收集於 50 mL 塑膠離心管, 每群蜜蜂約取 40~50 mL 的儲蜜。泰國進口蜂蜜樣品則委請台灣 2 家具規模的蜜蜂進口商提供, 分別委請其抽樣 2005 與 2006 年自泰國進口的蜂蜜, 抽樣時以每桶蜂蜜 (200 L) 為單位, 從中取樣 50 mL 為樣品。

二、蜂蜜中病原孢子的分離與檢測

每一蜂蜜樣品秤量 20 g 於 50 mL 塑膠離心管中, 加入 20 mL 無菌水震盪混勻, 將此均質液於 4°C, 6000 xg 離心 40 分鐘, 去除上清液, 再以無菌水定量至 1 mL, 最後以水浴加熱 (80°C, 20 min) 殺除雜菌。取 0.2 mL 分離液, 塗抹於 BHITN (DIFCO, brain-heart infusion supplemented with 0.1 µg/mL thiamine and 9 µg/mL nalidixic acid) 平板上, 放入 37°C, 5% CO₂ 培養箱中培養 72 小時, 每一樣品均至少塗抹 2 平板。72 小時後取出平板, 根據菌落形成的時間 (3 日) 與形

態(圓形,直徑約 1~3 mm,灰白色,扁平狀,菌落周緣不規則)初步判定為幼蟲芽孢桿菌(*Paeniacyllus larvae*),並計算每克樣品的菌落形成單位(colony-forming unit, CFU/g)。

每平板至少挑選 1 疑似菌落進行增殖,增殖後的分離株先以 catalase test 測試為陰性,再根據 Bakonyi *et al.*, (2003) 的 PCR 檢測法偵測特定 DNA 片段(472 bp),以確認分離株是否為 *P. larvae*,如是則再予以增殖並冷凍保存於 25% glycerol 中。

三、幼蟲芽孢桿菌分離株對羰四環素的感受性測試

取 2006 年蜂蜜樣品中分離的 *P. larvae* 分離株繼代培養 2 次後,利用無菌棉棒挑取菌體均勻塗佈於 BHIT (DIFCO, brain-heart infusion supplemented with 0.1 µg/mL thiamine) 平板上,於平板中央放置 1 片含 5 µg 羰四環素的紙盤(Difco, 直徑 6 mm),培養於 37°C, 5% CO₂ 恆溫培養箱 72 小時,每分離株至少進行二重複,3 日後測量 5 µg 羰四環素紙盤所導致的抑菌圈直徑。另自生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, Taiwan) 購入 *P. larvae* 的模式品系(ATCC 9545),以作為羰四環素感受性測試的參考品系。

結 果

一、蜂蜜中美洲幼蟲病原孢子的檢測

本研究共收集 2005~2006 年台灣地區的蜂蜜樣本共 838 件,其中 2005 年樣本有 431 件,2006 年樣本則有 407 件。在 2005 年蜂蜜樣本部分,共收集並檢測台灣地區 29 處養蜂場的單群蜜蜂儲蜜樣品共 141 件;台灣養蜂場採收蜜樣品則有養蜂產銷班提供 27 件樣

品,參加 2005 年全國蜂蜜評鑑樣品 84 件,蜂蜜濃縮代工廠提供 36 件,合計 147 件;泰國進口蜂蜜則有 143 件樣品。2006 年部分,共收集台灣地區 23 處養蜂場的單群蜜蜂儲蜜樣品 103 件;台灣養蜂場採收蜜樣品則有養蜂產銷班提供 175 件樣品,參加 2006 年全國蜂蜜評鑑樣品 59 件,參加 2006 年新竹縣蜂蜜評鑑樣品 10 件,蜂蜜濃縮代工廠提供 30 件,合計 274 件;泰國進口蜂蜜則有 30 件樣品。

上述 838 件蜂蜜樣品經分離與平板培養後,再經過 PCR 法增幅並偵測特定 DNA 片段確認後,共有 208 件檢出含美洲幼蟲病原孢子,檢出率為 24.8%(表一)。依樣品採收年度區分,2005 年共檢測 431 件蜂蜜樣品,其中有 68 件檢出含美洲幼蟲病原孢子,檢出率為 15.8%;2006 年共檢測 407 件蜂蜜樣品,其中有 140 件檢出含美洲幼蟲病原孢子,檢出率為 34.4%,檢出率顯著高於 2005 年($p < 0.05$, *Z-test*)。再依蜂蜜樣品的來源區分,台灣養蜂場的單群蜜蜂儲蜜樣品共 244 件,其中 36 件檢出病原孢子,檢出率 14.8%;台灣養蜂場採收蜜樣品共 421 件,152 件檢出病原孢子,檢出率達 36.1%,顯著高於其他來源樣品($p < 0.05$, *Z-test*),其中 2006 年蜂場採收蜜的檢出率高達 44.2%是主要因素;泰國進口蜜則共檢測 173 件樣品,20 件檢出病原孢子,檢出率 11.6%。

就蜂蜜樣品中檢測出的美洲幼蟲病原孢子數而言,可發現台灣單群蜜蜂儲蜜樣品與泰國進口蜜樣品的孢子數含量很少,多數樣品孢子數小於 1 CFU/g(圖一),其中 2005 年台灣單群蜜蜂儲蜜樣品只有 2 件(1.4%)的孢子數高於 1 CFU/g,但其中有 1 件的孢子數達 569 CFU/g;2006 年台灣單群蜜蜂儲蜜樣品則只有 4 件(3.9%)的孢子數高於 1 CFU/g,而且均介於 1~50 CFU/g。2005 年與 2006 年泰國

表一 2005 年與 2006 年台灣地區蜂蜜中美洲幼蟲病原孢子的檢測結果

Table 1. Culture results of American foulbrood spores in honey samples from Taiwan, 2005-2006

Honey sources	2005		2006		2005 + 2006	
	<i>n</i>	Positive	<i>n</i>	Positive	<i>n</i>	Positive
Taiwan, single hive	141	23 (16.3%)	103	13 (12.6%)	244	36 (14.8%)
Taiwan, apiary	147	31 (21.1%)	274	121 (44.2%)	421	152 (36.1%)*
Thailand, imported	143	14 (9.8%)	30	6 (20.0%)	173	20 (11.6%)
Total	431	68 (15.8%)	407	140 (34.4%)*	838	208 (24.8%)

*Significantly different by *Z*-test ($p < 0.05$)

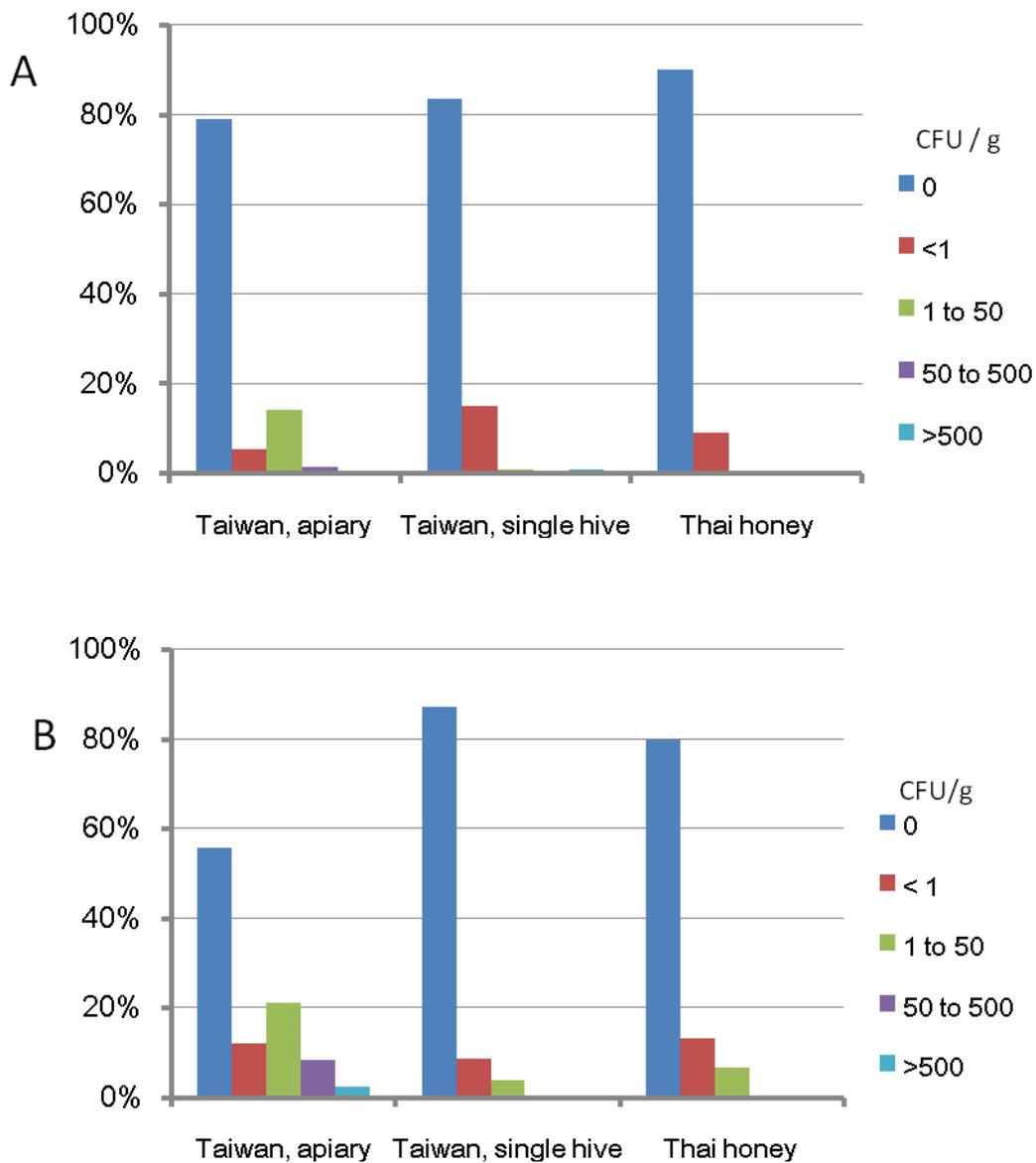
表二 2006 年台灣各地區蜂場採收蜜中美洲幼蟲病原孢子的檢測結果

Table 2. Culture results of American foulbrood spores in 2006 apiary honeys sampled from different counties in Taiwan

Counties	<i>n</i>	Positive samples (%)	Mean (CFU/g)
Taipei	3	33.3	10.21
Taoyuan	3	0	0
Hsinchu	24	41.7	19.45
Miaoli	13	53.8	243.70
Taichung	16	37.5	84.44
Changhua	25	28.0	0.37
Nantou	20	45.0	376.57
Yunlin	21	38.1	19.68
Chiayi	25	4.0	0.07
Tainan	34	29.4	6.40
Kaohsiung	36	63.9	21.58
Pingtung	13	46.2	3.75
Yilan	2	100	0.44
Hualien	2	50.0	2.19
Taitung	7	100	358.55

進口蜜樣品分別只有 1 件 (0.7%) 與 2 件 (6.7%) 的孢子數高於 1 CFU/g，而且均介於 1~50 CFU/g。台灣養蜂場採收蜜樣品的病原孢子數量則較多，尤其以 2006 年採收樣品的孢子含量最多，該年共有 88 件 (32.1%) 樣品的孢子數高於 1 CFU/g，而且其中有 23 件 (8.4%) 的孢子數達 50~500 CFU/g，更有 7 件 (2.6%) 的孢子數高於 500 CFU/g，其中最高量的樣品來自南投縣，其孢子數達 4,063 CFU/g。

由於養蜂場採收蜜較能呈現美洲幼蟲病原孢子在台灣各地區的分佈情形，本研究將 2006 年台灣養蜂場採收蜜樣品的檢測結果依照採樣地區分之 (表二)，可發現除了 5 個省轄市級以上都會區沒有分析樣品，其餘台灣本島的 15 個縣皆收集數量不等的蜂蜜樣品，其中以新竹以南的西部地區為主要的樣品來源。在樣品檢出率方面，桃園縣 (0%) 與嘉義縣 (4.0%) 蜂蜜樣品的病原孢子檢出率很低，其餘各縣樣品的孢子檢出率皆達 28.0% 以上，其中又以宜蘭縣與台東縣樣品檢出率皆達 100%



圖一 2005 年與 2006 年台灣地區蜂蜜中美洲幼蟲病原孢子數含量 (CFU/g)。A，2005 年樣品；B，2006 年樣品。
 Fig. 1. Spore numbers (CFU per gram honey) of *Paenibacillus larvae* in honeys sampled from Taiwan, 2005-2006. A, results of 2005; B, results of 2006.

最高，高雄縣檢出率 63.9% 次之，苗栗縣 53.8% 再次之。在美洲幼蟲病原孢子數的含量方面，以南投縣採收蜜樣品的平均含量達 376.57 CFU/g 最高，台東縣樣品的平均孢子數為

358.55 CFU/g 次之，苗栗縣樣品平均孢子數為 243.70 CFU/g 再次之；其餘各縣蜂蜜樣品除了台中縣 (84.44 CFU/g) 與高雄縣 (21.58 CFU/g) 的樣品外，平均孢子數都在 20

表三 含 5 µg 羧四環素紙錠對幼蟲芽孢桿菌分離株的抑菌圈直徑

Table 3. Zones of inhibition of *Paenibacillus larvae* isolates from different sources exposed to disc containing 5 µg oxytetracycline

Source of isolates	n	Inhibition zone in diameter (mm)	
		Mean ± s.d.	Range
Taiwanese honey	208	43.0 ± 6.2b*	21-60
Thai honey	11	43.3 ± 5.2b	31-49
Type strain (ATCC9545)	10	58.4 ± 3.1a	53-63

* Means in the same column followed by a different letter are significantly different by LSD multiple range test ($p < 0.05$).

表四 不同來源幼蟲芽孢桿菌分離株對羧四環素感受性的分級狀況

Table 4. Categories of susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates from different sources exposed to disc containing 5 µg oxytetracycline

Categories of inhibition zone	Numbers of <i>Paenibacillus larvae</i> isolates		
	Taiwanese honey	Thai honey	ATCC 9545
High (> 50 mm)	34 (16.4%)	0	10 (100%)
Moderate (40-50 mm)	124 (59.6%)	9 (81.8%)	0
Low (< 40 mm)	50 (24.0%)	2 (18.2%)	0
Total	208	11	10

CFU/g 以下 (表二)。

二、幼蟲芽孢桿菌分離株對羧四環素的感受性

本研究共計從 2006 年的蜜蜂樣品中分離得 219 株幼蟲芽孢桿菌分離株，其中從台灣本土蜂蜜分離得 208 株 (表三)，從泰國進口蜂蜜分離得 11 株。以含 5 µg 羧四環素的紙盤測試這些分離株的感受性，台灣本土分離株的抑菌圈直徑為 43.0 ± 6.2 mm (mean ± s.d.)，數值範圍介於 21~60 mm；泰國進口蜂蜜分離株的抑菌圈則為 43.3 ± 5.2 mm (mean ± s.d.)，數值範圍介於 31~49 mm；幼蟲芽孢桿菌的模式品系 (ATCC 9545) 的抑菌圈則為 58.4 ± 3.1 mm，顯著大於台灣與泰國分離株的抑菌圈 ($p < 0.05$)。

將所有幼蟲芽孢桿菌分離株對羧四環素感受性的檢測結果區分為高感受性 (抑菌圈直徑大於 50 mm)、中感受性 (抑菌圈直徑 40~

50 mm) 與低感受性 (抑菌圈直徑小於 40 mm)，可發現模式品系皆為高感受性；台灣本土分離株有 34 株 (16.4%) 被歸類為高感受性 (表四)，124 株 (59.6%) 為中感受性，另有 50 株 (24.0%) 呈現低感受性；泰國進口蜂蜜分離株則多數為中感受性 (9 株，81.8%)，少數為低感受性 (2 株，18.2%)，並未發現高感受性菌株。

討 論

蜜蜂美洲幼蟲病一直是全球養蜂業防治的重點項目之一，而於抗生素廣泛使用的年代，羧四環素也成為 AFB 主要的防治藥劑，然而，羧四環素只能抑制幼蟲芽孢桿菌營養體 (vegetative cells) 的增殖，無法殺滅病原孢子，使得 AFB 在許多養蜂場仍不斷爆發疫情。Otten and Otto (2005) 報導德國在

1950~2003 年間每年約有 100~400 個養蜂場爆發 AFB 疫情，而且大約 8~12 年就會出現疫情的高峰。在台灣，由於缺乏常態性蜜蜂傳染病疫情的監測單位，因此並無完整的 AFB 疫情資料，但根據筆者近年來與台灣蜂農接觸的經驗，專業養蜂場近年來很少發生 AFB 疫情，但業餘養蜂者近年來在台灣日漸增多，而他們對 AFB 的認識程度較低，也造成這些業餘養蜂場容易出現 AFB 疫情。

目前，限制抗生素的使用已成為世界各國的趨勢，對於發生 AFB 疫情的蜂群，多數國家的防治方法為燒毀罹病蜂群，台灣也不例外，而監測蜂蜜中的病原孢子則可以早期偵測 AFB 疫情 (Ritter, 2003)，再配合適當的蜂群管理措施，便可以有效防治 AFB 而避免燒毀蜂群。De Graaf *et al.* (2001) 證實於發生 AFB 疫情養蜂場半徑 5 公里內之鄰近養蜂場所採集的蜂蜜樣品，其被檢出病原孢子的風險高於非鄰近地區的 3 倍，而且也證實蜂蜜中病原孢子的檢出率與 AFB 的典型病徵具有顯著的相關性。Ritter (2003) 則發現每克蜂群儲蜜的病原孢子數高於 5,000 者，該群蜜蜂出現典型 AFB 病徵的比例高達 88%，相對的狀況，如果孢子數低於 5,000，則只有 2% 蜂群出現 AFB 病徵，如此顯示檢測蜂蜜中的病原孢子數的確可以在蜂群尚未出現典型 AFB 病徵前，早期偵測 AFB 的疫情。

事實上，近年來已有許多檢測各國蜂蜜 AFB 病原孢子數的研究報告，但檢測結果卻有很大的變異，例如 De Graaf *et al.* (2001) 廣泛收集了 1,328 件於 1999 年夏季在比利時採收的蜂蜜樣品，其中 146 件 (11.0%) 被檢出含 AFB 病原孢子。Antúñez *et al.* (2004) 於 2001~2002 年收集 101 件烏拉圭養蜂場採收的蜂蜜樣品，這些養蜂場均尚未發現典型 AFB 病徵，但卻有 52 件 (51.5%) 被檢出病

原孢子。在台灣，Chen *et al.* (2002a) 也於 1998 年收集 124 件台灣本土蜂蜜樣品，這些樣品來源蜂場也均未發現 AFB 病徵，但有 31 件 (25.0%) 被檢出病原孢子。各國 AFB 疫情與防治策略不同，造成檢測結果互異，但 Ritter (2003) 直言有些國家使用抗生素防治 AFB 而造成病原孢子檢出率偏高，Ritter 檢測了 1,520 件德國市售的蜂蜜樣品，其中 700 件來自非歐盟 (EU) 地區的進口蜂蜜，AFB 病原孢子檢出率高達 98%；另 200 件來自其他歐盟地區的蜂蜜樣品，檢出率也達 62%，但德國當地的樣品則僅有 2% 檢出病原孢子。

本研究廣泛收集了 2005~2006 年台灣地區的蜂蜜樣本共 838 件 (表一)，其中台灣本土的樣品達 665 件，採樣的養蜂場已涵蓋台灣本島的養蜂地區 (表二)，調查的規模與範圍均明顯大於 Chen *et al.* (2002a) 調查者，而且本研究也檢測了 2005~2006 年泰國進口蜜樣品 173 件，而根據中華民國海關進出口資料統計，2005~2006 年泰國進口至台灣的蜂蜜數量達 4,375 噸，比例高達台灣該期間所有進口蜂蜜數量的 88.9%，也達該期間台灣本土蜂蜜生產量的 38.7%，因此檢測台灣的泰國進口蜜之 AFB 病原孢子數極具重要性，檢測結果發現孢子檢出率為 11.6% (表一)，而且含有的孢子數多偏低 (圖一)，因此泰國進口蜜對台灣蜂群的 AFB 疫情影響有限。在台灣單群蜜蜂儲蜜部分，本研究檢測結果發現於 244 件樣品中，有 36 件 (14.8%) 被檢出病原孢子，檢出率小於 1998 年台灣單群蜜蜂儲蜜 (Chen *et al.*, 2002a) 的 24% 檢出率 (71 件樣品)；在台灣養蜂場採收蜜部分，本研究共檢測 421 件樣品，孢子檢出率達 36.1%，明顯高於 1998 年的 26.4% 檢出率 (53 件樣品)，其中 2006 年的檢出率達 44.2% 是造成檢出率偏高的主因，尤其台東縣、宜蘭縣、高雄縣與苗栗縣樣品的檢出

率皆超過 50% (表二), 值得養蜂業者與政府防疫單位的重視。

由於長期使用抗生素防治 AFB 的結果, Miyagi *et al.* (2000) 首先報導 *P. larvae* 對羧四環素出現抗性, 她們在 1998 年從美國明尼蘇達州養蜂場分離 UCD P-MN-98 的 *P. larvae* 分離株, 在與本研究相近的藥量下 (5.0 vs. 5.12 µg/disc), 卻未出現明顯的抑菌圈; 隨後 Piccini and Zunino (2001) 也針對烏拉圭的 17 個分離株進行抑菌圈測試, 發現在與本研究相同的劑量下 (5 µg/disc), 抑菌圈直徑範圍為 45~55 mm; 事實上, 在烏拉圭也使用羧四環素防治 AFB, 但可能使用的時間仍不長, 因此尚未出現明顯的抗性。Alippi *et al.* (2007) 則廣泛收集世界各地的 75 個分離株, 同樣測試在 5 µg/disc 劑量下的抑菌圈, 他們發現有 4 個分離株 (1 個來自義大利, 3 個來自美國) 對羧四環素具有明顯的抗性, 其抑菌圈直徑為 7.13~13.25 mm, 而且這 4 個分離株都具有 *Tet* (K) 基因, 而其餘 71 個分離株都沒有 *Tet* (K) 基因, 抑菌圈直徑則為 19.75~70.05 mm; 很顯然, *Tet* (K) 就是抗性基因, 而且位於細菌的質體 (plasmid) 上, 因此轉形至非抗性品系的機率極高。

本研究從台灣本土蜂蜜中取得的本土分離株達 208 株, 對調查本土病原是否對羧四環素出現抗性極具參考價值。表三可發現本土分離株的抑菌圈直徑為 43.0 ± 6.2 mm, 泰國分離株則為 43.3 ± 5.2 mm, 兩者顯著小於 *P. larvae* 模式品系 (ATCC 9545) 的 58.4 ± 3.1 mm, 顯示台灣本地分離的 *P. larvae* 尚未出現對羧四環素具抗性的品系, 但值得注意者, 其中有 50 個台灣本土分離株 (24%) 的抑菌圈直徑小於 40 mm, 其中最小者僅 21 mm, 已接近具抗性的臨界值 (表四), 宜進一步分析是否具 *Tet* (K) 抗性基因; 泰國進口蜜也有 2 株

(18.4%) 歸類為低感受性, 值得吾人重視。

綜合而言, 本研究廣泛收集並檢測 2005 與 2006 年台灣本土蜂蜜與泰國進口蜂蜜共 838 件樣品, 檢測結果顯示其中約有 1/4 樣品可檢出美洲幼蟲病原孢子, 但大多數樣品的孢子含量不高, 推測應處於潛伏感染狀態, 如此說明病原孢子仍普遍存在台灣各地養蜂場, 尤其 2006 年台灣養蜂場採收蜜樣品的孢子檢出率與孢子數含量均大幅增加, 建議台灣防疫單位應將本項檢測列為常態性蜜蜂疫情監測項目, 以適時提供蜜蜂美洲幼蟲病疫情資料供台灣養蜂業參考。

引用文獻

- Alippi, A. M., A. C. López, F. J. Reynaldi, D. H. Grasso, and O. M. Aguilar. 2007. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Veter. Microbiol.* 125: 290-303.
- Antúñez, K., B. D'Alessandro, C. Piccini, E. Corbella, and P. Zunino. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* 86: 56-58.
- Bakonyi, T., I. Derakhshifar, E. Grabensteiner, and N. Nowotny. 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *App. Environ. Microbiol.* 69: 1504-1510.

- Chen, Y. W., C. H. Wang, and K. K. Ho.** 1997. Pathogenicity of *Bacillus larvae* to the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). Chinese J. Entomol. 17: 23-32. (in Chinese)
- Chen, Y. W., G. Y. Hwang, and K. K. Ho.** 2002a. Detection and application of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey. Formosan Entomol. 22: 261-270. (in Chinese)
- Chen, Y. W., C. H. Wang, and K. K. Ho.** 2002b. Effects of oxytetracycline on larval honey bee, *Apis mellifera*, reared *in vitro*. Formosan Entomol. 22: 53-64. (in Chinese)
- Chen, Y. W., C. H. Wang, J. K. An, and K. K. Ho.** 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. J. Apicult. Res. 39: 169-175.
- Chen, Y. W., J. S. Liu, K. K. Ho, C. H. Wang, and J. An.** 2001. Control effects of oxytetracycline on American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae* of honey bee, *Apis mellifera*. Formosan Entomol. 21: 209-220. (in Chinese)
- De Graaf, D. C., D. Vandekerchove, W. Dobbelaere, J. E. Peeters, and F. J. Jacobs.** 2001. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. Apidologie 32: 587-599.
- Evans, D. J.** 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 83: 46-50.
- Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikainem, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwiski, and I. Fries.** 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int. J. Sys. Evo. Microbiol. 56: 501-511.
- Goodwin, R. M., J. H. Perry, and A. T. Houten.** 1994. The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. J. Apicult. Res. 34: 209-212.
- Goodwin, R. M., J. H. Perry, and H. M. Haine.** 1996. A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. J. Apicult. Res. 35: 118-120.
- Hornitzky, M. A. Z., and S. Clark.** 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. J. Apicult. Res. 30: 13-16.
- Hornitzky, M. A. Z., and S. Karlovskis.** 1989. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. J. Apicult. Res. 28: 118-120.
- Matheson, A.** 1995. World bee health report. Bee World 76: 31-39.
- Miyagi, T., C. Y. S. Peng, R. Y. Chuang, E. C. Mussen, M. S. Spivak, and R. H.**

- Doi.** 2000. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 95-96.
- Nordström, S., and I. Fries.** 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J. Apicult. Res.* 34: 97-103.
- Otten, C., and A. Otto.** 2005. Epidemiology and control of the American foulbrood in Germany. *Apiacta* 40: 16-22.
- Pernal, S. F., and A. P. Melathopoulos.** 2006. Monitoring for American foulbrood spores from honey and bee samples in Canada. *Apiacta* 41: 99-109.
- Piccini, C., and P. Zunino.** 2001. American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J. Invertebr. Pathol.* 78: 176-177.
- Riessberger-Gallé, U., W. von der Ohe, and K. Crailsheim.** 2001. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 77: 231-236.
- Ritter, W.** 2003. Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta* 38: 125-130.
- Shimanuki, H., and D. A. Knox.** 1988. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am. Bee J.* 128: 353-354.
- Steinkraus, K. H., and R. A. Morse.** 1992. American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. *Apidologie* 23: 497-501.
- Yen, D. F., and L. C. Chyn.** 1971. Studies on a bacterial disease of honeybee in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 13: 12-17. (in Chinese)
- 收件日期：2008年7月17日
接受日期：2008年7月24日

American Foulbrood Spores in Honey Samples in Taiwan

Yue-Wen Chen^{1*}, Hao-Chun Cheng¹, and Chuen-Uei Huang²

¹ Department of Animal Science, National I-Lan University, 1, Sec. 1, Shen-Lung Road, I-Lan, 260, Taiwan

² Department of Horticulture, National I-Lan University, 1, Sec. 1, Shen-Lung Road, I-Lan, 260, Taiwan

ABSTRACT

American foulbrood is a severe bacterial disease affecting larvae of the honeybee *Apis mellifera*. It is caused by spores of the *Paenibacillus larvae*. The disease is present worldwide and cases have been reported in almost all beekeeping regions. During 2005 and 2006 we carried out a nationwide study to assess the presence and the amount of *P. larvae* spores in honey samples from Taiwan. A total of 838 honey samples collected from apiaries in Taiwan, including 173 samples were collected in local market but originally imported from Thailand. The result showed that 208 samples were contaminated with *P. larvae* spores (24.8%). These spores that were detected yielded 219 isolates. We tested their susceptibility to oxytetracycline by disc-agar diffusion method. The results showed that the zones of inhibition of *P. larvae* isolates from Taiwan and Thailand were 43.0 ± 6.2 mm (mean \pm s.d., $n = 208$) and 43.3 ± 5.2 mm ($n = 11$), respectively. Both of them are significantly lower ($p < 0.05$) than the zones of the type strain of *P. larvae* (ATCC 9545). The criteria for susceptibility of isolates to oxytetracycline are discussed in this study.

Key words: *Paenibacillus larvae*, American foulbrood, *Apis mellifera*, honey, oxytetracycline

*Correspondence address
e-mail: chenyw@niu.edu.tw