

Etude de la sensibilité de la bactérie *Paenibacillus larvae*. agent causal de la loque américaine à l'antibiotique oxytétracycline

Study of the susceptibility of bacteria *Paenibacillus larvae*. causative agent of American foulbrood at oxytetracycline antibiotic

Noureddine Adjlane ^{*1,2}, Karima Belkadi¹, Naima Mecheri¹, Hanane Ridane¹ & Nizar Haddad³

^{1*} Département de Biologie, Université M'hamed Bougara, Boumerdes, 35 000 Algérie.

² Laboratoire de Biologie et de physiologie animale, ENS kouba Algérie.

³ National Center for Agriculture Research and Extension, Bee Research Department P.O. Box 639, Baqa'a 19381, Jordan.

Soumis le 08/11/2015

Révisé le 13/06/2016

Accepté le 21 /06/2016

ملخص :

(*Apis mellifera*) مرض رصع النحل الأمريكي هو أحد الأمراض البكتيرية الأكثر خطورة التي تصيب النحل سريع الانتشار. يمكن السيطرة على المرض من خلال تدمير الحضنة عند وجود علامات *P.larvae* العامل المسبب سريرية و تعقيم المعدات الملوثة باللب و استعمال المضادات الحيوية. اوكسيبتيتتراسكلين (OTC) هو العنصر النشط الأكثر استخداما لعلاج هذا المرض في العديد من البلدان التي شهدت ظهور عينات *P.larvae* مقاومة ل OTC في السنوات الأخيرة. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم انتشار 126 عينة من *P.larvae* مأخوذة من مناطق مختلفة في الجزائر (الجزائر العاصمة، البويرة، البلدية، بومرداس، تيزي وزو، تيبازة، المدية و عين الدفلة) و تحديد مدى فعالية اوكسيبتيتتراسكلين ضد هذه البكتيريا في المختبر. اختبارات ميكروبيولوجية، مجهرية و بيوكيميائية استعملت في هذه الدراسة. اغلب المناطق المدروسة مصابة بهذا المرض بمعدل 47.56%. قمنا بتصنيف نمط المقاومة ل 15 عينة ضد المضاد الحيوي (OTC) باستعمال طريقة الانتشار بالأقراص. تصنيف قطر التثبيط بالترتيب التنازلي اثبت أن 8 من 15 عينة مقاومة. إضافة إلى الوقاية الصحية تيتراسكلين يمكن استخدامها للحد من العواقب المرضية *P.larvae* و مع ذلك فمن الأفضل أن البديل استخدام أصناف أخرى من المضادات الحيوية لتجنب تطور المقاومة.

الكلمات المفتاحية :

النحل (*Apis mellifera*) الجزائر، المضادات الحيوية، مرض رصع النحل الأمريكي، المقاومة، *Paenibacillus larvae* اوكسيبتيتتراسكلين.

Résumé

La loque Américaine est une pathologie très grave de l'abeille mellifère *Apis mellifera* dans le monde et en Algérie. Elle est causée par la bactérie *Paenibacillus larvae*. L'objectif de ce travail est d'évaluer la prévalence de la loque américaine dans la région centre d'Algérie (Alger, Bouira, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Tipaza, Medea, et Ain Defla) et de déterminer l'efficacité de l'oxytétracycline contre cette pathologie au laboratoire. Des tests microbiologique, biochimique et microscopique ont été utilisés pour évaluer la prévalence de cet agent pathogène. La majorité des régions étudiées sont infestées par cette pathologie avec un taux moyen de contamination de 47,56%. Nous avons établi le profil de résistance de 15 isolats vis-à-vis l'oxytétracycline par la méthode de diffusion par disque. Le classement des diamètres d'inhibition par ordre décroissant a montré que 8 sur 15 échantillons sont résistants. Associées à une prophylaxie sanitaire, les antibiotiques peuvent permettre de diminuer les conséquences pathologiques de *Paenibacillus larvae*. Cependant, il est préférable d'alterner l'usage de différentes familles d'antibiotique afin d'éviter l'apparition de résistances.

Mots clés : La loque américaine, résistance à l'antibiotique, abeille mellifère, Algérie

Abstract

American foulbrood is a very serious disease of the honeybee *Apis mellifera* worldwide and Algeria. It caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*. The objective of this study was to evaluate the prevalence of AFB in the central region of Algeria (Algiers, Bouira, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Tipaza, Medea and Ain Defla) and determine the effectiveness of oxytetracycline against this disease in the laboratory. Microbiological, biochemical and microscopic tests were used to assess the prevalence of this pathogen. The majority of study areas infested by this pathology with an average rate of 47.56% of contamination. We have established the 15 isolates resistance profile vis-a-vis oxytetracycline by the disc diffusion method. The classification of inhibition diameters in decreasing order showed that 8 of 15 samples are resistances. Associated with sanitary prophylaxis, antibiotics may help to reduce the pathological consequences of *Paenibacillus larvae*. However, it is best to alternate the use of different families of antibiotics to prevent the development of resistance.

Keys words : American Foulbrood Disease, Antibiotics-Resistance, Honey Bee, Algeria.

* Auteur Correspondant : adjlanenoureddine@hotmail.com

1. Introduction

L'agent causal de la loque américaine est la bactérie Gram positive *Paenibacillus larvae*. Cette dernière peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée [1]. Les spores représentent le stade infectieux. Si le couvain absorbe des spores en se nourrissant, ils germent dans l'intestin moyen de la larve et les bâtonnets. Il s'agit de la forme végétative qui est très mobile et capable de traverser la paroi de l'intestin pour pénétrer dans la cavité abdominale. A ce niveau, les spores se multiplient rapidement et provoquent la mort de la larve [2]. La propagation des spores entre les colonies se fait par la dérive, le pillage et l'essaimage. Le transfert de cadres de couvain ou de cadres de miel ayant déjà été contaminés et l'utilisation de ruchers ou d'équipements contaminés sont des facteurs très importants de propagation de la maladie [3, 4]. Le diagnostic de la loque américaine est fondé sur l'inspection visuelle des ruches. Cette procédure présente des limites car elle dépend de l'observation des symptômes cliniques qui ne sont pas toujours faciles à reconnaître. La confirmation de diagnostic visuelle de la loque américaine nécessite la culture et la caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des isolats bactériens [5]. En Algérie, cette pathologie constitue une des plus dangereuses chez les apiculteurs [4]. Les apiculteurs algériens utilisent les antibiotiques surtout l'oxytétracycline dans le traitement de cette maladie. Depuis quelques années, des souches de *P. larvae* résistantes à l'OTC sont apparues dans plusieurs pays dans le monde [6, 7]. La présente étude vise d'abord l'évaluation de la prévalence de la pathologie dans les ruchers de la région centre d'Algérie et ensuite l'estimation la sensibilité de la bactérie à l'oxytétracycline.

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

Les échantillons d'abeilles ont été collectés dans huit wilayates à savoir Alger, Bouira, Blida, Boumerdes, Tizi Ouzou, Tipaza, Médéa, et Ain Defla. 42 prélèvements ont été réalisés dans l'ensemble des régions étudiées durant l'année 2015. Le prélèvement des ouvrières destinées à l'expérimentation a été fait au niveau des cadres à couvain à l'aide d'une brosse et d'un geste rapide les abeilles sont directement collectées dans une boîte de conservation laquelle est aussitôt refermée.

2.2. Identification de la loque américaine sur les échantillons des abeilles :

Le milieu de culture MYPGP a été utilisé pour la mise en évidence de *Paenibacillus larvae* [8]. Il est composé de 10 g de Bouillon Mueller-Hinton (Oxoid CM0405), 15 g d'extrait de levure, 3 g de phosphate de potassium (K₂PO₄), 2 g de glucose, 1 g de pyruvate de sodium (C₃H₃NO₃) et de 20 g de gélose.

La méthode de Lindstrom et al [9] a été utilisée pour la détection de *Paenibacillus larvae*. Elle consiste à prélever les intestins d'abeilles et à les écraser soigneusement dans un mortier stérile en verre, le substrat obtenu est mélangé avec 10 ml d'eau physiologiques. Après filtration l'échantillon est placé dans un tube à essai stérile, le mélange est centrifugé à 1000 tours par 5 minutes. Le surnageant est prélevé, 6 ml de l'eau physiologique sont ajoutées au culot. Le mélange final est déposé dans un bain marie réglé à 85°C pendant 10 minutes après agitation dans un vortex. 10 µl de la suspension estensemencée sur la surface de la gélose MYPGP par étalement.

La lecture des résultats s'effectue après 4 à 7 jours d'incubation à 36°C et à 5 % de CO₂. Sur la gélose MYPGP, les colonies de la bactérie *Paenibacillus larvae* sont petites, régulières, en général rugueuses, plates ou surélevées, blanchâtres ou beige.

Des tests microscopiques et biochimiques de confirmation ont été utilisés au cours de ce travail de recherche. Il s'agit de la coloration de Gram et le test de la catalase [10].

2.3 Test de l'antibiogramme :

La technique utilisée pour ce test est celle décrite par Marie et al [11]. Il s'agit de la diffusion sur gélose (méthode des disques) dont le principe est la détermination de la sensibilité ou la résistance des souches microbiennes testées vis-à-vis des différents antibiotiques. Cette méthode s'effectue par un dépôt de disques stériles de 6 mm de diamètre, imbibés de l'antibiotique à tester, sur une gélose préalablement coulée dans une boîte de pétrie etensemencée par 10 UFC/ml de microorganismes à tester. Après incubation, l'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'antibiotique à tester se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo clair au tour du disque absorbant. A partir des colonies isolées, on réalise un ensemencement par stries sur milieu MYPGP.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. On obtient ainsi des cultures jeunes [12]. A partir des cultures de bactérie revivifiées, des suspensions microbiennes sont préparées dans des tubes stériles contenant de l'eau physiologique. Agiter les tubes pendant quelques secondes et réaliser une lecture de densité de chacune des suspensions préparées, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm. L'absorbance doit être comprise entre (0.20-0.30 nm) ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml (concentration minimale qui assure la croissance microbienne) [12]. Pour l'ensemencement, le milieu de culture Muller-Hinton liquéfié et en surfusion à 45°C, est coulé dans des boîtes de Pétrie de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte. Après refroidissement, chaque boîte est ensemencée par écouvillonnage de la suspension bactérienne à tester. Des solutions à concentration décroissantes 300mg/l, 200mg/l et 150mg/l d'oxyteracyline ont été préparées.

2.3 Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de 6 mm de diamètre précédemment stérilisés sont imbibés avec l'antibiotique (OTC) et déposés à la surface de la gélose Muller Hinton préalablement ensemencée avec la bactérie *P.larvae*. Les boîtes ont été incubées 24h à 37°C [13].

2.4 Lecture des résultats

L'inhibition de croissance conduit à la formation d'une zone claire (zone d'inhibition) autour des disques d'antibiotiques. La lecture de l'antibiogramme a été faite en mesurant à l'aide d'une règle graduée les diamètres d'inhibition autour des disques.

3 Résultats

3.1 Etude des caractères macroscopiques

Les colonies de *Paenibacillus larvae* qui apparaissent sur le milieu sélectif MYPGP-agar, sont petites, régulières de formes plates ou surélevées, de couleur blanchâtre ou beige (Fig. 1).



Figure. 1 : Aspect macroscopiques des *P.larvae* sur le milieu MYPGP.

3.2. Etude des caractères microscopiques

Les bactéries *P.larvae* vues au microscope à l'état frais apparaissent sous leurs formes bacillaires mobiles, isolées ou en chaînettes. Après coloration de Gram, la bactérie *P.larvae* vue au microscope optique au grossissement X100 est de couleur violette, donc retient la coloration de Gram, elle est isolée ou associée en chaîne. Sa forme est bacillaire (Fig. 2).



Figure. 2 : Observation des bactéries avec la coloration de Gram

3.3. Résultats de la prévalence

A la lecture, il ressort que les régions de Blida et Tipaza sont les plus contaminées et très infestée par la loque américaine (Fig. 3). La prévalence de cette pathologie est estimée à environ 75%, soit 6 sur les 8 ruchers sont positifs. Pour les ruchers situés dans la région d'Alger, la moitié est infestée par la bactérie de la loque soit une fréquence de 50%. Pour la région de Tizi Ouzou, 5 ruchers sur les 9

échantillons sont caractérisés par la présence de la loque, avec un taux de contamination de 55,55%. Dans la région de Boumerdès la loque américaine est présente dans un seul rucher, soit un pourcentage d'infestation de 33,33%. Pour les ruchers situés dans la région de Médéa, un seul rucher sur 4 est infesté par la loque américaine, soit un pourcentage de prévalence de 25%. Aucun échantillon positif n'a été détecté dans la région d'Ain Defla.

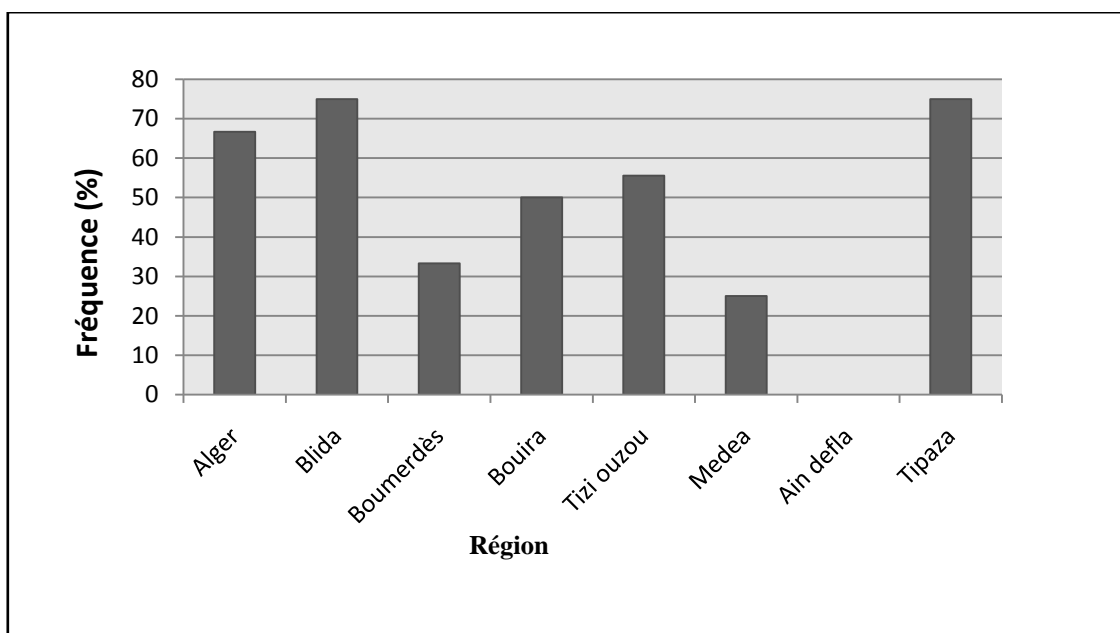


Fig. 3 : fréquence de la loque américaine par région étudiée.

3.4. Détermination des profils de résistance de la bactérie *P.larvae* à l'oxytétracycline:

La méthode de diffusion de disque a été réalisée pour catégoriser les 15 isolats de *P.larvae* selon leurs profils de résistance à l'oxytétracycline (OTC). La mesure du diamètre des zones d'inhibition de chaque bactérie pour l'oxytétracycline à 3 doses décroissantes 300 µg/ml, 200 µg/ml et 150 µg/ml permet de

caractériser la bactérie comme étant sensible, intermédiaire ou résistante. Nous avons considéré que la bactérie qui possède un diamètre inférieur à 15 mm est une bactérie résistante, celle dont le diamètre est compris entre 15-18 mm est dite intermédiaire et celle qui a le diamètre supérieur à 19 mm est une bactérie sensible [6] (Tab. 1)

Tableau 1: Estimation de la sensibilité de *P.larvae* sur disque de 6mm de diamètre :

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Catégories
< 15	Résistante
15-18	Intermédiaire
>19	Sensible

Le tableau 2 rassemble les résultats obtenus par la méthode d'antibiogramme en milieu solide. Ceci permet de déterminer le profil de résistance de *P.larvae* par rapport aux

différentes doses de l'antibiotique dans les régions sélectionnées (Alger, Blida, Boumerdès, Bouira et Tizi Ouzou) (Fig. 4).

Tableau 2 : Répartition des échantillons en fonction du diamètre

Diamètre (mm)	Nombres des échantillons selon les dilutions décroissantes		
	300µg/ml	200µg/ml	150µg/ml
<15	2	3	7
15-18	2	2	3
>19	11	10	4

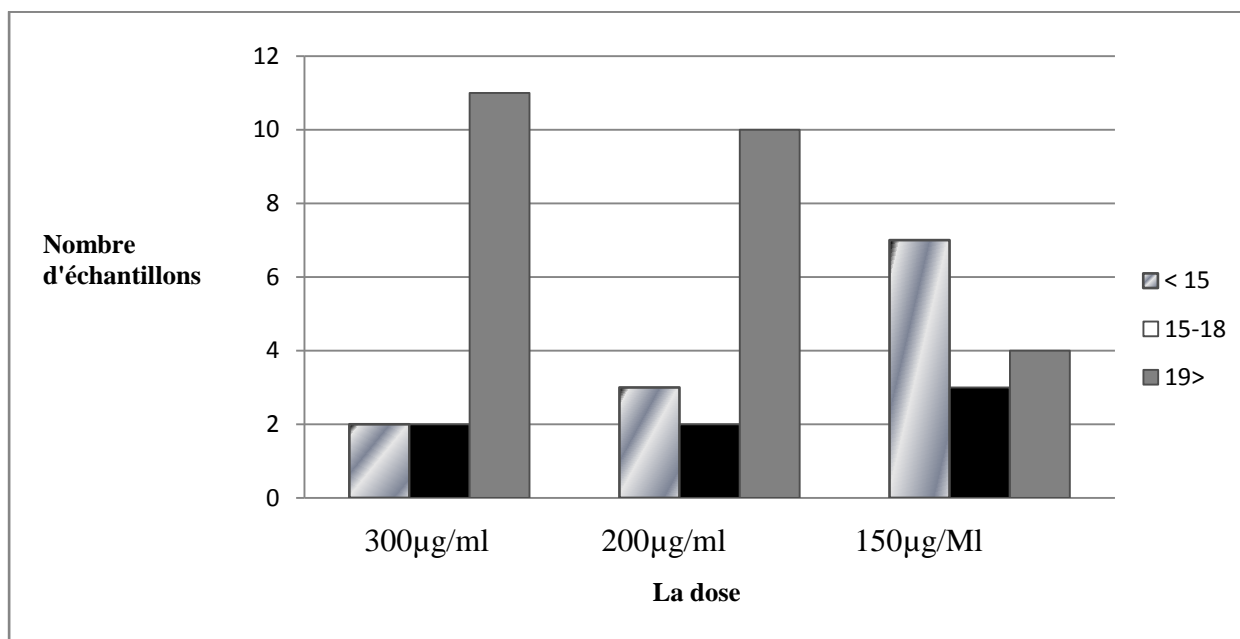


Figure. 4 : la répartition des échantillons en fonction de diamètre.

L'OTC a une faible efficacité sur les souches testées dans la région de Blida : plus de 66% des souches sont résistantes à cet antibiotique avec toutes les doses. Dans la région de Tizi Ouzou, la plus faible résistance a été enregistrée chez 25% des souches testées avec la dose de 200µg/ml, alors que la forte résistance est signalée sur 75% des souches avec la dose 150µg/ml par contre la dose 300µg/ml est efficace pour toutes les souches. Une forte efficacité de toutes les doses de l'OTC sur les souches testées dans la région de Boumerdès a été constatée.

Une seule souche de la région d'Alger est résistante à cet antibiotique avec une dose de 150µg/ml, le taux de résistance est de 33,33%. La moitié des souches de la région de Bouira sont résistantes avec 150 µg/ml d'OTC.

L'analyse statistique montre une différence significative entre les 3 doses ($p < 0,05$), par contre aucune différence significative n'a été trouvée entre les régions étudiées pour les 3 doses.

4 Discussion

Nombreux sont les facteurs qui expliquent cette grande différence dans le taux de contamination des colonies d'abeilles. Les conditions climatiques peuvent avoir un effet majeur sur la fréquence et la distribution de la pathologie. En climat tempéré la sporulation de *Paenibacillus larvae* est déclenchée; ceci peut conduire à de fortes charges en spores au cours du printemps en période d'élevage du couvain, ce qui augmente probablement le risque d'infection dans cette période puisqu'il y a beaucoup de spores disponibles [8]. En Iran, Yusufkhani et Lotfi [14] rapportent dans une étude effectuée sur 650 ruches, un taux d'infestation des colonies de (17,3%) et (11%) sur les prélèvements de Mai et Juin respectivement. La sporulation de *P.larvae* est déclenchée par le taux élevé d'humidité en hiver [15]. Les bactéries se multiplient durant la période de production de couvain causant les symptômes cliniques. En général, la loque américaine est décelée au printemps et en été. En Argentine, 50 % des échantillons de miel

sont contaminées par la bactérie [16]. Selon une étude menée par Bohorecka et Bober [17] en Pologne sur 242 échantillons de miel analysés en 2006, 23 % sont caractérisés par la présence de la bactérie. En république tchèque Ryba *et al* [18] rapportent un taux de 12 % des colonies contaminées par la bactérie. Le développement et la propagation de la loque américaine peuvent être favorisés par les mauvaises pratiques apicoles qui favorisent la diffusion de la maladie: la gestion anarchique des cadres (transfert des cadres), l'utilisation de la cire contaminée et l'apport alimentaire de miel ou de pollen contaminé. L'échange des cadres de couvain contenant des restes de larves malades est la voie de diffusion de la maladie la plus commune. Les ruches ayant reçu des cadres infectés peuvent, elles aussi, devenir des sources de contamination dans les ruchers, elles s'affaiblissent et meurent par la suite. En outre, l'alimentation ou le pillage de miel chargé en spores, le pain d'abeilles, les paquets d'abeilles, la cire contaminée par les spores de *P. larvae* utilisée pour la création de nouveaux cadres de ruche peuvent également aussi disséminer la maladie. Le remplacement fréquent des rayons devrait donc être encouragé dans la gestion des colonies pour lutter contre les maladies par simple retrait des rayons contaminés [19]. Uhrig Salvatori *et al.* [20] ont constaté que l'infection par *P.larvae* survient quand les reines des ruches infectées sont introduites dans les ruchers sains et quand les apiculteurs utilisent le matériel apicole contaminé ou mal nettoyé pendant la récolte ou l'entretien. En Algérie, les apiculteurs déplacent leurs ruches plusieurs fois par an vers différents endroits à la recherche de ressource nectarifère. Ces mouvements peuvent contribuer à la propagation de la maladie. Des ruchers contaminés peuvent introduire la maladie dans un nouvel endroit, ou bien des ruchers sains déplacés peuvent être attaqués à partir des ruches infectées qui se trouvent dans le nouveau voisinage. Au niveau de la colonie, le comportement hygiénique des abeilles adultes peut affecter le développement de la maladie [21]. Fries et Raina [22] rapportent dans une étude effectuée sur la loque américaine sur des colonies d'abeilles africanisées que le comportement hygiénique de cette abeille est responsable de la faible présence de la bactérie dans les colonies en Afrique. En outre, les facteurs environnementaux tels que la disponibilité du pollen et l'intensité du nectar peuvent

également jouer un rôle important [23]. L'apparition de la forme clinique de la maladie dépend de plusieurs facteurs: le niveau de contamination, la virulence de la souche de *P.larvae* et le développement ou non d'une forme de tolérance d'abeilles atteinte par la maladie [24, 25,26, 27,28]. Dans notre étude, la susceptibilité de la bactérie *Paenibacillus larvae* à la famille des cyclines, notamment l'oxytétracycline, est variable selon la région. La concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrée est comprise entre 150µg/ml et 200µg/ml. En 1954, Gochnauer a mesuré la zone d'inhibition de la croissance *P.larvae* et a constaté que les isolats étaient sensibles à une concentration aussi faible que 12 g / L de l'OTC [29, 30, 31]. Alippi *et al* [32] ont signalé dans une étude réalisée que tous les isolats finlandais de *P.larvae* étudiées étaient sensibles à l'oxytétracycline avec une valeur de CMI s'étendant entre 0,023 à 0,19µg/l. Les résultats obtenus par Haddad *et al* [33] en Jordanie montrent que l'antibiotique OTC est le plus efficace que les antibiotiques testés (Florfenicol et Novobiocine). Une étude réalisée sur 39 isolats de *P. larvae* provenant de différentes régions de pays européens (Finlande, France, Suède et Suisse) en utilisant la méthode de diffusion de disque n'a montré aucune résistance à l'OTC ou la tétracycline [34]. Puisque *Paenibacillus larvae* est devenue résistante à l'OTC sur une grande échelle aux États-Unis, Kochansky *et al.* [6] ont recherché des antibiotiques alternatifs qui pourraient efficacement remplacer l'OTC. Ils ont étudié principalement les antibiotiques déjà autorisés par FDA (Food and Drug Administration) pour des usages agricoles. Dans la plupart des cas la résistance à l'OTC conférait, avec un niveau variable, une résistance aux autres tétracyclines. Seule la minocycline était active contre les souches de *P.larvae* résistantes et les souches sensibles. Les antibiotiques testés les plus actifs (ceux actifs aux doses 0,04 mg/disque) couramment utilisés en agriculture étaient : l'érythromycine, la lincomycine, la monensine et la tylosine. La rifampicine, bien que non utilisée en agriculture, était de loin l'antibiotique le plus actif, avec une activité étant encore présente à 0,0012 mg/disque mais, étant utilisée contre la tuberculose, il est peu vraisemblable qu'elle reçoive une autorisation pour un usage agricole. La lyncomicine, la tylosine et l'érythromycine étaient actives jusqu'à 0,04 mg/disque et la monensine était la moins active avec une concentration minimale

d'inhibition de 0,12 mg/disque. La résistance aux antibiotiques résulte d'une adaptation rapide des bactéries à un nouvel écosystème, qui naît de mutations génétiques aléatoires leur permettant d'y survivre, et de continuer à se reproduire, en transmettant à leur descendance leurs gènes de résistance, ou qui se fait suite à des échanges de gènes de résistances entre des bactéries qui habitent dans divers écosystèmes. On suppose que l'apparition des *P.larvae* OTC-résistantes due à l'utilisation massive ou inappropriée d'OTC.

5 Conclusion

L'analyse des résultats obtenus montre que la bactérie *Paenibacillus larvae* est présente dans toutes les régions étudiées. Mais les populations d'abeilles sont infestées à divers niveaux. Plusieurs facteurs peuvent éventuellement expliquer cette grande variation dans la distribution de la maladie telle que le facteur climatique, et surtout le rôle de l'apiculteur dans la dissémination de la pathologie. Dans cette étude nous avons essayé de déterminer le profil de résistance de la bactérie *P.larvae* à l'OTC. Une grande variation de CMI de l'OTC (entre 150-200 ml/l) à été noté en fonction des régions. Les valeurs les plus élevées sont celles des souches des régions de Tizi Ouzou et de Blida avec des taux de résistance de 75% et 66.66% respectivement. Pour éviter l'apparition de ce phénomène d'antibiorésistance qui pose un grand problème sur la santé des abeilles, il est préférable d'alterner l'usage de différentes familles d'antibiotiques. Il s'agit aussi de mettre un programme de prévention et de contrôle de cette pathologie par les autorités vétérinaires afin de réduire le risque de la propagation de cette pathologie vers d'autres ruchers.

Références

[1]. Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N. & Berkeley R.C., 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P.larvae* subsp. *pulvifaciens*. International Journal of Systematic Microbiology, Vol. 46, 270-279

[2]. Gregorc A., Bowen I.D., 1998. Histopathological and histochemical changes in honey bee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease, *Cell. Biology. International*, Vol. 22, 137-144.

[3] Fries I. et Camazine S., 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epide-miology. *Apidologie*. Vol. 32, 199-214

[4]. Adjlane N., Kechih S., Doumandji S.E., Haddad N., 2012. Survey of american foulbrood in *Apis mellifera intermissa* colonies in mid-northern region of algeria *Uludag Bee Journal*, Vol. 12(3): 98-105

[5]. Martinez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P., 2010. A real time PCR-based strategy for the detection of *P.larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnostic and the screening of American foulbrood, *Letters in applied microbiology*, Vol. 50, 603-610.

[6]. Kochansky J., Knox D., Feldlaufer M., Pettis J., 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie*, Vol. 32, 215-222.

[7]. Cougoule N., Abadie G., Vautor E., Chauzat M-P., Aubert M., Faucon J-P., 2008. Study of the sensitivity to tetracycline of European isolates of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera*). *Revue Médecine. Vétérinaire.*, Vol. 159(6) : 323-326.

[8]. Dingman D. W., Stahly D.P., 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied. Environnemental . Microbiol.*, Vol. 46, 860-869.

[9]. Lindström A., Korpela S., Fries I., 2008. Transmission horizontale de spores de *Paenibacillus larvae* entre colonies d'abeilles *Apis mellifera* par le pillage. *La Santé de l'Abeille* .Vol. 239 (9-10), 373- 384.

[10]. Perrier R., Auffret Van Der Kemp T., Zonzain F., 1997. Expériences faciles et moins faciles en sciences biologiques. Ed. Europe, 437p.

[11]. Marie N., Christian D., 1998. Activités technologiques en microbiologie : classe de première BGB. Techniques de base et méthodologie. Vol1, 151-155.

[12]. Benabbou A., 2012. Antibiorésistance des bactéries lactiques isolées de produits artisanaux algériens. Mémoire Magister, Université d'Oran, Oran, 113p.

[13]. Rozman T., Jersek B., 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus Officinalis* L.) Against different species of *Listeria*. *Acta agriculture Slovenica*. Vol. 1, 51-58.

[14]. Yusufkhani M., lotfi A., 2010. Incidence of American foulbrood in honey bee colonies of Eastern Azerbaijan, North West of Iran. *Academic journal of entomology*, Vol. 3(1): 37-38.

[15]. Hansen H. et Brodsgaard C.J., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, Vol. 80, 5-23.

[16]. Basualdo M., Figini E., Torres J., Tabera A., Libonatti C., 2008. Control of American foulbrood disease in Argentine commercial apiaries through the use of queens selected for hygienic behavior. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Vol. 23. 42-53.

[17] Pohorecka K., Bober A., (2008) occurrence of paenibacillus larvae spores in honey samples domestic apiaries. *Journal of Apicultural Science*, Vol. 52(2) : 105-111

- [18]. Ryba S., Titera D., Haklova M., Stopka P., 2009. A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris, Veterinary. *Microbiology*, Vol. 24. 62-66.
- [19]. Graaf D.C., Vandekerchove D., Dobbelaere W., Peeters J.E., et Jacobs F.J., 2001. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, Vol. 32, 587-599.
- [20]. Uhrig Salvatori R., Schroeder Ingrid Müller S., Majolo C. et Fröder H., 2011. Detection of *Paenibacillus larvae* Subsp. *larvae* Spores in Honey Samples from Beekeepers of the Taquari Valley, Rio Grande Do Sul State, Brazil. *International Journal of Microbiological Research*, Vol. 2 (3): 217-221.
- [21]. Spivak M.S. Reuter G.S., 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32, 555-565.
- [22]. Fries I., Raina S., 2003. American Foulbrood and African Honey Bees (*Hymenoptera: Apidae*). *Journal of Economic Entomology*. Vol. 96, 1641-1646.
- [23]. Momot J.P., Rothenbuhler W.C., 1971. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 10, 11-21.
- [24]. Crailsheim K. et Reisberger-Galle U., 2001. Honey bee age dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*. Vol. 32, 91-103.
- [25]. Oliveira A, Leite M, Kluskens LD, Santos SB, Melo LDR, Azeredo J (2015) The First *Paenibacillus larvae* Bacteriophage Endolysin (PlyPI23) with High Potential to Control American Foulbrood. *PLoS ONE*, Vol.10(7): 132-141.
- [26]. Ghorbani-Nezami S., LeBlanc L., Yost D.G., Amy P.A. Phage Therapy is Effective in Protecting Honeybee Larvae from American Foulbrood Disease. *Journal of Insect Science*. Vol. 15(1): 84-91.
- [27]. Ritter W., 2003. Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*. Vol. 38, 125-130.
- [28]. Haddad N., Al-tellawi A., Adjlane N., , Khoury F., Samar Q. (2015) Diagnosis of *Paenibacillus larvae* from Honeybees in Jordan According to Microbiological and Chemicals Techniques. *Asian Journal of Animal Science*. Vol.9(6), 318-329.
- [29]. Gochnauer T.A., 1951. Drugs fight foulbrood diseases in bees, *Science*. Vol 9, 15-19.
- [30]. Tian, B., N. H. Fadhil, J. E. Powell, W. K. Kwong, and N. A. Moran. 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *MBio* Vol.3: 377-812.
- [31]. Boligon A, Brum T, Zadra M, Piana M, Alves C, Fausto V, Barboza Júnior V, Vaucher R, Santos R And Athayde M. 2013. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* Vol. 112: 105-107
- [32]. Allipi A.M., Reynaldi F.J., Lopez A.C., De Giusti M.R., Aguilar O.M., 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *Journal of Apicultural . Recherche.*, Vol. 43, 135 - 143.
- [33]. Haddad N., Khoury F., Tellawi A., Adjlane N. (2016) Screening the Efficacy of Different Anti-biotic Against American Foulbrood in Jordan. *Annals Najah University (Natural. Science.)* Vol. 30(2), 233-205.
- [34]. De Graaf, D. C., A. M. Alippi, K. Antu'nez, K. A. Aronstein, G. Budge, D. De Koker, L., De Smet, D. Dingman, J. D. Evans, L. J. Foster, 2013. Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 52(1), 52-63.