

Soumis le : 11/05/2020

Forme révisée accepté le : 09/02/2021

Auteur Corespondant: adjlanenouredine@hotmail.com



**Revue
Nature et Technologie**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN : 1112-9778 – EISSN : 2437-0312

Prévalence et répartition de la bactérie *Paenibacillus larvae* (Agent causal de la Loque américaine) au niveau de quelques ruchers de la région centre d'Algérie

ADJLANE Nouredine ^{a,*} et HADDAD Nizar ^b

^a Département d'Agronomie, Université M'hamed Bougara, Avenue de l'indépendance, Boumerdes, 35 000 Algérie.

Laboratoire de Bioinformatique, Microbiologie Appliquée et Biomolécules (BMAB), Université M'Hamed Bougara de Boumerdès

^b National Agricultural Research Center, P.O. Box 639-Baqa' 19381, Jordan.

Résumé

L'abeille constitue un élément indispensable de l'équilibre environnemental en tant que pollinisateur de très nombreuses espèces. La Loque américaine constitue une pathologie grave qui menace les colonies d'abeilles. Elle est considérée comme étant la maladie la plus néfaste du couvain de l'abeille domestique *Apis mellifera*. Les spores représentent le stade infectieux. La pathologie est causée par la bactérie *Paenibacillus larvae*. L'objectif de ce travail est l'étude de la prévalence de cette pathologie dans quelques régions du centre d'Algérie, en utilisant des méthodes de diagnostic microbiologiques et moléculaires. La recherche d'une possible influence de cette pathologie sur les mortalités des ruches est l'un des objectifs recherchés de ce travail. Un échantillonnage a été effectué sur 6 wilayas à la fin du 2019, 100 prélèvements ont été réalisés dans l'ensemble des régions étudiées sur 24 ruchers dont 4 ruchers par région. Une méthode de diagnostic microbiologique et une autre moléculaire par PCR¹ ont été utilisés pour la détermination de la contamination des abeilles par la bactérie. L'analyse des résultats obtenus montre que la bactérie est présente dans les cinq zones étudiées, mais les populations d'abeilles sont infestées à divers niveaux. Nombreux sont les facteurs qui favorisent la dissémination de la pathologie tels que les mauvaises pratiques apicoles, la forte densité des colonies d'abeilles, la vente des essaims et la transhumance. Le caractère hautement pathogène de cette maladie et l'incapacité de la dépister précocement sont en partie responsables de sa large diffusion.

Mots-clés : *Paenibacillus larvae* ; Abeille mellifère ; Prévalence ; PCR ; Symptômes, Mortalités.

Prevalence and distribution of the bacterium Paenibacillus larvae (causal agent of American foulbrood) at the level of some beehives of the central region of Algeria

Abstract

The honey bee constitutes an essential element of the environmental balance in the world as a pollinator of very many species. American foulbrood is a serious disease that threatens local bee colonies. It is considered to be the most harmful disease of the honey bee *Apis mellifera*. Spores represent the infectious stage. The pathology is caused by the bacterium *P. larvae*. The objective of this work is to study the prevalence of this pathology in some regions of central Algeria, using microbiological and molecular diagnostic methods. The research of a possible influence of this pathology on the hives mortalities is one of the sought objectives of this work. A sampling was carried out on 6 wilayas at the end of 2019, 100 samples were taken from all the regions studied, but the end of 2019 from 24 apiaries including 4 apiaries by region. A microbiological and a molecular diagnostic method by PCR were used to determine the contamination of bees by the bacterium. The analysis of the results obtained shows that the bacterium *Paenibacillus larvae* are present in the five areas studied. But bee populations are infested at various levels. Many factors favor the spread of the disease, such as poor beekeeping practices, the high density of honey bee colonies, the sale of swarms and transhumance. The highly pathogenic nature of this disease and the inability to detect it early are partly responsible for its wide spread.

Keywords: *Paenibacillus larvae*; Honey bee; Prevalence; PCR; Symptoms; Mortalities.

¹ PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction en chaîne par polymérase). Technique permettant d'amplifier spécifiquement un ADN d'intérêt après plusieurs cycles de réactions biochimiques.



Ceci est un document en libre accès selon les termes de [Creative Commons Attribution License CC-BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), ce qui permet de le partager, copier, reproduire, distribuer, communiquer, réutiliser ou de l'adapter avec l'obligation de créditer son auteur.

1. Introduction

La Loque américaine (AFB) est une maladie infectieuse du stade larvaire de l'abeille *Apis mellifera*, et est présente dans le monde entier où de telles abeilles sont gardées [1]. La Loque américaine est causée par la bactérie gram-positif *P. larvae*. Les larves de cette bactérie ont une capacité de propagation importante. Elle peut produire des milliards de spores dans chaque larve infectée, et peut survivre pendant de nombreuses années dans les écailles, les produits de la ruche et les équipements utilisés par les apiculteurs. De plus, cette bactérie est très résistante à la chaleur et aux produits chimiques [2]. Les individus malades brunissent, et la masse résultante devient gluante, enfin il y a une écaille foncée et dure sur le côté de la cellule [3]. Le couvain malade agit comme une source de spores infectieuses qui peuvent se propager dans tout un rucher et le tuer s'il n'est pas contrôlé ; pour ces raisons, la Loque est considérée comme l'une des rares maladies des abeilles capables de tuer des colonies entières [4]. L'infection des colonies continue d'être un problème et est le plus souvent causée par l'utilisation d'équipements contaminés, le déplacement des rayons de couvain infectés dans les colonies, la nourriture avec du miel contaminé. La Loque a un grave impact économique négatif sur l'industrie apicole et indirectement sur l'agriculture [5].

L'inspection des maladies des abeilles est un élément important de l'apiculture. Les apiculteurs doivent pouvoir reconnaître les maladies des abeilles selon des signes manifestement cliniques [6,7]. Les indicateurs les plus importants sont le couvain et les larves en bonne santé [8]. Une larve saine a un aspect blanc nacré scintillant. Elle se développe à la base de la cellule en forme de «C » et continue de croître en position verticale jusqu'au remplissage de la cellule [9]. Une fois infecté, la couleur de la larve change en brun crémeux puis en brun foncé [10]. Traditionnellement, les larves brun foncé ressemblant à la colle. Les larves décomposées peuvent former un fil avec le test de l'allumette, plongée et retirée dans la cellule douteuse ; ensuite la caractéristique filante disparaît et la larve devient une écaille adhérente aux parois de la cellule, ces résultats représentent les symptômes cliniques les plus évidents de la Loque américaine. C'est envisageant un système d'alerte de première ligne contre la maladie dans un domaine reconnu par les apiculteurs

[11].

Il existe deux principaux agents (facteurs) de transmission qui propagent la maladie : Les abeilles et l'apiculteur. La maladie se propage lorsque des spores sont transportées sur des abeilles dérivantes, des ruches, sur les vêtements de l'apiculteur et sur le pollen ou miel contaminés [12]. La forte densité d'individus au sein de la colonie, le contact physique étroit entre eux (par le contact causuel et la communication) et l'échange trophallactique des aliments et des substances glandulaires offrent tous des possibilités nombreuses de transmission d'agents pathogènes [13]. Par comportement de nettoyage des cellules, les abeilles ouvrières sont contaminées lorsqu'elles éliminent les larves séchées, une voie d'infection importante pour propager les spores infectieuses dans la colonie [14].

En Algérie, peu d'études ont été faites sur la Loque américaine en utilisant les méthodes de détections microscopiques, biochimiques et microbiologiques. L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence de la pathologie pendant la saison apicole 2019-2020 dans quelques ruchers situés dans la région centre d'Algérie en procédant à l'utilisation des méthodes microbiologiques et moléculaires.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Collection d'échantillons.

L'échantillonnage a été effectué dans 5 régions, Blida, Boumerdès, Alger, Tipaza et Bouira, au nord centre de l'Algérie, sur des colonies d'abeilles de la race *Apis mellifera intermissa*. 100 prélèvements ont été réalisés dans l'ensemble des régions étudiées durant la fin de l'année 2019 sur 20 ruchers, dont quatre ruchers par région.

2.2. Prélèvement des échantillons d'abeilles

Le prélèvement des ouvrières destinées à l'expérimentation a été réalisé se fait au niveau des cadres à couvain. A l'aide d'une brosse et d'un geste rapide les abeilles sont directement collectées dans une boîte de conservation laquelle est aussitôt fermée.

Pendant le transport, les abeilles adultes ont été conservées et plongées dans des boîtes numérotées contenant de l'éthanol 90°. Ce dernier est considéré comme un moyen de conservation des abeilles. Quand

le délai entre le prélèvement et l'utilisation des abeilles pour l'analyse est grand, il a été procédé à la congélation des abeilles à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Méthode de diagnostic microbiologique de l'agent causal

La méthode de Lundstrom et Fries [15] est utilisée dans la détection de la bactérie. Écraser soigneusement les intestins d'abeilles avec un mortier, après filtration, on place l'échantillon dans un tube à essai et on va ajouter 20 mL de l'eau physiologique. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 10 minutes. Le culot est récupéré et mélangé avec 12 mL de NaCl stérile (13 g.L^{-1}), l'échantillon est incubé pendant 10 minutes à $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 10 μL de la suspension sont inoculés sur les plaques MYPGP- agar. La lecture des résultats s'effectuera après avoir incubé ce dernier échantillon dans pendant 7 jours à $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ et à 5 % de CO_2 . Sur la gélose MYPGP, les colonies de la bactérie *P. larvae* sont petites, régulières, en général rugueuses, plates, blanchâtres ou beiges.

2.4. Méthode de diagnostic génétique de la Loque américaine

2.4.1. Enrichissement de *P. larvae*.

Les colonies bactériennes ont été collectées avec une boucle d'inoculation stérile et dispersées dans cinq mL de bouillon MYPGP. La suspension a été incubée à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures avec agitation continue à 170 tr.min^{-1} [16].

2.4.2. Extraction d'ADN du bouillon MYPGP

Les colonies bactériennes enrichies en bouillon MYPGP ont été récoltées dans une micro-centrifugeuse tube par centrifugation (Scientific, USA) à $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$ pendant trois minutes. Les pellets collectés ont été remis en suspension dans 300 μL de solution tampon CTAB (2 % (poids/vol) CTAB, 1,4 M NaCl, 1 % (wt/vol) PVP, 0,02 M EDTA et 0,1 M Tris-HCL. (pH ajusté à 8,0) et incubé dans bain-marie à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min sous agitation continue, puis le lysat bactérien a été incubé avec 30 rpm d'enzyme RNase 1 mg.mL^{-1} à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min. un volume de

phénol / chloroforme / alcool isoamylique (ratio 25 :24 :1) a été ajouté, mélangé et 25 microcentrifugé à $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$ pendant 5 min. Le surnageant a ensuite été transféré dans un nouveau tube ; Ensuite, un volume égal de chloroforme / alcool isoamylique (24 :1 v/v) a été ajouté, mélangé et micro-centrifugé à $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$ pendant 5 minutes. Le surnageant était transféré à nouveau dans un nouveau tube, 0,6 volume d'isopropanol ont été ajoutés et mélangés doucement et ensuite incubés à $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min ou toute une nuit à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à précipitation de l'ADN. Puis le tube a été centrifugé à $14\ 000\text{ tr.min}^{-1}$ pendant 15 min, le surnageant a été jeté et le l'ADN précipité a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 %, puis centrifugé à $14\ 000$ pendant 5 minutes. Le surnageant a été jeté et l'ADN a été séché à température ambiante après avoir inversé le tube sur un papier filtre pour permettre à tout le liquide de sécher. Enfin, le culot a été remis en suspension dans du tampon TE de 50 μL (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) et EDTA 1 mM (pH 8,0)), et conservé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

2.4.3. Pureté de l'ADN

La qualité de l'ADN a été testée en exécutant 10 μL de solution d'ADN mélangée à 2 μL de chargement colorant (Promega, USA) dans un gel d'agarose à 0,7 % à 80 volts pendant 30 min, puis photographié (Alphalimager, États-Unis).

2.4.4. Amplification PCR

La technique d'amplification a été directement utilisée pour détecter la présence ou l'absence de *P. larvae* dans les échantillons d'abeilles.

Les amorces utilisées pour amplifier deux régions spécifiques de la bactérie *P. larvae* sont : 5'-ACAAACTGGACCCGATCTAC-3' (KAT1) et 5'-CCGCCTTCTTCATATCTCCC-3' (Kat 2) [3].

2.5. Techniques employées pour l'analyse statistique des résultats

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel² Statistica® version 10 suivant le processus de l'analyse de la variance (ANOVA). La comparaison des moyennes a été faite par le test de

²<http://www.statsoft.fr/> / <https://www.tibco.com/products/data-science>

Newman – Keuls au seuil de 5 %.

3. Résultats

La prévalence de la Loque américaine en 2019 dans la région centre de l'Algérie est représentée dans la figure 1. Il existe une différence significative entre les

taux de contamination de la bactérie des régions étudiées ($p < 0,05$). La région de Tipaza enregistre la fréquence la plus élevée avec un taux de contamination de 32 %, suivie par celle de Boumerdes avec 19 %. Dans les autres régions les fréquences d'occurrence sont plus basses comme à Blida (14 %), Alger (11 %) et Bouira (5 %).

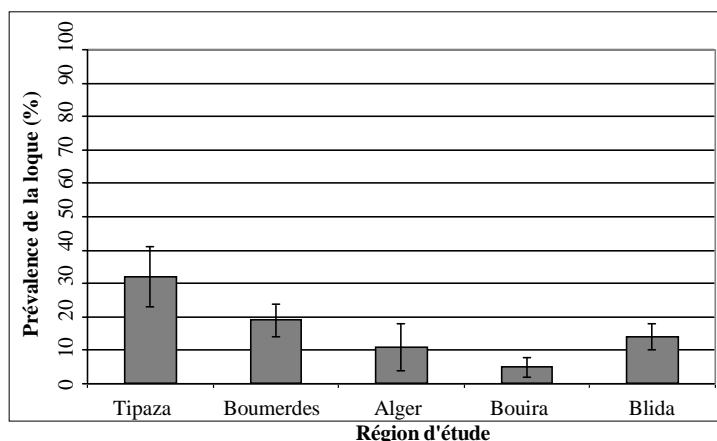


Figure 1 : Prévalences de la Loque américaine dans les zones étudiées

En conditions réelles, la détection de la Loque américaine est basée sur l'apparence du couvain contenant des larves malades dont l'aspect est très

particulier. Pour l'ensemble des ruches infestées, moins de 10 % des colonies sont caractérisés par la présence des symptômes de la maladie (Figure 2).

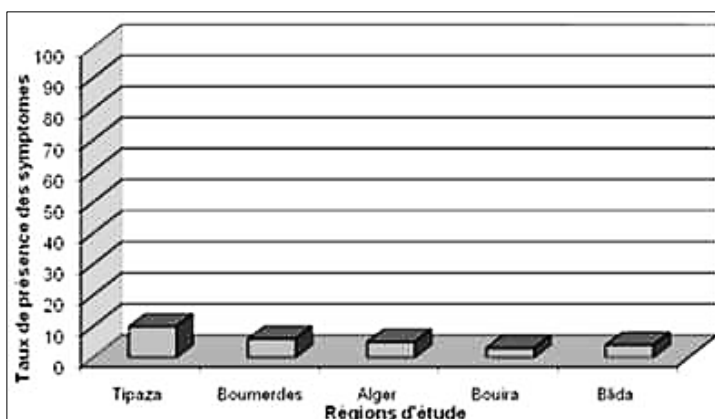


Figure 2 : Fréquences de l'apparition des symptômes de la Loque américaine dans les colonies infestées par la bactérie *P. larvae*

Parmi les symptômes typiques de la Loque américaine, un couvain irrégulier, des opercules perforés, des écailles, une masse brun clair dans la cellule formant un fil (Figure 3). On note d'ailleurs une

corrélation entre le pourcentage de contamination des ruches par la bactérie et la présence des signes de la pathologie. ($R=0,96, p < 0,001$) (Figure 4)

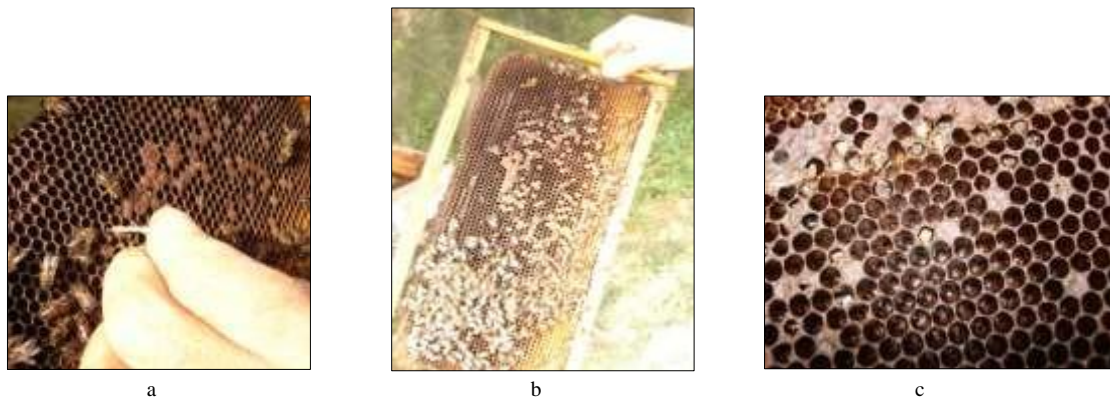
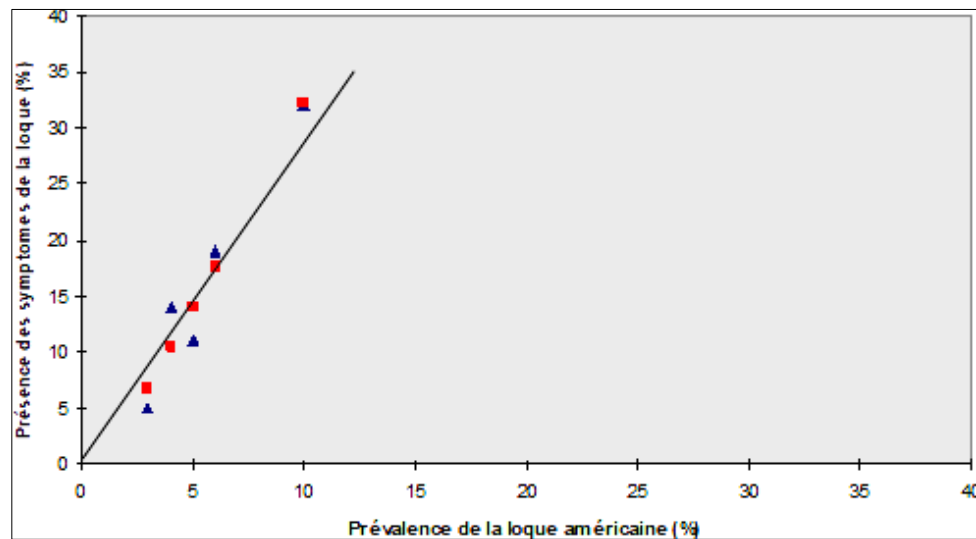


Figure 03 : Symptômes de la Loque américaine



a : Le test de l'allumette pour la détection de la Loque américaine (le contenu des cellules atteintes est filandreux et de consistance visqueuse) ;
 b, c : Un couvain en mosaïque avec des opercules perforés et des écailles

Figure 4 : régression linéaire montrant la corrélation entre le taux de prévalence de la maladie et la présence de symptômes de la Loque. ($R=0,96$, $p < 0,001$)

L'enquête réalisée en parallèle avec les prélèvements révèle que le taux de mortalité ne dépasse pas 10 % pour la majorité des ruchers visités. Le taux de mortalité le plus élevé est enregistré dans la région de Blida où les apiculteurs signalent une perte de 12 % en moyenne (Figure 5). Aucune corrélation n'existe entre les mortalités enregistrées et la présence de la Loque américaine ($R=0,39$; $p > 0,05$) (Figure 6).

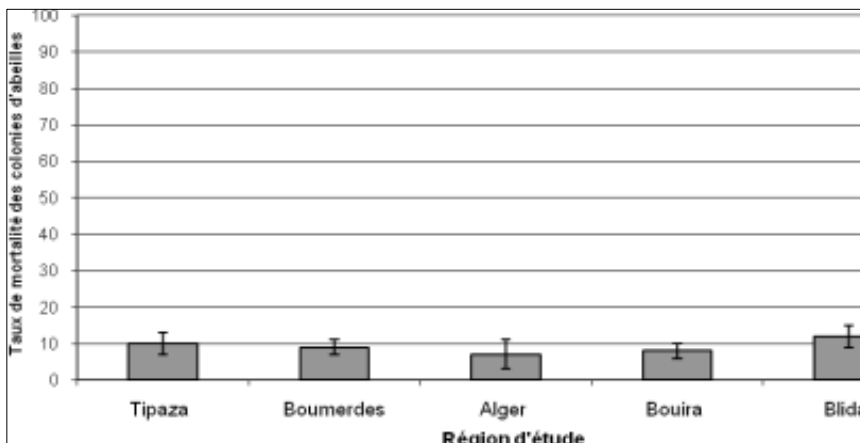


Figure 5 : Taux de mortalités enregistrés dans les ruchers étudiés pendant l'hiver 2019-2020.

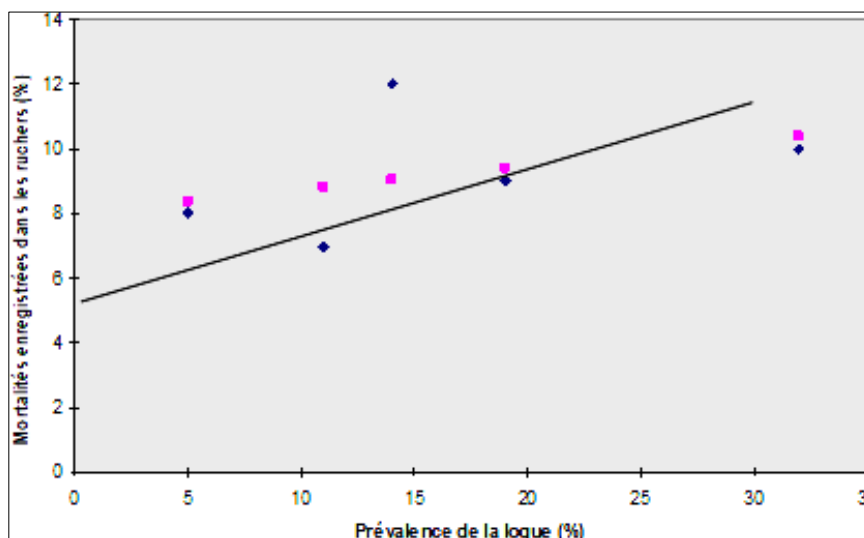


Figure 6 : régression linéaire montrant la corrélation entre le taux de prévalence de la maladie et les mortalités enregistrées dans les ruchers

4. Discussion

La Loque américaine est une pathologie grave qui menace les colonies d'abeilles locales. Elle est considérée comme la maladie la plus néfaste du couvain de l'abeille domestique *A mellifera*. Les résultats obtenus confirment la présence de cette pathologie dans les ruchers algériens. Cette recherche est la première confirmation au niveau national par l'utilisation des méthodes moléculaires. L'analyse des résultats obtenus montre que la bactérie *Paenibacillus larvae* est présente dans les cinq zones étudiées. Mais les populations d'abeilles sont infestées à divers niveaux. En général, la Loque américaine est décelée à la fin de l'hiver et au printemps. L'échantillonnage dans le cas de la présente

étude, a été effectué en hiver. Par ailleurs, les manipulations effectuées par l'apiculteur sont considérées comme un important facteur dans la propagation de la pathologie. Les mauvaises pratiques apicoles sont elles-mêmes favorables à l'apparition et à la diffusion de la Loque. L'échange des cadres de couvain contenant des restes de larves malades est la voie de diffusion de la maladie la plus commune [22].

Il faut rappeler qu'il existe d'autres voies de dispersion de la maladie tels que la vente des essaims qui peuvent être porteurs de spores et le déplacement des colonies d'abeilles [23]. En Algérie, les apiculteurs déplacent leurs ruches plusieurs fois par an dans différents endroits à la recherche de ressources nectarifères. Ces mouvements peuvent contribuer à la

propagation de la maladie. Des ruches contaminées peuvent introduire la maladie dans un nouvel endroit. A signalé que la transhumance des ruches en Algérie se fait sans aucune autorisation sanitaire.

Le mode de transmission entre les hôtes d'un agent pathogène est important pour la détermination de la virulence du pathogène et comme facteur clé du taux de transmission [24]. Les différents modes de transmission des agents pathogènes peuvent être divisés en deux catégories : horizontal et verticale. La transmission horizontale fait référence à la transmission parasitaire entre individus de la même génération, la transmission horizontale des spores entre les colonies est disponible [25] ; en référence verticale à celle du parent à la progéniture [26]. Chez les abeilles, la transmission de l'agent pathogène se produit horizontalement par dérive ou vol, et verticalement par essaimage. Le mode de transmission horizontal se produit à travers plusieurs itinéraires, par exemple en dérivant une abeille infectée de sa propre colonie à une autre [27], ou les contacts entre des individus ou avec matériel infectieux pendant le vol (est une activité dans laquelle les abeilles butineuses d'une colonie envahissent une autre colonie pour voler du miel : pillage). De Graaf *et al.* [17] rapportent à travers les résultats de leurs essais que la présence de *P. larvae* dans une ruche n'est pas systématiquement accompagnée de symptômes cliniques. Une colonie peut présenter de grandes quantités de spores par abeille adulte sans présenter de signes cliniques de la Loque américaine [18]. Lorsque des symptômes cliniques de la maladie apparaissent dans les colonies infectées, en l'absence de traitement, celles-ci succomberont très probablement à cette maladie [19]. Dans des colonies ne présentant pas de symptôme clinique de la maladie, des spores du pathogène peuvent être détectées dans des échantillons du couvain [20], ou dans le miel [21].

Les signes cliniques de la Loque américaine dépendent aussi du niveau de la virulence de la souche de la bactérie, de la concentration des spores dans les colonies et de la force de la ruche et sa résistance éventuelle à la Loque américaine [24].

A l'échelle mondiale, plusieurs travaux de recherche ont porté sur la répartition de la Loque au sein des colonies d'abeilles. En Suède, une étude a mis en évidence une prévalence de 70 % des abeilles contaminées par la Loque [15]. En Argentine, une étude

rapporte que 38 % des échantillons du miel des apiculteurs sont contaminés par la bactérie *P. larvae* [28]. En Argentine, 50 % des échantillons de miel sont contaminés par la bactérie [29]. Selon une étude faite en Pologne sur 242 échantillons du miel analysés en 2006, 23 % sont caractérisés par la présence de la bactérie [30]. En République Tchèque [31] rapportent un taux de 12 % des colonies contaminés par la bactérie. En 2010, les résultats d'une étude [32] ont rapportés un taux de 17 et 13 % d'infestation par la bactérie dans un échantillonnage qui a été effectué en Iran dans deux mois différents (Mai et Juin). En Iraq, on signale une faible prévalence de la pathologie [33]. Le taux de présence de la bactérie est de 2 %, la Loque européenne est la pathologie qui est présente en pourcentage très élevé (plus de 80 %).

Dans une étude faite en Ouganda, les chercheurs signalent la faible présence de cette pathologie. Les adaptations comportementales telles que la fuite et l'essaimage parmi les races d'abeilles africaines peuvent également expliquer leurs faibles niveaux d'infestation parasitaire. Deux races d'abeilles mellifères, *Apis mellifera scutellata* et *Apis mellifera adonsonii* sont caractérisés par un caractère comportemental pourrait entraîner une désinfection des colonies d'abeilles mellifères officiellement infectées par la bactérie [34]. L'étude de Morán (2011) [35] au Chili a analysé environ 1 300 échantillons de miel collectés dans les cadres de miel frais sur le terrain entre 2004 et 2009. Les résultats ont montré une prévalence estimée de 4 % des spores de *P. larvae* dans les échantillons de miel étudiés. Les résultats ont montré des effets similaires de *Paenibacillus* sur le taux de survie et les profils d'expression du gène codant pour des peptides antimicrobiens chez deux espèces d'abeilles (*mellifera* et *cerana*) lorsque les larves d'abeilles sont infectées par des spores à la concentration létale médiane (CL50) [36]. Les résultats de Stephan *et al.* (2020) [37] rapportent que la mortalité du couvain causée par la Loque américaine a entraîné une diminution progressive du nombre d'abeilles ouvrières adultes, entraînant finalement la colonie dans une spirale négative mortelle à laquelle elle ne pouvait pas échapper. Des chercheurs suggèrent fortement la nécessité d'appliquer des méthodes de culture améliorées ou une détection et quantification moléculaire pour une estimation plus fiable du risque de la Loque américaine afin de lutter

efficacement contre cette peste des abeilles [38]. Les résultats de Bassi *et al.* (2018) [39] ont montré que les niveaux de spores de *P. larvae* dans les débris de ruche peuvent être un outil utile pour l'évaluation des risques de la Loque américaine. L'utilisation de la PCR avec combiné avec d'autres outils moléculaires, sera une approche utile pour identifier les bactéries de *Paenibacillus* dans les échantillons de pollen et aidera à contrôler cette propagation du pathogène [40].

5. Conclusion

Les résultats de notre étude montrent clairement la présence et la forte prévalence de la Loque américaine dans les ruchers algériens, cette présence est accompagnée le plus souvent avec symptôme. Plusieurs facteurs peuvent éventuellement expliquer cette grande variation dans la distribution de la maladie tels que le facteur climatique, et surtout le rôle de l'apiculteur dans la dissémination de la pathologie. Selon la gravité de la situation, les colonies d'abeilles affectées par la Loque américaine seront détruites ou traitées au moyen d'interventions apicoles particulières. L'apiculteur ou le vétérinaire doit vérifier au moins deux fois par an l'absence de symptômes de la maladie sur tous les cadres du couvain au début et à la fin de la période apicole. Lorsqu'il y a un transfert d'un cadre du couvain d'une colonie à une autre, il faut vérifier le bon état sanitaire des deux ruches. Il faut appliquer la mise en quarantaine dans le rucher atteint par la maladie.

Références

- [1] Adjlane N. et Kechi H. S., la Loque américaine des abeilles mellifères : symptômes, contrôle et diagnostic, *Pratique vétérinaire*, 12 (2011) : 23-27.
- [2] Spivak M.S. & Reuter G.S., Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior, *Apidologie*, 32 (2001) : 555– 565. <https://doi.org/10.1051/apido:2001103>
- [3] Allipi A. M., Reynaldi F.J., Lopez A.C, De Giusti M.R. & Aguilar O.M., Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province, *J. Apic. Res.*, (43) (2004): 135-143. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101124>
- [4] Ricchiuti L., Rossi F., Del Matto I., Iannitto G., Del Riccio A.L., Petrone D. & Cammà C., A study in the Abruzzo region on the presence of *Paenibacillus larvae* spores in honeys indicated underestimation of American foulbrood prevalence in Italy, *Journal of Apicultural Research*, 58 (3) (2019): 416-419. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1541651>
- [5] Adjlane, N. & Haddad, N., Effect of some honey bee diseases on seasonal mortality of *Apis mellifera intermissa* in Algeria apiaries. In: *Proceedings of the Zoological Society*. Springer India, (2018), 83-87. <https://doi.org/10.1007/s12595-016-0188-5>
- [6] Adjlane N, Doumandji S.E. & Haddad N., Situation de l'apiculture en Algérie : facteurs menaçant la survie des colonies d'abeilles locales *Apis mellifera intermissa*, *Cah. Agric.*, 21 (2012) : 235- 41. <https://doi.org/10.1684/agr.2012.0566>
- [7] Haddad N. & Shehada S., "Honey bee brood disease", *NCARE*, (2001).
- [8] Haddad N.J. & Aladwan O., "American foulbrood", *Jordan agricultural engineering association*, 83 (2007): 58-59.
- [9] Otten, C., A general overview on AFB and EFB pathogen, way of infection, multiplication, Clinical symptoms and outbreak, *Agricultural*, 54 (2003): 15-25. Disponible en ligne : <http://www.fiitea.org/foundation/files/2003/Otten.pdf>. Accédé le 05/05/2020
- [10] Ashiralieva A. & Genersch E., Reclassification, genotypes, and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honey bees - a review, *Apidologie*, 37 (2006): 411–420. <https://doi.org/10.1051/apido:2006028>
- [11] De Graaf D.C., Vandekerckhove D., Dobbelaire W., Peeters J.E. & Jacobs F. J., Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey, *Apidologie*, 32 (2001): 587-599. <https://doi.org/10.1051/apido:2001146>
- [12] Hansen H. & Brodsgaard C.J., American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control, *Bee World*, 80 (1999): 5–23. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1999.11099415>
- [13] Fries I. & Camazine S., Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, *Apidologie* 32 (2001): 199–214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- [14] Basualdo M, E. Figini, J. Torres, A. Tabera, Bedascarrasbure, C. & Libonatti, E., Short communication. Control of American foulbrood disease in Argentine commercial apiaries through the use of queens selected for hygienic behaviour, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 23 (2008): 15-28. Disponible en ligne : <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ES2008000980>. Accédé le 28/04/2020
- [15] Lindstrom A. & Fries I., Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *J. Apicult. Res.*, 44 (2) (2005): 82-86. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101154>
- [16] Lauro F. M., Favaretto M., Covolo L., Rassa M. & Bertoloni G., Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol, *International Journal of Food Microbiology*, 81 (2003): 85-96. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00257-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00257-X)
- [17] De Graaf D. C., Alippi A. M., Brow, M., Evans J. D., Feldlaufer M., Gregorc A. & Tomkies V., Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols, *Letters in applied microbiology*, 43 (6) (2006): 583-590. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x>
- [18] Lindstrom A., Korpela S. & Fries I., Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing, *Apidologie*, (39) (2008): 515-522. <https://doi.org/10.1051/apido:2008032>
- [19] Genersch E., Ashiralieva A. & Fries I., Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (11) (2005): 7551-7555. <https://doi.org/10.1128/aem.71.11.7551-7555.2005>
- [20] Hornitzky M.A.Z., The detection of *Bacillus larvae* (American foulbrood) in adult honey bees, *Australas. Beekeep.* 90 (1988) : 11–12.
- [21] Antunez K., D'alexandro B., Piccini C., Corbella E. & Zunino P., *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey, *Journal of Invertebrate Pathology*, 86 (2004): 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.03.011>

- [22] Shimanuki H. & Knox D.A., Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey, *Am. Bee J*, 128 (1988): 353-354.
- [23] Pankiw F. & Corner J., The transmission of American foulbrood by package bees, *J. Apicult. Res.*, 5 (1966) : 99-101. <https://doi.org/10.1080/00218839.1966.11100141>
- [24] Fries I, Lindström A. & Korpela S.; Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*), *Veterinary microbiology*, 114 (3-4) (2006): 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.068>
- [25] Human H., Pirk C. W. W., Crewe, R. M., & Diemann, V., The honey bee disease American foulbrood - an African perspective, *African Entomology*, 19 (3) (2011): 551-557. <https://doi.org/10.4001/003.019.0301>
- [26] Dingman D. W., Honey bees and American Foulbrood, *Plant Science*, 70 (2009): 47-49.
- [27] Miyagi T., Peng C.Y.S., Chuang R.Y., Mussen E.C., Spivak M.S. & Doi R.H., Verification of Oxytetracycline-resistant American Foulbrood Pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States, *J. Invertebr. Pathol.*, 75 (1999) : 95-96. <https://doi.org/10.1006/jjpa.1999.4888>
- [28] Iurlina M.O., Saiz A.I., Fuselli S.R. & Fritz R., Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina., *LWT - Food Science and Technology*, 39 (2006): 105- 110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.006>
- [29] Basualdo M., Figini E., Torres J., Tabera A., Libonatti C. & Bedascarrasbure E., Control of American foulbrood disease in Argentine commercial apiaries through the use of queens selected for hygienic behavior, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6 (2) (2008): 236-240. Disponible en ligne : http://www.inia.es/gcontrec/pub/236-240_SC_Control_1212051796421.pdf. Accédé le 13/01/2021
- [30] Pohorecka K. & Bober A., Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in Honey samples domestic apiaries, *Journal of Apicultural Science*, 52 (2) (2008) : 105-111. Disponible sur URL : <http://www.jas.org.pl:81/Issue/25>. Accédé le 12/04/2020
- [31] Ryba S., Titera D., Haklova M., Stopka P., A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris, *Veterinary Microbiology*, 139 (2009): 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.05.009>
- [32] Yuesefkhani M. & Lotfi A., Incidence of Foulbrood in Honey Bee of Eastern Azerbaijan Province, Northwest of Iran, *Academic Journal of Entomology*, 3 (2010): 37-38. Disponible en ligne : [https://www.idosi.org/aje/3\(1\)10/7.pdf](https://www.idosi.org/aje/3(1)10/7.pdf). Accédé le 08/04/2020
- [33] Hind Suhail A. & May Ibraheem Y., Effects of diseases and pests on honey bee (*Apis mellifera*) in different parts in Baghdad city, Iraq, *Plant Archives*, 20 (1) (2020) 220-223. Disponible en ligne. http://www.plantarchives.org/SPECIAL%20ISSUE%2020-1/44_220-223_.pdf. Accédé le 1/44_220-223_.pdf. Accédé le 1/44_220-223_.pdf
- [34] Chemurot M., Brunain M. & Akol A.M., Descamps D. & de Graaf D. C., First detection of *Paenibacillus larvae* the causative agent of American Foulbrood in a Ugandan honey bee colony, *Springer Plus*, 5 (1) (2016): 36-42. <https://dx.doi.org/10.1186/s2Fs40064-016-2767-3>
- [35] Morán A., (2011) Actual situation of American Foulbrood in Chile, according the Project Fondo SAG N° 24 and projections. 42nd Congreso Internacional Apimondia Buenos Aires, Argentina.
- [36] Krongdang S., Comparative susceptibility and immune responses of Asian and European honey bees to the American foulbrood pathogen, *Paenibacillus larvae*, *Insect science*, 26 (5) (2019): 831-842. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12593>
- [37] Stephan J.G., De Miranda J.R. & Forsgren E., American foulbrood in a honey bee colony: spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development, *BMC ecology*, 20 (1) (2020): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12898-020-00283-w>
- [38] Crudele S., Ricchiuti L., Rubert A. & Rossi F., Quantitative PCR (qPCR) vs culture-dependent detection to assess honey contamination by *Paenibacillus larvae*, *Journal of Apicultural Research*, 59 (2) (2020): 218-222. <https://doi.org/10.1101/741801>
- [39] Bassi S., Carpana E., Bergomi P. & Galletti G., Detection and quantification of *Paenibacillus larvae* spores in samples of bees, honey and hive debris as a tool for American foulbrood risk assessment, *Bulletin of Insectology*, 71 (2) (2018): 235-241. Disponible en ligne : <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol71-2018-235-241bassi.pdf>. Accédé le 25/11/2020
- [40] Andrade V.D.M., Flores J.L.H., López M.A.R. *et al.*, Evaluation of the presence of *Paenibacillus larvae* in commercial bee pollen using PCR amplification of the gene for tRNA^{Cys}, *Braz. J. Microbiol.*, 50 (2019): 471–480. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00039-9>