

Etude sur la contamination des miels par *Paenibacillus larvae* en Région wallonne et relation avec l'expression clinique de la loque américaine dans les colonies d'abeilles domestiques.

NGUYEN B.K.¹, SAEGERMAN C.², HAUBRUGE E.¹

¹ Unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive, Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège, Passage des Déportés 2, 5030 Gembloux, Belgique

² Département des maladies infectieuses et parasitaires, Unité de recherches en Epidémiologie et Analyse de risques appliquées aux sciences vétérinaires (UREAR), Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance: B.K. Nguyen Email : BK.Nguyen@ulg.ac.be

RESUME

Dans le secteur apicole, cinq maladies ou organismes nuisibles sont sujets à déclaration obligatoire en Belgique : l'acarapisose, la loque américaine, la loque européenne, la varroose, le coléoptère *Aethina tumida* et l'acarien *Tropilaelaps sp.* Bien que *Paenibacillus larvae* constitue une des plus graves affections bactériennes du couvain, peu de données sont actuellement disponibles sur la prévalence de la loque américaine en Belgique. La présente étude dresse un état des lieux de la prévalence de la maladie déclarée en Région wallonne et évalue également la relation entre la présence d'infections à *P. larvae* dans le miel et les pertes élevées de colonies constatée depuis 1999. Cinquante ruchers ont été suivis dans le sud de la Belgique où des échantillons de miel ont été prélevés. La détection et la quantification des spores dans les échantillons ont été réalisées via des approches microscopique, bactériologique et moléculaire. Des spores de *Paenibacillus larvae* ont été détectées dans 26 % des ruchers examinés. Cependant, un seul rucher présentait la maladie déclarée et aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la présence de spores de *Paenibacillus larvae* dans le miel et le taux de mortalité dans les ruchers.

INTRODUCTION

La loque américaine (*American foul-brood* – AFB) est une maladie de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) extrêmement contagieuse (Kilwinski *et al.*, 2004). Elle constitue une des pathologies du couvain les plus graves (Alippi, 1999) et engendre des pertes économiques considérables dans le secteur apicole, et ce dans de nombreux pays à travers le monde. La loque américaine des abeilles mellifères constitue une maladie notifiable à l'Organisation mondiale de la Santé animale (Office International des Epizooties, 2004a). L'agent pathogène est une bactérie appelée *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*) (Genersch *et al.*, 2006). On la retrouve sur l'ensemble des continents, excepté en Afrique où elle n'est pas ubiquiste (Ellis et Munn, 2005). De 1997 à 1999, il sem-

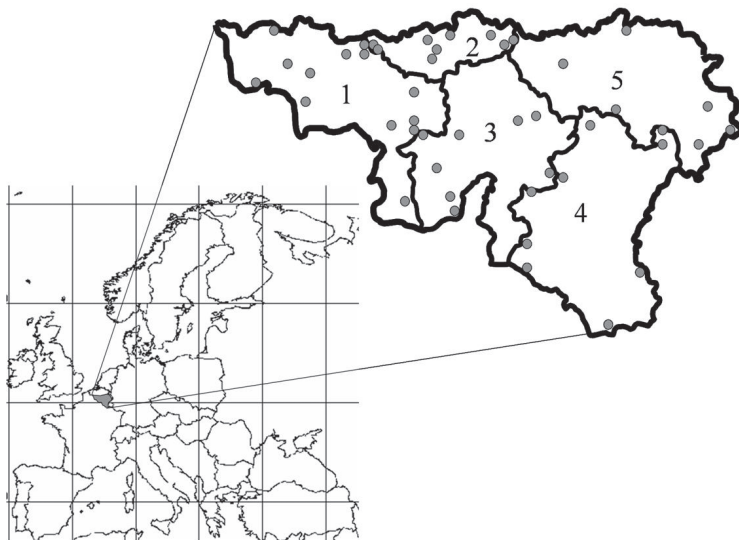
blait que cette bactérie était seulement sporadique en Belgique. Cependant, en 1999, des spores ont été détectées dans un grand nombre d'échantillons de miel et l'apparente faible fréquence de la loque américaine en Belgique a été remise en question (de Graaf *et al.*, 2001). L'objectif de cette étude est d'actualiser les données disponibles en Région wallonne sur la prévalence de la maladie déclarée, ainsi que sur la prévalence de spores de *P. larvae* dans le miel. En outre et compte tenu du taux de mortalité élevé d'abeilles domestiques observé en Région wallonne (Lefebvre et Bruneau, 2003), la relation entre la présence d'infections à *P. larvae* dans le miel et les pertes élevées de colonies a également été évaluée. Des méthodes microscopique, microbiologique et moléculaire ont été employées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sélection des ruchers, prélèvement des échantillons et évaluation de la mortalité

En 2004, cinquante ruchers ont été aléatoirement sélectionnés en Région wallonne (figure 1). Dans chaque rucher, deux colonies ont été aléatoirement sélectionnées. Il a été demandé aux apiculteurs de suivre leur méthode de travail habituelle. Cependant, pour des raisons pratiques, les colonies suivies ne devaient pas être déplacées durant l'ensemble de l'étude. Aucune transhumance n'était autorisée. Les apiculteurs ont été interviewés sur leurs pratiques apicoles ainsi que sur d'éventuels problèmes rencontrés préalablement. Une attention particulière a été portée à la mortalité

Figure 1. Distribution géographique des 50 ruchers inclus dans l'étude. Rond gris : rucher. Les chiffres correspondent aux différentes provinces: 1 = Hainaut, 2 = Brabant-Wallon, 3 = Namur, 4 = Luxembourg, 5 = Liège.



des colonies d'abeilles domestiques lors des entretiens. Chez les insectes sociaux, les individus vivent en colonie (Schmid-Hempel, 1998) qui sont considérées par certains éthologues comme des super-organismes (Wilson, 1972). Dans ce contexte, l'unité d'échantillonnage employée dans les calculs de mortalité était la colonie. La mortalité est définie par l'absence complète d'abeilles vivantes dans la colonie et le taux de mortalité dans un rucher est défini comme le nombre de colonies mortes divisé par le nombre total de colonies dans le rucher multiplié par cent (Nguyen *et al.*, 2009). Au total, cent échantillons de miel ont été collectés, sur plusieurs cadres, dans les colonies préalablement sélectionnées.

Mise en culture, comptage et identification

La mise en culture et le comptage des spores de *P. larvae* est inspiré de l'étude de de Graaf et collaborateurs (2001). Dix grammes de miel ont été mélangés avec un volume équivalent de tampon phosphate salin (PBS) et centrifugé 30 minutes à 4000 g. Le culot a été suspendu dans 250 µL de PBS stérile, chauffé à 80°C durant 15 min, passé au vortex puis mis en culture sur un milieu MYPGP (Alippi, 1995). Les boîtes de Pétri ont été incubées 4 jours à 37°C, en aérobie et le nombre de spores viables et formant des colonies (*Colony Forming Units*

– CFU) a été compté. Si le nombre de colonies était trop élevé, des dilutions (10 x, 100 x, 1.000 x, 10.000 x) ont été réalisées.

Un échantillon était considéré comme positif à *P. larvae* si les observations microscopiques mettaient en évidence des bacilles en forme de bâtonnets arrondis, droits ou/et parfois incurvés, si ces derniers étaient catalase négatif, gram positif (Heyndrickx *et al.*, 1996) et s'ils présentaient un résultat positif à l'amplification par polymérisation en chaîne (PCR).

Pour les analyses moléculaires, une combinaison d'amorces basées sur le gène de l'ARN 16S a été employée. Il s'agit de la paire d'amorces 5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3', 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3' (Dobbelaere *et al.*, 2001). Ces amorces sont celles conseillées par l'Organisation mondiale de la Santé animale (2004a). Pour la PCR, la préparation de l'ADN a été réalisée comme suit : une colonie a été mélangée avec 400 µL d'eau MilliQ, les tubes ont été chauffés 4 fois durant 15 secondes, à 10 secondes d'intervalle et ce, au micro-onde à une puissance de 800 W. Ensuite les tubes ont été centrifugés et le surnageant a été conservé pour analyse. L'amplification a été effectuée comme préalablement décrite par Piccini et collaborateurs (2002) et les produits de PCR ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % avant visualisation sous rayons UV.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Stata/SE 10 (StataCorp, 2003). La concordance entre le nombre de spores de *P. larvae* provenant des échantillons issus d'un même rucher a été testée avec le test Kappa. La distribution géographique préférentielle des spores et de la mortalité ont été évaluées à l'aide d'un test exact de Fisher. Ensuite, la corrélation entre le taux de mortalité dans les différents ruchers et le niveau de contamination avec *P. larvae* a été testée. Le nombre moyen de spores dans les ruchers présentant un taux de mortalité $\geq 10\%$ et dans les ruchers avec un taux de mortalité $< 10\%$ ont été comparés avec un test de Welch et la corrélation entre le nombre de spores de *P. larvae* et le taux de mortalité a été testé à l'aide du coefficient de corrélation de Spearman. Le niveau de signification des tests était fixé à 5 %.

RÉSULTATS

La présente étude a mis en évidence la présence de spores de *P. larvae* dans 26 % des ruchers suivis et dans 20 % des échantillons de miel testé. Le nombre de spores comptées dans les échantillons variaient de 1 à 6,67 10⁵ spores par 10 g de miel (tableau I).

Si on considère la présence et l'absence de spores dans chaque échantillon, la concordance entre les résultats des échantillons prélevés au sein des mêmes ruchers peut être considérée comme bonne (Kappa = 0,63; Intervalle de confiance 95 % : 0,35 – 0,90).

Parmi les échantillons positifs, un provenait d'un rucher où la loque américaine était présente au stade clinique (opercules de cellules de larve foncés, concaves et percés, odeur caractéristique, larves sous forme d'écailles ou de consistance visqueuse) ce qui explique le nombre élevé de spores comptabilisées dans cet échantillon. Pour les autres échantillons, le nombre de spores détectées était relativement faible (entre 1 et 51337 spores par 10 g de miel). Les échantillons positifs ont été observés dans la province du Hainaut, de Namur, du Brabant-Wallon, du Luxembourg et de Liège (figure 2a). Toutefois, aucune distribution géographique préférentielle des spores n'a été mise en évidence (test exact de Fisher, $P = 0,44$). Cinq ruchers présentaient plus de 50 % de mortalité, quinze entre

Tableau I. Nombre moyen de spores comptabilisées dans les échantillons et pourcentage de mortalité par rucher.

| Rucher | Nombre de spores moyen par échantillon | % de mortalité | Rucher | Nombre de spores moyen par échantillon | % de mortalité |
|--------|--|----------------|--------|--|----------------|
| 1 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 55 | 27 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 18 | 29 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 13 | 30 | 6 | 0 |
| 6 | 0 | 23 | 31 | 0 | 10 |
| 7 | 0 | 14 | 32 | 0 | 0 |
| 8 | 15 | 17 | 33 | 0 | 25 |
| 9 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 25 | 35 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 25 | 36 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 37 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 38 | 1 | 29 |
| 14 | 5 | 0 | 39 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 40 | 2 | 0 |
| 16 | 0 | 5 | 41 | 0.5 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 42 | 0 | 0 |
| 18 | 1304 | 10 | 43 | 16.5 | 60 |
| 19 | 50002 | 10 | 44 | 1.5 | 0 |
| 20 | 45 | 0 | 45 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 46 | 655000 | 50 |
| 22 | 0 | 20 | 47 | 0 | 0 |
| 23 | 0 | 25 | 48 | 0 | 0 |
| 24 | 0 | 57 | 49 | 0 | 52 |
| 25 | 0 | 47 | 50 | 0 | 4 |

10 et 49 % et trente avaient un taux de pertes inférieur à 10 %, ce qui correspond à une moyenne de 11,9 % de mortalité par rucher. Le taux de mortalité considéré comme acceptable et normal par les apiculteurs est de 10 % (Morgenthaler, 1968). Des pourcentages de mortalité supérieurs ont été constatés dans chacune des provinces wallonnes (figure 2b) et la répartition géographique des ruchers avec 10 % de pertes ou plus ne présente pas de distribution préférentielle (test exact de Fisher, $P = 0,30$).

Lors de l'analyse de la corrélation entre le nombre de spores et le taux de mortalité par rucher, c'est le nombre maximum de spores quantifié dans les deux échantillons de miel par rucher qui a été pris en compte. Aucune corrélation n'a été observée (coefficient de corrélation de Spearman = 0,15; d.l.l. = 48; $P = 0,31$; Intervalle de Confiance 95 % : -0,14 to 0,41). De plus, dans les ruchers où *P. larvae* a été détecté, le nombre moyen de spores quantifié n'était pas significativement supérieur dans le groupe de ruchers où le taux de mortalité était ≥ 10 % ($n = 7$) comparé aux ruchers où le taux de mortalité était < 10 % ($n = 6$) (Test de Welch ; d.d.l. 6; $P = 0,16$).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Un grand nombre de facteurs sont susceptibles d'influer sur la vitalité de l'abeille domestique. On retrouve notamment, les causes inhérentes au

secteur agricole (par exemple, des pesticides ou un manque de connaissances), aux particuliers (par exemple, des pesticides), aux industries (par exemple, une pollution locale), à l'environnement (par exemple, la température ou un problème de disponibilité en ressources nutritives) et au secteur apicole (par exemple, des pesticides ou des pathologies) (Haubrugé *et al.*, 2006). Parmi les pathologies, la loque américaine est une maladie visée par l'arrêté royal du 25/04/1988 désignant les maladies des animaux soumises à l'application du chapitre III de la loi du 24/03/1987 relative à la santé des animaux. Cette maladie est dite « à déclaration obligatoire ». Cependant, jusqu'à présent la détection de cette maladie dans les ruchers en Région wallonne est essentiellement réalisée

lors de suspicion des apiculteurs. Elle s'effectue donc sur une base de volontariat et les déclarations sont relativement rares.

La présente étude dresse un état des lieux de la prévalence de la maladie déclarée en Région wallonne et évalue également la relation entre la présence d'infections à *P. larvae* dans le miel et les pertes élevées de colonies constatée depuis 1999.

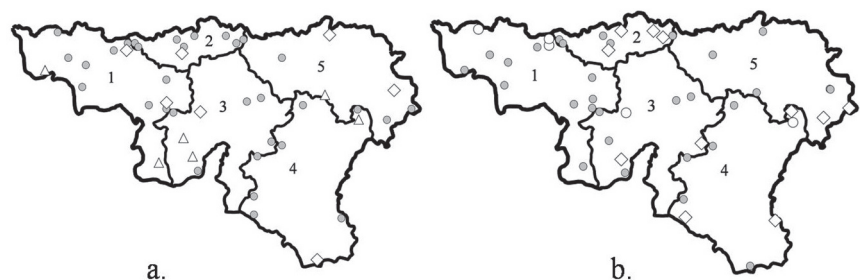
Des spores de *P. larvae* ont été détectées dans 20 % des échantillons de miel collectés. Ce résultat est supérieur au pourcentage obtenu par de Graaf et collaborateurs en 2001 qui était de 11 %. Parmi les échantillons positifs, un seul provenait d'un rucher où la loque américaine était présente au stade clinique, ce qui explique le nombre conséquent de spores comptabilisées dans ce rucher. Dans les autres échantillons, le nombre de spores était relativement faible. Le pourcentage élevé d'échantillons positifs comparés au nombre de cas clinique confirme l'étude de Hansen et Rasmussen (1986) qui conclue que la présence de *P. larvae* dans un rucher ne révèle pas systématiquement de signes cliniques (Hansen et Rasmussen, 1986).

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 de la souche d'abeilles atteinte par la maladie (Crailsheim et Riesberger-Gallé, 2001 ; Ritter, 2003).

Les échantillons positifs ont été détectés dans les provinces du Hainaut, de Namur, du Brabant-Wallon, du Luxembourg et de Liège. Pour expli-

Figure 2.

- a.** Distribution géographique des ruchers examinés et nombre de spores observés.
Rond gris : négatif; triangle : 1-9 spores/10 g de miel; losange : 10 spores ou plus/10 g de miel.
- b.** Distribution géographique des ruchers et pourcentages de mortalité.
Rond gris : 0-9 %; losange : 10-49 %; rond blanc : 50 % de mortalité ou plus



quer la distribution des miels contaminés, deux hypothèses peuvent être avancées. La première consiste en l'arrivée de spores originaires de zones géographiques jouxtant la Région wallonne. Des cas de loque américaine ont été recensés en Allemagne, en France, au Luxembourg et en Région flamande (Le Conte et Faucon, 2002 ; Von der Ohe, 2003 ; Office international des Epizooties, 2004b). Ainsi, leur proximité géographique pourrait expliquer en partie la présence des spores détectées, et ce notamment via le commerce du miel ou le transfert de matériel contaminé. La seconde hypothèse serait que des spores étaient déjà présentes en Région wallonne. L'étude de de Graaf et collaborateurs (2001) a révélé la présence de spores de loque américaine dans le nord de la province du Hainaut, dans la région de Namur-Dinant et au nord de la province du Brabant wallon. Ces entités géographiques auraient pu constituer des « foyers de spores » et auraient pu progressivement s'étendre dans l'ensemble de la Région wallonne.

Deux faits ont pu faciliter la dissémination de la loque américaine en Région wallonne. Le premier est que les spores de *P. larvae* ont la capacité à rester viable durant une période pouvant atteindre 35 ans (Haseman, 1961). Le second est que les dispositions mises en place pour contrôler la loque américaine n'étaient pas et ne sont toujours pas adaptées à un secteur apicole encore fort marginal. Ainsi si un apiculteur suspecte une colonie d'être atteinte ou d'être contaminée, il est tenu d'en faire immédiatement la déclaration à l'Unité provinciale de Contrôle (UPC) dont dépend le rucher. L'UPC envoie alors un assistant apicole, qui prélève des échantillons et les transmet au Centre d'Étude et de Recherches vétérinaires et agrochimiques (CERVA). Si les échantillons sont positifs (contiennent des spores), la colonie contaminée est soit détruite

soit fait l'objet d'une procédure d'essaimage artificiel. Une zone de protection d'un rayon de 3 km autour du foyer est délimitée par l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) en collaboration avec le bourgmestre. À l'intérieur de la zone de protection, il est interdit de transporter des abeilles et les autres ruchers présents seront également examinés. Toutefois, la problématique est, qu'à l'heure actuelle, approximativement seul un quart des apiculteurs sont déclarés en Belgique et qu'il est dès lors difficile d'examiner des ruchers que l'on ne sait pas exister et d'empêcher le déplacement de colonies non déclarées.

Concernant l'éventuel lien entre la présence de loque américaine et les taux anormalement élevés de mortalité en Région wallonne, seulement un site avec expression clinique de la maladie a été observé. Concomitamment, 17 ruchers sur 50 présentaient un taux de mortalité supérieur au niveau considéré comme acceptable par les apiculteurs. Ainsi, malgré le fait que cette maladie au stade clinique est fortement dommageable pour l'abeille domestique, les niveaux élevés de pertes constatés ne peuvent être attribués à ce seul facteur. La relation avec la présence d'infections à *P. larvae* dans le miel a également été évaluée. Toutefois l'analyse des résultats n'a pas permis de mettre en évidence de lien entre le nombre de spores détectés dans le miel et la mortalité des colonies.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient tous les apiculteurs qui ont accepté de participer à l'enquête de prévalence. Cette étude a été financée par la Direction de la Recherche, Direction générale opérationnelle de l'Agriculture, des Ressources naturelles et de l'Environnement (D'GARNE), Service public de Wallonie (convention D31-1090).

Study on the contamination by *Paenibacillus larvae* of honey from the south part of Belgium (Walloon Region) and relation with the clinical expression of American Foulbrood in honey bee colonies.

SUMMARY

In the beekeeping sector, there are five reportable diseases in Belgium: Acariosis, American foulbrood, European foulbrood, Varroosis, *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* sp. *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of the American foulbrood is one of the most severe bacterium affecting the brood of the honey bee, but few data are available on the prevalence of this bacterial disease in Belgium. Aims of this study is to review the prevalence of this disease at the clinical stage in the south part of Belgium (Walloon region) and to evaluate the correlation between the high level of honey bee colony losses observed in Belgium since 1999 and the presence of *P. larvae* in honey. Fifty apiaries in the south part of Belgium (Walloon Region) were followed and the spores were detected and quantified in honey combining microscopic, classic bacteriological and molecular approaches. Twenty-six percent of the apiaries tested contained spores of *Paenibacillus larvae*. Nevertheless, only one apiary presented the disease at the clinical stage and no significant correlation has been highlighted between the presence of spores of *Paenibacillus larvae* in honey samples and the honey bee colony death rate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALIPPI A.M. Detection of Bacillus larvae spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia*, 1995, **11**, 343-350.
- ALIPPI A.M. Bacterial diseases. In : Kilani M., Colin M.E., Alippi A.M., Puerta F., Flores J.M., Ruiz J.A., Campano F., Ball B.V., Garcia Fernandez P., Ben Hamida B., Matheson A., Bee disease diagnosis. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes – International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies: Zaragoza, 1999, 31-59.
- CRAILSHEIM K., RIESBERGER-GALLÉ U. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, 2001, **32**, 91-103.
- DE GRAAF D.C., VANDEKERCHOVE D., DOBBELAERE 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*, 2001, **32**, 587-599.
- DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E., JACOBS F.J. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 2001, **32**, 363-370.
- ELLIS J.D., MUNN P.A. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 2005, **86**, 88-101.
- GENERSCH E., FORSGREN E., PENTIKAINEN J., ASHIRALIEVA A., RAUCH S., KILWINSKI J., FRIES I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 501-511.
- HANSEN H., RASMUSSEN B. The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. *Tids. Plant.*, 1986, **90**, 81-86.
- HASEMAN L. How long can spores of American Foulbrood live? *Am. Bee J.*, 1961, **101**, 298-299.
- HAUBRUGE E., NGUYEN B.K., WIDART J., THOMÉ J.P., FICKERS P., DEPAUW E. Le dépérissement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: *Apidae*) : faits et causes probables. *Notes Faun. Gembloux*, 2006, **59**, 3-21.
- HEYNDRICKX M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., JANSSEN P., KERSTERS K., DE VOS P., LOGANNA.A., ALIN., BERKELEY W. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifasciens* (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. *pulvifasciens*. *Int. J. Syst. Bact.*, 1996, **46**, 270-279.
- KILWINSKI J., PETERS M., ASHIRALIEVA A., GENERSCH E. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*: results of a comparative biochemical and genetic study. *Vet. Microbiol.*, 2004, **104**, 31-42.
- LE CONTE Y., FAUCON J.P. Les maladies de l'abeille domestique. *Courr. Nat.*, 2002, **196**, 28-32.
- LEFEBVRE M., BRUNEAU E. Suivi sanitaire d'urgence des ruchers présentant des symptômes de dépérissement. Rapport final, Projet FF 02/15 (414) du Fonds Budgétaire des Matières Premières. Bruxelles, 2003. 16p.
- MORGENTHALER O. Les maladies infectieuses des ouvrières. In : Budel A., Lavie, P., Wahl O., Ruttner F., Maurizio A., Fyg W., Morgenthaler O., Frisch K. (Eds), *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 4. Masson : Paris, 1968, 324-409.
- NGUYEN B.K., SAEGERMAN C., PIRARD C., MIGNON J., WIDART J., THIRIONET B., VERHEGGEN F.J., BERKVEN D., PAUW E.D., HAUBRUGE E. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J. Econom. Entomol.*, 2009, **102**, 616-623.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES American foulbrood of honey bees. In : Office international des Epizooties, *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5th edition. Volume 1. World Organisation for Animal Health : Paris, 2004a, 395-404.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Sanitary informations. Volume 17(42). World organisation for Animal Health: Paris, 2004b, 301.
- PICCINI C., D'ALESSANDRO B., ANTUNEZ K., ZUNINO P. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **18**, 761-765.
- RITTER W. Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, 2003, **38**, 125-130.
- SCHMID-HEMPEL P. The biology of social insects. In : Schmid-Hempel P., *Parasites in social insects*. Princetown University Press : Princeton, 1998, 3-23.
- VONDER OHE W. Control of American foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta*, 2003, **38**, 137-139.
- WILSON O.E. Social homeostasis and the superorganism. In : Wilson O.E., *The insect societies*. Harvard University Press : Cambridge, 1972, 306-319.