

Université de Montréal

**Prévalence d'agents pathogènes de l'abeille domestique
(*Apis mellifera*) au Québec et leur impact sur la mortalité
hivernale**

par Gabrielle Claing

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires, option épidémiologie

Août 2019

© Gabrielle Claing, 2019

Université de Montréal
Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

Prévalence des principaux agents pathogènes de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) au Québec et impacts sur la mortalité hivernale

Présenté par

Gabrielle Claing

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Patrick Leighton

Président-rapporteur

Julie Arsenault

Directeur de recherche

Pascal Dubreuil

Codirecteur

Pierre Giovenazzo

Membre du jury

Résumé

Les colonies d'abeilles (*Apis mellifera*) sont d'une importance vitale pour la production agricole de nombreuses denrées, puisque plusieurs plantes dépendent en partie et parfois totalement de la pollinisation. Toutefois, les apiculteurs québécois sont confrontés chaque année à des pertes hivernales dépassant les limites optimales. Plusieurs facteurs ont été avancés pour expliquer la mortalité hivernale des colonies, mais leurs rôles exacts et interactions sont encore mal compris. Ce projet a pour but d'évaluer la présence des agents pathogènes et leurs impacts sur les pertes hivernales des colonies d'abeilles domestiques dans le sud-ouest du Québec. Les agents pathogènes *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Nosema spp.*, *Ascospaera apis*, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, les virus des ailes déformées (DWV), du complexe AKI et des cellules noires de la reine (BQCV), ainsi que *Apocephalus borealis* ont été recherchés sur des abeilles adultes collectées en août 2017 dans 242 colonies provenant de 31 ruchers situés dans l'Outaouais et la Montérégie. La mortalité hivernale des colonies de l'étude a été quantifiée en mai 2018. Des modèles de régression logistique et binomiale négative ont été élaborés pour évaluer l'impact de ces agents pathogènes, de facteurs environnementaux et de pratiques de régie sur la mortalité hivernale des colonies. La mortalité hivernale a été de 31% dans les colonies du projet. *Varroa destructor*, dont la prévalence a été estimée à 48% dans les colonies et 93% dans les ruchers, et a été associé à la mortalité hivernale des colonies ($p < 0.05$), ce qui en fait le principal problème de santé des abeilles du sud-ouest du Québec. Les colonies avec ≥ 1 acarien/100 abeilles et où le DWV était présent présentaient un risque de mortalité 2.6 fois plus élevé par rapport aux colonies comptant moins de 1 acarien/100 abeilles et exemptes de DWV ($p = 0.035$). Malgré l'absence d'association avec la mortalité hivernale, *Nosema spp.* et *M. plutonius* sont également des agents très communs (respectivement, prévalence de 40% et 21% dans les colonies) et associés avec la présence de signes cliniques dans la colonie. Pourtant, les apiculteurs n'ont souvent pas rapporté la présence de ces agents dans leurs ruchers. Le nombre de colonies possédées avait également un impact sur la mortalité hivernale ($p = 0.038$); les apiculteurs possédants un petit nombre de colonies (≤ 5) ont eu une mortalité par rucher moyenne plus sévère (62%) que ceux possédant 6 à 100 (33%) ou > 100 colonies (14%). Les

résultats de cette étude fournissent des informations utiles pour l'élaboration de programmes de médecine préventive ciblés et efficaces.

Mots-clés : prévalence; facteurs de risque; mortalité hivernale; abeille; *Varroa destructor*; *Nosema*; loque; régie

Abstract

Honey bee colonies are of vital importance for the agricultural production, since many plants depend partially and sometimes totally on pollination. However, beekeepers in Quebec are confronted each year with winter losses exceeding the objectives set. Several factors have been advanced to explain the winter mortality of colonies, but their exact roles and interactions are still poorly understood. This project aims to assess the presence and define the impact of pathogens on winter losses in southwestern Quebec. Pathogens *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Nosema spp.*, *Ascospaera apis*, *Melissococcus plutonius*, *Paenibacillus larvae*, deformed wing virus (DWV), AKI complex viruses and black queen cells virus (BQCV), as well as *Apocephalus borealis* were studied on adult bees collected in August 2017 in 242 colonies from 31 apiaries located in the Outaouais and Montérégie. Study colony winter mortality was assessed in May 2018. Negative logistic and binomial regression models were developed to evaluate the impact of these pathogens, environmental factors, and management practices on winter colony mortality. Colony winter mortality was 31%. The prevalence of *Varroa destructor* was estimated at 48% in the colonies and 93% in the apiaries, and the mite was associated with winter colony mortality ($p < 0.05$), making it the major health problem for the honey bees of southwestern Quebec. Colonies with ≥ 1 mite/100 bees and where DWV was present had a 2.6 higher mortality risk compared to colonies with less than 1 mite/100 bees and no DWV ($p = 0.035$). Despite the absence of association with winter mortality, *Nosema spp.* and *M. plutonius* are also very common agents (prevalence in colonies of 40% and 21% respectively) and associated with the presence of clinical signs in the colony. However, beekeepers did not often report the presence of these agents in their apiaries. The number of colonies owned also had an impact on winter mortality ($p = 0.038$); beekeepers with a small number of colonies (≤ 5) had a higher mean apiary mortality (62%) than those with 6 to 100 (33%) or > 100 colonies (14%). The results of this study provide useful information for the design of targeted and effective preventive medicine programs.

Keywords : prevalence; risk factors; winter loss; honey bee; *Varroa destructor*; *Nosema*; foulbrood; management

Table des matières

<i>Résumé</i>	3
<i>Abstract</i>	5
<i>Table des matières</i>	6
<i>Liste des tableaux</i>	8
<i>Liste des figures</i>	9
<i>Liste des sigles</i>	10
<i>Liste des abréviations</i>	11
<i>Remerciements</i>	13
<i>Avant-propos</i>	14
<i>Revue de littérature : agents pathogènes, parasites et envahisseurs de l'abeille domestique (Apis mellifera) et leur impact sur la mortalité hivernale</i>	17
1. Introduction	17
2. Agents pathogènes de l'abeille	19
2.1. Parasites et envahisseurs	19
2.1.1. <i>Varroa destructor</i>	19
2.1.2. <i>Acarapis woodi</i> (acarien de la trachée).....	34
2.1.3. <i>Tropilaelaps spp.</i>	38
2.1.4. <i>Galleria mellonella</i> et <i>Acroea alvearia</i> (grande et petite fausse teigne)	39
2.1.5. <i>Aethina tumida</i> (petit coléoptère de la ruche).....	39
2.1.6. <i>Apocephalus borealis</i>	43
2.1.7. <i>Malpighamoeba mellificae</i>	46
2.1.8. Trypanosomes	46
2.1.9. Grégarines	46
2.2. Bactéries.....	47
2.2.1. <i>Paenibacillus larvae</i> (loque américaine)	47
2.2.2. <i>Melissococcus plutonius</i> (loque européenne).....	55
2.2.3. Spiroplasma.....	63
2.2.4. <i>Pseudomonas apisepctica</i>	63
2.3. Mycètes	63
2.3.1. <i>Nosema spp.</i>	63
2.3.2. <i>Ascosphaera apis</i> (maladie du couvain plâtré).....	74
2.3.3. <i>Aspergillus spp.</i>	77
2.4. Virus.....	78
2.4.1. Virus des ailes déformées (DWV).....	78
2.4.2. Virus du complexe AKI.....	85
2.4.3. Virus des cellules noires de reine (BQCV).....	90
2.4.4. Autres virus.....	93
3. Problèmes d'origine environnementale	94

3.1. Météorologie et climat	94
3.2. Qualité et quantité de nourriture	96
3.2.1. Pollen	96
3.2.2. Eau	97
3.3. Empoisonnement aux pesticides	97
3.4. Transhumance	99
3.5. Facteurs liés à l'entreprise	99
<i>Hypothèse et objectifs</i>	101
<i>Article 1. Beekeeping management practices in southwestern Quebec</i>	103
<i>Article 2. Prevalence of honey bee pathogens, relation with clinical signs and perceived occurrence by beekeepers in southwestern Quebec</i>	121
<i>Article 3. Risk factors for winter mortality of honey bees in southwestern Quebec</i>	156
<i>Discussion et conclusion</i>	183
<i>Bibliographie</i>	198
<i>Annexe 1 – Résumé du choix des maladies</i>	230
<i>Annexe 2 – Formulaire d'information et de consentement</i>	231
<i>Annexe 3 – Examen du rucher et des colonies</i>	233

Liste des tableaux

Tableau I.	Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de <i>Varroa destructor</i> dans différentes parties du monde.....	30
Tableau II.	Prévalences de <i>P. larvae</i> selon le pays, l'année et la méthode de recherche.	52
Tableau III.	Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de <i>Melissococcus plutonius</i> dans différentes parties du monde.	61
Tableau IV.	Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de <i>Nosema spp.</i> dans différentes parties du monde.	71
Tableau V.	Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de DWV dans différentes parties du monde.	83
Tableau VI.	Résumé des principaux arguments ayant mené au choix des maladies pour le présent projet.	230

Liste des figures

- Figure 1. Résumé du nombre de colonies d'abeilles et des pertes hivernales au Canada entre 2007 et 2018, avec permission (ACPA, 2018). L'échelle verticale de gauche et les bandes bleues représentent le pourcentage de colonies perdues à l'hiver selon l'année, et l'échelle verticale de droite et la ligne rouge représentent le nombre de colonies en milliers déclaré chaque année..... 15
- Figure 2. Résumé des pertes hivernales au Québec et au Canada entre 2003 et 2017, avec permission (RAIZO, 2018)..... 16
- Figure 3. Dynamique théorique des populations de *Varroa* selon le nombre d'acariens initial, avec permission (FERA, 2017)..... 21
- Figure 4. Niveaux d'infestation (acariens/100 abeilles) prédits chez les abeilles adultes (adult bee) et chez le couvain operculé (sealed brood) au cours d'une année, avec permission (Martin, 1998). 22
- Figure 5. Virulence des différentes souches de *M. plutonius*, avec permission (Charriere et al., 2011)..... 57
- Figure 6. Distribution mondiale de l'ABPV, KBV et IAPV par pays, avec permission (de Miranda et al., 2010)..... 88

Liste des sigles

CAPA : *Canadian Association of Professional Apiculturists* (Association canadienne des professionnels en apiculture)

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

FAO : *Food and Agriculture Organisation of the United Nations* (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FRQNT : Fonds de recherche du Québec en nature et technologies

MAPAQ : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérase en chaîne)

qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (réaction de polymérase en chaîne quantitative)

RT-PCR : *Reverse-Transcriptase PCR* (transcriptase inversée)

SHB : *Small Hive Beetle* (petit coléoptère de la ruche)

SBV : *Sacbrood Virus* (virus du couvain sacciforme)

DWV : *Deformed Wing Virus* (virus des ailes déformées)

BQCV : *Black Queen Cell Virus* (virus de la cellule royale noire)

CBPV : *Chronic Bee Paralysis Virus* (virus de la paralysie chronique de l'abeille)

ABPV : *Acute Bee Paralysis Virus* (virus de la paralysie aiguë de l'abeille)

IAPV : *Israeli Acute Paralysis Virus* (virus israélien de la paralysie aiguë)

KBV : *Kashmir Bee Virus* (virus du Cachemire)

SBPV : *Slow Bee Paralysis Virus* (virus de la paralysie lente)

CWV : *Cloudy Wing Virus* (virus des ailes nuageuses)

BVX : *Bee Virus X* (virus de l'abeille X)

BVY : *Bee Virus Y* (virus de l'abeille Y)

ABV : *Arkansas Bee Virus* (virus Arkansas de l'abeille)

BBVP : *Berkeley Bee Picornavirus* (picornavirus Berkeley de l'abeille)

AmFV : *Apis mellifera Filamentous Virus* (virus filamenteux)

AIV : *Apis Iridescent Virus* (virus *Apis* iridescent)

Liste des abréviations

av. J.-C. : avant Jésus-Christ.

\$ US : dollar américain

\$ CA : dollar canadien

*« Nous sommes les abeilles de l'Univers. Nous butinons éperdument le miel du visible pour
l'accumuler dans la grande ruche d'or de l'invisible. »*

Rainer Maria Rilke

Remerciements

J'aimerais d'abord souligner l'immense contribution des apiculteurs participants, sans qui ce projet aurait été impossible. Mes sincères remerciements à l'équipe de terrain, Martine Bernier et Dr Jasmin Laroche, qui ont su réaliser un travail colossal en un temps record. Merci également au personnel des laboratoires du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), au virologue Yvan L'Homme et à ma collègue de classe, Dre Lauriane Duplaix, qui ont prêté main-forte pour réaliser les analyses. Finalement, ce projet aurait été impossible sans l'aide inestimable de mes directeurs, Dre Julie Arsenault et Dr Pascal Dubreuil, ainsi que de Dre Julie Ferland.

Ce projet a été soutenu financièrement par le MAPAQ, les Fonds de recherche du Québec en nature et technologies (FRQNT) ainsi que le fond du centenaire de la faculté de médecine vétérinaire.

Je dois mentionner mes « colocataires » du laboratoire d'épidémiologie, Lauriane Duplaix, Nestor Baraheberwa, Eyaba « Guy » Tchamdja et Carine Michèle Andela Abessolo qui ont fait preuve d'un esprit d'entraide inconditionnel et dont l'irréductible bonne humeur a rendu agréables ces longues heures de bureau.

Merci Simon, de m'avoir attendue deux années de plus.

Avant-propos

L'abeille mellifère, *Apis mellifera*, est un animal domestique utilisé en agriculture dont les premières preuves de domestication se retrouvent chez les Égyptiens, environ 2 600 ans av. J.-C. (vanEngelsdorp et Meixner, 2010). Bien qu'elle ait d'abord été domestiquée pour la production de miel, son rôle le plus crucial est en tant que pollinisatrice. En effet, l'abeille participe, parmi tant d'autres insectes pollinisateurs, non seulement à la pollinisation des fleurs sauvages et au maintien de la biodiversité, mais également à la pollinisation de la production alimentaire mondiale. Environ 75% des plantes cultivées dépendent au moins en partie de la pollinisation (FAO, 2016), qui est majoritairement fournie par l'abeille domestique. La valeur économique totale de la pollinisation dans le monde s'élevait à 212 milliards \$ US en 2005, ce qui représentait 9,5% de la valeur de la production agricole mondiale destinée à l'alimentation humaine (Gallai et al., 2009). On estime que la valeur de la pollinisation se situe entre 3 et 5 milliards \$ CA par année au Canada (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2016).

La fraction de l'agriculture mondiale dépendant de la pollinisation a vu sa production annuelle augmenter de >300% de 1960 à 2010. Le cheptel apicole peine à suivre cette augmentation de demande. Le nombre de ruches d'abeilles domestiques a augmenté d'environ 45% pour cette même période, ce qui porte à se questionner sur l'éventualité d'une future crise de pollinisation globale (Aizen et Harder, 2009). L'augmentation globale du nombre de colonies domestiques observée à l'échelle mondiale n'est pas répartie également à travers les régions : entre 1961 et 2016, alors que l'Asie (+295%), l'Afrique (+153%) et l'Océanie (+116%) ont vu leur cheptel augmenter drastiquement, l'Europe (-12%) et l'Amérique du Nord (-41%) ont souffert des diminutions de cheptel considérables (FAO, 2018). Au Canada, le nombre de colonies d'abeilles domestiques a régulièrement augmenté dans les dix dernières années (voir Figure 1), particulièrement au Québec (RAIZO, 2016).

Si l'industrie apicole peine déjà à suivre le rythme de la croissance agricole afin d'en assurer la productivité, elle doit également faire face à des pertes annuelles dans son cheptel. Bien que la mort d'une colonie puisse survenir au courant de la saison de production, les plus importantes pertes ont lieu lors de la saison froide, alors que les abeilles sont en hibernation. On parle alors de mortalité hivernale; cette appellation désigne le pourcentage de colonies

n'ayant pas survécu à l'hiver. En 2018, la plupart des provinces et états nord-américains accusaient la perte de 18 et 46% de leurs colonies d'abeilles au cours de l'hiver (ACPA, 2018; Bruckner et al., 2018). À titre de référence, le seuil de perte acceptable selon les apiculteurs américains se situerait entre 12 et 19% de 2006 à 2017, alors qu'en 2018 ce-dernier avait grimpé à 21% (Bruckner et al., 2018). Malgré cette hausse du seuil d'acceptabilité, 69% de ces mêmes apiculteurs ont rapporté des pertes supérieures à ce qu'ils jugeaient acceptable (Bruckner et al., 2018).

Au Canada, le seuil de mortalité hivernale proposé comme acceptable par l'Association canadienne des professionnels en apiculture (CAPA) est de 15% (ACPA, 2018). Malgré les variations annuelles, le taux de mortalité hivernale est demeuré supérieur à ce seuil durant toute la dernière décennie (Figure 1). Les pertes globales déclarées au Canada pour l'année 2018 sont les plus élevées depuis 2009 (ACPA, 2018).

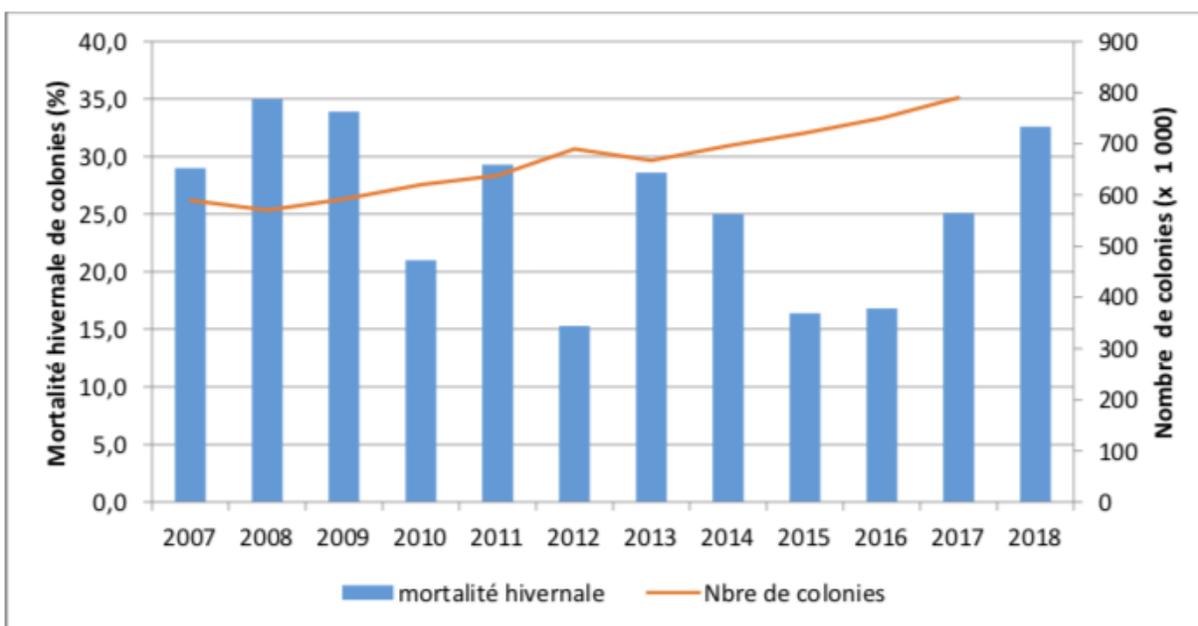


Figure 1. Résumé du nombre de colonies d'abeilles et des pertes hivernales au Canada entre 2007 et 2018, avec permission (ACPA, 2018). L'échelle verticale de gauche et les bandes bleues représentent le pourcentage de colonies perdues à l'hiver selon l'année, et l'échelle verticale de droite et la ligne rouge représentent le nombre de colonies en milliers déclaré chaque année.

Au Québec, la mortalité hivernale 2017-2018 a été estimée à 33% pour les apiculteurs possédant plus de 50 colonies selon la CAPA (ACPA, 2018). Pour l'hiver 2016-2017, elle était de 21% pour l'ensemble des apiculteurs selon le Réseau d'alerte et d'information zoosanitaire (RAIZO, 2018). La Figure 2 résume la mortalité hivernale pour l'ensemble des apiculteurs de 2003 à 2017.

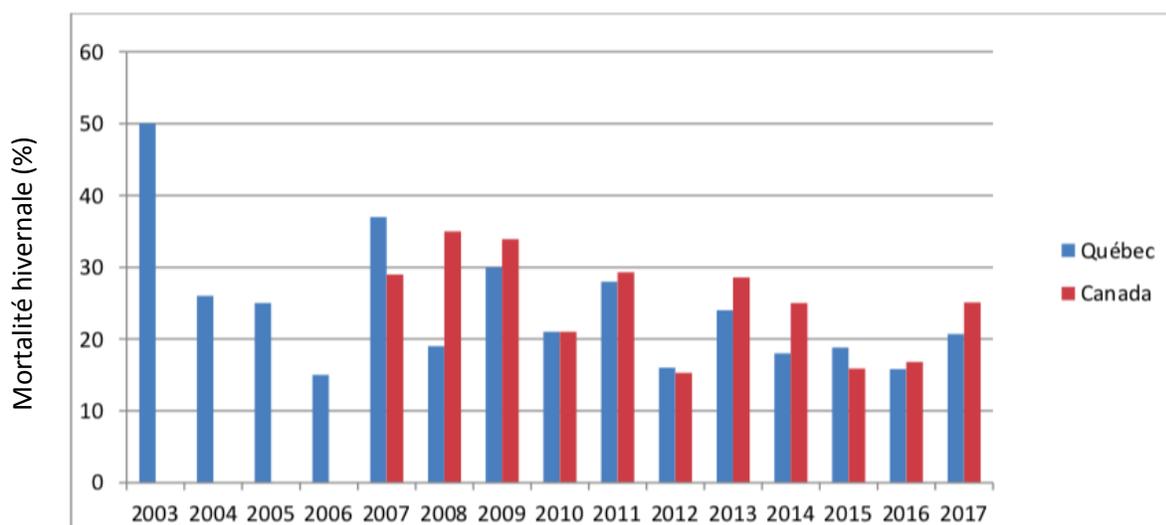


Figure 2. Résumé des pertes hivernales au Québec et au Canada entre 2003 et 2017, avec permission (RAIZO, 2018)

Plusieurs facteurs ont été avancés pour expliquer les pertes de colonies observées à travers le monde: conditions socio-économiques et politiques défavorables, nutrition peu diversifiée et destruction des fleurs sauvages, conditions météorologiques et climatiques défavorables, transhumance pour la pollinisation commerciale, mauvaise qualité de la reine et faible diversité génétique de l'abeille, utilisation de pesticides et finalement, les maladies et ravageurs de l'abeille (vanEngelsdorp et Meixner, 2010; Smith et al., 2013; Goulson et al., 2015). La prévalence et l'impact des différentes causes de mortalité et de morbidité affectant les abeilles du cheptel québécois demeurent largement inconnus, limitant ainsi la mise sur pied d'un plan de médecine préventive ciblé sur les besoins réels.

Ce projet a pour objectif de déterminer la prévalence et l'impact sur la mortalité hivernale des principaux agents pathogènes de l'abeille dans le contexte québécois.

Revue de littérature : agents pathogènes, parasites et envahisseurs de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) et leur impact sur la mortalité hivernale

1. Introduction

Cette revue de littérature porte sur les agents pathogènes, parasites, envahisseurs et autres causes de morbidité et mortalité de l'abeille mellifère qui sont présents et susceptibles d'influencer ces facteurs au Québec. Il est important de rappeler que cette revue s'attarde à l'espèce *Apis mellifera*. Les colonies du sud de l'Afrique ou d'Amérique latine tropicale, qui sont des abeilles africanisées, peuvent avoir une tolérance différente aux agents pathogènes (Mondet et Le Conte, 2014). La biologie et pathogénie de l'agent influençant sa dynamique spatio-temporelle dans la colonie, les facteurs de risque ou protecteurs, les méthodes diagnostiques et la prévalence seront couverts pour chaque condition sélectionnée. L'impact sur la santé de la colonie, incluant les seuils d'infection pour l'apparition de signes cliniques, sera également décrit. Les conséquences économiques et sanitaires pour l'entreprise seront approfondies. Finalement, l'impact sur la mortalité hivernale des colonies sera abordé. Une section est dédiée aux problèmes environnementaux, incluant les pesticides.

Les maladies infectieuses de l'abeille domestique, *Apis mellifera*, peuvent être classées en quatre grandes catégories : parasitaires et envahisseurs (acariens, insectes et protozoaires), bactériennes, fongiques et virus.

Plus de 83 espèces d'acariens ont été retrouvées dans les ruchers du monde, mais la plupart ne sont pas considérés préoccupants puisque le genre *Apis* n'est pas leur hôte habituel (De Jong et al., 1982a). Les principales infestations par des acariens chez l'abeille domestique sont causées par l'acarien *Varroa destructor*, les acariens du genre *Acarapis* (*A. woodi*, *A. externus* et *A. dorsalis*) et les acariens du genre *Tropilaelaps* (De Jong et al., 1982a).

Les ordres d'insectes pouvant infester la ruche, c'est-à-dire pouvant en consommer les produits et s'y reproduire, sont les lépidoptères (papillons) et les coléoptères. Dans les

papillons, on retrouve les fausses-teignes de la cire, *Galleria mellonella* et *Achroia grisella* (Spangler, 1988). Le petit coléoptère de la ruche, *Aethina tumida*, est le principal coléoptère nocif pour les colonies d'abeilles (Ellis et al., 2008). Un autre coléoptère, *Cryptophagus hexagonalis*, rapporté uniquement en Jordanie en 2008 (Haddad et al., 2008), se reproduit également dans les ruches (Haddad et al., 2008). Cependant, les dommages aux colonies sont probablement très faibles, voire totalement absents et les scientifiques en ayant découvert l'existence concluent que *C. hexagonalis* n'est qu'un associé inoffensif des colonies d'abeilles mellifères. Il existe plusieurs espèces de coléoptères saprophages ou mycetophages pouvant être retrouvées dans les ruches : *Cychramus luteus* (Neumann et Ritter, 2004), *Glischrochilus fasciatus*, *Lobiopa insularis*, *Epuraea corticina* et *Carpophilus dimidiatus* (Ellis et al., 2008). Ces dernières espèces ne se reproduisent pas dans la ruche, s'y trouvant plutôt pour se nourrir ou s'y abriter (Ellis et al., 2008). Comme elles n'infestent pas la ruche, elles ne seront pas approfondies dans cette revue.

Certains insectes peuvent parasiter la colonie, c'est-à-dire utiliser l'abeille pour se nourrir ou se reproduire. Il s'agit d'insectes de l'ordre des diptères : la mouche *Braula coeca*, incorrectement appelé « pou de l'abeille », et la récemment découverte « mouche zombie », *Apocephalus borealis* (Core et al., 2012). Il existe plusieurs autres espèces de phoridés parasitiques indigènes et, généralement, ces derniers sont spécifiques à leur hôte naturel. En Italie, un parasite de la même famille que la mouche zombie, *Megaselia rufipes*, a été observé émergeant d'abeilles mortes, confirmant que d'autres espèces sont capables de s'attaquer à *A. mellifera* (Dutto et Ferrazzi, 2014).

Plusieurs protozoaires peuvent être trouvés chez l'abeille. Il s'agit de l'amibe *Malpighamoeba mellificae*, de plusieurs agents trypanosomes du genre *Crithidia* ainsi que d'un groupe de protistes appelé grégarines (Bailey, 1968a; Evans et Schwarz, 2011).

Deux bactéries causent des problèmes de santé dans le couvain : *Melissococcus plutonius*, responsable de la loque européenne, et *Paenibacillus larvae*, responsable de la loque américaine (Evans et Schwarz, 2011). *Spiroplasma apis* (Mouches et al., 1983), *Spiroplasma melliferum* (Clark et al., 1985) et *Pseudomonas aseptica* (Bailey, 1968a; Sarwar, 2016) sont des bactéries pathogènes pour les abeilles adultes.

Les champignons pathogènes de l'abeille comprennent *Nosema spp.*, un pathogène de l'abeille adulte, et *Ascosphaera apis* et *Aspergillus spp.* causant des problèmes dans le couvain (Bailey, 1968a; Evans et Schwarz, 2011).

Plus de 18 virus de l'abeille ont été identifiés et caractérisés (Olivier et Ribière, 2006; Genersch et Aubert, 2010; de Miranda et al., 2012). Récemment, une étude métagénomique a découvert 127 nouveaux virus dans des échantillons provenant de 12 espèces d'abeilles (incluant *A. mellifera*) à l'échelle mondiale (Galbraith et al., 2018). Le virus du couvain sacciforme (SBV), des ailes déformées (DWV), des cellules noires de reine (BQCV), de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV), de la paralysie aiguë de l'abeille (ABPV), de la paralysie aiguë Israeli (IAPV), de l'abeille de Cachemire (KBV), de la paralysie lente (SBPV), des ailes nuageuses (CWV), X (BVX), Y (BVY), de l'Arkansas (ABV), de Berkeley (BBPV), Macula-like, virus filamenteux (AmFV) et *Apis iridescent* (AIV) sont des virus possiblement présents en Amérique du Nord (Olivier et Ribière, 2006; de Miranda et al., 2012).

2. Agents pathogènes de l'abeille

2.1. Parasites et envahisseurs

2.1.1. *Varroa destructor*

Agent et dynamique d'infestation

Varroa jacobsoni est un acarien originaire d'Asie, où il parasite l'abeille asiatique (*Apis ceranae*). Avec la mondialisation de l'apiculture moderne, il a effectué un passage vers l'abeille européenne (*Apis mellifera*). Les travaux de Anderson et Trueman (2000) ont démontré que l'acarien parasitant *Apis ceranae* est un complexe d'au moins 2 espèces, dont les haplotypes infectant *Apis mellifera* appartiennent en fait à l'espèce *Varroa destructor* (Anderson et Trueman, 2000). Les études réalisées avant 2000 appellent donc erronément *V. jacobsoni* ce parasite de l'abeille européenne. *Varroa destructor* est considéré comme le parasite le plus dommageable pour la santé d'*Apis mellifera*, causant une parasitose appelée varroase.

Varroa présente un dimorphisme sexuel évident. Les femelles sont larges (1.1-1.2 mm de long par 1.5-1.6 mm de large), de forme ellipsoïde et d'un brun rougeâtre (Bautz et Coggins, 1992). Elles sont les plus facilement observées dans la ruche. Les mâles sont plus petits (0.7 mm par 0.7 mm), ont une forme de poire et sont plus pâles. Les mâles ne se nourrissent pas et ne se retrouvent que dans le couvain.

La vie de varroa se divise en deux phases : une phase phorétique, au cours de laquelle l'acarien s'alimente des corps gras de l'abeille adulte (Ramsey et al., 2019), et une phase reproductive, durant laquelle l'acarien femelle s'introduit dans la cellule de couvain avant qu'elle soit operculée pour y pondre ses œufs (Rosenkranz et al., 2010). Lors de la phase reproductive, la femelle fécondée pond d'abord un œuf non-fertilisé qui produit un mâle haploïde, puis trois à cinq œufs fertilisés qui produisent des femelles (Martin, 1994; Garrido et Rosenkranz, 2003). Les jeunes femelles seront fécondées par le mâle. Elles se développent en se nourrissant sur la larve et émergent de la cellule avec la jeune abeille affaiblie, puis le cycle recommence. À l'émergence de l'abeille, une ou deux jeunes femelles varroas fécondées émergent avec la femelle fondatrice (Rosenkranz et al., 2010). Les acariens se reproduisent plus souvent dans les cellules de faux-bourçons, puisqu'elles sont plus larges, demeurent plus longtemps non-operculées (Boot et al., 1992) et sont plus souvent visitées par les abeilles nourrices (Fuchs, 1990; Calderone et Kuenen, 2003), ce qui facilite l'introduction des femelles. De plus, les cellules de faux-bourdon sont plus longtemps operculées, ce qui permet à plus de femelles de devenir mature et de se reproduire (Donze et al., 1998). Il est important de considérer cette particularité dans la lutte contre ce parasite.

Le nombre d'acariens dans la colonie s'accroît de façon exponentielle au cours de la saison apicole, doublant approximativement de population à chaque 4 semaines (FERA, 2017). Ainsi, le nombre initial d'acariens en début de saison est critique, puisque les colonies les plus sévèrement infestées au printemps risquent de ne pas survivre jusqu'au traitement automnal (Figure 3). Hedtke et al. (2011) ont trouvé des niveaux d'infestation variant entre 0,2 et 40 acariens pour 100 abeilles en été, alors qu'en automne ces mêmes colonies comptaient de 0,3 à 112 acariens pour 100 abeilles.

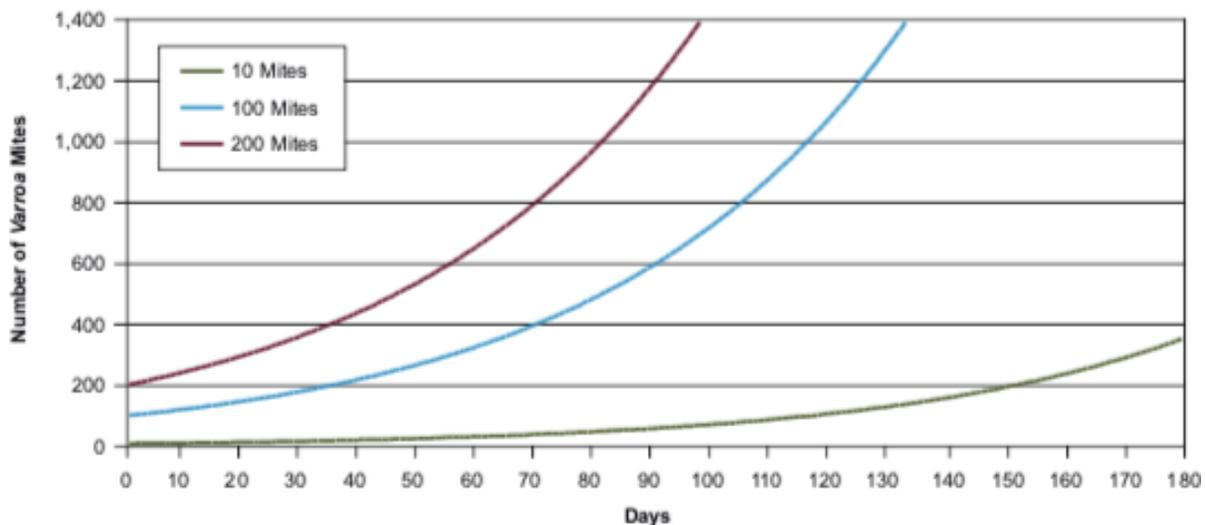


Figure 3. Dynamique théorique des populations de varroas selon le nombre d’acariens initial, avec permission (FERA, 2017)

En réalité, la situation est plus complexe, puisque plusieurs facteurs influencent le taux de reproduction de varroa. Martin (1998) a proposé un modèle mathématique incluant de multiples facteurs pour décrire la dynamique des populations de varroas dans les colonies d’abeilles dans une région tempérée avec un climat continental. Ces facteurs sont : le nombre total d’ouvrières et de couvain (œufs, larves et pupes) au cours de la saison, le nombre total d’acariens, le taux d’invasion de varroa dans les cellules de couvain, la proportion de varroas ayant une reproduction viable, la densité de la population de varroas et la mortalité des varroas à l’éclosion. Ce modèle prédit qu’environ 65% de la population d’acariens se retrouve dans le couvain operculé en tout temps (Martin, 1998). La figure 4 démontre l’évolution du taux d’infestation au cours de la saison. Puisque la population d’hôtes augmente drastiquement en début de saison, le taux d’infestation observé peut diminuer malgré l’augmentation de la population de parasites. On note l’arrêt de production de couvain à l’automne, mettant fin à la phase reproductive du parasite.

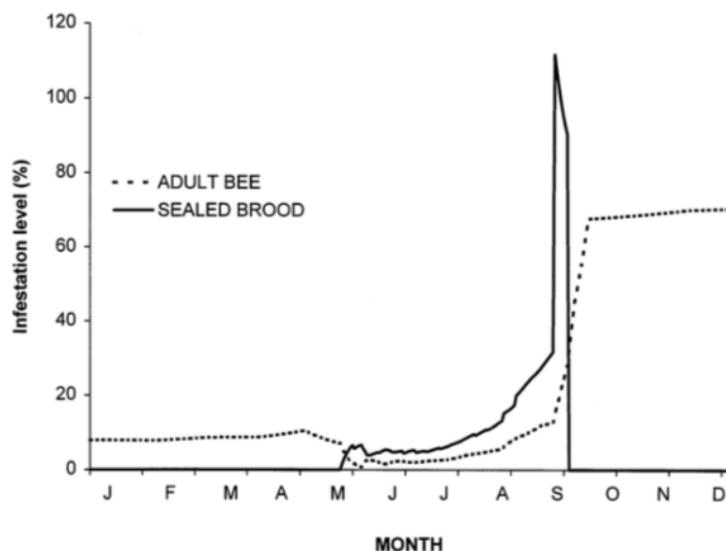


Figure 4. Niveaux d'infestation (acariens/100 abeilles) prédits chez les abeilles adultes (adult bee) et chez le couvain operculé (sealed brood) au cours d'une année, avec permission (Martin, 1998).

Au niveau de l'abeille individuelle, les acariens présents dans la cellule operculée se nourrissent des corps gras de la larve, conduisant à la naissance d'abeilles d'un poids 9% inférieur aux abeilles non-parasitées (Janmaat et Winston, 2000). Cette dilution de l'hémolymphe amène une immunosuppression chez l'abeille infestée au stade larvaire, mais également chez l'abeille adulte nourrice fortement infestée (Amdam et al., 2004). Le parasite module l'expression de gènes codant pour des peptides anti-microbiens et enzymes reliées à l'immunité (Yang et Cox-Foster, 2005), diminuant la réponse immunitaire de l'abeille. L'acarien étant un vecteur potentiel de multiples virus dont le DWV, le parasitage peut également amener des déformations morphologiques (ailes déformées) chez l'abeille adulte infestée au stade larvaire. Les abeilles parasitées commencent à butiner significativement plus tôt, vers 9 jours d'âge comparativement à 13-14 jours pour les abeilles saines, et ont une durée de vie significativement écourtée de 20% (Janmaat et Winston, 2000).

Facteurs de risque

Puisque varroa s'accroche aux abeilles adultes lors de la phase phorétique, les mouvements d'abeilles représentent une source d'introduction. Les faux-bourçons, qui sont

acceptés dans les colonies avoisinantes, ainsi que les ouvrières (via les comportements de dérive et de pillage) permettent la transmission entre les colonies (Kralj et Fuchs, 2006). Fries et al. (2003) ont cependant suggéré que cette transmission horizontale soit moins importante dans les climats nordiques, puisqu'aucun transfert d'acarien via le pillage n'a été observé dans leurs travaux en Suède. Les mouvements de colonies d'abeilles, tels que la transhumance et les échanges commerciaux d'abeilles, permettent la dispersion du parasite entre les ruchers (Marin, 1978).

Méthode diagnostique

Puisque le diagnostic et dépistage de *V. destructor* se fait visuellement, il est important de bien le distinguer du pou de l'abeille, *Braula coeca*, qui est d'apparence similaire, mais a un impact très différent sur la santé des abeilles (FERA, 2017). *B. coeca* est une mouche plate, aveugle et sans ailes, généralement considérée inoffensive pour les colonies. Puisqu'elle est sensible à certains traitements utilisés contre la varroase, tel que le fluvalinate (Kulinčević et al., 1991), on s'attend à ce qu'elle soit moins observée dans les régions où les apiculteurs contrôlent la varroase au moyen de produits chimiques.

Il existe plusieurs façons de détecter et de quantifier une infestation par *V. destructor*. Étant donné le cycle reproducteur de l'acarien, il est possible de le rechercher chez le couvain comme chez l'adulte. Dans le couvain, le dépistage consiste à ouvrir des cellules de faux-bourdon, alors que chez l'adulte, les méthodes utilisées sont le suivi des chutes naturelles ou totales du parasite et l'estimation de la proportion d'abeilles ouvrières parasitées.

Inspection des cellules de faux-bourdon : Chez le couvain, une méthode de dépistage consiste à ouvrir environ 100 cellules de faux-bourdon (FERA, 2017). La proportion de larves de faux-bourdon infestées par au moins un acarien est comptée pour fournir une estimation du pourcentage de cellules infestées. Les acariens peuvent être recherchés à la surface des larves, sous forme de taches brunes (Sammataro et al., 2000). En retirant la larve, le fond de la cellule est examiné à la recherche d'acariens ou de matériel fécal, qui prend l'allure de taches blanches contre les murs de la cellule (Mondet et Le Conte, 2014). Cette méthode est rapide et simple, et s'incorpore bien dans une inspection de routine. Elle est cependant peu sensible dans les cas d'infestation très légère et demeure approximative (FERA, 2017). Floris a

démontré que l'estimation du ratio du nombre d'acariens par le nombre de cellules dans un échantillon de plus de 30 pupes ouvrières était fortement corrélée ($r^2=0.969$) à la valeur exacte de ce ratio dans la population de pupes. Il est également possible de filtrer le contenu des cellules ouvertes lavées à l'eau chaude dans un double tamis : le couvain sera retenu dans le premier tamis (mailles de 2-3 mm) et les acariens tomberont dans le second (mailles de 1 mm) (OIE, 2008b). On pourra alors procéder à une estimation du nombre moyen d'acariens par larve.

Suivi des chutes naturelles de varroas : Le suivi des chutes naturelles du parasite s'effectue en recherchant celui-ci dans les débris de la ruche. Pour se faire, un plateau recouvert d'un treillis, ou de matière collante telle que de la graisse, est placé sur le plancher de la ruche. Les débris collectés en quelques jours au courant de la saison de production contiennent habituellement les acariens, qui sont bien visibles. Cependant, les débris récoltés l'hiver doivent subir un lavage à l'alcool de plusieurs minutes avant de compter les acariens par flottaison naturelle (OIE, 2008b). Cette méthode estime le taux de chute naturelle des acariens par jour (CNA). Selon Fries et al. (1991), il s'agit de la méthode de dépistage qui permet de détecter le plus d'acariens dans une colonie avec ou sans couvain lorsque comparée avec le roulage à l'éther et le lavage de cellules de couvain ouvertes. Ce taux est corrélé avec le taux d'infestation par varroa au même moment (Branco et al., 2006; FERA, 2017). Il est possible d'estimer le nombre total de varroas présents dans la ruche en multipliant la chute journalière naturelle par un facteur allant de 20 à 40 lorsque le couvain est présent, et 250 à 500 en absence de couvain (Martin, 1998). Cependant, les résultats de ce test peuvent être difficiles à interpréter, puisque la chute naturelle du parasite ne dépend pas uniquement de la taille de la population d'acariens, mais également de plusieurs autres facteurs (ex : saison, niveau d'activité, etc) (Martin, 1998; Vidal-Naquet, 2011). L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) recommande dans son bulletin épidémiologique d'effectuer un comptage au minimum une fois par semaine et de prendre en compte les comptages de deux semaines consécutives (Vallon et Wendling, 2017). Les valeurs des comptages sont corrélées entre elles sur une durée d'environ un mois. Cependant, la corrélation entre les proportions d'abeilles parasitées est plus faible sur cette

même période (Deniot et al., 2015). Ainsi, il n'est pas possible d'estimer au début de la saison le niveau d'infestation attendu en fin d'année.

Estimation de la chute totale de varroas : La chute totale des acariens (CTA) peut être calculée en appliquant un acaricide, si les acariens n'y sont pas résistants. Cette technique ne devrait être utilisée que dans les colonies sans couvain, puisque la plupart des acaricides n'agissent pas à l'intérieur des cellules operculées, et que les acariens operculés ne pourraient chuter. Bien que cette méthode donne en théorie le nombre total d'acariens présents dans la colonie, aucun traitement ne permet de tuer 100% des acariens. Cependant l'efficacité de nombreux acaricides, tels que le fluvalinate et la fluméthrine, est supérieure à 95% (Ferrer-Dufolet al., 1991), et cette technique est donc utilisée comme méthode de référence dans les travaux étudiant l'efficacité des méthodes de détection de la varroase (Branco et al., 2006). Il est possible de faire chuter les acariens de façon artificielle sur le plateau en saupoudrant du sucre en poudre sur les rayons de la ruche ouverte, pour un effet similaire au lavage des abeilles adultes décrit plus bas (Ministry of Agriculture of British Columbia, 2015).

Estimation de la proportion d'abeilles ouvrières parasitées : L'estimation de la proportion d'abeilles parasitées nécessite de prélever environ 100 mL d'abeilles provenant du nid à couvain (Calderone et Turcotte, 1998). De Jong et al. (1982b) ont démontré que brasser les abeilles dans une solution d'alcool de 25% durant une minute détache en moyenne 92% (79-96%) des acariens. Le brassage mécanique pour une durée de 30 minutes détache 100% des acariens. Dans le cas du brassage mécanique, la nature de la solution (solution d'alcool, détergent ou eau chaude) n'a pas d'impact sur les résultats. Par la suite, la solution est filtrée (mailles de 2-3 mm) et le nombre de acariens et d'abeilles est compté, permettant de calculer un nombre d'acariens pour 100 abeilles de la colonie (OIE, 2008b). Les abeilles peuvent également être roulées dans l'éther plutôt que l'alcool. Le nombre d'acariens par 100 abeilles est souvent utilisé comme un synonyme de la proportion d'abeilles parasitées, bien qu'il s'agisse en fait d'une approximation de celle-ci, puisqu'une abeille peut être parasitée par plusieurs acariens (Rosenkranz et al., 2010). Calderone et Turcotte (1998) ont exploré différents indicateurs pour décrire le taux d'infestation : le ratio du nombre d'acariens par volume d'abeilles (A/V), le ratio du nombre d'acariens par nombre d'abeilles (A/N) et le ratio du nombre d'acariens par poids humide d'abeilles (A/M). Ils ont utilisé le roulage à l'éther

pour estimer le nombre d'acariens (EA), et un facteur de conversion (nombre d'abeilles par gramme) pour estimer le nombre d'abeilles (EN) à partir du poids en grammes. Ces estimations ont été comparées aux données exactes à l'aide d'un coefficient de corrélation de concordance. Pour la comparaison entre le nombre estimé d'acariens par volume d'abeilles (EA/V) et par nombre exact d'acariens par volume d'abeilles (A/V), ils ont obtenu un coefficient de 0.97 et 0.85 respectivement dans l'état de New York et de Washington. Pour la comparaison entre le nombre d'acariens par nombre estimé d'abeilles (A/EN) et le nombre d'acariens par nombre exact d'abeilles (A/N), les coefficients étaient de 0.99 et 0.98 dans les deux états. Ceci signifie qu'une estimation du nombre d'acariens obtenu par roulage à l'éther ou une estimation du nombre d'abeilles obtenu à partir de la masse des abeilles produira un taux d'infestation très similaire à celui obtenu avec les méthodes exactes. À partir des résultats dans leurs 5 ruchers, Calderone et Turcotte ont obtenu un facteur de conversion pour passer de la masse d'abeilles au nombre d'abeilles de 7.3 ± 0.3 abeilles/gramme (i.e. poids en g \times 7.3 = nombre d'abeilles), et un facteur de correction pour l'estimation au roulage à l'éther de 1.7 ± 0.1 (i.e. nombre exact d'acariens = nombre estimé au roulage à l'éther \times 1.7).

Si on désire garder les abeilles en vie, il est possible de réaliser le test avec des poudres fines de matériel inerte plutôt que du liquide. Macedo et al. (2002) ont évalué l'efficacité de six poussières (sucre en poudre, sucre fin, farine de blé, poudre de talc, fécule de maïs et poudre à pâte) pour déloger les acariens d'échantillons de 300 abeilles. Le sucre en poudre a permis de récupérer $92.9 \pm 5.5\%$ des acariens, et la poudre de talc $84.0 \pm 5.6\%$. La détection ou l'évaluation des niveaux d'infestation faibles (1 à 5 acariens par échantillon) par le sucre en poudre ne différait pas des résultats obtenus avec le roulage à l'éther ($p=0.1$). Avec des niveaux d'infestation moyens (6 à 30 acariens par échantillon) et élevés (> 30 acariens par échantillon), plus d'acariens ont été récupérés avec du sucre en poudre qu'avec le roulage à l'éther (moyen: $p=0.008$; élevé: $p=0.023$), et les deux techniques détectaient un nombre similaire d'acariens pour les bas niveaux d'infestation (1 à 5 acariens par échantillon).

L'estimation de la proportion d'abeilles parasitées établit un indicateur du niveau de pression parasitaire (ratio parasite/hôte) plus facilement interprétable que la chute naturelle (Vallon et Wendling, 2017).

Prévalence

V. destructor a été introduit au Canada en 1989 au Nouveau-Brunswick, et les premiers cas au Québec ont été rapportés en 1991 (Boucher, 2002). Une étude menée en Ontario sur plus de 400 colonies a rapporté que l'acarien était détecté dans 76% des colonies à l'automne (Guzmán-Novoa et al., 2010). De 2004 à 2010 en Allemagne, respectivement 52% des 549 colonies et 62% des 533 colonies étaient infestées en automne et en été, tel que déterminé par l'examen individuel de 100 abeilles par colonies (Hedtke et al., 2011). Genersch et al. (2010) ont trouvé des taux moyens d'infestation de 3.1 à 5.1 acariens par 100 abeilles (en octobre) dans les colonies allemandes de 2004 à 2007. Au niveau des ruchers, une prévalence de 28% (avec un intervalle de confiance à 95% de 24-31%) a été décrite dans la région d'Auckland en Nouvelle-Zélande, en définissant un cas positif comme un rucher contenant au moins une ruche positive au test fluvalinate (Apistan®) mené par un agent de surveillance (Stevenson et al., 2005).

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

En utilisant le ratio du nombre d'acariens par le nombre de cellules de couvain ouvertes, Floris (1997) a déterminé que des signes cliniques de varroase (déformation des ailes, infections secondaires du couvain) sont visibles à un seuil de 0.15 acarien/cellule de couvain ouverte, et qu'aucun dommage n'est observé lorsque ce ratio est inférieur à 0.05. Les faux-bourçons infestés au stade larvaire par un ou deux acariens produisent respectivement 24 et 45% moins de sperme, et ceux infestés par deux acariens volent significativement moins longtemps que les faux-bourçons sains (Duay et al., 2002). Cet impact sur les faux-bourçons se traduit par une réduction de la reproduction au niveau de la colonie et une réduction de l'essaimage (Fries et al., 2003). Ce serait les virus dont le parasite est vecteur qui seraient les réelles causes de l'effondrement final de la colonie (Rosenkranz et al., 2010).

Plusieurs seuils ont été proposés pour déterminer l'impact du parasite sur la mortalité de la colonie, selon la méthode de détection utilisée et la période de l'année. Une étude canadienne recommande d'éviter de dépasser un taux d'infestation de 4 acariens pour 100 abeilles en fin août afin de prévenir la perte de la colonie au cours de l'automne ou l'hiver (Currie et Gatién, 2006). Fries et al. (2003) ont démontré que les colonies survivant à l'hiver

présentent un taux d'infestation moyen de moins de 40 acariens pour 100 abeilles en octobre, alors que ce taux est de plus de 50 acariens pour 100 abeilles chez les colonies qui sont mortes. Selon la *Food and Environment Research Agency* (FERA), au Royaume-Uni, un taux de chute naturelle journalier d'acariens (CNA) supérieur à 0.5 en hiver et au printemps, 6 en mai, 10 en juin, 16 en juillet, 33 en août et 20 en septembre indiquent une haute probabilité d'effondrement de la colonie avant l'hivernage (FERA, 2010). Si le parasite est recherché dans le couvain, la FERA indique que la colonie est considérée à risque élevé de s'effondrer lorsque plus de 5% des cellules de faux-bourdon sont infestées (FERA, 2017).

Varroa, qu'il soit diagnostiqué par lavage ou rapporté par les apiculteurs, est soupçonné d'avoir été le principal facteur associé aux pertes hivernales de colonies dans les années 2000 à 2010 dans plusieurs pays dont la Norvège (Dahle, 2010), le Danemark (Vejsnæs et al., 2010), les Pays-Bas (Van Der Zee et al., 2015), l'Autriche (Brodschneider et al., 2010), la Croatie (Gajger et al., 2010), la Suisse (Dainat et al., 2012b), ainsi que l'Italie (Mutinelli et al., 2010). La même conclusion n'a cependant pas pu être tirée en Grèce pour la même période (Hatjina et al., 2010). Une étude cas-témoin menée en France conclut que l'absence de traitement contre la varroase est le principal facteur de risque pour la mortalité hivernale (Chauzat et al., 2010b). À l'échelle européenne, la varroase clinique a été associée aux mortalités hivernales de 2012-2013 dans un modèle de régression de Poisson multivariable (Chauzat et al., 2016).

Au Canada, la varroase a été rapportée par les apiculteurs comme étant le second facteur le plus important pour expliquer la mortalité hivernale en 2016, après la qualité des reines (ACPA, 2016). Selon ce même rapport, au Québec, les apiculteurs accusent plus souvent des facteurs non infectieux (qualité des reines, épuisement des réserves de nourriture, colonies faibles et conditions météorologiques) que la varroase d'être responsables de la mortalité dans leurs ruches. Toutefois, puisque moins de 50% des apiculteurs exploitant plus de 50 colonies au Québec ont effectué un dépistage de la varroase en 2015 selon l'Association canadienne des Professionnels de l'Apiculture (ACPA, 2016), il est probable que l'impact de la varroase sur la mortalité hivernale soit sous-estimé. Une étude ontarienne conclue que la varroase diagnostiquée par lavage à l'acool à l'automne est associée à la mortalité hivernale

($p < 0.01$), et est donc la principale cause de mortalité hivernale sur ce territoire, et probablement dans les climats nordiques (Guzmán-Novoa et al., 2010).

L'interaction entre varroa et les virus dont il est vecteur doit être tenue en compte dans l'interprétation de l'impact de ce parasite sur la mortalité des colonies. Carreck et al. (2010) ont démontré que la population d'acariens dans les colonies ayant survécu à l'hiver est beaucoup plus petite (toujours sous 2 000 acariens) chez les colonies où au moins un virus (DWV, CWV ou SBPV) a été détecté que chez les colonies où aucun de ces virus n'a été détecté (jusqu'à 10 000 acariens).

Tableau I. Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de *Varroa destructor* dans différentes parties du monde.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence
							Mesure d'association	Valeur de p		
Ontario	2007-2008	Lavage à l'alcool positif	Non spécifiée (possiblement retrait par l'apiculteur)	Octobre-novembre	Colonie	76%	Test de Mann-Whitney ^c	<0.01		Guzmán-Nova et al. (2010)
Europe	2012-2013	Clinique	Moins de 500 abeilles ou orpheline	Automne	Rucher	13-15%	Modèle multivarié ^d	<0.0001	Taille entreprise/rucher	Chauzat et al. (2016)
Allemagne	2004-2008	Compte d'acariens sur 100 abeilles (quantitatif)	Moins de 3 cadres d'abeilles	Octobre	Colonie	-	ρ de Spearman =0.996	<0.000001		Genersch et al. (2010)

^a Colonie infestée par ≥ 1 acarien/100 abeilles, vs colonie infestée par]0,1[acarien/abeilles.

^b OR=2.58 pour colonies avec ≥ 1 acarien/100 abeilles et DWV, vs colonies avec < 1 acarien/100 abeilles sans DWV (p=0.035).

^c Infestation moyenne chez les colonies décédées de 11 acariens/100 abeilles, vs 3 acariens/100 abeilles chez les colonies survivantes.

^d Pour une entreprise de 50 colonies et moins et ruchers de 20 colonies et moins, un rucher souffrant de varroase clinique a une probabilité prédite de mortalité de 22%, vs une probabilité de 13% pour un rucher sain.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence	
							Mesure d'association	Valeur de p			
France	2003-2005	Clinique	Absence d'abeilles ou retrait par l'apiculteur	Incidence sur 4 saisons	Colonie	15-24%	OR=2.6	<0.05 ^e	Saison	Chauzat et al. (2010a)	
					Rucher	35-50%					-
Suisse	2007-2008	Chute naturelle (quantitatif)	Non spécifiée	Été à hiver	Colonie	-	Régression linéaire ^f	<0.001	Saison	Dainat et al. (2012b)	
				Été	Colonie	-	Régression linéaire ^f				<0.01
				Automne	Colonie	-	Régression linéaire ^f				<0.01

^e Lorsque la mortalité est mesurée 2 ou 3 saisons plus tard que la présence du parasite.

^f Mesures d'association non-présentées.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence
							Mesure d'association	Valeur de p		
Pays-Bas	2011-	Lavage à l'alcool (quantitatif)	Non spécifiée	Juillet	Colonie	-	-	>0.05	Saison	Van Der Zee et al. (2015)
	2012			Octobre	Colonie	-	OR=1.17	<0.001	Saison	
Israël	2009	≥1 acarien à chute totale (Amitraz)	NA ^g	Janvier	Colonie	21%	-	>0.05 ^g		Soroker et al. (2010)

^g Impact sur population hivernale d'abeilles.

Impact sur l'entreprise

Outre le danger d'effondrement des colonies, l'infestation se traduit en une chute de production de miel importante et de graves pertes économiques (OIE, 2016d). Currie et Gatién (2006) ont démontré qu'au Canada, lorsque le niveau d'infestation moyen de varroa est de 2 acariens par 100 abeilles à la mi-avril, la moyenne de production de miel totale en date du 1^{er} août est de 66 ± 7 kg (erreur-type) chez les colonies non traitées alors que, selon l'acaricide utilisé, cette moyenne peut monter jusqu'à 116 ± 23 kg dans les colonies traitées au printemps. Les colonies traitées avec du fluvalinate (Apistan®) (contraste, $P < 0,002$), de l'acide formique à 10 jours d'intervalle (contraste, $P < 0,02$) ou du coumaphos (Perizin®) (contraste, $P < 0,05$) ont toutes produit significativement plus de miel que les colonies non traitées. Ils concluent de leurs travaux qu'au-delà d'un seuil printanier de 2 acariens pour 100 abeilles, les producteurs de la région des prairies canadiennes devraient effectuer un traitement afin d'éviter les pertes de production de miel. Delaplane et Hood (1999) ont suggéré un seuil d'impact économique relativement élevé dans le sud des États-Unis de 3 000 à 4 000 acariens par colonie d'environ 25 000 à 34 000 abeilles, ce qui correspond à entre 8 et 16 acariens par 100 abeilles.

En raison de son potentiel pathogène élevé, il s'agit d'une maladie surveillée par les autorités. Bien que cela entraîne rarement des conséquences pour l'entreprise, le dépistage et le contrôle de *V. destructor* est encadré et surveillé par le Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) (Gervais, 2015). Les souches résistantes au fluvinate font également l'objet de notification immédiate à l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) (ACIA, 2016). Cette maladie figure sur la liste de l'organisation mondiale de la santé des animaux (anciennement office international des épizooties : OIE) (OIE, 2016d).

Prévention et contrôle

Dans les ruchers exempts, il a été démontré que chaque kilomètre ajouté à la distance au carré avec un site d'introduction réduit de 17% les cotes d'une infestation par varroa (Stevenson et al., 2005).

En cas d'infestation, de nombreuses actions, connues sous le nom de stratégie de lutte intégrée, peuvent être prises pour réduire les populations de varroas présentes dans les colonies. Les traitements sont généralement effectués au minimum en fin de saison, parfois complétés d'un traitement en début de saison (FERA, 2017). Un traitement en continu ne permet pas d'atteindre des niveaux de population d'abeilles, de couvain ou d'acariens plus satisfaisants qu'un traitement bisannuel (Delaplane et Hood, 1999). Plusieurs acaricides sont utilisés : les molécules de synthèse (amitraz, tau-fluvalinate, coumaphos), les acides organiques (acide formique, acide oxalique) et les huiles essentielles (thymol). Ces traitements ne permettent pas d'éradiquer le parasite, mais plutôt de réduire sa population, afin d'en atténuer les effets néfastes. Face à la menace d'un développement de résistance, il est recommandé d'alterner les molécules utilisées d'un traitement à l'autre (FERA, 2017), et éventuellement, il serait préférable de pouvoir compter sur d'autres méthodes.

L'élevage d'abeilles résistantes à l'infestation, capables de maintenir leur colonie vivante année après année sans mesures de contrôle, serait la seule solution à long terme (Vallon et Wendling, 2017). Des populations d'abeilles européennes résistantes ont été décrites en France, en Suède et aux États-Unis (Fries et al., 2003; Le Conte et al., 2007; Seeley, 2007). Cette maîtrise de la reproduction du parasite via la génétique de l'abeille s'expliquerait par une réduction de l'attractivité des larves au parasite ou par le nettoyage efficace des alvéoles contenant des femelles varroas (Vallon et Wendling, 2017).

2.1.2. *Acarapis woodi* (acarien de la trachée)

Agent et dynamique d'infestation

Outre varroa, il existe un autre genre d'acarien pouvant parasiter l'abeille : *Acarapis*. Parmi les trois espèces d'*Acarapis*, deux espèces, *A. externus* et *A. dorsalis*, sont des parasites externes causant peu de dommages (De Jong et al., 1982a). La troisième, *A. woodi*, parasite la trachée de l'abeille adulte, où elle se nourrit de son hémolymphe. La présence du parasite cause des lésions mécaniques et désordres physiologiques consécutifs à l'obstruction des conduits aériens, aux lésions des parois trachéales et à la diminution de l'hémolymphe (OIE, 2008a).

Selon une étude menée dans l'état de New York en 1986, la proportion d'abeilles infestées à l'intérieur de la colonie est très variable entre les colonies, et augmente grandement au cours de l'hiver (novembre à février) puis redescend au printemps (avril à juin) (Otis et al., 1988). Ces résultats contredisent les résultats observés en Europe, qui suggèrent plutôt un plateau ou un léger déclin de la proportion d'abeilles infestées en hiver (Bailey, 1958).

Facteurs de risque

Bailey (1958) a démontré que la proportion d'abeilles infestées dans une colonie et la sévérité de l'infestation des abeilles varient grandement d'une année à l'autre. Selon lui, cette différence serait due à une variation des activités de butinage. Lorsque les butineuses, plus fortement infestées, sont confinées, la transmission aux jeunes abeilles serait accrue. Les régions qui ont un flux de nectar irrégulier favoriseraient donc la présence de l'acarien.

Méthode diagnostique

Selon les directives de l'OIE, les abeilles échantillonnées doivent être tuées par trempage à l'alcool ou congélation avant d'être analysées. L'échantillon frais doit être analysé dans les 2-3 jours suivant la mort des abeilles. S'il est réfrigéré, il peut être conservé jusqu'à 4 semaines. La congélation à -20°C permet de conserver les échantillons plusieurs mois. Finalement, un échantillon pourra être conservé indéfiniment dans une solution de préservation telle qu'une solution d'Oudemann (mélange d'acide acétique, d'éthanol et de glycérol) (OIE, 2008a).

Le diagnostic est posé par dissection. Les thorax de 50 abeilles sont tranchés. Les coupes thoraciques sont ensuite macérées dans une solution de KOH 8% pour 20 minutes avec chauffage, ou pour la nuit sans chauffage (OIE, 2016b). Les trachées sont observées au microscope à dissection afin de détecter le parasite ou les signes d'infestation (trachée obstruée). Le parasite semble avoir une préférence pour les mâles (OIE, 2016b), il est donc préférable de sélectionner ceux-ci dans l'échantillon.

Une méthode plus rapide consiste à broyer 200 abeilles adultes, centrifuger la solution et ajouter quelques gouttes d'acide lactique au culot (Colin et al., 1979). On observe ensuite le broyat au microscope, à la recherche d'acariens. Cette technique est cependant moins

spécifique pour l'œil inexpérimenté, car elle met également en évidence les acariens externes *A. externus* et *A. dorsalis*, morphologiquement similaires à *A. woodi*.

Grant et al. (1993) ont mis au point un ELISA effectué sur des échantillons d'abeilles conservées dans une solution saturée de chlorure de sodium. Une courbe d'estimation du nombre d'acariens par échantillon a été établie grâce à des échantillons auquel un nombre connu d'acariens a été ajouté. L'estimation du nombre d'acariens à partir de l'ELISA a montré une bonne corrélation graphique avec le décompte d'acariens par dissection dans les échantillons présentant plus de 5% d'abeilles infestées. L'ELISA détectait en moyenne 20% plus d'acariens que la dissection. Il est probable que ce nombre soit plus près de la réalité puisque certains acariens peuvent se localiser à des endroits non-détectés par la dissection.

Une méthode de détection par PCR a récemment été développée par une équipe japonaise (Kojima et al., 2011). La méthode a été testée sur 72 colonies d'*A. mellifera* et 44 colonies d'*A. cerana japonica*, dans lesquelles 3 cas ont été détectés pour chaque espèce. Le statut d'infestation a été confirmé par dissection dans chaque cas positif ainsi que pour 10 cas négatifs pour chaque espèce.

Prévalence

La prévalence de cette parasitose est variable selon les régions et les années. En Ontario, 6.1% des colonies testées (plus de 400) en 2007 présentaient des acariens de la trachée (Guzmán-Novoa et al., 2010). En Espagne, la prévalence de ce parasite, détecté par PCR, a été estimée à 13 et 15.5% respectivement en 2006 et 2007, avec un pic à l'automne (jusqu'à 19.8%) (Garrido-Bailón et al., 2012). Une étude précédente dans le même pays a effectué des échantillonnages répétés sur 35 colonies; le parasite a été trouvé par dissection dans 4 colonies sur 35 (11.4%), mais dans seulement 5 des 202 échantillons récoltés (2.5%), et dans la trachée de seulement 15 abeilles sur 5,050 (0.29%), révélant la nature peu invasive de l'infestation à l'intérieur des colonies (Bermejo et al., 1997). Un projet de surveillance des maladies apicoles mené en Allemagne de 2004 à 2006 n'a détecté *A. woodi* dans aucun échantillon à l'échelle du pays (Genersch et al., 2010). Selon un projet de surveillance active, ce parasite est maintenant très rare au Québec et au Canada (National Bee Diagnostic Centre, 2017b).

L'acarapisose a un comportement enzootique. Une enquête de trois ans menée au Wisconsin de 1992 à 1994 a démontré que le pourcentage de colonies infestées demeurait relativement constant à travers les années, avec des prévalences de 63%, 45% et 51% (Phibbs, 1996). La majorité de ces colonies (61-79% selon les années) présentaient des taux d'infestation de 10 abeilles infestées et moins par 100 abeilles. Plusieurs colonies (13%-27% selon les années) présentaient des taux d'infestation entre 10 et 30 abeilles infestées par 100 abeilles. Quelques colonies (8 à 12% selon les années) présentaient des taux d'infestation supérieurs à 30 abeilles infestées par 100 abeilles. L'étude de Bailey, menée de 1955 à 1965 en Grande-Bretagne, démontre aussi que la prévalence du parasite varie à travers les années selon la qualité de la saison estivale (Bailey, 1961). A partir de l'amalgame de ses données et de celles de la surveillance passive du ministère de l'Agriculture britannique pour les mêmes années, il conclut que la prévalence des infestations sévères (>30% d'abeilles infestées) par ce parasite en Grande-Bretagne avoisine les 2%, et que la majorité de ces cas survivra à l'infestation.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Otis et Scott-Dupree ont rapporté en 1992 que les colonies infestées détectées lors de leur enquête dans l'état de New-York apparaissaient normales. Le seul signe clinique décrit est une durée de vie légèrement réduite des abeilles infestées (Bailey, 1958). Cette constatation est corroborée par de plus récentes études qui ont démontré que les abeilles d'hiver meurent plus tôt en cas d'infestation élevée (Eischen, 1987; Otis et Scott-dupree, 1992).

Cette mortalité des abeilles peut se traduire par une mortalité de la colonie. Le modèle qualitatif de McMullan et Brown suggère que les colonies d'abeilles mellifères infestées par *A. woodi*, sans présence d'autres agents pathogènes, peuvent s'effondrer à la fin de l'hiver ou au début du printemps en raison de leur incapacité à se thermoréguler (McMullan et Brown, 2008). Otis et Scott-Dupree ont démontré que la mortalité hivernale était significativement plus élevée dans les colonies fortement et moyennement infestées que dans les colonies faiblement infestées. Au cours des hivers 1987-1988 et 1988-1989, la mortalité était de 9% parmi les colonies faiblement infestées (0-20% d'abeilles infestées), supérieure à 17% parmi les colonies moyennement infestées (21-60% d'abeilles infestées) et supérieure à 75% parmi

les colonies fortement infestées (>60% d'abeilles infestées) (Otis et Scott-dupree, 1992). L'enquête menée au Wisconsin a obtenu des résultats similaires : parmi les colonies présentant des taux d'infestations de 10 abeilles infestées ou moins par 100 abeilles sont mortes, la mortalité était de 32%, alors que 48% des colonies présentant des taux d'infestations supérieurs à 10% d'abeilles infestées sont mortes (Phibbs, 1996). Cette différence n'était toutefois pas significative. Ces calculs excluent les colonies où varroa a été détecté. En Grande-Bretagne, Bailey a démontré que les colonies où plus de 30% des abeilles sont infestées présentaient un taux de mortalité hivernale significativement plus élevée (Bailey, 1961). Il mentionne cependant qu'il est probable que les colonies soient décédées d'autres causes (déficit en pollen, faible population d'abeilles) ayant été promues par les mêmes conditions défavorables que l'infestation parasitaire. Il apparaît somme toute que l'infestation par *A. woodi* est naturellement contrôlée et que les dommages causés par celle-ci sont généralement peu importants (Bailey, 1961).

Impact sur l'entreprise

L'étude expérimentale conduite par Bailey en 1958 n'a démontré aucun impact négatif de l'infestation sur la productivité des colonies infestées. Gary et Page Jr (1989) concluent de même que l'infestation par *A. woodi* n'a pas d'impact économique lorsqu'il y a production de couvain et de miel.

Prévention et contrôle

Les proportions d'abeilles infestées sont plus hautes chez les abeilles italiennes (*Apis mellifera ligustica*) que chez les abeilles russes (une race provenant de la région Primorsky Krai en Russie) (DeGuzman et al., 2005). Ces dernières démontrent une résistance innée à cet acarien.

2.1.3. *Tropilaelaps spp.*

La distribution des acariens du genre *Tropilaelaps* se limite à l'Asie (OIE, 2016d). Ils ont un cycle de vie similaire à celui des acariens du genre *Varroa*, se nourrissant de l'hémolymphe des larves, et ont le potentiel de causer de graves dommages aux colonies

sévèrement infestées; étant donné l'importance du commerce international des produits de la ruche, on s'inquiète de la dissémination de ces parasites vers les pays exempts (Burgett et al., 1983), dont le Canada fait partie. Ils figurent donc sur la liste de l'OIE, et doivent être déclarés au MAPAQ (MAPAQ, 2016; OIE, 2016d).

2.1.4. *Galleria mellonella* et *Acroea alvearia* (grande et petite fausse teigne)

Ces deux papillons ne causent pas de maladie en tant que telle, mais détruisent l'environnement de vie de la colonie en se nourrissant de la cire (Spangler, 1988). *G. mellonella* est présent partout où l'apiculture est pratiquée (Kwadha et al., 2017), et il est probable que sa présence éclipse celle d'*A. alvearia* par compétition dans plusieurs régions nord-américaines (Spangler, 1988). Les températures sous le point de congélation contrôlent l'infestation (Kwadha et al., 2017); l'hiver du Québec permet donc une régulation de ces papillons. Ces insectes représentent plus une nuisance pour l'industrie, qui voit son matériel détruit, que pour les abeilles. Aux États-Unis, les pertes annuelles ont été estimées à approximativement 3 et 4 millions de dollars en 1973 et 1976 respectivement, ce qui représente environ 3,9% et 5,1% du bénéfice de chaque année (Hood et al., 2003).

2.1.5. *Aethina tumida* (petit coléoptère de la ruche)

Agent et dynamique d'infestation

Aethina tumida est un petit coléoptère originaire des régions sub-saharienne pouvant s'établir dans les ruches d'abeilles. Le SHB¹ adulte a une forme oblongue, mesure environ le tiers de l'abeille ouvrière, et une coloration rouge-brun à noire. Dans la ruche, on observe souvent les SHB avec la tête recroquevillée sous le thorax, faisant disparaître leur antenne en forme de massue et leurs pattes. Les larves des SHB ont des épines dorsales se terminant par deux grandes épines à l'extrémité arrière, et trois paires de pattes près de l'extrémité

¹ Veuillez noter que l'abréviation SHB (de l'anglais *small hive beetle*) sera utilisée pour désigner le petit coléoptère de la ruche dans ce texte, afin d'éviter la confusion avec l'abréviation utilisée pour le test diagnostique PCR.

antérieure. Ces caractéristiques distinguent le SHB d'autres espèces, notamment la grande fausse-teigne (*Galleria mellonella*) (Zawislak, 2010; Ritter, 2014).

Les SHB s'accouplent à l'intérieur de la colonie d'abeilles, où la femelle pondra ses œufs. Les larves éclosent après trois jours et commencent à se nourrir de couvain d'abeilles, de pollen, de miel et de cire pendant deux semaines. Ils entrent ensuite dans la phase d'errance, abandonnant la colonie pour se terrer dans le sol. Ils se transforment en nymphes dans le sol, pendant deux à trois semaines. Les SHB adultes émergent du sol et infestent à nouveau la ruche (Somerville, 2003; Ellis et Ellis, 2010). La distance qu'ils peuvent atteindre par vol est incertaine. Bien qu'il a été reporté que le SHB puisse détecter ses hôtes jusqu'à une distance de 13-16 km, il semble qu'aux États-Unis l'insecte soit peu enclin à parcourir de longues distances (Spiewok et al., 2008); sa dispersion serait plutôt due à des activités humaines (e.g. transhumance, commerce d'abeilles).

Les abeilles ne sont pas capables d'expulser ou de piquer les SHB adultes. Au lieu de cela, les abeilles ouvrières peuvent être vues en train de poursuivre les SHB à travers les rayons jusqu'à ce que les parasites se réfugient dans des fissures trop petites pour que les abeilles ne puissent les suivre. Les abeilles vont ensuite emprisonner les SHB en gardant les fissures. Les SHBs sont capables de mendier de la nourriture à leurs gardes en stimulant leurs pièces buccales, de la même façon que les faux-bourçons (Zawislak, 2010; Ritter, 2014). Les abeilles répondent à environ toutes les douze sollicitations (Giangaspero et Turno, 2015). Bien que le comportement de confinement des abeilles mellifères européennes soit similaire à celui des abeilles africaines, elles ont tendance à utiliser moins de propolis pour sceller les fissures dans leur ruche, ce qui peut conduire à une efficacité moindre (Ellis et al., 2003; Ellis, 2005; Ritter, 2014). L'abeille africaine élimine les larves de SHB pour contrôler l'infestation, un comportement qui n'est pas observé chez les abeilles européennes (Giangaspero et Turno, 2015). Lorsqu'elles détectent des œufs de SHB à l'intérieur d'une cellule de couvain scellée, les abeilles domestiques retirent le couvain infesté (De Guzman et al., 2008; Ellis et Delaplane, 2008).

Une forte densité des ruchers, une taille de population élevée de coléoptères et la reproduction continue des coléoptères constituent toutes des facteurs favorisant l'introduction dans les nouveaux ruchers (Spiewok et al., 2008).

Facteurs de risque

Le contact entre les abeilles adultes n'est pas requis pour la transmission de l'infestation. Le SHB peut se propager par le mouvement des abeilles adultes, le commerce des reines, de cadres et d'autres produits de l'apiculture ainsi que l'équipement usagé associé à l'apiculture et aux fruits mûrs. Par conséquent, les ports maritimes représentent un point d'entrée potentiellement important (EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2013; Chauzat et al., 2015; Giangaspero et Turno, 2015). La cire d'abeille importée des États-Unis a introduit le parasite au Manitoba, Canada (Kozak, 2010).

Méthode diagnostique

Les programmes nationaux de surveillance sont généralement basés sur l'inspection visuelle complète des ruches (Chauzat et al., 2015). Une inspection complète du rucher devrait comprendre un examen rapide et attentif de chaque cadre, dans 20 à 50% des colonies (Mutinelli et al., 2014). Toutefois, ces manipulations extensives sont également risquées pour la transmission de l'envahisseur : les odeurs émanant des ruches après les travaux de routine semblent attirer les SHB, augmentant les infestations (Giangaspero et Turno, 2015).

Par conséquent, pour de vastes opérations de dépistage, l'utilisation d'une PCR sur les débris de la ruche offre certains avantages. Par exemple, cet outil pourrait être très utile pour les enquêtes de dépistage rapide visant à délimiter des zones infestées si le SHB envahit une nouvelle région (Ward et al., 2007). Le repérage des SHB adultes est une tâche difficile, compte tenu de leur comportement cryptique et d'un possible faible niveau d'infestation (Spiewok et Neumann, 2006). De plus, l'identification morphologique des œufs et des larves peut être difficile (Ward et al., 2007). La PCR permet la détection du passage du SHB même après qu'il ait quitté la colonie (Neumann et al., 2013); il ne permet donc pas de distinguer entre une infestation passée et une infestation active. Il y a très peu d'informations sur les performances de ce test. Par conséquent, son utilisation dans les programmes de surveillance n'est pas recommandée, jusqu'à ce que la méthode soit validée à l'aveugle sur le terrain (Chauzat et al., 2015). L'Espagne a mené un programme de surveillance du SHB en 2010-2011 basé sur la détection par PCR. La prévalence obtenue par les auteurs dans la région d'étude était de 0%, et la méthode a été validée sur un nombre non spécifié de contrôles

positifs. L'efficacité rapportée de détection (vrais positifs + vrais négatifs/total) du petit coléoptère de la ruche à de faibles niveaux d'infestation était de 93.35% pour les larves et de 95.5% pour les adultes (Cepero et al., 2014).

Prévalence

Le caractère invasif d'*A. tumida* lui a permis de se répandre rapidement sur plusieurs continents, dont l'Afrique, l'Amérique du Nord et l'Océanie (Neumann et Ellis, 2008). Au Canada, *A. tumida* n'a réussi à établir une population résidente que dans le comté d'Essex, en Ontario (Kozak, 2010; Kozak, 2012). Au Québec, un premier cas a été trouvé dans un rucher de la Montérégie en 2008 (Gervais, 2015). Quelques cas ont été détectés périodiquement sur le territoire du Québec dans les années suivantes, mais on croit qu'il s'agissait d'adultes isolés en provenance des états américains voisins et non de population résidente. Aucune larve n'a jamais été trouvée. En 2016, un seul cas a été détecté dans le cadre du programme de surveillance du MAPAQ (Ferland, 2016).

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Le SHB ne cause pas directement de problème de santé à la colonie, mais celle-ci peut ultimement fuir la ruche lorsqu'elle devient lourdement infestée (Schäfer et Ritter, 2014). Ce comportement se nomme *absconding* en anglais. Les abeilles africaines ont tendance à s'enfuir plus fréquemment que les abeilles européennes, mais ces dernières laissent plus de ressources quand elles le font. Ce comportement favorise la croissance de la population de SHB (Ritter, 2014).

Schäfer, Ritter, Pettis et Neumann ont étudié le rôle d'*A. tumida* dans les mortalités hivernales aux États-Unis et suggèrent que cet envahisseur est peu susceptible de contribuer aux pertes de colonies d'abeilles domestiques en hiver (Schäfer et al., 2010).

Impact sur l'entreprise

L'impact de l'infestation n'est pas tant au niveau de la santé des abeilles que de la santé économique de l'industrie. Le SHB nuit à la production apicole en se nourrissant des produits de la ruche et en détruisant le matériel, pouvant entraîner de lourdes pertes

économiques (OIE, 2016d). Une forte infestation conduit à de grandes quantités de fèces de SHB contenant des levures dans le miel, ce qui provoque sa fermentation et le rend non comestible pour les abeilles et les hommes. Le SHB peut également envahir la hausse de miel, si le miel n'a pas été immédiatement extrait, et ruiner la récolte (Zawislak, 2010). En raison de son potentiel invasif, le SHB figure sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'OIE (OIE, 2016d), et il s'agit d'une maladie à notification immédiate auprès de l'ACIA (ACIA, 2016). La présence du SHB dans un pays modifie son statut, ce qui affecte le commerce de produits de l'apiculture. Les impacts sur l'apiculture une fois qu'une population de SHB est établie dans une région semblent variables (Delaplane, 1998; Giraud, 2014).

Au meilleur des connaissances de l'auteur de cette revue, il n'existe pas d'étude scientifiques chiffrant l'impact économique du SHB. Néanmoins, les mesures de biosécurité renforcées en raison de la présence de cet organisme nuisible augmentent l'énergie, le temps et l'argent que les apiculteurs investissent dans leur travail (Giraud, 2014).

Prévention et contrôle

L'élimination de ce ravageur étant particulièrement difficile, puisqu'il faut non seulement éliminer les individus dans la ruche, mais également ceux dans le sol, il est crucial de prévenir son introduction. Le maintien de colonies solides et une bonne régie sont des éléments clés de la prévention de l'infestation (Schäfer et Ritter, 2014). Le contrôle du nombre d'abeilles dans la ruche par des reines vigoureuses permet aux colonies saines de bien tolérer l'invasion par le SHB (Giangaspero et Turno, 2015).

2.1.6. *Apocephalus borealis*

Agent et dynamique d'infestation

Apocephalus borealis, aussi nommé « mouche zombie », est un diptère originaire d'Amérique du Nord qui fait partie de la famille des *phoridae*. La plupart des espèces de cette famille sont des charognards, mais le genre *Apocephalus* est insectivore, connu pour ses mouches « décapitantes » s'attaquant aux fourmis. *A. borealis* fait partie du sous-genre *Mesophora*, un groupe qui préfère d'autres hôtes que les fourmis, et s'attaque habituellement à

certaines espèces de bourdons et frelons sauvages. Ce diptère a récemment été découvert dans les ruchers des États-Unis (Core et al., 2012). Au meilleur de nos connaissances, une seule étude (Core et al., 2012) a été conduite pour comprendre la biologie d'*A. borealis* en contexte apicole. Cette étude californienne est le résultat des observations fortuites d'un entomologiste universitaire sur une seule ruche témoin.

La femelle de la mouche zombie injecte des œufs sous la cuticule des abeilles adultes, probablement lorsque ces dernières butinent. Lorsque les œufs éclosent, les larves se nourrissent de l'intérieur de l'abeille, se frayant un chemin jusqu'à l'extérieur entre le thorax et la tête. La mort de l'hôte est rapide à la suite de l'éclosion, et les larves émergent près d'une semaine plus tard (Core et al., 2012).

Le nom de « mouche zombie » lui vient des signes cliniques qu'elle produit chez l'abeille. Un changement de comportement est observable chez l'abeille infestée, rappelant celui des créatures de fiction lui ayant donné son nom: l'abeille est désorientée, tourne en rond, démontre de la faiblesse et paralysie, rampe et se déplace lentement, et peut être vue quittant la ruche durant la nuit, à la recherche de source de lumière (Core et al., 2012). Les vols de nuit sont un comportement inhabituel pour l'abeille mellifère européenne (*A. mellifera*), qui oriente ses vols grâce à la position du soleil (Dyer et Could, 1983).

On ignore encore précisément ce qui cause les étranges signes de la maladie. Plusieurs hypothèses ont été avancées (Core et al., 2012) : il est possible que les larves affectent le système nerveux de l'abeille, par un mécanisme encore inexpliqué. Il est possible que le comportement de l'hôte, qui s'éloigne pour mourir, résulte du contrôle exercé par le parasite afin de promouvoir sa dispersion. Au contraire, il se peut que l'abeille quitte la ruche afin d'éloigner le parasite de la ruche. Une autre possibilité serait que les autres abeilles détectent et chassent leurs consœurs infectées de la ruche.

Méthode diagnostique

Des pièges lumineux peuvent être installés la nuit lorsque la maladie est suspectée, afin d'y attirer les abeilles infestées (2012). Les abeilles trouvées mortes ou agonisantes à l'extérieur des ruches peuvent également être recueillies dans un contenant hermétique et y être conservées pour quelques jours. Si elles sont infestées, des larves seront éventuellement

présentes dans le contenant, émergeant des abeilles environ sept jours après leur mort. Cependant, puisqu'il existe d'autres espèces morphologiquement similaires à *A. mellifera*, les larves doivent devenir adultes, en passant par le stade de puppe, afin d'être correctement identifiées. Ce processus requiert 28 jours d'attente supplémentaire (Core et al., 2012).

Prévalence

A. Borealis se retrouve partout en Amérique du Nord. Pour l'instant, au Canada, la mouche n'a été découverte que dans quelques ruchers de la Colombie-Britannique et une ruche au Québec en 2016 (Julie Ferland, communication personnelle, septembre 2016). Ces découvertes sont toutefois fortuites, et aucune enquête de prévalence n'a été réalisée.

Lorsqu'elle est recherchée, la mouche s'avère très présente : dans la région de San Francisco Bay aux États-Unis, 77% des sites échantillonnés étaient infestés (Core et al., 2012). Dans le cadre d'une enquête de prévalence réalisée en Égypte en 2014, tous les échantillons récoltés se sont avérés infestés, dans des proportions de 10% à 52% des abeilles selon la région (Khattab et El-Hosseney, 2014). Les auteurs de la publication spécifient d'ailleurs s'inquiéter de la contribution du parasite dans le déclin des populations d'abeilles enregistrées dans les dernières années.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Core et al. soupçonnent que des phoridés adultes aient été présents à l'intérieur de la ruche étudiée : la reine ne serait donc pas à l'abri d'une infestation fatale. Il semblerait que le parasite pourrait également être porteur de maladies telles que le virus des ailes déformées et *Nosema ceranae* (Core et al., 2012). L'effet de ce parasite sur la mortalité hivernale est inconnu.

Impact sur l'entreprise

En Colombie-Britannique, il semblerait que les pertes engendrées par cette dernière soient minimales toute proportion gardée (Julie Ferland, communication personnelle), et qu'elle représente une moins grande menace que bien d'autres maladies qui sévissent actuellement dans le cheptel apicole canadien.

Prévention et contrôle

Il n'y a pas d'information disponible sur la prévention ou le traitement de cette parasitose.

2.1.7. *Malpighamoeba mellifica*

L'amibe *Malpighamoeba mellifica* est le principal agent protozoaire affectant l'abeille. Bailey a étudié la coinfection par ce protozoaire et *N. apis* : la présence de l'amibe augmenterait les populations de *N. apis*, mais sa présence seule ne causerait pas de problème de santé visible (Bailey, 1968b).

2.1.8. Trypanosomes

Crithidia mellifica est un organisme observé pour la première fois en Australie qui ne semble pas avoir d'effets pathologiques sur son hôte (Langridge et McGhee, 1967). Les trypanosomes se trouvent principalement dans la lumière de l'intestin postérieur (Langridge et McGhee, 1967). Les niveaux d'infestation par ce protozoaire atteignent leur sommet en janvier, et l'infestation ne semble pas produire de mortalité plus élevée (Runckel et al., 2011). Il a cependant été démontré que lors d'une hibernation en condition de stress, une espèce de trypanosome apparenté qui infecte les bourdons réduit jusqu'à 40% le succès de fondation d'une colonie, la taille de celle-ci, la production de mâles et la condition générale (Brown et al., 2003). Ceci suggère que le contexte de l'infestation est important.

2.1.9. Grégarines

Les grégarines sont un groupe composé de divers protistes qui parasitent de nombreux invertébrés, y compris les abeilles domestiques. Ces parasites auraient un cycle de reproduction complexe dans l'intestin de l'abeille, où leurs trophozoïtes s'attacheraient à l'épithélium pour absorber les nutriments (Evans et Schwarz, 2011). Chez les bourdons, les grégarines – dont *Apicystis bombi* – empêchent la recherche de nourriture, réduisent la fécondité et augmentent la mortalité des reines (Rutrecht et Brown, 2008). Il a été démontré que ce parasite du bourdon pouvait également infecter l'abeille domestique (Plischuk et al., 2011).

2.2. Bactéries

2.2.1. *Paenibacillus larvae* (loque américaine)

Agent et dynamique d'infection

Paenibacillus larvae est une bactérie hautement pathogène pour les larves de l'abeille sous sa forme sporulée seulement. La bactérie est un bâtonnet Gram-positif pouvant grandement varier en taille (0.5-0.8 μm de large par 1.5-6 μm de long), se présentant seule ou en chaîne et filaments. Les spores sont souvent libres et mesurent 0.6 x 1.3 μm (Heyndrickx et al., 1996). Ces spores peuvent rester infectieuses plusieurs années et sont très résistantes à la chaleur, aux agents chimiques, aux intempéries et aux antibiotiques (OIE, 2016a). *P. larvae* se classe en quatre différents génotypes, nommés ERIC I, II, III et IV (Genersch et al., 2006). Ces génotypes présentent des morphologies, métabolisme du carbone et degrés de virulence différents.

La larve ingère les spores dans la nourriture contaminée servie par les abeilles nourrices, ou les spores qui se trouvaient déjà au fond de la cellule suite à l'infection de la larve précédente. L'infection se produit d'abord dans les intestins puis, en formant une brèche dans l'épithélium, s'étend à tous les tissus (Genersch, 2010). Ce stage septique cause la mort de la larve. La croissance de la bactérie sur le cadavre relâche des gaz à l'intérieur de la cellule operculée, et la larve devient visqueuse. Graduellement, elle s'assèche et forme une écaille dure et brune accolée à la paroi du bas de la cellule. Ces écailles contiennent des millions de spores et sont une source d'infection à l'intérieur et entre les colonies (Genersch, 2010).

Le génotype ERIC I tue les larves infectées en environ 12 jours. Les génotypes ERIC II, III et IV sont hautement virulents et provoquent la mort des larves à l'intérieur d'environ 7 jours. Les larves meurent donc avant que leurs cellules soient operculées, ce qui conduit à un portrait clinique différent de celui habituellement rencontré lors de loque américaine (Genersch et al., 2005; Genersch et al., 2006). Le génotype ERIC I est le plus fréquemment rencontré en Amérique du Nord et Europe, bien que ERIC II soit également présent en Europe, notamment en Allemagne et Autriche (Genersch, 2010). Les génotype ERIC III et IV

n'ont pas été rapportés depuis 1978, n'existant maintenant que dans de rares collections de cultures (Genersch, 2010).

Les signes cliniques varient en fonction du génotype de *P. larvae* impliqué, du stade de la maladie, de la force de la colonie et possiblement de la résistance des abeilles à la maladie (OIE, 2016a). En général, le couvain prend une apparence en mosaïque et des opercules concaves et percés sont observés. Les larves des cellules affectées sont mortes, visqueuses et de couleur brunâtre (Genersch, 2010). Une sonde insérée dans les restes de la larve puis retirée formera un filament collant pouvant s'étirer sur plus de 2 cm. Ce test, appelé « test de l'allumette », est le signe le plus évocateur de loque américaine sur le terrain (De Graaf et al., 2006). Il est cependant peu sensible, car la consistance des larves varie dans le temps (OIE, 2016a). La « langue saillante », ou la larve morte prend une forme typique rappelant une langue d'abeille dans sa cellule, est un signe caractéristique de la maladie, mais n'arrive que rarement, lorsque la larve meurt tardivement au stade de pupes (OIE, 2016a). À l'ouverture de la ruche, il est possible de remarquer une odeur nauséabonde (odeur ayant donné son nom à la maladie en anglais : *foolbrood*) (Carr, 2016). Ce signe n'est pas toujours présent, en particulier lorsque le nombre de cellules affectées est faible.

Facteurs de risque

Au Royaume-Uni, une étude portant sur des données collectées de 1994 à 2012 révèle que la loque américaine présente de l'agrégation spatiale significative sur des distances d'entre 10 et 30 km (calculé par fonction K), persistant de 1 à 5 ans (Aileen et Rushton, 2014).

Étant donné que la corrélation spatiale est limitée à des ruchers situés à des distances de moins de 30 km (culminant à 10-20 km), il semble que la transmission entre les ruchers se produise avant tout à l'échelle locale (Aileen et Rushton, 2014). Certains comportements des abeilles ou des apiculteurs peuvent expliquer ce phénomène. Les colonies peuvent produire des essaims qui se dispersent habituellement à l'intérieur de quelques centaines de mètres de la colonie-mère (Seeley et Morse, 1977). Il semble par contre peu probable que cette transmission verticale soit une cause majeure de dispersion de loque américaine, puisque ce sont les colonies fortes et populeuses, et non les colonies sévèrement malades, qui produisent des essaims (Fries et Camazine, 2001). Les colonies-filles sont en fait rarement cliniquement

atteintes (Fries et al., 2005). Ce seraient donc les comportements favorisant la transmission horizontale, tels la dérive et le pillage, qui permettent la propagation de la maladie (Aileen et Rushton, 2014). La dérive est un phénomène où les abeilles se promènent entre les colonies. Le pillage se produit lorsque les abeilles butineuses s'emparent du miel des colonies plus faibles. Ce dernier comportement serait donc un facteur majeur dans la propagation locale du pathogène (Aileen et Rushton, 2014), puisque les colonies ciblées sont probablement déjà affaiblies par la maladie.

Les apiculteurs ont aussi leur rôle à jouer dans la transmission locale de l'agent pathogène. L'étude britannique de Aileen et Rushton (2014) rapporte aussi que les ruchers de moins de 10 colonies sont moins à risque de présenter la maladie. En effet, les pratiques apicoles modernes, qui incluent la garde d'un nombre important de colonies sur le même site et le contrôle de l'essaimage, promeuvent la transmission horizontale des maladies au détriment de la transmission verticale (Fries et Camazine, 2001). Entre autres, le transfert de cadres (de couvain ou autre) entre les colonies, visant à augmenter la production, est une pratique risquée pour la transmission horizontale des maladies (Fries et Camazine, 2001). Aileen et Rushton (2014) expliquent que les larges ruchers soient plus à risque par les possibles phénomènes de propriété partagée sur de larges sites amateurs ou de possession de plusieurs ruchers par la même opération professionnelle.

Méthode diagnostique

Aileen et Rushton (2014) avancent deux points cruciaux à partir de leurs travaux sur l'épidémiologie spatiale de *P. larvae* : d'abord, qu'aucune stratégie de dépistage ne détectera 100% des cas. Ensuite, que les colonies peuvent maintenir de bas niveaux d'infection pendant plusieurs années tout en demeurant cliniquement asymptomatiques. De plus, en Allemagne, il a été estimé que 60% des apiculteurs ne sont pas en mesure de reconnaître cette maladie (Otten, 2003). Il n'est donc pas judicieux de baser le diagnostic sur la présence de signes cliniques.

La présence de spores et l'identification de la bactérie confirment le diagnostic de loque américaine. La recherche peut s'effectuer sur plusieurs substrats : morceau de rayon de couvain, larves, miel (Ritter et Kiefer, 1995; Ritter, 2003), pollen (Gochnauer et Corner, 1974)

ou gelée royale (OIE, 2016a) des cellules avoisinantes au couvain, abeilles adultes récoltées dans le nid à couvain (Hornitzky et Karlovskis, 1989; Lindström et Fries, 2005), ou débris de cire (Titera et Haklova, 2003; Bzdil, 2007). Lors de présence de signes cliniques, l'échantillon idéal est un morceau de 20 cm² de rayon contenant le couvain affecté (OIE, 2016b). L'OIE recommande d'échantillonner les colonies avoisinantes, même si elles sont exemptes de signes cliniques, car l'infection est hautement contagieuse. Dans le cadre d'un programme de surveillance ou de médecine préventive, tous les substrats énumérés peuvent être utilisés.

La présence de spores peut être démontrée par microscopie (OIE, 2016a). Cette technique permet de quantifier le niveau d'infection d'une colonie en calculant une proportion de spores par unité observée (abeille, g de miel, etc). La microscopie est une méthode quantitative, rapide et simple, mais ne permet pas de confirmer l'identification de l'agent.

La culture bactérienne, possible sur différents milieux de culture (*P. larvae* agar, MYPGP agar, etc), permet d'identifier la bactérie (OIE, 2016a). Elle permet également de tester la sensibilité aux antibiotiques de la souche en effectuant par la suite un antibiogramme. La culture est une technique lente et plus complexe, mais elle est également quantitative et permet de poser un diagnostic final. Le nombre de colonies bactériennes obtenu à partir d'échantillons d'abeilles a une valeur pronostique supérieure à ce qui serait obtenu à partir de débris (Forsgren et Laugen, 2014).

La PCR permet l'identification du génotype (Genersch, 2010). Les expériences de Forsgren et Laugen (2014) montrent que la culture est plus sensible que la PCR pour détecter la bactérie dans les colonies cliniquement malades. Toutefois, l'analyse par PCR des débris accumulés dans la ruche devrait être priorisée si l'objectif est de surveiller la prévalence de la bactérie indépendamment des symptômes de la maladie.

Prévalence

La loque américaine est présente sur tous les continents où l'apiculture est pratiquée (Aileen et Rushton, 2014). La prévalence de la maladie au niveau des colonies varie selon les pays, les années et la méthode de recherche. Les résultats des différentes études de prévalence menées dans le monde sont présentés dans le Tableau I. Une autre étude, menée dans le cadre d'un projet de surveillance réalisé de 2004 à 2008 en Allemagne, n'a détecté que si rarement

P. larvae dans ses échantillons (nature non-identifiée) provenant de 123 apiculteurs que la recherche de cet agent a été abandonnée après 2 ans (Genersch et al., 2010).

Tableau II. Prévalences de *P. larvae* selon le pays, l'année et la méthode de recherche.

Étude	Pays	Année	Niveau	Substrat (n)	Méthode	Prévalence
Steinkraus et Morse (1992)	États-Unis et Ontario	1992	Entreprises	Miel (82)	Culture	8.5%
De Graaf et al. (2001)	Belgique	1999	Ruchers	Miel (1328)	Culture	11%
Nguyen et al. (2009)	Belgique	2004	Ruchers	Miel (100)	Culture + PCR	26%
Arabiat et al. (2012)	Jordanie	2005-2007	Colonies	Colonies (127)	Inspection	3.9%
			Ruchers	Miel (114)	Culture	36.6%
				Miel (114)	PCR	39.7%
Garrido-Bailon et al. (2013)	Espagne	2006-2007	Colonies	Larves (1,659)	PCR	1.6-4.2%
Pohorecka et al. (2012)	Pologne	2009-2011	Ruchers	Miel (2,294)	PCR	45%
Khezri et al. (2018)	Iran	-	Ruchers	Abeilles (100)	PCR	2%

La distribution de cette infection semble inégale tant temporellement que spatialement. Par exemple, en Allemagne, selon une étude publiée en 2003, on peut retrouver des spores dans 6% des échantillons de miel sélectionnés au hasard sur le territoire, mais cette prévalence grimpe à 24% dans les zones ayant un historique de loque américaine; la quantité de spores contenues dans le miel varie également sur le territoire, étant plus élevée dans ces zones endémiques (Otten, 2003). Selon Aileen et Rushton (2014), la distribution de *P. larvae* forme des agrégats spatiaux, mais la majorité ne persiste pas dans le temps. Les chercheurs en

concluent que les mesures de contrôle (destruction des colonies positives obligatoire au Royaume-Uni) peuvent mener à l'extinction locale de la maladie. Quelques agrégats spatiaux, plus rares, sont persistants et indiquent potentiellement des points d'endémicité ou de risque d'introduction exotique.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Le niveau d'infection seuil conduisant à une manifestation clinique de la maladie au niveau de la colonie est difficile à définir. Selon Ritter (2003), seulement 2% des colonies présentant entre 1 et 5,000 spores par gramme de miel présentent des signes cliniques, alors que ce pourcentage est de 88% pour les colonies au-dessus de 5,000 spores par gramme. Une autre étude conclut que les abeilles adultes permettent un diagnostic précoce de la maladie, avant même l'observation de signes cliniques, et permet d'établir un statut sanitaire fiable de la colonie. On considère qu'à 3 000 spores par adulte, la colonie sera cliniquement atteinte (Gende et al., 2011). Il a été rapporté que des spores pouvaient être observées dans le miel 2 à 3 ans avant l'apparition de signes cliniques (von der Ohe, 2003). Cependant, tel que précédemment mentionné, il est difficile de poser un diagnostic sur la base de signes cliniques. Ainsi, il est difficile d'établir s'il s'agit véritablement d'une longue phase latente ou plutôt d'un défaut de diagnostic (Aileen et Rushton, 2014).

Dans une optique de médecine populationnelle, le traitement consiste à détruire le matériel et les colonies infectées. Le pronostic pour une colonie infectée est donc pauvre, même si elle ne succombait pas à la maladie par elle-même.

Lors d'une enquête de mortalité menée en Belgique, aucune relation entre la présence de spores dans le miel et la mortalité dans les ruchers n'a pu être démontrée (Nguyen et al., 2009). Cependant, à l'échelle européenne, la loque américaine clinique a été associée aux mortalités hivernales de 2012-2013 dans un modèle de régression de Poisson multivariable (Chauzat et al., 2016).

Impact sur l'entreprise

Une fois diagnostiquée, la maladie doit être reportée aux autorités provinciales et à l'OIE. Il n'y a pas de traitement imposé au Canada, et l'usage d'antibiotiques y est permis.

Une analyse canadienne a démontré qu'il était plus rentable économiquement de traiter les colonies affectées en les secouant sur du nouveau matériel non-contaminé que d'éliminer ces colonies; cependant, peu importe le traitement, les colonies affectées sont une source de pertes économiques. En effet, une colonie en santé dégageait des profits 315.57\$, comparé à des profits de 192.08\$ pour le traitement par secouage, de 154.81\$ pour l'achat d'abeilles de remplacement, et des pertes de 34.50\$ pour la destruction d'une colonie sans remplacement (Pernal et al., 2008).

P. larvae a le potentiel d'infecter les humains (5 cas rapportés) lors d'inoculation intraveineuse accidentelle, ce qui peut résulter en une septicémie fatale (Rieg, 2010). Des mesures de biosécurité de base doivent être observées lors de manipulation de produits de la ruche potentiellement contaminés, notamment le miel.

Prévention et contrôle

Il a été démontré expérimentalement que les colonies d'abeilles sélectionnées pour leur comportement hygiénique sur la base d'un test de couvain lyophilisé résistent à la loque américaine (Spivak et Reuter, 2001). Dans le cadre de cette étude, suite à l'introduction de morceaux de cadre contaminé dans les colonies, seulement 2 colonies hygiéniques sur 18 (11%) ont développé des signes cliniques sans rémission spontanée, alors que cette proportion était de 17/18 (94%) pour les colonies non-hygiéniques. La production de miel des colonies hygiénique était également significativement supérieure.

Bien que certains antibiotiques (l'oxytétracycline et la tylosine) soient homologués pour le contrôle de la loque américaine au Canada, leur utilisation n'est pas recommandée. D'abord, ces molécules ne sont pas efficaces contre les spores, qui sont la forme problématique de la bactérie (Alippi, 1999). Une utilisation massive d'antimicrobiens malgré cette particularité risque d'aggraver un phénomène de résistance déjà observé chez la bactérie (Miyagi et al., 2000; Kochansky et al., 2001; Ritter, 2003; Alippi et al., 2007; Genersch, 2010). De plus, en évitant les molécules chimiques, on évite les résidus dans les produits de la ruche. Il est possible de créer des « essais chocs » (les abeilles sont secouées sur de nouveaux cadres sains) pour tenter de réduire la charge de spores et aider les colonies à éliminer la maladie, sans antibiotiques (von der Ohe, 2003).

2.2.2. *Melissococcus plutonius* (loque européenne)

Agent et dynamique d'infection

La loque européenne est causée par *Melissococcus plutonius*, une bactérie coque Gram positive pouvant former des chaînes. Son apparence est parfois pléomorphique (Carr, 2016). Il s'agit d'une bactérie résistante, notamment à la dessiccation, pouvant survivre sur les parois des cellules et dans les fèces des larves (Bailey, 1959a; Bailey, 1959b). Sa culture est laborieuse et requiert des conditions d'anaérobiose (Carr, 2016),

La pathogenèse est similaire à celle de la loque américaine : la bactérie est ingérée par la larve lorsqu'elle est alimentée par les nourrices, se multiplie dans le tractus digestif et entraîne la mort de la larve. Cependant, la mort de la larve se produit avant l'operculation de la cellule (OIE, 2016c). Le portrait clinique est donc légèrement différent de celui de la loque américaine. Toutefois, le génotype ERIC II de *P. larvae*, tuant les larves plus rapidement, peut amener des signes similaires à la loque européenne (voir section 1.2.2). Le signe le plus caractéristique d'une infection par *M. plutonius* est l'apparence décolorée de l'intestin de la larve. Celui-ci, de couleur jaune-orange lorsqu'en santé, est visible à travers la paroi corporelle translucide de la larve. La larve morte devient progressivement blanc cassé, jaunâtre à brunâtre et perd son positionnement normal (recroquevillé au fond de la cellule) (Pernal et Clay, 2015). Elle peut être tordue ou étendue contre la paroi de l'alvéole, ou encore couchée en travers de l'ouverture de la cellule. Une odeur aigre se développe lorsque de nombreuses cellules sont affectées.

L'infection de la larve est suivie de l'invasion par des agents secondaires : *Achromobacter eurydice*, *Enterococcus faecalis*, *Brevibacillus laterosporus*, et *Penibacillus alvei* (Budge et al., 2010; OIE, 2016c). La présence de ces bactéries complique le diagnostic en stade avancé de la maladie.

La loque européenne étant une maladie digestive, elle est étroitement liée à des facteurs nutritionnels (Pernal et Clay, 2015). Elle apparaît généralement en début d'une période importante de miellée, période durant laquelle les nourrices peinent à nourrir tout le couvain. Les symptômes régressent habituellement si la miellée demeure constante et

abondante. Par contre, lorsque les mauvaises conditions environnementales font fluctuer la miellée, la maladie peut persister, voire même s'intensifier.

Parallèlement, l'abondance des aliments influence la survie de l'individu à la loque européenne (Pernal et Clay, 2015). Si la larve reçoit des aliments en surabondance, elle peut devenir nymphe puis adulte, bien que plus petite et légère que la normale. L'opercule de la nymphe infectée est noirci par les dépôts de bactérie. C'est dans cette optique que la maladie se propage, car au moment de la nymphose, la larve défèque de grandes quantités de *M. plutonius* au fond de sa cellule. Si au contraire, la larve n'est pas suralimentée, elle meurt de faim. La plupart du temps, elle meurt avant que la cellule soit scellée, et donc avant d'avoir déféqué, brisant ainsi le cycle de propagation de la bactérie. La mort de nombreuses larves infectées entraîne souvent la rémission spontanée de la colonie (Forsgren, 2010).

M. plutonius est présent dans les larves de colonies asymptomatiques (Forsgren et al., 2005). Les abeilles adultes peuvent être des vecteurs mécaniques de la bactérie (McKee et al., 2003). Étant donné la contamination des rayons par cet organisme résistant, la maladie a un comportement enzootique à l'intérieur des colonies; la récurrence de la maladie est un phénomène commun (OIE, 2016c). Le portrait de cette maladie est habituellement endémique, ponctué d'éclosions saisonnières, généralement au printemps ou à l'été lorsque les colonies sont en fort développement (Forsgren et al., 2013).

La virulence de l'agent pathogène semble varier de bénigne à sévère entre ces régions (Forsgren et al., 2013).

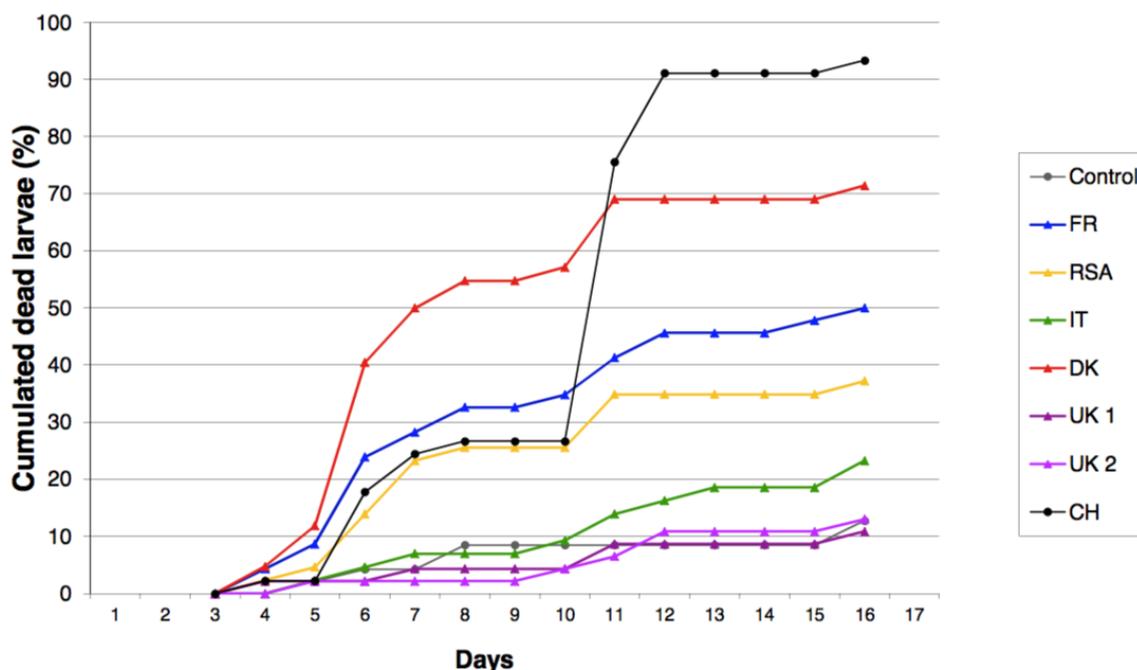


Figure 5. Virulence des différentes souches de *M. plutonius*, avec permission (Charriere et al., 2011)

Les raisons de cette variation de sévérité observée entre les cas de loque européenne sont encore mal comprises. Celle-ci pourrait être due à différentes souches de la bactérie, à la génétique et résistance intrinsèque des abeilles ou encore aux pratiques apicoles. En Europe, il a été démontré que la capacité expérimentale de la bactérie à causer la mortalité des larves varie selon la région d'origine de celle-ci (voir Figure 5) (Charriere et al., 2011). Des chercheurs japonais (Arai et al., 2012) ont identifié des organismes similaires à *M. plutonius*, mais qui présentent des caractéristiques microbiologiques différentes, chez des larves présentant des signes de loque européenne. Contrairement à la bactérie *M. plutonius* typique, ces organismes poussent plus facilement en culture, et conservent la capacité d'infecter même à la suite de leur culture. Cette découverte démontre qu'il existe au moins deux groupes de souches de *M. plutonius* : le groupe typique et l'atypique. D'autres équipes ont décrit par le passé des bactéries *M. plutonius* capables de croître dans des conditions atypiques aux États-Unis, aux Pays-Bas, au Royaume-Unis, au Brésil et en Inde (Bailey et Gibbs, 1962; Bailey, 1974; Bailey, 1984; Allen et Ball, 1993). Le simple fait qu'il semble exister plusieurs souches différentes à travers le monde, bien qu'elles soient encore méconnues, pourrait expliquer la

variance de virulence de la loque européenne dans les ruches. Cet argument est appuyé par une étude du Royaume-Unis qui remarque que certains groupes de *M. plutonius* sont associés avec une plus grande sévérité de cas et la décision conséquente de détruire la colonie plutôt que de traiter (Budge et al., 2014). Ces chercheurs émettent aussi l'hypothèse que la variation d'impact de la maladie sur les ruchers entre les régions reposerait donc sur une variation génétique de la bactérie, et non seulement sur des conditions environnementales ou la susceptibilité des colonies.

Facteurs de risque

Tel que précédemment décrit, des facteurs nutritionnels, liés à des facteurs environnementaux, peuvent influencer le développement de la maladie clinique.

Méthode diagnostique

Un frottis des larves malades peut être réalisé et analysé au microscope pour un décompte des bactéries (OIE, 2016c).

La culture bactériologique ne détecte que 0.2% des bactéries comptées à la microscopie, ce qui suggère qu'une importante proportion de ces bactéries ne sont pas viables (Djordjevic et al., 1998). La culture permet également de performer un antibiogramme.

Une qPCR a été développée pour la quantification de *M. plutonius*. Puisque la PCR permet de détecter une infection avant que les signes cliniques de la maladie ne soient visibles dans la colonie, l'analyse d'échantillons groupés par rucher a été suggérée comme alternative à l'examen visuel systématique du couvain (Roetschi et al., 2008). Une étude japonaise démontre que les PCR présentement utilisées pour identifier rapidement la bactérie en laboratoire peuvent détecter *M. plutonius* typique et atypique, mais ne permettent pas de les différencier (Arai et al., 2014), expliquant pourquoi ces variations peuvent passer inaperçues.

Pour ce qui est des techniques immunologiques, il est possible de préparer un antisérum chez le lapin à l'aide de cultures de *M. plutonius*. Une ELISA détectant les antigènes a été développée en 1983. Un test immuno-chromatographique commercial, récemment développé à l'aide d'anticorps monoclonaux, permet un diagnostic sur place en

moins de 10 minutes. Ce test, bien que très utile pour les cas cliniques, manque de validation et n'est pas un test recommandé par l'OIE pour la surveillance (OIE, 2008a).

Les abeilles nourricières provenant des nids à couvain sont l'échantillon idéal pour poser le diagnostic. En effet, elles montraient des charges bactériennes 20 fois plus élevées que les abeilles butineuses attrapées à l'entrée de la ruche (Roetschi et al., 2008). Les larves non-infectées et le miel, même dans les colonies montrant des signes cliniques, obtiennent souvent un résultat négatif à la PCR (Forsgren et al., 2005).

Prévalence

La loque européenne a une distribution mondiale, à l'exception de la Nouvelle-Zélande (Forsgren et al., 2013). Cependant, il semble que la distribution de la bactérie sur les territoires ne soit pas uniforme; en Suisse et au Royaume-Uni, l'ensemble des échantillons de certaines régions étaient négatifs (Belloy et al., 2007; Budge et al., 2010).

Une équipe suisse a décrit la distribution de *M. plutonius* chez les abeilles ouvrières par PCR (Belloy et al., 2007): ils ont retrouvé des abeilles porteuses dans plus de 90% des colonies asymptomatiques (n=12) situées dans des ruchers présentant des signes cliniques de loque européenne (n=6). Dans les ruchers asymptomatiques situés dans des zones où la maladie est endémique (n=5), des abeilles porteuses ont été détectées dans environ 30% des colonies (n=32). Dans les régions sans histoire de loque européenne, tous les échantillons (n=16) d'abeilles étaient négatifs.

En Europe, la prévalence clinique de cette maladie semble très basse, détectée dans seulement 5 des 15 états enquêtés, et excédant 2% seulement en France (Chauzat et al., 2014). Les données de surveillance passive au Royaume-Uni, où le cheptel est estimé à 274 000 colonies, 675 cas de loque ont été diagnostiqués en 2005 (Wilkins et al., 2007). La plus haute incidence déclarée était de 1,041 colonies, en 2000. Comme il s'agit de surveillance passive, et que le diagnostic de cette bactérie est difficile, il est probable que l'incidence soit sous-estimée. En 2008, une enquête active menée par le même bureau de surveillance a détecté *M. plutonius* dans 4.6% (7/152) des échantillons d'abeilles adultes (Budge et al., 2015).

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Aucun signe clinique de loque européenne n'est noté dans une colonie sous 50 000 CFU de *M. plutonius* par abeille (Roetschi et al., 2008). Selon une étude menée au Royaume-Uni en 2008, la prévalence de *M. plutonius*, recherché sur abeilles adultes, était de 1.6% dans les colonies fortes (n=63), alors qu'elle était de 6.7% dans les colonies faibles (n=89); malgré cette différence, la présence de la bactérie ne permettait pas de prédire la force d'une colonie de façon significative (Budge et al., 2015).

Chauzat et al. (2016) n'ont pas trouvé d'association entre la présence de loque européenne clinique dans le rucher et la mortalité dans le rucher à l'hiver suivant.

Tableau III. Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de *Melissococcus plutonius* dans différentes parties du monde.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Référence
							Mesure d'association	Valeur de p	
Québec	2017-2018	Culture positive		Août	Colonie	21%	-	0.48 ^a	Claing et al. (2019)
					Rucher	55%	-	-	
Europe	2012-2013	Clinique	Moins de 500 abeilles ou orpheline	Automne	Rucher	1%	-	0.3	Chauzat et al. (2016)
France	2003-2005	Clinique + culture positive	Absence d'abeilles ou retrait par l'apiculteur	Incidence sur 4 saisons	Colonie	3-8%	OR=6.7	<0.001^b	Chauzat et al. (2010a)
					Rucher	18-29%			

^a Pas d'impact sur la mortalité hivernale, mais associé à des signes cliniques (couvain en mosaïque).

^b Lorsque la mortalité est mesurée une saison plus tard que la présence de la maladie.

Impact sur l'entreprise

La loque européenne est considérée comme étant de plus en plus problématique dans certaines régions du monde (OIE, 2016c). Par exemple, dans les dernières années, des cas sévères de loque européenne ont été répertoriés en France, pouvant entraîner la mortalité de ruchers entiers (Vidal-Naquet, 2015b).

Prévention et contrôle

La prévention passe principalement par la régie de l'alimentation : les larves ne doivent recevoir une quantité ni excessive, ni insuffisante de nourriture. Il faut donc s'assurer que la colonie accroît son nid à couvain avec un rythme qui ne dépasse pas les capacités des nourrices, tout en laissant une source d'énergie supplémentaire à la colonie pour prévenir les pénuries. Le point clé de la prévention de la loque européenne est le renouvellement régulier des rayons, afin d'éliminer la contamination par la bactérie, avec destruction des rayons contaminés (Pernal et Clay, 2015).

Contrairement à *Paenibacillus larvae*, l'agent de la loque américaine, aucune résistance à l'oxytétracycline n'a été décrite chez *M. plutonius*. Suite à un traitement conventionnel à l'aide de l'antibiotique bactériostatique oxytétracycline, des taux de récurrence élevés (27%) sont rapportés (Thompson et Brown, 2001). La combinaison de l'utilisation de cet antibiotique avec un transvasement réduit le taux de récurrence à 5% (Waite et al., 2003). Selon une étude menée au Royaume-Uni, les colonies traitées à l'oxytétracycline étaient 5 fois plus susceptibles de présenter de la loque européenne l'année suivante que les colonies transvasées (Budge et al., 2010). Dans une expérience menée en Suisse, les mesures d'assainissement (brûler les colonies atteintes et stériliser le matériel) utilisées seules n'ont permis d'éliminer la maladie que dans 3 ruchers sur 8 l'année suivante (Roetschi et al., 2008).

Une étude menée au Royaume-Unis conclut que les colonies asymptomatiques d'un rucher présentant des signes de loque sont plus à risque d'être infectées par *M. plutonius* que les colonies asymptomatiques de ruchers en santé, et que par conséquent cette maladie pourrait être traitée comme une maladie de rucher (Budge et al., 2010).

2.2.3. Spiroplasma

Deux bactéries mollicutes peuvent infecter l'abeille adulte : *Spiroplasma apis* (Mouches et al., 1983) et *Spiroplasma melliferum* (Clark et al., 1985). Ces bactéries franchissent la barrière intestinale et causent une infection systémique de l'hémolymphe aussi connue sous le nom de « maladie de mai » (Evans et Schwarz, 2011). En aquaculture, les spiroplasma ont causé de nombreuses épidémies chez des crustacés qui laissent croire que la virulence de ces bactéries pourrait être reliée à un large nombre d'hôtes et des conditions environnementales stressantes (Regassa et Gasparich, 2006).

2.2.4. *Pseudomonas apiseptica*

Tout comme les spiroplasma, *Pseudomonas apiseptica*, une bactérie gram négatif, infecte les abeilles adultes, causant une septicémie fatale. L'entrée dans l'hémolymphe se produirait toutefois via le système respiratoire, probablement lorsque des conditions défavorables créent une brèche dans celle-ci (Bailey, 1968a; Sarwar, 2016). Cette maladie cause peu de pertes et semble se résoudre par elle-même (Sarwar, 2016).

2.3. Mycètes

2.3.1. *Nosema spp.*

Agent et dynamique d'infection

Deux microsporidies causent la parasitose connue sous le nom de nosérose : *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. On les désigne donc souvent sous l'appellation *Nosema spp.* Ces agents proviennent de l'abeille asiatique, *Apis cerana*. *N. ceranae* démontre une grande variabilité génétique, qui pourrait être à l'origine des différentes virulences observées (Higes et al., 2013).

Le cycle de vie de ce parasite peut être résumé en deux phases : la phase amiboïde (phase végétative et reproductrice) et la phase sporulée (phase passive et de résistance). Les spores de *Nosema spp.* ont une forme ovoïde, longues de 4 à 7 micromètres et larges de 2 à 4

micromètres (OIE, 2013; Vidal-Naquet, 2015a; Boucher, 2016), les spores de *N. ceranae* étant légèrement plus petites.

Les spores sont ingérées par l'abeille adulte. Elles se multiplient dans les cellules épithéliales de l'intestin et causent leur éclatement. Le parasite est excrété dans les déjections de l'abeille et contamine l'environnement. Outre son effet sur le système digestif, *N. apis* conduit à l'atrophie des glandes hypopharyngiennes, qui sont essentielles à l'alimentation du couvain et altère le développement des ovaires, menant à l'infertilité chez la jeune reine (Vidal-Naquet, 2015a).

Facteurs de risque

Dans la triade épidémiologique, des facteurs relatifs à l'hôte peuvent expliquer les effets pathologiques divergents de *N. ceranae* et *N. apis*, et ces différences semblent dépendre en partie de l'âge des abeilles au moment de l'infection. Lorsque de jeunes abeilles élevées dans des incubateurs sont utilisées, on observe une mortalité augmentée par rapport aux abeilles non infectées. Alaux et al. (2010) ont observé une mortalité cumulée d'environ 25% dans le groupe infecté contre ~5% dans le groupe témoin après 10 jours ($p < 0.05$). Pour Higes et al. (2007), la mortalité cumulée 8 jours post-infection était de 100% pour les abeilles infectées ($n=60$), tandis que toutes les abeilles témoins sauf une ($n=20$) étaient en vie au jour 14. Dussaubat et al. (2012) ont également observé un taux de mortalité cumulé des abeilles mellifères infectés par *N. ceranae* significativement supérieur à celui des abeilles témoins (test du log-rank, $p < 0.001$). Martín-Hernández et al. (2011) ont remarqué une augmentation de la mortalité des jeunes abeilles avec la dose infectieuse utilisée. La mortalité a atteint 93,1% après 7 jours dans le groupe avec la plus haute dose infectieuse (10^5 spores/abeille). La mortalité était alors plus élevée dans tous les groupes infectés par *N. ceranae* que dans les groupes témoins. Dans le cas d'une infection à *N. apis*, seules les doses les plus élevées de spores (10^5 et 5×10^4 spores/abeille) ont produit plus de mortalité que dans le groupe d'abeilles témoin. Paxton et al. (2007) décrivent également une survie réduite des abeilles nourricières infectées par *N. ceranae* (14/25 abeilles), soit de jeunes abeilles provenant du nid à couvain, par rapport aux abeilles non-infectées (24/25 abeilles) (test exact de Fisher, $p=0.008$). Il n'y avait pas de différence entre la survie des abeilles infectées par *N. apis* (23/25) et celle du

groupe non-infecté. Cependant, lorsque que ce sont des abeilles ouvrières adultes d'âge indéterminé (âge moyen : 15 jours) qui sont infectées expérimentalement avec *N. ceranae*, la mortalité observée est très faible (Forsgren et Fries, 2010). On peut donc constater que *N. ceranae* est plus virulent que *N. apis*, et que l'âge des abeilles infectées par *N. ceranae* pourrait influencer la mortalité résultante. Toutefois, étant donné les importantes différences méthodologiques entre les études d'infection expérimentale, il est difficile de déterminer si la variance de mortalité observée d'une étude à l'autre est réellement due à une différence de sensibilité des sous-espèces hôtes (i.e. des groupes d'âge) (Higes et al., 2013).

Un autre aspect ayant un impact important sur la résultante clinique de l'infection par *N. ceranae* est la coinfection. D'abord, il est clair que les deux espèces de *Nosema* sont en compétition lorsqu'elles infectent le même hôte. Il n'a pas été démontré qu'une des espèces ait un avantage compétitif sur l'autre; ce serait plutôt l'ordre d'infection qui déterminerait l'espèce la plus prolifique (Martín- Hernández et al., 2018). Cependant, il semble que la coinfection par les deux espèces de *Nosema* n'influence pas la distribution et l'évolution dans le temps de l'infection aux différents niveaux populationnels (individu, colonie, rucher, pays) : même si *N. ceranae* est dominante tout au long de l'année, les populations de *N. apis* varient de façon classique, c'est-à-dire avec un petit pic à l'automne, une accumulation au cours de l'hiver et un large pic au printemps (Martín- Hernández et al., 2012; Vidal-Naquet, 2015a). On a observé une relation entre *N. ceranae* et le virus des ailes déformées (DWV). Les deux agents entreraient en compétition pour les cellules intestinales nécessaires à leur pathogénèse; cependant, les résultats de cette compétition varient selon les études, dont la méthodologie est également inconstante (Martín- Hernández et al., 2018). Par ailleurs, selon la même étude, l'alimentation des abeilles aurait un impact sur la force de la corrélation négative entre ces deux pathogènes. Des interactions entre *N. ceranae* et d'autres virus, comme le BQCV, le ABPV et le CBPV ont aussi été proposées. Selon une étude, il semblerait que la présence de *N. ceranae* ait un effet synergique sur le développement de CBPV lorsque ce dernier est inoculé *per cuticula*, et antagoniste lorsqu'il est inoculé oralement (Toplak et al., 2013). Selon une étude cohorte de 6 ans menée en Allemagne sur 220 ruches, l'infestation par *V. destructor* en automne est liée à l'infection par *N. apis* au printemps suivant (Hedtke et al., 2011). La

présence de l'amibe *Malpighamoeba mellificae* augmenterait la sévérité de l'infestation par *N. apis* (Bailey, 1968b).

On soupçonne que des facteurs environnementaux et de régie soient également associés avec les résultats d'une infestation par *Nosema spp.* C'est le cas de la température, qui a un effet sur la compétition interspécifique entre les espèces de *Nosema*. De façon générale, la microsporidie la plus prévalente est *N. ceranae*, qui est souvent détectée seule (Klee et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen et Huang, 2010; Yoshiyama et Kimura, 2011; Martín- Hernández et al., 2012). On observe toutefois que *N. apis* est plus prévalente dans les régions tempérées (Martín- Hernández et al., 2012). Une investigation d'échantillons historiques suggère un remplacement progressif de *N. apis* par *N. ceranae* (Paxton et al., 2007). La pluie et le confinement favorisent le développement de *N. apis*, alors que les températures élevées favorisent le développement de *N. ceranae* (Martín-Hernández et al., 2009). La qualité de l'alimentation est également primordiale pour l'évolution de l'infection par *N. ceranae*; les abeilles parasitées recevant une alimentation monoflorale pauvre en protéines survivent moins longtemps que les abeilles parasitées recevant un mélange polyfloral (Di Pasquale et al., 2013). L'exposition à des doses sublétales d'insecticides augmente la sévérité de l'infection par *N. ceranae* (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011).

Méthode diagnostique

Le moment de l'effondrement de la colonie a un impact sur la charge parasitaire parmi les abeilles survivantes (Higes et al., 2008) qu'il est important de considérer lors du diagnostic. En effet, puisque la production de couvain est interrompue à l'automne, une colonie qui s'effondre à l'hiver comptera principalement de vieilles abeilles fortement infestées. Au contraire, le nombre croissant d'abeilles naissantes viendra diluer la proportion d'abeilles infectées dans une colonie effondrée au printemps.

Tout comme pour les maladies bactériennes, il est possible de quantifier l'infection en dénombrant les spores au microscope. Pour ce faire, le contenu digestif de 60 abeilles est broyé puis observé au microscope (OIE, 2013). Les abeilles butineuses collectées à l'entrée de la ruche forment un échantillon plus fiable que les abeilles nourricières (situées dans les hausses) pour la recherche de *N. ceranae* par compte de spores, tout comme *N. apis* (Meana et

al., 2010). Higes et al. (2008) suggèrent cependant que la proportion d'abeilles infectées serait un indicateur plus approprié de l'état de santé de la colonie, mesuré en cadre recouverts de couvain et d'abeilles (Pearson $r=-0.8$, $p=0.001$).

Bien qu'il existe des techniques microscopiques pour distinguer entre les deux espèces, *N. apis* et *N. ceranae*, les méthodes moléculaires sont plus sensibles et spécifiques d'espèces (Fries et al., 2013). La qPCR est plus sensible que le dénombrement de spores et détecte les infections 40% plus fréquemment (Traver et al., 2012).

Prévalence

La prévalence de l'infection à *Nosema spp.* en Ontario, évaluée par comptage de spores au microscope sur 408 colonies, était de 28% en 2007 (Guzmán-Novoa et al., 2010). En Allemagne, la prévalence de l'infection à *Nosema spp.* en automne variait de 14 à 31% entre 2004 et 2007, avec entre 1% et 2% de colonies sévèrement infestés (>100 spores à l'évaluation microscopique) (Genersch et al., 2010). Toujours en Allemagne, de 2004 à 2010, la proportion de colonies positives à *Nosema spp.* était toujours plus élevée au printemps (18,9% de *N. apis*, 14,46% de *N. ceranae*, $n=1,217$) qu'en automne (5,84% de *N. apis*, 3,02% de *N. ceranae*, $n=1,061$) (Hedtke et al., 2011). En Uruguay, entre les années 1964 et 2008, la proportion d'échantillons ($n=61,916$) positifs à la nosérose variait entre 5% et 58%. Entre 2002 et 2008, la proportion se maintenait sous 30% (Invernizzi et al., 2009).

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Bien que généralement considérés comme agents opportunistes, la pathogénicité de *N. apis* et *N. ceranae* fait encore l'objet de débat et demeure mal comprise.

On distingue deux portraits cliniques distincts de nosérose selon l'agent pathogène responsable : la nosérose de type A, associée à *N. apis*, et la nosérose de type C, associée à *N. ceranae*. Les infections mixtes sont également possibles (Klee et al., 2007).

La nosérose de type A est une maladie généralement bénigne et possiblement asymptomatique en l'absence de facteurs prédisposants (longues périodes de pluie, confinement, alimentation inadéquate). On peut alors observer un affaiblissement de la colonie

et la présence d'infections concomitantes telles l'amoebiose et certaines infections virales. Au niveau des individus, on peut remarquer de la dysenterie (présence de déjections pâles à brunâtres sur les cadres et hausses de la ruche), des abdomens distendus par la constipation, des abeilles incapables de voler et des abeilles mortes devant la ruche (Vidal-Naquet, 2011). Ces signes sont peu spécifiques et le diagnostic différentiel suivant doit être considéré : acarapodose, amoebiose, maladies virales, empoisonnement.

La nosérose de type C fait encore l'objet de beaucoup de débats et de recherche. La dépopulation est le seul signe évident d'infection par *Nosema ceranae* décrit (Higes et al., 2013). Cette maladie réduit drastiquement la population d'abeilles adultes, jusqu'au point où la colonie n'arrive plus à compenser par sa production de couvain. En effet, puisque les abeilles doivent commencer à butiner plus tôt pour compenser la perte d'abeilles adultes (Huang et Robinson, 1996; Amdam et Omholt, 2003), moins de temps est consacré à la production de couvain. Ceci augmente également le risque de développer des maladies du couvain, telle l'ascosphérose (Hedtke et al., 2011). La capacité de *N. ceranae* à dépeupler une colonie entière demeure controversée. Puisque la nosérose de type C ne présente pas de signes cliniques précis, l'interprétation des postulats de Koch s'en trouve limitée. Toutefois, en tenant compte de ces limites, l'impact de l'infestation par *N. ceranae* au niveau des colonies a été démontré (Higes et al., 2008).

N. ceranae a également un impact sur la consommation alimentaire des abeilles (Naug et Gibbs, 2009), altérant leur état énergétique (Mayack et Naug, 2010). Ceci mène à une aptitude de vol réduite, traduite par des facultés d'orientation altérées et une diminution du retour des butineuses infectées (Kralj et Fuchs, 2010). Il est donc soupçonné que ces abeilles meurent pendant le butinage (Higes et al., 2013). Lors de nosérose de type C, on ne retrouve habituellement pas d'abeilles mortes à proximité de la ruche (Higes et al., 2013).

Selon le nombre de spores détectées par abeille, on peut estimer l'intensité de l'infection. Une étude a établi que lorsqu'une ruche s'effondre durant l'hiver, plus de 50% des abeilles trouvées mortes dans la ruche sont infectées, et le compte de spore moyen pour ces abeilles est supérieur à 10 millions (Higes et al., 2009a).

La nosémose est mentionnée comme cause de mortalité hivernale par les apiculteurs du Québec (RAIZO, 2016). À l'échelle européenne, la nosémose a été associée aux mortalités hivernales de 2012-2013 dans un modèle de régression de Poisson multivariable (Chauzat et al., 2016).

Dans les années 2000-2010, un phénomène nommé CCD (*Colony Collapse Disorder*) en Amérique (ou CDS, *Colony Depopulation Syndrome*, en Europe) a été observé; celui-ci se définit par une disparition inexplicée des abeilles adultes, un abandon du couvain, une diminution de la force de la colonie et une forte mortalité hivernale sans aucune perturbation pathologique antérieure évidente (Higes et al., 2009b). Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur les origines du CCD, plusieurs études ont conclu que *N. ceranae* était responsable de la dépopulation observée. Higes et al. (2009b) n'ont détecté que *N. ceranae*, avec évidences cliniques à l'examen pathologique, dans deux ruchers affectés de CCD au court de l'hiver 2006 appartenant à deux apiculteurs professionnels en Espagne. Ces résultats concordent avec d'autres études précédemment menée en Espagne par le premier auteur (Higes et al., 2006; Higes et al., 2008; Higes et al., 2009a). En Grèce, de nombreux agents pathogènes et pesticides ont été trouvés dans 5 ruchers ayant souffert de dépopulation en 2009, mais les auteurs soupçonnent principalement une synergie entre *N. ceranae* et les virus présents (Bacandritsos et al., 2010). En Israël, l'examen et l'échantillonnage d'agents pathogènes sur 113 ruches à l'hiver 2009 ont montré que 35% des ruches étaient atteintes de *Nosema spp.* Une corrélation négative significative a été observée entre la population d'abeilles ouvrières et la présence d'infections virales et de *Nosema* ($\tau\text{-}b=-0.32$, $n=32$, $P=0.03$). Cependant, dans un modèle de régression linéaire multiple utilisant la présence de *Nosema*, varroa et des virus détectés pour prédire la population d'abeilles adultes, la seule variable avec un effet négatif significatif sur la population d'abeilles était la présence de BQCV (Soroker et al., 2010). En Suisse, un modèle linéaire ($n=29$) montre que, pour toutes les saisons de 2007, *N. ceranae* ($p<0.001$) pourrait être utilisé comme marqueur prédictif des pertes hivernales de colonies. Cependant, le modèle a montré qu'il y avait un impact saisonnier significatif sur l'expression de ce marqueur: en été, seul *V. destructor* ($p<0.01$) pouvait être considéré comme un marqueur prédictif important, tandis qu'en automne, *N. ceranae* (diminué; $p<0.05$) pourrait être

considéré comme un prédicteur significatif de l'effondrement des colonies (Dainat et al., 2012b).

D'autres études n'ont pas trouvé d'association entre *N. ceranae* et la mortalité dans les colonies. C'est le cas d'une étude menée en Uruguay qui, malgré des signes classiques de CCD, n'a pu détecter une présence marquée de *Nosema* dans les colonies affectées (n=29, provenant de 9 régions du pays), mais plutôt des problèmes de varroa résistant aux acaricides (Invernizzi et al., 2009). Les auteurs spécifient toutefois que *Nosema* semblerait responsable des mortalités observées lors de la pollinisation d'Eucalyptus en automne (Invernizzi et al., 2005). Aux États-Unis et en Suisse, les chercheurs n'ont pas trouvé de différence dans la charge en agents pathogènes ou dans les co-infections, incluant *Nosema*, entre colonies CCD et non CCD; cependant, cette découverte n'exclut pas l'implication des agents pathogènes dans le développement du CCD (Dainat et al., 2012c). Dans les pays des Balkans, de 2006 à 2009, aucune caractéristique du CCD n'a été observée dans les colonies échantillonnées (325 colonies, dont 272 positives à *N. ceranae*), ni au moment de l'échantillonnage, ni lors des étapes de réévaluation ultérieures (Stevanovic et al., 2010). En Allemagne, l'analyse statistique de 1,997 échantillons collectés dans 220 colonies suivies durant 5 ans n'a révélé aucune relation entre la mortalité des colonies et les niveaux détectables d'infection à *N. ceranae* ou *N. apis*. De plus, *N. apis* était plus répandu que *N. ceranae* dans la cohorte étudiée. Les auteurs émettent l'hypothèse que la diminution marquée de la germination des spores observée après une exposition même courte aux températures basses (-4°C) pour *N. ceranae* uniquement expliquerait ces résultats. La germination réduite ou inhibée des spores de *N. ceranae* à basses températures pourrait entraver le pouvoir infectieux et la propagation de cet agent pathogène dans les régions climatiques caractérisées par un hiver relativement froid (Gisder et al., 2010).

Tableau IV. Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de *Nosema spp.* dans différentes parties du monde.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence
							Mesure d'association	Valeur p		
Québec	2017-2018	Présence de spores		Août	Colonie	15%	-	0.43 ^a		Claing et al. (2019)
					Rucher	56%	-	-		
Ontario	2007-2008	Présence de spores	Non spécifiée (possiblement retrait par l'apiculteur)	Octobre-novembre	Colonie	28%	Mann-Whitney test ^b	0.28		Guzmán-Nova et al. (2010)
Europe	2012-2013	Clinique	Moins de 500 abeilles ou orpheline	Automne	Rucher	1-8%	Modèle multivariable ^c	0.001	Taille entreprise/rucher	Chauzat et al. (2016)
Allemagne	2004-2008	Présence de spores	Moins de 3 cadres	Printemps	Colonie	14-31%	-	0.49		Genersch et al. (2010)
		>100 spores/champ	d'abeilles		Colonie	1-2%	-	-		

^a Pas d'impact sur la mortalité hivernale, mais association avec la force concurrente de la colonie.

^b Compte de spores moyen chez les colonies décédées de 18 018/abeille vs 6 734/abeille chez les colonies survivantes.

^c Pour une entreprise de 50 colonies et moins et ruchers de 20 colonies et moins, un rucher souffrant de nosémose clinique a une probabilité prédite de mortalité de 46%, vs une probabilité de 22% pour un rucher sain.

Région	Année	Définition de cas	Définition de Saison mortalité	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence	
						Mesure d'association	Valeur de p			
France	2003-2005	Présence de spores	-	Incidence sur 4 saisons	Colonie	3-49%	-	-	Chauzat et al. (2010a)	
					Rucher	14-50%	-	-		
Suisse	2007-2008	PCR pour <i>N. ceranae</i> positive	Non spécifiée	Été à hiver	Colonie	-	Régression linéaire ^d	<0.001	Saison	Dainat et al. (2012b)
				Été	Colonie	34%	-	>0.05		
				Automne	Colonie	41%	Régression linéaire ^d	<0.05		
				Hiver	Colonie	28%	-	-		
Pays-Bas	2011-2012	PCR positive	Non spécifiée	Juillet	Colonie	-	-	0.49	Van Der Zee et al. (2015)	
Israël	2009	PCR positive	NA ^e	Janvier	Colonie	35%	-	>0.05 ^e	Soroker et al. (2010)	

^d Mesures d'association non-présentées.

^e Impact sur population hivernale d'abeille.

Impact sur l'entreprise

Surveillée de façon passive au Québec, les apiculteurs ont rapporté avoir plus de problèmes avec cette maladie dans les dernières années (Julie Ferland, MAPAQ, communication personnelle, 2016). Un signe fréquemment rapporté d'une infection sous-clinique est une chute de production de miel de plus de 50% (Martín- Hernández et al., 2018). Il est donc possible que ce pathogène relativement fréquent soit la cause de pertes économiques pour les apiculteurs, même en cas d'infection sous-clinique.

Prévention et contrôle

L'acide acétique est parfois utilisé pour prévenir la nosérose en acidifiant la nourriture d'hiver (6 mL/litre de sirop) (Boucher, 2016). Plusieurs autres compléments alimentaires, dont le Nozevit+ (un mélange de vitamines, huiles essentielles et acide citrique) ou différentes formes de vinaigre, sont populaires afin de prévenir la nosérose.

La fumagiline B est la molécule médicinale homologuée au Canada pour le traitement de *Nosema spp.* Son efficacité a été démontrée sur *N. apis* et *N. ceranae* (Pernal et al., 2009). Dans les colonies d'abeilles mellifères, la dose de 120 mg/colonie d'abeilles à la posologie recommandée est efficace contre le dépeuplement et la mort de colonies due à *N. ceranae* après 1 an, sans détection de résidus dans le miel, bien qu'une réinfection puisse être détectée 4 mois après le traitement (Higes et al., 2011). Au Québec, ce traitement est sous prescription vétérinaire.

Il a récemment été démontré que l'âge de la reine est critique à l'évolution de l'infection par *N. ceranae* dans la colonie (Botias et al., 2012); le remplacement de celle-ci par une reine plus jeune abaisse la proportion d'abeilles adultes infectées, laquelle peut passer de ~70% à ~30% ($p < 0.001$), et permet de maintenir cette proportion à un niveau acceptable pour la viabilité de la colonie selon les auteurs (entre 10 et 30%).

2.3.2. *Ascosphaera apis* (maladie du couvain plâtré)

Agent et dynamique d'infection

La maladie du couvain plâtré est causée par l'ascomycète *Ascosphaera apis*. Les spores produites sexuellement par *A. apis* (ascospores) sont présentes dans l'environnement de la ruche et la maladie se développe lorsque les conditions sont favorables (Bailey, 1966; Gilliam, 1986). Les larves se contaminent en ingérant les ascospores contaminant le miel; bien que la voie transcuticulaire au contact de cire infectée ait autrefois été suspectée, de plus récentes études confirment que le fungus doit être ingéré pour infecter les larves, puisqu'il ne peut germer sur la cuticule (Heath, 1982; Puerta et al., 1994; Flores et al., 1996). L'infection traverse rapidement la muqueuse digestive pour envahir les tissus, à l'aide de diverses enzymes (Theantana et Chantawannakul, 2008). Les larves infectées meurent de lésions mécaniques et enzymatiques, d'une perturbation de la circulation de l'hémolymphe et d'une toxicose générale (Glinski et Buczek, 2003) avant d'être recouvertes d'une épaisse couche de mycélium blanc. Plus tard, la croissance fongique est tachetée de taches brunes ou noires, en raison de la production d'ascomates dont la taille et la couleur peuvent varier (Aronstein et Murray, 2010).

Facteurs de risque

Étant donné que les spores peuvent s'accumuler sur toutes les parties de la ruche et dans tous ses produits (e.g., cadres, hausses, cire, pollen et miel) et rester viables pendant plus de 5 mois, le matériel apicole contaminé sert de réservoir à l'infection (Gilliam, 1986; Flores et al., 2005a; Flores et al., 2005b).

L'humidité et le froid favorisent la maladie (Flores et al., 1996), et elle est plus fréquemment observée au printemps. Dans une étude expérimentale, le déficit en pollen (produit par simple retrait du pollen récolté ou par pose de pièges à pollen) produit une augmentation du pourcentage de momification; la tendance semble indiquer que le risque de développer la maladie est plus élevé dans les colonies où le piège à pollen entrave la récolte du pollen frais (Flores et al., 2005a). Pour cette raison, les auteurs recommandent d'utiliser les

pièges à pollen avec prudence, de ne pas les laisser sur les ruches pendant de longues périodes et de surveiller étroitement tout déficit en pollen.

Selon une étude cohorte de 6 ans menée en Allemagne sur 220 ruches, les épidémies de couvain plâtré en été sont liées à une infection à *N. ceranae* au printemps précédent ($p < 0.0119$) et à une infestation par *V. destructor* au cours de la même saison ($p < 0.0047$) (Hedtke et al., 2011). Ceci suggère qu'une infection antérieure par ces agents pathogènes affectant l'abeille adulte puissent rendre les colonies plus susceptibles de subir une éclosion de couvain plâtré, possiblement via un nombre réduit d'ouvrières pour maintenir le couvain à une température adéquate.

Méthode diagnostique

Les deux signes cliniques suivants sont considérés pathognomoniques de la maladie du couvain plâtré : moisissure blanche et duveteuse dans les cellules de couvain, et momies blanches, grises et/ou noires à l'entrée de la ruche ou dans les cellules de couvain operculées ou non (Aronstein et Murray, 2010).

On peut également noter la présence de couvain en mosaïque, comme c'est le cas dans toute maladie causant de la mortalité chez le couvain. Secouer légèrement un cadre de couvain operculé produit un son de grelot, puisque les momies à l'intérieur des cellules n'adhèrent pas à la paroi de celles-ci (Boucher, 2016).

Le diagnostic de cette maladie est principalement clinique (voir signes pathognomoniques énoncés plus haut). En général, le diagnostic ne requiert pas de test en laboratoire. Cependant, il doit être corroboré par l'analyse des facteurs de risque de la maladie (Flores et al., 2005a; Vidal-Naquet, 2011) : froid et humidité, baisse de température du couvain, déficit en protéine (pollen) et régie (ex : entretien du matériel).

Il est possible de confirmer le diagnostic par identification directe au microscope des asques. L'utilisation du colorant bleu de lactophénol améliore la visualisation de ceux-ci (Aronstein et Murray, 2010).

Prévalence

La prévalence de couvain plâtré semble être faible. En Allemagne, 3,84% des 1,277 échantillons collectés dans une cohorte de 220 colonies observées sur 6 ans présentaient des symptômes pathognomoniques durant l'été (Hedtke et al., 2011). L'infection par le fungus est également peu commune : une enquête de prévalence espagnole menée de 2006 à 2007 a détecté *A. apis* dans entre 1.8% et 4.8% de ses 1,659 échantillons de couvain par PCR (Garrido-Bailon et al., 2013).

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Bien que mortelle pour certaines larves, la maladie ne détruit généralement pas toute une colonie d'abeilles.

Selon les différentes études ayant évalué l'impact de différents agents pathogènes sur la mortalité hivernale, la présence de couvain plâtré ou d'*A. apis* ne semble pas associée au problème de mortalité hivernale (Gajger et al., 2010; Genersch et al., 2010; Hedtke et al., 2011).

Impact sur l'entreprise

Malgré l'impact négligeable d'*A. apis* sur la santé des colonies, l'infection peut résulter en des pertes importantes en termes de nombre d'abeilles et de productivité des colonies (Aronstein et Murray, 2010), avec une réduction de la production de miel de 1 à 5%, une réduction de force de la colonie 23% et une réduction de 49% du butinage (Heath, 1982; Zaghoul et al., 2005). Cette maladie est surveillée de façon passive par le MAPAQ (Gervais, 2015).

Prévention et contrôle

Une étude évaluant l'impact des traitements communément utilisés en apiculture a démontré que les acaricides ont un effet négatif sur la croissance *in vitro* de *A. apis*; l'acide formique tue *A. apis* et l'acide oxalique réduit sa croissance de 70% (Yoder et al., 2014).

Certaines huiles essentielles se sont avérées particulièrement efficaces pour contrôler la croissance *in vitro* de *A. apis*: *Lavandula angustifolia*; *Rosmarinus officinalis*; *Thymus vulgaris*; *Salvia officinalis*; *Mentha x piperita*; *Pelargonium graveolens*; *Prunus dulcis*; *Citrus aurantium*; et *Olea europaea*. L'huile de thym a donné les meilleurs résultats, suivie de l'huile de *Pelargonium*. Les autres huiles essentielles testées ont montré une efficacité limitée contre *A. apis*, mais peuvent contribuer à l'amélioration des stratégies de lutte antiparasitaire biologique ou intégrée en apiculture (Boudegga et al., 2010). Une étude où les ruches ont été expérimentalement infectées a démontré que 27,6% des larves échantillonnées dans les ruches nourries d'un sirop contenant 0.1% d'huile d'ajedra (*Satureja montana*) présentaient une momification, contre 79,1% dans les ruches témoins ayant reçu un sirop sans traitement (Higes et al., 1998).

2.3.3. *Aspergillus* spp.

L'aspergillose est une maladie très rare du couvain d'abeilles domestiques causée par plusieurs champignons du genre *Aspergillus*. *Aspergillus flavus* a été le plus souvent signalé, suivi de *A. fumigatus*, mais d'autres espèces incluant *A. niger* peuvent tuer les abeilles mellifères. *Aspergillus* est capable d'infecter l'hôte par le biais de l'intestin si les spores sont ingérées; par conséquent, tout comme pour *Ascospaera apis* (couvain plâtré), les larves et les adultes peuvent être infectés. La plupart des espèces d'*Aspergillus* produisent des aflatoxines qui pourraient être la principale cause de décès chez les abeilles mellifères souffrant d'aspergillose (Jensen et al., 2013).

Aspergillus spp. sont des champignons filamenteux cosmopolites que l'on trouve souvent dans le sol, où ils se développent comme des saprophytes, mais ils infectent parfois des hôtes vivants, notamment des plantes, des insectes et des mammifères. Des cas d'aspergillose ont été rapportés chez l'homme, le plus souvent a été observé chez des personnes immunodéprimées (Parra et Ramos, 1998; Garrett et al., 1999). De plus, les aflatoxines produites par certaines espèces d'*Aspergillus* sont de puissants hépatocarcinogènes, en plus d'être mutagènes et hépatotoxiques (Groopman et al., 1988; Henry et al., 1999); par conséquent, des précautions pour protéger les apiculteurs et les consommateurs doivent être prises lorsque la maladie apparaît dans le couvain.

2.4. Virus

2.4.1. Virus des ailes déformées (DWV)

Agent et dynamique d'infection

Le DWV est un virus à ARN du genre *Iflavirus*. Le DWV est transmis par l'acarien *Varroa destructor* lorsqu'il se nourrit de pupes d'abeilles ou pendant la phase phorétique de son cycle biologique chez les abeilles adultes (Bowen-Walker et al., 1999; Möckel et al., 2011). Le virus se réplique dans l'acarien, et la transmission d'une charge virale élevée (supérieure à 10^{10} équivalents du génome viral par acarien) conduit à l'apparition de signes cliniques chez la jeune abeille infestée au stade de pupes : l'abeille émerge alors avec des ailes déformées, sous-développées (Gisder et al., 2009; Möckel et al., 2011). L'infestation peut également conduire à la mort des abeilles (Bowen-Walker et al., 1999).

Alors que Yang et Cox-Foster (2005) rapportent des charges beaucoup plus élevées chez les abeilles aux ailes déformées comparées aux abeilles asymptomatiques ($\sim 10^6$ fois plus élevés), il a aussi été rapporté que des charges élevées de virus (jusqu'à 10^8 copies d'ARN) peuvent être retrouvées tant chez les abeilles présentant des ailes déformées que chez des abeilles asymptomatiques (Tentcheva et al., 2006). Une différence dans la distribution spatiale du DWV tel que détecté par RT-PCR a été démontrée entre abeilles asymptomatiques et symptomatiques provenant de 5 colonies naturellement infectées: alors que toutes les parties du corps (abdomen, thorax, tête) d'abeilles aux ailes déformées étaient toujours fortement positives pour les séquences virales, les séquences virales n'étaient jamais détectées dans l'ARN extrait de la tête pour les abeilles asymptomatiques (Yue et Genersch, 2005).

Dans l'étude de Yue et Genersch (2005), le DWV a pu être détecté à tous les stades de développement de l'abeille provenant d'une colonie naturellement infestée, à l'exception des œufs, et les charges d'ARN du DWV étaient plus élevées dans les cellules parasitées par plusieurs acariens mères. Dans les acariens collectés sur des abeilles émergentes, les rendements en ARN de DWV variaient de 10^4 à plus de 10^8 copies par acarien. Une autre étude a étudié les charges virales retrouvées par RT-PCR quantitative chez *V. destructor* provenant de 8 colonies naturellement infestées, et a observé des charges similaires, entre

5×10^4 et 1×10^{12} équivalents de génome par mite (Gisder et al., 2009). En plus de supporter la réplication virale, *V. destructor* entraîne une réduction de l'immunité de l'abeille parasitée (Yang et Cox-Foster, 2005). Au niveau individuel, il a été démontré dans un modèle de régression linéaire que la charge virale des abeilles immatures infectées par le virus est associée au nombre de mites présentes dans la cellule ($R^2=0.513$), et que la présence de mites est requise pour qu'une abeille adulte émergente soit infectée par le virus (Tentcheva et al., 2006). L'infestation des colonies par *V. destructor* en été est liée aux infections à DWV à l'automne (Hedtke et al., 2011). Il a été démontré que le pourcentage d'abeilles adultes, de larves du couvain et des mites infectée par le DWV (détecté par ELISA dans un échantillon de 20 abeilles, larves et acariens) augmente jusqu'à ce que la colonie meure ou soit traitée contre *V. destructor* (Martin et al., 2010). Cependant, la vitesse de la disparition du virus chez les abeilles adultes suite au traitement dépend de la saison, puisque les abeilles d'hiver ont une longévité prolongée; par conséquent, les traitements contre *V. destructor* devraient être appliqués quelques semaines avant la disparition du couvain de la colonie (en début septembre dans les régions tempérées) afin de protéger les abeilles d'hiver.

Selon les résultats d'une étude clinique, il semble que le virus n'est pas efficacement transmis horizontalement en l'absence d'acariens et qu'il est donc peu probable que les voies de transmission verticale génèrent de lourdes charges chez la progéniture (Dainat et al., 2012b). Möckel et al. (2011) ont également émis l'hypothèse que les abeilles nourricières pourraient s'infecter en cannibalisant les pupes infectées par le DWV, puisque l'ingestion expérimentale de 10^7 équivalents de génome du DWV résultait en une infection sous-clinique des abeilles adultes.

Möckel et al. (2011) ont également observé une augmentation significative du nombre de copies de génome du DWV détecté par PCR quantitative dans les colonies entre l'été et l'automne, tel que précédemment rapporté (Gauthier et al., 2007). Ceci concorde avec l'augmentation exponentielle du nombre d'acariens de l'été à l'automne, et reflète probablement le lien étroit qui existe entre le DWV et *V. destructor*. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les traitements appropriés des colonies d'abeilles contre *V. destructor* réduisent considérablement les quantités de DWV dans les colonies (Martin et al., 2010; Dainat et al., 2012b).

Facteurs de risque

Tel que décrit dans la section précédente, la présence de *V. destructor* représente le facteur de risque le plus important.

Indépendamment de la présence du parasite, il semble que le froid soit un facteur suffisant pour aggraver les problèmes dus au DWV (Martin et al., 2010; de Miranda et al., 2012). De plus, il a été démontré expérimentalement qu'un pesticide de la famille des néonicotinoïdes affecte l'immunité des abeilles et favorise la réplication du virus (Di Prisco et al., 2013).

Hedtke et al. (2011) ont trouvé une corrélation hautement significative de la présence d'infections à DWV et à ABPV ($P < 0,0001$) en automne; il est donc possible que la coinfection virale favorise le développement des virus.

La transhumance des colonies pourrait également jouer un rôle dans la multiplication du DWV; dans une étude américaine, le rucher de 16 colonies de Caroline du Nord exposé aux abeilles d'un rucher de 16 colonies migratrices (de retour de Californie) a connu une augmentation plus importante de la prévalence intra-rucher ($p=0.026$) et de la charge moyenne ($p=0.002$) du DWV (détecté par RT-PCR quantitative) par rapport à un rucher isolé de 16 colonies (Alger et al., 2018).

Méthode diagnostique

L'identification du SBV se fait par RT-PCR (Tentcheva et al., 2006). On peut également obtenir un diagnostic rapide par ELISA, mais cette technique n'est pas quantitative (Martin et al., 2010).

La limite de quantification a été établie à 300 copies d'ARN (soit 120 000 copies par mite et 240 000 copies par abeille en considérant les facteurs de dilution de l'étude), en deçà de quoi le virus peut être détecté, mais non quantifié.

Prévalence

Le DWV est un des virus les plus fréquemment retrouvés dans la plupart des endroits du monde. Entre 2004 et 2007, ce virus a été détecté par RT-PCR dans entre 4% ($n=182$) et

33% (n=350) des échantillons de colonies analysés dans le cadre d'une enquête allemande à l'échelle nationale (Genersch et al., 2010). Il s'agit du virus le plus souvent détecté par RT-PCR dans une autre étude allemande menée de 2004 à 2010; il a été observé dans 26% des 445 échantillons provenant de 220 colonies échantillonnées de façon répétée (Hedtke et al., 2011). En Israël, le virus a été retrouvé dans 23% des 71 colonies testées par RT-PCR à l'hiver 2009 (Soroker et al., 2010); les auteurs mentionnent toutefois que dans la plupart des cas, aucun signe clinique d'infection virale n'était détecté. Une étude expérimentale menée en Suisse a mis en évidence une variation saisonnière dans la prévalence du virus; alors que 58.6% des 29 colonies étaient infectées en été, la quasi-totalité (28/29) des colonies étaient infectées à l'automne (Dainat et al., 2012b). Il a également été retrouvé par RT-PCR dans 57% de 96 ruchers étudiés au Danemark (Nielsen et al., 2008). En France, le DWV a été trouvé par RT-PCR chez les abeilles adultes de 97% des ruchers, chez les pupes de 94% des ruchers, et chez les acariens *V. destructor* dans 100% des ruchers (n=36) (Tentcheva et al., 2004).

Le virus a été détecté en zone exempte de *V. destructor*, sur l'île de Terre-Neuve, où 21 des 23 colonies échantillonnées (91.3%), provenant de chacune des 5 entreprises apicoles (total de 115 colonies) de la province, étaient positives par RT-PCR en juin (Shutler et al., 2014). Toutefois, aucun signe clinique n'a été noté.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

L'infection par le DWV peut demeurer sous-clinique, c'est-à-dire que les abeilles infectées ne présentent pas d'ailes déformées. Lors de ce type d'infection, des problèmes d'apprentissages (par exemple pour le butinage) ont été rapportés chez l'abeille adulte infectée (Iqbal et Mueller, 2007). Lors d'infection clinique, la mortalité d'abeilles immatures peut mener à l'apparition de couvain en mosaïque, à la diminution du nombre d'abeilles adultes, et, éventuellement, à l'effondrement de la colonie. En effet, la présence du DWV a été significativement corrélé négativement à la population de travailleurs adultes ($p < 0.05$) (Soroker et al., 2010).

Selon un modèle de régression de Cox, il semble que même les infections asymptomatiques au DWV peuvent diminuer la durée de survie des ouvrières en hivernation (Dainat et al., 2012a), ce qui laisse supposer que le virus peut affecter la mortalité hivernale

des colonies. Selon une étude expérimentale menée en Suisse sur 29 colonies, le DWV ($p < 0.05$) est un marqueur prédictif des pertes de colonies hivernales, mais son pouvoir prédictif dépend fortement de la saison; en automne, la significativité de l'impact du DWV était augmentée ($p < 0.01$) (Dainat et al., 2012b). Ceci est corroboré par une autre étude menée sur 15 colonies en Angleterre, où il a été observé que la différence de charge DWV pendant la période d'hivernage entre les colonies effondrées et les colonies survivantes était statistiquement significative ($P = 0.001$), alors que les colonies étaient traitées pour maintenir les niveaux d'infestation par *V. destructor* bas. Ceci suggère que l'infection par DWV pourrait être un risque pour la survie de la colonie, indépendamment de la présence de *V. destructor* (Highfield et al., 2009).

Tableau V. Tableau comparatif des prévalences, impacts et interactions sur la mortalité hivernale de DWV dans différentes parties du monde.

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence
							Mesure d'association	Valeur de p		
Québec	2017-2018	PCR positive		Août	Colonie	33%	OR=1.31	0.5	<i>V. destructor</i> ^a	Claing et al. (2019)
					Rucher	88%	-	-		
Allemagne	2004-2008	PCR positive	Moins de 3 cadres d'abeilles	Octobre	Colonie	4-33%	Test chi ²	0.00001		Genersch et al. (2010)
Suisse	2007-2008	PCR positive	Non spécifiée	Été à hiver	Colonie	-	Régression linéaire ^b	<0.05	Saison	Dainat et al. (2012b)
				Été	Colonie	59%	-	>0.05		
				Automne	Colonie	97%	Régression linéaire ^b	<0.01		
				Hiver	Colonie	100%	-	-		

^a OR=2.58 pour colonies avec ≥ 1 acarien/100 abeilles et DWV vs colonies avec < 1 acarien/100 abeilles sans DWV (p=0.035)

^b Mesures d'association non-présentées

Région	Année	Définition de cas	Définition de mortalité	Saison	Unité	Prévalence	Impact sur mortalité		Interaction	Référence
							Mesure d'association	Valeur de p		
Pays-Bas	2011-2012	PCR positive	Non spécifiée	Août	Colonie	-	-	0.35		Van Der Zee et al. (2015)
Israël	2009	PCR positive	NA ^c	Janvier	Colonie	23%	Tau-b=-0.22^c	<0.05^c		Soroker et al. (2010)

^c Impact sur population hivernale d'abeilles

Impact sur l'entreprise

Il n'y a pas de données disponibles dans la littérature sur l'impact économique pour ce virus.

Prévention et contrôle

Tel que précédemment discuté, la meilleure protection contre le DWV est la prévention et le traitement de l'infestation par *V. destructor*.

Au niveau de l'abeille, une corrélation négative a été démontrée entre le virus des ailes déformées (DWV) et *N. ceranae* dans une étude expérimentale (Costa et al., 2011). Ce dernier détruit les cellules hôtes dans l'appareil digestif (Higes 2007), nécessaires à la pathogenèse du DWV (Boncristiani 2009).

2.4.2. Virus du complexe AKI

Agent et dynamique d'infection

Les virus de la paralysie aiguë de l'abeille (ABPV), de l'abeille de Cachemire (KBV) et le virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV) sont tous trois des virus à ARN de la famille des *Dicistroviridae*. Bien que génétiquement distincts (Maori et al., 2007), les trois ont des caractéristiques biologiques très similaires, ce qui permet d'aborder ces virus en tant que complexe viral (de Miranda et al., 2010). Ce complexe est ici nommé AKI en raison des initiales de chaque virus.

La pathologie de l'ABPV, du KBV et de l'IAPV est assez similaire, tant au niveau de l'abeille que de la colonie. Il a été démontré que l'ABPV s'accumule dans le cerveau et les glandes hypopharyngiennes de l'hôte abeille adulte (Bailey et Milne, 1969). La pathogénie exacte du virus n'a pas été décrite dans la littérature. Les virus peuvent être détectés dans des colonies sans signe d'infection apparent tant au niveau de l'abeille que de la colonie, tel que démontré en Australie à l'aide du test d'immunodiffusion sur gel (Dall, 1985). Cependant, lorsqu'injecté directement à des pupes ou abeilles adultes, l'ABPV a démontré une virulence importante pouvant causer un décès rapide, seulement 2-4 jours après l'apparition des symptômes (Bailey et al., 1963). Alors que l'injection de 10^3 particules causaient la mort de

80% des abeilles en 6 jours, et 10^{10} particules virales devaient être ingérées par abeille pour arriver au même résultat, ce qui laisse supposer que l'infection via *V. destructor* serait une voie de transmission plus importante que l'infection oro-fécale. L'IAPV cause des signes cliniques similaires à ceux de l'ABPV (Maori et al., 2007), c'est-à-dire une paralysie se manifestant notamment par des tremblements et évoluant rapidement jusqu'à la mort (de Miranda et al., 2010). Le seul signe rapporté de l'infection par le KBV est une mortalité rapide, mais les cas de pertes majeures d'abeilles semblent rares (Dall, 1985). La transmission du KBV par *V. destructor* a été démontrée de façon expérimentale en introduisant des mites de colonies positives au virus dans les cellules de pupes provenant de colonies négatives au virus; le virus a été transmis à environ 70% des pupes exposées à des mites positives (Chen et al., 2004). Une efficacité de transmission similaire a été rapportée pour le virus ABPV chez les adultes et les pupes, et cette efficacité diminue avec les transferts successifs, ce qui suggère qu'il n'y a pas de réplication du virus dans l'acarien (de Miranda et al., 2010).

Dans un modèle de simulation théorique, il a été suggéré que l'APV transmis par *V. destructor* ne pouvait causer l'effondrement d'une colonie que si une large population d'acariens (>10,000) était déjà présente lors de l'infection par l'APV (Martin, 2001). Une étude expérimentale menée en Nouvelle-Zélande tire des conclusions similaires pour le KBV : un grand nombre d'acariens (>9,000) est nécessaire pour maintenir l'infection dans la colonie étant donné la mortalité rapide des abeilles infectées (Todd et al., 2004).

Facteurs de risque

Étant donné l'effet des injections expérimentales de ces virus dans l'hémolymphe d'abeille, une association avec *V. destructor*, qui produit des bris dans la cuticule des adultes et des nymphes, est attendue. La présence de l'ABPV a été confirmée par ELISA dans les acariens femelles collectées de colonies naturellement infestées aux Pays-Bas et en Allemagne (Allen et al., 1986), et le virus a été soupçonné d'être impliqué dans les pertes de colonies infestées par *V. destructor*, principalement en Europe (Békési et al., 1999).

Méthode diagnostique

Étant donné la localisation des virus, il est important d'inclure la tête lors de la recherche des virus AKI sur abeille adulte.

Plusieurs méthodes de diagnostic sérologiques ont été décrites, incluant l'ELISA, mais elles sont moins sensibles que la PCR (Anderson, 1984). Bien que ces techniques soient maintenant moins utilisées pour la détection des virus d'abeille, elles l'ont beaucoup été avant l'avènement de la PCR; il est donc important d'en connaître les limites, par exemple lorsqu'on interprète des données de prévalence détectée par immunologie.

Plusieurs protocoles de RT-PCR sont disponibles pour la détection de gènes structurels et fonctionnels de l'ABPV, du KBV et de l'IAPV (Tentcheva et al., 2004; Cox-Foster et al., 2007; Maori et al., 2007). Les protocoles de RT-PCR offrent un moyen de détecter les virus et, lorsqu'ils sont associés à un séquençage, peuvent être utilisés pour confirmer des diagnostics et obtenir des informations phylogénétiques sur les virus étudiés (de Miranda et al., 2010).

Les toutes premières amorces créées pour la détection de virus d'abeilles ont été conçues en 1995 (Stoltz et al., 1995). Depuis le séquençage des génomes ABPV, KBV et IAPV (Govan et al., 2000; Bakonyi et al., 2000), le potentiel d'amplification croisée entre ces amorces et les virus apparentés est devenu évident (de Miranda et al., 2010). Bien que souvent utilisées par le passé, ces amorces KBV d'origine doivent être évitées.

La RT-qPCR offre les avantages supplémentaires de quantifier les virus et de ne pas nécessiter la visualisation des produits de PCR (i.e. électrophorèse). Bien qu'aucune comparaison de sensibilité entre les protocoles de détection sérologique et moléculaire ne soit disponible pour ABPV, KBV et IAPV, de telles comparaisons avec d'autres virus à ARN à sens positif monocaténaux suggèrent que la RT-qPCR est 1000 fois plus sensible que ELISA et 100 fois plus sensible que la RT-PCR classique non imbriquée (Ratti et al., 2004).

Prévalence

Tel que présenté à la Figure 6, les trois virus ont une distribution mondiale (de Miranda et al., 2010).

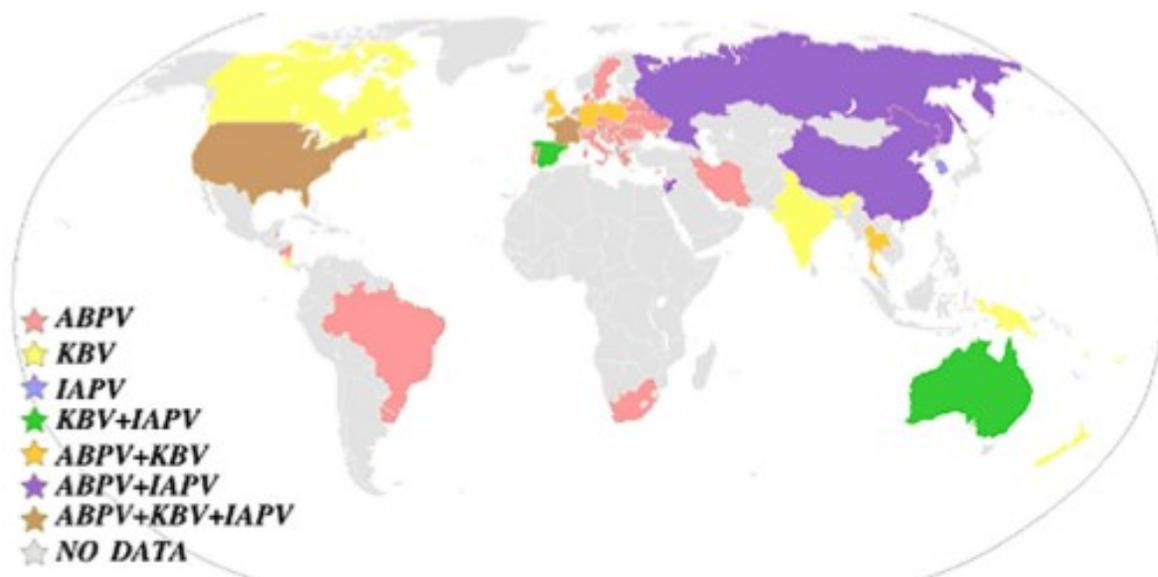


Figure 6. Distribution mondiale de l'ABPV, KBV et IAPV par pays, avec permission (de Miranda et al., 2010)

Malgré cette large aire de répartition, les virus AKI n'ont généralement pas une prévalence très élevée à l'intérieur de chaque région. Dans une enquête nationale menée en Allemagne de 2004 à 2007, la prévalence du virus ABPV établie par RT-PCR, selon les années, variait entre 6% (n=276) et 12% (n=350) des colonies choisies au hasard (Genersch et al., 2010). La prévalence du KBV variait entre 0% (n=400) et 1% (n=196) des colonies. L'IAPV n'a été détecté dans aucun de ses échantillons. En Israël, l'examen et l'échantillonnage de 113 ruches à l'hiver 2009 ont montré via RT-PCR que le virus de la paralysie aiguë israélienne (IAPV) était présent dans 35% des colonies (n=71), et que l'ABPV était plus rare, présent dans moins de 1% des colonies (Soroker et al., 2010). Cependant, aucun signe clinique d'infection virale n'a été détecté dans la plupart des cas. Au Danemark, l'ABPV a été détecté par RT-PCR dans 11 ruchers sur 96 (11%), et le KBV dans seulement 1 rucher (1%) (Nielsen et al., 2008). En France, lorsque cherchés sur les abeilles adultes par RT-PCR, les virus AKI ont une prévalence plus élevée de ruchers infestés, avec 58% des ruchers (n=36) positifs à l'ABPV, et 17% des mêmes ruchers positifs au KBV (Tentcheva et al., 2004). Dans cette même étude, l'ABPV et le KBV ont été trouvés dans les acariens *V. destructor* de respectivement 36% et 5% des ruchers.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

La paralysie des abeilles ne se traduit pas par un syndrome généralisé au niveau de la colonie, même dans les cas où le virus est connu pour avoir causé la mort de la colonie (Békési et al., 1999). Étant donné la progression rapide de la paralysie à la mort, il est possible que le nombre d'adultes paralytiques vivants dans une colonie affectée ne soit pas suffisant pour que l'on observe de la paralysie au niveau de la colonie; c'est peut-être pour cette raison que les symptômes de paralysie massive au niveau des colonies sont généralement associés au virus de la paralysie chronique des abeilles, qui se développe plus lentement (de Miranda et al., 2010).

La mortalité d'abeilles adultes causée par les virus AKI expliquerait l'association rapportée entre l'IAPV et les mortalités massives d'abeilles causant l'effondrement soudain de la colonie sans problème au couvain, un syndrome appelé CCD (*Colony Collapse Disorder*). L'IAPV a été fortement associé ($p < 0.0001$) avec le phénomène de CCD vécu aux États-Unis (Cox-Foster et al., 2007). Une étude subséquente a toutefois échoué à isoler le virus dans les colonies effondrées (Hunter et al., 2010). En Europe centrale, avant que le phénomène de CCD soit nommé, l'ABPV était le virus le plus souvent retrouvé (en combinaison avec l'omniprésent DWV) dans les colonies souffrant de faiblesse, de dépeuplement ou d'effondrement soudain, présent dans 37% des cas (Berényi et al., 2006).

Siede et al. (2008) ont utilisé la RT-qPCR pour démontrer une corrélation positive de la charge de ABPV avec les mortalités hivernales en Allemagne. En outre, ce travail a pris en compte l'erreur expérimentale qui s'accumule lors de la quantification par PCR en temps réel. L'infection par ABPV était plus souvent observée dans les colonies qui n'ont pas survécu à l'hiver ($p < 0.001$), et les colonies décédées durant l'hiver avaient des quantités plus élevées d'ABPV à l'automne que les colonies survivantes ($p < 0.05$).

Étant donné la parenté étroite des virus AKI, il est possible qu'il existe une interchangeabilité de leurs rôles dans les effondrements de type CCD ou dans la mortalité hivernale.

Impact sur l'entreprise

Il n'y a pas de données disponibles dans la littérature sur l'impact économique pour ce virus.

Prévention et contrôle

Étant donné la mort rapide des abeilles infectées, un contrôle des populations de *V. destructor* permettrait probablement de réduire l'impact du virus en empêchant son maintien dans la colonie (Todd et al., 2004).

Une méthode de traitement basée sur l'insertion de petits ARN antisens afin de prévenir l'expression des gènes du virus IAPV a fait ses preuves en conditions expérimentale en Israël (Maori et al., 2009) ainsi que dans une application à large échelle aux États-Unis (Hunter et al., 2010).

2.4.3. Virus des cellules noires de reine (BQCV)

Agent et dynamique d'infection

Tout comme les virus AKI, le BQCV est un virus à ARN de la famille des *Dicistroviridae*. Le virus de la cellule de la reine noire (BQCV) a été isolé pour la première fois au Royaume-Uni chez des larves de reines mortes collectées sur le terrain et des prépuces ont été trouvées partiellement décomposées dans des cellules sombres, presque noires par endroits, d'où le nom du virus (Bailey et Woods, 1977); aux premiers stades de l'infection, les larves malades ont une apparence jaune pâle et une peau dure qui pourrait être confondue avec l'infection par le virus du couvain saciforme (SBV). Cependant, pour le BQCV, aucun symptôme d'infection visible chez les abeilles n'a été clairement démontré (Ribière et al., 2008).

Bien que le BQCV soit habituellement détecté dans des larves d'apparence saine, le BQCV a été détecté par RT-PCR pour la première fois dans des larves de faux-bourçons abîmées, et même parfois mortes, en Allemagne. Les auteurs de ce rapport de cas ont considéré que les dommages étaient symptomatiques de l'infection par le virus BQCV de la

couvée de faux-bourçons (Siede et al., 2008), toutefois, aucune comparaison avec les larves saines et analyse statistique n'ont été réalisées pour attribuer les signes à la présence du virus.

La forte prévalence rapportée (voir plus bas) et l'absence de signes cliniques observés pour le BQCV suggèrent que l'infection asymptomatique persiste dans les populations d'abeilles, et que les éclosions pourraient être le résultat de stress externe menant à l'activation de la réplication virale (Dainat et al., 2012b).

La transmission verticale du virus a été démontrée dans une étude très récente ayant détecté le BQCV par RT-PCR chez 10 reines et leurs descendants. Le virus a été détecté chez toutes les reines (10/10), dans tous les groupes de 50 œufs de ces reines (10/10), chez 49% des 100 larves individuelles et chez 8% des 100 adultes, tous descendants de ces reines (Chen et al., 2006). Dans cette même étude, le BQCV a été détecté dans les intestins et les ovaires des reines, mais pas dans l'hémolymphe, la spermathèque, la tête ou le corps éviscéré, suggérant une transmission verticale transovarienne, mais non vénérienne.

Bien que le BQCV n'ait pas été détecté chez *V. destructor* par RT-PCR (Tentcheva et al., 2004), la sensibilité de la PCR en temps réel a permis de confirmer la présence du virus chez le parasite (Chantawannakul et al., 2006). Il est possible que les acariens puissent acquérir le virus d'abeilles adultes infectées et le transmettre au couvain. Cependant, l'incapacité du BQCV à se répliquer après une injection chez les abeilles adultes constituerait un facteur limitant de la propagation du virus dans la population d'abeilles (Ribière et al., 2008).

Une étude de prévalence en France a démontré que la présence du BQCV variait au cours de la saison : le virus est plus présent au début de l'été qu'au printemps ($p < 0.001$), et plus présent en été qu'en automne ($p < 0.001$) (Tentcheva et al., 2004).

Facteurs de risque

Tel que décrit plus haut, des facteurs de stress externe pourraient augmenter le risque d'apparition de signes cliniques (Dainat et al., 2012b).

Ces facteurs ont été peu étudiés, toutefois une association avec le fungus *Nosema apis* été démontrée expérimentalement (Bailey et al., 1983). Le virus était dépendant de *N. apis*

pour l'infection des abeilles adultes par ingestion; lorsque seulement le virus était ingéré, aucune particule virale n'était retrouvée par microscopie électronique, alors que le virus était présent chez les abeilles ayant ingéré les deux pathogènes. Celles-ci présentaient jusqu'à 10 mg de virus pour les groupes de 10 à 30 abeilles mortes, et très peu de virus dans les groupes d'abeilles survivantes. Les abeilles adultes des colonies utilisées pour élever des reines sont souvent des abeilles plus âgées et plus susceptibles d'être gravement infectées par *N. apis*, ce qui porte à croire que les larves de reines sont probablement infectées ouvertement par l'ingestion d'aliments dans lesquels de grandes quantités de virus ont été sécrétées par des abeilles adultes infectées (Ribière et al., 2008).

Méthode diagnostique

Comme pour les virus précédents, le BQCV peut être détecté par des méthodes sérologiques ou moléculaires. Dans une étude comparative, la limite de détection (déterminée comme la dilution la plus faible ayant présenté une amplification spécifique pour les échantillons à fort champ positif sélectionnés comme modèles) était de 10^{-9} pour la PCR quantitative (qRT-PCR), alors que la limite de détection conventionnelle par RT-PCR était de 10^{-5} (Kukielka et al., 2008). Pour la qRT-PCR, le coefficient de variation (CV) au cours d'une analyse (reproductibilité intra-analyse) variait de 1% à 3%, le CV d'une analyse à l'autre (reproductibilité inter-analyse) était entre 0,6% et 4%.

Prévalence

Tout comme le DWV, le BQCV est un virus très fréquent. La maladie est plus souvent détectée chez les producteurs de gelée royale, car ceux-ci observent plus fréquemment les cellules royales. Dans une étude de prévalence menée en Israël, il s'agit du virus le plus fréquemment détecté par RT-PCR, présent de 62% des 71 colonies testées (Soroker et al., 2010). En France, le BQCV est rencontré dans 86% des ruchers (n=36) et dans 58% des colonies (n=360) en été lorsque recherché par PCR sur les abeilles adultes (Tentcheva et al., 2004). Il semble toutefois que certaines régions ne soient que peu affectées par ce virus; au Danemark, le BQCV a été détecté par RT-PCR dans seulement 1 rucher sur 96 (Nielsen et al., 2008). La répartition du virus semble donc hétérogène.

Impact sur la santé de la colonie et mortalité hivernale

Il existe peu d'informations permettant d'estimer l'impact du BQCV sur les colonies. Dans un modèle de régression linéaire, le BQCV ne s'est pas avéré un marqueur prédictif des pertes hivernales ($p = 0.467$) (Dainat et al., 2012b).

Impact sur l'entreprise

Bien que généralement associé à des infections asymptomatiques, il est possible que le BQCV ait un impact mesurable sur les entreprises d'élevage de reine. En Australie, ce virus a été considéré comme la cause de décès la plus fréquente chez les larves de reines, car il a été détecté en sérologie dans 19% des échantillons malades et à de faibles concentrations chez toutes les reines adultes apparemment en bonne santé (Anderson, 1993).

Prévention et contrôle

En l'absence de traitement spécifique, la protection contre *Nosema spp.* et *V. destructor* demeure la meilleure prévention.

2.4.4. Autres virus

Les autres virus à ARN connus de l'abeille incluent le virus du couvain sacciforme (SBV), de la paralysie chronique de l'abeille (CBPV), de la paralysie lente (SBPV), des ailes nuageuses (CWV), de l'abeille X (BVX), de l'abeille Y (BVY), de l'abeille de l'Arkansas (ABV), de l'abeille de Berkeley (BBPV), Macula-like, filamenteux (AmFV), et Apis iridescent (AIV). Le AmFV et le AIV sont les deux virus à ADN connu affectant les abeilles. Ces virus sont généralement beaucoup plus rares et, à l'exception du SBV et CBPV, moins étudiés que les virus précédents (Tentcheva et al., 2004; Genersch et al., 2010; Soroker et al., 2010). Leurs impacts sur la santé des colonies sont peu connus.

Le SBV est un virus à ARN du genre *Iflavirus*, transmis oralement au couvain via la gelée servie aux larves ou verticalement par la reine, ou encore possiblement par *V. destructor*; les larves infectées se remplissent de liquide ecdysial et prennent l'apparence de sacs de liquide à l'intérieur des cellules (Ribière et al., 2008).

Le CBPV est un virus à ARN qui n'a pas encore été classé. Lors d'exposition à un environnement contaminé par les fèces d'abeilles infectées, les abeilles naïves peuvent ingérer le virus, ou encore être contaminées par une lésion de la cuticule (Ribiere et al., 2007). La paralysie chronique présente des signes cliniques bien définis avec deux ensembles distincts de symptômes (syndromes) (Ribière et al., 2008). Dans le syndrome de type 1, on observe des abeilles tremblantes, incapables de voler, rampant sur le sol. Il arrive parfois que des milliers d'individus soient touchés. Les colonies gravement touchées s'effondrent soudainement, en particulier au plus fort de l'été. Dans le second syndrome (type 2), les abeilles touchées deviennent presque sans poils, paraissant sombres ou presque noires. Les deux syndromes peuvent se produire dans la même colonie.

3. Problèmes d'origine environnementale

Selon le temps de l'année et le type de nourriture disponible, les abeilles tendent à explorer leur environnement dans un rayon de 2 à 5 km de leur ruche, mais peuvent se rendre jusqu'à 10 km à la recherche d'une ressource attirante (Bruneau, 2014; Couvillon et al., 2015). Leur alimentation dépend donc directement de la disponibilité et de la qualité des ressources dans ce rayon. Elles sont donc particulièrement exposées aux facteurs environnementaux tels que la météo ou les pesticides lors du butinage. De plus, les abeilles peuvent être déplacées d'un environnement à l'autre pour la pollinisation commerciale (Simone-Finstrom et al., 2016; Alger et al., 2018), et être soumises à différentes pratiques de régie selon l'apiculteur.

La présente section explore donc l'impact de l'alimentation, des conditions météorologiques et climatiques, des pesticides, de la transhumance et des facteurs liés à l'entreprise sur la santé des colonies et la mortalité hivernale des abeilles.

3.1. Météorologie et climat

La vie des colonies d'abeilles est dépendante de facteurs météorologiques tels que l'ensoleillement, la pluie, la température, le vent et l'humidité. Les abeilles adaptent leur comportement aux conditions météorologiques : elles ne sortent pas quand il pleut et, par temps extrêmement chaud, elles butinent et vont chercher de l'eau pour garder la colonie au

frais (Le Conte et Navajas, 2008). Cette réalité peut avoir des conséquences directes sur la santé des abeilles, en affectant leur capacité à se nourrir, ou indirectes, en favorisant l'apparition de maladies (décrit dans les facteurs de risque pour chaque pathogène).

L'humidité, la température, la vitesse du vent et l'intensité de la lumière ont toutes été hautement et significativement corrélées (de +0.701 à +0.978) avec l'activité de vol (Szabo, 1980). Il existe aussi une relation directe significative entre l'activité de vol et le gain de poids des colonies 30 minutes plus tard, et l'activité journalière moyenne de vol d'une colonie est également très significativement corrélée au gain de poids total de la colonie à la fin de la saison (+ 0.766 à + 0.879) (Szabo, 1980). Ainsi, on peut conclure que plus les abeilles sortent butiner, plus elles accumulent des réserves alimentaires.

Dans une revue de littérature, Le Conte et Navajas (2008) se sont attardés aux impacts potentiels des changements climatiques sur l'abeille domestique. Puisqu'on la trouve déjà presque partout dans le monde et dans des climats très divers, *Apis mellifera* est une espèce qui a montré un grand potentiel d'adaptation. Suite à une analyse de la variabilité des caractéristiques biologiques de l'abeille sur le plan de la température et de l'environnement, les auteurs concluent que l'espèce possède une plasticité et une variabilité génétique telles qu'elle pourrait donner lieu à la sélection de cycles de développement adaptés aux nouvelles conditions environnementales. Toutefois, la diversité des écotypes disponibles et des abeilles qui y sont associées risque d'être réduite. De plus, les auteurs soulignent que les changements climatiques sont voués à modifier les aires de répartition des agents pathogènes de l'abeille, et que des populations naïves devront s'adapter à de nouvelles maladies, en plus de potentiellement aggraver les problèmes sanitaires déjà présents dans certaines régions du monde.

Pour l'hiver 2017-2018, les apiculteurs canadiens ont rapporté les conditions météorologiques comme première cause de mortalité hivernale (ACPA, 2018). Switanek et al. (2017) ont démontré que les conditions climatiques et météorologiques à long terme ont un impact sur la mortalité hivernale subséquente des abeilles. Ils ont construit un modèle statistique capable de prédire la mortalité par colonie en utilisant les données de température et de précipitations (résolution de 5 x 5 km) comme prédicteurs, à l'aide des données de mortalité (% de colonies mortes) des apiculteurs autrichiens de 2009 à 2014. Ce modèle a

démontré que les conditions météorologiques plus chaudes et plus sèches de l'année précédente étaient accompagnées d'une mortalité accrue en hiver. Il réduit l'erreur absolue moyenne entre les mortalités de colonies prédites et observées de 9% et est statistiquement significatif au niveau de confiance de 99.9%. Les auteurs mentionnent toutefois une potentielle confusion avec les pesticides, puisque les régions chaudes et sèches d'Autriche sont aussi des régions de production agricole plus intensive, et donc l'usage de pesticides y est possiblement plus élevé.

3.2. Qualité et quantité de nourriture

3.2.1. Pollen

Le pollen est l'unique source de protéines et de lipides chez les abeilles. Sa composition en nutriments varie selon l'espèce de plante. La diversité du pollen disponible est primordiale, afin de fournir une diète complète et équilibrée en acides aminés. De rares diètes monopollen sont considérées équilibrées, telles que celles à base de mélilot ou de moutarde (Brodschneider et Crailsheim, 2010). On décrit cependant plusieurs autres diètes monopollen, tels que le tournesol ou le sésame, comme délétères comparées à une diète mixte (Schmidt et al., 1987). La qualité et la diversité du pollen semblent également favoriser une meilleure immunité et longévité, en particulier en présence du pathogène *Nosema ceranae* (Di Pasquale et al., 2013). Ainsi, les monocultures représentent un risque pour la santé des abeilles. Une étude des Pays-Bas a identifié la présence de pollen de *Brassica napus* (colza oléagineux) ou *Sinapis arvensis* (moutarde sauvage) dans le pain d'abeille en début août comme facteur de risque pour la mortalité au cours de l'hiver suivant ($p=0.0179$) (van der Zee, 2010).

Bien que l'importance des habitats semi-naturels (prairies, boisés, jachères, haies, bandes préservées en marge des champs) comme source de nourriture ait été soulevée en ce qui a trait aux pollinisateurs sauvages, il semblerait que l'abeille domestique préfère les cultures à fleuraison massive aux habitats semi-naturels (Rollin et al., 2013). En effet, l'abeille utilise peu les bandes préservées en marge des champs lorsque d'autres ressources florales sont disponibles. Cette préférence serait expliquée par le caractère social de l'abeille mellifère, qui requiert d'importantes quantités de nourriture et permet une communication élaborée entre

les butineuses (Rollin et al., 2013). L'abeille affectionne également les habitats boisés semi-naturels (Rollin et al., 2013); outre les cultures à fleuraison massive, les arbres seraient la seconde plus grande source de pollen de l'abeille domestique. Selon une étude menée en France, la contribution des différents habitats à la récolte pollinique serait de 62% pour les cultures, de 32% pour les boisés, de 4% pour les prairies et de 1% pour les jardins (Odoux et al., 2012).

3.2.2. Eau

L'abeille européenne a le potentiel de s'adapter à la chaleur extrême, à la condition d'avoir un approvisionnement en eau, nécessaire en grande quantité pour élever les larves et réguler la température du couvain. Il existe des abeilles natives du désert, vivant dans les oasis. Cependant, dans un environnement trop aride, les fleurs sont incapables de fournir suffisamment d'eau aux abeilles et celles-ci meurent (Le Conte et Navajas, 2008). Il est donc raisonnable de supposer qu'une sécheresse prolongée serait néfaste pour la survie des abeilles.

3.3. Empoisonnement aux pesticides

Il existe une multitude d'agents potentiellement toxiques pour les abeilles. Parmi ceux-ci, on retrouve les insecticides, herbicides, acaricides, fongicides, molluscicides et bactéricides (Johnson et al., 2010). Parmi les insecticides, on retrouve les organochlorés, organophosphorés (i.e. coumaphos), carbamates, pyréthrinés (i.e. perméthrine), avermectines (i.e. ivermectine), formamidines (i.e. amitraz), phenylpyrazols (i.e. fipronil) et les néonicotinoïdes (i.e. imidaclopride) qui ciblent le système nerveux. Les amidinohydrazones et pyrazoles bloquent la respiration cellulaire. Les benzoylurés et acylurés (i.e. lufenuron) agissent sur la croissance des insectes. Les acaricides sont des molécules couramment utilisées en apiculture, principalement pour le contrôle de *V. destructor*, et représentent une importante source d'intoxication potentielle pour les abeilles (Johnson et al., 2010).

Les intoxications peuvent être aiguës ou chroniques. En 2016, 8 des 9 cas d'empoisonnement aigus aux pesticides confirmés au Québec étaient associés aux

néonicotinoïdes, qui sont couramment utilisés en production agricole. Tous se sont produits au mois de mai, sauf un cas en juin (Ferland, 2016).

Wu et al. (2011) ont démontré les effets sublétaux, notamment le retard du développement larvaire et de l'émergence de l'adulte ou sa longévité réduite, de l'exposition aux résidus de multiples pesticides d'un rayon de couvain contaminé sur les abeilles ouvrières. L'exposition chronique de bourdons à deux pesticides (néonicotinoïde et pyréthroïde) à des concentrations qui pourraient se rapprocher de l'exposition au champ altère le comportement naturel de recherche de nourriture et augmente la mortalité des ouvrières, entraînant une réduction significative du développement du couvain et la perte d'ouvrières (Gill et al., 2012).

L'interaction des pesticides entre eux ou avec d'autres molécules peut avoir un effet synergique. Une étude a démontré que l'utilisation d'oxytétracycline dans les ruches pour le contrôle des loques américaine et européenne potentialise l'effet toxique sur les abeilles des acaricides coumaphos et tau-fluvalinate, utilisés pour le contrôle de la varroase (Hawthorne et Dively, 2011). Selon la région choisie, il est possible que ces deux produits soient appliqués simultanément, conduisant à une augmentation des effets secondaires des médicaments. Des facteurs de stress supplémentaire peuvent modifier l'effet des pesticides. Il a été démontré expérimentalement que les abeilles mellifères adultes élevées à une température même légèrement sous-optimale sont plus susceptibles d'être intoxiquées par les pesticides et présentent une longévité réduite (Medrzycki et al., 2010).

Pour la surveillance des pesticides, la recherche s'effectue sur des échantillons environnementaux : les plantes cultivées, le miel, la cire et le pollen en sont des exemples. Toutefois, les pesticides ne sont pas également distribués entre les différentes matrices de la ruche. Le coumaphos, un pesticide couramment utilisé dans la lutte contre la varroase, se retrouve en bien plus grande concentration dans la cire que dans le miel, bien qu'il persiste longtemps dans les deux matrices (Tremolada et al., 2004). En 2017, 3 néonicotinoïdes ont été retrouvés avec succès dans des ruches sentinelles postées près d'un champ de soya traité, mais seulement sur les abeilles adultes et dans la cire. Aucun pesticide ne fut détecté dans le miel et le pollen (Silvina et al., 2017). Un modèle construit dans une étude en 2010 concluait également que la cire, suivi des abeilles adultes, contient la plus haute concentration de pesticides (fluvalinate). La basse concentration prédite dans le miel n'a pu être confirmée par

les échantillons provenant des ruches puisqu'aucun pesticide n'a été détecté (Tremolada et al., 2011).

Bien que des effets sur la physiologie de l'abeille ont été décrits, le lien de causalité directe entre l'exposition chronique aux pesticides et l'effondrement des colonies demeure à prouver (Bernal et al., 2010). Une étude des Pays-Bas a identifié la présence de l'un des deux néonicotinoïdes cyano-substitués acétamipride ou thiaclopride au cours des 2 premières semaines d'août dans au moins une des matrices (miel, abeilles ou pain d'abeille) comme facteur de risque pour la mortalité au cours de l'hiver suivant ($p=0.0025$) (van der Zee, 2010).

3.4. Transhumance

L'apiculture migratoire peut avoir divers impacts sur la santé des abeilles, que ce soit par le stress oxydatif, la pénurie alimentaire ou les agents pathogènes (Simone-Finstrom et al., 2016; Alger et al., 2018). Un projet de recherche mené en 2004 chez un apiculteur de la Montérégie n'a pas pu établir de lien entre le transport des ruches pour la pollinisation et la taille de la population de varroa présente dans celles-ci (Dubreuil et Giovenazzo, 2004). Le même projet a toutefois noté une diminution significative de la quantité totale de miel produite au cours de l'été lorsque les ruches étaient transportées. Ceci peut être attribué aux faibles récoltes où les abeilles étaient transportées, car les cultures pollinisées dans cette étude (i.e. bleuetières) sont des plantes peu mellifères.

3.5. Facteurs liés à l'entreprise

La taille des entreprises et des ruchers sont des facteurs qui ont été significativement liés aux pertes hivernales en utilisant les données de 17 pays en Europe (Chauzat et al., 2016). En règle générale, plus les entreprises ou ruchers sont de petites tailles, plus la mortalité est élevée ($p<0.01$) : les ruchers de ≤ 5 colonies avaient une mortalité de 20% contre une mortalité de 7% dans les ruchers de >50 colonies, et les entreprises de ≤ 50 colonies avaient une mortalité de 16% contre une mortalité de 8% pour les entreprises de >300 colonies. La taille de rucher était également fortement liée à l'âge de l'apiculteur. Les auteurs expliquent qu'en Europe, la plupart des apiculteurs hobbyistes sont relativement âgés (à l'exception du nouveau

phénomène d'apiculture urbaine) et gardent moins de colonies dans leur cour, alors que de jeunes apiculteurs démarrent de larges entreprises. Ces différences socio-démographiques influencent probablement les pratiques de régie, qui, à leur tour, ont un impact sur la mortalité des colonies.

Hypothèse et objectifs

Le présent projet vise à dresser un portrait du statut de santé des colonies d'abeilles dans le sud-Ouest du Québec et établir l'impact des maladies et parasites de l'abeille sur la mortalité hivernale, afin de répondre aux besoins des vétérinaires du Québec en termes de médecine préventive.

Les causes de morbidité et/ou mortalité suivantes ont été retenues : *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Aethina tumida*, *Apocephalus borealis*, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Nosema spp.*, SBV, DWV, BQCV, ABPV, CBPV, IAPV, KBV et pesticides (Annexe 1). L'importance de la varroase (*V. destructor*) et des loques (*P. larvae* et *M. plutonius*) a été bien démontrée. Les autres agents ont été retenus pour leur impact potentiel sur la santé des abeilles, s'ils étaient trouvés dans des climats similaires aux nôtres et que leur diagnostic était applicable dans notre contexte (Annexe I).

Hypothèses :

- La population d'apiculteurs du sud-ouest du Québec utilise des pratiques de régie variées.
- Plusieurs agents pathogènes sont présents dans les populations d'abeilles du sud-ouest du Québec.
- Les perceptions des apiculteurs des maladies présentes sont différentes du statut sanitaire de leurs ruchers tel que déterminé en laboratoire.
- La présence de certains signes cliniques pourrait être associée à la présence de certains agents pathogènes au niveau de la colonie.
- Certains agents pathogènes ont un impact sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles domestiques, *Apis mellifera*, au sud-ouest du Québec.

Objectifs :

- Décrire la population d'apiculteurs du sud-ouest du Québec et leurs pratiques de régie.

- Estimer la prévalence des colonies et/ou ruchers positifs aux principaux agents pathogènes, ravageurs et toxiques rencontrés chez les abeilles du sud-ouest du Québec.
- Évaluer l'accord entre la perception des apiculteurs des maladies présentes dans leur entreprise et le statut sanitaire des ruches tel que déterminé en laboratoire.
- Évaluer l'association entre les signes cliniques qui sont observés dans les colonies et la présence des agents pathogènes.
- Évaluer l'impact des agents pathogènes sélectionnés sur la mortalité hivernale, principal marqueur de la santé de la colonie.

Article 1. Beekeeping management practices in southwestern Quebec²

Short communication

Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Martine Bernier, Julie Arsenault

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Quebec, Canada (Claing, Dubreuil, Arsenault); Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, Quebec City, Quebec, Canada (Claing, Ferland); Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Deschambault, Quebec, Canada (Bernier)

Addressed all correspondence to Gabrielle Claing; e-mail: gabrielle.claing@umontreal.com

Author contributions

Conceptualization : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Data curation : Gabrielle Claing

Formal analysis : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Funding acquisition : Gabrielle Claing, Julie Ferland, Julie Arsenault

Investigation : Gabrielle Claing, Martine Bernier

Methodology : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Martine Bernier, Julie Arsenault

Project administration : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Supervision : Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Validation : Julie Arsenault

Writing – original draft : Gabrielle Claing

Writing – review & editing : Pascal Dubreuil, Martine Bernier, Julie Ferland, Julie Arsenault

² In preperation for submission to *The Canadian Journal of Veterinary Research*.

Abstract

The number of honey bee colonies in Canada is expanding, yet little information is available on current beekeeping practices to make recommendations for a suitable control of diseases. A survey was conducted in southwestern Quebec to describe managing practices used by 15 beekeepers owning 1,824 colonies in that area. Data were obtained by telephone interviews. Potentially toxic acaricides and chemical treatments associated with antimicrobial resistance were generally avoided by beekeepers, preventive or destructive methods when infectious diseases are suspected were used, but laboratory diagnosis were rarely used. This study highlights the wide variety of operation sizes, activities, and disease management strategies among beekeepers in southwestern Quebec.

Keywords: beekeeping; honey bees; management practices; integrated management;

Introduction

Beekeeping is in expansion in Canada, with increasing numbers of honeybee colonies in the last ten years, particularly in Quebec (1). As honey bees can be afflicted by various bacteria, fungi, viruses and parasites, disease management is a vital part of any beekeeping operation. Many strategies are used to control bee pathogens, including the use of antibiotics and pesticides, which should be judicious to avoid deleterious effects of treatment on the microbiota and lifetime expectancy of honeybees (2, 3), to preserve drug effectiveness (4) and to avoid drug residues in bee products (5, 6). This reality is acknowledged in Quebec, where since 1998, antimicrobials—such as the oxytetracycline, tylosin and fumagillin used in apiaries—require a veterinary prescription (7). Since December 2018, a similar legislation is also applied for all of Canada (8). This new regulation limits access to different medicines for provinces where those drugs were available without prescription. New approaches will be necessary in the control of bee health status; disease management includes chemical treatments, but emphasis should be put on effective and sustainable management strategies (9), such as preventive screening, disinfection and replacement of material, genetic breeding, feeding and mechanical reduction of pathogen loads. Given the difference in legislative situation, the use of integrated pest management practices and natural organic acids is already well-established in Quebec (1). The aim of that study was to document the actual situation regarding disease management practices in beekeeping productions of southwestern Quebec, Canada.

Material and methods

A cross-sectional study was conducted as an extension of the active monitoring program for the small hive beetle (SHB) performed by the ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) during the year 2017. The study area included 126 provincially registered apiaries, belonging to 38 beekeepers, located within 15 km of the boundaries with the United States or Ontario province. A total of 42 apiaries in the adjacent

regions of Montérégie-Ouest and Vaudreuil-Soulanges, and 34 apiaries in Pontiac were randomly selected for mandatory inspection. All beekeepers inspected were invited to participate in our project on a voluntary basis. Among the 26 beekeepers owning the 76 randomly selected apiaries (for SHB inspections), 15 accepted to participate in this project (58% participation rate). The geospatial distribution of the 31 participating apiaries is represented on Figure 1.

Two questionnaires were developed and pre-tested for clarity and time of completion (both are available in complementary file). The first survey was conducted by telephone interviews between November 21 and December 15, 2017, among the participating beekeepers. All questions dealt with the management strategies applied for the entire 2017 beekeeping season (January 2017 to December 2017). For the purpose of our study, the 3 following definitions were used to describe beekeeping activities: 1) *professional beekeepers* live only of beekeeping, 2) *semi-professional beekeepers* derive a part of their income from their beekeeping activities, and 3) *hobbyists* do not earn income from their hives. Also, “comb replacement” was defined as systematically eliminating combs after a predefined number of years in circulation. The second questionnaire, on wintering practices for the winter of 2017-2018, was conducted by telephone between May 15 and May 28, 2018. Statistical analyzes were performed in SAS version 9.4 using the PROC FREQ procedure.

Results

For all their operation, including outside study area, 6 beekeepers (40%) owned less than 5 colonies, 5 beekeepers (33%) owned between 6 and 80 colonies, and 4 beekeepers (27%) owned more than 80 colonies. The majority of these beekeepers (7/15; 47%) had 1 or 2 apiaries, while 4 beekeepers (27%) had between 3 and 6 apiaries, and 4 beekeepers (27%) had more than 6 apiaries. The number of colonies in an apiary ranged from 1 to 40, with a lower quartile of 5, a median of 14 and an upper quartile of 28. For the 2017 season, 3 of these 15 beekeepers (20%) produced less than 100 kg of honey, 5 beekeepers (33%) produced between

100-1,000 kg, 3 beekeepers (20%) produced between 1,000-3,999 kg, and 4 beekeepers (27%) produced $\geq 4,000$ kg in 2017.

Management practices reported by beekeepers are summarized in Tables 1 to 3. The exact number of colonies concerned was only asked for chemical control of diseases. For the other questions, those tables depict the number of colonies owned in the study area by beekeepers having reported the use of each specific practice; they do not necessarily represent the number of colonies in which the practice was applied. For example, the number of colonies reported for diagnosis tests are the number of colonies in the study area belonging to a beekeeper having done the test at least once in the season, not the number of colonies tested.

Table 2 presents management practices concerning varroasis. Of the 10 beekeepers applying at least one method of biomechanical control, the majority used only one method: mesh floors in hives ($n = 6$) or the systematic destruction of drone cells from the bottom of frames ($n = 2$). The other 2 beekeepers combined the use of a mesh floor with another biomechanical control method (colony division to reduce the infestation load or interruption of egg laying).

Table 3 presents management practices for foulbroods and noseimos. Among the 5 beekeepers believing they have had European foulbrood ($n = 4$) and/or American foulbrood ($n = 3$) in their hives in 2017, only one beekeeper had lab samples analyzed for foulbroods, which came back negative. Their diagnostic suspicion was based on visual inspection of the colonies. For the 13 beekeepers performing regular brood inspection, the period between 2 inspections averaged 2 weeks, ranging from 1 week to 1 month. All beekeepers who performed a regular inspection did so at least during the month of May. Almost all of these beekeepers (11/13) were inspecting throughout the summer. Of the two remaining beekeepers (owning 10 colonies in total), one carried out a regular brood inspection in the spring and then in the fall, and the second carried out only one complete brood inspection in the spring. All beekeepers except one (12/13) inspected the brood of all colonies, while one beekeeper inspected the brood nest only when the colony showed signs of weakness. Beekeepers inspected an average of 6 combs per brood box (between 2 and 10). For the beekeeper who reported performing a preventive disinfection, bleach was used over 5 years (20% of the material each year). The 4 beekeepers who suspected European foulbrood in their hives for

2017 all indicated applying the removal of positive brood combs and disinfection of contaminated equipment (i.e. hive tool). The destruction of positive brood combs was carried out by three beekeepers. One of these 3 beekeepers used this method for some combs, and disinfection for others, and withdrew positive brood boxes for 2 years. Another of these 3 beekeepers also applied the destruction of positive colonies, as well as the disinfection or destruction of boxes that contained positive brood. In case of European foulbrood, 2 beekeepers reported making queen changes. All 3 beekeepers who suspected American foulbrood in their hives for 2017 reported applying disinfection of contaminated equipment (i.e. hive tool) and destruction of positive brood combs. Disinfection of boxes containing positive brood and destruction of the positive colony were each applied by two beekeepers.

When the colonies presented severe problems that beekeepers suspected to be nose-mosis, one of them reported eliminating the colonies and disinfecting the equipment. When they considered the problem as mild, they changed the queen. Another beekeeper reported applying a preventive rotation of the combs (eliminating the older combs) to prevent nose-mosis. However, only one beekeeper used laboratory testing, which came back positive, to confirm the diagnosis.

Discussion

To our knowledge, this is the first study based on a random sample of colonies to describe beekeeping practices in Quebec. The 38 beekeepers located in the southwestern area owned approximately 11,000 colonies spread throughout the entire province, representing 17% of the total colonies (63,500) in Quebec in 2017. The 15 participating beekeepers owned 1,824 colonies located in the studied area (2% of total colonies in Quebec). Therefore, the results presented should be viewed as preliminary but could serve as guidelines to orient future research. With a participation rate of 58%, the final composition of the sample is likely to reflect the actual composition of beekeepers in the studied area. In 2018, while about 50 large companies owned 80% of Quebec's bee colonies, more than 1,000 beekeepers owned the remaining 20% of colonies (10). Beekeepers owning larger enterprises had a higher chance of

being selected for the study considering that apiaries were first selected; however, our results are likely representative of the management practices applied in apiaries of the study area. It should be noted that the number of colonies owned by a beekeeper vary greatly through the year, as colonies are commonly split, united or eliminated to deal with overcrowding or weakness; thus, the colony numbers presented in all tables are estimations.

Apiary inspections should be carried out within a time lapse allowing for problem resolutions in the hive (i.e. absence of queen, swarming, etc.) while remaining time-efficient for the beekeeper. In an effort to standardise biosecurity practices country-wide for both small- and large-scale operations, the Canadian Food Inspection Agency (CFIA) recommends inspecting and removing swarm cells every 9-10 days to prevent swarming (11). There were 11 (73%) beekeepers who visited their hives at the recommended frequency or more (regardless of whether they practiced the removal of swarm cell or not). An external inspection of the hive, while providing additional information, doesn't allow to detect internal problems of the colony, such as brood and queen problems. Almost all beekeepers (13/15) performed routine internal inspections of all their colonies in at least one supper per hive. However, more than 100 hives were poorly or not inspected during the season, which represents about 5% of the studied colonies.

Services between beekeepers can be a source of pathogen transmission. While there are many beekeeping practices known to increase risk of horizontal transmission within a hive (12), practices which could increase risk of transmission between beekeeping operations have not been demonstrated in the field to our knowledge. Yet, for pathogens that can survive away from their hosts (such as foulbrood agents, *Nosema spp.*, the small hive beetle and wax moths), equipment loan, extraction of hive products in shared facilities and transportation services are possible indirect transmission paths (11). In this study, most beekeepers offered no services, and only 2/15 offered extraction services or transportation services. This suggests that risky activities for disease transmission between beekeeping operations are not common amongst southwestern Quebec's beekeepers, and that physical proximity between apiaries may play a bigger role in disease transmission, if it should occur.

Adequate food supply is essential for the colony's survival throughout winter (11), whether it is the colony's own honey reserve or replacement feeding. All surveyed beekeepers

provided their colonies with supplementary feeding during autumn, fed individually for most of them. Diseases may be transmitted through feeders when bees defecate in the food, therefore it can be hypothesised that barrel feeding, which was used for a third of the hives, may enhance disease transmission between colonies (12).

It is important to note that all diseases reported by beekeepers are based on their own knowledge of clinical signs. Some diseases may be very difficult to detect or differentiate based solely on clinical signs. Therefore, diseases reported are likely different from the actual sanitary status of the hives. The emphasis should be made on the importance of sending samples to the laboratory to be correctly identified. However, beekeepers from southwestern Quebec apply preventive methods or destroy and disinfect combs or hives when infectious diseases are suspected.

Regarding *Varroa destructor*, the use of pesticides is necessary, but it should be reduced to a minimum in order to avoid attendant hazards to bees, honey and the environment; regular screening and biomechanical control measures help in delaying chemical treatment (13). The only beekeeper who did not carry out screening for *V. destructor* still declared suspecting varroasis in their apiaries in 2017. This beekeeper, owning 5 hives, rather felt it unnecessary to monitor *V. destructor* levels as they were the same each year and didn't influence their treatment strategy. Screen hive floors, SMR queens (selected for suppressed mite reproduction), removal of drone brood and brood trapping reduce the level of infestation within a colony (13, 14). However, these methods can be unavailable in our context, time-consuming or unpractical for medium or large-scale beekeepers. The use of a mesh floor was the only biomechanical control commonly used (8/15 beekeepers) in this study. Many synthetic pesticides (amitraz, tau-fluvalinate, coumaphos and flumethrin) and natural organic compounds (thymol, oxalic and formic acids) of varying efficiency are used for the control of *V. destructor*, and resistance has been reported for all synthetic pesticides (15). Moreover, coumaphos and tau-fluvalinate have been reported to be toxic for the bees (16), and beekeepers in the case of coumaphos (17), if wrongly applied. In the fall, the majority of beekeepers (10/15) avoided using synthetic pesticides, using only natural organic compounds, which do not lead to resistance. The others, who owned approximately the quarter of the colonies in this study, used amitraz. However, two beekeepers, owning between the two of

them half the colonies in this study, used amitraz in the spring. Many hives received a thymol treatment in fall, not followed with oxalic acid application, which is a questionable practice in terms of efficacy (18).

Brood should be examined regularly for detection of foulbrood signs, which was done for most beekeepers. Despite the common suspicion of foulbrood (data reported in Claing, 2019) , only one beekeeper sent a sample for laboratory analysis. There are two distinct foulbrood diseases: European foulbrood caused by *Melissococcus plutonius*, and American foulbrood caused by *Paenibacillus larvae*. Both diseases are difficult to differentiate clinically, and American foulbrood is a highly virulent disease posing an important threat to beekeeping operations if not managed properly. As laboratory diagnosis is provided free-of-charge to registered beekeepers in Quebec (and registration is mandatory), we conclude that there is some other obstacle than monetary to this lack of diagnosis. It could be due to beekeepers not knowing about this service, a lack of time, a lack of trust in authorities, a too long delay before knowing the results, or a fear of the consequences (e.g. hive destruction). According to the national standard, at least 20% (ideally a third) of brood combs should be replaced per year to reduce level of spores and acaricide residues in the hive (11). An important proportion of beekeepers (40%) did not follow those recommendations. The massive use of antibiotics, almost exclusively oxytetracycline, for prevention purposes over four decades has led to the occurrence of antimicrobial resistance in *P. larvae* in the United States (4). We found that the practice of preventing or treating foulbrood diseases by use of antibiotics is uncommon in southwestern Quebec.

Fumagilin B, is used to reduce spore loads in *Nosema spp.* infected bees (20). The impact of *N. ceranae* infection is however controversial and poorly understood, and the use of medicinal treatment is questionable for efficiency and human health risks (20, 21). This antibiotic was rarely used by the beekeepers in this project, and most beekeepers put no particular control measure in place for this disease.

Conclusion

This study clearly shows the wide variety of beekeeping operation sizes and activities, as well as the discrepancy and non-confirmation of the diseases found in the bees of Southwestern Quebec. Potentially toxic acaricides and chemical treatments associated with antimicrobial resistance were generally avoided by the participating beekeepers in the fall, even though two large operations used amitraz in the spring. The free laboratory support was not used, but beekeepers used preventive or destructive methods when infectious diseases were suspected. Efforts should focus on the medical services available and the alternative strategies to control diseases and should be part of educational services to large, medium and small size operations to standardize a preventive medical approach and avoid the spread of infectious diseases.

Acknowledgments

The authors acknowledge the participant beekeepers for their time, and the MAPAQ for their in-kind contribution. This study was made possible through a research grant from the Fond du centenaire of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal and scholarships provided by the Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and by the J. A. de Sève and Bank of Montreal foundations through the Faculty of Graduate Studies of the Université de Montréal to Gabrielle Claing. This work was also made possible by the financial assistance of the Centre de recherche en Sciences animales de Deschambault.

References

1. RAIZO. Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2016-2017. Bulletin zoosanitaire: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec; 2018.
2. Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*2011;6(2):e14720.
3. Wu JY, Smart MD, Anelli CM, Sheppard WS. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of invertebrate pathology*2012 Mar;109(3):326-329.
4. Miyagi T, Peng CY, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of invertebrate pathology*2000 Jan;75(1):95-96.
5. Martel A-C, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon J-P, Aubert M. Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food additives and contaminants*2006;23(3):265-273.
6. Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi A, Ansari MJ. Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The scientific world journal*2012;2012.
7. LégisQuébec. Règlement sur les conditions et modalités de vente des médicaments. In: Gouvernement du Québec, ed.1998.
8. Government of Canada. Responsible use of Medically Important Antimicrobials in Animals. 2018.
9. Arbia A, Babbay B. Management Strategies of Honey Bee Diseases. *Journal of entomology*2011 Jan-feb;8(1):1-15.
10. Ferland J. Les différents enjeux sanitaires apicoles au Québec et les activités du MAPAQ en apiculture. MAPAQ; 2018.
11. CFIA. Section 1: Bee Health Management. Honey Bee Producer Guide to the National Bee Farm-level Biosecurity Standard: Government of Canada; 2013.

12. Fries I, Camazine S. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*2001;32(3):199-214.
13. Delaplane K, Berry JA, Skinner JA, Parkman JP, Hood WM. Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold. *Journal of apicultural research*2005;44(4):157-162.
14. Wantuch HA, Tarpay DR. Removal of Drone Brood From *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies to Control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and Retain Adult Drones. *Journal of economic entomology*2009 Dec;102(6):2033-2040.
15. Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*1999;30(2-3):229-234.
16. Johnson RM, Pollock HS, Berenbaum MR. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of economic entomology*2009;102(2):474-479.
17. Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*1998;64(4):463-468.
18. Gregorc A, Planinc I. The control of *Varroa destructor* in honey bee colonies using the thymol-based acaricide-Apiguard. *American bee journal*2005;145(8):672-675.
19. Claing G, Dubreuil P, Ferland J, Bernier M, Rodriguez E, L'Homme Y, et al. Prevalence of honey bee pathogens, relation with clinical signs and perceived occurrence by beekeepers in southwestern Quebec. Unpublished work2019.
20. Williams GR, Shutler D, Little CM, Burgher-Maclellan KL, Rogers REL. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength*. *Apidologie*2010.
21. Huang W-F, Solter LF, Yau PM, Imai BS. *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS pathogens*2013;9(3):e1003185.

Tables

Table 1. Descriptive statistics of operation management of 15 beekeepers owning 1,824 colonies in southwestern Quebec, Canada, 2017.

Survey summary	Beekeepers		Colonies owned by beekeepers ^a	
	Number	Percentage	Number	Percentage
Occupation				
Professional	3	20.0	1,490	81.7
Semi-professional	8	53.3	302	16.6
Hobbyist	4	26.7	32	1.7
Marketing activities^{b c}				
Pollination services	4	26.7	1,520	83.3
Honey sale	11	73.3	1,792	98.3
Wax sale	6	40.0	1,492	81.8
Other ^d	1	6.7	1,115	61.1
No marketing activities	4	26.7	32	1.7
Apiary inspection^e				
Internal inspection of all hives	13	86.6	1,721	94.3
Internal inspection of some hives	1	6.7	80	4.4
External inspection only	1	6.7	23	1.3
Services offered to other beekeepers^{b f}				
Extraction of honey in their facilities	2	13.3	106	5.8
Practical training	5	33.3	259	14.2
Transport of hives	2	13.3	1,204	66.0
At least one of the above	6	40.0	1,374	75.3
Record of purchases of honey bee colonies				
Yes	1	6.6	98	5.4
No	4	26.6	5	0.3
No purchase	10	66.6	1,721	94.3
Record of bee movements				
Yes	4	26.7	1,435	78.7
No	2	13.3	214	11.7
No movement	9	60.0	175	9.6
Mortality insurance for 2017-2018				
Yes	1	6.7	35	1.9

No	14	93.3	1,789	98.1
Autumn feeding				
Individual	9	60.0	1,228	67.3
Barrels	5	33.3	561	30.8
Mixed (both methods)	1	6.7	35	1.9
Honey left in the hive for wintering				
Yes	4	26.7	102	5.6
No	11	73.3	1,722	94.4
Wintering method				
Indoors	3	20.0	1,227	67.3
Outdoors	12	80.0	597	32.7

^a Those are the number of colonies owned in the study area by beekeepers having reported the use of each specific practice; they do not necessarily represent the number of colonies in which the practice was applied.

^b Non-mutually exclusive categories

^c Marketing activities were only asked to the 11 professional and semi-professional beekeepers

^d One beekeeper also produced pollen, royal jelly and propolis. No beekeeper sold bees or queens.

^e The delay between inspections ranged from 2 to 30 days (median = 7 days)

^f No respondent reported melting wax for other beekeepers nor lending equipment

Table 2. Descriptive statistics of *Varroa* management of 15 beekeepers owning 1,824 colonies in southwestern Quebec, Canada, 2017.

Survey summary	Beekeepers		Colonies owned by beekeepers ^a	
	Number	Percentage	Number	Percentage
Screening for <i>Varroa</i> ^b				
Natural mite fall	4	28.6	115	6.3
Total mite fall (after application of acaricide)	3	20.0	26	1.4
Alcohol wash	3	20.0	1,306	71.6
Uncapping of drone cells	6	40.0	513	28.1
Visual identification on adult bees	10	66.7	553	30.3
At least one of the above	14	93.3	1,819	99.7
Biomechanical control of <i>Varroa</i> ^b				
Mesh floor in hive	8	53.3	321	17.6
Destruction of drone cells in frame bottom	3	20.0	27	1.5
Brood trapping (green comb frame)	1	6.7	17	0.9
Other method	2	13.3	142	7.8
At least one of the above	10	66.7	331	18.2
Chemical control of <i>Varroa</i> in spring ^{b,c}				
Amitraz (Apivar®)	2	13.3	1,032	56.6
Flash treatment (formic acid)	2	13.3	95	5.2
At least one of the above	3	20.0	1,087	59.6
Chemical control of <i>Varroa</i> in fall ^{b,c}				
Amitraz (Apivar®)	5	33.3	442	24.2
Thymol (Thymovar®)	3	20.0	1,207	66.2
Flash treatment (formic acid)	6	40.0	433	23.7
Mite Away / MAQS (formic acid)	3	20.0	30	1.6
Oxalic acid	2	13.3	135	7.4
At least one of the above	15	100.0	1,850	101.4 ^c

^a The exact number of colonies concerned was only asked for chemical control of *Varroa*. For the other questions, this table depicts the number of colonies owned in the study area by beekeepers having reported the use of each specific practice; they do not necessarily represent the number of colonies in which the practice was applied.

^b Non-mutually exclusive categories

^c No beekeepers used tau-fluvalinate (Apistan®), coumaphos (CheckMite +®) or wipes of formic acid (Mite Wipe®)

^d Some of the treated colonies were lost before the count of total colonies in fall, hence the smaller denominator.

Table 3. Descriptive statistics of other disease management of 15 beekeepers owning 1,824 colonies in southwestern Quebec, Canada, 2017.

Survey summary	Beekeepers		Colonies owned by beekeepers ^a	
	Number	Percentage	Number	Percentage
Systematic visual inspection of brood				
Yes	13	86.7	1,814	99.5
No	2	13.3	10	0.5
Use of laboratory diagnosis services for foulbrood				
Yes	1	6.7	66	3.6
No	14	93.3	1,758	96.4
Preventive measures against foulbrood ^b				
Comb replacement	9	60.0	1,647	90.3
Preventive disinfection of material	1	6.7	80	4.4
Genetic selection	2	13.3	169	9.3
Chemical control for foulbrood				
Oxytetracycline (prophylactic)	1	6.7	35	1.9
No treatment	14	93.3	1,789	98.1
Use of laboratory diagnosis services for <i>Nosema spp.</i>				
Yes	1	6.7	66	3.6
No	14	93.3	1,758	96.4
Chemical control for <i>Nosema spp.</i>				
Fumagillin	1	6.7	5	0.3
Nozevit®	2	13.3	316	17.3
Apple cider vinegar	1	6.7	17	0.9
None	11	73.3	1,486	81.5

^a The exact number of colonies concerned was only asked for chemical control of *Nosema spp.* For the other questions, this table depicts the number of colonies owned in the study area by beekeepers having reported the use of each specific practice; they do not necessarily represent the number of colonies in which the practice was applied.

^b Non-mutually exclusive categories

Figures

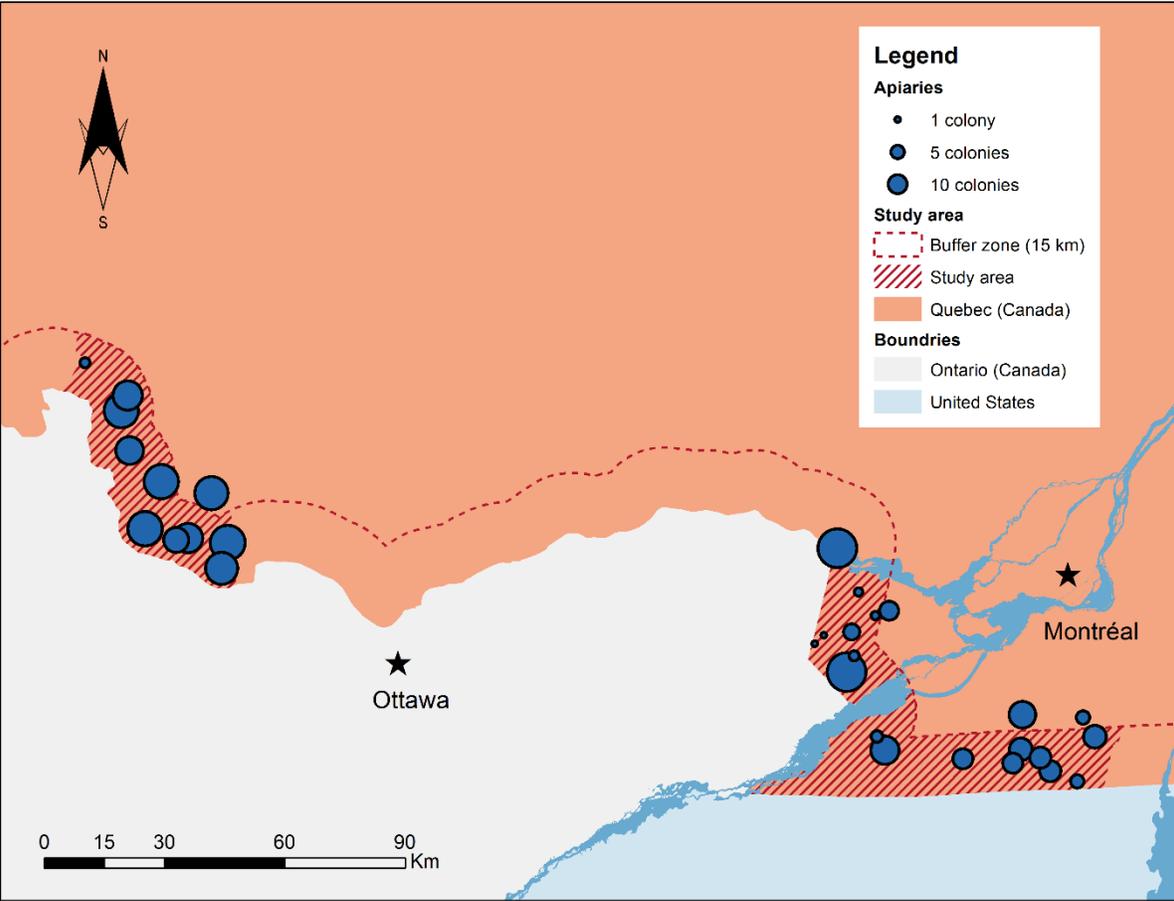


Figure 1. Spatial distribution and sizes of randomly selected apiaries owned by beekeepers participating in the study (southwestern Quebec, 2017)

Article 2. Prevalence of honey bee pathogens, relation with clinical signs and perceived occurrence by beekeepers in southwestern Quebec³

Gabrielle Claing^{a,b}, Pascal Dubreuil^a, Julie Ferland^b, Martine Bernier^c, Edisleidy Rodriguez^b, Yvan L’Homme^{a,d}, Julie Arsenault^a

^aFaculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Quebec, Canada

^bMinistère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec, Quebec City, Quebec, Canada

^cCentre de recherche en sciences animales de Deschambault, Deschambault, Quebec, Canada

^dCégep Garneau, Quebec City, Quebec, Canada

Correspondence should be addressed to Gabrielle Claing, gabrielle.claing@umontreal.ca

Author contributions

Conceptualization : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Data curation : Gabrielle Claing

Formal analysis : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Funding acquisition : Gabrielle Claing, Julie Ferland, Julie Arsenault

Investigation : Gabrielle Claing, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme

Methodology : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

Project administration : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Supervision : Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Validation : Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

Writing – original draft : Gabrielle Claing

Writing – review & editing : Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

³ In preparation for submission to *Preventive Veterinary Medicine*

Abstract

Honey bees are vital to agriculture and the global economy through pollination. Knowledge of the pathogens affecting honey bees and their prevalence is necessary to guide prevention and control measures and to determine reliable sampling protocols. A pilot cross-sectional study was conducted in southwestern Quebec to 1) estimate the prevalence of eleven bee pathogens at the colony, apiary, and/or beekeeper levels, 2) assess the agreement between beekeeper suspicion and laboratory detection for the presence of these pathogens in their enterprise and 3) to explore the association between observed clinical signs and pathogen levels in a colony. A total of 242 colonies in 31 apiaries belonging to 15 beekeepers were sampled in August 2017. *Varroa destructor* was the most common pathogen of clinical importance, detected by alcohol wash in approximately half (48%) of colonies and nearly all (93%) apiaries. *Nosema spp.* comes second, with ~40% of colonies infected. *Acarapis woodi*, *Paenibacillus larvae* and *Aethina tumida* were not detected. With the exception of *V. destructor*, beekeepers often failed to detect the disease in their apiaries when a pathogen was identified in laboratory within their operation (5/8 for nosemosis; 5/11 for European foulbrood). *M. plutonius*, another prevalent pathogen (~20% of colonies infested), was associated with the presence of scattered brood in the colony ($p=0.009$), which corroborates that colonies showing signs of scattered brood should be prioritized when screening for European foulbrood. These results provide preliminary data for future research and will help guide the implementation of prevention and control measures in Quebec.

Keywords: prevalence; varroa destructor; nosema; foulbrood; honey bees

1. Introduction

Managed honey bee (*Apis mellifera*) colonies are important for their honey production, but mostly for the role they play as pollinators for wildflowers and for a large variety of crops providing food, biofuels (e.g. canola oil) and forage for livestock (Klein et al., 2006). About 75% of crop plants depend at least in part on pollination (FAO, 2016), which is mostly provided by the honeybee. It is estimated that the value of pollination is in the range of CAN \$ 3 to \$ 5 billion per year in Canada (Agriculture and Agri-Food Canada, 2016).

Considering this, the recent declines in managed honey bee hives in the North America and Europe (FAO, 2018) were cause for widespread concern (Moritz et al., 2010; Pettis and Delaplane, 2010). In Canada, although the number of managed honey bee colonies has been rising in the last decade, winter losses have always been higher than considered acceptable by beekeepers over that same period; in Quebec, these losses reached an alarming 33% in the winter of 2017-2018 for beekeepers owing more than 50 colonies (CAPA, 2016). This global phenomenon led to increased research efforts focusing on the many factors presumably afflicting honey bees, including diseases.

In Canada, pathogens suspected to cause production losses according to beekeepers are primarily the mite *Varroa destructor*, *Nosema spp.* and *Paenibacillus larvae* (CAPA, 2016). The wide presence of *V. destructor* and its important impact on colony mortality has been demonstrated in Ontario (Guzmán-Novoa et al., 2010). Other known pathogens of the honey bee include *Melissocossus plutonius*, many viruses, the tracheal mite *Acarapis woodi*, the fungi *Ascosphaera apis* and the parasitic fly recently discovered in Canada, *Apocephalus borealis*. Over 24 viruses of the honey bee have been identified (Olivier and Ribière, 2006; Genersch and Aubert, 2010; de Miranda et al., 2012), among which the Black Queen Cell Virus (BQCV), the Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) and Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), and the Deformed Wing Virus (DWV) seem to be more common in other countries (Genersch et al., 2010; Soroker et al., 2010; Hedtke et al., 2011).

Many studies have reported the prevalence of these important pathogens or diseases of the honey bee in various parts of the world (Gajger et al., 2010; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b). With the exception of one national health survey encompassing 35 apiaries in Quebec (National Bee Diagnostic Centre, 2017), data on Canadian or Quebec's honey bee

population that does not origin from passive surveillance is still rare, but necessary for several reasons. Knowledge of the agents affecting colony health is important to prioritize actions, and documented prevalence is necessary to establish reliable sampling protocols for scientific research or disease surveillance. It is also essential to guide prevention and control measures. Since passive surveillance of honey bee diseases mainly relies on the declaration of beekeepers, there is a need for validation of disease status as reported by beekeepers. Furthermore, in a context of disease surveillance or screening, knowledge on the probability of pathogen detection clinical signs are observed is relevant to targeted sampling.

The objectives of this study were to 1) estimate the prevalence of eleven bee pathogens at the colony, apiary, and/or beekeeper levels 2) assess the agreement between beekeeper suspicion and laboratory detection for the presence of different pathogens in their enterprise and 3) explore the association between observed clinical signs and pathogen levels in a colony. Only pathogens that were expected to be common or impactful in Canada based on studies in other countries were included in this study.

2. Material and methods

2.1. Study design and area

This cross-sectional study was conducted in the province of Québec as an extension of the yearly active monitoring for *Aethina tumida*, the small hive beetle (SHB), performed by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). The study area was defined as the strip located within 15 km of the border with the United States or Ontario province within 2 regions: Pontiac and western Montérégie, which includes two regional county municipalities (Montérégie-Ouest and Vaudreuil-Soulanges). This area corresponds to the SHB surveillance zone.

2.2. Selection of apiaries

A list of the 126 apiaries belonging to the 38 registered beekeepers located in the study area was provided by the MAPAQ. A total of 42 of the 75 apiaries in the adjacent regions of

Montérégie-Ouest and Vaudreuil-Soulanges, and 34 of the 51 apiaries in Pontiac were randomly selected for mandatory inspection. These sample sizes were calculated separately for each of the two areas defined by the MAPAQ for SHB monitoring, to enable the detection of at least one positive apiary in the finite population at a confidence level of 95% given a minimal expected prevalence of 5% (Sergeant, 2019). All 27 beekeepers inspected for the SHB monitoring program were invited to participate in the project on a voluntary basis.

2.3. Sampling

The sampling took place from August 7, 2017 to September 1, 2017. In apiaries of 10 colonies or less, all colonies were sampled, and in larger apiaries, 10 colonies were sampled. The colonies were systematically selected with random start according to a linear or circular path joining each of the hives only once. For a more efficient inspection, an agronomist, a biologist and a veterinarian formed two teams to perform the inspection and sampling of the colonies with the owner of the bees present. For standardization, everyone involved inspected each hive of the first two apiaries as one team.

For each selected colony, the top of each box of the hive, as well as the hive's floor, was visually inspected for the presence of SHB, according to Bernier et al. (2017). Colony strength was visually assessed according to proportion of brood frames covered by bees. Strong colonies had more than 60% of their brood frames covered by bees, mild colonies had between 30 and 60% and colonies were considered as weak when less than 30% of brood frames were covered by bees. An empty hive is considered weak, and a full hive is considered strong. Colony strength (strong, mild or weak) and signs of disease (including mummies, dead larvae, scattered brood, deformed wings and *V. destructor* on adult bees) were noted using a standardized form. The 3 oldest frames in the brood nest of the hive were thoroughly examined, and samples were collected.

For each colony, approximately 300 nurse bees were collected from two brood frame in the bottom brood chamber and kept in a plastic container containing 375 mL of isopropyl alcohol 70% for the search of *V. destructor*. Approximately 200 foraging bees were collected and kept in a plastic container containing 125 mL of isopropyl alcohol 70% for the search for

Acarapis woodi and *Nosema spp.* No sample was collected for the search of *Ascospheera apis*; colonies were considered positive when mummies were present.

For testing of foulbrood agents *Melissococcus plutonius* and *Paenibacillus larvae*, approximately 30 nurse bees were collected in separate single-use polyethylene sample bags (Fisherbrand®) for each colony and immediately killed on dry ice. For molecular detection of viruses, approximately 100 nurse bees were collected in separate re-sealable plastic bags for each colony and immediately put on dry ice. These samples were kept on dry ice until transportation to the laboratory and then stored at -80°C until assayed.

If very weak or dead bees were present in front of the hive, they were collected in a sealed plastic container for the search of *Apocephalus borealis* and kept at ambient temperature.

2.4. Questionnaire

A questionnaire on management practices applied for the 2017 season (available in complementary file) was developed and pre-tested for clarity, thoroughness and time of administration by two experienced beekeepers. This questionnaire included questions on the presence of diseases on apiaries according to the beekeeper and was filled by telephone interviews with participating beekeepers between November 21 and December 15, 2017.

2.5. Laboratory analysis

2.5.1. *Varroa destructor*

In accordance with the alcohol wash method (Dietemann et al., 2013), the 300 nurse bees sampled and conserved in alcohol were filtered in a strainer over a clean white cotton fabric. All *V. destructor* mites were counted. All bees were counted in the positive samples to estimate the percentage of infestation.

2.5.2. *Acarapis woodi*

A pool of 50 bees was made from the samples of foraging bees kept in alcohol from all selected hives within the apiary for each of the 31 apiaries. A section of the thorax was made for each bee and the 50 slices were immersed in 40 mL of KOH (8%). The solution was microwave heated at low power for 4 minutes. The thorax was then observed under the stereomicroscope (450X) to find the presence of the parasite or its excreta in each trachea (Sammataro et al., 2013).

2.5.3. *Nosema spp.*

Samples of approximately 60 foraging bees kept in alcohol were sent to the Laboratoire de santé animale of Saint-Hyacinthe (LSA-SH) of the MAPAQ and kept at room temperature for 3 to 8 months prior to analysis. Spore counts were performed on 60 bees for each colony, according to Fries et al. (2013). When spores were detected, PCR analysis was performed to identify the *Nosema* species present.

For DNA extraction, the abdomen (the last 3 tergites) of 5 bees per sample was cut and the intestines were removed and deposited in pre-identified 1.5 mL tubes. The pieces of bees were dried for 20 minutes at 37°C to remove all the residual ethanol, and then frozen at -80°C for 15 minutes. To that sample, 440 µL of saline extraction buffer, 44 µL of 20% SDS and 8 µL of Proteinase K (20 mg/mL) were added. The result was vortexed for a few seconds, then incubated for 1 hour at 60°C while being vortexed every 20 minutes. Three hundred µL of 6M saline solution was added, and the sample was vortexed and then centrifuged at 13,300 rpm for 20 minutes at 4°C. The supernatant was transferred to a new pre-identified 1.5 ml tube. Centrifugation was repeated to remove debris. 600 µL of cold isopropanol (stored in freezer -20°C) was added, the sample was mixed and incubated at -20°C for 30 minutes. The sample was then centrifuged at 13,000 rpm for 20 minutes at 4°C, and the supernatant was removed by pipette. Two hundred µL of 70% cold ethanol (stored in the -20 ° C freezer) was added, centrifugation at 13000 rpm at 4 ° C repeated for 10 minutes, and the supernatant removed again. The pellet was dried overnight at room temperature. 100 µL of H₂O was added, and the sample was left overnight at 4°C to resuspend. Extracted DNA was stored at -20°C.

A PCR was realized with the following 15 μL mix: 3 μL Q5 Reaction Buffer (5X), 0.3 μL dNTPs (10 mM), 0.75 μL forward primer (10 μM), 0.75 μL reverse primer (10 μM), 3 μL Q5 High GC enhancer (5X), 0.3 μL Q5 High-Fidelity DNA polymerase (2U/ μL), 4.9 μL ddH₂O, and 2 μL of extracted DNA. Primers for *N. apis* and *N. ceranae* were developed in the Derome laboratory in Université Laval (Québec), and actin primers were used to assess the quality of extracted DNA, as described by Cox-Foster (2007). Primer sequences were ‘CCATTGCCGGATAAGAGAGT’ for *N. apis* forward, ‘CACGCATTGCTGCATCATTGAC’ for *N. apis* reverse, ‘CGGATAAAAGAGTCCGTTACC’ for *N. ceranae* forward and ‘TGAGCAGGGTTCTAGGGAT’ for *N. ceranae* reverse. Expected fragment length were 401 bp for *N. apis* and 250 bp for *N. ceranae*. Positive (confirmed cases) and negative (water) samples were tested with each sample. Samples were processed for *N. apis* and *N. ceranae* in a biometra T1+ thermocycler according to the following program: 94°C for 2 min; 30 cycles of 94°C for 45 sec, 56°C for 45 sec and 72°C for 30 sec; and 72°C for 5 min. The results were visualized on agarose gel electrophoresis.

2.5.4. Foulbrood agents

The method proposed by Lindström and Fries (2005) for the culture of *M. plutonius* and *P. larvae* on adult bees was adapted as follows. For each apiary, a pool of 30 bees made from the samples of nurse bees stored at -80°C of each colony was mixed with 20 mL of phosphate buffer (PBS) using a stomacher for 30 seconds at 560 bpm. The result was filtered through Whatman No. 1 paper. The liquid obtained was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. The pellet was suspended in 3 ml of sterile PBS. The preparations were stored at -80°C while waiting for culture. The same protocol was applied for each colony. The sensitivity of this technique was tested on one sample from a colony with clinical signs for European foulbrood, and one with signs of American foulbrood, which both tested positive for their respective agent to the culture of diseased larvae swabs.

Preparations were sent to the Laboratoire de santé animale de Québec (LSA-Qc) for culture. Each preparation was separated into 3 vials each containing 1 mL. One vial was directly inoculated on a MYPGP plate and a basal plate. The second vial was heated at 80°C

for 10 minutes and inoculated on a MYPGP plate. The third vial was heated at 95°C for 3 minutes and inoculated on a MYPGP plate. Positive controls for *P. larvae*, using 200 µl of sporulated strain mixed in 2800 µl of PBS, were prepared on three MYPGP plates using the same protocol.

Basal plates were incubated anaerobically for 7 days before being analyzed by PCR for identification of *M. plutonius*. MYPGP plates were incubated for 7 days for culture of *P. larvae* before being declared negative.

2.5.5. Viruses

Total nucleic acids were extracted from 10 bees from the sample of adult bees stored at -80°C per colony by crushing them in a mortar in liquid nitrogen for 1-2 minutes until a fine powder was obtained. An extraction control consisting of mouse norovirus (10^3 MNV-1) was added to one sample/extraction cycle. A total of 4 ml of PBS (pH 7.4) was added to the bee homogenate, mixed, transferred to a 15 ml screw-cap tube and centrifuged at 3800 x G for 10 minutes. One hundred and forty µL of the supernatant was used for nucleic acid extraction using the Qiampr Viral RNA mini extraction kit from Qiagen. Total extracted nucleic acids were stored at -80°C until RT-PCR testing.

Qualitative one-step RT-PCR reactions were performed using the QuantiTect SYBR green RT-PCR kit from Qiagen. RT-PCR reactions were done in a final volume of 20µL containing 2X QuantiTect master mix, a mix of reverse transcriptase and Taq polymerase, 0.6µM of each primer and 2 µL of total nucleic acid. All reactions were performed on a Roche LightCycler 96 instrument. To ensure specificity, amplification reactions were followed by a melting curve analysis (fluorescence was read at each 0.5 °C increments from 70 to 95 °C to record the dissociation point, ensuring amplicon fidelity).

Conventional RT-PCR for the MNV-1 extraction control, BQCV and confirmative RT-PCR for selected samples used the OneStep RT-PCR kit from Qiagen. Primers and RT-PCR conditions for MNV-1 were as described by Kingsley (2007). Following 35 cycles of RT-PCR amplification, 10 µL of the RT-PCR reaction was separated on a 1.5% agarose gel stained with SYBR Safe. In the case of BQCV, samples were analysed using a Qiaexel instrument (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. All samples spiked with 10^3 MNV-1

as an extraction controls generated a DNA fragment of the expected size and were confirmed by sequencing.

2.5.5.1 DWV

For deformed wing virus (DWV), the primer pair designed by Li et al. (2011) was used. The RT-PCR conditions were: 30 minutes at 50°C, 15 minutes at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds, 58°C for 15 seconds and 72°C for 15 seconds. Samples with Ct values ≤ 34 were considered positive. One PCR-positive sample per apiary was sequenced up to a total of 10 samples.

2.5.5.2 AKI complex

For the closely related Acute bee paralysis virus (ABPV), Kashmir bee virus (KBV) and Israeli acute paralysis virus (IAPV), a “universal” primer pair (AKI) located in a highly conserved region of the genome was used as described by Francis and Kryger (2012). The RT-PCR conditions were: 30 minutes at 50°C, 15 minutes at 94°C, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds, 58°C for 15 seconds and 72°C for 15 seconds. Samples with Ct values ≤ 34 were considered positive.

To confirm the identity of the PCR products (the specificity of the AKI primer pair), a random subset (>50%) of positive samples (Ct<34), representing all positive apiaries, were sequenced. In addition, all positive samples were reamplified using one or more of the following systems. Primers for KBV and ABPV, as designed by Tentcheva et al. (2004), were used as described by the authors in addition to primers for IAPV as designed by Di Prisco et al. (2011). If one or more of these 3 RT-PCR systems produced a band of the appropriate size, the sample was considered positive and the amplicon was sequenced for confirmation. If none of these RT-PCR generated a band of the appropriate size, the sample was considered negative.

2.5.5.3 BQCV

For Black queen cell virus, the method designed by Benjeddou et al. (2001) was used. The RT-PCR conditions were: 30 minutes at 50°C, 15 minutes at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C for 15 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s.

2.5.6 *Apocephalus borealis*

The bees were kept in their plastic container at room temperature for 15 days. If larvae emerged, they were sent to the Laboratoire de phytoprotection of the MAPAQ to be identified to species level based on typical morphological characteristic (Brues, 1924; Brown, 1993) using a binocular loupe that allows a magnification ranging from 4.7X to 150X. For larvae that died before reaching an adult form, PCR testing was performed as follows.

Extraction was done using the “DNeasy Blood and tissue” Qiagen kit, using manufacturer instructions. A PCR was realized with the following reagents: 11.7 µL sterile H₂O, 5 µL amplification buffer (10X), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 25 µL 10% trehalose, 1 µL DNTP (2 mM), 0.3 µL TAQ (5 U), and 5 µL of extracted DNA. In one preparation, 0.5 µL LEP-F1/LEP-R1 primer (10 µM) is added, and in another one, 0.5 µL LCO1490/HCO2198 primer (10 µM) is added. Primer sequences were ‘ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA T’ for LEP-F1, ‘TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA A’ for LEP-R1, ‘GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G’ for LCO1490 and ‘TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA’ for HCO2198. Expected fragment length were 648 bp for LEP-F1/LEP-R1 and 710 bp for LCO/HCO. Samples were processed in a thermocycler according to the following program: 94°C for 1 min; 5 cycles of 94°C for 40 sec, 45°C for 40 sec and 72°C for 60 sec; 35 cycles of 94°C for 40 sec, 51°C for 40 sec and 72°C for 60 sec; and 72°C for 10 min. The results were visualized on agarose gel electrophoresis. Amplicons were sequenced to obtain a chromatogram of the genes of interest, using the services of the Genome Sequencing and Genotyping Platform at the Centre Hospitalier Universitaire de Québec. Each sample comprised two reactions (sequences) for a pair of primers (5' to 3' reaction and 3' to 5' reaction). To clean and process the sequences, the software Geneious R8 (8.0.5) was used. The sequences obtained were compared with the reference databases NCBI and BOLD.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in the software SAS version 9.4. The prevalence of *V. destructor*, *A. woodi*, *Nosema spp.*, *A. apis*, *M. plutonius*, *P. larvae*, viruses, *A. borealis* and SHB and 95% confidence intervals were estimated at the colony level, taking the sampling stratum (2 regions), clustering of colonies by apiary and sampling weights (apiary sampling probability per region and colony sampling probability per apiary) into consideration (SURVEYFREQ procedure). For *V. destructor* and *Nosema spp.*, various count values were explored to define a positive colony status. The MAPAQ and the French agency ANSES recommend treating *V. destructor* for rates of 1 mite/100 bees or more at the end of the season (MAPAQ, 2014; Vallon and Wendling, 2017). A long term bee monitoring project in Germany concluded that infestation rates in autumn should be kept below 5 mites/100 bees (Genersch et al., 2010). In Canada, infestation rates of 4 mites/100 bees in late summer were suggested as thresholds to predict economic damages (Currie and Gatien, 2006). Delaplane and Hood (1999) suggested a relatively high threshold of around 10 mites/100 bees to predict economic impact in the southern United States. As bees were collected in late summer, before autumn treatments, the aforementioned thresholds were used to estimate the prevalences presented in this study. As bees were collected in late summer, before autumn treatments, the aforementioned thresholds were used as case definition to estimate the prevalences presented in this study. Case definitions for *Nosema spp.* were the detection of at least one spore in the sample, of 500,000 spores or more per 60 bees, and of 1,000,000 spores or more per 60 bees. As significant thresholds for *Nosema spp.* infection are not clearly defined, even less during summer, the thresholds were chosen according to the distribution of spore loads in the samples (minimum, mid-range and 95% percentile). Apiaries were considered positive if they contained at least one positive colony. Prevalence at the apiary and beekeeper level was estimated with the same procedure, taking stratum (regions) and sampling weight into account for apiary-level prevalences. Prevalence according to beekeeper suspicion was also computed for *V. destructor*, *Nosema spp.*, *M. plutonius* and *P. larvae*. Confidence intervals for prevalence of 0 or 100% were computed using an exact method without adjustment for clustering or weight (FREQ procedure).

The proportion of beekeepers suspecting the presence of a pathogen in their colonies was compared to the proportion of them for which the pathogen was detected using a McNemar test, performed separately for each pathogen (*V. destructor* (≥ 1 mite), *Nosema spp.* (≥ 1 spore), *P. larvae*, and *M. plutonius*). In the absence of a significant association ($p > 0.05$), the agreement between beekeeper pathogen suspicion and detection was estimated using the Kappa coefficient.

Association between colony weakness and pathogen presence was tested for *V. destructor*, *Nosema spp.*, *M. plutonius*, DWV, AKI and BQCV, and association between various clinical signs and pathogen presence for *M. plutonius* (dead larvae, scattered brood) and DWV (deformed wings) were explored with contingency tables and Rao-Scott chi-square exact test, taking clusters by apiaries into account (SURVEYFREQ procedure). For these analyses, colony weakness was defined as a colony deemed weak by the inspector (as opposed to strong or mildly strong colonies).

3. Results

Of the 27 beekeepers owning apiaries selected for mandatory SHB inspection, 15 agreed to participate in the study. Due to temporal constraints, all selected apiaries could not be sampled; at least one apiary was sampled by beekeeper, and for beekeepers having multiple selected apiaries, the ones located farther from another one sampled were prioritized. Thirty-one apiaries were sampled through all regions (11 apiaries in Pontiac, and 20 apiaries in the adjacent regions of Montérégie-Ouest and Vaudreuil-Soulanges), for a total of 242 colonies (see Figure 1).

3.1. Pathogen prevalence according to laboratory diagnosis and beekeeper perception

Table 1 presents the prevalence estimates of each honey bee pathogen according to the different thresholds used to define a positive case.

V. destructor was detected by alcohol wash in 134 colonies, and mites were observed on adult bees during inspection in 2 of those colonies. *A. woodi* was not found in any of the pooled samples from the 31 apiaries. Among the 88 positive colonies for *Nosema spp.*, *N. apis*

alone was detected in 2 (2.3%) colonies, *N. ceranae* alone was detected in 66 (75%) colonies, and both species were detected for 2 (2.3%) other colonies. We were unable to identify any species for the 18 remaining cases (20%).

M. plutonius was found in 57 colonies (24%), while *P. larvae* was not found in any of the 242 colonies.

Regarding DWV, 10 (25%) of the 40 samples with Ct values <34 (positive), each from a different apiary, were sequenced. All were over 98% identical to DWV using Blastn against GenBank's viral database. A total of 21 samples generated Ct values between 34 and 36. Of these, 11 samples (52%) were separated by agarose gel electrophoresis and all displayed a faint DNA fragment of the appropriate size (170 bp). In addition, 6 samples of those 21 samples (29%) were sequenced and were over 98% identical to DWV using Blastn against GenBank's viral database. These 21 samples were therefore considered as positives.

For the AKI complex viruses, 9 (56%) of the 16 samples with Ct values <34 (positive) were sequenced. All sequences were over 85% identical to the ABPV/IAPV/KBV complex using Blastn against GenBank's viral database. In addition, 13 (81%) of the 16 AKI positive samples, selected to represent all positive apiaries, were reamplified using one or more of the 3 conventional RT-PCR described above. All samples generated DNA fragments of the appropriate size on agarose gel electrophoresis (400-600 bp) and were sequenced by Sanger sequencing. All sequences were over 97% identical to IAPV using Blastn against GenBank's viral database. A total of 3 samples had Ct values between 34 and 36 were considered ambiguous; 2 of them were retested with different primers in conventional RT-PCR and separated using agarose gel electrophoresis. These ambiguous samples were therefore considered as positives. Among the total 19 positive colonies for the AKI virus complex, IAPV was detected by PCR in 18 colonies (95%). ABPV-KBV presence was tested in 17 (89%) of AKI-positive cases and was detected in 9 colonies (53%); however, after sequencing, the virus identified in all of these samples was IAPV.

As for BQCV, 168 (93%) of the 180 tested colonies were found positive. A total of 17 samples chosen from 15 different apiaries were confirmed over 98% identical to BQCV using Blastn against GenBank's viral database following Sanger sequencing of amplicons.

Apocephalus borealis was confirmed by PCR in one of the 109 samples of weak or dead bees collected in front of the hives. No sample was collected for the remaining 133

colonies for which no weak bees were observed in front of the hive. *Aethina tumida* was not visually detected in any colony.

3.1. Agreement between beekeeper suspicion and laboratory diagnosis

V. destructor was suspected by 14 out of 15 beekeepers and was detected by alcohol wash in the apiaries of all beekeepers. There were 3 beekeepers who suspected American foulbrood in their apiaries for the 2017 season, while *P. larvae* was not detected in any sample. McNemar's test couldn't be conducted for these pathogens due to their distribution.

There was no significant agreement between culture for *M. plutonius* and European foulbrood suspicion by beekeepers (Table 2.A, McNemar $p=0.10$, Kappa $p=0.15$), or between Nosema detection by spore count and Nosema suspicion by beekeepers (Table 2.B, McNemar $p=10$, Kappa $p=0.15$).

3.2. Association between clinical signs and pathogen levels

Associations between clinical signs reported by the inspectors and pathogens found are presented in Table 3. While no significant association was observed between colony weakness and pathogen detection, *Nosema spp.* ($p=0.09$), *M. plutonius* ($p=0.15$) and the AKI virus complex ($p=0.2$) had a tendency of being more detected in weak colonies. No association with colony weakness was found for *V. destructor*, DWV and BQCV ($p>20$).

Dead larvae presence in the colony was not associated with culture results for *M. plutonius* ($p=0.49$). However, the presence of scattered brood was associated with culture results for *M. plutonius* ($p=0.010$).

There was only one colony in which bees with deformed wings were observed, and that colony tested positive for DWV.

4. Discussion

4.1. Pathogen prevalence according to laboratory diagnosis and beekeeper perception

4.1.1. *Varroa destructor*

V. destructor was the most common pathogen of clinical importance detected in southwestern Quebec; it was found in approximately half of colonies and nearly all apiaries. Similar results were obtained in Germany from 2004 to 2010, where 51% of colonies (549) and 62% of colonies (533) were infested in autumn and summer, respectively, as determined by the individual examination of 100 bees per colony (Hedtke et al., 2011). Using alcohol wash, Guzmán-Novoa et al. (2010) found a higher prevalence (76%) of infested colonies in the fall, in the neighboring province of Ontario. As reported by Claing et al. (2019), 56% of colonies belonging to participating beekeepers were treated in spring with amitraz, an acaricide with >90% efficacy (Semkiw et al., 2013). It is also important to mention that our detection method did not allow for the detection of mites in capped brood. A model built by Martin (1998) predicts that about 65% of the mite population is found in capped brood. As visits took place in August, only a few months after acaricide treatment which might have reduced population below detection levels, and with brood in the hive for the mite to escape detection by alcohol wash, it is possible that the actual prevalence of *V. destructor* was higher than observed.

According to Guzmán-Novoa et al. (2010), the mean infestation rate was 5.1 mites/100 bees in fall, but only 1.5 mites/100 bees in early summer. Our results for late summer show lower infestation rates, with only 16% of colonies above 1 mite/100 bees. There was only 3% of colonies with a threshold above 5 mites/100 bees.

This study confirms that visual detection of *V. destructor* should not be used as a screening method for *V. destructor* presence, but can be regarded as an indicator of high infestation levels.

4.1.2. *Nosema spp.*

Nosema spp. was the second most common pathogen detected in samples and suspected by beekeepers. The vast majority (77%) of cases were due to *N. ceranae*. However, for 20% of spore count positive samples, neither *Nosema* species was detected by PCR. This is probably due to the small number of bees used for PCR detection, as it was shown that

spores are distributed heterogeneously among bees, with some bees highly infected and others free from infection (Higes et al., 2008).

Our results compare to those reported in Germany, where the prevalence of *Nosema spp.* in autumn ranged from 14 to 31% between 2004 and 2007, with between 1% and 2% of colonies severely infested (> 100 spores on microscopic evaluation) (Genersch et al., 2010). To our knowledge, there are no scientifically validated threshold of spore counts leading to serious consequences for either *Nosema* species.

4.1.3. Foulbrood agents

M. plutonius was detected in ~20% of the hive samples. Data from passive surveillance have found this disease at a low incidence (~2%) in France and the United-Kingdom (Wilkins et al., 2007; Chauzat et al., 2014). Active monitoring in the UK has found *M. plutonius* in 4.6% of samples (7/152) in 2008 (Budge et al., 2015). Since colonies were sampled regardless of their health condition, and that our bacterial diagnostic method did not allow for quantification, it is difficult to establish the clinical significance of the prevalence obtained for *M. plutonius*.

P. larvae was not isolated in the 242 bee samples, and no colony in our project showed clear signs of American foulbrood. Similar results were obtained in the German bee monitoring project (Genersch et al., 2010). We may consider the possibility that our cultures did not possess the analytic sensitivity required to detect sub-clinical infections. Therefore, freedom from infection cannot be concluded, especially since confirmed clinical cases of American foulbrood were previously diagnosed in Quebec. Based on culture of honey, *P. larvae* spores were detected in 8.5% of Canadian and American businesses (n=82) (Steinkraus and Morse, 1992). Moreover, this disease has an unequal distribution, both temporally and spatially. In Germany, spores can be found in 6% of honey samples randomly selected in the territory, but this prevalence rises to 24% in areas with a history of American foulbrood (Otten, 2003). This suggests that there are areas where the disease subsists at low levels between peaks of recurrence. It is therefore important to evaluate the analytical sensitivity of this new method if it is to be used for surveillance purposes.

4.1.4. Viruses

Viruses prevalence reported varies in many studies. Our results are closely related to those of Soroker et al. (2010) in Israel, who found DWV in 23% of colonies and BQCV in 62% of colonies (n=71). DWV prevalence in Germany varied between 4 and 33% according to two studies conducted in the 2000s (Genersch et al., 2010; Hedtke et al., 2011). Genersch et al. (2010) and Soroker et al. (2010) reported a prevalence of respectively 0% and 35% for the IAPV. Genersch et al. (2010) also found the ABPV in 6% to 12% of their samples from 2004 to 2007. The relatively low prevalence of AKI complex viruses (9%) reported in this study concurs with the results observed in Germany. As only IAPV was detected in this study, it is possible that the AKI primer system is not adequate to detect ABPV and KBV. In a previous survey conducted throughout Canada, KBV presence has been reported in the apiaries of Quebec (n=35), but not ABPV (National Bee Diagnostic Centre, 2017), therefore it is also possible that ABPV is very rare, or even absent in Quebec. As for KBV, this previous report does not mention sequencing, and, as we have demonstrated, KBV primers lack specificity and can amplify IAPV. Therefore, KBV presence in Quebec is uncertain. This raises the question of whether these viruses should be searched individually or rather as a complex in epidemiological studies. Although a lack of sensibility in our method is possible, it was demonstrated that analyzing individual bees has no advantage over analyzing pooled bees and that a pool of 20 bees is sufficient to reliably quantify virus levels in colonies (Highfield et al., 2009).

4.1.5. Other pathogens

A. woodi was not detected, as was reported in the German bee monitoring project (Genersch et al., 2010). A recent study in Ontario found this parasite in 6.1% of the 400 sampled colonies (Guzmán-Novoa et al., 2010). Since *A. woodi* was only searched in 50 bees per apiary for practicality reasons, the sensitivity of our method might have been low. A Spanish study carried out repeated sampling of 35 colonies; the parasite was found by dissection in 4 out of 35 colonies (11.4%), but in only 2.5% of the 202 samples collected, and in the trachea of only 15 bees out of 5.050 (0.29%) (Bermejo et al., 1997). This suggests that

the infestation is very rare within colonies at all times, and that our numbers (1550 bees) might have been insufficient to detect the pathogen. Notwithstanding this fact, with the widespread use of miticides such as formic acid and thymol to control *V. destructor*, which also controls *A. woodi*, and the fact that this parasite has not been reported by passive surveillance for many years, we expected *A. woodi* prevalence to be low.

A. apis is the only pathogen that was diagnosed based on clinical signs rather than laboratory tests. The presence of white, black, or gray mummies at the hive entrance, on the bottom board, or in sealed and unsealed brood cells are considered sufficient to diagnose the disease (Aronstein and Murray, 2010). Given that fungal growth is enhanced in cool and humid beehives (Flores et al., 1996), it is possible that the prevalence obtained in this study, for samples collected in late summer, is at its lowest point through the year.

Sampling for *A. borealis* was challenging in the field since dead bees were not always present in front of the hive or could be hard to collect in tall grass. Bees tend to die of *A. borealis* far away from the hive; therefore, an absence of sample does not equal to an absence of parasite, and our sampling is possibly biased towards negative colonies. A minimal expected prevalence is presented in Table 1.

As SHB is an exotic pest subject to annual monitoring in Quebec, the observed prevalence of 0% was expected.

4.2. Agreement between beekeeper suspicion and laboratory diagnosis

V. destructor was detected in the colonies of all beekeepers, and 14 out of 15 beekeepers believed the parasite was present in their apiaries. However, when it comes to other common diseases (foulbrood diseases, noseiosis), beekeeper suspicions and laboratory analysis were not in accordance. As beekeepers were asked whether they suspected the pathogens' presence over the course of the entire season, it is possible that they correctly identified a pathogen's presence in colonies that were not sampled, or that they did so before or after samples were taken for laboratory analysis. That could be the case for beekeepers having suspected American foulbrood. Nonetheless, when a pathogen was identified in laboratory within their operation, the concerned beekeepers often failed to detect the disease in their apiaries (45% of beekeepers [5/8] for noseiosis; 63% [5/11] for European foulbrood).

Although this could be due to the complete absence of clinical cases, which is often the case for nosemosis, it is also possible that beekeepers do not know or search for the clinical signs of each disease. Clinical signs of foulbroods might be similar to signs of other diseases and thus, might be hard to distinguish for beekeepers, mainly for those who are less experienced. For nosemosis, the necessity and efficiency of treatment is controversial (Higes et al., 2013). Thus, beekeepers might find it unnecessary to search for clinical symptoms of such a disease. It can be concluded that, in research studies or surveillance programs, the perception of the beekeepers is less reliable than laboratory test for case definition.

4.3. Association between clinical signs and pathogen levels

As severe *V. destructor* infestation combined with viral infection has been clearly demonstrated to weaken a colony (Yang and Cox-Foster, 2005; Yang and Cox-Foster, 2007; Guzmán-Novoa et al., 2010; Dainat et al., 2012a), a negative correlation between colony strength and *V. destructor* infestation level was expected, but unobserved. Conversely, *V. destructor* population increases with the bee population, therefore heavy infestations could be observed in heavily populated colonies in summer, before the parasitic load begins to affect the colony in fall. This phenomenon could explain the lack of association between colony strength and concurrent *V. destructor* infestation levels.

Each *Nosema* species leads to a different clinical portrait. While *N. apis* infection is considered a generally benign disease sometimes leading to dysentery, the consequences of *N. ceranae* infection are more controversial. Depopulation is the only sign clearly demonstrated of *N. ceranae* infection (Higes et al., 2013), which represented most of the *Nosema spp.* cases in this study. Even during summer, weak colonies seem more frequently affected with severe *Nosema spp.* infection than strong colonies ($p < 0.05$). Other diagnostic methods, such as the proportion of infested bees, could be explored to add evidence to support this association.

Our results suggest that weak colonies might also be at a higher risk of *M. plutonius* presence ($p = 0.15$). This study corroborates that scattered brood ($p = 0.009$) is highly associated with *M. plutonius* infection. As this is not the case for dead larvae, a colony showing a clear pattern of scattered brood would be a better choice to send samples for the search of *M. plutonius* than a colony with a few dead larvae. Since scattered brood is a result of larvae

dying off and their alveoli having been cleaned, it is possible that the disease episode is already resolved when this clinical sign is visible. This could explain the high percentage (64%) of colonies with scattered brood and negative culture results. It is also possible that the culture detected subclinical or early European foulbrood cases, which would explain the few cases without scattered brood in which the agent was found.

Weak colonies also had a tendency to be more frequently infected by viruses from the AKI complex than strong colonies. As IAPV has been strongly associated with the phenomenon of Colony Collapse Disorder (CCD) experienced in the United States (Cox-Foster et al., 2007), this possible association should be further explored. However, no association with weakness was found for DWV or BQCV virus, which have both been previously significantly associated with a reduction in worker bee population (Soroker et al., 2010). As these PCR results are not quantified, it is possible that DWV and BQCV levels in the colonies of this study were not sufficient to cause visible weakening. Many factors (e.g. such as nutrition, immunity, stress and *V. destructor*) seem to influence the outcome of viral infections (DeGrandi-Hoffman and Chen, 2015), therefore it is possible that colonies in our study were not subjected to deleterious factors.

4.4. Limitations of the study

As beekeepers were selected based on a random selection of their apiaries, caution should be used when interpreting the prevalence at the beekeeper level. Beekeepers owning more apiaries had a higher chance of being selected for this study, therefore the prevalence reported might be more representative of those beekeepers, although this does not mean that they own a larger operation (e.g. owning five colonies each in a different location vs owning two large apiaries).

A single visit was carried out to evaluate all pathogen presence, at the moment of annual monitoring for SHB, however not all pathogens are at their peak of infection levels in August. *V. destructor* levels are known to vary exponentially through the beekeeping season (Martin, 1998). Fungi such as *A. apis* and *N. apis* are favored by humidity, cold and containment inside the hive, and are therefore more common in spring and fall, while warm temperatures promote the development of *N. ceranae* (Martín-Hernández et al., 2009).

European foulbrood is an endemic disease, but outbreaks can occur in the spring, when colonies are growing fast and food is scarce (Forsgren et al., 2013; Pernal and Clay, 2015). The prevalence reported for these pathogens in this study are therefore only valid for late summer, and future studies using our data for reference should adjust expected prevalence accordingly to the season.

It should be noted that assessment of colony strength, even when all carried out by a reduced number of experienced inspectors, is a subjective matter, and could prevaricate the associations described in this study. Tools for objective approximation of bee population (such as an assessment of the proportion of each frame covered by bees or actual count of bees on pictures of frames using artificial intelligence) should be developed for future studies to further explore the association of colony strength with pathogens.

5. Conclusion

This pilot study has highlighted the most common pathogens in southwestern Quebec and their association with clinical signs. It is clear that prevention and control measure should focus on *V. destructor*, which was present in the colonies of all beekeepers, and whose impact on colony health is clearly established, even if we were not able to demonstrate this at this time of the year. *Nosema spp.* and *M. plutonius* were the next more common pathogens. Weak colonies were more frequently infested with higher spore counts than strong colonies. A tendency of being more frequently infected by *M. plutonius* and the AKI virus complex was observed in weak colonies, when compared to stronger colonies. Scattered brood in the colony was associated with the presence of *M. plutonius*, which corroborates that colonies showing signs of scattered brood should be prioritized when screening for European foulbrood. Since beekeepers often failed to detect diseases in their apiaries when the pathogen responsible was present, except for *V. destructor*, beekeeper perception shouldn't be used to estimate pathogen prevalence in research or surveillance programs. These results provide preliminary data for future research and will help guide the implementation of prevention and control measures in Quebec.

Acknowledgements

The authors acknowledge the participant beekeepers for their time, and the MAPAQ, Marilou Morin, Dr. Jasmin Laroche and Dr. Lauriane Duplaix for their contribution. This study was made possible through a research grant from the Fond du centenaire of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal and scholarships provided by the Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and by the J. A. de Sève and Bank of Montreal foundations through the Faculty of Graduate Studies of the Université de Montréal to Gabrielle Claing. This work was also made possible by the financial assistance of the Centre de recherche en Sciences animales de Deschambault (CRSAD).

References

- Agriculture and Agri-Food Canada, 2016. Statistical Overview of the Canadian Honey and Bee Industry and the Economic Contribution of Honey Bee Pollination, 2013-2014.
- Aronstein, K., Murray, K., 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of invertebrate pathology* 103, S20-S29.
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and environmental microbiology* 67, 2384-2387.
- Bermejo, F.O., Rodriguez, R.B., Fernández, P.G., 1997. A scientific note on the current low levels of honey bee tracheal mite in southern Spain. *Apidologie* 28, 149-150.
- Bernier, M., Mercier, P.-L., Arsenault, J., Giovenazzo, P., 2017. Detection of small hive beetle (*Aethina tumida* Murray) in naturally infested hives using DNA analysis of hive debris and scraps. *Hive lights*. 11-13.
- Brown, B.V., 1993. Taxonomy and preliminary phylogeny of the parasitic genus *Apocephalus*, subgenus *Mesophora* (Diptera: Phoridae). *Systematic entomology* 18, 191-230.

- Brues, C.T., 1924. Notes on some New England Phoridae (Diptera). *Psyche* 31, 41-44.
- Budge, G.E., Pietravalle, S., Brown, M., Laurenson, L., Jones, B., Tomkies, V., Delaplane, K.S., 2015. Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PloS one* 10, e0133228.
- CAPA, 2016. Statement on Honey Bee Wintering Losses in Canada. Canadian Association of Professionals Apiculturists.
- Chauzat, P., Laurent, M., Rivière, M.-P., Saugeon, C., Hendrikx, P., Ribière-Chabert, M., Pathology Unit, H., 2014. A pan-European epidemiological study on honey bee colony losses 2012–2013. European Union Reference Laboratory for Honeybee Health, Brussels, Rapport technique.
- Clain, G., Dubreuil, P., Ferland, J., Bernier, M., Arsenault, J., 2019. Beekeeping management practices in southwestern Quebec. Unpublished work.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
- Currie, R.W., Gatién, P., 2006. Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies. *The Canadian entomologist* 138, 238-252.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012a. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and environmental microbiology* 78, 981-987.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012b. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PloS one* 7, e32151.

- de Miranda, J.R., Gauthier, L., Ribière, M., Chen, Y.P., 2012. Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. *Honey bee colony health: Challenges and Sustainable solutions*. Oxford, England: Taylor and Francis Group, 71-102.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current opinion in insect science* 10, 170-176.
- Delaplane, K.S., Hood, W.M., 1999. Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie* 30, 383-395.
- Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani Jr, H.F., Evans, J.D., Chen, Y., 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of general virology* 92, 151-155.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., 2013. Standard methods for varroa research. *Journal of apicultural research* 52, 1-54.
- FAO, 2016. Pollinators vital to our food supply under threat. Food and Agricultural Organization, Kuala Lumpur.
- FAO, 2018. FAOSTAT.
- Flores, J., Ruiz, J., Ruz, J., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F., 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie* 27, 185-192.
- Forsgren, E., Budge, G.E., Charrière, J.-D., Hornitzky, M.A., 2013. Standard methods for European foulbrood research. *Journal of apicultural research* 52, 1-14.
- Francis, R., Kryger, P., 2012. Single assay detection of acute bee paralysis virus, Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus. *Journal of apicultural science* 56, 137-146.

- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of apicultural research* 52, 1-28.
- Gajger, I.T., Tomljanović, Z., Petrinec, Z., 2010. Monitoring health status of Croatian honey bee colonies and possible reasons for winter losses. *Journal of apicultural research* 49, 107-108.
- Genersch, E., Aubert, M., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary research* 41, 54.
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P., Correa-Benítez, A., 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 41, 443-450.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., Genersch, E., 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of invertebrate pathology* 108, 167-173.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailon, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology* 10, 2659-2669.
- Higes, M., Meana, A., Bartolome, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports* 5, 17-29.

- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C., Laure, M.-L.N., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and environmental microbiology* 75, 7212-7220.
- Kingsley, D.H., 2007. An RNA extraction protocol for shellfish-borne viruses. *Journal of virological methods* 141, 58-62.
- Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 274, 303-313.
- Li, J., Peng, W., Wu, J., Strange, J.P., Boncristiani, H., Chen, Y., 2011. Cross-species infection of deformed wing virus poses a new threat to pollinator conservation. *Journal of economic entomology* 104, 732-739.
- Lindström, A., Fries, I., 2005. Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of apicultural research* 44, 82-86.
- MAPAQ, 2014. Calendrier des interventions pour le contrôle de la varroase dans un contexte de lutte intégrée. In: *comparatives*, G. (Ed.).
- Martin, S., 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological modelling* 109, 267-281.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L., Higes, M., 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and environmental microbiology* 75, 2554-2557.
- Moritz, R.F., De Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R.J., 2010. Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227-242.

- National Bee Diagnostic Centre, 2017. Canadian National Honey Bee Health Survey - 2016 report. Grande Prairie Regional College and Beaverlodge Research Farm, Beaverlodge, AB, 32.
- Olivier, V., Ribière, M., 2006. Les virus infectant l'abeille *Apis mellifera*: le point sur leur classification. *Virologie* 10, 267-278.
- Otten, C., 2003. A general overview on AFB and EFB pathogen, way of infection, multiplication, clinical symptoms and outbreak. *Apiacta* 38, 106-113.
- Pernal, S.F., Clay, H., 2015. Maladies et organismes nuisibles de l'abeille domestique. Association canadienne des professionnels de l'apiculture Beaverlodge (Alberta).
- Pettis, J.S., Delaplane, K.S., 2010. Coordinated responses to honey bee decline in the USA. *Apidologie* 41, 256-263.
- Sammataro, D., de Guzman, L., George, S., Ochoa, R., Otis, G., 2013. Standard methods for tracheal mite research. *Journal of apicultural research* 52, 1-20.
- Semkiw, P., Skubida, P., Pohorecka, K., 2013. The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. *Journal of apicultural science* 57, 107-121.
- Sergeant, E., 2019. Epitools epidemiological calculators. In: Ltd, A.P. (Ed.).
- Soroker, V., Hetzroni, A., Yakobson, B., David, D., David, A., Voet, H., Slabezki, Y., Efrat, H., Levski, S., Kamer, Y., 2010. Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie*.
- Steinkraus, K., H., Morse, R., A., 1992. American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. *Apidologie* 23, 497-501.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L.

and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and environmental microbiology* 70, 7185-7191.

Vallon, J., Wendling, S., 2017. De la surveillance individuelle à la surveillance collective : connaître le niveau d'infestation des colonies d'abeilles mellifères par *Varroa destructor* pour optimiser et rationaliser la lutte. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 80, 54-61.

Wilkins, S., Brown, M.A., Cuthbertson, A.G., 2007. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest management science* 63, 1062-1068.

Yang, X., Cox-Foster, D., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 134, 405-412.

Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7470-7475.

1 **Tables**

2 Table 1. Prevalence of pathogens in 242 colonies from 31 apiaries owned by 15 beekeepers in southwest Quebec, 2017.

Pathogen with case definition	Prevalence at various level according to visual inspection or laboratory testing of samples ^a						Prevalence according to beekeeper suspicion					
	Colony (n=242)			Apiary (n=31)			Beekeeper (n=15)			Beekeeper (n=15)		
	# pos	Prevalence		# pos	Prevalence		# pos	Prevalence		# pos	Prevalence	
	%	95% CL		%	95% CL		%	95% CL		%	95% CL	
<i>V. destructor</i>												
≥1 mite	134	48	[36-60]	29	93	[77-99]	15	100	[78-100]			
≥1% ^b	53	16	[10-25]	16	49	[31-68]	12	80	[52-96]	14	93	[68-100]
≥5% ^b	8	2	[0-5]	4	12	[3-29]	4	27	[8-55]			
≥10% ^b	4	1	[0-3]	3	9	[2-25]	3	20	[4-48]			
<i>A. woodi</i> ^c												
Visualized in trachea		-		0	0	[0-11]	0	0	[0-22]		-	
<i>Nosema spp.</i>												
≥1 ^d	88	40	[31-50]	24	78	[60-91]	11	73	[45-92]			
≥500,000 ^d	32	15	[9-23]	17	56	[37-74]	10	67	[38-88]	7	47	[21-73]
≥1,000,000 ^d	13	6	[3-10]	10	35	[19-54]	5	33	[12-62]			
<i>A. apis</i> ^e												
Mummy presence	13	7	[2-17]	5	18	[7-36]	1	7	[0-32]		-	
<i>M. plutonius</i>												
Culture-positive	57	21	[12-32]	17	55	[36-73]	8	53	[27-79]	4	27	[8-55]
<i>P. larvae</i>												
Culture-positive	0	0	[0-1]	0	0	[0-11]	0	0	[0-22]	3	20	[4-48]
DWV ^f												
Detected by PCR	61	33	[17-50]	22	88	[68-98]	13	87	[60-98]		-	
AKI complex ^g												
Detected by PCR	19	9	[3-20]	7	28	[12-50]	4	27	[8-55]			
BQCV ^g												
Detected by PCR	168	95	[88-98]	25	100	[86-100]	15	100	[78-100]		-	
<i>A. borealis</i> ^h												
Identified by PCR	1	1	[0-5]	1	5	[0-25]	1	14	[0-58]		-	
SHB												
Presence in hive	0	0	[0-1]	0	0	[0-11]	0	0	[0-22]		-	

- 3 ^a An apiary or beekeeper is considered positive if ≥ 1 colony is positive
- 4 ^b Percentage of infestation in alcohol wash (mite/100 bees)
- 5 ^c 31 pooled samples (1 per apiary)
- 6 ^d Number of spores counted in 60 bees
- 7 ^e Data missing for 1 colony
- 8 ^f 182 colonies tested in 25 apiaries, totalizing 15 beekeepers; data missing on BQCV for 2 colonies
- 9 ^g Data missing for 133 colonies

10

Table 2. Agreement between laboratory results and disease suspicion by beekeepers for the 2017 season in southwestern Quebec.

a. European foulbrood

Culture for <i>M. plutonius</i>	Beekeeper evaluation		Total
	Not suspected	Suspected	
Negative	6	1	7
Positive	5	3	8
Total	11	4	15

b. Nosemosis

<i>Nosema spp.</i> spore detection	Beekeeper evaluation		Total
	Not suspected	Suspected	
Negative	3	1	4
Positive	5	6	11
Total	8	7	15

Table 3. Distribution of clinical signs according to pathogen presence and p-value according to Rao-Scott Chi-Square test in 242 colonies (181 for viruses) in southwestern Quebec, 2017.

<i>a. Varroa destructor</i>			
Clinical sign	Number of colonies	% varroas-positives	P-value
<i>Positivity threshold: ≥ 1 mite</i>			
Strength of colony ^a			
Weak	33	48	0.38
Strong	206	57	
<i>Positivity threshold: ≥ 1 %</i>			
Strength of colony ^a			
Weak	33	18	0.44
Strong	206	23	
<i>Positivity threshold: ≥ 5 %</i>			
Strength of colony			
Weak	33	3	0.91
Strong	206	3	
<i>Positivity threshold: ≥ 10 %</i>			
Strength of colony			
Weak	33	0	1.00 ^b
Strong	206	2	
<i>b. Nosema spp.</i>			
Clinical sign	Number of colonies	% Nosema-positives	P-value
<i>Positivity threshold: ≥ 1 spore</i>			
Strength of colony ^a			
Weak	33	48	0.19
Strong	206	34	
<i>Positivity threshold: $\geq 500K$ spores</i>			
Strength of colony ^a			
Weak	33	27	0.041*
Strong	206	11	
<i>Positivity threshold: $\geq 1M$ spores</i>			
Strength of colony ^a			
Weak	33	12	0.048*
Strong	206	4	

c. M. plutonius

Clinical sign	Number of colonies	% positives	P-value
Strength of colony ^a			
Weak	33	33	0.15
Strong	206	22	
Detection of dead larvae ^c			
Yes	29	28	0.58
No	212	23	
Detection of scattered brood ^c			
Yes	36	36	0.009*
No	205	21	

d. DWV

Clinical sign	Number of colonies	% positives	P-value
Strength of colony ^a			
Weak	27	33	0.96
Strong	154	34	
Detection of deformed wings			
Yes	1	100	0.34 ^b
No	180	33	

e. AKI complex

Clinical sign	Number of colonies	% positives	P-value
Strength of colony ^a			
Weak	27	19	0.20
Strong	154	9	

f. BQCV ^d

Clinical sign	Number of colonies	% positives	P-value
Strength of colony ^a			
Weak	27	93	0.83
Strong	152	93	

N.B.: Significant p-values are marked by an asterisk.

^a Data missing for 3 colonies

^b According to exact Pearson Chi-Square test (not taking clusters into account), given rarity of occurrence

^c Data missing for 1 colony

^d Data missing for 2 colonies

Figures

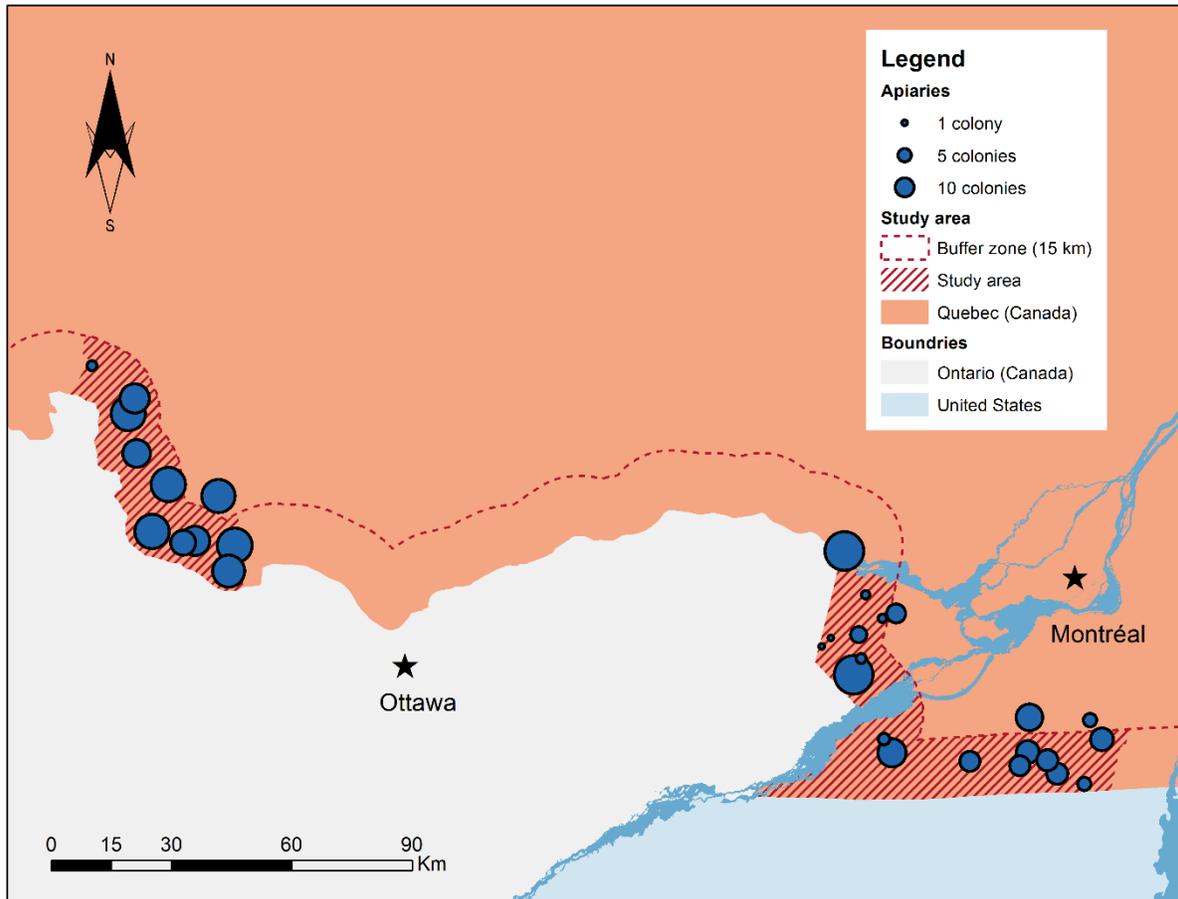


Figure 1. Spatial distribution and sizes of randomly selected apiaries owned by beekeepers participating in the study (southwestern Quebec, 2017)

Article 3. Risk factors for winter mortality of honey bees in southwestern Quebec⁴

Gabrielle Claing^a, Pascal Dubreuil^a, Julie Ferland^b, Martine Bernier^c, Edisleidy Rodriguez^b, Yvan L’Homme^d, Julie Arsenault^a

^a Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Quebec, Canada

^b Ministère de l’Agriculture, des Pêcheries et de l’Alimentation du Québec, Quebec City, Quebec, Canada

^c Centre de recherche en sciences animales de Deschambault, Deschambault, Quebec, Canada

^d Cégep Garneau, Quebec City, Quebec, Canada

Correspondence should be addressed to Gabrielle Claing, gabrielle.claing@umontreal.ca

Author contributions

Conceptualization : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Data curation : Gabrielle Claing

Formal analysis : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Funding acquisition : Gabrielle Claing, Julie Ferland, Julie Arsenault

Investigation : Gabrielle Claing, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme

Methodology : Gabrielle Claing, Pascal Dubreuil, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

Project administration : Gabrielle Claing, Julie Arsenault

Supervision : Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Julie Arsenault

Validation : Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

Writing – original draft : Gabrielle Claing

Writing – review & editing : Pascal Dubreuil, Julie Ferland, Martine Bernier, Edisleidy Rodriguez, Yvan L’Homme, Julie Arsenault

⁴ In preperation for submission to *Preventive Veterinary Medicine*

Abstract

Winter mortality of bees represents a major source of economic losses for the beekeeping industry. Pathogens, management practices and environmental factors are thought to be involved in this phenomenon, but their exact roles and interactive effects are still poorly understood. This pilot project aims to investigate the impact of these risk factors on overwintering mortality in southwestern Quebec. The pathogens *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Nosema spp.*, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, the deformed wing virus and viruses of the AKI complex were investigated on adult bees in 242 colonies of 31 apiaries of Pontiac and Montérégie areas in the province of Quebec in August 2017. Colony mortality, defined as less than 4 frames at least 75% covered by bees, was evaluated in May 2018. Overall colony mortality percentage was estimated to be 26.5% (IC 95% 15.4-40.3). Intra-apiary colony mortalities ranged from 0% to 100%, with a median of 30%. In logistic regressions accounting for clustering by apiaries, *V. destructor* was the only pathogen associated with winter mortality in colonies ($p=0.046$). An interaction was found between *V. destructor* and DWV, such that colonies positive to *V. destructor* and DWV had a significantly higher odds of mortality than colonies negative to both ($p=0.034$). In negative binomial regressions, no significant association with winter colony losses in apiaries was found for transhumance, wintering method, the most commonly found pesticide (imazalil), and immediate apiary environment. Apiaries belonging to beekeeper owning between 1 and 5 colonies experienced colony losses 3.77 more frequently than beekeepers owning over 100 colonies ($p=0.002$). This seems to indicate that the most important predictor of winter mortality are the experience and management practices of the beekeeper, as the number of colonies owned is strongly indicative of those, *V. destructor* infestation and DWV infection.

Keywords: risk factors; winter loss; honey bees

1. Introduction

Winter mortality of honey bees is an important indicator of a beekeeping business's successful management. Heavy winter losses, in addition to being a cause of stress to the beekeepers, lead to increased efforts to maintain production in the subsequent year. While the ideal goal would be to lose no hive during winter, the Canadian Association of Professional Apiculturists suggests a long-term baseline of less than 15% for winter losses (CAPA, 2018). In the last decade, winter mortality has always exceeded that threshold in Quebec (RAIZO, 2018). In the winter of 2017-2018, the wintering mortality for Quebec's beekeepers owning more than 50 colonies was estimated at 32.6% (CAPA, 2018).

Winter mortality is a complex phenomenon and while many causes have been hypothesised, their exact role and interactions between one another are still poorly understood. Several factors have been advanced to explain colony losses. One of those factors is exposition to toxic compounds. Pesticides used in agriculture, such as imidacloprid or deltamethrin, have been proven to have lethal effects and negative effects on bee learning performances, under semi-field and laboratory conditions (Moncharmont et al., 2003; Decourtye et al., 2004). Furthermore, acaricides used intentionally in the hive to control bee pests may have synergetic effects harmful to the bees when interacting with one another, or with other pesticides applied to crops, or even with untargeted pathogens such as *N. ceranae*; these interactions have been suspected of leading to colony mortality (Johnson et al., 2009; Johnson et al., 2010; Aufauvre et al., 2012). While acute impacts have been described, it is reasonable to expect that chronic exposure at sublethal concentrations, especially combined with other stress factors, might lead to reduced chances of survival through winter.

Environmental factors might also play a role in honey bee winter mortality. Monocultures lead to the destruction of wildflowers and a poorly diversified nutrition for honey bees. While pollen of poor quality might have limited consequences on healthy bees, it was found to have a significant impact on survival when bees are parasitized by *Nosema ceranae*, a gut pathogen (Di Pasquale et al., 2013). Several monopollen diets, such as sunflower or sesame, are deleterious compared to a mixed diet (Schmidt et al., 1987). Long-term weather conditions and climate have also been demonstrated to influence honey bee winter mortality (Switanek et al., 2017). Beekeeping management practices can lead to the

bees being exposed to different environments. Migratory beekeeping may have various impacts on bee health, through oxidative stress, food scarcity or pathogens (Simone-Finstrom et al., 2016; Alger et al., 2018). Overwintering methods (indoors vs outdoors) also modify the environment of the bees. It is worth noting that Quebec's population of beekeepers is divided in two distinct groups: about 50 large companies owned 80% of Quebec's bee colonies, more than 1,000 beekeepers owned the remaining 20% of colonies (Ferland, 2018). Therefore, and as variation in management practices has been demonstrated before (Claing et al., 2019a), it is reasonable to expect variation in associated losses among the general beekeeper population.

Finally, diseases and pests play an important role in honey bee mortality, on their own and through interactions with other previously listed factors (Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b; Chauzat et al., 2016). Among various pathogens, *Varroa destructor* has been largely identified as a cause of colony losses around the world, especially in Europe (Chauzat et al., 2010; Dainat et al., 2012a; Van Der Zee et al., 2015). Varroosis was reported by Canadian beekeepers as the second most important factor to explain winter mortality in 2016, after queen quality (ACPA, 2016). An Ontario study concluded that varroosis, being associated with > 85% of mortalities in 400 colonies, was the leading cause of winter mortality in this area, and probably in northern climates (Guzmán-Novoa et al., 2010). Other incriminated pathogens include *Nosema ceranae*, viruses such as Deformed Wing Virus (DWV) or viruses of the AKI complex, and *Paenibacillus larvae* (Higes et al., 2009; Dainat et al., 2012b; Chauzat et al., 2016).

Quebec beekeepers generally blame management or environmental issues as principal causes of winter losses, (RAIZO, 2016, 2017, 2018). However, the impact of pathogens may be underestimated because of the difficulty in detecting them: clinical signs may be difficult to detect or nonspecific, and the low use of laboratory services by beekeepers to confirm diagnosis is rare (Claing et al., 2019a). Furthermore, as winter mortality is a complex and multifactorial issue, it is difficult to pinpoint a main cause. In August 2017, a study conducted in southwestern Quebec reported that some bee pathogens were highly prevalent (Claing et al., 2019b). This article reports on the second part of this study, in which the investigated colonies were followed over a 9-month period with the objective to 1) estimate the winter mortality percentage and 2) evaluate the risk factors for winter mortality in southwestern Quebec, with focus on major bee pathogens, pesticides detected and management factors.

2. Material and methods

2.1. Study area and design

A cross-sectional study was conducted in the province of Québec as an extension of the yearly active monitoring for the small hive beetle performed by the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). The study area was defined as the strip located within 15 km of the border with the United States or Ontario province within the regional county municipalities of Montérégie-Ouest, Vaudreuil-Soulanges and Pontiac, which represents the active surveillance zone.

2.2. Selection and sampling of apiaries and colonies

A list of the 126 apiaries belonging to 38 beekeepers located in the study area was provided by the MAPAQ. This secondary study was conducted from a sample of 242 hives, 31 apiaries and 15 beekeepers initially randomly selected for a prevalence study (Claing et al., 2019b). The spatial distribution of apiaries is presented in Figure 1. The sampling took place from August 7, 2017 to September 1, 2017. Briefly, one agronomist, one biologist and one veterinarian performed the inspection and sampling while the owner of the bees was present. In each selected apiary, all colonies were sampled if 10 hives or less were present; otherwise, 10 hives were systematically selected. Colony strength was visually assessed according to proportion of brood frames covered by bees. Strong colonies had more than 60% of their brood frames covered by bees, mild colonies had between 30 and 60% and colonies were considered as weak when less than 30% of brood frames were covered by bees. The 3 oldest brood frames of the hive were thoroughly examined, and samples for pathogen and pesticide detection were collected. Colony strength (strong, mild or weak) and signs of disease (including dead larvae, scattered brood, chalkbrood, deformed wings and crawling bees) at time of selection were noted. Samples were kept either in alcohol or frozen until time of analysis, as previously described (Claing et al., 2019b). A short questionnaire on management practices for the apiary (*inter alia*, transhumance) was completed in an interview with the

beekeeper during the visit. The number of colonies in the apiary and the immediate environment (i.e. presence of trees, by tree line, or no trees) were noted.

2.3. Pathogen detection

Laboratory testing for pathogen detection was performed as previously described (Claing et al., 2019b). Briefly, *Varroas destructor* mites were counted on approximately 300 nurse bees per colony using the alcohol wash technic. *Nosema spp.* spores were counted in the guts of 60 foraging bees per colony. PCR was realized on 5 bees from spore positive colonies to identify the *Nosema* species present. For the search of foulbrood agents *Melissococcus plutonius* and *Paenibacillus larvae*, a homogenate from 30 nurse bees was cultured for each colony. *M. plutonius* was then identified by PCR on the positive cultures. DWV and the AKI viruses complex were identified by real-time PCR on a sample of 10 adult bees. *Acarapis woodi* was searched in the sectioned thorax of 50 pooled foraging bees for each of the apiaries.

2.4. Pesticides detection

For each colony, approximately 2 g of capped honey was collected from a middle frame of the top honey super, poured in plastic vials and stored at room temperature. A pool of 10 g of honey was formed for each apiary. The sample was prepared by mixing 2 g of honey to 2 ml of water, followed by addition of 1 ml of methanol and 19 ml of acetonitrile. The sample was shaken on a Geno Grinder system and then analyzed for pesticides and drug residues on LC-MS/MS with different injections (different pools of compounds). A negative control was added, in addition to the calibration standards. Each sample was fortified with an internal standard to correct variations in the injections on the device.

All detected pesticides were found at concentrations below limits for safe human consumption of honey (Maximum Residue Limit [MRL]). Azoxystrobin, coumaphos, ethion, ethirimol, flonicamide, permethrine-cis, piperonyl-butoxide, proquinazide, quizalofop, resmethrine, thiamethoxame and tralkoxydime were all detected in only one apiary. Chlorpyrifos and propargite were each detected twice. The most frequent pesticide was

imazalil, which was found in 8 apiaries out of 31, at concentrations between 0.023 and 0.042 mg/Kg.

2.5. Questionnaire

A questionnaire (available in complementary file) on wintering practices for the winter of 2017-2018 was developed and pre-tested by two professional beekeepers. It covered the total number of colonies owned by the beekeeper for the 2017 season and wintering method (indoors vs outdoors) for each apiary, as well as the outcome (winter survival or death) of each participating colony. Colony mortality was defined as such: colonies were considered as dead or unviable when less than 4 frames were covered at 75% by bees as seen from above on the 15th of May 2018. The questionnaire was administered by telephone interview with beekeepers between May 15 and May 28, 2018.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in the software SAS version 9.4. The percentage of winter mortality with exact confidence intervals for southwestern Quebec were estimated with the SURVEYFREQ procedure, taking strata by region, clusters by apiaries and sampling weight into account.

Logistic regression modeling winter mortality of colonies were built with the GENMOD procedure, taking colony clustering by apiaries into account with a compound symmetry covariance structure. All risk factors investigated were categorized (Table 1) and screened using univariable models. For *V. destructor*, categories were formed using 1 mite/100 bees as a threshold, as it is the recommended threshold for treatment in late summer both in Quebec and France (MAPAQ, 2014; Vallon and Wendling, 2017). For *Nosema spp.*, categories were formed based on the distribution of spore loads as shown in a previous analysis of our data (Clain et al., 2019b). Those with a p-value < 0.1 were included in a full multivariable model. The interaction of *V. destructor* and DWV on winter mortality was tested in the colony-level multivariable model regardless of univariable model results, as an

interaction was expected biologically. A backward selection procedure was then performed to keep only variables with a p-value < 0.05, and variables involved in a significant interaction.

Binomial negative regression modeling the number of death colonies per apiary were used to describe risk factors at the apiary level, performed with the GENMOD procedure. As imazalil was the only commonly found pesticide, it was the only pesticide tested as a risk factor for winter mortality at the apiary level. Other factors tested were the impact of transhumance (yes or no), wintering method (outdoors or indoor), environment (trees, by tree line or no trees) and number of colonies in the apiary. The number of colony per apiary was included as an offset. Variables were categorized and screened using univariable models (Table 2). No multivariable model was built as no factor had a p-value < 0.1.

At the beekeeper level, the association between the percentage of winter mortality in sampled colonies with the number of colonies owned in categories and the region was assessed with a Wilcoxon exact test (proc NPAR1WAY).

3. Results

3.1. Percentage of winter mortality

Overall winter mortality in sampled colonies was 30.5% (74/242). Estimated winter mortality percentage in southwestern Quebec for 2017-2018 was 26.5% (IC95% 15.4-40.3). Median intra-apiary colony mortality was 30%, ranging from 0 to 100%. At the beekeeper level (n=15), the median mortality of colonies was 37%.

3.2. Risk factors at the colony level

The distribution of mortality according to various colony-level factors is described in Table 1. As *Paenibacillus larvae* was not found in any sample, its impact on winter mortality could not be assessed.

V. destructor was the only statistically significant factor. According to univariable logistic regressions, colonies with ≥ 1 mites per 100 bees had higher odds of winter mortality when compared to colonies with between 0 and 1 (exclusively) mite per 100 bees. As there

was no significant difference between colonies with 0 and colonies with between 0 and 1 mite per 100 bees, the two categories were merged in multivariable regressions. The impact of the interaction between *V. destructor* and DWV on colony mortality is also presented in Table 1b. The odds ratio of mortality when the virus was present (vs when absent) in colonies where the level of infestation is below 1 mite/100 bees was 0.87 and was not significant ($p=0.71$). Neither was the odds ratio of mortality when the virus was present (vs when absent) in colonies where the level of infestation was above 1 mite/100 bees (OR=2.24, $p=0.14$).

Colonies with ≥ 1 mites per 100 bees and where the virus was present had 2.58 higher odds of mortality than colonies with less than 1 mite per 100 bees and free from DWV infection ($p=0.035$).

3.3. Risk factors at the apiary level

A. woodi was not detected in any pooled sample, therefore it could not be tested as a risk factor for winter mortality.

The distribution of mortality according to various apiary-level factors is described in Table 2. Among the risk factors tested, only the number of colonies in the apiary had a $p \leq 0.1$, with a significant ($p=0.027$) difference observable between apiaries of 5 or less colonies and apiaries of more than 25 colonies.

3.4. Risk factors at the beekeeper level

As shown in Table 3, the number of colonies owned by the beekeeper had a significant impact on the mean apiary mortality for the beekeeper, while no association was observed with the region where the beekeeper's apiaries were located.

4. Discussion

4.1. Percentage of winter mortality

Using the same definition as this study, the overall winter mortality of colonies in Quebec for all beekeepers varied between 15 and 30% in the last decade (RAIZO, 2018), which indicates that the mortality percentage obtained for southwestern Quebec was one of the worst, but not exceptional winter in recent years. Our results also concur with those of the Canadian Association of Professional Apiculturists, which estimated colony mortality in Quebec for the same winter at 32.6% for beekeepers with more than 50 colonies (CAPA, 2018). Similar losses (~25%) are reported in recent years in the United-States; however, summer losses were reported to be as high as winter losses, making overall mortality over the year reach 40% (Kulhanek et al., 2017). Future studies in Quebec and Canada should confirm when the majority of colony losses occur and, if summer mortality plays an important role in overall mortality, explore the factors associated to these losses.

4.2. Risk factors at the colony level

As shown in the neighboring province of Ontario (Guzmán-Novoa et al., 2010), we identified *V. destructor* as an important contributor to winter losses in southwestern Quebec. Other studies support this association in other parts of the world (Chauzat et al., 2010; Dainat et al., 2012a; Van Der Zee et al., 2015). Following sampling, all beekeepers in this study treated for *V. destructor* in the fall, but with various molecules, and not necessarily following recommended protocol (Claing et al., 2019a). Therefore, it was not possible to investigate if specific fall treatments had an impact on winter mortality. According to a survey on winter mortality conducted in Quebec, no significant difference in winter mortality between types of control method used against *V. destructor* mite (synthetic acaricides, organic acaricides or absence of treatment) (RAIZO, 2016, 2017). Taken together, this supports that higher summer *V. destructor* levels are a risk for winter mortality, regardless of the treatments applied in the fall. This concurs with the results of an experimental study which concluded that, as *V. destructor* alters the physiology of winter bees before their birth in late summer, treatments for *V. destructor* in late autumn might be too late to prevent winter losses (Amdam et al., 2004).

Neither of the two viruses studied had a significant impact on winter mortality on their own. This contrasts with a previous study conducted in apiaries where *V. destructor* levels was controlled with integrated pest management, in which DWV was reported to have a significant impact ($p=0.001$) on winter mortality by itself (Highfield et al., 2009). Dainat et al. (2012b) also found DWV presence in fall to be a predictive marker of winter losses. DWV presence from November to January was found to reduce the life span of winter bees, thus possibly contributing to overwintering losses (Dainat et al., 2012a). As our samples were collected in August, this suggests that presence of DWV in the summer is not predictive of winter losses, and therefore that colony infection status in summer might differ from colony status in fall or winter. Although the Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), the only virus of the AKI complex identified by sequencing in this study (Claing et al., 2019b), has previously been linked to the colony collapse disorder phenomenon in the United-States (Cox-Foster et al., 2007), subsequent studies have failed to demonstrate this association (Hunter et al., 2010). Likewise, our results seem to indicate that AKI complex viruses do not significantly increase the risk of winter mortality.

Although we did not observe an overall impact of DWV on winter mortality, its presence combined with high levels of *V. destructor* did. Interactions between viruses and *V. destructor* have been suspected and described in the past. For example, Carreck, Ball & Martin (2010) have shown that the *V. destructor* mite population in winter survivors was much smaller (under 2,000 mites) in colonies with at least one virus (DWV, cloudy wing virus or slow paralysis bee virus) present than in colonies where none of these viruses were detected. Our results concur with the fact that *V. destructor* supports DWV replication, and causes immune suppression of the parasitized bee (Yang and Cox-Foster, 2005). As such, *V. destructor* infestation in summer has previously been linked to DWV infection in fall (Hedtke et al., 2011). No interaction was found between *V. destructor* levels and infection with viruses of the AKI complex (data not shown). Transmission of those viruses by *V. destructor* has been demonstrated (Chen et al., 2004; de Miranda et al., 2010). Although ABPV has been suspected of being involved in the loss of *V. destructor*-infested colonies mainly in Europe (Békési et al., 1999), we could not demonstrate such an impact in Quebec.

Our *Nosema* positive samples were mostly (75%) infected with only one *Nosema* species, i.e. *N. ceranae*, which has been associated with colony depopulation in the past

(Higes et al., 2013). However, even though a tendency can be observed in winter mortality percentage as spore count increases, no significant association was found between *Nosema* positive samples and colony mortality. These results are consistent with those obtained by the German bee monitoring project (Genersch, 2010). The impact of *N. ceranae* on bee health and colony mortality is still poorly understood; in a recent broad review of the last 12 years of research, Martín- Hernández et al. (2018) concluded that the overall contribution of *N. ceranae* to honey bee losses was debatable.

To our knowledge, *M. plutonius* presence in the summer was never reported to have an impact on following winter mortality, and our results concurred with this. Similarly, in the United-Kingdom, *M. plutonius* was found to have no impact on colony strength (Budge et al., 2015).

Clinical signs observed in August (colony strength, dead larvae and scattered brood) do not appear to have an impact on winter mortality. Although colony strength was associated with higher *Nosema spp.* spore counts and scattered brood was associated with *M. plutonius* presence in a previous study (Claing et al., 2019a), this concurs with the fact that neither *Nosema spp.* nor *M. plutonius* were found to have an impact on winter mortality. It can therefore be concluded that clinical signs such as scattered brood or colony weakness in summer, while representative of current infection status, are not predictive of mortality over the subsequent winter.

4.3. Risk factors at the apiary level

Although long-distance moving of hives during the summer was suspected to negatively impact winter survival (Simone-Finstrom et al., 2016; Alger et al., 2018), our study did not reveal such association. Our results are congruent with a research project carried out in the Montérégie region of Quebec, which could not establish a link between the transport of hives for pollination and the size of the varroa population present in them (Dubreuil and Giovenazzo, 2004). The same project however noted a significant decrease in the total amount of honey produced during the summer when hives were transported. As there were only 4 migratory apiaries in our project, it is possible that our sample wasn't large enough to detect a significant difference.

Although imazalil was the most currently found pesticide in the apiaries of this study, its impacts on honey bees survival has not been studied to our knowledge. Our results suggest that its presence below MRL in honey during summer doesn't predict a higher apiary mortality overwinter. As the concentration of this pesticide was low in all apiaries (below limits for safe human consumption), it is also possible the exposure dose was not sufficient to negatively impact the winter mortality.

Despite the observable difference in mortality percentages between colonies wintered indoors and outdoors, no significant association was found. This tendency but lack of significance concurs with results of the MAPAQ's annual mortality surveys (RAIZO, 2016, 2017, 2018). Previous studies in northern temperate climates have reported greater losses in colonies wintered outdoors when compared to those wintered indoors (Williams et al., 2010; Desai and Currie, 2016). It is possible that this study did not possess the necessary statistical power to detect the impact of this factor.

The largely higher mortality in apiaries located in an entirely treeless environment compared to apiaries located among trees could be explained by a higher exposition to wind, thus forcing confinement and preventing foragers from seeking food resources. Trees can also be a source of pollen for the bees. Moreover, it is possible that many of those treeless environments were fields, which can force foragers to go a long distance to find food.

A smaller number of colonies in the apiary was the factor with the strongest tendency to higher winter mortality within the apiary, with $p=0.1$. The fact that apiaries of 5 or less colonies had a significantly higher mortality percentage when compared to apiaries of more than 25 colonies can be explained by the difference in experience of the beekeeper. Beekeepers with smaller apiaries tend to be less experienced than beekeepers with larger apiaries. This variable is closely related to the total number of colonies owned, which was an important predictor of winter mortality at the beekeeper level.

4.4. Risk factors at the beekeeper level

The number of colonies owned was an important risk factor for mortality in our model. Similarly, it was reported repeatedly in yearly survey conducted by the MAPAQ that as the number of colonies owned by a beekeeper increases, the mortality percentage decreases, even

if not statistically significantly (RAIZO, 2016, 2017, 2018). The number of colony owned is probably related to the occupation of the beekeeper (hobbyist vs professional), their experience, and their management techniques (Claing et al., 2019a), which could explain its strong impact on winter losses. These results concur with those of a pan-European active surveillance program which showed that the size of the operation and apiaries significantly affected overwinter losses (Chauzat et al., 2016).

4.5. Limitations of this study

Given the difficulty to determine the cause of death in a honey bee colony after the fact, *a priori* sampling and follow-up of a representative number of colonies is required to infer mortality causes and risk factors (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). However, as all samples were collected in the summer, and the outcome was measured in the following spring, the pathogen status of a colony might have changed between those two moments, either naturally, or following a beekeeper's intervention (especially regarding treatments).

The first limit of this study rests in the definition of colony mortality. No standard definition exists and many different definitions have been used across studies in literature (such as queen absence, less than 500 bees, less than 3 frames covered in bees, hive removal by the beekeeper); sometimes, the definition used isn't specified by the authors (Chauzat et al., 2010; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b; Chauzat et al., 2016). Therefore, comparison of results (mortality rates, risk factors) with other studies is limited.

Diagnostic tests used in this study had imperfect sensitivity, as explained for alcohol wash (since there is still brood in the hive in August, *V. destructor* might go undetected) and suspected for *P. larvae* culture on adult bees. Few information is available on the sensitivity and specificity of bee diseases in general, and future research on the subject is required. Bacteria and viruses were not quantified in this study, which limits the interpretation of their impact on colonies. Assessment of colony strength, even when all carried out by a reduced number of experienced inspectors, is a subjective matter, and could prevaricate the associations described in this study. Objective measurement (such as actual count of bees on frames) should be used in future studies to further explore the association of colony strength with pathogens.

As there was only one commonly found pesticide, and a wide variety of treatments used for *Varroa* control, it was not possible to test interactions between pesticides, or interaction of pesticides with acaricides used in the hive, even though such interactions have been reported before. An experimental design might be more appropriate to study these interactions, as there were too many variables to control in an observational study.

This study was based on a relatively small number of samples, and might have lacked statistical power; therefore, some associations might have been missed. Factors that showed a tendency to influence mortality percentages, even when non statistically significant, should be further explored in studies with larger sample size.

5. Conclusion

In the winter of 2017-2018, estimated winter mortality percentage in southwestern Quebec was 26.5% (IC95% 15.4-40.3). High levels of *V. destructor* and a combination of high *V. destructor* levels and DWV presence were both significant risk factors for colony mortality over winter. The number of colonies owned was also a significant predictor of winter mortality at the beekeeper level. This suggests that the most important predictors of winter mortality, apart from the pathogens present in the colonies, are the experience and management practices of the beekeeper, as the total number of colonies owned and number of colonies in an apiary are strongly indicative of those.

Acknowledgement

The authors would like to thank the participant beekeepers for their time, and the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Marilou Morin, Dr. Jasmin Laroche and Dr. Lauriane Duplaix for their contribution. This study was made possible through a research grant from the Fond du centenaire of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal and scholarships provided by the Fonds de recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and by the J. A. de Sève and Bank of Montreal foundations through the Faculty of Graduate Studies of the Université de Montréal

to Gabrielle Claing. This work was also made possible by the financial assistance of the Centre de recherche en Sciences animales de Deschambault (CRSAD).

References

ACPA, 2016. Rapport sur la mortalité hivernale de colonies d'abeilles au Canada. Association canadienne des professionnels de l'apiculture.

Alger, S.A., Burnham, P.A., Lamas, Z.S., Brody, A.K., Richardson, L.L., 2018. Home sick: impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size. *PeerJ* 6, e5812-e5812.

Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of economic entomology* 97, 741-747.

Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific reports* 2, 326.

Békési, L., V. Ball, B., Dobos-Kovács, M., Bakonyi, T., Rusvai, M., 1999. Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta veterinaria Hungarica* 47, 319-324.

Budge, G.E., Pietravalle, S., Brown, M., Laurenson, L., Jones, B., Tomkies, V., Delaplane, K.S., 2015. Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PloS one* 10, e0133228.

CAPA, 2018. Statement on Honey Bee Wintering Losses in Canada. Canadian Association of Professionals Apiculturists.

Carreck, N.L., Ball, B.V., Martin, S.J., 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *Journal of apicultural research* 49, 93-94.

- Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Madec, F., Bougeard, S., Cougoule, N., Drajnudel, P., Clément, M.-C., Aubert, M., Faucon, J.-P., 2010. The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *Journal of apicultural research* 49, 31-39.
- Chauzat, M.-P., Jacques, A., Laurent, M., Bougeard, S., Hendrikx, P., Ribière-Chabert, M., Consortium, E., 2016. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie* 47, 348-378.
- Chen, Y., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., Feldlaufer, M.F., 2004. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35, 441-448.
- Claing, G., Dubreuil, P., Ferland, J., Bernier, M., Arsenault, J., 2019a. Beekeeping management practices in southwestern Quebec. Unpublished work.
- Claing, G., Dubreuil, P., Ferland, J., Bernier, M., Rodriguez, E., L'Homme, Y., Arsenault, J., 2019b. Prevalence of honey bee pathogens, relation with clinical signs and perceived occurrence by beekeepers in southwestern Quebec. Unpublished work.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012a. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and environmental microbiology* 78, 981-987.
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012b. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PloS one* 7, e32151.
- de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010. The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of invertebrate pathology* 103, S30-S47.

- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delègue, M.-H., 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* 57, 410-419.
- Desai, S.D., Currie, R.W., 2016. Effects of wintering environment and parasite–pathogen interactions on honey bee colony loss in North Temperate regions. *PloS one* 11, e0159615.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., Alaux, C., 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PloS one* 8, e72016.
- Dubreuil, P., Giovenazzo, P., 2004. Projet de recherche sur les effets du temps de traitement, du transport et de la localisation des ruches sur les populations de *Varroa destructor* dans les ruches en Montérégie. Université de Montréal.
- Ferland, J., 2018. Les différents enjeux sanitaires apicoles au Québec et les activités du MAPAQ en apiculture. MAPAQ.
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352.
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P., Correa-Benítez, A., 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie* 41, 443-450.
- Hedtke, K., Jensen, P.M., Jensen, A.B., Genersch, E., 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of invertebrate pathology* 108, 167-173.

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., García-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental microbiology reports* 1, 110-113.
- Higes, M., Meana, A., Bartolome, C., Botias, C., Martin-Hernandez, R., 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports* 5, 17-29.
- Highfield, A.C., El Nagar, A., Mackinder, L.C., Laure, M.-L.N., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2009. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and environmental microbiology* 75, 7212-7220.
- Hunter, W., Ellis, J., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., Williams, M., Sela, I., Maori, E., Pettis, J., Cox-Foster, D., 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS pathogens* 6, e1001160.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie* 41, 312-331.
- Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R., 2009. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of economic entomology* 102, 474-479.
- Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., 2017. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of apicultural research* 56, 328-340.
- MAPAQ, 2014. Calendrier des interventions pour le contrôle de la varroase dans un contexte de lutte intégrée. In: comparatives, G. (Ed.).
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V., 2018. *Nosema ceranae* in

- Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology* 20, 1302-1329.
- Moncharmont, F.X.D., Decourtye, A., Hennequet-Hantier, C., Pons, O., Pham-Delègue, M.H., 2003. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry* 22, 3088-3094.
- RAIZO, 2016. Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2015. *Bulletin zoosanitaire*. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- RAIZO, 2017. Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2015-2016. *Bulletin zoosanitaire*. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- RAIZO, 2018. Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2016-2017. *Bulletin zoosanitaire*. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- Schmidt, J.O., Thoenes, S.C., Levin, M.D., 1987. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *Annals of the Entomological Society of America* 80, 176-183.
- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M.H., Strand, M.K., Rueppell, O., Tarpy, D.R., 2016. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific reports* 6, 32023.
- Switanek, M., Crailsheim, K., Truhetz, H., Brodschneider, R., 2017. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *The Science of the total environment* 579, 1581-1587.
- Vallon, J., Wendling, S., 2017. De la surveillance individuelle à la surveillance collective : connaître le niveau d'infestation des colonies d'abeilles mellifères par *Varroa*

destructor pour optimiser et rationaliser la lutte. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 80, 54-61.

Van Der Zee, R., Gray, A., Pisa, L., De Rijk, T., 2015. An observational study of honey bee colony winter losses and their association with *Varroa destructor*, neonicotinoids and other risk factors. PloS one 10, e0131611.

vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of invertebrate pathology 103, S80-S95.

Williams, G.R., Shutler, D., Rogers, R.E., 2010. Effects at Nearctic north-temperate latitudes of indoor versus outdoor overwintering on the microsporidium *Nosema ceranae* and western honey bees (*Apis mellifera*). Journal of invertebrate pathology 104, 4-7.

Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 7470-7475.

Tables

Table 1 a. Descriptive statistics and odds ratio from univariable logistic regressions modeling the winter mortality of honey bee colonies according to the detection of pathogens and clinical signs (242 colonies from 31 apiaries, southwestern Quebec, 2017).

Characteristics	Number of colonies	% of mortality	Odds ratio		P-value
			OR	P-value	
<i>V. destructor</i> (mites/100 bees)					0.046
0	108	30	Ref		
]0,1[*	81	25	0.77	0.36	
≥1 *	53	42	1.63	0.13	
<i>Nosema spp.</i> (spores/60 bees)					0.43
0	154	29	Ref		
]0-50,000[56	30	1.12	0.70	
[50,000-1,000,000[19	37	1.47	0.26	
≥1,000,000	13	46	2.17	0.16	
<i>Nosema ceranae</i> (n=224 ^a)					0.74
0	156	30	Ref		
]0-50,000[45	29	0.96	0.92	
[50,000-1,000,000[15	40	1.29	0.53	
≥1,000,000	8	50	2.02	0.32	
<i>P. larvae</i>					-
Absence	242	31			
Presence	0	-	-	-	
<i>M. plutonius</i>					0.48
Absence	185	32	Ref		
Presence	57	25	0.79	0.48	
DWV (n=182 ^b)					0.51
Absence	121	25	Ref		
Presence	61	38	1.31	0.51	

AKI (n=182 ^b)					0.82
Absence	163	28	Ref		
Presence	19	42	1.09	0.82	
Strength in August (n=239 ^b)					0.31
Strong	206	30	Ref		
Weak	33	33	1.36	0.31	
Dead larvae (n=241 ^b)					0.37
No	212	29	Ref		
Yes	29	42	1.41	0.37	
Scattered brood (n=241 ^b)					0.32
No	205	29	Ref		
Yes	36	39	1.48	0.32	

^a Excluding cases in which the species was not identified.

^b Missing data were present.

* Significantly different categories (p=0.002).

Table 1 b. Odds ratio from a multivariable logistic regression modeling winter mortality of honey bee colonies according to *V. destructor* and DWV detection in 182 colonies collected in 28 apiaries of southwestern Quebec, 2017.

Characteristics	Number of colonies	% of mortality	Odds ratio		Predicted probability (%)	P-value
			OR	P-value		
DWV-negative						0.034
<i>V. destructor</i>						
<1 mite/100 colonies	95	24			28	
≥1 mite/100 colonies	26	27	1.34	0.25	34	
DWV-positive						
<i>V. destructor</i>						
<1 mite/100 colonies	34	24			25	
≥1 mite/100 colonies	27	56	3.46	>0.001	53	

Table 2. Descriptive statistics and odds ratio from univariable binomial regressions modeling the winter mortality according to characteristics at the apiary level (31 apiaries, southwestern Quebec, 2017).

Characteristics	Nb of apiaries	Mean colony mortality in apiaries	Incidence rate ratio		P-value
			IRR	P-value	
Transhumance (n=29 ^a)					0.23
No	25	37	Ref		
Yes	4	50	1.69	0.23	
Imazalil					0.25
Absence	23	35	Ref		
Presence	8	48	1.55	0.25	
Wintering method					0.15
Indoors	11	24	Ref		
Outdoors	20	46	1.63	0.15	
Environment					0.14
Trees	2	10	Ref		
By tree line	21	37	2.92	0.19	
No trees	8	46	4.65	0.07	
Number of colonies in the apiary					0.10
26-40	10	22	Ref		
6-25	11	33	1.61	0.22	
1-5	10	58	2.79	0.027	
<i>Acarapis woodi</i>					-
Absence	31	37			
Presence	0	-	-	-	

^a Excluding missing data

Table 3. Median winter mortality of colonies for beekeepers according to characteristics at the beekeeper level (15 beekeepers, southwestern Quebec, 2017).

Characteristics	Number of beekeepers	Median colony mortality for beekeepers	P-value ^a
Number of colonies owned			
1-5	6	58	0.038
6-100	6	35	
>100	3	10	
Region			
Pontiac	3	33	0.87
Monteregie	12	38	

^a According to exact Wilcoxon test.

Figures

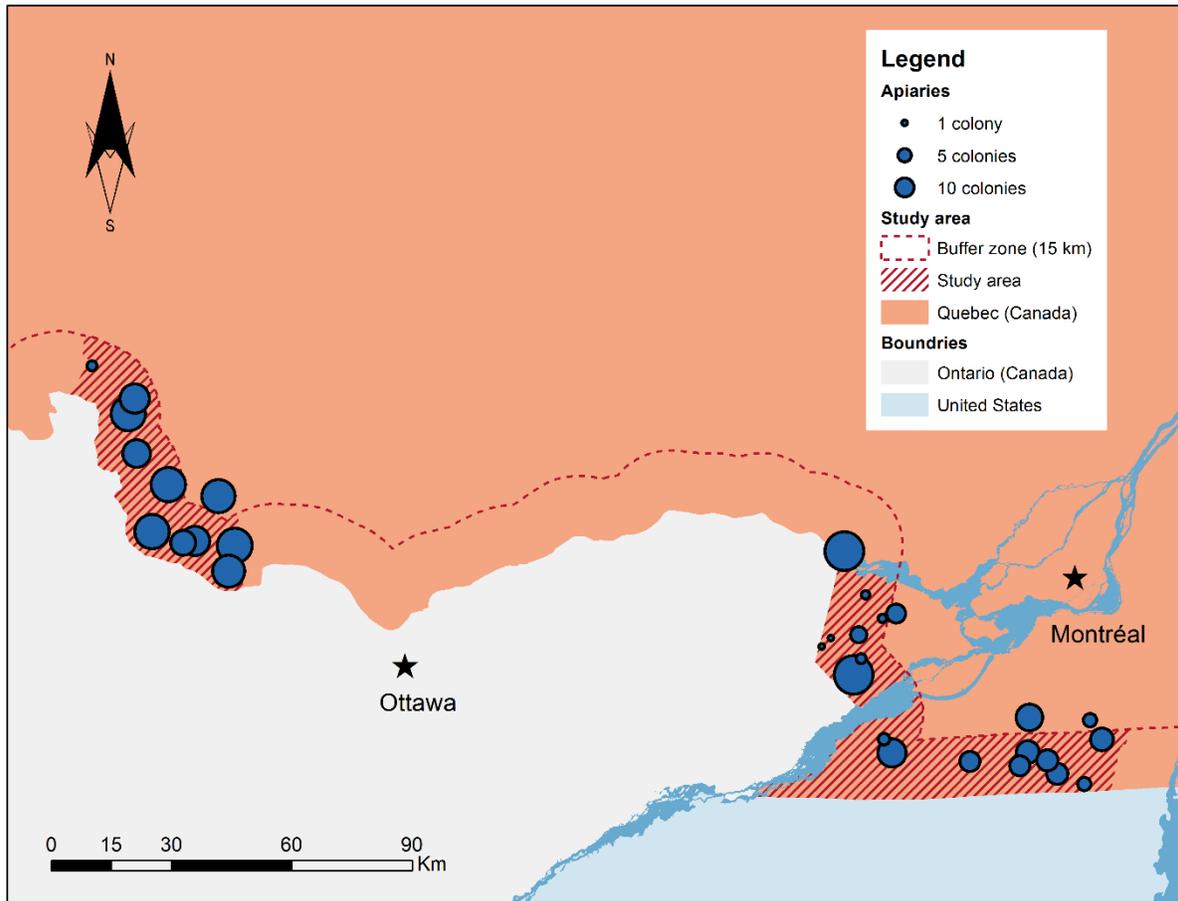


Figure 1. Spatial distribution and sizes of randomly selected apiaries owned by beekeepers participating in the study (southwestern Quebec, 2017)

Discussion et conclusion

Ce projet de recherche se penchait sur les principaux agents pathogènes de l'abeille domestique et leur impact sur la mortalité hivernale des colonies. Nous avons donc considéré les hypothèses suivantes : 1) La population d'apiculteurs du sud-ouest du Québec utilise des pratiques de régie variées; 2) Plusieurs agents pathogènes sont présents dans les populations d'abeilles du sud-ouest du Québec; 3) Les perceptions des apiculteurs des maladies présentes sont différentes du statut sanitaire de leurs ruchers tel que déterminé en laboratoire; 4) La présence de certains signes cliniques pourrait être associée à la présence de certains agents pathogènes au niveau de la colonie; 5) Certains agents pathogènes ont un impact sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles domestiques, *Apis mellifera*, au sud-ouest du Québec. Les objectifs suivants ont été déterminés en conséquence : 1) Décrire la population d'apiculteurs du sud-ouest du Québec et leurs pratiques de régie; 2) Estimer la prévalence des colonies et/ou ruchers positifs aux principaux agents pathogènes, ravageurs et agents toxiques pouvant être rencontrés chez les abeilles du sud-ouest du Québec; 3) Évaluer l'accord entre la perception des apiculteurs des maladies présentes dans leur entreprise et le statut sanitaire des ruches tel que déterminé en laboratoire; 4) Évaluer l'association entre la présence des agents pathogènes dans les colonies et les signes cliniques qui y sont observés; 5) Évaluer l'impact des agents pathogènes sélectionnés sur la mortalité hivernale.

La mortalité hivernale des colonies d'abeilles domestiques est un problème récurrent au Québec depuis la dernière décennie (RAIZO, 2018). Plusieurs facteurs, incluant les agents pathogènes et les maladies associées, ont été avancés pour expliquer les pertes de colonies. Cependant, l'impact des agents pathogènes peut être sous-estimé en raison de signes cliniques difficiles à détecter ou non spécifiques, et en raison de la faible utilisation des services de laboratoire par les apiculteurs pour la détection de ces agents pathogènes. De plus, la mortalité hivernale étant un problème complexe et multifactoriel, il est difficile, voire impossible, de déterminer une cause principale dans la majorité des cas.

Les résultats de ces travaux fournissent des pistes de solution aux apiculteurs afin de lutter contre la mortalité hivernale via le contrôle des maladies. Les pratiques apicoles actuelles ont été décrites afin de cibler les pratiques de régie qui pourraient être améliorées

pour permettre un meilleur contrôle des maladies. Les données sur la prévalence estimée, l'accord entre la perception de l'apiculteur et la détection en laboratoire et l'association entre l'agent et les signes cliniques observés, permettront d'orienter les mesures de prévention et de contrôle, et de déterminer des protocoles d'échantillonnage fiables, que ce soit pour la recherche scientifique ou la surveillance des maladies. Finalement, les résultats de ce projet permettront de prioriser certains facteurs, pathologiques ou non, dans les efforts de lutte contre la mortalité hivernale.

Objectif 1: Décrire la population d'apiculteurs du sud-ouest du Québec et leurs pratiques de régie

Une importante conclusion de ce projet est qu'il existe non seulement une grande disparité dans les mesures de régie des opérations apicoles, mais également dans leur taille. Néanmoins, quelques tendances générales se sont démarquées.

Notamment, les apiculteurs ne confirmaient que très rarement en laboratoire les maladies qu'ils suspectaient, malgré le fait que ce service soit fourni gratuitement aux apiculteurs du Québec. Ceci pourrait être dû au fait que les apiculteurs ne sont pas au courant de ce service, à un manque de temps, de confiance dans les autorités, à un délai excessif avant de connaître les résultats, ou encore par crainte des conséquences (par exemple, destruction des ruches).

Les apiculteurs évitaient généralement les acaricides à toxicité élevée (e.g. coumaphos) (Johnson et al., 2009), les traitements chimiques associés à la résistance aux antimicrobiens ou antiparasitaires (e.g. oxytétracycline, tau-fluvalinate) (Milani, 1999; Miyagi et al., 2000) et les traitements dont l'efficacité est remise en question (e.g. fumagiline B) (Williams et al., 2010; Huang et al., 2013). La régie apicole n'ayant pas été l'objet d'études descriptives dans la littérature, il est difficile de trouver un standard comparatif pour ces résultats. Les pratiques décrites dans ce projet sont toutefois en accord avec celles rapportées par les données de surveillance passive au Québec; la grande majorité des apiculteurs effectuent un dépistage de la varroase (~70%), les acides organiques sont préférés aux acaricides de synthèse pour le contrôle de la varroase, et la fumagilline et les antibiotiques ne sont que rarement utilisés par les apiculteurs (<16%) (RAIZO, 2018). Selon ce projet, plutôt que d'utiliser ces traitements

chimiques nocifs, les apiculteurs mettaient en place des mesures de régie préventives ou d'éradication lorsque les maladies infectieuses telles que la loque européenne, loque américaine ou nosérose étaient soupçonnées, tel que recommandé dans le standard national (CFIA, 2013). Cependant, les mesures de contrôle biomécaniques qui permettraient de réduire ou retarder l'usage de traitements chimiques en diminuant la population de *V. destructor* (Delaplane et al., 2005; Wantuch et Tarpy, 2009) n'étaient que rarement utilisées.

Les efforts éducatifs devraient donc être centrés sur les services médicaux disponibles et leur importance, ainsi que les stratégies alternatives de contrôle des maladies. Cette éducation devrait cibler autant les grandes, moyennes et petites entreprises afin de standardiser une approche médicale préventive et d'éviter la propagation des maladies infectieuses. L'établissement d'un lien de confiance avec les autorités offrant ces services afin de promouvoir leur utilisation est également primordiale.

Objectif 2: Estimer la prévalence des colonies et/ou ruchers positifs aux principaux agents pathogènes, ravageurs et toxiques rencontrés chez les abeilles du sud-ouest du Québec

Parmi les agents pathogènes étudiés, *Varroa destructor* est l'agent le plus répandu dans le sud-ouest du Québec, présent dans ~50% des colonies en août 2017 et dans les ruchers de tous les apiculteurs. Ceci concorde avec plusieurs autres études ayant démontré l'ubiquité du parasite dans les colonies et ruchers, tant en Amérique du Nord qu'en Europe (Genersch et al., 2010; Guzmán-Novoa et al., 2010; Hedtke et al., 2011). Étant donné son impact démontré sur la survie des colonies (voir objectif 5), il est essentiel de prioriser les mesures de prévention et de contrôle visant ce parasite. Un point important de ces travaux est que *V. destructor* n'est que très rarement observé sur les abeilles adultes lors d'inspections, et que par conséquent, l'identification visuelle du parasite n'est pas une méthode de dépistage appropriée. Les méthodes quantitatives telles que le lavage à l'alcool ou la chute naturelle hebdomadaire moyenne sur plusieurs jours devraient être prioritaires. Cependant, à ce temps de l'année, la visualisation de *V. destructor* sur les abeilles adultes semble être indicatrice d'une forte infestation.

Nosema spp. (causant la nosérose) et *Melissococcus plutonius* (causant la loque européenne) étaient les second et troisième agents pathogènes les plus répandus (avec ou sans signes cliniques), avec respectivement 40% et 20% des colonies infectées. *Nosema spp.* a été retrouvé en proportion similaire dans les échantillons de surveillance active en Allemagne (Genersch et al., 2010); cependant pour *M. plutonius*, il s'agit d'une présence plus forte que la prévalence de moins de 5% précédemment rapportée en Europe (Wilkins et al., 2007; Chauzat et al., 2014; Budge et al., 2015). L'agent de la loque américaine (*Paenibacillus larvae*), une maladie beaucoup plus redoutable que la loque européenne, n'a été détecté dans aucune colonie du projet. Selon les données d'Amérique du Nord et d'Europe, une prévalence faible était attendue (Steinkraus et Morse, 1992; Genersch et al., 2010). De plus, la distribution de cette infection semble très hétérogène, se présentant uniquement dans certaines entreprises (Steinkraus et Morse, 1992), régions et années (Otten, 2003). Puisque nous avons développé une nouvelle méthode pour détecter ces bactéries du couvain sur les abeilles adultes, et vérifié la sensibilité de celle-ci uniquement sur des échantillons positifs provenant de cas cliniques, il est possible que la sensibilité de notre test était insuffisante pour détecter des cas d'infection sous-clinique. En effet, aucun signe clinique n'a été observé dans les colonies lors de l'échantillonnage.

Le virus le plus présent était le BQCV, étant presque ubiquitaire (>90% des colonies), suivit par le DWV (~30%) et les virus du complexe AKI (~10%). Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus en Israël et en Allemagne (Genersch et al., 2010; Soroker et al., 2010; Hedtke et al., 2011). Étant donné le rôle du DWV dans la mortalité des colonies (voir objectif 5), cette importante présence du virus devrait également faire la cible de mesures de prévention et de contrôle. Puisque le contrôle de la varroase permet de diminuer la charge de DWV (Martin et al., 2010; Dainat et al., 2012b), le contrôle de *V. destructor* devient d'autant plus important. Seul le virus IAPV a été identifié par séquençage chez les cas positifs de AKI, indiquant que les virus ABPV et KBV sont soit absents au Québec, soit mal détectés par le système d'amorce du complexe AKI. Puisque les amorces de PCR utilisés pour la détection de chaque virus peuvent s'amarrer à l'ARN de leurs virus homologues, un séquençage est nécessaire pour distinguer les virus. Bien que le KBV ait déjà été détecté par PCR au Québec (National Bee Diagnostic Centre, 2017a), l'absence de séquençage ne permet pas de conclure

sur la présence de ce virus spécifique au Québec, mais seulement sur la présence d'un virus du complexe AKI.

Un cas d'infestation par *Apocephalus borealis* a été détecté, confirmant la présence de cette mouche parasite dans les colonies du Québec. *Acarapis woodi* (mite de la trachée) et le petit coléoptère de la ruche n'ont pas été détectés. Ceci confirme la rareté de cette infestation (sensible aux acaricides utilisés pour le contrôle de *V. destructor*) pour le premier, et supporte l'absence de population établie de cet envahisseur exotique pour le second.

Ces prévalences représentent la présence des agents pathogènes, et non celle des cas cliniques. On peut émettre l'hypothèse que la proportion de cas d'infections symptomatiques sont inférieures aux résultats présentés, et donc qu'une prévalence basée sur l'évaluation clinique des colonies serait inférieure. Il ne s'agit donc pas de la proportion de cas problématiques, mais bien de cas potentiellement problématiques si l'agent atteint des niveaux nocifs pour la colonie. Par ailleurs, à l'exception de *V. destructor* et *Nosema spp.*, les méthodes utilisées pour détecter les agents pathogènes n'étaient pas quantitatives. L'impact de la présence des agents est présenté à l'objectif 4 et 5.

Objectif 3: Évaluer l'accord entre la perception des apiculteurs des maladies présentes dans leur entreprise et le statut sanitaire des ruches tel que déterminé en laboratoire.

La perception des maladies par les apiculteurs n'était généralement pas en accord avec les agents pathogènes détectés en laboratoire. Cependant, il est important de mentionner que l'apiculteur donnait sa perception pour l'ensemble de la saison, c'est-à-dire qu'il croyait ou non avoir eu une maladie dans ses ruchers durant l'été. Puisque les échantillons étaient prélevés à un point fixe dans le temps, il est possible que l'apiculteur ait effectivement observé la maladie avant ou après l'échantillonnage, et qu'un changement de statut ait eu lieu entre le moment d'observation par l'apiculteur et le prélèvement. De plus, il est possible que l'apiculteur ait observé la maladie dans d'autres colonies que celles échantillonnées. Cependant, si l'échantillon est positif, et que l'apiculteur n'a jamais observé la maladie, alors il s'agit d'un désaccord véritable. Les résultats de ce projet démontrent que, à l'exception de *V. destructor*, les apiculteurs ne détectent souvent pas de maladies dans leurs ruchers lorsque

le pathogène responsable est présent. Ceci peut être expliquée par l'absence de signes cliniques lors d'infection subclinique ou encore par un manque de connaissance ou d'intérêt pour certaines maladies. Pour certaines maladies, les signes cliniques ressemblent aux signes d'autres maladies et peuvent donc être difficiles à distinguer pour les apiculteurs, particulièrement pour les moins expérimentés, et même pour les professionnels de la santé de l'abeille. Pour d'autres maladies, telles que les virus, aucun traitement n'est disponible, et la prévention est plutôt réalisée via le contrôle du vecteur *V. destructor*. Les apiculteurs pourraient donc juger inutile de rechercher les symptômes cliniques de ces maladies.

Par conséquent, même si cela est parfois fait (Dahle, 2010), la perception des apiculteurs ne devrait pas être utilisée comme outil diagnostique pour estimer la prévalence d'agents pathogènes dans les programmes de recherche ou de surveillance, ou du moins, son interprétation devrait être prudente. Une formation spécifique pourrait permettre d'améliorer la perception des apiculteurs si elle est utilisée pour la surveillance, pour les maladies plus facilement identifiables cliniquement par des observateurs expérimentés. Cette solution ne serait pas possible pour des maladies virales, ou pour la nosérose. Il en va de même pour l'étude des facteurs de risque pour la mortalité hivernale; ces études, lorsque basées sur des sondages, rapportent souvent la cause selon les apiculteurs (Brodschneider et al., 2010; Currie et al., 2010; Dahle, 2010). Il faut rappeler que ces causes n'ont pas été validées en laboratoire. Généralement, afin de pallier cette limite, les études basées sur des sondages analysent l'effet protecteur des pratiques de régie mises en place contre les agents pathogènes sur la mortalité hivernale, plutôt que d'étudier l'impact négatif de l'agent présumément en cause selon les apiculteurs sur la mortalité (Charrière et Neumann, 2010; Clermont et al., 2014).

Objectif 4: Évaluer l'association entre la présence des agents pathogènes dans les colonies et les signes cliniques qui y sont observés.

Les associations ont été présentées afin de décrire la probabilité de retrouver un agent pathogène selon la présence d'un certain signe clinique. Ce type de donnée pourrait permettre d'orienter des protocoles d'échantillonnage ciblé.

Étant donné l'impact reconnu de *V. destructor* et des virus qui y sont associés sur la santé des colonies (Yang et Cox-Foster, 2005; Yang et Cox-Foster, 2007; Guzmán-Novoa et

al., 2010; Dainat et al., 2012a), il aurait été possible de trouver plus d'acariens chez les colonies faibles que chez les colonies fortes. Cependant, la dynamique de la population de l'acarien suit celle des abeilles, par conséquent une colonie populeuse (i.e. forte) pourrait être fortement parasitée. Ceci est particulièrement vrai au mois d'août, alors que l'acarien peut être caché dans le couvain et, par le fait même, échapper au décompte par lavage à l'alcool effectué dans ce projet. Il n'est donc pas si étonnant que ce projet de recherche n'ait trouvé aucune association entre la faiblesse dans les colonies et la présence concomitante de l'acarien en fin d'été. L'impact réel du parasite se fait sentir à travers le temps, tel que démontré à l'objectif 5.

Bien que l'effet de *Nosema ceranae* (l'espèce de *Nosema* principalement observée dans ce projet) fasse l'objet de controverse dans la littérature (Higes et al., 2013), nous avons démontré qu'en été, le mycète était présent en quantité significativement plus élevée chez les colonies faibles que chez les colonies fortes. Cependant, cette association n'indique pas si la faiblesse des colonies permet la prolifération du fungus, ou si c'est la charge importante de fungus qui entraîne la faiblesse de la colonie. Il serait intéressant d'effectuer un étude cohorte suivant la force des colonies et les niveaux d'infestation dans le temps, afin de déterminer la direction de la causalité dans cette association.

Nos résultats suggèrent également que les colonies présentant du couvain en mosaïque sont de meilleures cibles d'échantillonnage pour la recherche de *Melissococcus plutonius* (puisque cette association est hautement significative) que les colonies présentant seulement quelques larves mortes (où aucune association n'a été démontrée).

Aucune association n'a pu être démontrée entre la force de la colonie et la présence de virus. Ceci pourrait être attribuable à l'absence de quantification; il est possible que les virus n'étaient pas présents en quantité suffisante pour avoir un impact sur la force des colonies, tel que précédemment rapporté dans la littérature (Cox-Foster et al., 2007; Soroker et al., 2010).

Objectif 5: Évaluer l'impact des agents pathogènes sélectionnés sur la mortalité hivernale, principal marqueur de la santé de la colonie.

De nombreuses études ont tenté de déterminer la présence des agents pathogènes et d'élucider leur rôle dans les mortalités hivernales de différents pays à travers le monde. Nos

résultats suggèrent que le principal agent pathogène responsable pour la mortalité des colonies au Québec est *V. destructor*. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés en Ontario (Guzmán-Novoa et al., 2010) et en Europe (Chauzat et al., 2010a; Dainat et al., 2012a; Van Der Zee et al., 2015) (voir le tableau I dans la section 2.1.1. de la *Revue de littérature*), ainsi qu'avec les suspicions rapportées par les professionnels de l'apiculture canadiens, qui utilisent la même définition de mortalité (ACPA, 2016). Puisque l'infestation par *V. destructor* a été évaluée en août, nos résultats indiquent qu'une forte infestation en été a déjà un impact sur les chances de survie pour l'hiver, peu importe les traitements appliqués à l'automne. Ceci concorde avec le fait que *V. destructor* altère le développement physiologique des jeunes abeilles parasitées; puisque les abeilles d'hiver ont déjà émergées avant les traitements automnaux, ces-derniers n'empêcheront pas les effets néfastes du parasite et des virus associés sur la physiologie de la population hivernale (Amdam et al., 2004). Ceci remet donc en question le contrôle de *V. destructor* par un unique traitement automnal tardif.

Aucun autre agent pathogène ou signe clinique n'a été associé à la mortalité des colonies. Alors que certaines études ont rapporté un effet significatif de *Nosema spp.* sur la mortalité hivernale (Dainat et al., 2012b; Chauzat et al., 2016), d'autres n'ont détecté aucun effet significatif (Genersch et al., 2010; Guzmán-Novoa et al., 2010; Soroker et al., 2010; Van Der Zee et al., 2015) (voir le tableau IV dans la section 2.3.1. de la *Revue de littérature*). Très peu d'études ont étudié l'impact de la présence de *Melissococcus plutonius* sur la mortalité hivernale, mais une étude européenne n'a noté aucun impact de la forme clinique de la loque européenne sur la mortalité hivernale (Chauzat et al., 2016), ce qui semble en accord avec les résultats de ce projet (voir le tableau III dans la section 2.2.2. de la *Revue de littérature*). Finalement, le DWV a été associé à la mortalité hivernale dans plusieurs études (Genersch et al., 2010; Soroker et al., 2010; Dainat et al., 2012b) (voir le tableau V dans la section 2.4.1. de la *Revue de littérature*). Malgré l'absence d'effet sur la mortalité pour le DWV seul dans ce projet, un effet d'interaction a été démontré entre *V. destructor* et le DWV sur la mortalité hivernale. En effet, l'augmentation de mortalité entre les colonies parasitées par moins de 1 acarien/100 abeilles et celles parasitées par 1 acarien ou plus/100 abeilles en août était bien plus drastique lorsque le virus était présent que lorsqu'il était absent. Puisque *V. destructor* supporte la réplication virale du DWV et affaiblit le système immunitaire des abeilles, une

telle association entre le parasite et le virus était attendue. De telles associations entre virus et acarien ont été décrites par le passé (Carreck et al., 2010; Hedtke et al., 2011).

Outre les facteurs au niveau des colonies, le plus important facteur de risque pour la mortalité hivernale était le nombre de colonies possédées par l'apiculteur : un petit nombre de colonies était associé à un taux de mortalité plus élevé. Cette association a également été décrite dans les travaux de recherches pan-européens menés par Chauzat et al. (2016), et des interactions entre la taille d'entreprise et d'autres facteurs tels que les signes cliniques de maladie ont été soulignés. Cependant, puisque nous n'avons pas pu bâtir de modèle multiniveau, il n'a pas été possible de vérifier ces interactions dans le présent projet. Bien que la tendance entre mortalité élevée et petite taille d'entreprise ait été rapportée de façon répétée dans les rapports annuels rédigés par le gouvernement du Québec (RAIZO, 2016; RAIZO, 2017; RAIZO, 2018), une association significative n'avait jusqu'ici jamais été démontrée. Bien que les micro-élevages d'animaux permettent en général l'application de soins de santé individualisées pouvant conduire à une meilleure survie, il semble que chez les apiculteurs, ce ne soit pas le cas. Les résultats de ce projet ont démontré que les pratiques de régie tendaient à être homogènes entre apiculteurs possédant un nombre similaire de colonies, et différentes entre ces catégories d'apiculteurs : un petit nombre d'apiculteurs possédant de nombreuses colonies utilisaient certaines pratiques, alors que d'autres pratiques étaient utilisées par un grand nombre d'apiculteurs possédant un petit nombre de colonies. Par exemple, 27% des apiculteurs offraient des services de pollinisation, mais ceci représentait 83% des colonies. Un autre exemple : 20% des apiculteurs hivernaient leurs colonies à l'intérieur, mais ceci représentait 67% des colonies. Ceci démontre une différence probable d'expérience et de ressources entre les apiculteurs professionnels et les apiculteurs hobbyistes. Il est donc logique que les apiculteurs professionnels observent des pertes moindres dans leur ruchers.

Perspectives d'avenir

Les réponses apportées et questionnements soulevés dans ce projet aideront à orienter les recherches futures. En effet, ce projet a confirmé que *V. destructor* est un problème majeur pour la santé des abeilles, tant au niveau de sa forte présence qu'au niveau de son impact sur la survie hivernale des colonies. Dans les années à venir, en particulier au Québec, les efforts de surveillance et de contrôle devraient se concentrer sur ce parasite. L'impact de *V. destructor*

sur la mortalité hivernale ayant été bien démontré, tant au Québec qu'en Ontario, il apparaît important de se questionner sur les besoins futurs en termes de recherche sur ce parasite. La prochaine étape pourrait être de rechercher des méthodes efficaces de contrôler *V. destructor*, notamment en ce qui concerne le moment de traitement idéal pour augmenter les chances de survie à l'hiver. Il serait important de développer des méthodes de contrôle biomécanique pratiques et applicables pour les apiculteurs. *Nosema spp.* étant également fortement présent, et associé à la faiblesse concurrente des colonies, de futures études devraient déterminer le sens de la causalité observée. La présence de l'agent pathogène pourrait être la cause de la faiblesse dans la colonie, mais la faiblesse de la colonie pourrait également permettre la prolifération de l'agent. Considérant l'incertitude générale entourant *Nosema spp.*, il y a un fort besoin de validation scientifique : ceci pourrait être sous la forme d'une étude longitudinale surveillant les taux d'infestation et le nombre d'abeilles dans la colonie à travers le temps, ou encore d'une validation dans un design d'infection expérimentale. S'il apparaît que *Nosema spp.* a réellement un effet sur la santé de la colonie, il y aura alors un besoin criant de traitements appropriés, puisqu'en ce moment au Québec et au Canada, aucun traitement homologué n'est disponible pour le contrôle de la nosérose.

Limites de ce travail

Ce projet avait pour but de décrire l'état et les facteurs influençant la santé des abeilles du sud-ouest du Québec, c'est-à-dire des abeilles se retrouvant en Pontiac et dans l'ouest de la Montérégie, et ce pour l'année 2017 à 2018. Ce projet comportait trois unités hiérarchiques d'intérêt : la colonie, le rucher et l'entreprise de l'apiculteur. Une colonie d'abeilles est extrêmement dynamique dans le temps, présentant une variation annuelle impressionnante en taille et en composition. Il en va de même pour le nombre de ruches possédées par un apiculteur, puisque les colonies sont divisées ou réunies en fonction de leur force au cours de la saison. Cependant, le nombre de ruchers, ou encore sites de production, demeure assez stable. Il est donc plus pratique de tenir une liste des ruchers enregistrés et d'effectuer une sélection aléatoire à ce niveau.

Bien que l'enregistrement soit obligatoire pour les apiculteurs du Québec, il est plus probable qu'il existe des apiculteurs amateurs qui ne sont pas enregistrés par ignorance du règlement. Il est donc possible que la population source pour ce projet soit légèrement

différente de la population cible; cette différence est toutefois probablement minime, puisque, s'ils existent, ces rares apiculteurs ne possèdent pas assez de colonies pour commercialiser leurs produits et donc avoir affaire au MAPAQ.

La sélection d'unités pour représenter la population cible, dans ce cas-ci les abeilles (colonies, ruchers et entreprises) du sud-ouest du Québec, comporte des risques de biais. Dans un échantillonnage aléatoire tel qu'effectué (au niveau des ruchers) dans ce projet, ce risque est considérablement réduit. Toutefois, puisque certains apiculteurs ont refusé de participer à l'étude, la sélection n'était pas parfaitement aléatoire. Un biais de non-réponse pourrait être introduit, par exemple si les apiculteurs ayant peu de problèmes de santé dans leurs ruchers n'ont pas ressenti le besoin de profiter des services de diagnostic offerts par le projet : les abeilles participantes seraient donc plus malades que la population cible. La principale raison de refus étant le manque de temps, il est peu probable que les abeilles des apiculteurs participants diffèrent de celles des apiculteurs non-participants. Le taux de participation des apiculteurs était suffisant (58%) pour supposer que les ruchers sélectionnés représentent bien la population cible de ruchers dans chaque strate.

L'échantillonnage a été effectué de manière non-proportionnelle : les proportions de ruchers échantillonnés par région, et les proportions de colonies échantillonnées par ruchers n'étaient pas homogènes. Lorsque les unités d'une population n'ont pas toute la même chance d'être sélectionnée, celles ayant les meilleures chances d'être sélectionnées auront plus d'influence sur les statistiques effectuées (ex : calcul de prévalence). Si ces unités ont une caractéristique commune, on assiste à un biais de sélection (ex : les colonies de petits ruchers ont plus de chance d'être sélectionnées, et ne sont pas traitées contre la varroase). Les chances d'être sélectionnées sont donc considérées dans le calcul de prévalence pour éviter de biaiser celle-ci : un poids plus lourd est accordé aux ruchers et colonies qui avaient moins de chances d'être sélectionnées.

En ce qui concerne les statistiques calculées au niveau des apiculteurs, il faut être conscient que, la sélection s'étant effectuée au niveau des ruchers, les apiculteurs possédant de nombreux ruchers avaient plus de chance d'être sélectionnés. Dans la description des pratiques de régie par apiculteur, cela donne plus de poids aux apiculteurs ayant de larges entreprises. C'est pourquoi le nombre de colonies concernées par ces pratiques de régie était également

présenté : puisque ces pratiques de régie sont appliquées à un plus grand nombre de ruchers et de colonies, il est pertinent de les décrire, même si un certain biais de sélection est probable.

Étant donné la stratégie d'échantillonnage choisie, des biais de survie (sélection sur une caractéristique ayant éliminé les malades), de détection (probabilité de détecter dépend de l'exposition) ou d'admission (base secondaire) ne sont pas attendus. L'échantillonnage et les questionnaires ponctuels, cumulant en 3 entrevues étendus sur 3 saisons, font qu'il est peu probable que les apiculteurs aient modifié leur comportement puisqu'ils participaient à l'étude (biais de suivi). Les données manquantes étaient très rares dans ce projet (ex : 1 sur 242 pour les signes cliniques) et n'ont probablement pas influencé les résultats.

De nombreux tests diagnostiques ont été utilisés dans ce projet, chacun possédant certaines limites. Bien que le lavage à l'alcool produise un estimé facilement interprétable du ratio de la population de *V. destructor* contre la population d'abeilles adultes (Vallon et Wendling, 2017), celui-ci ne permet pas de détecter les acariens se trouvant dans le couvain. La population totale d'acariens est donc sous-estimée. De plus, ce test ne détectera pas l'infestation dans une colonie récemment traitée par acaricide puisque les acariens se trouveront exclusivement dans le couvain. Ce biais de classification non-différentiel pourrait mener à une sous-estimation de la prévalence de *V. destructor* et de ses effets sur la force de la colonie et sur la mortalité hivernale. Il a été suggéré que le compte de spores moyen pour la quantification de l'infection par *N. ceranae* ne serait pas une mesure aussi représentative de l'état de santé que la proportion d'abeilles infestées, puisque la distribution de l'infection entre les abeilles de la colonie serait très hétérogène (Higes et al., 2008). Dans ce cas, un biais de mesure non-différentiel pourrait avoir été introduit, menant à la sous-estimation de l'impact de *N. ceranae* sur la force de la colonie et sur la mortalité hivernale. La sensibilité et spécificité des techniques de culture bactérienne sur abeilles adultes développées pour ce projet n'ayant pas été validées, il est possible que les prévalences obtenues pour les agents de loque soient légèrement biaisées dans un sens ou l'autre. Il en va de même pour les techniques moléculaires pour la recherche de virus.

De nombreuses mesures ont été prises pour s'assurer de la qualité du questionnaire développé. Les questions ont été formulées afin d'offrir des choix de réponses standardisés. Le questionnaire a été pré-testé par entrevue avec deux apiculteurs afin de s'assurer de la clarté

des questions et de la durée du questionnaire. Les questionnaires ont été remplis lors d'entrevues téléphoniques afin d'assurer la complétion du questionnaire et une uniformité dans l'interprétation des questions. Malgré ces précautions, certaines questions auraient pu être améliorées. Il n'a pas été possible d'utiliser certaines données dans les analyses puisqu'il était difficile pour les apiculteurs d'en connaître la réponse avec certitude. Par exemple, très peu d'apiculteurs connaissaient précisément quand le dernier changement de reine avait été effectué, puisqu'ils ne tenaient pas de registre de cette intervention dans les colonies, et puisque les abeilles elles-mêmes peuvent changer de reine à l'insu de l'apiculteur. Un design d'étude expérimental serait plus approprié pour répondre à ce type de question.

Puisque le nombre d'abeilles dans une colonie et par conséquent, le nombre de colonies, est très variable au cours d'une année, il est difficile de quantifier le nombre de colonies, ou même de définir ce qu'est la colonie en tant que telle, lorsqu'on réalise une étude longitudinale. Il est difficile de définir clairement la mortalité hivernale d'une colonie lorsque celle-ci a été réunie à une autre à l'automne ou au printemps. Heureusement, cette instance a été rare dans les colonies suivies pour le projet et n'a probablement pas affecté les résultats.

De plus, l'apiculture étant fortement hiérarchisée (régions, apiculteurs, ruchers, colonies), obtenir des tailles d'échantillon suffisantes pour conduire des analyses statistiques aux niveaux supérieurs demande de grandes ressources budgétaires et beaucoup de temps. Dans le cas d'une étude transversale comme celle-ci, cela demande une large équipe pour réaliser l'échantillonnage dans un court laps de temps. Les 242 colonies enrôlées dans l'étude étaient réparties en seulement 31 ruchers, et n'appartenaient qu'à 15 apiculteurs, ce qui limitait les analyses statistiques possibles à l'échelle des ruchers et des apiculteurs (e.g. nombre de cofacteurs possibles dans un modèle statistique). Il aurait été possible d'échantillonner moins de colonies par rucher afin d'échantillonner plus de ruchers, mais dans ce cas, les chances de détecter des agents pathogènes répartis de façon hétérogène dans les ruchers diminuent. La régie décrite à l'objectif 1 ne concerne donc que 15 apiculteurs; toutefois, ces apiculteurs possédaient un nombre important de colonies (1 824). Les statistiques descriptives présentées sont donc très probablement représentatives de ce qui est appliqué dans la région. En ce qui concerne les modèles statistiques, il est possible que la puissance de ce projet pilote n'était pas suffisante pour détecter des associations présentes dans la population aux niveaux supérieurs,

et de futurs travaux avec des plus grandes tailles d'échantillon seraient nécessaires pour confirmer que les associations non-significatives dans ce projet étaient réellement inexistantes.

Réaliser un modèle décrivant correctement tous les facteurs soupçonnés dans la mortalité hivernale et leurs interactions est difficile; les facteurs peuvent intervenir à différents niveaux (e.g. climat dans la région, expérience de l'apiculteur, régie appliquée dans le rucher, agents pathogènes présents dans la colonie), tandis que les cofacteurs et les interactions biologiquement plausibles sont nombreux. Étant donné la petite taille d'échantillon et la distribution des données de ce projet, les modèles statistiques ont dû être réalisés séparément pour chaque niveau, ne permettant pas de vérifier l'interaction des facteurs entre les niveaux. De plus, puisque la régie médicale des apiculteurs était extrêmement diversifiée et ne suivait généralement pas de normes standards, il était difficile d'intégrer les méthodes de régie au modèle, alors qu'il est raisonnable de penser que celles-ci peuvent avoir un effet important sur la mortalité. Une des importantes conclusions de ce projet est qu'il existe une dichotomie dans les populations d'apiculteur du Québec : de rares apiculteurs commerciaux qui possèdent un nombre important de colonies se partagent le territoire avec de nombreux apiculteurs hobbyistes qui ne possèdent chacun qu'un très petit nombre de colonies. En étudiant tous les apiculteurs sans sélectionner en fonction de la taille d'entreprise, nous avons tenté de fournir un portrait global de la santé des abeilles pour l'ensemble du Québec. Les résultats ont démontré que le nombre de colonies possédées a un impact important sur la mortalité hivernale; par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que les différences de régie entre ces apiculteurs mènent probablement à une différence dans l'importance relative des causes de mortalité. Il serait possible dans un futur projet d'étudier ces sous-populations séparément, en fonction des besoins spécifiques pour chacune.

Conclusions générales sur les agents pathogènes et la mortalité hivernale

Ce projet a démontré que *V. destructor* et DWV sont des agents pathogènes communs au Québec ayant un impact sur la mortalité hivernale. Également, malgré l'absence d'association avec la mortalité hivernale, *Nosema spp.* et *M. plutonius* sont des agents d'importance au Québec, ne serait-ce que par leur fréquence, et leur association avec des problèmes de santé de la colonie. Pourtant, les apiculteurs n'ont pas souvent rapporté la présence de ces agents, conduisant souvent à des signes cliniques difficiles à discerner, dans

leurs ruchers. Posséder un petit nombre de colonies est également un facteur de risque pour la mortalité hivernale, ce qui suggère qu'en plus des agents pathogènes comme *V. destructor* et DWV, des facteurs de régulation jouent un rôle très important dans la survie des colonies.

Bibliographie

- (2012). "ZomBee Watch." 2018, from www.zombeewatch.org.
- ACIA. (2016). "Maladies à notification immédiate." Retrieved Octobre 27, 2016.
- ACPA (2016). Rapport sur la mortalité hivernale de colonies d'abeilles au Canada, Association canadienne des professionnels de l'apiculture.
- ACPA (2018). Rapport sur la mortalité hivernale de colonies d'abeilles au Canada, Association canadienne des professionnels de l'apiculture.
- Agriculture et Agroalimentaire Canada (2016). Aperçu statistique de l'industrie apicole canadienne et contribution économique des services de pollinisation rendus par les abeilles domestiques pour 2013-2014.
- Aileen, C. M. et S. P. Rushton (2014). "Clustering, persistence and control of a pollinator brood disease: epidemiology of American foulbrood." Environmental microbiology **16**(12): 3753-3763.
- Aizen, M. A. et L. D. Harder (2009). "The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination." Current biology : CB **19**(11): 915-918.
- Alaux, C., J. L. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, M. Cousin, J. Brillard, A. Baldy, L. P. Belzunces et Y. Le Conte (2010). "Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*)." Environmental microbiology **12**(3): 774-782.
- Alger, S. A., P. A. Burnham, Z. S. Lamas, A. K. Brody et L. L. Richardson (2018). "Home sick: impacts of migratory beekeeping on honey bee (*Apis mellifera*) pests, pathogens, and colony size." PeerJ **6**: e5812-e5812.
- Alippi, A. (1999). Bacterial diseases. Bee Disease Diagnosis: 1999.
- Alippi, A. M., A. C. López, F. J. Reynaldi, D. H. Grasso et O. M. Aguilar (2007). "Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees." Veterinary microbiology **125**(3): 290-303.
- Allen, M. et B. Ball (1993). "The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*." Journal of apicultural research **32**(2): 80-88.

- Allen, M., B. Ball, R. White et J. Antoniw (1986). "The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA." Journal of apicultural research **25**(2): 100-105.
- Amdam, G. V., K. Hartfelder, K. Norberg, A. Hagen et S. W. Omholt (2004). "Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering?" Journal of economic entomology **97**(3): 741-747.
- Amdam, G. V. et S. W. Omholt (2003). "The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis." Journal of theoretical biology **223**(4): 451-464.
- Anderson, D. (1993). "Pathogens and queen bees." Australian beekeeper **94**(7): 292-296.
- Anderson, D. L. (1984). "A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses." Journal of invertebrate pathology **44**(3): 233-243.
- Anderson, D. L. et J. W. H. Trueman (2000). "*Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species." Experimental & applied acarology **24**(3): 165-189.
- Arabiati, A. H., S. T. Zaitoun et S. J. Bani-Shams (2012). "Prevalence and Distribution of American Foulbrood (AFB) Disease among Jordanian Governorates, Depending on Microbiological and PCR Techniques." International journal of biotechnology and biochemistry **8**(2): 131-144.
- Arai, R., M.-A. Tohru, O. Kayo, M. Yuiko, M. Wu, S. Yuya, Y. Mikio, O. Masatoshi, K. Teruo et T. Daisuke (2014). "Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains." The Journal of veterinary medical science **76**(4): 491-498.
- Arai, R., K. Tominaga, M. Wu, M. Okura, K. Ito, N. Okamura, H. Onishi, M. Osaki, Y. Sugimura et M. Yoshiyama (2012). "Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates." PloS one **7**(3): e33708.
- Aronstein, K. et K. Murray (2010). "Chalkbrood disease in honey bees." Journal of invertebrate pathology **103**: S20-S29.

- Bacandritsos, N., A. Granato, G. Budge, I. Papanastasiou, E. Roinioti, M. Caldon, C. Falcaro, A. Gallina et F. Mutinelli (2010). "Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies." Journal of invertebrate pathology **105**(3): 335-340.
- Bailey, L. (1958). "The epidemiology of the infestation of the honeybee, *Apis mellifera* L., by the mite *Acarapis woodi* Rennie and the mortality of infested bees." Parasitology **48**(3-4): 493-506.
- Bailey, L. (1959a). "An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology." Journal of insect pathology **1**(1): 80-85.
- Bailey, L. (1959b). "Recent research on the natural history of European foul brood disease." Bee world **40**(3): 66-70.
- Bailey, L. (1961). "The natural incidence of *Acarapis woodi* (Rennie) and the winter mortality of honeybee colonies." Bee world **42**(4): 96-100.
- Bailey, L. (1966). "The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*." Insect Pathology and Microbial Control: 162.
- Bailey, L. (1968a). "Honey bee pathology." Annual review of entomology **13**(1): 191-212.
- Bailey, L. (1968b). "The measurement and interrelationships of infections with *Nosema apis* and *Malpighamoeba mellificae* of honey-bee populations." Journal of invertebrate pathology **12**(2): 175-179.
- Bailey, L. (1974). "An unusual type of *Streptococcus pluton* from the Eastern hive bee." Journal of invertebrate pathology **23**(2): 246-247.
- Bailey, L. (1984). "A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media." FEMS microbiology letters **25**(2-3): 139-141.
- Bailey, L., B. V. Ball et J. Perry (1983). "Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee." The Annals of applied biology **103**(1): 13-20.
- Bailey, L. et A. Gibbs (1962). "Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci." Microbiology **28**(3): 385-391.
- Bailey, L., A. Gibbs et R. Woods (1963). "Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus)." Virology **21**(3): 390-395.
- Bailey, L. et R. Milne (1969). "The multiplication regions and interaction of acute and chronic bee-paralysis viruses in adult honey bees." The Journal of general virology **4**(1): 9-14.

- Bailey, L. et R. Woods (1977). "Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses." The Journal of general virology **37**(1): 175-182.
- Bautz, R. A. et J. R. Coggins (1992). "Scanning Electron Microscopy of Female *Varroa jacobsoni* (Arthropoda: Acarina), Ectoparasite of the Honeybee *Apis mellifera*." Transactions of the American Microscopical Society: 28-35.
- Békési, L., B. V. Ball, M. Dobos-Kovács, T. Bakonyi et M. Rusvai (1999). "Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*." Acta veterinaria Hungarica **47**(3): 319-324.
- Belloy, L., A. Imdorf, I. Fries, E. Forsgren, H. Berthoud, R. Kuhn et J.-D. Charrière (2007). "Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood." Apidologie **38**(2): 136-140.
- Berényi, O., T. Bakonyi, I. Derakhshifar, H. Köglberger et N. Nowotny (2006). "Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries." Applied and environmental microbiology **72**(4): 2414-2420.
- Bermejo, F. O., R. B. Rodriguez et P. G. Fernández (1997). "A scientific note on the current low levels of honey bee tracheal mite in southern Spain." Apidologie **28**(3-4): 149-150.
- Bernal, J., E. Garrido-Bailón, M. Del Nozal, A. González-Porto, R. Martín-Hernández, J. Diego, J. Jiménez, J. Bernal et M. Higes (2010). "Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain." Journal of economic entomology **103**(6): 1964-1971.
- Boot, W. J., J. N. Calis et J. Beetsma (1992). "Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees." Experimental & applied acarology **16**(4): 295-301.
- Botias, C., R. Martin-Hernandez, J. Dias, P. Garcia-Palencia, M. Matabuena, A. Juarranz, L. Barrios, A. Meana, A. Nanetti et M. Higes (2012). "The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies." Environmental microbiology **14**(4): 845-859.
- Boucher, C. (2002). Résistance au fluvalinate : les apiculteurs sont invités à être vigilants. RAIZO.

- Boucher, S. (2016). Maladies des abeilles. Paris, Editions France agricole.
- Boudegga, H., N. Boughalleb, N. Barbouche, M. H. Ben Hamouda et M. E. Mahjoub (2010). "In vitro inhibitory actions of some essential oils on *Ascosphaera apis*, a fungus responsible for honey bee chalkbrood." Journal of apicultural research **49**(3): 236-242.
- Bowen-Walker, P., S. Martin et A. Gunn (1999). "The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera*L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*Oud." Journal of invertebrate pathology **73**(1): 101-106.
- Branco, M. R., N. A. Kidd et R. S. Pickard (2006). "A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation." Apidologie **37**(4): 452-461.
- Brodtschneider, R. et K. Crailsheim (2010). "Nutrition and health in honey bees." Apidologie **41**(3): 278-294.
- Brodtschneider, R., R. Moosbeckhofer et K. Crailsheim (2010). "Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol." Journal of apicultural research **49**(1): 23-30.
- Brown, M. J., R. Schmid-Hempel et P. Schmid-Hempel (2003). "Strong context-dependent virulence in a host–parasite system: reconciling genetic evidence with theory." The Journal of animal ecology **72**(6): 994-1002.
- Bruckner, S., N. Steinhauer, K. Rennich, D. S. Aurell, D. M. Caron, J. D. Ellis, A. M. Fauvel, K. Kulhanek, K. C. Nelson, J. Rangel, R. Rose, R. Sagili, G. P. Slater, R. Snyder, C. A. Thoms, J. T. Wilkes, M. E. Wilson, D. vanEngelsdorp et G. R. Williams. (2018). "Honey Bee Colony Losses 2017-2018: Preliminary Results." 2018, from <https://beeinformed.org/results/honey-bee-colony-losses-2017-2018-preliminary-results/>.
- Bruneau, E. (2014). Risk management practices in beekeeping. Bee Health and veterinarians. W. Ritter. Paris, OIE: 55-60.
- Budge, G. E., B. Barrett, B. Jones, S. Pietravalle, G. Marris, P. Chantawannakul, R. Thwaites, J. Hall, A. G. Cuthbertson et M. A. Brown (2010). "The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures." Journal of invertebrate pathology **105**(2): 164-170.

- Budge, G. E., S. Pietravalle, M. Brown, L. Laurenson, B. Jones, V. Tomkies et K. S. Delaplane (2015). "Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales." PloS one **10**(7): e0133228.
- Budge, G. E., M. D. Shirley, B. Jones, E. Quill, V. Tomkies, E. J. Feil, M. A. Brown et E. G. Haynes (2014). "Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*." The ISME journal **8**(8): 1588-1597.
- Burgett, M., P. Akranakul et R. A. Morse (1983). "Tropilaelaps clareae: a parasite of honeybees in south-east Asia." Bee world **64**(1): 25-28.
- Bzdil, J. (2007). "Detection of *Paenibacillus* larvae spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method." Acta Veterinaria Brno **76**(4): 643-648.
- Calderone, N. W. et L. Kuenen (2003). "Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping." Apidologie **34**(6): 543-552.
- Calderone, N. W. et R. M. Turcotte (1998). "Development of Sampling Methods for Estimating Levels of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) Infestation in Colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)." Journal of economic entomology **91**(4): 851-863.
- Carr, J. (2016). Managing Bee Health: A Practical Guide for Beekeepers, 5m Publishing.
- Carreck, N. L., B. V. Ball et S. J. Martin (2010). "Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*." Journal of apicultural research **49**(1): 93-94.
- Cepero, A., M. Higes, A. Martínez-Salvador, A. Meana et R. Martín-Hernández (2014). "A two year national surveillance for *Aethina tumida* reflects its absence in Spain." BMC research notes **7**(1): 878.
- CFIA (2013). Section 1: Bee Health Management. Honey Bee Producer Guide to the National Bee Farm-level Biosecurity Standard, Government of Canada.
- Chantawannakul, P., L. Ward, N. Boonham et M. Brown (2006). "A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary." Journal of invertebrate pathology **91**(1): 69-73.

- Charriere, J., V. Kilchenmann et A. Roetschi (2011). Virulence of different *Melissococcus plutonius* strains on larvae tested by an in vitro larval test. Proceedings of the 42nd International Apicultural Congress, Buenos Aires, Argentina.
- Charrière, J.-D. et P. Neumann (2010). "Surveys to estimate winter losses in Switzerland." Journal of apicultural research **49**(1): 132-133.
- Chauzat, M.-P., P. Carpentier, F. Madec, S. Bougeard, N. Cougoule, P. Drajnudel, M.-C. Clément, M. Aubert et J.-P. Faucon (2010a). "The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France." Journal of apicultural research **49**(1): 31-39.
- Chauzat, M.-P., A. Jacques, M. Laurent, S. Bougeard, P. Hendrikx, M. Ribière-Chabert et E. Consortium (2016). "Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance." Apidologie **47**(3): 348-378.
- Chauzat, M.-P., M. Laurent, M. Brown, P. Kryger, F. Mutinelli, S. Roelandt, S. Roels, Y. van der STEDE, M. Schäfer et S. Franco (2015). "Guidelines for the surveillance of the small hive beetle (*Aethina tumida*) infestation." European Union Reference Laboratory for honey bee health (EURL), Sophia-Antipolis, France: 19.
- Chauzat, M.-P., A.-C. Martel, S. Zeggane, P. Drajnudel, F. Schurr, M.-C. Clément, M. Ribière-Chabert, M. Aubert et J.-P. Faucon (2010b). "A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005–6." Journal of apicultural research **49**(1): 40-51.
- Chauzat, P., M. Laurent, M.-P. Rivière, C. Saugeon, P. Hendrikx, M. Ribière-Chabert et H. Pathology Unit (2014). "A pan-European epidemiological study on honey bee colony losses 2012–2013." European Union Reference Laboratory for Honeybee Health, Brussels, Rapport technique.
- Chen, Y., J. D. Evans, I. B. Smith et J. S. Pettis (2008). "Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States." Journal of invertebrate pathology **97**(2): 186-188.
- Chen, Y., J. S. Pettis, A. Collins et M. F. Feldlaufer (2006). "Prevalence and transmission of honeybee viruses." Applied and environmental microbiology **72**(1): 606-611.

- Chen, Y., J. S. Pettis, J. D. Evans, M. Kramer et M. F. Feldlaufer (2004). "Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*." *Apidologie* **35**(4): 441-448.
- Chen, Y. P. et Z. Y. Huang (2010). "Nosema ceranae, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia." *Apidologie* **41**(3): 364-374.
- Claing, G., P. Dubreuil, J. Ferland, M. Bernier, E. Rodriguez, Y. L'Homme et J. Arsenault (2019). "Risk factors for winter loss of honey bees in southwestern Quebec " Unpublished work.
- Clark, T., R. Whitcomb, J. Tully, C. Mouches, C. Saillard, J. BOV, H. Wroblewski, P. Carle, D. Rose et R. Henegar (1985). "Spiroplasma melliferum, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*)." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **35**(3): 296-308.
- Clermont, A., M. Eickermann, F. Kraus, C. Georges, L. Hoffmann et M. Beyer (2014). "A survey on some factors potentially affecting losses of managed honey bee colonies in Luxembourg over the winters 2010/2011 and 2011/2012." *Journal of apicultural research* **53**(1): 43-56.
- Colin, M., J. Faucon, A. Giauffret et C. Sarrazin (1979). "A new technique for the diagnosis of acarine infestation in honeybees." *Journal of apicultural research* **18**(3): 222-224.
- Core, A., C. Runckel, J. Ivers, C. Quock, T. Siapno, S. DeNault, B. Brown, J. DeRisi, C. D. Smith et J. Hafernik (2012). "A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*." *PloS one* **7**(1): e29639.
- Costa, C., G. Tanner, M. Lodesani, L. Maistrello et P. Neumann (2011). "Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers." *Journal of invertebrate pathology* **108**(3): 224-225.
- Couvillon, M. J., F. C. R. Pearce, C. Acclerton, K. A. Fensome, S. K. Quah, E. L. Taylor et F. L. Ratnieks (2015). "Honey bee foraging distance depends on month and forage type." *Apidologie* **46**(1): 61-70.
- Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P.-L. Quan, T. Briese, M. Hornig et D. M. Geiser (2007). "A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder." *Science* **318**(5848): 283-287.

- Currie, R. W. et P. Gatién (2006). "Timing acaricide treatments to prevent *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) from causing economic damage to honey bee colonies." The Canadian entomologist **138**(02): 238-252.
- Currie, R. W., S. F. Pernal et E. Guzman-Novoa (2010). "Honey bee colony losses in Canada." Journal of apicultural research **49**(1): 104-106.
- Dahle, B. (2010). "The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway." Journal of apicultural research **49**(1): 124-125.
- Dainat, B., J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier et P. Neumann (2012a). "Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees." Applied and environmental microbiology **78**(4): 981-987.
- Dainat, B., J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier et P. Neumann (2012b). "Predictive markers of honey bee colony collapse." PloS one **7**(2): e32151.
- Dainat, B., D. Vanengelsdorp et P. Neumann (2012c). "Colony collapse disorder in Europe." Environmental microbiology reports **4**(1): 123-125.
- Dall, D. (1985). "Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia." The Annals of applied biology **106**(3): 461-468.
- De Graaf, D., A. M. Alippi, M. Brown, J. D. Evans, M. Feldlauder, A. Gregorc, M. Hornitzky, S. F. Pernal, D. M. T. Schuch, D. Titera, V. Tomkies et W. Ritter (2006). "Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols." Letters in applied microbiology **43**: 583-590.
- De Graaf, D., D. Vandekerchove, W. Dobbelaere, J. E. Peeters et 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.
- De Guzman, L. I., A. M. Frake et T. E. Rinderer (2008). "Detection and removal of brood infested with eggs and larvae of small hive beetles (*Aethina tumida* Murray) by Russian honey bees." Journal of apicultural research **47**(3): 216-221.
- De Jong, D., R. A. Morse et G. C. Eickwort (1982a). "Mite pests of honey bees." Annual review of entomology **27**(1): 229-252.

- De Jong, D., D. D. A. Roma et L. Goncalves (1982b). "A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees." *Apidologie* **13**(3): 297-306.
- de Miranda, J. R., G. Cordoni et G. Budge (2010). "The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex." *Journal of invertebrate pathology* **103**: S30-S47.
- de Miranda, J. R., L. Gauthier, M. Ribière et Y. P. Chen (2012). "Honey bee viruses and their effect on bee and colony health." *Honey bee colony health: Challenges and Sustainable solutions*. Oxford, England: Taylor and Francis Group: 71-102.
- DeGuzman, L. I., T. E. Rinderer, M. Bigalk, H. Tubbs et S. J. Bernard (2005). "Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) infestations and overwintering survival." *Journal of economic entomology* **98**(6): 1796-1801.
- Delaplane, K., J. A. Berry, J. A. Skinner, J. P. Parkman et W. M. Hood (2005). "Integrated pest management against *Varroa destructor* reduces colony mite levels and delays treatment threshold." *Journal of apicultural research* **44**(4): 157-162.
- Delaplane, K. S. (1998). The small hive beetle, *Aethina tumida*. A new beekeeping pest. Tifton, Georgia, USA, University of Georgia: 2.
- Delaplane, K. S. et W. M. Hood (1999). "Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA." *Apidologie* **30**(5): 383-395.
- Deniot, C., P. Basselet, A. L. Douteau, M. Beguin et B. Basso (2015). Suivi d'infestation: varroa phorétiques ou chutes naturelles?, Itsap-Institut de l'abeille.
- Di Pasquale, G., M. Salignon, Y. Le Conte, L. P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, S. Suchail, J.-L. Brunet et C. Alaux (2013). "Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?" *PloS one* **8**(8): e72016.
- Di Prisco, G., V. Cavaliere, D. Annoscia, P. Varricchio, E. Caprio, F. Nazzi, G. Gargiulo et F. Pennacchio (2013). "Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(46): 18466-18471.

- Djordjevic, S. P., K. Noone, L. Smith et M. A. Hornitzky (1998). "Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*." Journal of apicultural research **37**(3): 165-174.
- Donze, G., P. Fluri et A. Imdorf (1998). "A look under the cap: the reproductive behavior of *Varroa* in the capped brood of the honey bee." American bee journal **138**(7): 528.
- Duay, P., D. De Jong et W. Engels (2002). "Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development." Genetics and molecular research : GMR **1**(3): 227-232.
- Dubreuil, P. et P. Giovenazzo (2004). Projet de recherche sur les effets du temps de traitement, du transport et de la localisation des ruches sur les populations de *Varroa destructor* dans les ruches en Montérégie, Université de Montréal.
- Dussaubat, C., J.-L. Brunet, M. Higes, J. K. Colbourne, J. Lopez, J.-H. Choi, R. Martín-Hernández, C. Botías, M. Cousin et C. McDonnell (2012). "Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*." PloS one **7**(5): e37017.
- Dutto, M. et P. Ferrazzi (2014). "*Megaselia rufipes* (Diptera: Phoridae): a new cause of facultative parasitoidism in *Apis mellifera*." Journal of apicultural research **53**(1): 141-145.
- Dyer, F. C. et J. L. Could (1983). "Honey bee navigation: the honey bee's ability to find its way depends on a hierarchy of sophisticated orientation mechanisms." American scientist **71**(6): 587-597.
- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2013). "Scientific Opinion on the risk of entry of *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* spp. in the EU." EFSA Journal **11**(3): 127.
- Eischen, F. A. (1987). "Overwintering performance of honey bee colonies heavily infested with *Acarapis woodi* (Rennie)." Apidologie **18**(4): 293-304.
- Ellis, J. D. (2005). "Reviewing the confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by western honey bees (*Apis mellifera*)." Bee world **86**(3): 56-62.

- Ellis, J. D. et K. S. Delaplane (2008). "Small hive beetle (*Aethina tumida*) oviposition behaviour in sealed brood cells with notes on the removal of the cell contents by European honey bees (*Apis mellifera*)." Journal of apicultural research **47**(3): 210-215.
- Ellis, J. D., K. S. Delaplane, A. Cline et J. V. McHugh (2008). "The association of multiple sap beetle species (Coleoptera: Nitidulidae) with western honey bee (*Apis mellifera*) colonies in North America." Journal of apicultural research **47**(3): 188-189.
- Ellis, J. D. et A. Ellis (2010). Small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Insecta: Coleoptera: Nitidulidae), Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Ellis, J. D., R. Hepburn, K. Delaplane, P. Neumann et P. Elzen (2003). "The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*)." Apidologie **34**(4): 399-408.
- Evans, J. D. et R. S. Schwarz (2011). "Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health." Trends in microbiology **19**(12): 614-620.
- FAO. (2016, 26 February 2016). "Pollinators vital to our food supply under threat." 2018, from www.fao.org.
- FAO. (2018). "FAOSTAT." 2018, from <http://faostat.fao.org>.
- FERA (2010). Managing Varroa. York, The Food & Environment Research Agency.
- FERA (2017). Managing Varroa. York, The Food & Environment Research Agency.
- Ferland, J. (2016). Activités et réglementation en santé apicole, MAPAQ.
- Ferrer-Dufol, M., A. Martinez-Vinuales et C. Sanchez-Acedo (1991). "Comparative tests of fluvalinate and flumethrin to control *Varroa jacobsoni* Oudemans." Journal of apicultural research **30**(2): 103-106.
- Flores, J., I. Gutiérrez et R. Espejo (2005a). "The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions." Mycologia **97**(6): 1171-1176.
- Flores, J., J. Ruiz, J. Ruz, F. Puerta, M. Bustos, F. Padilla et F. Campano (1996). "Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions." Apidologie **27**(4): 185-192.
- Flores, J., M. Spivak et I. Gutiérrez (2005b). "Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood." Veterinary microbiology **108**(1-2): 141-144.

- Floris, I. (1997). "A sequential sampling technique for female adult mites of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the sealed worker brood of *Apis mellifera ligustica* Spin." *Apidologie* **28**(2): 63-70.
- Forsgren, E. (2010). "European foulbrood in honey bees." *Journal of invertebrate pathology* **103, Supplement**: S5-S9.
- Forsgren, E., G. E. Budge, J.-D. Charrière et M. A. Hornitzky (2013). "Standard methods for European foulbrood research." *Journal of apicultural research* **52**(1): 1-14.
- Forsgren, E. et I. Fries (2010). "Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees." *Veterinary parasitology* **170**: 212-217.
- Forsgren, E. et A. T. Laugen (2014). "Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies." *Apidologie* **45**(1): 10-20.
- Forsgren, E., A. C. Lundhagen, A. Imdorf et I. Fries (2005). "Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood." *Microbial ecology* **50**(3): 369-374.
- Fries, I., A. Aarhus, H. Hansen et S. Korpela (1991). "Comparison of diagnostic methods for detection of low infestation levels of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies." *Experimental & applied acarology* **10**(3-4): 279-287.
- Fries, I. et S. Camazine (2001). "Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology." *Apidologie* **32**(3): 199-214.
- Fries, I., M.-P. Chauzat, Y.-P. Chen, V. Doublet, E. Genersch, S. Gisder, M. Higes, D. P. McMahon, R. Martín-Hernández et M. Natsopoulou (2013). "Standard methods for *Nosema* research." *Journal of apicultural research* **52**(1): 1-28.
- Fries, I., H. Hansen, A. Imdorf et P. Rosenkranz (2003). "Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden." *Apidologie* **34**: 389-398.
- Fries, I., A. Lindstrom et S. Korpela (2005). "Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*)." *Veterinary microbiology* **114**: 269-274.
- Fuchs, S. (1990). "Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud in colonies of *Apis mellifera carnica*." *Apidologie* **21**(3): 193-199.

- Gajger, I. T., Z. Tomljanović et Z. Petrincec (2010). "Monitoring health status of Croatian honey bee colonies and possible reasons for winter losses." Journal of apicultural research **49**(1): 107-108.
- Galbraith, D. A., Z. L. Fuller, A. M. Ray, A. Brockmann, M. Frazier, M. W. Gikungu, J. F. I. Martinez, K. M. Kapheim, J. T. Kerby et S. D. Kocher (2018). "Investigating the viral ecology of global bee communities with high-throughput metagenomics." Scientific reports **8**(1): 8879.
- Gallai, N., J.-M. Salles, J. Settele et B. E. Vaissière (2009). "Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline." Ecological economics **68**(3): 810-821.
- Garrett, D., E. Jochimsen et W. Jarvis (1999). "Invasive *Aspergillus* spp infections in rheumatology patients." The Journal of rheumatology **26**(1): 146-149.
- Garrido, C. et P. Rosenkranz (2003). "The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*." Experimental & applied acarology **31**(3-4): 269-273.
- Garrido-Bailón, E., C. Bartolomé, L. Prieto, C. Botías, A. Martínez-Salvador, A. Meana, R. Martín-Hernández et M. Higes (2012). "The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies." Experimental parasitology **132**(4): 530-536.
- Garrido-Bailon, E., M. Higes, A. Martinez-Salvador, K. Antunez, C. Botias, A. Meana, L. Prieto et R. Martin-Hernandez (2013). "The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay." Microbial biotechnology **6**(6): 731-739.
- Gary, N. E. et R. E. Page Jr (1989). "Tracheal mite (Acari: Tarsonemidae) infestation effects on foraging and survivorship of honey bees (Hymenoptera: Apidae)." Journal of economic entomology **82**(3): 734-739.
- Gauthier, L., D. Tentcheva, M. Tournaire, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin et M. Bergoin (2007). "Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique." Apidologie **38**(5): 426-435.
- Gende, L., A. Satta, V. Ligios, L. Ruiu, F. Buffa, N. Fernandez, S. Churio, M. Eguaras, M. Fiori et I. Floris (2011). "Searching for an American foulbrood early detection

- threshold by the determination of *Paenibacillus* larvae spore load in worker honey bees." Bulletin of insectology **64**(2): 229-233.
- Genersch, E. (2010). "American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae." Journal of invertebrate pathology **103 Suppl 1**: S10-19.
- Genersch, E., A. Ashiralieva et I. Fries (2005). "Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees." Applied and environmental microbiology **71**(11): 7551-7555.
- Genersch, E. et M. Aubert (2010). "Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.)." Veterinary research **41**(6): 54.
- Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikainen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski et I. Fries (2006). "Reclassification of *Paenibacillus* larvae subsp. pulvifaciens and *Paenibacillus* larvae subsp. larvae as *Paenibacillus* larvae without subspecies differentiation." International journal of systematic and evolutionary microbiology **56**(Pt 3): 501-511.
- Genersch, E., W. Von Der Ohe, H. Kaatz, A. Schroeder, C. Otten, R. Büchler, S. Berg, W. Ritter, W. Mühlen et S. Gisder (2010). "The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies." Apidologie **41**(3): 332-352.
- Gervais, J. (2015). Caractéristiques épidémiologiques, surveillance et dépistage de la varroase, de la nosérose, de l'infestation par le petit coléoptère des ruches et de la loque américaine chez les abeilles domestiques. J. Arsenault and A. Leboeuf, MAPAQ: 65.
- Giangaspero, M. et P. Turno (2015). "Aethina tumida, an Exotic Parasite of Bees." Clinical microbiology : open access **2015**.
- Gill, R. J., O. Ramos-Rodriguez et N. E. Raine (2012). "Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees." Nature **491**(7422): 105.
- Gilliam, M. (1986). "Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*." Apidologie **17**(2): 93-100.
- Giraud, F. (2014). "Aethina tumida, le petit coléoptère de la ruche."
- Gisder, S., P. Aumeier et E. Genersch (2009). "Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*)." The Journal of general virology **90**(Pt 2): 463-467.

- Gisder, S., K. Hedtke, N. Mockel, M. C. Frielitz, A. Linde et E. Genersch (2010). "Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?" Applied and environmental microbiology **76**(9): 3032-3038.
- Glinski, Z. et K. Buczek (2003). "Response of the Apoidea to fungal infections." Apiacta **38**: 183-189.
- Gochnauer, T. et J. Corner (1974). "Detection and identification of *Bacillus* larvae in a commercial sample of bee-collected pollen." Journal of apicultural research **13**(4): 265-267.
- Goulson, D., E. Nicholls, C. Botías et E. L. Rotheray (2015). "Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers." Science **347**(6229): 1255957.
- Grant, G., D. Nelson, P. Olsen et W. Rice (1993). "The "Elisa" detection of tracheal mites in whole honey bee samples." American bee journal.
- Groopman, J. D., L. G. Cain, T. W. Kensler et C. C. Harris (1988). "Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer." CRC critical reviews in toxicology **19**(2): 113-145.
- Guzmán-Novoa, E., L. Eccles, Y. Calvete, J. McGowan, P. Kelly et A. Correa-Benítez (2010). "Varroa destructor is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada." Apidologie **41**(4): 443-450.
- Haddad, N., J. Esser et P. Neumann (2008). "Association of *Cryptophagus hexagonalis* (Coleoptera: Cryptophagidae) with honey bee colonies (*Apis mellifera*)." Journal of apicultural research **47**(3): 190.
- Hatjina, F., M. Bouga, A. Karatasou, A. Kontothanasi, L. Charistos, C. Emmanouil, N. Emmanouil et A.-D. Maistros (2010). "Data on honey bee losses in Greece: a preliminary note." Journal of apicultural research **49**(1): 116-118.
- Hawthorne, D. J. et G. P. Dively (2011). "Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees." PloS one **6**(11): e26796.

- Heath, L. (1982). "Development of chalk brood in a honeybee colony: a review." Bee world **63**(3): 119-130.
- Hedtke, K., P. M. Jensen, A. B. Jensen et E. Genersch (2011). "Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood." Journal of invertebrate pathology **108**(3): 167-173.
- Henry, S. H., F. X. Bosch, T. C. Troxell et P. M. Bolger (1999). "Reducing liver cancer-- global control of aflatoxin." Science **286**(5449): 2453-2454.
- Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Janssen, K. Kersters, P. De Vos, N. Logan, N. Ali et R. Berkeley (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 and evolutionary microbiology **46**(1): 270-279.
- Higes, M., P. García-Palencia, R. Martín-Hernández et A. Meana (2007). "Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia)." Journal of invertebrate pathology **94**(3): 211-217.
- Higes, M., R. Martín et A. Meana (2006). "*Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe." Journal of invertebrate pathology **92**(2): 93-95.
- Higes, M., R. Martín-Hernández, C. Botias, E. G. Bailon, A. V. Gonzalez-Porto, L. Barrios, M. J. Del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jimenez, P. G. Palencia et A. Meana (2008). "How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse." Environmental microbiology **10**(10): 2659-2669.
- Higes, M., R. Martín-Hernández, P. García-Palencia, P. Marin et A. Meana (2009a). "Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*)." Environmental microbiology reports **1**(6): 495-498.
- Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, A. V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, M. J. Del Nozal, R. Mayo et J. L. Bernal (2009b). "Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries." Environmental microbiology reports **1**(2): 110-113.

- Higes, M., A. Meana, C. Bartolome, C. Botias et R. Martin-Hernandez (2013). "Nosema ceranae (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen." Environmental microbiology reports **5**(1): 17-29.
- Higes, M., M. J. Nozal, A. Alvaro, L. Barrios, A. Meana, R. Martín-Hernández, J. L. Bernal et J. Bernal (2011). "The stability and effectiveness of fumagillin in controlling Nosema ceranae (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions." Apidologie **42**(3): 364-377.
- Higes, M. P., M. R. Suárez, J. M. Llorente, M. V. Payá et A. M. Vicente (1998). "Efficiency of essential oil (*Satureja montana*) in controlling the ascospherosis in the honey bee (*Apis mellifera*) under field conditions." Revista iberoamericana de micología **15**(3): 151-154.
- Highfield, A. C., A. El Nagar, L. C. Mackinder, M.-L. N. Laure, M. J. Hall, S. J. Martin et D. C. Schroeder (2009). "Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses." Applied and environmental microbiology **75**(22): 7212-7220.
- Hood, W. M., P. M. Horton et J. W. McCreadie (2003). "Field evaluation of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) for the control of wax moths (Lepidoptera: Pyralidae) in stored honey bee comb." Journal of agricultural and urban entomology **20**(2): 93-103.
- Hornitzky, M. et S. Karlovskis (1989). "A culture technique for the detection of *Bacillus* larvae in honeybees." Journal of apicultural research **28**(2): 118-120.
- Huang, W.-F., L. F. Solter, P. M. Yau et B. S. Imai (2013). "Nosema ceranae escapes fumagillin control in honey bees." PLoS pathogens **9**(3): e1003185.
- Huang, Z.-Y. et G. E. Robinson (1996). "Regulation of honey bee division of labor by colony age demography." Behavioral ecology and sociobiology **39**(3): 147-158.
- Hunter, W., J. Ellis, J. Hayes, D. Westervelt, E. Glick, M. Williams, I. Sela, E. Maori, J. Pettis et D. Cox-Foster (2010). "Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae)." PLoS pathogens **6**(12): e1001160.
- Invernizzi, C., C. Abud, I. H. Tomasco, J. Harriet, G. Ramallo, J. Campa, H. Katz, G. Gardiol et Y. Mendoza (2009). "Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay." Journal of invertebrate pathology **101**(2): 150-153.

- Invernizzi, C., E. Santos, E. García et G. Daners (2005). Nosema apis and Varroa destructor from honeybee colonies of Eucalyptus spp. forestations in Uruguay. Proceedings of the 39th International Apicultural Congress, Dublin, Ireland.
- Iqbal, J. et U. Mueller (2007). "Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers." Proceedings. Biological sciences **274**(1617): 1517-1521.
- Janmaat, A. et M. Winston (2000). "The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.)." Insectes sociaux **47**(2): 177-182.
- Jensen, A. B., K. Aronstein, J. M. Flores, S. Vojvodic, M. A. Palacio et M. Spivak (2013). "Standard methods for fungal brood disease research." Journal of apicultural research **52**(1): 1-20.
- Johnson, R. M., M. D. Ellis, C. A. Mullin et M. Frazier (2010). "Pesticides and honey bee toxicity—USA." Apidologie **41**(3): 312-331.
- Johnson, R. M., H. S. Pollock et M. R. Berenbaum (2009). "Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*." Journal of economic entomology **102**(2): 474-479.
- Khattab, M. M. et E. N. El-Hosseney (2014). "The first records of the parasite zombie fly (*Apocephalus borealis* Brues) on honeybee, *Apis mellifera* in Egypt." International journal of agricultural science and research (IJASR) **4**(6): 37-42.
- Khezri, M., M. Moharrami, H. Modirrousta, M. Torkaman, B. Rokhzad et H. Khanbabaie (2018). "Prevalence of American foulbrood in asymptomatic apiaries of Kurdistan, Iran." Veterinary world **11**(3): 281-285.
- Klee, J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q. Tam, T. X. Chinh, F. Puerta, J. M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries et R. J. Paxton (2007). "Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*." Journal of invertebrate pathology **96**(1): 1-10.
- Kochansky, J., D. Knox, M. Feldlaufer et J. Pettis (2001). "Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and-resistant *Paenibacillus* larvae." Apidologie **32**(3): 215-222.

- Kojima, Y., M. Yoshiyama, K. Kimura et T. Kadowaki (2011). "PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*." Journal of invertebrate pathology **108**(2): 135-137.
- Kozak, P. (2010). Small Hive Beetle. Guelph, Ontario, Canada, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- Kozak, P. (2012). Biosecurity practices for preventing the spread of Small Hive Beetle. Guelph, Ontario, Canada, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- Kralj, J. et S. Fuchs (2006). "Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers." Apidologie **37**(5): 577-587.
- Kralj, J. et S. Fuchs (2010). "Nosema sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers." Apidologie **41**(1): 21-28.
- Kukielka, D., F. Esperón, M. Higes et J. M. Sánchez-Vizcaíno (2008). "A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*." Journal of virological methods **147**(2): 275-281.
- Kulinčević, J., T. Rinderer et V. Mladjan (1991). "Effects of fluvalinate and amitraz on bee lice (*Braula coeca* Nitzsch) in honey bee (*Apis mellifera* L) colonies in Yugoslavia." Apidologie **22**(1): 43-47.
- Kwadha, C. A., G. O. Ong'amo, P. N. Ndegwa, S. K. Raina et A. T. Fombong (2017). "The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*." Insects **8**(2): 61.
- Langridge, D. et R. B. McGhee (1967). "*Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*." The Journal of protozoology **14**(3): 485-487.
- Le Conte, Y., G. De Vaublanc, D. Crauser, F. Jeanne, J.-C. Rousselle et J.-M. Bécard (2007). "Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*." Apidologie **38**(6): 566-572.
- Le Conte, Y. et M. Navajas (2008). "Climate change: impact on honey bee populations and diseases." Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) **27**(2): 499-510.
- Lindström, A. et I. Fries (2005). "Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies." Journal of apicultural research **44**(2): 82-86.

- Macedo, P. A., J. Wu et M. D. Ellis (2002). "Using inert dusts to detect and assess varroa infestations in honey bee colonies." Journal of apicultural research **41**(1-2): 3-7.
- Maori, E., S. Lavi, R. Mozes-Koch, Y. Gantman, Y. Peretz, O. Edelbaum, E. Tanne et I. Sela (2007). "Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination." The Journal of general virology **88**(12): 3428-3438.
- Maori, E., N. Paldi, S. Shafir, H. Kalev, E. Tsur, E. Glick et I. Sela (2009). "IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion." Insect molecular biology **18**(1): 55-60.
- MAPAQ. (2016). "Réseau apicole." Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec Retrieved Octobre 27, 2016.
- Marin, M. (1978). "World spread of Varroa disease." Apiacta **13**(4): 163-166.
- Martin, S. (1998). "A population model for the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni in honey bee (*Apis mellifera*) colonies." Ecological modelling **109**(3): 267-281.
- Martin, S. J. (1994). "Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions." Experimental & applied acarology **18**(2): 87-100.
- Martin, S. J. (2001). "The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach." The Journal of applied ecology **38**(5): 1082-1093.
- Martin, S. J., B. V. Ball et N. L. Carreck (2010). "Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide-treated Varroa destructor infested honey bee (*Apis mellifera*) colonies." Journal of apicultural research **49**(1): 72-79.
- Martín-Hernández, R., C. Botías, L. Barrios, A. Martínez-Salvador, A. Meana, C. Mayack et M. Higes (2011). "Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*)." Parasitology research **109**(3): 605-612.
- Martín-Hernández, R., A. Meana, P. García-Palencia, P. Marín, C. Botías, E. Garrido-Bailón, L. Barrios et M. Higes (2009). "Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia." Applied and environmental microbiology **75**(8): 2554-2557.
- Martín-Hernández, R., C. Bartolomé, N. Chejanovsky, Y. Le Conte, A. Dalmon, C. Dussaubat, P. García-Palencia, A. Meana, M. A. Pinto et V. Soroker (2018). "Nosema

- ceranae in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective." Environmental microbiology **20**(4): 1302-1329.
- Martín-Hernández, R., C. Botías, E. G. Bailón, A. Martínez-Salvador, L. Prieto, A. Meana et M. Higes (2012). "Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?" Environmental microbiology **14**(8): 2127-2138.
- Mayack, C. et D. Naug (2010). "Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers." Journal of insect physiology **56**(11): 1572-1575.
- McKee, B. A., S. P. Djordjevic, R. D. Goodman et M. A. Hornitzky (2003). "The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR." Apidologie **34**(1): 19-27.
- McMullan, J. B. et M. J. F. Brown (2008). "A qualitative model of mortality in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with tracheal mites (*Acarapis woodi*)." Experimental & applied acarology **47**(3): 225.
- Meana, A., R. Martín-Hernández et M. Higes (2010). "The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees." Journal of apicultural research **49**(2): 212-214.
- Medrzycki, P., F. Sgolastra, L. Bortolotti, G. Bogo, S. Tosi, E. Padovani, C. Porrini et A. G. Sabatini (2010). "Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides." Journal of apicultural research **49**(1): 52-59.
- Milani, N. (1999). "The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides." Apidologie **30**(2-3): 229-234.
- Ministry of Agriculture of British Columbia (2015). *Varroa Mite Detection Methods*. M. o. Agriculture. Abbotsford, Plant & Animal Health Branch: 5.
- Miyagi, T., C. Y. Peng, R. Y. Chuang, E. C. Mussen, M. S. Spivak et R. H. Doi (2000). "Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus* larvae in the United States." Journal of invertebrate pathology **75**(1): 95-96.
- Möckel, N., S. Gisder et E. Genersch (2011). "Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route." The Journal of general virology **92**(2): 370-377.

- Mondet, F. et Y. Le Conte (2014). Parasites. Bee Health and veterinarians. Paris, OIE : World Organisation for Animal Health.
- Mouches, C., J. Bové, J. Tully, D. Rose, R. McCoy, P. Carle-Junca, M. Garnier et C. Saillard (1983). Spiroplasma apis, a new species from the honey-bee Apis mellifera. Annales de l'Institut Pasteur. Microbiology., Elsevier.
- Mutinelli, F., C. Costa, M. Lodesani, A. Baggio, P. Medrzycki, G. Formato et C. Porrini (2010). "Honey bee colony losses in Italy." Journal of apicultural research **49**(1): 119-120.
- Mutinelli, F., F. Montarsi, G. Federico, A. Granato, A. M. Ponti, G. Grandinetti, N. Ferrè, S. Franco, V. Duquesne et M.-P. Rivière (2014). "Detection of Aethina tumida Murray (Coleoptera: Nitidulidae.) in Italy: outbreaks and early reaction measures." Journal of Apicultural Research **53**(5): 569-575.
- National Bee Diagnostic Centre (2017a). Canadian National Honey Bee Health Survey - 2016 report. Beaverlodge, AB, Grande Prairie Regional College and Beaverlodge Research Farm: 32.
- National Bee Diagnostic Centre (2017b). Enquête Nationale Canadienne sur l'état de Santé des Abeilles Domestiques - Rapport 2016. Beaverlodge, AB, Grande Prairie Regional College and Beaverlodge Research Farm: 32.
- Naug, D. et A. Gibbs (2009). "Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with Nosema ceranae." Apidologie **40**(6): 595-599.
- Neumann, P. et J. D. Ellis (2008). "The small hive beetle (Aethina tumida Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species." Journal of apicultural research **47**(3): 181-183.
- Neumann, P., J. D. Evans, J. S. Pettis, C. W. Pirk, M. O. Schäfer, G. Tanner et J. D. Ellis (2013). "Standard methods for small hive beetle research." Journal of Apicultural Research **52**(4): 1-32.
- Neumann, P. et W. Ritter (2004). "A scientific note on the association of Cychramus luteus (Coleoptera: Nitidulidae) with honeybee (Apis mellifera) colonies." Apidologie **35**(6): 665-666.
- Nguyen, B. K., C. Saegerman et E. Haubruge (2009). "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." Annales de médecine vétérinaire **153**: 219-223.
- Nielsen, S. L., M. Nicolaisen et P. Kryger (2008). "Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark." Apidologie **39**(3): 310-314.
- Odoux, J.-F., D. Feuillet, P. Aupinel, Y. Loublier, J.-N. Tasei et C. Mateescu (2012). "Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies." Apidologie **43**(5): 561-575.
- OIE (2008a). Acarapisosis of Honey Bees. OIE Terrestrial manual.
- OIE (2008b). Varroosis of Honey Bees. OIE Terrestrial manual: 424-430.
- OIE (2013). Nosemosis of Honey Bees. OIE Terrestrial manual: 1-6.
- OIE (2016a). American foulbrood of honey bees: 15pp.
- OIE (2016b). Apinae. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016.
- OIE (2016c). European foulbrood of honey bees: 15pp.
- OIE (2016d). Texte introductif général fournissant des informations de base aux chapitres du Code sanitaire pour les animaux terrestres sur les maladies des abeilles. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 12, rue de Prony, Paris, France.
- Olivier, V. et M. Ribière (2006). "Les virus infectant l'abeille *Apis mellifera*: le point sur leur classification." Virologie **10**(4): 267-278.
- Otis, G. W., J. B. Bath, D. L. Randall et G. M. Grant (1988). "Studies of the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi*)(Acari: Tarsonemidae) during winter." Canadian journal of zoology **66**(10): 2122-2127.
- Otis, G. W. et C. D. Scott-dupree (1992). "Effects of *Acarapis woodi* on overwintered colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York." Journal of economic entomology **85**(1): 40-46.
- Otten, C. (2003). "A general overview on AFB and EFB pathogen, way of infection, multiplication, clinical symptoms and outbreak." Apiacta **38**: 106-113.
- Parra, H. et G. Ramos (1998). "Cutaneous aspergillosis: a report of six cases." The British journal of dermatology **139**(3): 522-526.

- Paxton, R. J., J. Klee, S. Korpela et I. Fries (2007). "Nosema ceranae has infected Apis mellifera Europe in at least 1998 and may be more virulent than Nosema apis." Apidologie **38**: 558-565.
- Pernal, S. F., R. L. Albright et A. P. Melathopoulos (2008). "Evaluation of the Shaking Technique for the Economic Management of American Foulbrood Disease of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae)." Journal of economic entomology **101**(4): 1095-1104.
- Pernal, S. F. et H. Clay (2015). Maladies et organismes nuisibles de l'abeille domestique. Beaverlodge (Alberta), Association canadienne des professionnels de l'apiculture.
- Pernal, S. F., A. Ibrahim et A. P. Melathopoulos (2009). Evaluation of the effectiveness of fumagillin and alternative therapies for the control of Nosema ceranae, Agriculture et agroalimentaire Canada, Alberta, Canada.
- Phibbs, A. (1996). "Three year survey of varroa mite and tracheal mite infestations of honey bees in Wisconsin." American bee journal **136**: 3.
- Plischuk, S., I. Meeus, G. Smagghe et C. E. Lange (2011). "Apicystis bombi (apicomplexa: neogregarinorida) parasitizing apis mellifera and bombus terrestris (hymenoptera: apidae) in Argentina." Environmental microbiology reports **3**(5): 565-568.
- Pohorecka, K., M. Skubida, A. Bober et D. Zdanska (2012). "Screening of Paenibacillus larvae spores in apiaries from Eastern Poland. Nationwide survey. Part I." Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy **56**(539-545).
- Puerta, F., J. Flores, M. Bustos, F. Padilla et F. Campano (1994). "Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions." Apidologie **25**(6): 540-546.
- RAIZO (2016). Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2015. Bulletin zoosanitaire, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- RAIZO (2017). Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2015-2016. Bulletin zoosanitaire, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.
- RAIZO (2018). Enquête sur la mortalité hivernale des colonies d'abeilles au Québec en 2016-2017. Bulletin zoosanitaire, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

- Ramsey, S. D., R. Ochoa, G. Bauchan, C. Gulbranson, J. D. Mowery, A. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J. M. Cicero et J. D. Ellis (2019). "Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph." Proceedings of the National Academy of Sciences **116**(5): 1792-1801.
- Ratti, C., G. Budge, L. Ward, G. Clover, C. Rubies-Autonell et C. Henry (2004). "Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and Polymyxa graminis in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®)." Journal of virological methods **122**(1): 95-103.
- Regassa, L. B. et G. E. Gasparich (2006). "Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **11**(1): 2983-3002.
- Rivière, M., B. Ball et M. Aubert (2008). "Natural history and geographical distribution of honey bee viruses." Virology and the honey bee: 15-84.
- Ribiere, M., P. Lallemand, A.-L. Iscache, F. Schurr, O. Celle, P. Blanchard, V. Olivier et J.-P. Faucon (2007). "Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces." Applied and environmental microbiology **73**(23): 7711-7716.
- Rieg, S. (2010). "Paenibacillus larvae Bacteremia in Injection Drug Users-Volume 16, Number 3—March 2010-Emerging Infectious Disease journal-CDC."
- Ritter, W. (2003). "Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis." Apiacta **38**(2): 125-130.
- Ritter, W. (2014). Bee health and veterinarians, OIE (World Organisation for Animal Health).
- Ritter, W. et M. Kiefer (1995). "A method for diagnosing Bacillus larvae in honey samples." Animal research and development **42**: 7-13.
- Roetschi, A., H. Berthoud, R. Kuhn et A. Imdorf (2008). "Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation." Apidologie **39**(3): 362-371.
- Rollin, O., V. Bretagnolle, A. Decourtye, J. Aptel, N. Michel, B. E. Vaissiere et M. Henry (2013). "Differences of floral resource use between honey bees and wild bees in an intensive farming system." Agriculture, ecosystems & environment **179**(1): 78-86.
- Rosenkranz, P., P. Aumeier et B. Ziegelmann (2010). "Biology and control of *Varroa destructor*." Journal of invertebrate pathology **103 Suppl 1**: S96-119.

- Runckel, C., M. L. Flenniken, J. C. Engel, J. G. Ruby, D. Ganem, R. Andino et J. L. DeRisi (2011). "Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia." PloS one **6**(6): e20656.
- Rutrecht, S. T. et M. J. Brown (2008). "The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens." International journal for parasitology **38**(7): 799-808.
- Sammataro, D., U. Gerson et G. Needham (2000). "Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact." Annual review of entomology **45**(1): 519-548.
- Sarwar, M. (2016). "Challenges due to bacterial infections of the honey bees and contributions to manage pest problems." International journal of entomology research **1**(1): 4-10.
- Schäfer, M. O. et W. Ritter (2014). The small hive beetle (*Aethina tumida*). Bee health and veterinarians. W. Ritter, OIE (World Organisation for Animal Health): 149-222.
- Schäfer, M. O., W. Ritter, J. S. Pettis et P. Neumann (2010). "Winter losses of honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae): The role of infestations with *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) and *Varroa destructor* (Parasitiformes: Varroidae)." Journal of economic entomology **103**(1): 10-16.
- Schmidt, J. O., S. C. Thoenes et M. D. Levin (1987). "Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources." Annals of the Entomological Society of America **80**(2): 176-183.
- Seeley, T. D. (2007). "Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States." Apidologie **38**(1): 19-29.
- Seeley, T. D. et R. A. Morse (1977). "Dispersal behavior of honey bee swarms." Psyche **84**(3-4): 199-209.
- Shutler, D., K. Head, K. L. Burgher-MacLellan, M. J. Colwell, A. L. Levitt, N. Ostiguy et G. R. Williams (2014). "Honey bee *Apis mellifera* parasites in the absence of *Nosema ceranae* fungi and *Varroa destructor* mites." PloS one **9**(6): e98599.
- Siede, R., M. König, R. Büchler, K. Failing et H.-J. Thiel (2008). "A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies." Apidologie **39**(6): 650-661.

- Silvina, N., J. Florencia, P. Nicolas, P. Cecilia, P. Lucia, S. Abbate, C. L. Leonidas, D. Sebastian, M. Yamandu, C. Veronica et H. Horacio (2017). "Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: towards a pesticide residues biomonitor." The Science of the total environment **581**(582): 25-31.
- Simone-Finstrom, M., H. Li-Byarlay, M. H. Huang, M. K. Strand, O. Rueppell et D. R. Tarpay (2016). "Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees." Scientific reports **6**: 32023.
- Smith, K. M., E. H. Loh, M. K. Rostal, C. M. Zambrana-Torrel, L. Mendiola et P. Daszak (2013). "Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses." EcoHealth **10**(4): 434-445.
- Somerville, D. (2003). "Study of the small hive beetle in the USA." Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, NSW Agriculture, RIRDC Publication(03/050).
- Soroker, V., A. Hetzroni, B. Yakobson, D. David, A. David, H. Voet, Y. Slabezki, H. Efrat, S. Levski et Y. Kamer (2010). "Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests." Apidologie.
- Spangler, H. G. (1988). "Sound and the moths that infest beehives." Florida Entomologist: 467-477.
- Spiewok, S., M. Duncan, R. Spooner-Hart, J. S. Pettis et P. Neumann (2008). "Small hive beetle, *Aethina tumida*, populations II: Dispersal of small hive beetles." Apidologie **39**(6): 683-693.
- Spiewok, S. et P. Neumann (2006). "Cryptic low-level reproduction of small hive beetles in honey bee colonies." Journal of apicultural research **45**(1): 47-48.
- Spivak, M. et S. Reuter (2001). "Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior." Apidologie **32**(6): 555-565.
- Steinkraus, K., H. et R. Morse, A. (1992). "American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys." Apidologie **23**(6): 497-501.
- Stevanovic, J., Z. Stanimirovic, E. Genersch, S. R. Kovacevic, J. Ljubenkovic, M. Radakovic et N. Aleksic (2010). "Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder." Apidologie.

- Stevenson, M. A., H. Benard, P. Bolger et R. S. Morris (2005). "Spatial epidemiology of the Asian honey bee mite (*Varroa destructor*) in the North Island of New Zealand." Preventive veterinary medicine **71**(3): 241-252.
- Switanek, M., K. Crailsheim, H. Truhetz et R. Brodschneider (2017). "Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate." The Science of the total environment **579**: 1581-1587.
- Szabo, T. I. (1980). "Effect of weather factors on honeybee flight activity and colony weight gain." Journal of apicultural research **19**(3): 164-171.
- Tentcheva, D., L. Gauthier, L. Bagny, J. Fievet, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin et M. Bergoin (2006). "Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*." Apidologie **37**(1): 41-50.
- Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin et M. Bergoin (2004). "Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France." Applied and environmental microbiology **70**(12): 7185-7191.
- Theantana, T. et P. Chantawannakul (2008). "Protease and β -N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*." Journal of apicultural research **47**(1): 68-76.
- Thompson, H. M. et M. A. Brown (2001). "Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood?" Bee world **82**(3): 130-138.
- Titera, D. et M. Haklova (2003). "Detection method of *Paenibacillus* larvae from beehive winter debris." Apiacta **38**: 131-133.
- Todd, J., B. Ball et J. d. Miranda (2004). "Identifying the viruses causing mortality of honey bees in colonies infested with *Varroa destructor*." Surveillance (Wellington) **31**(4): 22-25.
- Toplak, I., U. Jamnikar Ciglencečki, K. Aronstein et A. Gregorc (2013). "Chronic Bee Paralysis Virus and *Nosema ceranae* Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.)." Viruses **5**(9): 2282.
- Traver, B. E., M. R. Williams et R. D. Fell (2012). "Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies." Journal of invertebrate pathology **109**(2): 187-193.

- Tremolada, P., I. Bernardinelli, M. Colombo, M. Spreafico et M. Vighi (2004). "Coumaphos Distribution in the Hive Ecosystem: Case Study for Modeling Applications." Ecotoxicology **13**(6): 589-601.
- Tremolada, P., I. Bernardinelli, B. Rossaro, M. Colombo et M. Vighi (2011). "Predicting pesticide fate in the hive (part 2): development of a dynamic hive model." Apidologie **42**(4): 439-456.
- Vallon, J. et S. Wendling (2017). "De la surveillance individuelle à la surveillance collective : connaître le niveau d'infestation des colonies d'abeilles mellifères par *Varroa destructor* pour optimiser et rationaliser la lutte." Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation **80**(1): 54-61.
- van der Zee, R. (2010). "Colony losses in the Netherlands." Journal of apicultural research **49**(1): 121-123.
- Van Der Zee, R., A. Gray, L. Pisa et T. De Rijk (2015). "An observational study of honey bee colony winter losses and their association with *Varroa destructor*, neonicotinoids and other risk factors." PloS one **10**(7): e0131611.
- vanEngelsdorp, D. et M. D. Meixner (2010). "A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them." Journal of invertebrate pathology **103**: S80-S95.
- Vejsnæs, F., S. L. Nielsen et P. Kryger (2010). "Factors involved in the recent increase in colony losses in Denmark." Journal of apicultural research.
- Vidal-Naquet, N. (2011). "Honeybees." Invertebrate Medicine, Second Edition: 285-321.
- Vidal-Naquet, N. (2015a). Fungal and protozoan diseases. Honeybee Veterinary Medecine: *Apis mellifera* L. Sheffield, United Kingdom, 5m Publishing: 151-169.
- Vidal-Naquet, N. (2015b). Honeybee bacterial diseases. Honeybee Veterinary Medecine: *Apis mellifera* L. Sheffield, United Kingdom, 5m Publishing: 89-104.
- Vidau, C., M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Viguès, J.-L. Brunet, C. Texier, D. G. Biron, N. Blot et H. El Alaoui (2011). "Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*." PloS one **6**(6): e21550.
- von der Ohe, W. (2003). "Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms." Apiacta **38**: 137-139.

- Waite, R. J., M. A. Brown, H. M. Thompson et M. H. Bew (2003). "Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK." *Apidologie* **34**(6): 569-575.
- Wantuch, H. A. et D. R. Tarpy (2009). "Removal of Drone Brood From *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies to Control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and Retain Adult Drones." *Journal of economic entomology* **102**(6): 2033-2040.
- Ward, L., M. Brown, P. Neumann, S. Wilkins, J. Pettis et N. Boonham (2007). "A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*)." *Apidologie* **38**(3): 272-280.
- Wilkins, S., M. A. Brown et A. G. Cuthbertson (2007). "The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales." *Pest management science* **63**(11): 1062-1068.
- Williams, G. R., D. Shutler, C. M. Little, K. L. Burgher-Maclellan et R. E. L. Rogers (2010). "The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength*." *Apidologie*.
- Wu, J. Y., C. M. Anelli et W. S. Sheppard (2011). "Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity." *PloS one* **6**(2): e14720.
- Yang, X. et D. Cox-Foster (2007). "Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge." *Parasitology* **134**(3): 405-412.
- Yang, X. et D. L. Cox-Foster (2005). "Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(21): 7470-7475.
- Yoder, J. A., A. J. Jajack, W. S. Cornacchione, A. L. Dunn, E. G. Cunningham, C. L. Matchett et A. E. Rosselot (2014). "In vitro evaluation of sugar syrups, antibiotics, and miticides on growth of honey bee pathogen, *Ascosphaera apis*: Emphasis for chalkbrood prevention is on keeping bees healthy." *Apidologie* **45**(5): 568-578.
- Yoshiyama, M. et K. Kimura (2011). "Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan." *Journal of invertebrate pathology* **106**(2): 263-267.

- Yue, C. et E. Genersch (2005). "RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*)." The Journal of general virology **86**(12): 3419-3424.
- Zaghloul, O., A. Mourad, M. K. El, F. Nemat et M. Morsy (2005). "Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt." Communications in agricultural and applied biological sciences **70**(4): 703-714.
- Zawislak, J. (2010). Managing small hive beetles, Cooperative Extension Service, University of Arkansas, US Department of Agriculture, and county governments cooperating.

Annexe 1 – Résumé du choix des maladies

Tableau VI. Résumé des principaux arguments ayant mené au choix des maladies pour le présent projet.

Maladie	Pathogénicité	Présence anticipée au Qc	Comportement épidémique anticipé au Qc	Impact économique potentiel	Surveillance
Varroase	Menace majeure	Commune	Pandémique	Sévère	OIE, ACIA, MAPAQ
Acarapisose	Faible à sévère	Peu commune	Endémique	Faible	OIE, MAPAQ
Petit coléoptère de la ruche	Sévère	Exempt (larves)	Épidémique	Sévère	OIE, ACIA, MAPAQ
Mouche zombie	Faible à modérée	Présent	Inconnu	Faible	
Loque américaine	Menace majeure	Peu commune	Épidémique	Sévère	OIE, MAPAQ
Loque européenne	Faible à sévère	Commune	Endémique	Faible à sévère	OIE, MAPAQ
Nosérose	Faible à sévère	Commune	Endémique	Faible à sévère	MAPAQ
Maladie du couvain plâtré	Faible	Commune	Endémique	Faible	MAPAQ
Ailes déformées (DWV)	Faible à sévère (+ <i>V. destructor</i>)	Présente	Endémique	Faible à sévère	
Virus des cellules noires de reine (BQCV)	Faible à modérée (+ <i>N. apis</i>)	Présente	Endémique	Faible	
Paralysie aiguë (ABPV)	Faible à modérée	Inconnue	Endémique	Faible	
Israéli paralysie aiguë (IAPV)	Faible à modérée	Inconnue	Endémique	Faible	
Abeille de cachemire (KBV)	Faible à sévère	Inconnue	Endémique	Faible	

Annexe 2 – Formulaire d’information et de consentement

Projet : Étude épidémiologique des principales pathologies de l’abeille au sud-ouest du Québec et impacts sur la mortalité hivernale des colonies

Problématique et objectifs du projet

Ce projet de recherche vise à estimer la prévalence des principaux agents pathogènes affectant les abeilles dans la province et à évaluer l’effet de ces pathogènes, en combinaison avec différents facteurs de risque, sur la mortalité hivernale. Ceci permettra d’évaluer le rôle des agents pathogènes, pratique de régie ou conditions environnementales dans la survie des ruches afin de mieux comprendre ce phénomène complexe. Les maladies suivantes sont ciblées : petit coléoptère de la ruche, varroase, acariose, loque américaine et européenne, nosérose, couvain plâtré et mouche zombie. Différents virus pourront également être testés. De plus, la présence de pesticides dans le miel des colonies participantes sera évaluée.

Procédures

Les prélèvements pour ce projet de recherche seront réalisés lors de la visite planifiée par le MAPAQ pour la surveillance active du petit coléoptère de la ruche. Au courant de cette visite, jusqu’à 10 colonies par rucher sélectionné feront l’objet d’une inspection complète. Environ 600 abeilles par colonie seront prélevées afin de pouvoir rechercher les différents agents pathogènes. Un maximum de 10 grammes de miel sera également prélevé. Le site du rucher sera géo-référencé, et différentes observations sur l’état de la ruche seront notées. Un questionnaire sur les pratiques de régie devra être complété par chaque apiculteur participant à l’automne. Les ruches échantillonnées seront identifiées par une étiquette afin de pouvoir les suivre jusqu’au printemps. Au printemps, l’équipe de recherche fera un suivi auprès des apiculteurs participants afin d’obtenir l’information sur la présence de mortalité hivernale pour les colonies échantillonnées.

Avantages et risques

Votre participation contribuera à l’avancement des connaissances scientifiques afin de mieux connaître l’état de santé des colonies et les facteurs qui y sont associés dans le contexte québécois. De plus, elle vous permettra de connaître l’état de santé complet de vos ruchers participants, puisque les résultats des analyses de laboratoire vous seront communiqués. Les risques du projet sont mineurs et rares. Étant donné la grande population d’une colonie en plein été, le nombre d’abeilles prélevées ne devrait pas affecter le bon fonctionnement de la ruche. Il existe un faible risque que la reine soit accidentellement perdue ou blessée lors des manipulations de la ruche; c’est pourquoi votre présence est souhaitée lors de la visite. Finalement, l’équipe de terrain prendra toutes les mesures de biosécurité nécessaire pour protéger vos colonies.

Confidentialité

Il est entendu que les renseignements recueillis (résultats de laboratoire et questionnaire) sont confidentiels et que seuls le MAPAQ, qui réalise les analyses, et les membres de l’équipe de recherche de la Faculté de médecine vétérinaire (FMV) auront accès à ceux-ci. Les résultats de laboratoire vous seront transmis. Les résultats du projet pourront être diffusés sous forme de publications écrites ou de présentation orale, mais uniquement sous un format agrégé qui protégera la confidentialité de vos

données. Aucune information permettant de vous identifier ne sera divulguée publiquement à moins d'un consentement explicite de votre part.

Participation volontaire

Votre participation à ce projet de recherche est volontaire. Cela signifie que vous acceptez de participer au projet sans aucune contrainte ou pression extérieure, et que par ailleurs vous êtes libre de mettre fin à votre participation en tout temps au cours de cette recherche. Dans ce cas, les renseignements vous concernant seront détruits.

Compensation financière

Les frais reliés à la prise d'échantillons et aux analyses de laboratoire seront entièrement couverts par le projet. Aucune autre compensation financière n'est prévue.

Personnes-ressources

En cas d'urgence ou pour toute question concernant les aspects scientifiques du projet, vous pouvez contacter Gabrielle Claing (étudiante responsable du projet), Julie Arsenault (chercheuse, Faculté de médecine vétérinaire) ou encore Julie Ferland (responsable du projet au MAPAQ) aux coordonnées suivantes :

Gabrielle Claing, D.M.V.
Étudiante à la maîtrise
Faculté de médecine vétérinaire
3200, rue Sicotte
Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2
Téléphone: XXX-XXX-XXXX
Courriel: gabrielle.claing@umontreal.ca

Julie Arsenault, D.M.V., M.Sc., Ph.D.
Professeure agrégée
Faculté de médecine vétérinaire
3200, rue Sicotte
Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2
Téléphone : 450-773-8521 poste 86040
Courriel: julie.arsenault@umontreal.ca

Julie Ferland, D.M.V.
Responsable du réseau apicole|Responsable provinciale en apiculture
Direction de la santé animale
Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation
200, chemin Sainte-Foy, 11e étage
Québec (Québec) G1R 4X6
Téléphone : 418 380-2100, poste 2067
julie.ferland2@mapaq.gouv.qc.ca

Remerciements

Votre collaboration est essentielle à la réalisation de notre projet et l'équipe de recherche tient à vous en remercier grandement.

Signatures

Je reconnais avoir lu le présent formulaire de consentement et consens volontairement à participer à ce projet de recherche.

Je soussigné _____ autorise le personnel de l'équipe de recherche à effectuer des prélèvements dans mes ruchers. J'autorise la communication de mes résultats à l'équipe de recherche ainsi qu'au MAPAQ.

Signature de l'apiculteur

Date

Signature d'un membre de l'équipe de terrain

Date

Annexe 3 – Examen du rucher et des colonies

QUESTIONNAIRE VISITE

Nom de l'inspecteur: _____ Date de la visite: _____

Heure début de visite: _____ H _____ Heure fin de visite: _____ H _____

Les renseignements recueillis sont traités de façon confidentielle

C - INFORMATIONS SUR LE RUCHER

- a. Nombre de colonies: _____
- b. Positionnement des colonies les unes par rapport aux autres:
- Séparées individuellement.
- En groupe de _____ colonies.
- c. Ce rucher est-il sédentaire ou en transhumance pour la saison 2017 (choisir 1 réponse)?

Sédentaire c'est-à-dire qu'il n'est pas déplacé de toute la période de production (i.e. pour la pollinisation)	<input type="checkbox"/>
Transhumance/pollinisation	<input type="checkbox"/>

- d. Au meilleur de votre connaissance, le miel prélevé pour le projet a été récolté :
1. À quelle période de l'été ? _____
2. À quel endroit ? _____
- e. Dans quel environnement se trouve ce rucher? (choisir 1 réponse)

Site complètement à découvert	<input type="checkbox"/>
Site à découvert, en bordure forestière	<input type="checkbox"/>
Site parsemé d'arbres	<input type="checkbox"/>

- f. Coordonnées GPS de 4 points aux extrémités du rucher (évaluation de la surface):

Point #	X	Y
1		
2		
3		
4		

QUESTIONNAIRE VISITE : D - INFORMATIONS SUR LA COLONIE

Id Apiculteur:		# de rucher:	# de colonie:									
INFORMATION												
Emplacement géographique												
# d'enregistrement du point GPS												
Orientation cardinale de l'entrée de la ruche (°)												
Description de la colonie												
Dernière introduction de reine												
	<1 an	<input type="checkbox"/>										
	Entre 1 et 2 ans	<input type="checkbox"/>										
	2 ans ou plus	<input type="checkbox"/>										
	Ne sait pas	<input type="checkbox"/>										
Dernière division de la colonie												
	<1 an	<input type="checkbox"/>										
	Entre 1 et 2 ans	<input type="checkbox"/>										
	2 ans ou plus	<input type="checkbox"/>										
	Ne sait pas	<input type="checkbox"/>										
Matériau de la ruche												
	Bois	<input type="checkbox"/>										
	Plastique	<input type="checkbox"/>										
	Styromousse	<input type="checkbox"/>										
Matériau des cadres												
	Bois	<input type="checkbox"/>										
	Plastique	<input type="checkbox"/>										
	Styromousse	<input type="checkbox"/>										
État de santé												
La ruche a-t-elle reçu un diagnostic pour une maladie dans le dernier mois (cochez si oui)?			<input type="checkbox"/>									
Si oui, précisez :												
La ruche a-t-elle reçu les traitements suivants dans le dernier mois (cochez tout ce qui s'applique)?												
	Apistan® (Fluvalinate)	<input type="checkbox"/>										
	Apivar® (Amitraz)	<input type="checkbox"/>										
	CheckMite+® (Coumaphos)	<input type="checkbox"/>										
	Thymovar® (Thymol)	<input type="checkbox"/>										
	Traitement « flash » ou Mite wipe® (65% acide formique)	<input type="checkbox"/>										
	Mite away® (47% acide formique) ou MAQS	<input type="checkbox"/>										
	Acide oxalique	<input type="checkbox"/>										
	Oxytétracycline	<input type="checkbox"/>										
	Tylosine	<input type="checkbox"/>										
	Fumagilline	<input type="checkbox"/>										
	Autre	<input type="checkbox"/>										
Si autre, précisez :												
	Aucun	<input type="checkbox"/>										
Force de la colonie selon l'inspecteur												
	Faible	<input type="checkbox"/>										
	Moyenne	<input type="checkbox"/>										
	Forte	<input type="checkbox"/>										
	Ne sait pas	<input type="checkbox"/>										

Id apiculteur:	# de rucher:	# de colonie:									
SIGNES CLINIQUES OBSERVÉS											
Ailes déformées 1 ou + abeille adulte présentant des ailes difformes. Typiquement, les ailes sont atrophiées et rabougries, sur la jeune abeille nourrice (près du couvain).		<input type="checkbox"/>									
Varroa observé sur les abeilles 1 ou + abeille adulte infestée d'un varroa, typiquement visible sur le dos de celle-ci.		<input type="checkbox"/>									
Jeunes abeilles sans poil 1 ou + petite abeille adulte, près du couvain, lisse et sans poil.		<input type="checkbox"/>									
Capsules du couvain renfoncées et/ou perforées 1 ou + opercules de couvain renfoncées ou perforées sur 1 ou + cadres.		<input type="checkbox"/>									
Larves operculées mortes et visqueuses 1 ou + larves operculées mortes, typiquement de consistance visqueuse. La larve prend typiquement une couleur brunâtre et semble accolée à la paroi de la cellule.		<input type="checkbox"/>									
Larves non-operculées mortes et mollasses 1 ou + larves non-operculées mortes, typiquement de consistance mollasse. La couleur de la larve peut varier entre blanc et brun.		<input type="checkbox"/>									
Test de l'allumette positif S'il y a présence de larves mortes d'apparence anormale, réaliser un test de l'allumette. Ce test consiste à enfoncer une sonde (i.e. tige d'une allumette) dans une larve morte et la retirer. Si un filet de larve reste accolé à la sonde en la retirant, le test est positif.		<input type="checkbox"/>									
Couvain en mosaïque Couvain hétérogène, composé de la juxtaposition dans le désordre de couvain de tout âge. La forme normalement concentrique du couvain semble parsemée de trous. Présent sur 1 cadre ou plus.		<input type="checkbox"/>									
Momies Larves mortes noires à blanches et d'apparence crayeuse au plancher de la ruche ou dans les cellules.		<input type="checkbox"/>									
Abeilles rampantes ou paralysées 1 ou + abeille faible, incapable de voler (abeille rampante) ou présentant des signes de paralysie tel qu'un positionnement anormal des ailes (ailes en K).		<input type="checkbox"/>									
Mortalité aiguë Nombre anormalement élevé d'abeilles mortes à l'entrée de la ruche		<input type="checkbox"/>									
Aucun		<input type="checkbox"/>									
Autre		<input type="checkbox"/>									
Précisez:		<input type="checkbox"/>									