

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.03 - Version 07

Août 2019

Recherche de la loque américaine du couvain d'abeilles par examen bactérioscopique



Laboratoire de Sophia Antipolis

Laboratoire national de référence - Santé des abeilles

Laboratoire européen de référence - Santé de l'Abeille



Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V06	Révision mineure	14/10/2015	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.03 - révision 5 du LNR Santé des abeilles.
V07	Révision mineure	01/08/2019	Précisions apportées : lésions (langue nymphale) (§ 8.1), modalités de prélèvement (§ 8.2), réalisation d'une PCR si observation de bacilles Gram + (8.4), mise à jour des références de l'OIE.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis

Laboratoire National de Référence sur la santé des abeilles

Adresse : Les Templiers - 105 route des Chappes - CS 20111 - 06902 Sophia Antipolis Cedex

Contact : lnr.abeille@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	6
Avertissements et précautions de sécurité	7
1. Objet et domaine d'application	8
2. Documents de référence	8
3. Termes, sigles et définitions	8
4. Principe de la méthode	8
5. Réactifs	9
5.1. Eau	9
5.2. Ethanol	9
5.3. Kit de coloration de Gram	9
5.4. Huile à immersion	9
6. Appareillage et matériels	10
7. Échantillons	10
7.1. Conditions d'acceptation des échantillons.....	10
7.2. Conservation des échantillons avant analyse	10
8. Mode opératoire	10
8.1. Examen visuel du couvain : identification des lésions de loque américaine	10
8.2. Prélèvement et préparation de l'échantillon en vue de l'examen bactérioscopique	12
8.3. Préparation de la lame microscopique, coloration de Gram	13
8.4. Examen microscopique : détection des spores de type <i>P. larvae</i>	13
9. Résultats	14
9.1. Contrôle qualité.....	14
9.2. Calculs et expression des résultats.....	14
10. Caractéristiques de performance de la méthode	15
Annexe	16
Bibliographie	17

Table des figures

FIGURE 1. SCHEMA DU PRINCIPE DE LA METHODE.....	8
FIGURE 2. SPORES DE <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> - MICROSCOPE OPTIQUE X 1000 (COLORATION DE GRAM)	14

Table des tableaux

TABLEAU 1. LISTE DES LESIONS PRESENTES SUR UN COUVAIN ATTEINT DE LOQUE AMERICAINE.	11
TABLEAU 2. RESULTATS DE L'EXAMEN BACTERIOSCOPIQUE QUALITATIF.	14



Introduction

La loque américaine affecte les stades larvaires de l'abeille domestique *Apis mellifera*. La maladie est présente dans le monde entier. L'agent causal *Paenibacillus larvae* (White) est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Ces spores, extrêmement résistantes à la chaleur et aux agents chimiques, sont le vecteur de la maladie.

La loque américaine est classée comme danger sanitaire de catégorie 1 dans la réglementation française. Elle est réglementée à l'échelle européenne et fait partie de la liste de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale / Office International des Epizooties (OIE).

La présente méthode décrit une technique de diagnostic par examen bactérioscopique après coloration de Gram. Il s'agit d'une méthode interne adaptée du Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE (version 2018).

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Afin de protéger le manipulateur, la coloration de Gram doit être réalisée sous une hotte chimique munie des filtres appropriés ou sous une sorbonne. La manipulation des produits doit être effectuée avec des gants appropriés.

L'élimination des solutions utilisées lors de la coloration doit être effectuée selon les règles d'hygiène et de sécurité concernant les produits chimiques.

Manipulation et élimination des matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination de *P. larvae* dans l'environnement.



1. Objet et domaine d'application

La méthode décrite est une technique de diagnostic de la loque américaine pour une colonie présentant des signes cliniques de cette maladie.

Elle est adaptée du Manuel de diagnostic pour les animaux terrestres de l'Office International des Epizootie (OIE), 2018 (Chapitre 3.2.2). Ce diagnostic peut, si nécessaire, être confirmé par une identification en biologie moléculaire de *P. larvae*.

2. Documents de référence

- [1] OIE, 2018. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Chapitre 3.2.2, pp. 719-735.

3. Termes, sigles et définitions

OIE : Office International des Epizooties.

LNR : Laboratoire National de Référence.

PCR : Réaction en chaîne par polymérase.

4. Principe de la méthode

La méthode repose sur l'examen bactérioscopique après coloration de Gram d'un prélèvement de larves symptomatiques en vue de la visualisation de la forme sporulée de la bactérie pathogène *P. larvae*.

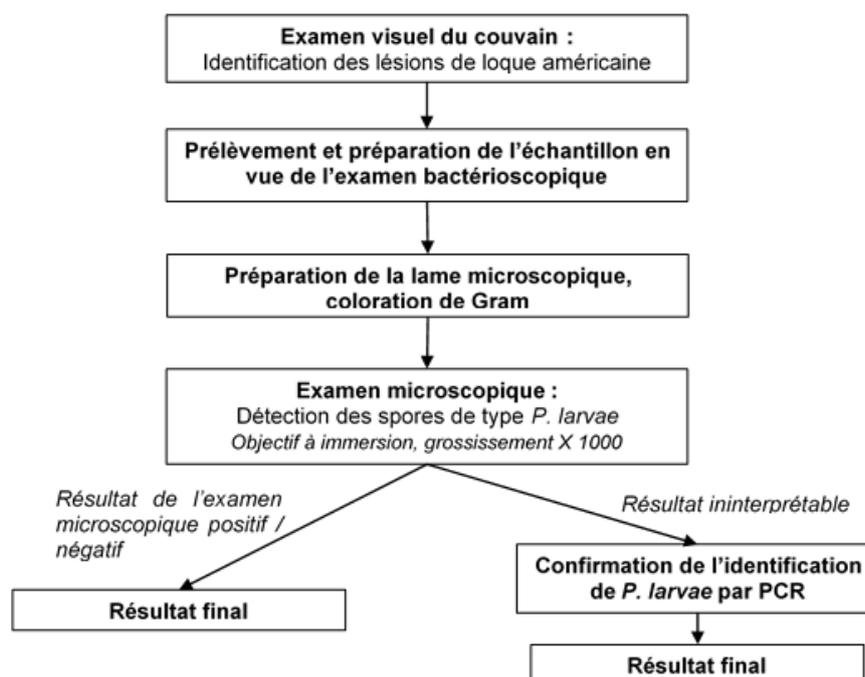


Figure 1. Schéma du principe de la méthode.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1. Eau

Utiliser de l'eau ultra pure (eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente).

5.2. Ethanol

Utiliser de l'éthanol de concentration supérieure ou égale à 70 %.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront respectées, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. Le laboratoire doit prendre en compte les dates de péremption préconisées par les fabricants lorsqu'une telle date est fournie.

L'éthanol est un produit toxique et dangereux (cf. annexe).

5.3. Kit de coloration de Gram

Il contient une solution de cristal violet (ou violet de Gentiane), du lugol, un produit décolorant différentiateur (alcool ou mélange d'alcool-acétone), un colorant de type safranine ou fuchsine.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront respectées, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. Le laboratoire doit prendre en compte les dates de péremption préconisées par les fabricants lorsqu'une telle date est fournie.

En raison de la toxicité de ces produits (cf. détails en annexe), les précautions de rigueur doivent être mises en œuvre afin de protéger le manipulateur et l'environnement (manipulation des produits avec des gants et sous une hotte chimique ou une sorbonne, élimination appropriée des déchets chimiques).

5.4. Huile à immersion

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront respectées, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. Le laboratoire doit prendre en compte les dates de péremption préconisées par les fabricants lorsqu'une telle date est fournie.

Certaines huiles peuvent présenter un caractère toxique et dangereux (cf. annexe). Il convient de mettre en place les mesures de précaution de rigueur lors de leur utilisation.



6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- Pince à bouts pointus
- Tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Broyeur pour micro tube
- Pipette à usage unique de 1000 µl
- Lames de microscopie
- Cœse de 10 µl
- Gants de laboratoire
- Minuteur
- Vortex
- Plaque chauffante
- Hotte aspirante
- Microscope optique possédant un objectif à immersion permettant un grossissement x1000

7. Échantillons

7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif des troubles observés, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

Des échantillons de deux natures peuvent être reçus au laboratoire :

- morceau de couvain avec du couvain ;
- prélèvements de larves / pronymphes malades ou d'écaillés loqueuses conditionnés par exemple en tube Eppendorf.

A réception au laboratoire, les échantillons ne doivent pas être en état de décomposition et doivent être en quantité suffisante et exploitables pour l'analyse :

- morceau de couvain d'une taille d'au moins 10 x 10 cm, non écrasé, présentant des alvéoles atteintes ;
- prélèvement de larves / pronymphes / écaillés avec au moins deux individus.

7.2. Conservation des échantillons avant analyse

Avant mise en analyse, les échantillons doivent être conservés dans les conditions suivantes :

- En réfrigération à environ + 4 °C si l'analyse est réalisée dans la journée suivant la réception des échantillons ;
- En congélation à environ -20 °C si l'analyse est différée.

8. Mode opératoire

8.1. Examen visuel du couvain : identification des lésions de loque américaine

Nota bene : Dans le cas où l'échantillon reçu par le laboratoire est un prélèvement de larve symptomatique, l'analyse débutera directement à l'étape suivante de mise en évidence des spores

ou bacilles de la bactérie en bactérioscopie (cf. paragraphe 8.2 Prélèvement et préparation de l'échantillon en vue de l'examen bactérioscopique).

Pour identifier les signes de la maladie, il faut considérer, d'une part, l'aspect général du couvain et, d'autre part, l'examen spécifique des alvéoles douteuses.

Tableau 1. Liste des lésions présentes sur un couvain atteint de loque américaine

1	Couvain en mosaïque
2	Opercules de couleur différente
3	Opercules affaissés
4	Opercules percés et/ou déchirés
5	Cadavres de larves de couleur marron clair à brun (sous l'opercule)
6	Cadavres de larves de consistance filante
7	Odeur spécifique des larves malades
8	Ecailles loqueuses
9	Langue nymphale

Les points 5 et 6 ont une obligation de présence pour établir le diagnostic. Le point 7 est parfois noté.

Le point 8 (présence d'écailles loqueuses) ne s'applique que pour les cas d'une maladie installée depuis plusieurs semaines ce qui peut éliminer alors le point 6.

Le point 9 apparaît suite à le mort d'une nymphe malade. C'est un caractère rarement observé.

Description des lésions observées :

1. Couvain en mosaïque

Juxtaposition sur un même cadre de couvains d'âges différents, de cellules vides, de cellules contenant des restes de larves malades. Cet aspect particulier est dû à l'élimination par les abeilles nettoyeuses des éléments malades du couvain qui sont alors remplacés par une nouvelle ponte de la reine.

2. Opercules de couleur différente

Les opercules des cellules saines ne présentent pas entre eux de variation notable couleur.

3. Opercules affaissés

Les opercules des cellules saines sont bombés ou plats. Un aspect affaissé ou convexe peut signer un développement de la maladie.



4. Opercules percés et/ou déchirés

Les opercules des cellules saines ne sont ni percés ni altérés de lésions témoignant d'une activité de nettoyage par les abeilles adultes.

5. Larves de couleur marron clair à brun

La larve malade perd sa couleur blanc-nacré d'origine.

6. Cadavres de larves de consistance filante

La larve malade prend une consistance élastique mise en évidence lorsque l'on essaie de retirer la larve de la cellule.

7. Odeur spécifique des larves malades

Un couvain sain « sent la ruche », particulièrement la cire. Les larves atteintes de loque américaine exhalent une odeur de colle forte de menuisier. Ce symptôme est noté particulièrement lorsque le prélèvement de couvain est frais et n'a pas été congelé.

8. Ecaille loqueuse

La larve malade sèche petit à petit pour n'être plus représentée que par un fin amas adhérent à la base de l'alvéole. Ce symptôme est uniquement valable pour une maladie installée depuis longtemps.

9. Langue Nymphale

C'est l'un des signes les plus caractéristiques de la maladie pouvant survenir suite à la mort de la larve au stade nymphal. Il reste cependant très rare à observer.

Nota bene : en l'absence de suspicion (basée sur des critères cliniques et/ou sur les lésions observées sur l'échantillon de couvain), la mise en évidence de l'agent en bactérioscopie optique ne sera pas conduite.

8.2. Prélèvement et préparation de l'échantillon en vue de l'examen bactérioscopique

- Remplir les tubes Eppendorf avec environ 500 µl d'eau ultra pure.
- Prélever dans les alvéoles operculées présentant des lésions caractéristiques, au moyen d'une pince stérile à bouts pointus, un échantillon représentatif (1 ou 2 larves).
- Broyer avec un broyeur en plastique stérile et homogénéiser au Vortex.

Nota bene : Dans le cadre d'un diagnostic différentiel avec la loque européenne : dans la mesure des possibilités, c'est-à-dire lorsque des larves symptomatiques sont observées dans le couvain ouvert et dans le couvain operculé, prélever un échantillon des deux stades de développement de couvain.

8.3. Préparation de la lame microscopique, coloration de Gram

- Réaliser un frottis :
 - Prélever avec une cèse environ 10µl de suspension.
 - Etaler sur une lame microscopique.
 - Sécher la lame en la déposant sur une plaque chauffante (température moyenne d'environ 45°C).
 - Fixer à l'éthanol.
- Coloration de Gram :

Nota bene : Au cours de l'étape de coloration, en raison de la toxicité des produits employés, l'opérateur devra porter des gants de laboratoire en nitrile. Cette opération devra de plus être effectuée sous une hotte aspirante.

- Colorer avec la solution de cristal violet oxalate (1 minute).
- Laver abondamment à l'eau ultra pure pour éliminer toute trace de solution en excès.
- Rincer avec un jet de lugol stabilisé pour éliminer toute trace d'eau puis recouvrir avec la solution de lugol stabilisé (30 secondes à 1 minute).
- Laver abondamment à l'eau ultra pure.
- Décolorer par le différenciateur puis rincer à l'eau ultra pure.
- Colorer avec la solution de safranine / fuchsine (1 minute).
- Laver à l'eau ultra pure puis laisser sécher la lame sur la plaque chauffante.

8.4. Examen microscopique : détection des spores de type *P. larvae*

- Déposer une goutte d'huile à immersion sur la lame microscopique
- Examiner la lame au microscope avec l'objectif à immersion au grossissement x 1000.

L'examen microscopique doit mettre en évidence la présence de spores (spores à bord non parallèles d'une taille d'environ 1,3 x 0,6 µm). Ces spores sont révélées par l'accumulation en périphérie d'une coloration rose. Elles sont optiquement vides (figure 1). Dans quelques cas (pour une atteinte récente de la maladie), des bacilles Gram + peuvent être observés, soit sous forme isolée, soit disposés en chaînes plus ou moins longues.

Dans le cas où l'interprétation de la lame est difficile, une identification de *Paenibacillus larvae* par PCR sera conduite. De même, si aucune spore n'est observée et que seuls des bacilles Gram + sont présents, compléter l'analyse par une identification par PCR.

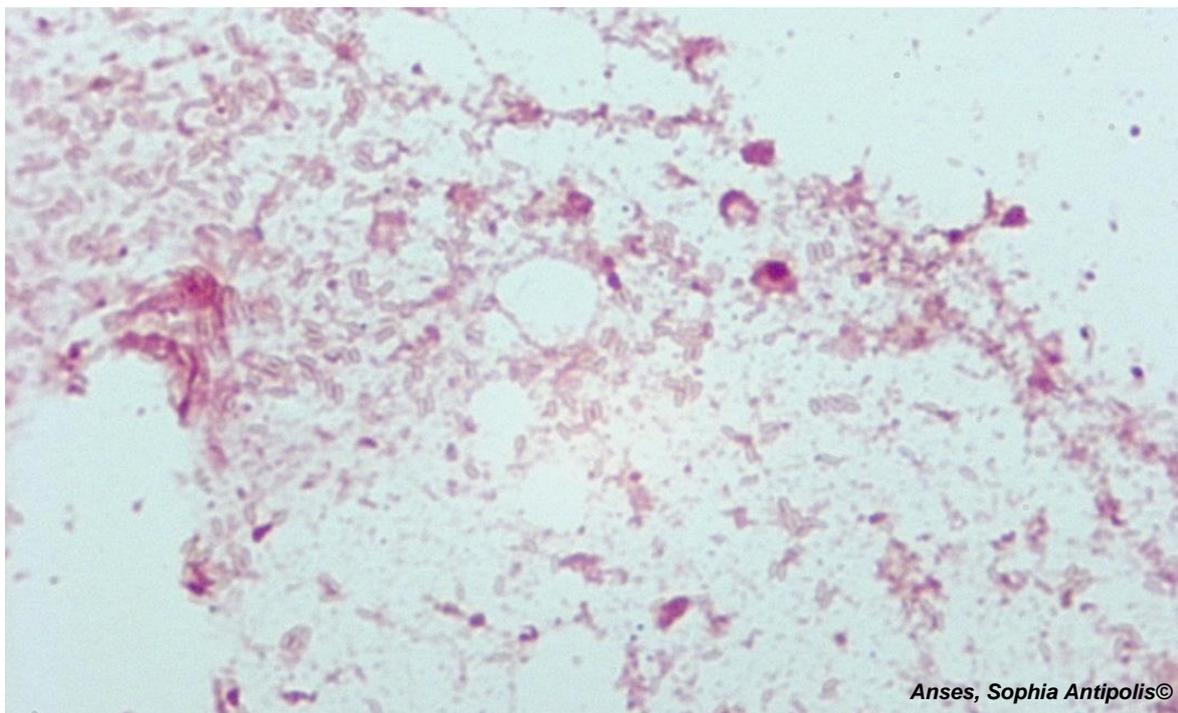


Figure 2. Spores de *Paenibacillus larvae* - Microscope optique x 1000 (coloration de Gram)

9. Résultats

9.1. Contrôle qualité

En cas de besoin, des lames de référence peuvent être observées en comparaison afin d'assurer la qualité des résultats obtenus.

9.2. Calculs et expression des résultats

Les résultats de l'examen qualitatif sont présentés de la façon suivante :

Tableau 2. Résultats de l'examen bactérioscopique qualitatif

Résultat de l'examen bactérioscopique	Expression du résultat analytique dans le rapport d'analyses Paramètre de l'analyse : spores de type <i>Paenibacillus larvae</i>
Présence de spores de type <i>P. larvae</i>	Déecté
Absence de spores de type <i>P. larvae</i>	Non déecté
Présence de spores non identifiables en bactérioscopie, pouvant s'apparenter à <i>P. larvae</i> (identification par PCR nécessaire en confirmation)	Ininterprétable

L'interprétation du résultat analytique est portée en fonction des lésions observées lors de l'examen du couvain au laboratoire et/ou des signes cliniques mentionnés dans le commémoratif, et des résultats des analyses de PCR éventuellement conduites.

Dans le cas où l'agent *P. larvae* est détecté et en présence de lésions et/ou signes cliniques évocateurs de maladie, la conclusion portée sera : « Recherche de la loque américaine positive ».

En l'absence de détection de l'agent *P. larvae*, la conclusion portée sera : « Recherche de la loque américaine négative ».

10. Caractéristiques de performance de la méthode

Sans objet.



Annexe

Phrases de risque

Analytes	Pictogrammes de danger	Code	Mentions de danger
Acétone	 	H225 H319 H336	Liquide et vapeurs très inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut provoquer somnolence ou vertiges.
Cristal violet / violet de gentiane	   	H226 H319 H351 H411	Liquide et vapeurs inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux. Susceptible de provoquer le cancer. Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
Ethanol	 	H225 H319	Liquide et vapeurs très inflammables. Provoque une sévère irritation des yeux.
Fuchsine	Sans objet	Sans objet	Sans objet d'après la réglementation en vigueur
Huile à immersion <i>NB : ces informations sont données à titre indicatif, le danger dépendant de la composition de l'huile</i>		H315 H319 H315	Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Peut irriter les voies respiratoires.
Lugol	Sans objet	Sans objet	Sans objet d'après la réglementation en vigueur
Safranine		H318	Provoque des lésions oculaires graves.

Bibliographie

Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.

OIE, 2018. Loque américaine des abeilles mellifères (infection des abeilles mellifères à *Paenibacillus larvae*). Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 3.2.2, pp. 719-735.