

# Prélèvements destinés à des analyses en pathologie apicole

1

# Introduction

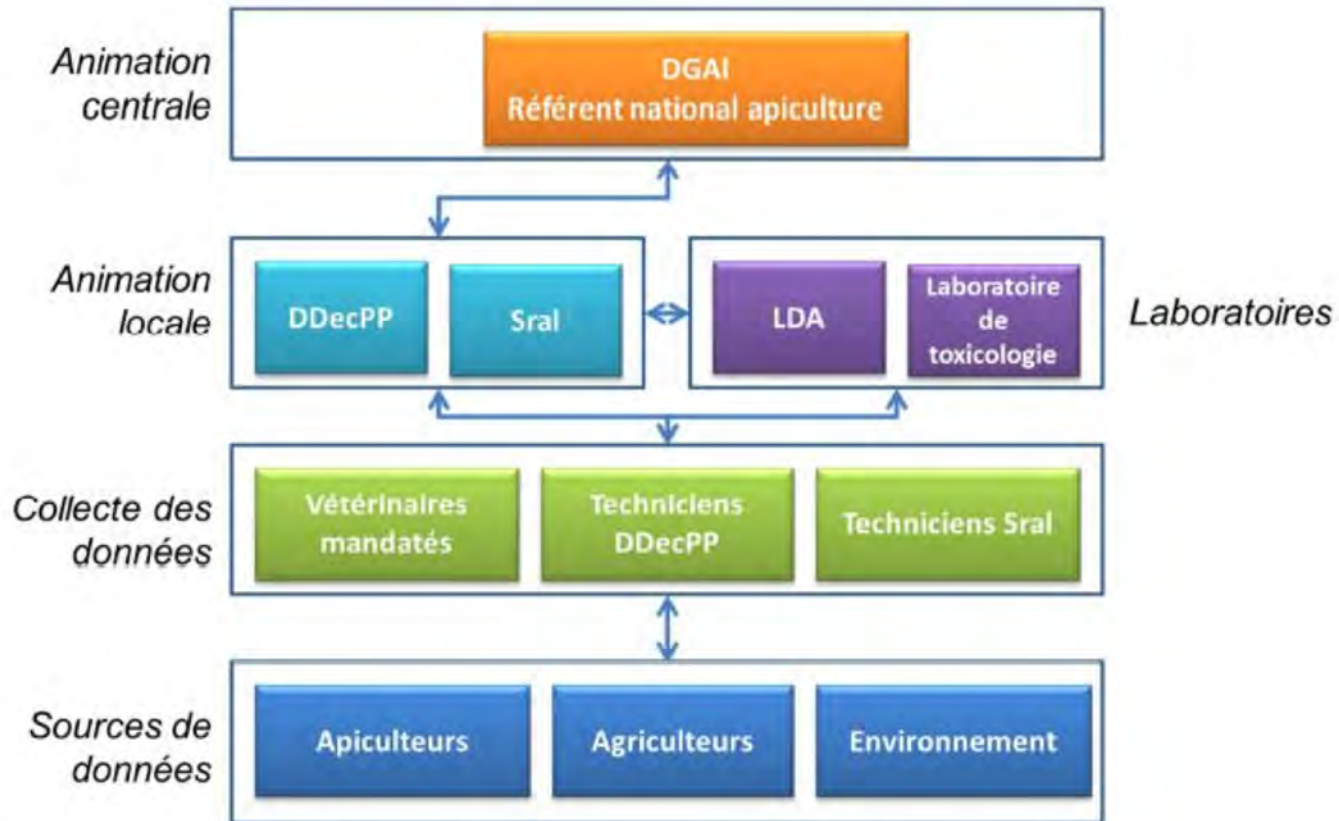


Figure 2. Organisation actuelle de la surveillance des mortalités massives aiguës des abeilles en France. Source : Anses, sept. 2017

Qui fait quoi? Petit rappels.

# Décret n° 2016-1307 du 3 octobre 2016 fixant les compétences adaptées à la réalisation d'actes de médecine vétérinaire par les TSA



# Rôle du TSA

Arrêté modifié du 5 octobre 2011 relatif aux actes de médecine ou de chirurgie des animaux que peuvent réaliser certaines personnes n'ayant pas la qualité de vétérinaire

- ▶ « Peuvent être pratiqués par les techniciens sanitaires apicoles visés à l'article L. 243-3-13° du code rural et de la pêche maritime les actes suivants :
  - ▶ **Recueil de signes cliniques et lésionnels** affectant les colonies d'abeilles, y compris le recueil des commémoratifs relatifs à leur état de santé ;
  - ▶ **Prélèvements biologiques** à visée diagnostique ou zootechnique
  - ▶ **Traitement des colonies** d'abeilles par transvasement ou au moyen de médicaments prescrits par le vétérinaire sous l'autorité et la responsabilité duquel ils interviennent.

# Condition d'intervention des TSA

- ▶ Le TSA doit se placer sous l'autorité et la responsabilité d'un vétérinaire de son choix autorisé à exercer la médecine et la chirurgie des animaux.
- ▶ Le TSA prend ses instructions auprès du vétérinaire sous l'autorité et la responsabilité duquel il intervient et lui rend compte de ses interventions.
- ▶ un TSA peut se placer sous l'autorité et la responsabilité d'un ou plusieurs vétérinaires de son choix
- ▶ un vétérinaire peut être responsable d'un ou plusieurs TSA de son choix ;

7

## Missions exercées à la demande et à la charge de l'état

Action de police sanitaire lors de DS1 vétérinaire mandaté (vétérinaire non mandaté et TSA non habilité à intervenir)

Visites en cas de MMA vétérinaire mandaté ou compétent en pathologie apicole (TSA sous responsabilité d'un vétérinaire)

Visite sanitaire obligatoire... ?

## Missions à la demande de l'apiculteur

Vétérinaire autorisé à exercer en médecine vétérinaire, TSA sous responsabilité du vétérinaire

## Mission dans le cadre du PSE

TSA conventionné avec vétérinaire

# Quelles analyses? Pour quel usage? Données épidémiologiques



# Choix méthodes et échantillonnages

## Objectifs :

- Diagnostic/Dépistage
- Analyse officielle ou non

Contexte  
épidémiologique  
et réglementaire,  
enjeux sanitaires

Aspects  
pratiques et  
économiques



## Choix de la méthode d'analyse

- Performances (sensibilité, spécificité)
- Temps
- Equipement disponible
- Coût

Choix de la stratégie  
d'échantillonnage

# Stratégie d'échantillonnage



Photo KS

## Prélèvements à cibler en fonction

Objectif de l'analyse :

- A visée diagnostique
- Détection en l'absence de signes cliniques

Répartition de l'agent au sein de la colonie

- Caractéristiques des agents
- Modalités d'exposition

# Choix échantillonnage

11

## Virologie

Animaux  
symptomatiques  
ou mort récente

Analyse avec  
quantification

Eviter screening  
larde

## Bactério

Abeilles, couvain

Si DS1 obligatoire

Si suspicion LE  
demander  
bactério  
complète

## Toxico

Cire, pain  
d'abeilles, pollen,  
abeilles, couvain

Coût  
(380€/matrice  
screening large)

Risque que ce ne  
soit pas  
interprétable

Garder  
échantillons pour  
contre expertise

## Parasite

Prélever à plusieurs  
stades de  
développement

Alerter DDSCPP  
et LNR

# Exemple Varroose

2 Objectifs

- évaluer infestation / varroa
- Établir un diagnostique des troubles de varroose

infestation

- Comptage au rucher
- Au laboratoire sur échantillon d'abeilles

varroose

- Signes observées sur abeilles et couvain
  - +/- présence de parasite
  - Méthode interne au LNR
- Importance dans le diagnostique différentiel





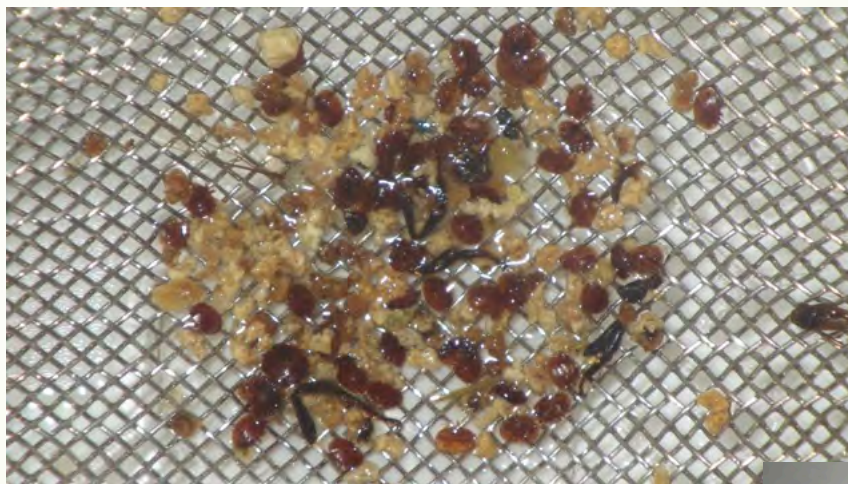
Photos LV



Examen  
d'abeilles

Désoperculation  
de couvain de  
mâle

Examen de  
spores et  
filaments  
d'*Ascospheera  
apis*



Comptage  
varroas

Examen du tube  
digestif d'une  
abeille (suspicion  
nosemose)





# Envoi au laboratoire pour confirmation de suspicion clinique

- Nécessite une suspicion clinique
- Nécessite une recherche ciblée
- Doit permettre de renforcer la suspicion clinique et ne peut servir de certitude diagnostic sans signes cliniques
- Penser au coût pour l'apiculteur

Attention portage sain de tous les agents viraux et bactériens sur des colonies asymptomatiques

# EX LOQUE AMERICAINE



2 INFECTIONS  
VISIBLES

---

POUR

10 INFECTIONS  
LATENTES

# Comment effectuer les prélèvements

# Matériel nécessaire

- Préparer une caisse de prélèvements :
- Une tenue adaptée et propre
  - Des gants jetables
- Des contenants
  - Emballages et conditionnements rigides ou en papier propre et neuf
  - Pots à prélèvement à usage unique de différents contenants
  - Sacs et boîtes en plastiques
  - Pot en verre propre et sec de 250 et 500ml (produits de la ruche)
  - Pots eppendorf
  - Alcool (non dénaturé)





- **Matériel**
  - ✓ Une balance de pesée
  - ✓ Instruments : ciseaux, aiguille, lame de bistouri, pince d'entomologiste, cuillère
  - ✓ Aspirateur à insectes
- **Identification**
  - ✓ De quoi identifié (stylo, feutre, étiquettes autocollantes)
  - ✓ Fiche commémorative
- **Désinfection**
  - ✓ Matériel de nettoyage et de désinfection
- **Acheminement**
  - Glacières, sacs isothermes





# Principes de base

- Prélèvements en quantité et en qualité
- Limiter les risques de contamination
- Séparer les prélèvements si signes cliniques distincts
- Emballages appropriés (limiter écrasement, macération...)
- Identification des échantillons
- Joindre feuille de commémoratifs



# Type de prélèvement

## matrice apicole

- abeilles
- couvain
- pollen, pain d'abeille
- miel, nectar
- propolis
- cire
- gelée royale

## Bio-agresseurs

- parasites
- prédateurs
- ravageurs

## Nourrissement

- eau
- Sirop
- végétaux (SRAL)

# Abeilles



- Prélever des animaux vivants présentant des signes cliniques
- Si morts: mortalité récente <48h et prendre les animaux présentant les lésions caractéristiques si possible
- Mettre dans une enveloppe
- Faire plusieurs échantillons
- Identifier correctement l'enveloppe devant l'apiculteur
- Mettre dans une glacière pour le transport
- Elles pourront être conservées au congélateur avant envoi
- Attention enveloppe peut être rongée par les abeilles....

# Abeilles

Vivantes, moribondes ou mortes



D'intérieur ou d'extérieur



Butineuses avec pelote de pollen



Abeilles âgées, nourrices ou émergentes



Abeilles symptomatiques ou d'apparence saine



Ouvrières, faux bourdons, reine





# Abeilles

- Nombre minimum d'individus à prélever en fonction de la pathologie recherchée

Pathologie	Nb d'individus
varroase	20
nosémose	20
viroses	10
Acarioses des trachées	20



source itsap

- Comment? (pince, directement dans pot, main...)
- Conditionnement (sac congélation, enveloppes, pot rigide)



## S'assurer de l'absence de la reine



**Prélèvements d'abeilles :** Tableau extrait pour information de la fiche OMAA, toutes les matrices analysées ne sont pas pertinentes pour la recherche de mortalités massives aiguës d'abeilles adultes mais peuvent servir à l'investigateur pour explorer d'autres causes et réaliser le diagnostic différentiel. Les recherches retenues pour le réseau de surveillance de mortalités massives et aiguës sont surlignées en jaune.

Nature de la recherche	Objectifs de l'analyse	Quantité minimale* à prélever	Caractéristiques et origine du prélèvement	Contenant	Stockage	Transport	
						Jusqu'au lieu de stockage	Vers le laboratoire
Varroose, infestation par <i>Varroa destructor</i>	Diagnostic (varroose)	> 30 abeilles	Abeilles vivantes symptomatiques ou mortes	<b>Emballages en papier</b> (ex : enveloppes épaisses en papier kraft) OU <b>emballages rigides en carton</b> (ex : boîte d'allumettes) OU <b>Pot à prélèvement en polypropylène à usage unique</b>  Attention à éviter tout risque d'écrasement.	Congélation à environ -20°C	Dans une glacière à une température < 5°C	Envoi rapide (sous 24h) avec des plaques eutectiques  Ou Dans l'idéal par transporteur spécialisé pour maintenir la congélation  Eviter l'écrasement
	Dépistage (infestation par <i>Varroa destructor</i> )	300 abeilles	Abeilles internes asymptomatiques prélevées sur 1 à 3 cadres de couvains				
Nosébose / <i>N. ceranae</i>	Diagnostic / Dépistage	> 60 abeilles	Abeilles vivantes asymptomatiques à prélever sur des cadres de rive, dans les hausses ou à l'entrée de la ruche (pour privilégier le prélèvement de butineuses)				
Nosébose / <i>N. apis</i>	Diagnostic	> 10 abeilles	Abeilles vivantes symptomatiques ou mortes				
	Dépistage	> 60 abeilles	Abeilles vivantes asymptomatiques à prélever sur des cadres de rive, dans les hausses ou à l'entrée de la ruche (pour privilégier le prélèvement de butineuses)				
Acariose des trachées ( <i>Acarapis woodi</i> )	Diagnostic	> 20 abeilles	Abeilles vivantes symptomatiques ou mortes				
	Dépistage	> 200 abeilles	Abeilles internes asymptomatiques				
Loques américaine ( <i>Paenibacillus larvae</i> ) et européenne ( <i>Melissococcus plutonius</i> )	Dépistage	> 200 abeilles	Abeilles asymptomatiques proches du nid à couvain				
Viroses	Diagnostic	> 10 abeilles	Abeilles vivantes symptomatiques ou mortes				
	Dépistage	>100 abeilles	Abeilles vivantes asymptomatiques à prélever sur des cadres de rive ou à l'entrée de la ruche (pour privilégier le prélèvement de butineuses)				
Résidus chimiques	Diagnostic	50 g (500 abeilles)	Abeilles vivantes symptomatiques ou mortes				
Palynologique	Connaissance des ressources butinées	20 abeilles	Butineuses sur la planche d'envol ayant des pelotes de pollen	<b>Pot à prélèvement en polypropylène à usage unique</b>	Température ambiante	Température ambiante	Température ambiante



# Couvain

Ouvert ou operculé



symptomatique



Fragments découpés



# Couvain

27

## Quantité

Pathologie	Quantité	Origine du couvain
varroase	Section 12x12	Couvain fermé
Loque européenne	50 à 100 ou Section 12x12	Couvain fermé et ouvert
Loque américaine	50 à 100 ou Section 12x12	Couvain fermé
Ascophérose (couvain plâtré)	50 à 100 ou Section 12x12	Couvain fermé
Viroses	50 à 100 ou section 12x12	Couvain ouvert et fermé

- Mettre dans une poche à prélèvement plastique, tube Eppendorf
- Identifier les échantillons
- Conserver au frais
- Les échantillons pourront être conservés au congélateur



Nature de la recherche	Objectifs de l'analyse	Quantité minimale à prélever *	Caractéristiques et origine du prélèvement	Contenant	Stockage	Transport	
						Jusqu'au lieu de stockage	Vers le laboratoire
Ascophérose ou couvain plâtré	Diagnostic	Section de cadre > 10 cm x 10 cm ou cadre entier	Couvain symptomatique	<p><u>Cadre ou morceau de couvain :</u> Boîte carrée en plastique (ou en carton) ou enveloppe en papier kraft ou papier aluminium <b>Attention à éviter tout risque d'écrasement et de « coulures ».</b> Bien envelopper le cadre dans le papier aluminium en évitant d'en avoir dans le couvain</p> <p><u>Éléments du couvain symptomatiques (larves ou nymphes)</u></p> <p>Petit tube à bouchon fermé (ex : tube Eppendorf de 1,5 ml). <i>Remarque : placer le tube Eppendorf dans un pot en polypropylène ou une enveloppe pour faciliter l'identification des prélèvements. Indiquer le nombre de larves/nymphes échantillonnées</i></p> <p>Pot à prélèvement 50 ml en polypropylène à usage unique hermétiquement fermé.</p>	Congélation à environ - 20°C	Dans une glacière à une température < 5°C	<p>Envoi rapide (sous 24h) avec des plaques eutectiques</p> <p>Ou</p> <p>Dans l'idéal par transporteur spécialisé pour maintenir la congélation</p> <p>Éviter l'écrasement</p>
Loques américaine et européenne	Diagnostic	Section de cadre > 10 cm x 10 cm ou cadre entier	Couvain symptomatique				
Varroose	Diagnostic	Section de cadre 10 cm x 10 cm ou cadre entier	Couvain symptomatique				
Viroses	Diagnostic	Section de cadre > 10 cm x 10 cm, cadre entier ou larves/nymphes symptomatiques (> 10)	Couvain symptomatique				
Résidus chimiques	Diagnostic	10 g de larves (correspond à environ 80 larves au stade L5) ou 20 g de nymphes (200 nymphes)	Larves ou nymphes				



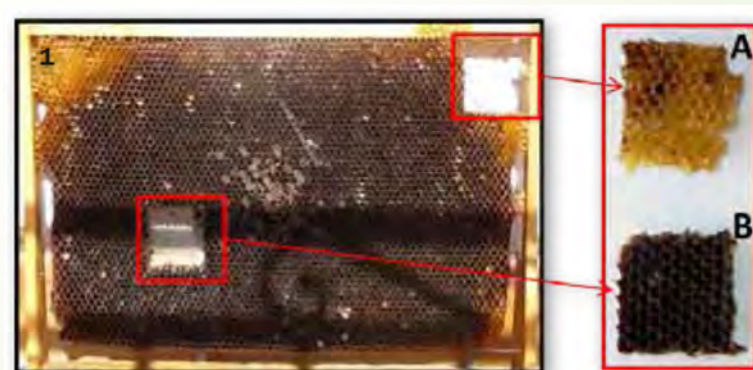
# Miel

- Minimum 20g, garder prélèvements (contre expertise)
- Lors de suspicion d'intoxication
- L'état des lieux d'une colonie : choisir cadre de réserves
- Pour diagnostiquer une colonie :
  - De nourrices ou de butineuses symptomatiques (rayons contenant du miel frais)
  - De couvain symptomatique :  
miel frais sur cadre  
de couvain



# Cire

- ▶ Modalité :
  - ▶ Adultération : cire gaufrée (n°lot)
  - ▶ Diagnostic d'intoxication : cire sur cadre de couvain malade
  - ▶ États des lieux toxicologiques : prélever en bordure et en périphérie
- ▶ Extraire le couvain des cellules
- ▶ Ne pas prélever avec miel ou pollen
- ▶ Congélation  $-18^{\circ}$



Sections découpées en bordure (A) et en périphérie (B) de cadre.

Source itsap

# Pollen

- Minimum 10g
- Utilisation de trappes à pollen ou directement sous le plancher grillagé
- Prélèvements des pelotes tous les 3j (sinon altération)
- Analyse de mélange ou indépendante de chaque échantillon
- Congélation  $-18^{\circ}$



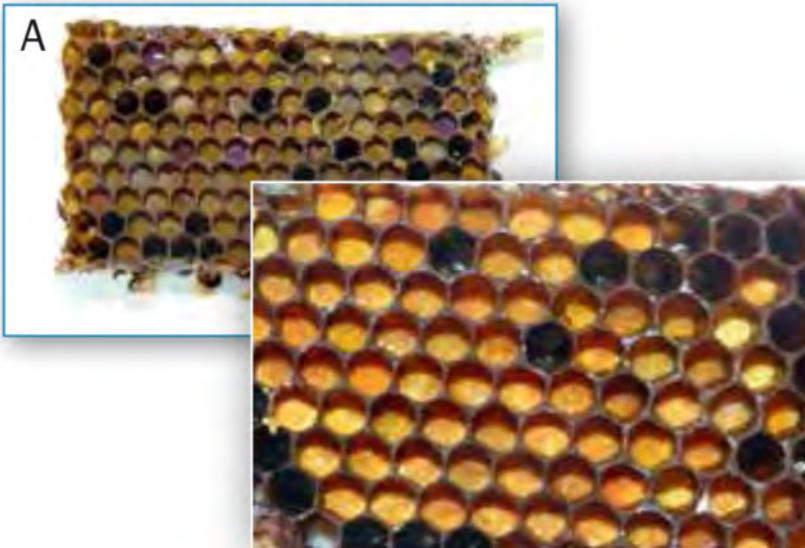
Source itsap



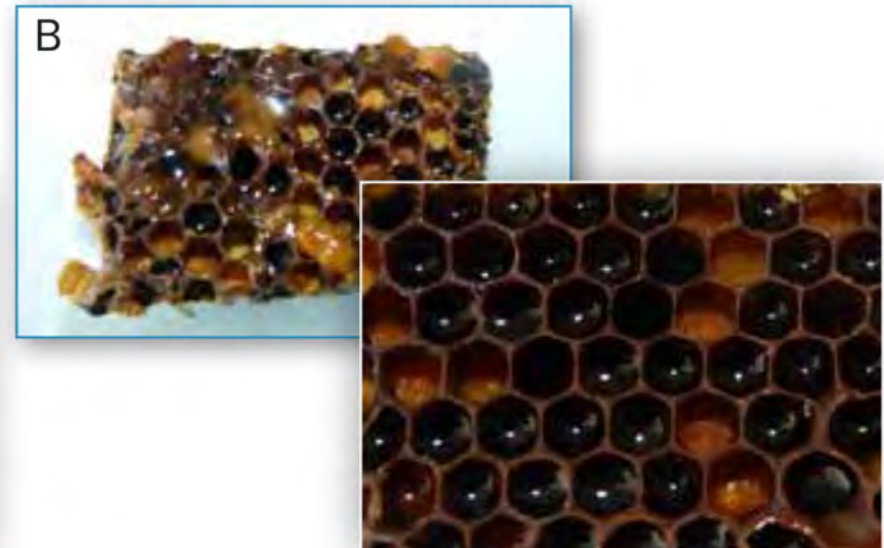
# Pain d'abeille

- Lors de suspicion d'intox ou état des lieux toxicologiques
- Pain d'abeille
  - Découper sur le cadre un morceau dépourvu de miel
  - A conserver au frais (4 à 6°) ou congelé si envoi > 48h

**Prélèvements de haute qualité (A)**



**Prélèvements de basse qualité (B)**





## Prélèvements des produits de la ruche : Tableau extrait pour information de la fiche OMAA

Matrice	Nature de la recherche	Objectifs de l'analyse	Quantité minimale à prélever *	Caractéristique et origine du prélèvement	Contenant	Stockage	Transport	
							Jusqu'au lieu de stockage	Vers le laboratoire
Miel	Résidus chimiques	Diagnostic	50 g en cas d'intoxication	Prélever dans les rayons contenant du miel frais et filtrer. <u>En cas de suspicion d'intoxication</u> , prélever le miel sur les cadres du corps de ruche et dans les hausses. Ne pas mélanger le miel issu du corps de ruche et des hausses. Identifier chaque prélèvement.	<b>Pot à prélèvement en polypropylène à usage unique hermétiquement fermé</b>	Réfrigération (environ + 4 °C)	Dans une glacière à une température < 5°C  Possibilité de transport à température ambiante si la température est inférieur à 30°C. Si envoi de cadres de miel en rayon, veiller à envoyer les échantillons dans les plus brefs délais.	Envoi rapide (sous 24h) avec des plaques eutectiques. Possibilité de transport à température ambiante si la température est inférieur à 30°C.
Cire	Résidus chimiques	Diagnostic	Minimum 20 g = 4 sections de cadre d'environ 5 cm x 10 cm (ou 7 cm x 7 cm) chacune	Cire issue des cadres de couvain symptomatique (sans miel et pain d'abeilles)	<b>Boîte carrée en plastique (ou en carton) ou enveloppe épaisse en papier kraft</b>  <b>Attention à éviter tout risque d'écrasement</b>	Réfrigération (environ + 4 °C) <b>Ou</b> Congélation à environ - 20°C		
Pollen frais	Palynologique	Connaissance des ressources butinées	50 g	Pollen frais récupéré dans les trappes à pollen	<b>Pot à prélèvement en polypropylène à usage unique hermétiquement fermé ou tube à centrifuger de 50 ml hermétiquement fermé ou enveloppe Kraft</b>	Température ambiante	Température ambiante	Température ambiante
	Résidus chimiques	Diagnostic	50 g	Pollen frais récupéré dans les trappes à pollen	<b>Pot à prélèvement en polypropylène à usage unique hermétiquement fermé ou tube à centrifuger de 50 ml hermétiquement fermé ou enveloppe Kraft</b>	Congélation à environ - 20°C	Dans une glacière à une température < 5°C	Envoi rapide (sous 24h) avec des plaques eutectiques <b>Ou</b> Dans l'idéal par transporteur spécialisé pour maintenir la congélation. Eviter l'écrasement
Pain d'abeilles	Résidus chimiques	Diagnostic	50 g (soit 20 cm <sup>2</sup> de cadre bâti rempli)	Cadre avec cellules pleines de pain d'abeilles. <u>Présence de nourrices ou butineuses symptomatiques</u> → Sélectionner les rayons de pain d'abeilles les plus frais  <u>Présence de couvain symptomatique</u> → Sélectionner les rayons de pain d'abeilles sur les cadres de couvain symptomatique	<b>Boîte carrée en plastique (ou en carton) ou enveloppe épaisse en papier kraft</b>  <b>Attention à éviter tout risque d'écrasement</b>			

# Parasites suspects

- Prélèvement à cibler : plusieurs individus de chaque espèce à plusieurs stades de développement
- Pince, Aspirateur à insectes, à la main
- Conservation dans éthanol à 70% non dénaturé, ou mort conserver à sec
- Contenant hermétique pour éviter toute dissémination
- Si suspicion parasites exotiques :
  - Alerter DDSPP
  - Et le LNR (Sophia Antipolis)



Source internet



# Prélèvements divers

Eau ou source d'abreuvement



Sirop



Flacon ou pot eppendorf



Végétaux (enquête SRAL)





Acheminer, conserver, envoyer



# Stockage

- Abeilles/couvain/larves : congélation -20°C
- Miel/cire/propolis : réfrigération +4°C
- Pain d'abeille : congélation -20°C
- Parasites :
  - Ethanol non dénaturé à 70° pour identification morphologique
  - Congélation -20°C
  - Dans tous les cas envoyer mort

# Conditionnement

- Emballage rigides, propre, hermétique
- Eviter l'écrasement
- Bien identifier
- Joindre fiches commémoratifs
- Joindre rapport de visites



# Acheminement

- Dans les plus brefs délais. Eviter les we, jours fériés, grève
- Chronopost/Transporteur
- Bloc de froid
- Température ambiante si délai court



Prendre contact avec  
laboratoire avant envoi des  
échantillons

# Acheminement

Abeilles vivantes ou  
mortes/couvain/larves  
/pain d'abeilles/pollen

Glacière T° < 5°C

• Miel / cire :

à température  
réfrigérée (< 5°C).

En cas de manque  
de place transport  
à température  
ambiante si la  
T°ext < 30°.

parasites

mort!!!

alcool dénaturé  
Congélation -20°C



Ne pas oublier de joindre fiche de demande d'analyse et de commémoratifs

**anses** Anses Laboratoire de Sophia Antipolis - Unité Pathologie de l'Abessie  
Echantillons pour analyses, Les Templiers, 105 route des Chappes, 08902 Sophia Antipolis  
Tél : 04 92 94 37 00 - Fax : 04 92 94 37 01

### FICHE ET PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

**Partie réservée à l'Anses**

Date de réception : ..... Date d'enregistrement : .....  
 Personnel en charge du dossier : ..... N° de DA : .....  
 Fiche complétée : oui non  
 Demande d'informations complémentaires le : ..... par / téléphone email autre

**RENSEIGNEMENTS - Fiche remplie par : ..... Date : .....**

<b>Demandeur :</b> NOM Prénom : ..... Adresse : ..... CP : ..... Ville : ..... Tél : ..... Fax : ..... Email : .....	<b>Payeur :</b> NOM Prénom : ..... Adresse : ..... CP : ..... Ville : ..... Tél : ..... Fax : ..... Email : .....
<b>Propriétaire (des prélèvements, du rucher) :</b> NOM : ..... Tél : ..... Adresse : ..... CP : ..... Ville : ..... N° d'apiculteur : ..... <b>Prélèvements réalisés :</b> NOM du préleveur : ..... Date du prélèvement : ..... Lieu du prélèvement : ..... Date de l'envoi : .....	<b>Description des problèmes du rucher</b> <b>Signes cliniques devant les colonies</b> <input type="checkbox"/> Mortalité importante <input type="checkbox"/> Abeilles tremblantes <input type="checkbox"/> Abeilles traînantes <input type="checkbox"/> Abeilles noires et/ou défilées <input type="checkbox"/> Abeilles rejetées par les gardiennes (agressivité) <input type="checkbox"/> Abeilles aux ailes déformées/atrophiques <input type="checkbox"/> Abeilles accrochées aux brins d'herbe <input type="checkbox"/> Traces de diarrhées devant/sur la ruche <input type="checkbox"/> Abeilles disposées en soleil <input type="checkbox"/> Activité au trou de vol réduite <b>Signes cliniques à l'intérieur des colonies</b> <input type="checkbox"/> Dépopulation constatée <input type="checkbox"/> Manque d'abeilles sur le couvain <input type="checkbox"/> Présence de varroas <input type="checkbox"/> Abeilles aux ailes déformées <input type="checkbox"/> Abeilles avec la tête dans l'alvéole <input type="checkbox"/> Couvain en mosaïque <input type="checkbox"/> Atteinte du couvain ouvert <input type="checkbox"/> Atteinte du couvain operculé <input type="checkbox"/> Opercules de couleurs différentes <input type="checkbox"/> Larves : <input type="checkbox"/> Gluantes <input type="checkbox"/> Filantes <input type="checkbox"/> Larves jaunes, marrons à noires <input type="checkbox"/> Couvain plâtré/mycose <input type="checkbox"/> Couvain tubulaire <input type="checkbox"/> Présence de galeries dans les cadres <input type="checkbox"/> Destruction du couvain <input type="checkbox"/> Modification de la couleur du miel / fermentation <input type="checkbox"/> Présence d'insectes (ex : coléoptères), d'acariens (différents de Varroa), de larves suspectes dans la ruche
<b>Problème observé :</b> Date de 1 <sup>ère</sup> observation du problème : ..... Nombre de ruches dans le rucher : ..... Nombre de ruches atteintes : ..... Nombre de ruches mortes : ..... <b>Plan de surveillance miel :</b> <input type="checkbox"/> <b>Situation du rucher :</b> <input type="checkbox"/> Cultures, vergers, Type : ..... <input type="checkbox"/> Flore naturelle sauvage : ..... <input type="checkbox"/> Industries, autoroutes, autres : .....	
<b>Calendrier des traitements (varroose, loques...)</b> Dates de traitement : ..... Produits employés : ..... Mode d'application : ..... Durée du traitement : .....	

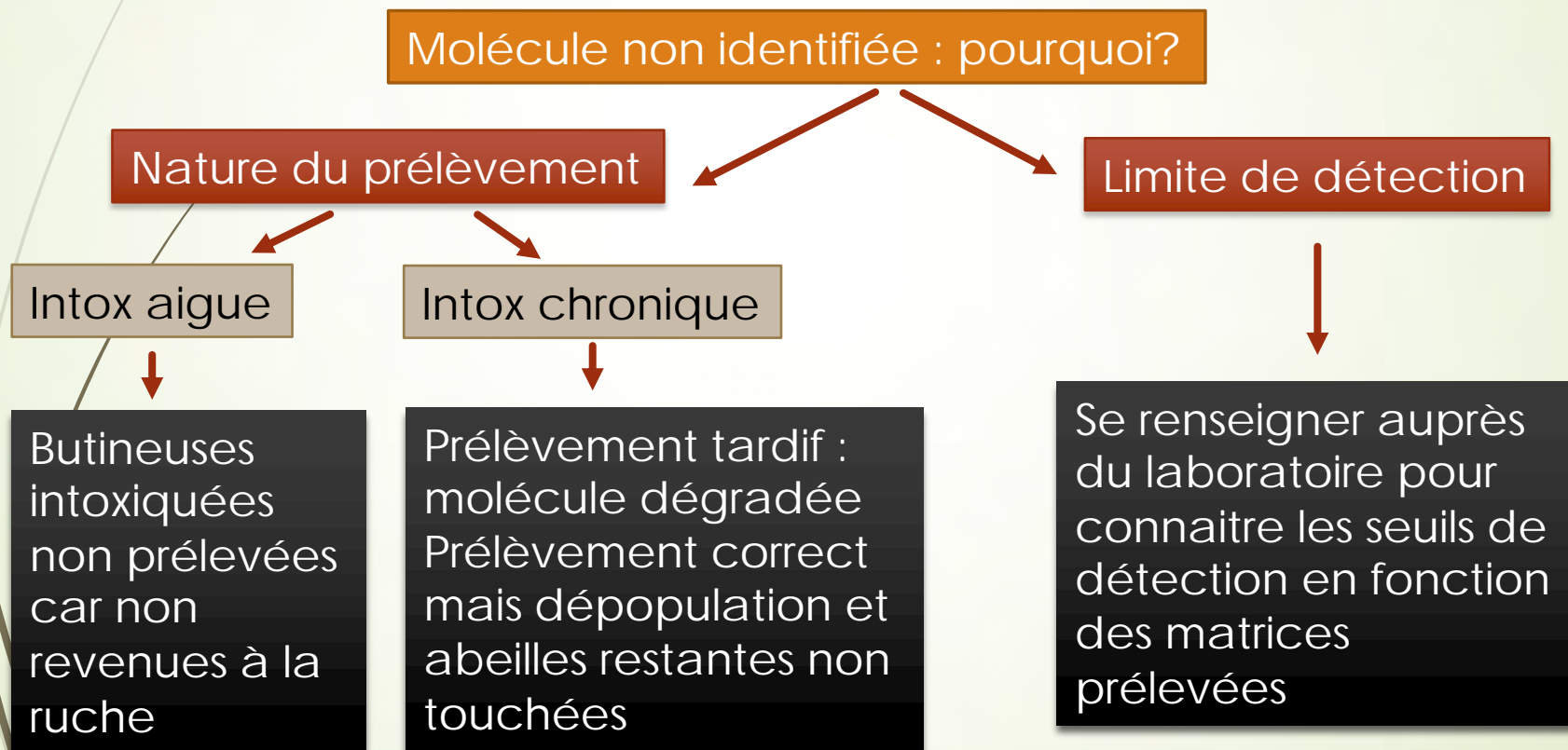
Fiche de prélèvement et de demande d'analyse - ANA-E1.DGG.01 - Rev 09

# Laboratoires

- Liste laboratoire sur le site <http://itsap.asso.fr/outils/laboratoires/annuaire-labos/>
- <http://agriculture.gouv.fr/laboratoires-agrees-et-methodes-officielles-en-sante-animale>
- Recense les laboratoires compétents
- Les prestations analytiques proposées

# Interprétation des résultats

- Attention à l'interprétation
- Ramener à la clinique
- Exemple intoxication





# Conclusion

- Attention à l'interprétation des résultats de laboratoire
- La plus grande difficulté est d'interpréter des résultats lorsqu'il n'y a ni clinique ni épidémiologie en faveur d'une hypothèse diagnostic: ex: mortalités et dépopulations hivernales



Photos LV