

GDSA 38

FORMATION
DES AGENTS SANITAIRES
du 28 novembre 2009

INTERVENTION DE Mme Sylvie MARTIN
Directrice du Laboratoire départemental
vétérinaire de l'Isère

Analyses de laboratoire
du prélèvement au résultat...

- ▣ *Le prélèvement*
- ▣ *Les commémoratifs*
- ▣ *Le conditionnement*
- ▣ *L'expédition*
- ▣ *Les analyses*
- ▣ *Les résultats*

☰ *Le prélèvement*

➤ *Suspicion d'intoxication*

✓ Par qui ?

↳ si examen pratiqué en vue d'une action en justice : prélèvements par des personnes assermentées (SRPV-DDSV)

↳ mode opératoire normalisé (MON/SP/010/01 et MON/SP/020/01)

✓ Quel(s) prélèvement(s) ?

↳ suspicion intoxication aiguë sur cultures : cinq sortes de prélèvements nécessaires

VOIR note de service DGAL/SDSPA/N2009-8118 du 14/04/09

☰ *Le prélèvement*

- 1. **abeilles adultes** : 500 à 1000 abeilles (50 à 100 g environ)
 - Il faut 2 prélèvements :
un d'abeilles fraîchement mortes ou mortes sans que l'on ait un délai (dans la mesure où elles sont encore dans un état correct) et n'ayant pas été « lavées » par la pluie
 - un d'abeilles vivantes symptomatiques (traînantes, tremblantes ou autres anomalies) en particulier pour les recherches de *Nosema ceranae*
 - Pour un rucher de 0-10 ruches : prélever des abeilles de chaque ruche
 - Pour plus de ruches : prélever 20 % des ruches

- 2. **couvain** : un fragment de rayon - le but étant de rechercher s'il y a association ou non de l'intoxication avec une maladie du couvain (carré 15x15 cm à cheval entre la zone suspecte et la zone saine ou plus simplement un rayon complet)

☰ *Le prélèvement*

- 3. **pollen et miel** : un rayon entier, ou à défaut, un très large fragment de rayon avec pollen et nectar frais
- 4. **pollens sur abeille** : recherche de l'aire de butinage - 20aine d'abeilles butineuses avec pelotes de pollen
- 5. **plantes** : une vingtaine de fleurs sur tige avec feuilles et rameaux des végétaux traités ou pollués.

↪ éviter tout contact avec des liquides comme l'alcool, l'éther, la benzine...

Ramassage à la pince (ou avec un aspirateur à insectes) - matériel propre à chaque ruche

Eviter la rupture de la chaîne du froid - glacière sur terrain - congélation rapide

Couvain : important en cas de dépeuplement . Cadre à envelopper dans du papier et surtout pas du plastique

Produits de la ruche : 150 g de miel, 25 g de cire et propolis, 50 g de pollen - dans des pots en verre propres, fermés hermétiquement et enveloppés dans des sacs plastique ou emballages en carton, papier - conservation au réfrigérateur (miel et cire)

Le prélèvement

↳ A prendre en compte pour une approche objective des problèmes de mortalités d'abeilles : lorsqu'il est constaté une mortalité plus ou moins importante, celle-ci peut être due à une intoxication ou au développement du virus de la paralysie chronique (l'une pouvant être facteur favorisant de l'autre dans les 2 sens où se suffisant à elle seule. Il est donc obligatoire dans tous les cas de mortalité de faire une recherche toxicologique et une recherche virale même si les acteurs de terrain concluent à un problème toxique.

☰ *Le prélèvement*

✓ *Suspicion de maladies infectieuses ou parasitaires*

✓ **Par qui ?**

↪ si suspicion de maladies réputées contagieuses (MRC) : prélèvements effectués par les techniciens de la DDSV, par les vétérinaires sanitaires ou par les agents sanitaires apicoles (assistants ou spécialistes)

✓ **définition d'une MRC :**

↪ impact sur la santé publique, socio-économique, sanitaire

↪ intervention immédiate de l'État lors d'une suspicion → empêcher la diffusion - éradiquer

↪ application de mesures sanitaires

↪ déclaration obligatoire

↪ liste fixée par décret (article L.223-2 du CR) - en fonction de la réglementation européenne et de la liste des maladies animales de l'OIE

Aides spécialistes :

Décret n° 2007-96 du 25/01/07 portant majoration à compter du 01/02/07 Taux de l'acte est de 0,50 euros / km avec un minimum de versement de 8 euros versés par le GDS 38. Pour les visites dans le cadre de police sanitaire, c'est le décret qui s'applique.

☰ *Le prélèvement*

Décret n° 2006-178 du 17 février 2006 portant création d'une liste de maladies réputées contagieuses et modifiant le code rural
- Décret n° 2009-69 du 19 janvier 2009 modifiant l'article D. 223-21 du code rural (JO 21/01/09)

Pour la MRC, il s'agit de *Nosema apis* seulement c'est à dire que si le labo de première intention trouve du nosema il doit demander une discrimination entre les 2 par PCR.

DENOMINATION	AGENT	ESPECE
Loque américaine	<i>Paenibacillus larvae</i>	Abeille
Nosérose des abeilles	<i>Nosema apis</i>	Abeille
Infestation due à <i>Aethina tumida</i>	<i>Aethina tumida</i>	Abeille
Infestations à <i>Tropilaelaps</i>	<i>Tropilaelaps clareae</i>	Abeille

☰ *Le prélèvement*

Décret n° 2006-179 du 17 février 2006 portant création d'une liste de maladies à déclaration obligatoire modifiant le code rural
- Décret n° 2009-69 du 19 janvier 2009 modifiant l'article D. 223-21 du code rural (JO 21/01/09)

DENOMINATION	AGENT	ESPECE
Varroose	Varroa destructor	Abeille

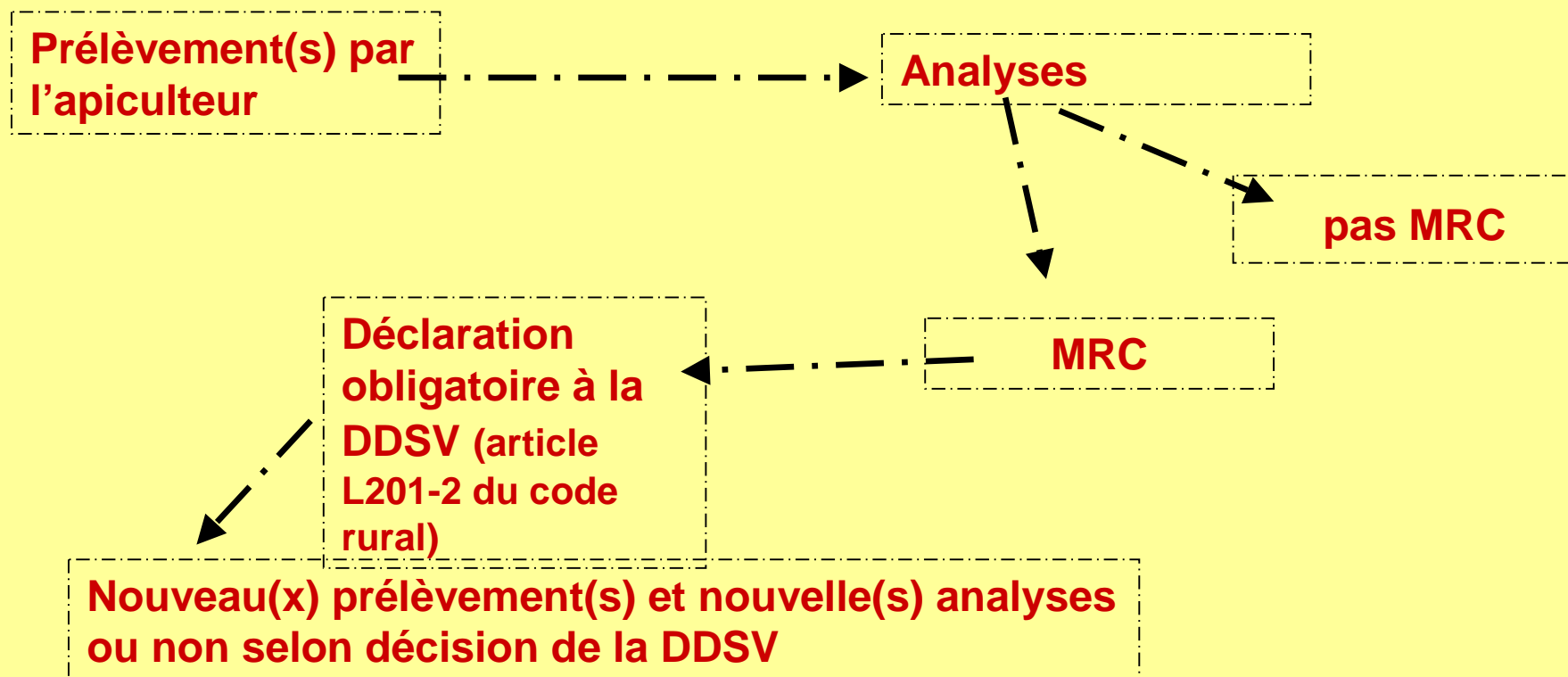
2 nouvelles MRC

3 sorties : loque européenne - varroose (ex MPC) et acariose (ex MDO)

Décret n° 2006-178 du 17/02/06 (JORF du 18/02/06) modifié par D. du 27/10/06 (JORF du 29/10/06) portant création d'une liste de MRC et modifiant le Code Rural

Le prélèvement

↪ si pas de suspicion particulière de MRC - prélèvements par l'apiculteur



Article L201-2 du Code rural - modifié par Ordonnance n°2005-1127 du 8 septembre 2005 - art. 2 JORF 9 septembre 2005 - Tout laboratoire est tenu de communiquer à l'autorité administrative tout résultat d'analyse conduisant à suspecter ou constater l'infection d'un ou de plusieurs animaux par l'une des maladies contagieuses au sens de l'article L. 223-2, ou la présence d'un organisme nuisible au sens de l'article L. 251-3.

☰ *Le prélèvement*

✓ Quel(s) prélèvement(s) ?

chaque analyse et chaque laboratoire a ses exigences particulières

↪ **Maladie du couvain** : fragment de rayon de 15-20 cm de côté (minimum 10 cm) dans la partie où se trouve le plus grand nombre de larves suspectes ou le rayon en entier

↪ **Suspicion de couvain sacciforme** : analyse virologique seule - prélèvement suffisant d'une 15aine de larves ou nymphes anormales (minimum 6)

- *ramassage à la pince (ou avec un aspirateur à insectes) - matériel propre à chaque ruche*
- *éviter la rupture de la chaîne du froid - glacière sur terrain - congélation rapide*

☰ *Le prélèvement*

↪ **Maladie des abeilles adultes** : prélever prioritairement des abeilles vivantes, présentant des signes ou comportements anormaux - à défaut des abeilles mortes

✓ pour éviter les contaminations de ruche à ruche et entre prélèvements : utiliser un **matériel propre à chaque ruche** - possibilité de ramassage à la pince (ou avec un aspirateur à insectes)

✓ **nosébose** : 150-200 abeilles (env. 15-20 g) - les abeilles jeunes sont réfractaires, prélever en priorité des abeilles âgées - préférer les butineuses aux abeilles d'intérieur

✓ **acariose** : abeilles jeunes

Pb : en cas de dépopulation due à une mortalité d'abeilles adultes → les abeilles analysées ne sont pas forcément les plus atteintes

☰ *Le prélèvement*

✓ *viroses (maladie noire, ABPV, IAPV...)* : 15aine abeilles (6 minimum) prélevées **sur le pas de vol** avec symptômes si possible - en plus, peuvent être prélevées des abeilles fraîchement mortes ou des abeilles internes avec symptômes

✓ bien séparer et **identifier les différents prélèvements** - noter le type prélevé : mortes, vivantes, à l'intérieur ou à l'extérieur de la colonie

✓ **éviter la rupture de la chaîne du froid** - glacière sur terrain

↪ **Produits de la ruche** : miel - gelée royale - pour recherche de spores de loque, de nosérose... - études épidémiologiques - garantie sanitaire

*Pas de connaissance à l'heure actuelle en France de laboratoires faisant la recherche de spores de loques ou de *Nosema spp* dans le miel ou la cire*

Le prélèvement

✓ **Etiquetage des échantillons :**

Chaque échantillon sera identifié sur le sachet par une étiquette comprenant =

- ↪ la date du prélèvement,
- ↪ le nom et l'adresse de l'expéditeur,
- ↪ la référence du rucher concerné,
- ↪ le lieu du prélèvement,
- ↪ la nature du prélèvement (par exemple : « abeilles »),
- ↪ le laboratoire destinataire (« Afssa » ou « Girpa » ou « LVD »)
- ↪ le type d'analyse demandée

➤ Pour plus de sécurité, un double de l'étiquette sera placé à l'intérieur de la boîte.

Les analyses ne pourront être faites que si la fiche de renseignement est fournie et remplie correctement.

☰ *Les commémoratifs*

✓ Une fiche commémoratif est disponible sur le site de l'AFSSA. Dans le cadre de la démarche qualité ce document doit obligatoirement être joint aux prélèvements envoyés à l'AFSSA. (exemplaire en document joint)

✓ **Fiche de renseignement** : essentielle pour l'interprétation des résultats - par rapport à l'échantillon analysé ou pour des études rétrospectives

✓ **Informations utiles** :

↳ **coordonnées** du propriétaire, de l'expéditeur ou du préleveur, des différents destinataires du rapport d'analyses, de la facture

↳ **lieu(x) et date de prélèvement** (nom du rucher - commune - n° de rucher) - types d'abeilles prélevées : mortes, vivantes, à l'intérieur ou à l'extérieur de la colonie pour chaque prélèvement bien identifié

↳ nombre de colonies atteintes, **symptômes** (abeilles traînantes devant la ruche, abeilles tremblantes sur le pas de vol, abeilles déformées, abdomens distendus, taches de diarrhée...) et mortalités - début et évolution de la maladie - présence de varroa visible sur les cadres...

Les commémoratifs

- ↪ **interventions** faites sur le rucher au cours de l'année :
 - traitements anti-varroa : date, matière active et type de traitement
 - nourrissements
 - autres traitements ou interventions

- ↪ **historique du rucher** : trappes à pollen - transhumance - récoltes : type de récolte et quantité (bonne, moyenne, mauvaise...) - cultures environnantes

☰ *L'expédition*

✓ Conditions d'envoi

↪ *envoi immédiat* (colis express) : à température ambiante dans les heures qui suivent le prélèvement pour les recherches d'acariose

↪ *envoi différé* : mettre les prélèvements au réfrigérateur (abeilles vivantes) ou dans un endroit frais et sec (abeilles mortes) et les envoyer le lendemain ou le surlendemain

↪ *envoi reporté de plusieurs jours* : congeler l'échantillon (-20°C) et veiller à ce que la chaîne du froid ne soit pas interrompue jusqu'à l'arrivée au laboratoire

➤ éviter les envois en fin de semaine

➤ colis rigide (conformes aux conditions exigées par les transporteurs) afin d'éviter les écrasements

☰ *Le conditionnement*

- ✓ **couvain** : emballage : papier solide étanche pour chaque fragment de rayon et boîte résistante
- ✓ **abeilles vivantes** : boîtes identifiées, rigides et bien fermées (pour éviter tout risque de sortie d'abeilles), tout en laissant une aération (perforations) - mention « abeilles vivantes »
- ✓ **abeilles mortes** : boîtes en carton (par ex. : boîte d'allumettes) ou enveloppes en papier (mais risque d'écrasement) bien identifiées - éviter les sachets et flacons en plastique ou les flacons en verre car les insectes se décomposent - utiliser des emballages neufs

N.B. : lors d'envoi de plusieurs prélèvements, prendre soin de les séparer convenablement afin d'éviter tout risque de détérioration, par écrasement - dans le cas d'une suspicion d'intoxication, si les prélèvements ne peuvent être expédiés immédiatement, les conserver au réfrigérateur (certains toxiques se dégradent à la température ambiante)

emballage : boîte en bois ou en carton - éviter les récipients hermétiques en verre, plastique ou fer (putréfaction) - emballages neufs et propres

☰ *L'expédition*

✓ Laboratoires destinataires

➤ *Analyses toxicologiques :*

- ↪ pollens sur abeilles (analyses palynologiques) : AFSSA Sophia Antipolis
- ↪ abeilles et végétaux : GIRPA Beaucouzé - (autres labos agréés pour recherche multirésidus ...)
- ↪ **recherche des néonicotinoïdes (Thiaméthoxam, Clothianidine, Imidaclopride, Acétamipride dans abeilles, pollen et pain d'abeille à AFSSA Sophia Antipolis (labo de référence agréé COFRAC en janvier 2010))**

➤ *Analyses pathologiques :*

- ↪ LVD -LDA - LNR (AFSSA Sophia Antipolis)
- ↪ analyses officielles → laboratoire agréé ou LNR (Article R 202-1 et R 202-8 du code rural)

☰ *L'expédition*

➤ un laboratoire agréé est tenu de :

(Articles L. 202-1 et R. 202-1 et suivants du code rural et Arrêté du 19/12/07 fixant les conditions générales d'agrément des labo d'analyses dans le domaine de la santé publique et de la protection des végétaux) :

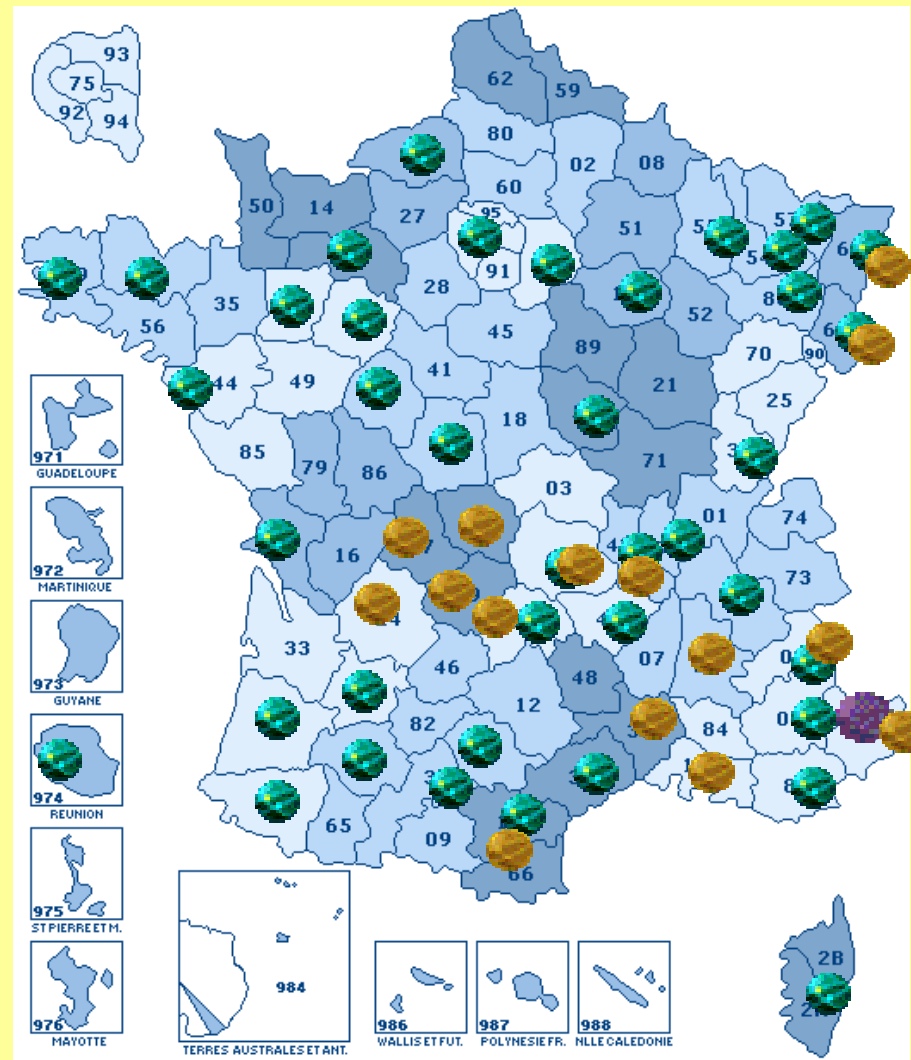
- ✓ participer aux **essais inter-laboratoires** organisés par le LNR
- ✓ réaliser les analyses sous **accréditation** et maintenir son accréditation
- ✓ justifier des garanties de **confidentialité, impartialité et indépendance**

Au sens de l'article R. 202-1 du code rural, une analyse officielle est définie comme toute analyse effectuée par un laboratoire, d'un échantillon prélevé dans le cadre d'un contrôle officiel. Le terme contrôle officiel concerne tout audit, inspection, vérification, prélèvement, examen, ou toute autre forme de contrôle par les services de l'Etat compétents ou leur délégués, en vue d'assurer le respect des dispositions des titres II, III et V du livre II du code rural et des textes pris pour leur application.

Article R. 202-8 du code rural prévoit que seuls des laboratoires à cette fin par le Ministre chargé de l'Agriculture peuvent réaliser les analyses officielles.

☰ *L'expédition*

- LNR - AFSSA
Sophia Antipolis
- LVD-LDA agréés
(dernière liste du
27/07/1982)
- Labos pour
recherche *Aethina*
(liste du
04/04/2005)



*Article L202-2 - Créé par Loi n°2005-157 du 23 février 2005 - art. 115 JORF 24 février 2005
Le ministre chargé de l'agriculture peut désigner des laboratoires nationaux de référence chargés
notamment de l'encadrement technique des laboratoires agréés.*

☰ *Les analyses*

➤ Les analyses réalisées par le LVD 38 :

Types d'analyse	Tarifs
Acariose	10.80 € HT
Loque européenne	
Loque américaine	
Mycose	
Nosérose	
Varoosé	

➤ Nombre de prélèvements reçus :

Années	Nbre prélèvements
2006	24
2007	17
2008	28
2009	16

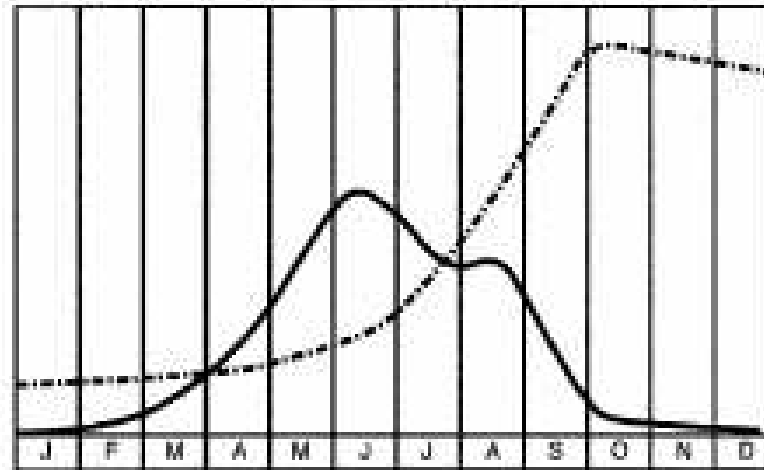
☰ *Les analyses - Tarifs de l'AFSSA*

➤ Les prestations de l'AFSSA de SOPHIA ANTIPOLIS :

Prestations	Tarifs HT
Loque des abeilles	16.59 €
Recherche d'éléments fongiques	11.35 €
Diagnostique d'acariose	11.35 €
Diagnostique de nosérose	11.35 €
Diagnostique de varroatose	7.86 €
Recherche d'un virus de l'abeille par PCR	62.45 €
Recherche et quantification d'un virus de l'abeille par PCR en temps réel	70.11 €
Recherche de plusieurs (2 à 5) virus de l'abeille par PCR	110.13 €
Identification de Nosema apis et Nosema ceranae par PCR	52.31 €
Miel : examen pollinique quantitatif (Pr 118 SR90 - AFNOR)	62.00 €
Pollen : examen pollinique qualitatif	30.56 €
Pollen : examen pollinique quantitatif	55.89 €
Gelée royale : examen pollinique qualitatif	46.28 €

☰ *Les résultats*

- la seule présence ne signifie pas forcément que l'agent est à l'origine de la maladie - notion d'**appréciation quantitative** (quantité d'agents pathogènes - nb d'abeilles affectées...)
- l'interprétation peut être fonction de la **saisonnalité**



Graphique des populations d'abeilles et d'acariens sur une année dans l'hémisphère nord en climat tempéré : quantité de couvain (en trait plein) ; nombres d'acariens (ligne en pointillé).

Source : méthode OIE

Les résultats

Déclaration des maladies, autres que salmonelloses aviaires, visées à l'article D. 223-1 du code rural

Date de déclaration

Declarant

Nom Téléphone
 Qualité Télécopie
 Adresse
 Code postal Ville

Maladie (*)

Anaplasmose bovine
 Artérite virale des équidés
 Botulisme (Bovins, oiseaux sauvages)
 Chlamydiophilose aviaire
 Encéphalite japonaise (oiseaux, suidés)
 Encéphalite West-Nile (oiseaux)
 Encéphalopathie spongiforme subaiguë transmissible (autres espèces que bovins, ovins et caprins)

Epididymite contagieuse ovine
 Lymphangite épizootique
 Métrite contagieuse équine
 Salmonellose porcine
 Tularémie
 Variole du singe
 Varroose

Cas (*)

Espèce Âge (ans) non déterminé
 Sexe : M F M castré non déterminé

Diagnostic (*)

Forme clinique : Oui Non Symptômes :
 Mort : Oui Non
 Confirmation du diagnostic par examen de laboratoire : Oui Non
Si oui, coordonnées du laboratoire :
 Nom Téléphone
 Adresse Télécopie
 Code postal Ville
 Date du diagnostic

Méthode

Examen direct par coloration
 Culture
 Autre :

Technique d'amplification moléculaire
 Analyse sérologique

Signature déclarant Validation DDSV

(*) : cocher la case correspondante

✓ obligation de déclaration s'impose aux éleveurs, vétérinaires, responsables de laboratoire d'analyses vétérinaires

✓ modèle de déclaration - Annexe II de l'arrêté du 29/06/06

☰ *Les résultats*

Tableau I : Nombre de cas de MDO enregistrés en 2006 et 2007

MDO	Espèces sur lesquelles a été confirmée la MDO	2006	1 ^{er} janvier au 14 mars 2007	Départements ayant déclaré la MDO
Artérite virale équine	Equins		1	61
Botulisme	Anatidés	8	1	13, 17, 38, 57, 69, 80, 92
Botulisme	Bovins	1		32
Chlamyphilose aviaire	Fringillidés, Psittacidés	3	1	37, 73
Métrite contagieuse équine	Equins		1	90
Tularémie	Lièvres	2	7	32, 38, 52, 56, 60, 76, 80
Varroose	Abeilles	66	4	45, 61, 73, 83

✓ déclarants principaux : apiculteurs, ASA, DDSV et laboratoires

NS DGAL/SDSPA/N2007-8099 du 19/04/07 - Synthèse des déclarations des MDO

☰ *Les résultats 2008- LDA39*

Période hivernale
de déc. 2007 à mars 2008

- 45 prélèvements en provenance de 35 ruchers - abeilles mortes trouvées sur le plancher de la ruche

Printemps - été
d'avril à août 2008

- 25 prélèvements en provenance de 25 ruchers

- Varroas :

Nb varroas / 100 abeilles		
	déc - mars	avril - août
né gatif	4	21
x < 10	9	3
10 <= x < 20	10	0
20 <= x < 30	14	0
x >= 30	6	0
total positifs	39/43	3/24

☰ *Les résultats 2008- LDA39*

- Numération de spores de *Nosema* en lame de Malassez :

Spores de <i>Nosema</i> - numération		
en million sp./abeille	déc-mars	avril-août
< seuil détection	15	
$x < 0,1$	4	2
$0,1 \leq x < 5$	17	18
$5 \leq x < 10$	1	3
$x \geq 10$	2	1
total numérations	39	24

Les résultats

TRANSMISSION DES RESULTATS D'ANALYSES SUR LA PATHOLOGIE DES ABEILLES					
PATHOLOGIES	RESULTATS	DSV	DGAL	APICULTEURS	ASA
MRC	si PRESENCE	OUI		RESULTATS ENVOYES AVEC UNE SEMAINE DE DELAI PAR RAPPORT A LA DSV	COMME L'APICULTEUR
Aethina tumida					
Tropilaelaps clareae					
Paenibacillus larvae					
Nosema apis					
	si ABSENCE	OUI		OUI EN MEME TEMPS QUE LA DSV	COMME L'APICULTEUR
MALADIE A DECLARATION OBLIGATOIRE	si PRESENCE	OUI		RESULTATS ENVOYES AVEC UNE SEMAINE DE DELAI PAR RAPPORT A LA DSV	COMME L'APICULTEUR
Varroa destructor					
	si ABSENCE	OUI		OUI EN MEME TEMPS QUE LA DSV	COMME L'APICULTEUR
AUTRES PATHOLOGIES					
bacteriennes				OUI	OUI
virales				OUI	OUI
parasitaires				OUI	OUI
INTOXICATIONS CHIMIQUES		OUI	OUI		

N° DOSSIER : 091119 014407 01
Date d'édition : 19/11/2009



ANALYSES DEMANDEES : Diagnostic des maladies des abeilles

Client		TEST1
Code : 38185		
TEST1		
38000 GRENOBLE	38000	GRENOBLE
Preleveur / Veterinaire		
ELEVEUR		

SANTÉ ANIMALE - Diagnostic Vétérinaire			
ESPECE	ABEILLES	Date de réception	19/11/2009
Nature prélevement	Abeilles mortes + cadre de couvain	Heure de réception	10h00
Date de prélevement	18/11/2009	Nombre	1
Age / Race / Sexe	- / -		

Remarques : Localisation du rucher : rue du Bourdon - MAYAVILLE

RESULTATS

EXAMEN DU COUVAIN

- Recherche de Paenibacillus larvae, agent de la Loque Américaine = Absence.
- PRESENCE de nombreuses larves mycosées (Ascosphaera apis).

EXAMEN DES ABEILLES

- Recherche de Nosema apis, agent de la Nosérose = PRESENCE (infestation moyenne).

CONCLUSION

NOSEMOSE et ASCOSPHAEROSE.

N° DOSSIER : 091119 014408 01
Date d'édition : 19/11/2009



ANALYSES DEMANDEES : Diagnostic des maladies des abeilles

Client		TEST1
Code : 38185		
TEST1		
38000 GRENOBLE	38000	GRENOBLE
Preleveur / Veterinaire		
ELEVEUR		

SANTÉ ANIMALE - Diagnostic Vétérinaire			
ESPECE	ABEILLES	Date de réception	19/11/2009
Nature prélevement	Couvain + abeilles	Heure de réception	11h10
Date de prélevement	17/11/2009	Nombre	1
Age / Race / Sexe	- / -		

Remarques : Localisation du rucher : place de la Reine - APISVILLE

RESULTATS

COUVAIN

- Recherche de Paenibacillus larvae, agent de la Loque Américaine : PRESENCE,
- Recherche de Streptococcus pluton et Bacillus alvei, agents de la Loque Européenne : PRESENCE,
- Recherche de Varroa jacobsoni, agent de la Varroose : Absence.

ABEILLES

- Recherche de Nosema apis, agent de la Nosérose : Absence.

CONCLUSION

LOQUES EUROPEENNE ET AMERICAINE.