

# Comment échantillonner une ruche ?

Etienne Bruneau - CARI asbl - 14 juin 2009

Ce texte est principalement réalisé au départ du Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE 2005, méthodes d'échantillonnage et des paragraphes relatifs aux différentes maladies des abeilles.

## Chapitre 1 Notions générales relatives à l'échantillonnage

### A. COLLECTE DES ECHANTILLONS

Avant de collecter les échantillons, des précautions particulières doivent être apportées selon la raison pour laquelle l'échantillonnage est demandé. Cela va déterminer la nature et le nombre d'échantillons devant être prélevés pour valider les résultats d'analyse. Lorsque les échantillons sont prélevés sur un colonie vivante, des précautions particulières doivent être prises afin d'éviter dans la mesure du possible une perturbation de la colonie. L'opérateur doit disposer d'une protection adéquate. Heureusement, avec l'abeille, le risque de zoonose (maladie animale transmissible à l'homme et vice-versa) est inexistant. Une attention particulière doit être portée pour éviter de contaminer l'environnement ou tout risque de dissémination d'une maladie. En ce sens, des précautions doivent être prises avec le matériel utilisé pour réaliser les visites de ruches, lors des prélèvements et lors de l'évacuation correcte des abeilles mortes, des échantillons de couvain....

Une attention et un soin considérables sont exigés pour décider du choix des échantillons qui seront envoyés au laboratoire. Les échantillons doivent être représentatifs de la maladie à étudier. Les abeilles adultes, mortes ou à l'agonie, peuvent être collectées à proximité des colonies. Les abeilles vivantes doivent être tuées. Elles doivent être tuées avec du diéthylique ou dans une chambre de congélation (-20°C) durant une nuit. Certaines peuvent également être tuées par immersion dans de l'alcool éthylique à 70 % (cas pour le diagnostic de l'acariose (*Acarapis woodi*)). Des frottis de larves et de nymphes doivent être réalisés pour déterminer les maladies du couvain ou un morceau de cadre de couvain montrant des signes évidents de la maladie peut être envoyé au laboratoire.

### B. TAILLE DE L'ÉCHANTILLON

Lorsqu'on étudie un cas clinique de maladie, les échantillons collectés doivent être représentatifs de la maladie étudiée et des lésions observées. Quelques règles statistiques générales d'échantillonnage doivent être utilisées lorsqu'on met en place un programme de surveillance et de contrôle en santé animale. Il est ainsi possible de calculer la taille de l'échantillon à réaliser. Celle-ci va dépendre de la prévalence de l'infection (% d'individus touchés) dans la population, de la probabilité que l'on veut avoir d'identifier l'infection (le plus souvent de 95 à 100%) et de la sensibilité de la technique (la plupart des épreuves de diagnostic ne présentent pas une sensibilité et une spécificité de 100 %).

### C. INFORMATIONS DEVANT ACCOMPAGNER L'ÉCHANTILLON

Il est essentiel que les échantillons individuels soient clairement identifiés avec des méthodes appropriées. La signalisation doit pouvoir résister aux conditions d'utilisation, par exemple l'humidité ou la congélation (utiliser des stylos marqueurs indélébiles). Les crayons ont tendance à déteindre et les étiquettes collées au plastique tombent lorsque les emballages sont conservés à -70°C. Des informations décrivant le cas et son historique doivent toujours accompagner les échantillons au laboratoire. Elles doivent être placées de façon optimale dans une enveloppe plastifiée à l'extérieur du récipient d'expédition (sauf

si le plastique ne peut être utilisé). Comme c'est souligné dans la section suivante sur le transport des échantillons, ces informations doivent aussi figurer à l'intérieur du colis d'expédition. Les indications ci-dessous sont des points qui doivent être signalés. Il est préférable de contacter le laboratoire de réception pour déterminer s'il possède un formulaire de soumission qu'il souhaite recevoir avec l'échantillon ou s'il a besoin d'autres informations (voir à ce titre le formulaire du CERVA).

- i) Nom et adresse du propriétaire/exploitant et géo localisation (latitude et longitude, si disponibles) où est apparue la maladie avec numéros de téléphone et de fax ;
- ii) Nom, adresses postale et électronique, numéros de téléphone et de fax de l'expéditeur;
- iii) Maladie(s) suspectée(s) et analyses demandées ;
- iv) Espèce animale, race ;
- v) Date à laquelle les échantillons ont été prélevés et envoyés ;
- vi) Liste des échantillons soumis avec les milieux de transport utilisés ;
- vii) Un historique complet sera utile au laboratoire et doit être inclus si possible.

Quelques-uns des points de l'historique sont :

- a) Une liste et une description des colonies examinées et les résultats de l'examen *post mortem*;
- b) Durée pendant laquelle les colonies malades sont restés dans le rucher, s'il y a eu des arrivées récentes, et leur origine;
- c) Date du premier cas, des cas suivants ou des pertes, avec les références des précédentes soumissions;
- d) Description de l'étendue de l'infection dans le rucher ou dans l'ensemble du cheptel;
- e) Nombre de colonies dans l'exploitation, nombre de colonies mortes, nombre de colonies présentant une manifestation clinique, force de ces colonies, âge des reines, importance des réserves et du couvain, races;
- f) Signes cliniques, l'état (importance et structure) de la ponte, des larves et des nymphes, état des abeilles (malformations, perte de poils...), état et localisation des réserves de pollen (présence de moisissures...), des réserves de miel ;
- g) Type d'alimentation donnée, les toxiques possibles et les plantes toxiques pouvant entrer en contact avec les animaux ;
- h) L'historique des voyages à l'étranger du propriétaire ou de l'introduction d'abeilles provenant d'autres pays ou régions ;
- i) Liste des médicaments éventuellement donnés et date de leur administration ;
- j) Autres observations sur la maladie et l'élevage.

Voici ce que demande les données administrative CERVA-Uccle (analyses vétérinaires) :

1. Nom et prénom du vétérinaire avec numéro d'ordre
2. Nom, prénom et adresse du détenteur
3. Prélèvement envoyé par...
4. Résultats à envoyer au...
5. Facturation à...
6. Motif de l'analyse
7. Date du prélèvement
8. Nombre d'échantillons
9. Espèce

Vous devez savoir que pour initier un dossier d'analyse, des données administratives complètes sont indispensables. Les formulaires de demande d'examen, peuvent se télécharger à partir du site du CERVA ([document PDF à compléter pour le CERVA Uccle \(analyses vétérinaires\)](#)). Ces documents doivent être remplis consciencieusement et complètement pour chaque demande. Du matériel qui n'est pas identifié clairement et qui est envoyé sans formulaire complètement rempli et distinctement lisible n'est pas immédiatement pris en considération. Le matériel sera conservé 10 jours ouvrables pour éventuellement permettre au client de se manifester avant l'élimination du matériel.

#### D. EMBALLAGE ET TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

##### 1. Agrément d'expédition d'échantillons

Le laboratoire qui recevra les échantillons doit être contacté pour s'assurer qu'il a la

capacité de faire l'analyse demandée et de savoir s'il y a un emballage particulier ou des conditions d'expédition. Il est essentiel de prendre contact avec le laboratoire de réception lorsque le matériel est destiné à un autre pays. Une licence spéciale d'importation est habituellement exigée et doit être obtenue à l'avance pour tout produit biologique. Cette licence doit être placée dans une enveloppe à l'extérieur du colis.

## 2. Transport des échantillons

Les échantillons doivent être transmis au laboratoire par la méthode la plus rapide disponible. S'ils peuvent arriver au laboratoire en moins de 48 h, les échantillons sont envoyés réfrigérés. Si de la glace carbonique est utilisée, les exigences supplémentaires concernant l'emballage doivent être respectées.

Les « Échantillons de diagnostic ou les Échantillons cliniques ou les Substances biologiques de catégories B » (UN 3373) présente peu de risque et les emballages contenant ces échantillons doivent être étiquetés comme « Échantillons de diagnostic ou les Échantillons cliniques ou les Substances biologiques de catégories B ». Une Déclaration de produits dangereux n'est pas nécessaire.

Voici une procédure simplifiée reprenant les principales informations

- a) Les « Échantillons de diagnostic » doivent être emballés dans un emballage de bonne qualité, qui doit être suffisamment solide pour résister aux chocs et aux chargements habituellement subis au cours des transports. L'emballage doit être construit et fermé afin d'empêcher toutes pertes du contenu, qui peuvent survenir dans des conditions normales de transport.
- b) L'emballage doit être constitué de 3 éléments :
  - a. d'un réceptacle (conditionnement primaire);
  - b. d'un emballage secondaire; et
  - c. d'un emballage externe rigide.
- c) Pour les substances liquides (miel, abeilles dans le formol...) :
  - a. Le réceptacle doit être étanche aux fuites et ne doit pas contenir plus de 1 litre ; l'emballage secondaire doit également être étanche aux fuites ;
  - b. Le premier réceptacle doit être entouré d'un matériel absorbant approprié afin d'absorber tout fluide;
  - c. Si plusieurs premiers réceptacles sont utilisés, ils doivent être emballés individuellement ou séparés pour éviter le contact;
- d) Pour les substances solides :
  - a. Le premier réceptacle utilisé pour des solides ne doit pas fuir (pas de perte de poudres) et ne doit pas excéder la limite de poids de l'emballage extérieur ; l'emballage secondaire doit être étanche aux fuites de poudres ;
  - b. Le premier réceptacle doit être entouré d'un matériel absorbant approprié afin d'absorber tout fluide dans ce premier réceptacle ;
  - c. l'emballage externe ne doit pas contenir plus de 4 kg. Cette quantité exclu la glace, la glace carbonique, ou l'azote liquide utilisées pour maintenir les échantillons froids ;
  - d. S'il y a un doute concernant la présence ou non d'un liquide résiduel dans le réceptacle primaire pendant le transport alors un emballage adapté aux fluides, incluant le matériel absorbant, doit être utilisé.
- e) Une liste détaillée du contenu doit être jointe entre l'emballage second et l'emballage externe.
- f) Si l'expédition se fait à température ambiante ou plus, le premier réceptacle doit avoir des explications claires assurant qu'il résiste aux fuites, telles qu'un bouchon résistant aux fuites, soudé par la chaleur ou un bouchon à jupe. Si des bouchons à vis sont utilisés, ils doivent être soudés avec un parafilm ou un adhésif.
- g) Des blocs pré-congelés ou de la glace carbonique peuvent être déposés autour du second emballage. Si de la glace carbonique est utilisée, il doit y avoir un support

interne pour maintenir le second emballage dans sa position originale après que la glace carbonique se soit dissipée. L'emballage externe doit permettre la libération du dioxyde de carbone.

- h) Les emballages contenant des échantillons de diagnostic ou cliniques ne nécessitent pas l'inscription de la quantité nette sur l'emballage extérieur. Cependant, si de la glace carbonique est utilisée comme réfrigérant, la quantité nette de glace carbonique doit être donnée.
- i) Les réceptacles primaires et secondaires doivent être déposés dans un conteneur d'expédition avec un matériel de matelassage approprié.
- j) L'emballage doit pouvoir résister à une chute test de 1,2 m (Il existe des exigences supplémentaires concernant la résistance des emballages utilisés pour les échantillons UN 2900 et UN 2814).
- k) La surface de l'emballage extérieur doit avoir au moins une dimension minimale de 100 mm x 100 mm.
- l) Pour le transport, la marque 3373 doit être affichée sur la surface externe de l'emballage extérieur sur un fond de couleur contrastée et doit être clairement visible et lisible. La marque doit avoir la forme d'un carré disposé avec un angle de 45° (forme de diamant) et avec chaque coté d'une longueur d'au moins 50 mm, l'épaisseur de la ligne doit être d'au moins 2 mm, et les lettres et nombres doivent faire au moins 6 mm de haut. Le nom approprié d'envoi « Échantillon de Diagnostic », « Échantillon Clinique » ou « Substance Biologique de catégorie B » en lettre d'au moins 6 mm de haut doit être inscrit sur l'emballage extérieur à côté du symbole en forme de diamant.



- m) Formulaires d'expédition : tous les formulaires d'expédition doivent être déposés dans une enveloppe attachée à l'extérieur du conteneur d'expédition. Les formulaires et les étiquettes doivent être également placés à l'extérieur du paquet.

Voici les conditions à respecter pour l'envoi des échantillons au CERVA Uccle (analyses vétérinaires) :

- les échantillons doivent être séparés
- les échantillons doivent être placés dans un emballage individuel qui sera fermé hermétiquement.
- Il faut une identification claire de l'échantillon individuel
- Il faut un emballage soigné (pas de casse ou d'écoulement possible!), isotherme, résistant, avec un absorbant efficace et une source de refroidissement
- L'envoi doit être rapide (ex. : le porter vous - même, Taxipost ou autre courrier express). Une voie facile pour les échantillons vétérinaires est l'envoi via les laboratoires du DGZ-Vlaanderen ou de l'ARSIA où le CERVA ramasse les échantillons chaque semaine.

## Chapitre 2 - L'échantillonnage en fonction des pathologies

### A. ACARIOSE

L'acariose ne peut être détectées en laboratoire qu'en utilisant un microscope ou par une méthode immuno-enzymatique (ELISA). Il n'y a aucune méthode fiable pour la détection des infections primaires. Le nombre d'abeilles prélevées détermine le seuil de détection de la méthode. Il a été observé qu'un taux de 2 % d'infection peut être détecté en prélevant 50 abeilles, alors que 100 abeilles sont nécessaires pour détecter un taux de 1 % d'infection (la fiabilité est de 80 % pour une colonie de taille moyenne au printemps). En raison de la lourdeur des manipulations, il est préférable d'examiner 50 abeilles. Le CERVA recommande un échantillon de 60 abeilles vivantes qui rampent sur le sol devant la ruche.

Le meilleur moment pour le prélèvement des échantillons d'abeilles se situe au début du printemps ou à la fin de l'automne, lorsque les populations d'*Acarapis* sont les plus fortes. La visualisation des acariens est plus facile sur des abeilles plus âgées, qui ont plus d'acariens. Les castes de reines, de faux-bourçons ou d'ouvrières peuvent être utilisées, mais *Acarapis* préfèrent la caste des faux-bourçons.

### B. LOQUE AMERICAINE

La loque américaine affecte les stades larvaires de l'abeille domestique d'*Apis mellifera* et d'autres espèces d'*Apis*. Elle est présente dans le monde entier. *Paenibacillus larvae* sous-espèces *larvae* (*White*), l'agent causal, est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Les cadres de couvain des colonies infectées ont un aspect en mosaïque dû à un mélange de cellules operculées de couvain sain, de cellules non operculées contenant les restes des larves malades, et de cellules vides. Ceci n'est pas seulement caractéristique de la loque américaine. Les opercules d'une cellule de larve malade apparaissent mous et plus foncées, devenant concaves et souvent perforées à mesure que l'infection progresse.

La couleur des larves et des pupes passe du brun crémeux au brun foncé avec un aspect visqueux une fois exposés à l'extérieur. Une odeur caractéristique se développe à un stade avancé d'infection. Le couvain malade se dessèche par la suite pour former des écailles caractéristiques très adhérentes au fond de la cellule. La formation d'une larve filante est un des signes les plus caractéristiques de la maladie, il précède la formation des écailles.

Il est recommandé d'envoyer au laboratoire un morceau de cadre de couvain d'environ 20 cm<sup>2</sup>, contenant autant de couvain mort et décoloré que possible. Peu ou pas de miel doit être présent dans l'échantillon. Le CERVA recommande des morceaux de couvain présentant les signes de la maladie de 15 X 15 cm.

L'échantillon peut être simplement enveloppé dans du papier, et les emballages, tels que les sachets en plastique, papier d'aluminium, papier ciré, étain ou verre, doivent être évités afin d'empêcher la moisissure des échantillons, rendant un diagnostic précis presque impossible. L'échantillon peut être expédié dans un carton épais ou une boîte en bois. Si une partie du cadre de couvain ne peut pas être envoyée, le prélèvement, doit contenir assez d'échantillons pour plusieurs tests. L'échantillon peut aussi être enveloppé dans du papier ou mis dans un tube approprié.

Cependant, un si petit échantillonnage ne peut être effectué que si la personne est suffisamment expérimentée pour identifier les secteurs malades du cadre de couvain. Parfois, il est difficile de localiser les restes larvaires en raison de l'état du cadre de couvain. Les écailles peuvent être commodément localisées par l'emploi de rayons ultraviolets ou d'une lumière proche des ultraviolets. L'exposition entre 310 et 400 nm fera

entrer en fluorescence n'importe quelle écaille loqueuse.

Une attention particulière doit être portée quand le miel et le pollen entrent également en fluorescence.

Quand l'observation macroscopique au rucher par une personne expérimentée indique que les cadres de couvain ont un aspect sain, des échantillons de miel peuvent être envoyés pour l'analyse en laboratoire. Des échantillons de nectar et de pollen collectés dans des cellules operculées près du couvain peuvent être pris avec une cuillère et être transférés dans un sachet en plastique ou un tube. Du miel récolté prêt à la vente peut également être analysé, bien que ceci ne permette pas l'identification des colonies malades en cas de présence avérée de spores dans l'échantillon. La taille des échantillons devrait être de 30 à 50 g.

### C. LOQUE EUROPEENNE

Habituellement, les larves d'abeilles atteintes de loque européenne meurent 1 ou 2 jours avant l'operculation des cellules, parfois juste après, mais toujours avant la métamorphose en chrysalide. La maladie est causée par *Melissococcus pluton* et se produit généralement lors d'une période où les colonies se développent rapidement.

La plupart des larves malades perdent leurs positions enroulées en fond de cellule avant de mourir. La majorité d'entre-elles sont rapidement détectées et enlevées par les abeilles nourricières, laissant des cellules vides dispersées aléatoirement sur le cadre de couvain.

Les larves infectées échappant aux contrôles des abeilles adultes meurent, puis deviennent flasques et prennent une couleur jaune-clair qui vire rapidement au brun, dans le même temps, celles-ci se dissolvent en une masse semi-liquide. Elles se dessèchent alors pour former une écaille de couleur brun foncé facilement détachable des cellules. La plupart du temps, le couvain sévèrement atteint peut avoir une odeur aigre ou de moisi, parfois acide, comme le vinaigre, mais souvent il n'y a aucune odeur.

Habituellement, les signes de la maladie disparaissent spontanément des colonies infectées avant la fin de la saison d'activité, mais sont susceptibles de réapparaître les années suivantes.

Les larves fraîchement mortes sont les meilleures pour le diagnostic. L'échantillon aura les mêmes caractéristiques que pour la loque américaine.

### D. NOSEMOSE

Dans les formes aiguës d'infection, particulièrement en début de printemps, des souillures fécales brunes peuvent être observées sur les cadres. À l'entrée de la ruche, des abeilles malades et mortes peuvent être présentes, bien que d'autres causes soient possibles, telles que l'empoisonnement par des pesticides. Pendant l'hiver, les colonies infectées par *Nosema* peuvent s'affaiblir fortement ou s'éteindre tout à fait. La majorité des colonies infectées par *Nosema* semble normale, sans signe évident de maladie même lorsque celle-ci est suffisante pour causer des pertes importantes dans la production de miel et dans l'efficacité de la pollinisation. Pendant l'hiver, il peut y avoir une augmentation de la mortalité des abeilles. Un diagnostic approprié peut être fait seulement par l'observation en microscopie du ventricule d'abeille adulte. Pour diagnostiquer une infection par *Nosema*, la paire postérieure de segments abdominaux est enlevée avec une pince pour visualiser le ventricule, pourvu des tubules de Malpighi, du petit intestin et du rectum. Le ventricule est normalement brun, mais après une infection par *Nosema*, il devient blanc et très fragile. Cependant, cet aspect peut être causé par d'autres perturbations intestinales, par exemple une alimentation par des nourritures commerciales non digestibles, tels que des sirops contenant de la levure active. Pour un diagnostic fiable, un certain nombre

d'abeilles doivent être examinées.

Une méthode simple non quantitative pour détecter l'infection de *Nosema* est la suivante : des abeilles d'au moins 8 jours sont prélevées sur le pas de vol, ceci élimine les faux négatifs obtenus avec des jeunes abeilles où les spores du protozoaire ne se seraient pas encore développées. Un minimum de 60 abeilles est nécessaire afin de détecter 5 % d'abeilles malades avec un indice de confiance de 95 %. Avant l'envoi au laboratoire, les abeilles devront être conservées dans du formol à 4 % afin d'empêcher leur décomposition et ainsi d'améliorer leur réception et leur traitement au sein du laboratoire.

Le CERVA recommande de prélever par colonie 30 ouvrières (abeilles attrapées sur la planche d'envol)

#### E. TROPILAEELAPS (ET VARROASE)

Une infestation par *Tropilaelaps* peut être observée comme pour la varroase, directement sur des abeilles ou observée dans les débris de ruche. Un couvain irrégulier, des abeilles immatures mortes ou mal formées, des abeilles aux ailes déformées rampant à l'entrée de la ruche, et particulièrement la présence d'acariens allongés, larges, de couleur rouge-brun, courant rapidement sur les cadres, permettent le diagnostic lors de la présence de *T. clareae*. Un diagnostic précoce peut être fait après ouverture des cellules de couvain et observation des acariens immatures et adultes présents dans celles-ci. La ruche (colonie) peut être traitée avec divers produits acaricides qui entraînent la chute des acariens des cadres et des abeilles. Des feuilles collantes placées au fond de la ruche peuvent être employées pour collecter et observer les débris et les acariens de la ruche.

Le CERVA recommande d'envoyer des débris recoltés sur le fond de la ruche, ou du couvain operculé (15x15 cm) et de préférence du couvain de faux-bourdon