

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.31 - Version 1

Octobre 2016

Analyse des cages à reines d'abeilles ou de bourdons afin de mettre en évidence un risque d'introduction du petit coléoptère de la ruche (*Aethina tumida*) et des acariens de type *Tropilaelaps* (*Tropilaelaps* spp.)

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 peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées ; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V1	Modification mineure	10/10/2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.31 - révision 1 du LNR Santé des abeilles.



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 : Inr.abeille@anses.fr



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	7
5 Matériel et consommables	8
6 Appareillage et matériels	8
7 Échantillons.....	8
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	8
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	8
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	9
8 Mode opératoire	9
8.1 Préparation pour analyse.....	9
8.2 Examen des cages à reines	9
8.3 Description des éléments suspects susceptibles de s'apparenter à <i>A. tumida</i> et <i>Tropilaelaps</i> spp.	10
9 Résultats	13
9.1 Calculs et expression des résultats	13
9.2 Conclusion analytique	13
10 Caractéristiques de performance de la méthode	13
Bibliographie	14



Introduction

Les infestations par le petit coléoptère des ruches et par les acariens du genre *Tropilaelaps* spp. sont classées comme dangers sanitaires de première catégorie pour l'abeille en France et sont réglementées à l'échelle européenne et internationale (OIE).

Le petit coléoptère des ruches (*Aethina tumida*) est un insecte originaire d'Afrique du Sud. Son cycle reproductif se déroule en partie dans les colonies d'abeilles. Les femelles du petit coléoptère, attirées par l'odeur de la ruche, y pénètrent et pondent des paquets d'œufs dans les anfractuosités du bois. Ces œufs donnent naissance à des larves. Les larves carnassières assurent leur croissance en se nourrissant du couvain d'abeille (larves), de miel et de pollen. Leurs défécations entraînent de plus une fermentation du miel, qui devient impropre à la consommation. Dans les cas graves, il y a perte de la colonie d'abeilles et de la récolte.

Le petit coléoptère a envahi ces dernières années différentes régions du monde entraînant parfois des dommages importants pour les filières apicoles de ces pays (EFSA, 2013 ; OIE, 2013). Il a été détecté dans le sud de l'Italie en 2014 (Mutinelli *et al.*, 2014; Palmeri *et al.*, 2015).

Les acariens du genre *Tropilaelaps* spp. sont des parasites du couvain d'abeille. S'alimentant sur les larves et les nymphes, ils sont à l'origine de malformations, et entraînent la mort des abeilles et le déclin progressif des colonies. Le cycle de développement dure environ 1 semaine. Ces acariens sont disséminés par les abeilles adultes, sur lesquelles ils ne peuvent s'alimenter (impossibilité de percer leur cuticule). Ainsi, lorsqu'ils sont confinés sur abeilles adultes et privés de nourriture, leur durée de survie est courte ; elle varie de cinq heures à trois jours, et peut atteindre jusqu'à huit jours, selon les conditions des études effectuées (EFSA, 2013).

Originaires d'Asie, les deux espèces *Tropilaelaps clareae* et *Tropilaelaps mercedesae* sont des parasites reconnus comme pathogènes pour *Apis mellifera*. L'Europe est actuellement indemne de cette parasitose.

En raison du risque d'introduction de ces deux agents exotiques sur le territoire communautaire, lié aux importations de reines d'abeilles et de bourdons en provenance de pays tiers, le règlement (UE) n°206/2010 impose un examen en laboratoire des cages de transport et des abeilles accompagnatrices visant à mettre en évidence la présence éventuelle d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp.

La présente méthode décrit la technique d'examen mise en œuvre dans le cadre de ces analyses officielles.



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 en vigueur.

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



1 Objet et domaine d'application

La méthode décrite est une technique d'examen en laboratoire des cages de transport des reines et des abeilles accompagnatrices visant à mettre en évidence la présence éventuelle d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp.

Cette analyse officielle s'inscrit dans le cadre du règlement européen n° 206/2010 du 12 mars 2010 relatif aux importations issues de pays tiers.

Il s'agit d'une méthode interne du Laboratoire National de Référence (LNR) sur la Santé des abeilles.

2 Documents de référence

- (1) Règlement (UE) n° 206/2010 de la Commission du 12 mars 2010 établissant des listes des pays tiers, territoires ou parties de pays tiers ou territoires en provenance desquels l'introduction dans l'Union européenne de certains animaux et viandes fraîches est autorisée, et définissant les exigences applicables en matière de certification vétérinaire.
- (2) Note de service DGAL/SDSPA/SDASEI/N2012-8128 du 20 juin 2012 relative aux contrôles sanitaires à l'importation en France d'apidés en provenance des pays tiers.

3 Termes, sigles et définitions

OIE : Office International des Epizooties.
LNR : Laboratoire National de Référence.

4 Principe de la méthode

La méthode repose sur l'examen visuel, des cages à reine, des abeilles accompagnatrices et du matériel ayant contenu l'ensemble. Elle vise à détecter, en première intention, tout élément douteux susceptible de représenter un risque d'introduction d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp. dans l'Union Européenne. Cette analyse est mise en œuvre par le réseau de laboratoires agréés par la DGA.

Un examen morphologique des prélèvements suspects, confirmé si nécessaire par une analyse moléculaire, permet dans un second temps d'effectuer un diagnostic de confirmation ou d'exclusion. Ces analyses sont réalisées par le Laboratoire national de référence (LNR) sur la Santé des abeilles.

La détection des formes parasitaires suspectes est basée sur un examen macroscopique visuel des échantillons. Cette analyse fait suite à un premier examen réalisé lors de l'arrivée des cages à reines au lieu de première destination (i.e. chez l'importateur). A cette occasion, les reines sont introduites dans une nouvelle cage avec de nouvelles abeilles accompagnatrices. Le laboratoire reçoit pour analyse l'emballage d'origine avec, à l'intérieur, les cages à reines et les abeilles accompagnatrices d'origine.



5 Matériel et consommables

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits 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 produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

- Pincés,
- Ethanol dilué à 70 % (non dénaturé),
- Contenant à fermeture hermétique à usage unique (ex : tube à bouchon),
- Papier de protection de type BenchGuard®.

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.

- Loupe binoculaire.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons sont constitués de :

- l'emballage d'origine accompagnant le lot de reines introduites,
- les cages à reines et les abeilles accompagnatrices d'origine.

Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur, l'ensemble des emballages, cages et abeilles accompagnatrices issues d'un même lot est soumis à l'analyse.

Les cages de transport avec les accompagnatrices ainsi que les autres matériels d'accompagnement sont expédiés au laboratoire agréé dans un emballage correctement identifié empêchant toute échappée d'abeilles, et accompagnés d'une fiche officielle de commémoratifs (cf. annexe III de la note de service DGAL/SDSPA/SDASEI/N2012-8128).

Important : Les abeilles doivent arriver mortes au laboratoire. Dans le cas où les abeilles seraient encore vivantes lors de la réception du colis, placer le lot au congélateur à une température inférieure à -12°C pendant au moins 24 h (OIE, 2016) afin de tuer les abeilles et les formes parasitaires éventuellement présentes.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant 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.



7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Après l'examen au laboratoire, tous les matériels (cages, accompagnatrices et autres matériels) sont détruits selon le circuit d'élimination des déchets d'activités de soins à risques infectieux. Les formes parasitaires suspectes sont conditionnées dans de l'éthanol non dénaturé à 70 % pour envoi au LNR.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation pour analyse

Procéder à l'examen dans une pièce fermée.

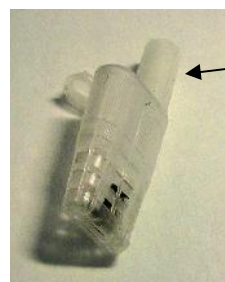
Réaliser l'examen sur une surface propre et dégagée.

8.2 Examen des cages à reines

- Ouvrir les emballages contenant le lot de cages à reine.
- Ouvrir chaque cage à reine et placer les abeilles accompagnatrices présentes à l'intérieur sur le papier de protection.
- Placer également sur le papier de protection les abeilles accompagnatrices qui seraient éventuellement présentes dans l'emballage.
- Examiner visuellement à la loupe l'intérieur des cages ainsi que chaque abeille accompagnatrice présente dans le lot.
- Examiner les emballages associés au lot de cages.

Note : En fonction du modèle de cage, il est important de bien vérifier l'absence d'éléments suspects au niveau du candi (nourriture sucrée destinée aux abeilles lors du transport).

Cage à reines contenant des abeilles :



← Réserve de candi

Source : Anses, laboratoire de Sophia Antipolis

- **Tout élément suspect susceptible de s'apparenter aux formes parasitaires d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp. :**
 - œufs,
 - larves d'insecte,



- coléoptères,
- acarien autre que *Varroa destructor*,

est placé dans de l'éthanol dilué à 70 % (non dénaturé), dans un contenant hermétiquement fermé, préalablement identifié avec le numéro de l'échantillon.

- **A la fin de l'examen, les cages sont comptées afin de vérifier que le lot reçu et examiné est bien complet.**

8.3 Description des éléments suspects susceptibles de s'apparenter à *A. tumida* et *Tropilaelaps* spp.

- **Détection de coléoptères (Fig. 1 et 2) :**

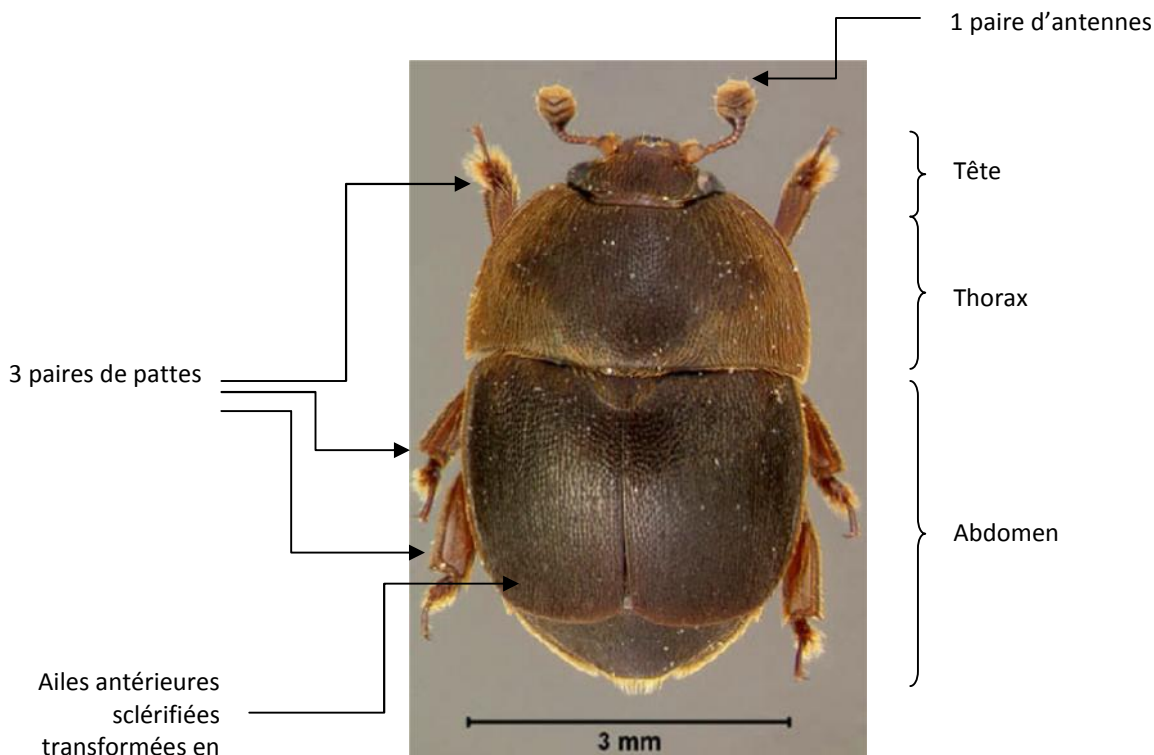
Les coléoptères sont des insectes, ils possèdent :

- trois paires de pattes articulées ;
- un corps recouvert d'une cuticule ;
- deux paires d'ailes ;
- une paire d'antennes ;
- un corps présentant trois régions distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen.

Le groupe des coléoptères est caractérisé par la présence d'ailes antérieures sclérifiées (i.e. épaissies et durcies) transformées en élytres, recouvrant une partie ou la totalité de l'abdomen. Elles recouvrent également les ailes postérieures membraneuses (i.e. transparentes).

Figure 1 - Le coléoptère *Aethina tumida*, au stade adulte (forme déployée) :

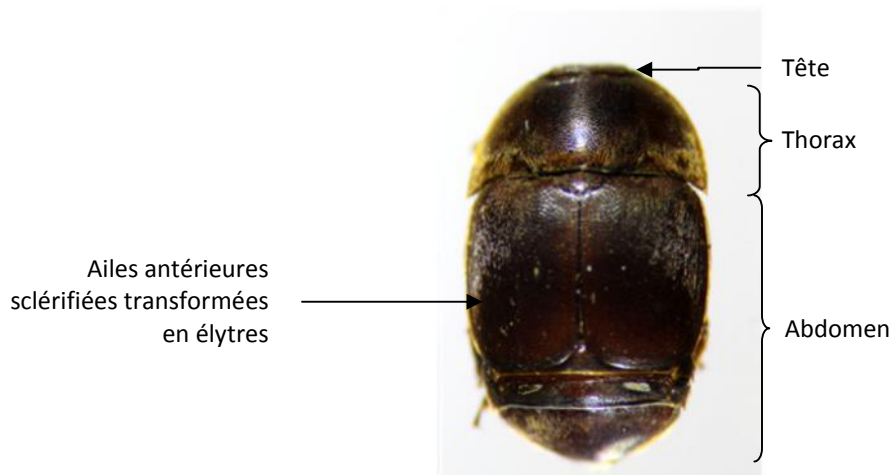
- Mesure 5 à 7 mm de longueur et 3 à 4.5 mm de largeur environ,
- est de couleur rouge à brun foncé / noir à l'âge adulte.



Source : University of Florida. (OIE, 2013)



Figure 2 - Le coléoptère *Aethina tumida*, au stade adulte (forme rétractée) :



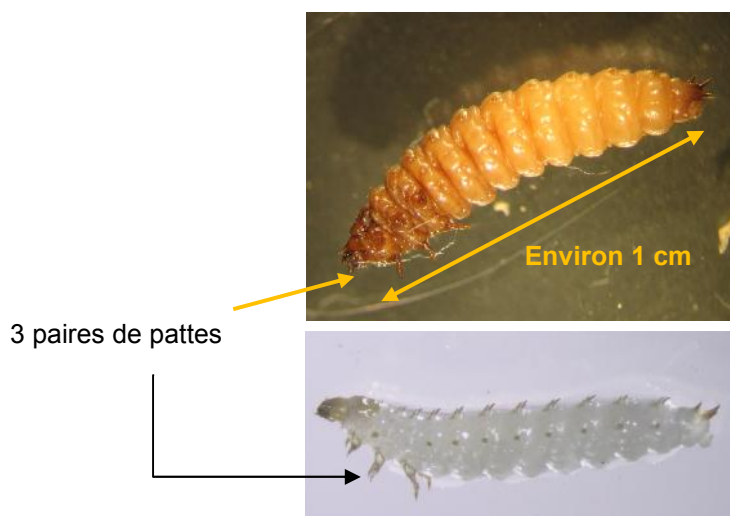
Vue dorsale. Source : Anses, laboratoire de Sophia Antipolis.

- **Détection de larves d'insectes (Fig. 3) :**

Les larves de coléoptères possèdent **trois paires de pattes**.

Elles présentent une segmentation. Leur couleur est variable (blanchâtre à brun plus ou moins foncé en fonction de l'état de développement et de conservation).

Figure 3 - Larve d'*Aethina tumida*



Source : Anses, laboratoire de Sophia Antipolis.



- **Mise en évidence d'œufs :**

Les œufs d'*Aethina tumida* sont blancs en forme de haricot. Ils font environ les 2/3 de la taille d'un œuf d'abeille mellifère (1,4 x 0,2 mm) et sont donc difficilement visibles à l'œil nu.

Figure 4 - Œuf d'*Aethina tumida*



Source : University of Florida. (OIE, 2013)

Les œufs de *Tropilaelaps* spp. ne sont pas détectables lors de l'examen visuel des cages à reines et abeilles accompagnatrices.

- **Mise en évidence d'acariens différents de *Varroa destructor* :**

Tropilaelaps spp. sont des **arachnides** et possèdent les caractéristiques suivantes :

- quatre paires de pattes. ;
- une paire de chélicères (appendice buccal en forme de crochet ou de pince) et une paire de pédipalpes (appendice de préhension situé en arrière des chélicères) ;
- pas d'antennes ;
- un corps ovale comportant deux parties : le céphalothorax et l'abdomen.

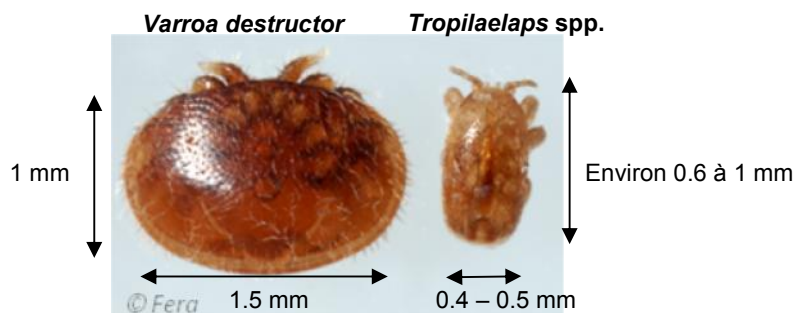
Ce sont des **acariens et possèdent de fait :**

- un abdomen non segmenté ;
- un corps en une seule région apparente.

Les acariens de type *Tropilaelaps* spp. sont **visibles à l'œil nu**. Leurs dimensions sont inférieures à celles de *Varroa destructor* : 1 x 0,5 mm, contre 1,1 x 1,6 mm.

Contrairement à *Varroa destructor*, *Tropilaelaps* spp. est plus long que large (Fig. 5).

Figure 5. *Varroa destructor* et *Tropilaelaps* spp.



Source : FERA, Crown.



9 Résultats

9.1 Calculs et expression des résultats

Résultat de l'examen	Expression du résultat analytique dans le rapport d'analyse Paramètre de l'analyse : risque d'introduction d' <i>Aethina tumida</i> et de <i>Tropilaelaps</i> spp.
Présence d'élément(s) susceptible(s) de s'apparenter aux formes parasitaires d' <i>Aethina tumida</i> et de <i>Tropilaelaps</i> spp. : - œufs, - larve d'insecte, - coléoptère, - ou acarien différent de <i>Varroa destructor</i> .	Déecté
Absence d'élément(s) susceptible(s) de s'apparenter aux formes parasitaires d' <i>Aethina tumida</i> et de <i>Tropilaelaps</i> spp. : - œufs, - larve d'insecte, - coléoptère, - ou acarien différent de <i>Varroa destructor</i> .	Non déecté

9.2 Conclusion analytique

- Dans le cas d'un résultat positif, la conclusion portée est : « Détection positive d'un risque d'introduction d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp.».

La nature des formes parasitaires suspectes qui ont été déctées ainsi que leur nombre sont précisées dans le rapport d'analyses (œufs, larve d'insecte, coléoptère, acarien différent de *Varroa destructor*).

Important :

- Tout résultat d'analyse positif doit être transmis sans délai par le laboratoire à la DDecPP du département concerné.
- Les spécimens suspects morts sont envoyés sans délai au LNR Santé des abeilles pour une analyse de confirmation (identification morphologique éventuellement associée à une analyse moléculaire).
- Dans le cas d'un résultat négatif, la conclusion portée est : « Détection négative d'un risque d'introduction d'*Aethina tumida* et de *Tropilaelaps* spp.».

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Méthode validée par l'usage.



Bibliographie

1. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the risk of entry of *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* spp. in the EU. EFSA Journal 2013, 11(3):3128, 127 pp. Disponible en ligne : www.efsa.europa.eu/efsajournal
2. Laboratoire de Référence Européen pour la Santé de l'Abeille, 2014. Les acariens du genre *Tropilaelaps* spp. Plaquette disponible en ligne : <https://www.anses.fr/fr/content/laboratoire-de-sophia-antipolis>
3. Laboratoire de Référence Européen pour la Santé de l'Abeille, 2015. Le petit coléoptère des ruches. Plaquette disponible en ligne : <https://www.anses.fr/fr/content/laboratoire-de-sophia-antipolis>
4. Mutinelli F., Montarsi F., Federico G., Granato A., Ponti A.M., Grandinetti G., Ferre N., Franco S., Duquesne V., Riviere M.P., Thiery R., Henriks P., Ribiere-Chabert M., Chauzat M.P. (2014). Detection of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae.) in Italy: Outbreaks and early reaction measures. In Journal of Apicultural Research, 53 (5), 569-575.
5. OIE, 2008. *Tropilaelaps* infestation of honey bees (*Tropilaelaps* spp.). In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Paris, 419-423.
6. OIE, 2013. Small hive beetle infestation *Aethina tumida*. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Paris.
7. OIE, 2016. Infestation of honey bees with *Tropilaelaps* spp.. In: Terrestrial Animal Health Code, Paris, volume 2, chap. 9.5.
8. OIE, 2016. Infestation with *Aethina tumida* (Small hive beetle). In: Terrestrial Animal Health Code, Paris, volume 2, chap. 9.4.
9. Palmeri V., Scirtò G., Malacrinò A., Laudani F., Campolo O. (2015). A scientific note on a new pest for European honeybees: first report of small hive beetle *Aethina tumida*, (Coleoptera: Nitidulidae) in Italy. Apidologie 46, 527-529.