

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.19 - Version 2

Août 2016

Identification de *Paenibacillus larvae*, agent de la loque américaine, par PCR

Anses Sophia Antipolis

Laboratoire national de référence - Santé des abeilles

Laboratoire de référence de l'Union Européenne - 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
V 2	Révisions mineures	25 juillet 2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-11.MOA.19 - révision 2 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

Laboratoire de référence de l'Union Européenne sur la santé de l'abeille

Adresse : Les Templiers, 105 Route des Chappes, CS 20111, 06902 Sophia Antipolis

Contact : [lnr.abeille@anses.f](mailto:lnr.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 Réactifs.....	8
5.1 Eau	8
5.2 Kit d'extraction de l'ADN total.....	8
5.3 Désoxyribonucléotides triphosphates	8
5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle	8
5.5 Amorces	8
5.6 Témoin positif de processus.....	9
5.7 Témoin négatif de processus.....	9
5.8 Témoin positif de PCR.....	9
5.9 Témoin négatif de PCR	9
6 Appareillage et matériels	9
6.1 Petit équipement de laboratoire.....	9
6.2 Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles.....	9
6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase).....	10
7 Échantillons	10
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	10
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	10
7.3 Conservation des échantillons reliquats après analyse	10
8 Mode opératoire.....	10
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	10
8.2 Extraction de l'ADN génomique.....	10
8.3 Amplification de l'ADN cible.....	11
8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)	11
8.3.2 Préparation des tubes de réaction de PCR.....	11
8.3.3 Visualisation des fragments PCR générés	12
9 Résultats.....	12
9.1 Contrôle de la validité des résultats	12
9.2 Cas des résultats négatifs	12
9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR β -actine »	13
9.3.1 Amorces utilisées	13
9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)	13
9.3.3 Préparation des tubes de réaction de PCR.....	13
9.4 Expression des résultats	14
9.4.1 Conclusion analytique et interprétation de la PCR.....	14
9.5 Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la loque américaine	14
10 Caractéristiques de performance de la méthode	15
Annexe.....	16
Bibliographie.....	17



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 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).

Plusieurs techniques sont envisageables pour détecter la maladie ou identifier la bactérie. La mise en évidence de bacilles ou de spores de type *P. larvae* peut être faite par examen microscopique (coloration de Gram). La culture sur milieu gélosé permet de mettre en évidence des colonies dont la morphologie est typique de celle de *P. larvae*. Des tests biochimiques (exemple : catalase) peuvent également aider à l'identification de la bactérie. Enfin, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'identification de l'espèce bactérienne.



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 exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

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

Ce document décrit la méthode officielle d'identification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) de l'agent de la loque américaine, *Paenibacillus larvae*, dans des prélèvements de couvain (larves) présentant les signes cliniques évocateurs de la maladie.

Le diagnostic de la loque américaine est, dans un premier temps, réalisé par examen bactérioscopique après coloration de Gram selon la méthode « Recherche de la loque américaine sur couvain d'abeilles » (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.03). Dans le cas où le résultat de cette analyse est « ininterprétable », l'identification de *P. larvae* est confirmée par PCR.

La méthode décrite est adaptée du Manuel de diagnostic pour les animaux terrestres de l'Office International des Epizootie (OIE), 2014 (Chapitre 2.2.2). Cette méthode a été validée selon la norme NF U47-600.

2 Documents de référence

- [1] AFNOR, NF EN ISO/CEI 17025. Septembre 2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- [2] AFNOR, NF U47-600 parties 1 et 2. Février 2015. Méthode d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne)
- [3] OIE, 2008. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Chapitre 2.2.2, pp. 433-442.

3 Termes, sigles et définitions

Les termes, sigles et définitions décrits dans la norme française NF U47-600 partie 1 (AFNOR, 2015) s'appliquent au présent document.

4 Principe de la méthode

La PCR présentée est utilisée pour l'identification de l'espèce *P. larvae*, suite à la détection de spores ou de bacilles par microscopie. Les échantillons de larves ont donc été préalablement broyés afin d'obtenir une suspension homogène pour l'extraction des acides nucléiques.

La bactérie est identifiée par amplification de l'ADN de l'ARN ribosomal 16S. L'ADN ciblé est issu de l'ADN génomique (extraction directe). Il est amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques. Cette technique permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné.

La technique décrite ici est basée sur le protocole de PCR décrit par Dobbelaere *et al.* (2001) et reprise dans le manuel OIE (2008).



L'identification de *P. larvae* par PCR à partir des échantillons de larves d'abeilles se décompose en 3 étapes :

1. Extraction de l'ADN à partir des broyats de larves
2. Amplification par PCR de la séquence cible et analyse des produits de PCR
3. Interprétation et validation des résultats

5 Réactifs

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.

5.1 Eau

Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase

5.2 Kit d'extraction de l'ADN total

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics)

5.3 Désoxyribonucléotides triphosphates

dNTP 10 mM mix – PCR Grade (Invitrogen)

5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle

Cette méthode a été caractérisée et validée avec la Taq polymérase Platinum (Invitrogen), ainsi que les dNTP et MgCl₂ (Invitrogen).

Réactif	Concentration	Fournisseur
PCR Buffer, Minus Mg (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	10 X	Invitrogen
MgCl ₂	50 mM	Invitrogen
dNTP mix	10 mM	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase	5 U/μl	Invitrogen

5.5 Amorces

Les amorces spécifiques de *P. larvae* (AFB 3 et AFB 4), en solution de travail à 20 μM en eau qualité biologie moléculaire, sont conservées à environ -18°C. Les séquences sont décrites dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de l'ARN 16S de *P. larvae***

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
AFB 3	5'-CTT GTG TTT CTT TCG GGA GAC GCC A-3'	1096 pb
AFB 4	5'-TCT TAG AGT GCC CAC CTC TGC G-3'	

5.6 Témoin positif de processus

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction et de la PCR. Il est constitué d'une suspension de larves naturellement infectées avec des spores de *P. larvae*, diluée à une concentration de 10 fois supérieure à la limite de détection de la méthode. Cette suspension de larves est issue d'un diagnostic de loque américaine dont l'espèce *P. larvae* a été identifiée au préalable et validée par le séquençage des produits de PCR.

5.7 Témoin négatif de processus

Le tampon d'éluion du kit d'extraction est utilisé comme témoin négatif de processus.

5.8 Témoin positif de PCR

Le témoin positif de PCR est constitué du contrôle positif plasmidique *P. larvae* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD_{PCR}) multipliée par 10.

5.9 Témoin négatif de PCR

De l'eau de qualité biomoléculaire est utilisée comme témoin négatif de PCR.

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.

6.1 Petit équipement de laboratoire

Micropipettes (0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de pailasse, centrifugeuse(s) de microtubes, incubateur de microtubes, cuve électrophorèse et générateur, table UV avec système d'acquisition des images, thermocycleur.

6.2 Thermocycleur de PCR pour PCR conventionnelles

Par exemple : Eppendorf Mastercycler ou Eppendorf Nexus.



6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

Microtubes de 1,5 et 2 ml et pointes à filtre, microtubes 0,2 ml pour PCR.

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Le diagnostic de la loque américaine étant, dans un premier temps, réalisé lors d'un examen bactérioscopique (cf. 1 Objet et domaine d'application), la PCR n'est utilisée que pour confirmer l'identification de l'agent bactérien. De ce fait, les conditions d'acceptation des échantillons ne s'appliquent pas à la présente méthode mais à la méthode « Recherche de la loque américaine du couvain d'abeilles ». Les échantillons issus de la recherche de la loque américaine et transférés pour l'identification de l'espèce *P. larvae* sont constitués de broyats de larves infectées.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le tube contenant l'échantillon issu de la recherche de loque américaine est conservé :

- En réfrigération à environ + 4 °C si l'analyse est réalisée dans la journée suivant la préparation du broyat ;
- En congélation à environ – 20 °C si l'analyse est différée.

7.3 Conservation des échantillons reliquats après analyse

Les échantillons (broyages de larves, ADN extraits) peuvent être conservés (sans limite prédéfinie) au congélateur à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$ à des fins de recherche.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les larves ont été préalablement broyées afin d'effectuer l'examen bactérioscopique. Il est cependant recommandé de centrifuger rapidement l'échantillon pour culotter les débris en suspension afin de favoriser le pipetage des 80 μl de la suspension de larves.

8.2 Extraction de l'ADN génomique

La préparation des réactifs du kit et l'extraction de l'ADN génomique sont réalisées sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (High Pure PCR Template Preparation Kit - Roche Diagnostics – version décembre 2008).

Brièvement, 80 μl de broyat à analyser sont utilisés. A l'étape finale, les ADN sont élués avec 200 μl de tampon d'éluion. Les témoins processus positifs et négatifs sont traités de la même manière en parallèle.



8.3 Amplification de l'ADN cible

8.3.1 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Préparer le mélange réactionnel selon les indications du Tableau 3.
Vortexer brièvement et centrifuger le mélange.

Tableau 3 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 µl)
Mix PCR	H ₂ O	-	-	13,8
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl ₂	50 mM	3 mM	1,5
	dNTP	10 mM	400 µM	1
	Amorce AFB 3	20 µM	400 nM	0,5
	Amorce AFB 4	20 µM	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/µl	1 U / 25 µl	0,2
ADN	-	-	-	5

- Les mix se préparent dans un microtube stérile de 1,5 à 2 mL.
- Les différents composants sont décongelés puis homogénéisés par vortexage.
- Les différents composants sont ajoutés au microtube stérile à l'aide de micropipettes obligatoirement munies de micro-cônes stériles à embout filtre.
- Les deux microtubes contenant les mix sont vortexés avant leur distribution.
- Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 20 µl par microtube.

8.3.2 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

20 µl de mix PCR + 5 µl d'ADN du témoin positif de processus, ou
5 µl du témoin négatif de processus, ou
5 µl du témoin positif de PCR, ou
5 µl du témoin négatif de PCR, ou
5 µl d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 6).

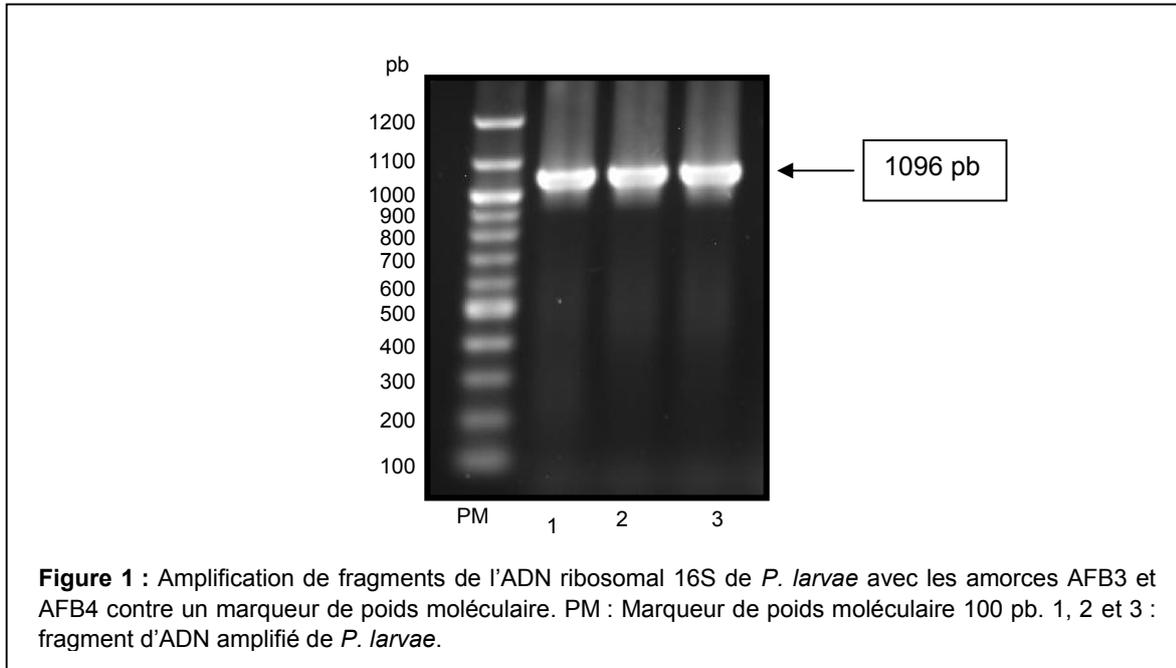
Tableau 6 : Conditions d'amplification

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	55°C	30 sec
	Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	



8.3.3 Visualisation des fragments PCR générés

L'analyse des produits de PCR est réalisée en salle post-PCR. La visualisation des fragments se réalise après la séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose de 1 % suivi d'une coloration à l'aide d'un agent spécifique de l'ADN (exemple bromure d'éthidium).



9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Un résultat d'identification de *P. larvae* par PCR n'est considéré comme validé que si :

- les témoins positifs de processus et de PCR sont positifs,
- les témoins négatifs de processus et de PCR sont négatifs.

9.2 Cas des résultats négatifs

En cas de résultat négatif de l'identification, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait analysé qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR pour l'amplification de la β -actine est alors réalisée afin de mettre en évidence la présence de ce gène spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible (cf. protocole « Contrôle de la présence du gène de la β -actine sur des échantillons d'abeille par PCR »).



9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR β -actine »

9.3.1 Amorces utilisées

Tableau 7 : Séquences des amorces ciblant l'ADN de la β -actine d'*Apis mellifera*

Amorces	Séquence	Taille produit de PCR
A.m-actin-L	5'-AGGAATGGAAGCTTGCGGTA-3	181 pb
A.m-actin-R	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'	

9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)

Le mix réactionnel est réalisé selon les indications du Tableau 8 :

Tableau 8 : Préparation du mélange réactionnel PCR (Mix PCR) pour l'amplification de la β -actine

	Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par réaction (Volume final: 25,0 μ l)
Mix PCR	H ₂ O	-	-	17,55
	Tampon Taq Pol	10 X	1 X	2,5
	MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75
	dNTP	10 mM	200 μ M	0,5
	Amorce A.m-actin-L	20 μ M	400 nM	0,5
	Amorce A.m-actin-R	20 μ M	400 nM	0,5
	Taq Pol	5 U/ μ l	1 U / 25 μ l	0,2
ADN	-	-	-	2,5

Les mix sont distribués dans les microtubes de PCR à raison de 22,5 μ l par microtube.

9.3.3 Préparation des tubes de réaction de PCR

Compléter les tubes de réaction de PCR en ajoutant dans le tube correspondant :

22,5 μ l de mix PCR + 2,5 μ l d'ADN du témoin positif de processus, ou
 2,5 μ l du témoin négatif de processus, ou
 2,5 μ l du témoin positif de PCR, ou
 2,5 μ l du témoin négatif de PCR, ou
 2,5 μ l d'ADN d'échantillon à analyser.

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur. Le programme suivant est lancé (Tableau 9).



Tableau 9 : Conditions d'amplification

Dénaturation de l'ADN		94°C	2 min
PCR (30 cycles)	Dénaturation	94°C	30 sec
	Hybridation des amorces	60°C	30 sec
	Elongation	72°C	15 sec
Elongation finale		72°C	5 min
Conservation des échantillons		10°C	

- Si la présence du gène de la β -actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé.
- Dans le cas contraire, l'extraction d'ADN doit être effectuée de nouveau pour l'échantillon en question.

9.4 Expression des résultats

9.4.1 Résultats, conclusion analytique et interprétation de la PCR

Résultat de la PCR <i>P. larvae</i>	Résultat de la PCR β -actine	Conclusion
Positif	/	Identification de <i>P. larvae</i> positive
Négatif	Positif	Agent pathogène non typé, identification de <i>P. larvae</i> négative
Négatif	Négatif	Echantillon inhibé, pas d'identification possible

/ : Non réalisé

9.5 Conclusion et interprétation du résultat dans le cadre du diagnostic de la loque américaine

La conclusion analytique est portée de la façon suivante :

Résultat de l'examen microscopique	Identification de l'espèce <i>P. larvae</i>	Conclusion analytique
Non détecté	/	Recherche de la loque américaine négative
Détecté	/	Recherche de la loque américaine positive
Ininterprétable	Négative	Recherche de la loque américaine négative
Ininterprétable	Positive	<i>P. larvae</i> , agent de la loque américaine, détecté

/ : Non réalisé



Une interprétation pourra être 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 de l'examen bactérioscopique et de la PCR (cf. Méthode « Recherche de la loque américaine du couvain d'abeille », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.03).

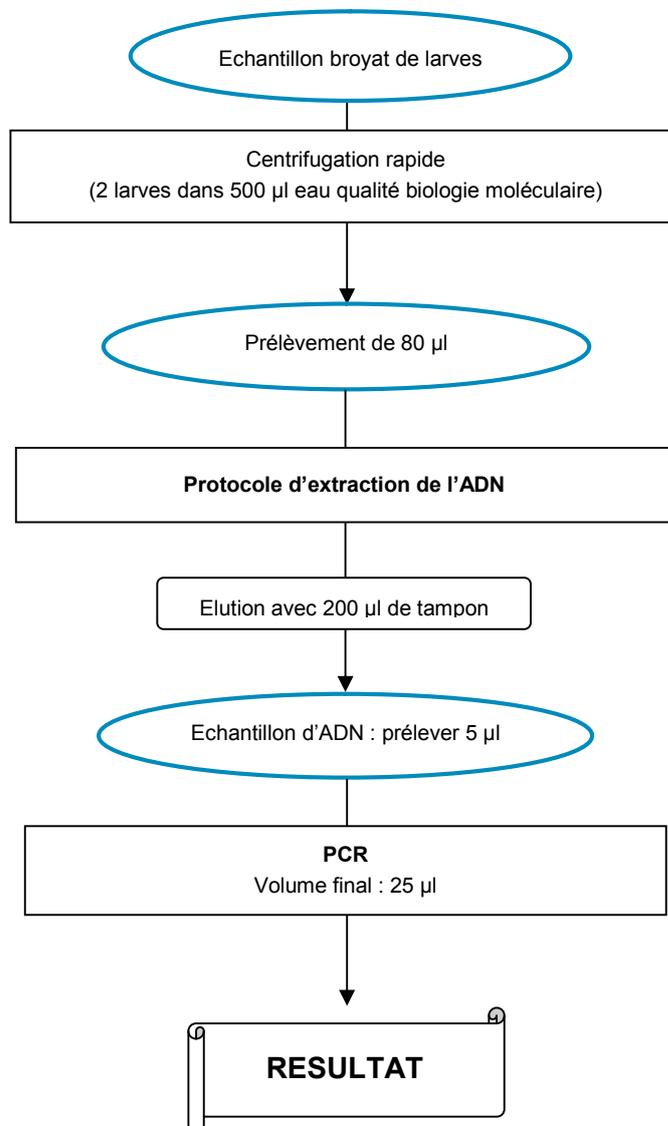
10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critères	Critères de validité attendus	Performances observées
Spécificité analytique	100 %	100 %
Limite de détection PCR	-	<ul style="list-style-type: none"> • ERIC I : 74 copies/réaction • ERIC II : 60 copies/réaction • ERIC III : 93 copies/réaction • ERIC IV : 160 copies/réaction
Limite de détection de la méthode	-	Témoin processus dilué 100 fois
Sensibilité diagnostique	≥ 90 %	100 %
Spécificité diagnostique	-	La méthode PCR étant mise en œuvre uniquement sur les échantillons positifs en microscopie, ce critère n'a pas été évalué.



Annexe

Synoptique de la méthode d'identification de *P. larvae* dans un broyat de larves





Bibliographie

1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Dobbelaere, W., de Graaf, D.C., Peeters, J.E. and Jacobs, F.J. (2001) Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 32, 363–370.
3. Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Loque américaine des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.2, pp.