

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.39 - Version 2

Septembre 2019

Recherche et quantification des virus de la paralysie aiguë (ABPV), de la cellule royale noire (BQCV), des ailes déformées (DWV- A et DWV-B) et du couvain sacciforme (SBV) par RT-PCR en temps réel sur échantillons d'abeilles

Anses Sophia Antipolis

Laboratoire national de référence Santé des abeilles

**Laboratoire européen de référence pour la santé de
l'abeille**





Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
v0	Création	Janvier 2017	Version initiale mise en consultation.
v1	Majeure	Mars 2018	Prise en compte des remarques formulées lors de la mise en consultation et description de la PCR en temps réel de recherche et quantification du virus DWV-B.
V2	Majeure	Septembre 2019	Echantillonnage étendu de 10 abeilles symptomatiques à 50 abeilles sans signe clinique ; interprétation des charges virales au regard de seuils séparant les infections sub-cliniques de cliniques.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par : l'Unité de pathologie de l'abeille

Anses – Sophia Antipolis

Laboratoire National de Référence Santé des Abeilles

Adresse : Les Templiers - 105 route des Chappes - CS 20111 - 06902 Sophia Antipolis Cedex

Contact : lnr.abeille@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	7
Avertissements et précautions de sécurité	7
1 Objet et domaine d'application ^{1,2}	8
2 Documents de référence	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
5 Réactifs	9
5.1 Eau.....	10
5.2 Tampon phosphate.....	10
5.3 Kit de purification des ARN viraux.....	10
5.4 Amorces aléatoires.....	10
5.5 Transcriptase inverse	10
5.6 Inhibiteur de nucléase.....	10
5.7 Désoxyribonucléotides triphosphates	10
5.8 Réactifs de PCR temps-réel	10
5.9 Amorces et sondes.....	10
5.10 Contrôle interne positif exogène	11
5.11 Gammes de référence	11
5.12 Contrôle positif de processus.....	12
6 Appareillage et matériels	12
6.1 Equipement de laboratoire.....	12
6.2 Broyeur de tissus.....	13
6.2.1 Trois types d'équipement de broyage de 10 abeilles symptomatiques peuvent être utilisés :	13
6.2.2 Equipement de broyage de 50 abeilles sans signe clinique :	13
6.3 Thermocycleur de PCR en temps réel	13
6.4 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)	13
7 Échantillons	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons ⁶	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse	14

8	Mode opératoire	14
8.1	Broyage des abeilles	14
8.1.1	Broyage manuel de 10 abeilles.....	14
8.1.2	Broyage mécanique de 10 abeilles à l'aide du Tissue Lyser (Qiagen)	15
8.1.3	Broyage mécanique de 10 abeilles à l'Ultra Turrax	15
8.1.4	Broyage mécanique de 50 abeilles au Waring Blendor	15
8.2	Clarification par centrifugation	15
8.3	Témoins processus.....	16
8.3.1	Témoin positif	16
8.3.2	Témoin négatif.....	16
8.4	Purification des ARN totaux ⁷	16
8.5	Transcription inverse des ARN totaux.....	16
8.5.1	Hybridation des amorces aléatoires	16
8.5.2	Synthèse des ADNc.....	17
8.6	Réaction de PCR en temps-réel	17
8.6.1	Préparation du mélange de PCR en temps-réel (Mix qPCR) ^{8,9}	17
8.6.2	Préparation de la plaque de réaction de PCR en temps-réel.....	18
8.7	Conservation des échantillons après analyse	18
9	Résultats	18
9.1	Conformité de l'essai	18
9.1.1	Courbe de référence :	18
9.1.2	Témoin positif de processus	19
9.1.3	Témoin négatifs de processus	19
9.1.4	Contrôle positif interne (IPC) ¹⁰	19
9.2	Calculs et expression des résultats.....	19
9.2.1	Expression d'un résultats conforme	20
9.2.2	Expression d'un résultat issu d'une réaction inhibée	21
9.3	Interprétation des résultats	21
	Annexe 1 : Synoptique de la méthode de détection et quantification des virus ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B et SBV à partir d'un échantillon d'abeilles	22
	Annexe 2 : Caractéristiques de performance des méthodes	23
	Bibliographie	24



Table des tableaux

TABLEAU 1 : SEQUENCES DES AMORCES ET DES SONDAS	11
TABLEAU 2 : REFERENCES DES PLASMIDES RECOMBINANTS, UTILISES POUR ETABLIR LES COURBES STANDARDS DES QPCR EN FONCTION DE VIRUS CIBLES	12
TABLEAU 3 : SIGNES CLINIQUES ET MORTALITES DES INFECTIONS PAR LES VIRUS ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B ET SBV CHEZ L'ABEILLE MELLIFERE (DE MIRANDA ET AL., 2013)	14
TABLEAU 4 : REACTION D'HYBRIDATION DES AMORCES ALEATOIRES	16
TABLEAU 5 : REACTION DE SYNTHESE DES ADNC	17
TABLEAU 6 : REACTIONS DE PCR EN TEMPS-REEL EN FONCTION DES VIRUS CIBLES	17
TABLEAU 7 : CONDITIONS D'AMPLIFICATION	18
TABLEAU 8 : EXEMPLE DE CONVERSION DU RESULTAT INSTRUMENTAL EN NOMBRE DE COPIES DE GENOME VIRAL PAR ABEILLE ADULTES ^{11, 12}	20
TABLEAU 9 : EXPRESSION DU RESULTAT ^{13, 14}	20
TABLEAU 10 : INTERPRETATION DES RESULTATS	21

Introduction

L'abeille mellifère (*Apis mellifera*) est fréquemment infectée par des virus de l'ordre des *Picornavirales*, qui contribuent à l'affaiblissement des colonies. Les principales maladies liées à ces virus sont : la maladie des ailes déformées associée aux virus des ailes déformées (Deformed Wing Virus de type A [DWV-A] et de type B [DWV-B] - virus de la famille *Iflaviridae*, genre *Iflavirus*), la maladie du couvain sacciforme associée au virus du couvain sacciforme (Sacbrood Virus [SBV] - virus de la famille *Iflaviridae*, genre *Iflavirus*) - la paralysie aigue associée au virus de la paralysie aigue (Acute Bee Paralysis Virus [ABPV] - virus de la famille *Dicistroviridae* du genre *Aparavirus*), et la maladie de la cellule royale noire associée au virus de la cellule royale noire (Black Queen Cell Virus - BQCV - virus de la famille *Dicistroviridae*, genre *Cripavirus*).

Les signes cliniques sont clairement décrits pour la maladie du couvain sacciforme et des ailes déformées. Pour les autres, ils sont plus frustes. De plus, l'ensemble de ces virus provoque également des infections sub-cliniques. Une charge virale élevée pourrait être un indicateur pertinent de rupture d'un équilibre entre l'hôte (l'abeille) et son parasite (le virus). Estimer la charge virale par abeille apparait alors comme un élément important pour identifier les causes des troubles observés sur le terrain (Schurr et al.,2019).

La méthode de RT-PCR en temps-réel (qPCR) permet de quantifier les copies de génomes viraux dans l'abeille. De telles méthodes ont soit été décrites dans la littérature scientifique (qPCR ABPV et BQCV) soit été développées à l'Anses de Sophia Antipolis (qPCR SBV, DWV-A et DWV-B).

Ce protocole décrit un processus harmonisé pour la détection et la quantification de ces virus.

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^{1, 2}

Ce document décrit la méthode officielle de détection et de quantification des virus ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B et SBV par RT-PCR en temps réel (qPCR) à partir d'un échantillon d'abeilles mellifère. Ce diagnostic est réalisé en France par le Laboratoire National de Référence sur la santé des abeilles (Anses Sophia Antipolis).

Le document est aussi à destination des laboratoires agréés par le ministère en charge de l'agriculture, qui souhaiteraient adopter cette méthode pour le diagnostic de laboratoire des maladies virales de l'abeille.

Note 1 : Le protocole peut être adapté à la recherche et à la quantification des virus sur larves. Toutefois, les méthodes n'ayant pas été validées sur cette matrice, l'exactitude des résultats n'a pas été démontrée.

Note 2 : Ce document décrit une nouvelle réaction de qPCR ciblant le variant DWV-B (aussi dénommé Varroa destructor virus-1; Martin et al., 2012) voire des virus issus de recombinaisons génétiques entre les DWV-A et DWV-B (Dalmon et al., 2017). Bien que l'incertitude de mesure de la méthode soit supérieure à $1,0 \log_{10}$ copies/abeille (maximum 1,2), elle est mise en œuvre afin de définir l'étiologie virale de cas nouveaux d'abeilles aux ailes déformées, non associés au DWV-A. Ce choix est également guidé par la fréquence de plus en plus importante des troubles associés à ces nouveaux variants.

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 U 47-600 parties 1 et 2. Février 2015. Méthode d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne)

3 Termes, sigles et définitions

Les termes, sigles et définitions décrits dans la norme française NF U 47-600 partie 1 (AFNOR, 2015) s'appliquent au présent document.

4 Principe de la méthode

Les échantillons d'abeilles sont broyés et clarifiés afin d'obtenir une suspension homogène préalablement à l'extraction des acides nucléiques. Les ARN sont transcrits en ADN complémentaires (ADNc) et les transcrits des génomes viraux sont dosés par cinq réactions différentes de qPCR (Annexe 1).

L'usage d'un contrôle interne non cible dans chaque réaction de qPCR permet de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs et d'écartier de l'interprétation toute réaction faussement négative.

Deux méthodes publiées ont été adoptées par le laboratoire pour permettre de quantifier les virus de l'abeille mellifère :

- La qPCR BQCV a été décrite en 2006 par Chantawannakul et ses collaborateurs. Elle cible la séquence codant pour la partie C-terminale de la polyprotéine virale.
- La qPCR ABPV a été décrite en 2012 par Jamnikar Ciglencéki et Toplak. Elle cible le gène de la protéine de capsid.

Pour la quantification des virus SBV et DWV, le laboratoire a développé de nouvelles amorces et sondes de qPCR.

- La qPCR SBV a été publiée (Blanchard *et al.*, 2014). Elle cible la séquence codant pour la partie N-terminale de la poly-protéine virale.
- La cible des qPCR DWV-A et DWV-B est la région codante de la poly-protéine clivée en la protéine VP3 (Schurr *et al.*, 2019).

Ce document décrit également les matériaux utilisés pour élaborer les courbes de référence ainsi que les traceurs qui servent à évaluer l'incertitude de mesure.

La détection et la quantification des virus par qPCR à partir des échantillons d'abeilles se décomposent en six étapes :

1. Préparation des broyats d'abeilles
2. Purification des ARN totaux à partir des broyats d'abeilles
3. Transcription inverse des ARN (synthèse d'ADNc)
4. Amplification par PCR en temps réel de la séquence cible³
5. Validation de l'essai
6. Interprétation des résultats

Note 3 : La recherche et la quantification des virus des ailes déformées doit **systematiquement** impliquer la mise en œuvre, séparée mais en parallèle, des deux PCR ciblant le DWV-A et le DWV-B.

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, conservé au réfrigérateur (5°C +/- 3°C).

5.2 Tampon phosphate

Tampon phosphate 0,01 M pH 6,8, conservé a une température de 5°C (+/- 3°C).

5.3 Kit de purification des ARN viraux

High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics). La préparation des réactifs du kit est réalisée sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (Kit High Pure Viral RNA - Version Décembre 2008). Les réactifs sont conservés selon les recommandations du fabricant.

5.4 Amorces aléatoires

Random Hexamer (pdN6) (Invitrogen) (solution de travail : 0,3 µg/µl in Tris 10 mM - EDTA 1 mM, pH 8,0). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.5 Transcriptase inverse

Super Script II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.6 Inhibiteur de nucléase

RNaseOUT - Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.7 Désoxyribonucléotides triphosphates

dNTP 10 mM mix – PCR Grade (Invitrogen). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.8 Réactifs de PCR temps-réel

TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems ref 4304437). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.9 Amorces et sondes

Les séquences des amorces et des sondes sont décrites dans le Tableau 1. Les amorces en solution de travail à 20 µM et les sondes en solution de travail à 50 µM sont conservées au congélateur à une température ≤ -16°C.

Tableau 1 : Séquences des amorces et des sondes

RT-qPCR	Amorces et sonde	Séquence
ABPV	ABPV1	CAT ATT GGC GAG CCA CTA TG
	ABPVRn	CTA CCA GGT TCA AAG AAA ATT TC
	ABPVnTaq	(6-Fam) ATA GTT AAA ACA GCT TTT CAC ACT GG (Tamra)*
BQCV	BQCV8195F	GGT GCG GGA GAT GAT ATG GA
	BQCV8265R	GCC GTC TGA GAT GCA TGA ATA C
	BQCV8217T	(6-Fam) TTT CCA TCT TTA TCG GTA CGC CGC C (Tamra)*
DWV-A	F-DWV_4250	GCG GCT AAG ATT GTA AAT TG
	R-DWV_4321	GTG ACT AGC ATA ACC ATG ATT A
	Pr-DWV_4293	(6-Fam) CCT TGA CCA GTA GAC ACA GCA TC (Tamra)*
DWV-B	F-VDV1_4218	GGT CTG AAG CGA AAA TAG
	R-VDV1_4290	CTA GCA TAT CCA TGA TTA TAA AC
	Pr-VDV1_4266	(6-Fam) CCT TGT CCA GTA GAT ACA GCA TCA CA (Tamra)*
SBV	SBV-F434	AAC GTC CAC TAC ACC GAA ATG TC
	SBV-R503	ACA CTG CGC GTC TAA CAT TCC
	SBV-P460	(6-Fam) TGA TGA GAG TGG ACG AAG A (MGB)

* Le marquage Tamra de l'extrémité 3' de la sonde peut être remplacé par un marquage non fluorescent, absorbant l'émission de fluorescence du marquage Fam en 5'.

5.10 Contrôle interne positif exogène

TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems ref 4308323 - VIC™ Probe). Le réactif est conservé selon les recommandations du fabricant.

5.11 Gammes de référence

Dilutions sériées de raison 10 du plasmide recombinant cible de la qPCR de 8,0 log₁₀ copies/5µl (G8) à 2,0 log₁₀ copies/5µl (G2). Le Tableau 2 liste les plasmides recombinants, utilisés en fonction des cibles virales⁴.

Les plasmides sont conservés à une température ≤ -16°C. Une gamme plasmidique ne doit pas subir plus de 10 cycles de congélation/décongélation.



Tableau 2 : Références des plasmides recombinants, utilisés pour établir les courbes standards des qPCR en fonction de virus ciblés

Virus	Plasmide	Conditions d'usage
ABPV	pB2	Préparer des dilutions sériées du plasmide en tampon TE de 2,0 log ₁₀ copies/5µl (G2) à 8,0 log ₁₀ copies/5µl (G8)
BQCV	pNC1-4	
DWV-A	pC1	
DWV-B	pFab1	
SBV	pD1	

Note 4 : Les plasmides sont élaborés, dosés et distribués par le LNR. Pour toute demande de ces réactifs, contacter le LNR à l'adresse email : lnr.abeille@anses.fr

5.12 Contrôle positif de processus

Dilution dans du broyat d'abeilles indemnes, d'un broyat d'abeilles naturellement infectées par le virus cible, telle que la charge virale soit environ 10 à 100 fois supérieure à la limite de détection de la méthode⁵. La suspension est aliquotée sous 250 µl et stockée au surgélateur à une température ≤ - 65°C.

Note 5 : Les témoins positifs de processus ne sont pas fournis par le LNR, ils doivent être élaborés par les laboratoires qui souhaiteraient mettre en œuvre les méthodes décrites dans ce document. Toutefois, le LNR apporte son soutien aux laboratoires dans l'adoption des méthodes et il peut fournir des recommandations pour l'élaboration des témoins.

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 Equipement de laboratoire

Micropipettes (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de paillasse, centrifugeuse(s) de microtubes et de microplaques, incubateur de microtubes, réfrigérateurs, congélateurs et surgélateurs, hotte filtrante, poste de sécurité microbiologique.

6.2 Broyeur de tissus

6.2.1 Trois types d'équipement de broyage de 10 abeilles symptomatiques peuvent être utilisés :

- broyeur de tissus en tube de verre à piston (par exemple de type Tenbroeck, de 15 ml),
- broyeur de tissus mécanique avec bols en acier de 25 ml contenant 3 billes d'acier de 5 à 8 mm de diamètre (MM 301 ou MM 400 - Qiagen),
- broyeur mécanique IKA Ultra Turrax Tube Drive (modèle : UT TD) avec des tubes à couteaux de 20 ml stériles, jetables (modèle : IKA Tube DT-20M - Nr. 3700100).

6.2.2 Equipement de broyage de 50 abeilles sans signe clinique :

- broyeur mécanique de type Waring Blendor (WAR18011BU - VWR) avec tête coupante équipée d'un mini-bécher en acier inoxydable de 250 ml et d'un couvercle (431-9133 - VWR).

6.3 Thermocycleur de PCR en temps réel

ABI Prism 7500 Real Time PCR ou Quant Studio 5 (Applied Biosystems).

6.4 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

Microtubes de 1,5 et 2 ml, tubes de 50 ml, pointes à filtre et microplaques d'essai de PCR en temps réel (Optical 96-well reaction plate and Optical plate sealer film - Applied Biosystems).

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons⁶

Le demandeur transmet au laboratoire au moins 10 abeilles symptomatiques ou mortes (permettant de détecter une prévalence minimale de l'infection virale de 26% avec 95% de confiance) ou 50 abeilles sans signes cliniques (permettant de détecter une prévalence minimale de l'infection virale de 6% avec 95% de confiance). Les échantillons doivent parvenir au laboratoire dans des conditions les préservant de la décomposition (enveloppe en papier évitant la condensation, envoi sous couvert du froid et/ou rapidité de transport). L'échantillon d'abeilles issu d'une colonie présentant des signes d'affaiblissement doit être accompagné d'une fiche de commémoratifs décrivant les signes cliniques observés. Les signes cliniques pouvant être associés aux infections virales sont décrits dans le Tableau 3.

Note 6 : L'analyse de prélèvement d'abeilles en début de décomposition peut permettre de détecter un génome viral par les présentes méthodes. Toutefois, la dégradation des ARN viraux peut conduire à une réduction apparente de la charge virale. L'exactitude des résultats n'est donc pas démontrée.



7.2 Conservation des échantillons avant analyse

L'échantillon d'abeilles peut être conservé dans son enveloppe à une température $\leq -16^{\circ}\text{C}$, pendant 2 mois.

Tableau 3 : Signes cliniques et mortalités des infections par les virus ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B et SBV chez l'abeille mellifère (de Miranda et al., 2013)

ABPV	BQCV	DWV-A et DWV-B	SBV
Absence de signe clinique Mortalité d'abeilles et de couvain particulièrement dans des colonies infestées par varroa	Cellules royales operculées aux parois noirâtres, contenant une pré-nymphé morte Couvain en mosaïque, présentant des cellules aux opercules noirâtres, contenant des larves mortes Mortalité de larves et de pré-nymphes de reines	Nymphes et abeilles aux ailes déformées ou atrophiées Mortalité de nymphes et d'abeilles particulièrement dans des colonies infestées par varroa	Couvain en mosaïque avec parfois opercules troués Larves sous opercules en position anormale, de couleur jaune pâle à marron foncé formant un saccule (le tégument de la larve forme un sac contenant un liquide jaune à marron) En fin d'évolution, les larves mortes forment une écaille marron foncé en forme de barque Mortalité de couvain

8 Mode opératoire

8.1 Broyage des abeilles

Deux types de broyage peuvent être réalisés pour homogénéiser 10 abeilles symptomatiques. Soit un broyage manuel utilisant des broyeurs de tissus en tube de verre (avec piston), soit un broyage mécanique utilisant des bols en acier équipés de billes d'acier, ou des tubes en plastiques stériles, à couteaux, jetables.

Pour le broyage de 50 abeilles sans signe clinique, utiliser un broyeur mécanique de type Waring Blender.

8.1.1 Broyage manuel de 10 abeilles

Il est recommandé de réaliser le broyage sous un poste de sécurité microbiologique (PSM).

- Placer le tube du broyeur dans la glace et introduire 2,5 ml de tampon phosphate froid pour le rincer.
- Vider le tube de sa solution de rinçage et introduire 8 à 10 abeilles à l'aide d'une pince stérile et compléter avec 8 à 10 ml de Tampon phosphate conservé au réfrigérateur ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), selon la proportion de 1 abeille pour 1 ml de tampon.
- Broyer les abeilles en effectuant une vingtaine d'allers-retours et de rotations du piston. Bien maintenir le broyeur dans la glace.

8.1.2 Broyage mécanique de 10 abeilles à l'aide du Tissue Lyser (Qiagen)

- Sous un PSM, placer les bols stockés au réfrigérateur (5°C +/-3°C) contenant les billes dans la glace et introduire 8 à 10 abeilles et 8 à 10 ml de Tampon phosphate réfrigéré (1 abeille = 1 ml de tampon).
- Insérer les bols fermés entre les mâchoires du broyeur, serrer et verrouiller.
- Déclencher 3 mn à 30 Hz pour un échantillon d'abeilles et 1 mn à 30Hz pour des larves.

8.1.3 Broyage mécanique de 10 abeilles à l'Ultra Turrax

- Sortir les tubes DT-20M de leur sachet (usage unique), les identifier et les installer dans le bac à glace placé sous un PSM.
- Introduire 8 à 10 abeilles et 8 à 10 ml de tampon phosphate réfrigéré (1 abeille = 1 ml de tampon).
- Placer le tube sur l'Ultra Turrax (fermeture à baïonnette).
- Déclencher 1 min en position 9.
- A l'issue du cycle, replacer le tube dans la glace quelques minutes afin de décanter le broyat.

8.1.4 Broyage mécanique de 50 abeilles au Waring Blendor

- Placer sous un PSM les bols en acier inoxydable dans la glace.
- Introduire 50 abeilles et 50 ml de tampon phosphate réfrigéré (1 abeille = 1 ml de tampon) et refermer avec le couvercle.
- Placer le bol sur le moteur.
- Déclencher 20 secondes à vitesse lente (18.000 tours/min).
- A l'issue du cycle, replacer le bol dans la glace quelques minutes afin de décanter le broyat.

8.2 Clarification par centrifugation

- Sous poste de sécurité microbiologique (PSM), transvaser la suspension de broyage dans des microtubes. Maintenir les microtubes dans la glace.
- Centrifuger les microtubes de broyat pendant 10 minutes à 8,000 x g en microcentrifugeuse réfrigérée à 4°C.
- Transvaser sous le PSM le surnageant dans un premier microtube.
- Centrifuger 10 minutes à 8,000 x g en microcentrifugeuse réfrigérée à 4°C.
- Transvaser sous le PSM le surnageant dans le second microtube (clarifiat).
- Si l'extraction des ARN viraux est réalisée dans la même journée, conserver les clarifiats sur glace à 5°C (+/- 3°C), sinon garder les clarifiats à une température ≤ -65°C jusqu'à l'extraction des ARN.



Les broyeurs réutilisables (tube en verre et pistons ou bol en acier inoxydable) sont lavés avec une solution savonneuse, désinfectés avec 1% d'hypochlorite de sodium (pendant 2 à 10 min), rincés puis stérilisés par autoclavage.

8.3 Témoins processus

8.3.1 Témoin positif

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction, de la RT et de la qPCR. Pour chaque série d'extraction, un microtube correspondant au témoin positif du virus ciblé par la méthode est ajouté à la série.

8.3.2 Témoin négatif

Le tampon phosphate de broyage est utilisé comme témoin négatif de processus.

8.4 Purification des ARN totaux⁷

La purification des ARN viraux est réalisée sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (Kit High Pure Viral RNA - Version Décembre 2008).

A l'étape finale, les ARN sont élués avec 50 µl de tampon d'éluion.

Les ARN sont maintenus dans la glace dans l'attente d'être rapidement analysés.

Note 7 : Afin de réduire le risque de contamination inter-échantillons, il est recommandé de centrifuger brièvement les tubes avant chaque ouverture (réalisée avec précaution et sans contact avec l'intérieur des bouchons) et avant la phase d'éluion, soit de nettoyer le rotor (exemple : avec une solution d'ammonium quaternaire puis sécher) soit de le changer par un rotor propre.

8.5 Transcription inverse des ARN totaux

8.5.1 Hybridation des amorces aléatoires

Préparer le mélange réactionnel comme indiqué dans le Tableau 4. Incuber le mélange 2 min à 70°C puis le réfrigérer 5 min à 4°C.

Tableau 4 : Réaction d'hybridation des amorces aléatoires

Réactifs	Volume par réaction (Volume final : 13,5 µl)
pdN6 (0,3 µg/µl)	1,0 µl
ARN purifié	12,5 µl

8.5.2 Synthèse des ADNc

La synthèse des ADNc est réalisée dans les conditions décrites dans le Tableau 5. Le mélange réactionnel est incubé 60 min à 42°C puis la réaction est stoppée (5 min à 95°C).

Tableau 5 : Réaction de synthèse des ADNc

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction (volume final : 20,0 µl)
First Strand Buffer (5 X)	1 X	4,0
dNTP (10 mM)	500 µM	1,0
RNaseOUT (40 U/µl)	20 U	0,5
Super Script II RT (200 U/µl)	200 U	1,0
ARN/pdN6 (hybridé)	-	13,5

8.6 Réaction de PCR en temps-réel

8.6.1 Préparation du mélange de PCR en temps-réel (Mix qPCR) ^{8,9}

Préparer le mélange réactionnel selon les indications du Tableau 6. Agiter brièvement et centrifuger le mélange avant de le protéger de la lumière.

Tableau 6 : Réactions de PCR en temps-réel en fonction des virus ciblés

Réactif	ABPV		BQCV etSBV		DWV-A		DWV-B	
	Concent. finale	Vol. par réaction (25µl)	Concent. finale	Vol. par réaction (25 µl)	Concent. finale	Vol. par réaction (25 µl)	Concent. finale	Vol. par réaction (25 µl)
H ₂ O	-	2,45	-	3,6	-	3,57	-	4,3
qPCR MIX (2X)	1X	12,5	1X	12,5	1X	12,5	1X	12,5
Amorce sens (20 µM)	800 nM	1,0	320 nM	0,4	350 nM	0,44	1200 nM	1,5
Amorce anti-sens (20 µM)	800 nM	1,0	320 nM	0,4	350 nM	0,44	1200 nM	1,5
Sonde (50 µM)	100 nM	0,05	200 nM	0,1	100 nM	0,05	400 nM	0,2
Int. Pos. Control MIX (10X)	1X	2,5	1X	2,5	1X	2,5	-	0
Int. Pos. Control DNA (50X)	1X	0,5	1X	0,5	1X	0,5	-	0
ADNc	-	5,0	-	5,0	-	5,0	-	5,0

Note 8 : Les ADNc, les échantillons de la gamme standard et les témoins processus négatifs et positifs sont analysés sans répétition.



Note 9 : Ce protocole utilise un contrôle interne, positif, exogène, co-amplifié lors des réactions de PCR ciblant l'ABPV, le BQCV, le DWV-A et le SBV. La faible efficacité de la PCR ciblant le DWV-B ne permet pas de co-amplifier ce contrôle interne ; en conséquence, il n'est pas ajouté au mélange réactionnel de cette PCR DWV-B.

8.6.2 Préparation de la plaque de réaction de PCR en temps-réel

Agiter brièvement et centrifuger tous les échantillons puis les conserver dans la glace. Compléter la microplaque de PCR en temps-réel en ajoutant dans les puits correspondants :

- 20 µl de mix qPCR dans chaque puits,
- 5 µl de chaque échantillon de la gamme standard (G2 to G8),
- 5 µl d'ADNc du témoin positif de processus,
- 5 µl du témoin négatif de processus,
- 5 µl d'ADNc d'échantillon.

Seller la plaque et la centrifuger brièvement à $800 \times g$.

Placer la plaque dans le thermocycleur et lancer le cycle (Tableau 7).

Tableau 7 : Conditions d'amplification

Etape		Incubation
Uracyl N-glycosylase		50°C - 2 min
Activation de la polymérase		95°C - 10 min
PCR (40 cycles)	Dénaturation	95°C - 15 sec
	Hybridation/Polymérisation	60°C - 1 min

8.7 Conservation des échantillons après analyse

Les échantillons (broyats d'abeilles, clarifiés, et ADNc) peuvent être conservés (sans limite prédéfinie) au surgélateur à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

Les ARN purifiés peuvent être conservés 1 mois au surgélateur à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.

9 Résultats

9.1 Conformité de l'essai

9.1.1 Courbe de référence :

Reporter sur la feuille de paillasse les caractéristiques de la courbe standard :

- la valeur du cycle seuil sélectionné à partir des points de la gamme (Threshold),
- la pente (Slope) de la droite de régression qui doit être comprise entre -2,92 et -3,92,
- la valeur de l'intercept (Y-Inter), qui est la valeur de C_T calculée pour 1 copie,
- la valeur de R^2 (coefficient de corrélation) qui doit être supérieure à 0,97.

9.1.2 Témoin positif de processus

Ce contrôle positif permet de suivre la fidélité intermédiaire de la méthode.

Reporter sur une carte de contrôle (exemple : carte de Shewhart) la valeur moyenne calculée pour l'essai (copies de génome par réaction).

Vérifier que le résultat ne dépasse pas les limites préalablement fixées pour considérer l'essai comme validé. Le seuil d'alerte (3 fois l'écart-type de fidélité) doit être inférieur ou égal à +/- 1,0 \log_{10} .

Calculer l'incertitude de mesure (U) par exemple en utilisant l'écart-type de fidélité intermédiaire (S_{FI}) défini avec la carte de contrôle selon la formule : $U = 2 S_{FI}$.

9.1.3 Témoin négatifs de processus

Vérifier qu'aucune amplification n'a été générée dans les témoins d'extraction processus.

- Si un témoin négatif de processus est trouvé positif mais avec une charge virale mesurée, inférieure à la limite de détection de la méthode ($LD_{METHODE}$), refaire l'extraction des ARN à partir des échantillons positifs présentant une valeur inférieure à la limite de détection de la méthode.
- Dans le cas de témoins négatifs de processus fortement contaminés ($\geq LD_{METHODE}$), l'extraction des ARN doit être refaite après décontamination complète des zones de travail et notamment de la centrifugeuse.

9.1.4 Contrôle positif interne (IPC)¹⁰

Vérifier que les résultats de C_T obtenus avec la sonde IPC (C_T IPC) sont inférieurs à 35 (généralement de l'ordre de 28), pour les échantillons de statut inconnu, négatifs ou faiblement positifs en virus :

- Dans les cas d'échantillons fortement positifs en ARN viral, il y a compétition entre les deux cibles en faveur de la cible majoritaire (d'où des valeurs de C_T IPC > 35 voire indéterminées) mais l'essai reste conforme.
- Dans le cas d'un C_T IPC indéterminé ou > 35 pour un échantillon de statut inconnu, négatif ou à C_T virus > 28 (présence d'inhibiteurs de PCR), refaire l'analyse en diluant l'échantillon au 1/10 (voire au 1/100). Lors de cette seconde analyse, la valeur de C_T IPC doit être < 35. Dans le cas contraire, refaire l'essai pour cet échantillon depuis l'extraction des ARN.

Note 10 : Pour la PCR ciblant le DWV-B qui ne comporte pas de contrôle positif interne, l'interprétation repose sur celle faite pour la PCR DWV-A, réalisée systématiquement en parallèle.

9.2 Calculs et expression des résultats

Les C_T calculés pour chaque échantillon sont confrontés à la courbe standard afin de définir le nombre de séquences cibles par réaction d'amplification. La valeur est ensuite utilisée pour calculer le nombre de copies de génome viral par abeille en tenant compte des prises d'essai lors de l'ensemble du processus analytique et du biais éventuel de la méthode (Tableau 8).


 Tableau 8 : Exemple de conversion du résultat instrumental en nombre de copies de génome viral par abeille adultes^{11, 12}

Virus	Résultat instrumental (log ₁₀ par 5 µl)	Facteur de conversion	Charge observée (log ₁₀ par abeille)	Correction de biais	Résultat final corrigé (log ₁₀ copies/abeille)
ABPV	3,0	+1,9	4,9	-0,4	4,5*
BQCV	3,0	+1,9	4,9	-0,2	4,7*
DWV-A	3,0	+1,9	4,9	0,0	4,9
DWV-B	3,0	+1,9	4,9	+0,95	5,85*
SBV	3,0	+1,9	4,9	+0,4	5,3*

* : Le rapport final doit indiquer que le résultat a été corrigé du biais systématique de la méthode

9.2.1 Expression d'un résultats conforme

L'expression analytique du résultat se fait selon le Tableau 9 en fonction de la limite d'exactitude de la méthode (LQ_{METHODE} et Limite supérieure du domaine d'exactitude, décrites en Annexe 2).

Note 11 : Il est recommandé de transformer les résultats de PCR quantitative en log₁₀. Les valeurs sont indiquées avec un chiffre significatif après la virgule.

Note 12 : La valeur du biais est intrinsèque à la méthode décrite dans ce mode opératoire. Cette erreur systématique n'est pas maîtrisable ; aussi ce biais doit être corrigé par tous les laboratoires mettant en œuvre la méthode.

 Tableau 9 : Expression du résultat^{13, 14}

Résultat final	Expression qualitative	Expression quantitative (log ₁₀ copies/abeille)
« Non détecté »	Non détecté	0,0*
< LQ _{METHODE}	Détecté, non quantifiable	<LQ _{METHODE}
≥ LQ _{METHODE}	Détecté	x
> Limite supérieure du domaine d'exactitude	Détecté	>10

* La valeur 0,0 correspond à un résultat instrumental « non détecté » ou à un signal d'amplification non caractéristique.

Note 13 : Pour faciliter la lecture des résultats par le demandeur, les valeurs logarithmiques (en log₁₀) peuvent être retransformées en valeurs algébriques.

Note 14 : Le rapport final peut indiquer que le résultat a été corrigé du biais systématique de la méthode, par exemple : « **Remarque : la charge virale mesurée a été corrigée du biais systématique de la méthode.** ».

9.2.2 Expression d'un résultat issu d'une réaction inhibée

Dans le cas d'une réaction inhibée, indiquer en commentaire :

- « **Echantillon ayant présenté une inhibition de PCR, levée par la dilution au 1/10 (ou au 1/100) de l'extrait d'ARN** » ou
- « **Echantillon présentant une inhibition de PCR** » si l'inhibition persiste.

L'expression chiffrée du résultat est majorée par le facteur de dilution (+1,0 ou +2,0 log₁₀ copies/abeille).

Pour un résultat positif < LQ_{METHODE} + 1,0 (ou < LQ_{METHODE} + 2,0 en fonction de la dilution appliquée), l'expression est : « **Détecté, non quantifiable** ».

Un résultat négatif après levée de l'inhibition par dilution de l'échantillon est rendu comme « **Ininterprétable** ». En effet, l'absence de détection pourrait être associée à la diminution de la sensibilité de la méthode d'analyse d'un échantillon dilué ou à un problème plus global de corruption de l'échantillon avec dégradation de la cible d'amplification.

9.3 Interprétation des résultats

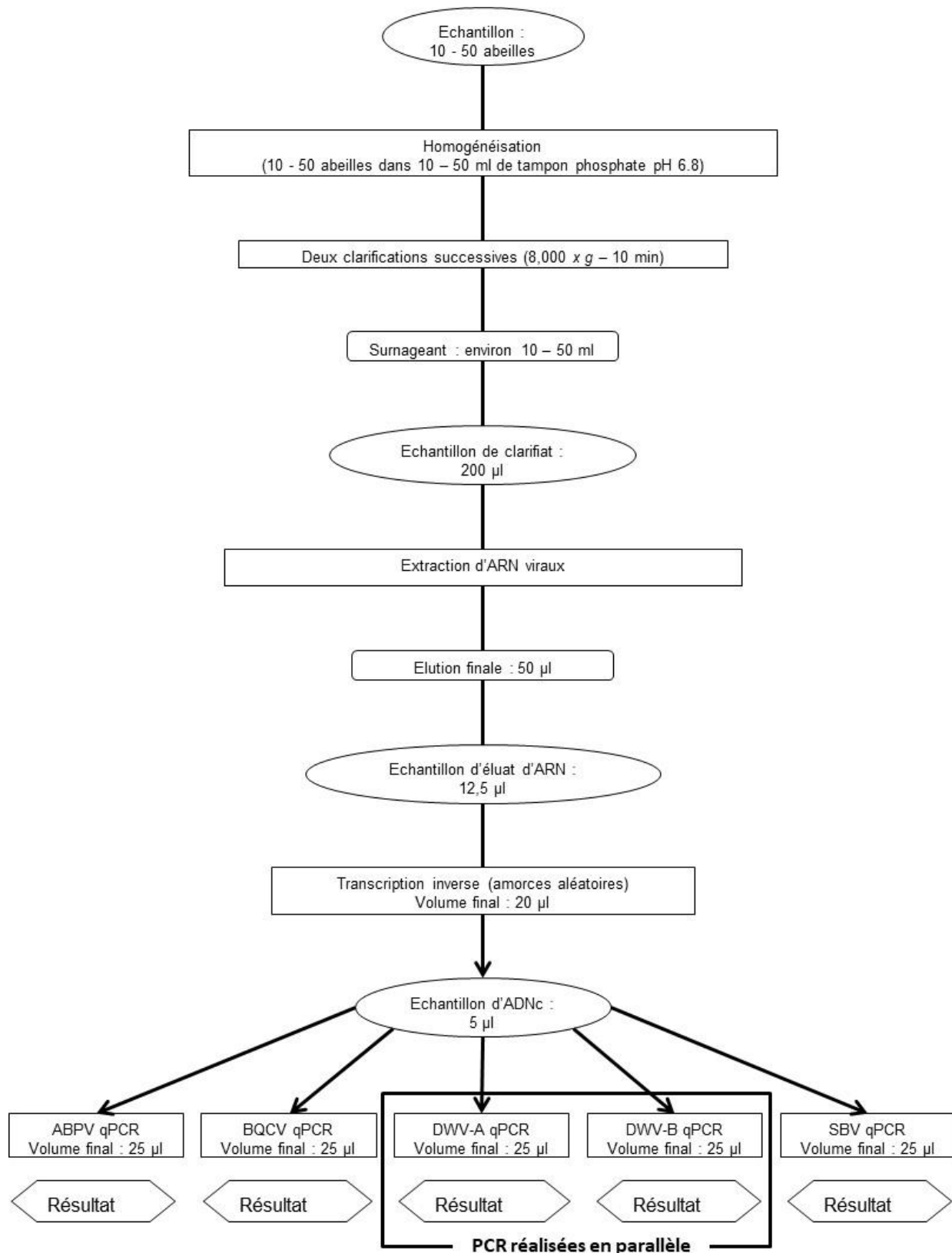
L'interprétation des résultats conformes est faite au regard des seuils d'interprétation séparant les cas symptomatiques et asymptomatiques, définis pour chaque virus (Tableau 10 ; Schurr et al., 2019). L'incertitude de mesure (*U*) est également prise en compte pour interpréter les résultats proches de ces seuils.

Tableau 10 : Interprétation des résultats

Virus détecté	Seuil d'interprétation (log ₁₀ copies/abeille)	Virus non détecté	Charge virale < Seuil- <i>U</i>	Seuil- <i>U</i> ≥ Charge virale ≥ Seuil+ <i>U</i>	Charge virale > Seuil+ <i>U</i>
ABPV	5,0	Virus non détecté dans l'échantillon	Virus détecté à une charge virale non significative	Virus détecté à une charge virale proche du seuil associé à une infection déclarée	Virus détecté à une charge virale évocatrice d'une infection déclarée
BQCV	8,0				
DWV-A	6,0				
DWV-B	7,0				
SBV	9,0				



Annexe 1 : Synoptique de la méthode de détection et quantification des virus ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B et SBV à partir d'un échantillon d'abeilles



Annexe 2 : Caractéristiques de performance des méthodes

Les qPCR et les méthodes complètes de détection et quantification des virus ABPV, BQCV, DWV-A et SBV ont été caractérisées selon la norme AFNOR XP U47-600.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau : Critères de validation et performance des méthodes (résultats exprimés en \log_{10} copies)

Critères	ABPV	BQCV	DWV-A	DWV-B	SBV
Spécificité analytique	a	b	c	d	e
Limite de détection de la qPCR (LD_{PCR}) (minimum : 23 positifs / 24 échantillons)	2,0	1,7	1,1	2,0	1,7
Limite de quantification de la qPCR (LQ_{PCR}) (biais $\leq 0,25 \log_{10}$)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Domaine de linéarité (biais $\leq 0,25 \log_{10}$)	2,0 à 8,0	2,0 à 8,0	2,0 à 8,0	2,0 à 8,0	2,0 à 8,0
Efficacité de la qPCR	87%	105%	104%	84%	92%
Limite de détection de la méthode ($LD_{METHODE}$) (minimum : 8 positifs / 8 échantillons)	4,4	3,0	2,4	5,0	3,4
Limite de quantification de la méthode ($LQ_{METHODE}$) (incertitude élargie [U] $\leq 1,0 \log_{10}$) ^f	6,4	3,0	2,4	5,0 ^g	3,4
Limite supérieure du domaine d'exactitude ($U \leq 1,0 \log_{10}$) ^f	10,4	10,0	10,4	10,0 ^g	10,4
Valeur du biais systématique de la méthode (biais $\leq 1,0 \log_{10}$)	+0,4	+0,2	0,0	-0,95	-0,4
Sensibilité du diagnostic	100% (20/20)	100% (43/43)	100% (37/37)	100% (2/2)	100% (48/48)
Spécificité du diagnostic ^h	12	6	31	11	14

a : Spécificité analytique décrite par Jamnikar-Ciglenc̃ki and Toplak, 2012.

b : Spécificité analytique décrite par Chantawannakul *et al.*, 2006.

c : Les amorces et la sonde ont été sélectionnées pour la détection et la quantification du DWV-A (Schurr *et al.*, 2019).

d : Les amorces et la sonde ont été sélectionnées pour la détection et la quantification du DWV-B et les recombinants génétiques entre le DWV-A et DWV-B (Schurr *et al.*, 2019).

e : Spécificité analytique décrite par Blanchard *et al.*, 2014.

f : La $LQ_{METHODE}$ et le domaine d'exactitude de la méthode prennent en compte la correction du biais systématique.

g : La méthode ciblant le DWV-B ne respecte pas les critères de validité d'une quantification juste et fidèle des charges virales. L'incertitude élargie moyenne de la méthode de quantification du DWV-B, sur le domaine de 5,0 à 10,0 \log_{10} copies/abeille, est de 0,87 (maximum 1,2).

h : La valeur de spécificité indiquée représente le nombre d'échantillons d'abeilles, trouvés négatifs lors du processus de validation. Ces échantillons pouvaient soit être issus du diagnostic d'autres agents pathogènes, soit provenir de zones connues comme indemnes de la maladie.



Bibliographie

1. Blanchard P, Guillot S, Antúnez K, Köglberger H, Kryger P, de Miranda JR, Franco S, Chauzat MP, Thiéry R, Ribière M. 2014. Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *J. Virol. Methods.* 197:7-13.
2. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invertebr Pathol.* 91(1):69-73.
3. Dalmon A, Desbiez C, Coulon M, Thomasson M, Le Conte Y, Alaux C, Vallon J, Moury B. 2017. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Sci Rep.* 7:41045.
4. de Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, de Graaf DC, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, and van der Steen JJM. 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52(4).
5. Jamnikar-Ciglencéki U, Toplak I. 2012. Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *J. Virol. Methods.* 184(1-2): 63-8.
6. Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304-6.
7. Schurr F., Tison A., Militano L., Cheviron N., Sircoulomb F., Rivière M.P., Ribière-Chabert M., Thiéry R., Dubois E. 2019. Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *J. Virol. Methods.* 270:70-78.