

FICHE ET PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Partie réservée à l'Anses :

Date de réception :

Personnel en charge du dossier :

Fiche complète : oui non

Demande d'informations complémentaires le :

Date d'enregistrement :

N° de DA :

Par : téléphone email autre

RENSEIGNEMENTS - Fiche remplie par :

DEMANDEUR		Date :
NOM Prénom : Adresse : CP : Ville : Tél : Email :		NOM Prénom : Adresse : CP : Ville : Tél : Email :
PROPRIETAIRE DES PRELEVEMENTS / DU RUCHER		DESCRIPTION DES PROBLEMES DU RUCHER
NOM Prénom : Tél : Adresse : CP : N° d'apiculteur :		Signes cliniques devant les colonies <input type="checkbox"/> Mortalité importante <input type="checkbox"/> Abeilles tremblantes <input type="checkbox"/> Abeilles traînantes <input type="checkbox"/> Abeilles noires et/ou dépilées <input type="checkbox"/> Abeilles rejetées par les gardiennes (agressivité) <input type="checkbox"/> Abeilles aux ailes déformées/atrophiques <input type="checkbox"/> Abeilles accrochées aux brins d'herbe <input type="checkbox"/> Traces de diarrhées devant/sur la ruche <input type="checkbox"/> Abeilles disposées en soleil <input type="checkbox"/> Activité au trou de vol réduite
PRELEVEMENTS REALISES		Signes cliniques à l'intérieur des colonies
NOM du préleveur : Date du prélèvement : Lieu du prélèvement : <i>Code postal</i> : <i>Commune</i> : Date de l'envoi :		<input type="checkbox"/> Dépopulation constatée <input type="checkbox"/> Manque d'abeilles sur le couvain <input type="checkbox"/> Présence de varroas <input type="checkbox"/> Abeilles aux ailes déformées <input type="checkbox"/> Abeilles avec la tête dans l'alvéole <input type="checkbox"/> Couvain en mosaïque <input type="checkbox"/> Atteinte du couvain : <input type="checkbox"/> ouvert <input type="checkbox"/> operculé <input type="checkbox"/> de cellules royales <input type="checkbox"/> Opercules de couleurs différentes <input type="checkbox"/> Larves : <input type="checkbox"/> Gluantes <input type="checkbox"/> Filantes <input type="checkbox"/> avec saccule <input type="checkbox"/> Larves jaunes, marrons à noires <input type="checkbox"/> Couvain plâtré/mycose <input type="checkbox"/> Couvain tubulaire <input type="checkbox"/> Présence de galeries dans les cadres <input type="checkbox"/> Destruction du couvain <input type="checkbox"/> Modification de la couleur du miel / fermentation <input type="checkbox"/> Présence d'insectes (ex : coléoptères), d'acariens différents de varroas, de larves suspectes
CONTEXTE DE LA DEMANDE		
<input type="checkbox"/> Plan de contrôle miel <input type="checkbox"/> Certificat sanitaire pour l'exportation <input type="checkbox"/> Diagnostic suite à trouble : Date de 1 ^{ère} observation du problème : Nombre de ruches dans le rucher : Nombre de ruches atteintes : Nombre de ruches mortes : Situation du rucher : <input type="checkbox"/> Cultures, vergers. Type : <input type="checkbox"/> Flore naturelle sauvage : <input type="checkbox"/> Industries, autoroutes, autres :		
CALENDRIER DES TRAITEMENTS (varroose, loques...)		
Dates de traitement : Produits employés : Mode d'application : Durée du traitement :		

PROBLEME SUSPECT PAR LE DEMANDEUR ET AUTRES OBSERVATIONS :

LISTE DES PRELEVEMENTS ET ANALYSES DEMANDEES

¹ Référence à indiquer sur le prélèvement (ex : n° ruche, nom rucher, date...)

² Ex : abeilles (mortes, vivantes internes, vivantes externes), couvain, larves, nymphes, écailles, pollen, miel, pain d'abeilles, cire, lames microscopiques...

³ Voir liste des prestations analytiques proposées par le laboratoire en pages 3 et 4.

LISTE DES PRESTATIONS ANALYTIQUES

Recherche de maladies et d'agents pathogènes biologiques

Loques américaine et européenne :

<input type="checkbox"/>	1. Recherche des loques américaine et européenne par examen bactérioscopique* <i>Note : Analyse réalisée en première intention suite à une suspicion clinique</i>	Couvain, larves
<input type="checkbox"/>	2. Isolement et culture de <i>Paenibacillus larvae</i> (agent de la loque américaine)	Couvain, larves, miel, cire
<input type="checkbox"/>	3. Isolement et culture de <i>Melissococcus plutonius</i> (agent de la loque européenne)	Couvain, larves
<input type="checkbox"/>	4. Identification de <i>P. larvae</i> par PCR* <i>Note : Analyse réalisée uniquement en seconde intention, et si nécessaire, dans le cas d'une suspicion clinique ou d'un résultat positif en culture</i>	
<input type="checkbox"/>	5. Identification de <i>M. plutonius</i> par PCR* <i>Note : analyse réalisée uniquement en seconde intention, et si nécessaire, dans le cas d'une suspicion clinique ou d'un résultat positif en culture</i>	Couvain, larves

Varroose :

<input type="checkbox"/>	6. Recherche de la varroose par examen macroscopique et mise en évidence de <i>Varroa destructor</i> par examen direct*	Abeilles, couvain
--------------------------	---	-------------------

Nosémose :

<input type="checkbox"/>	7. Recherche de la nosémose par examen microscopique sur 10 abeilles symptomatiques* <i>Note : Analyse réalisée en première intention suite à une suspicion clinique</i>	
<input type="checkbox"/>	8. Recherche de la nosémose par examen microscopique sur 60 abeilles (dépistage) <i>Note : Analyse réalisée en première intention suite à une suspicion clinique</i>	Abeilles
<input type="checkbox"/>	9. Identification de l'espèce de <i>Nosema</i> (<i>N. apis</i> / <i>N. ceranae</i>) par PCR* <i>Note : Analyse réalisée uniquement en seconde intention si la microscopie est positive</i>	

Acariose des trachées :

<input type="checkbox"/>	10. Recherche de l'acariose des trachées par examen microscopique (méthode OIE ou méthode interne)	Abeilles
<input type="checkbox"/>	11. Recherche d' <i>A. woodi</i> par PCR	

Petit coléoptère des ruches, *Aethina tumida* :

<input type="checkbox"/>	12. Identification par examen morphologique*	Insecte adulte, larve
<input type="checkbox"/>	13. Identification par PCR* <i>Note : Pour les adultes et les larves : analyse réalisée en seconde intention si nécessaire</i>	Insecte adulte, larve, œufs

Frelon asiatique, *Vespa velutina* :

<input type="checkbox"/>	14. Identification par examen morphologique	Insecte
--------------------------	---	---------

Tropilaelaps spp. :

<input type="checkbox"/>	15. Identification par examen morphologique*	Acarien
<input type="checkbox"/>	16. Identification par PCR <i>Note : Analyse réalisée uniquement en seconde intention si nécessaire</i>	

Viroses / virus de l'abeille :

<input type="checkbox"/>	17. Paralysie chronique (maladie noire, CBPV) : recherche et quantification par PCR	Abeilles
<input type="checkbox"/>	18. Virus de la paralysie aigüe (ABPV) : recherche et quantification par PCR	
<input type="checkbox"/>	19. Virus de la cellule royale noire (BQCV) : recherche et quantification par PCR	
<input type="checkbox"/>	20. Virus du couvain sacciforme (SBV) : recherche et quantification par PCR	
<input type="checkbox"/>	21. Virus des ailes déformées (DWV-A et DWV-B) : recherche et quantification par PCR	
<input type="checkbox"/>	22. Virus du Cachemire (KBV) : recherche par PCR	
<input type="checkbox"/>	23. Virus israélien de la paralysie aigüe (IAPV) : recherche par PCR	

Recherche de contaminants chimiques

MIEL :	NECTAR :
<input type="checkbox"/> 25. Métabolites de l'amitraz (DMA, DMF et DMPF) en LC-MS/MS *	<input type="checkbox"/> 29. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS
<input type="checkbox"/> 26. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS *	
<input type="checkbox"/> 27. Multirésidus en LC-MS/MS *(1)	
<input type="checkbox"/> 28. Multirésidus en GC-MS/MS *(2)	
ABEILLES :	PAIN D'ABEILLES :
<input type="checkbox"/> 31. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS *	<input type="checkbox"/> 33. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS *
<input type="checkbox"/> 32. Multirésidus en GC-MS/MS *(2)	<input type="checkbox"/> 34. Multirésidus en GC-MS/MS *(2)
LARVES :	POLLEN :
<input type="checkbox"/> 35. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS	<input type="checkbox"/> 36. Néonicotinoïdes en LC-MS/MS *
	<input type="checkbox"/> 37. Multirésidus en GC-MS/MS *(2)

(1) Acétamiprid, azoxystrobine, boscalid, clothianidine, diméthoate, dimoxystrobine, imidaclopride, méthiocarbe, prothioconazole-destho, pyrimicarbe, sulfoxaflor, tébuconazole, thiaclopride, thiaméthoxam.

(2) Organochlorés, organophosphorés, pyréthrinoïdes de synthèse, dicarboximides, bromopropylate et boscalid.

* Les essais portant un astérisque (*) sont réalisés sous le couvert de l'accréditation par le COFRAC.

Numéro d'accréditation : 1-2229. Portée disponible sur le site : www.cofrac.fr

TARIFS ET CONDITIONS

- Les tarifs et les conditions générales applicables aux prestations de service, essais et analyses tarifées et réalisées par l'Anses sont disponibles sur le site : anses.fr.
- Pour la facturation, il est impératif de préciser le nom du payeur avec ses coordonnées complètes soit via un bon de commande soit, pour les organismes publics, par la communication de l'engagement juridique.
- Pour toute demande d'information complémentaire (ex : quantité à prélever, choix de la méthode d'analyse, précisions sur les tarifs), contacter le laboratoire.
- Le laboratoire s'engage à conserver les échantillons deux mois après l'envoi du rapport d'essai au client.

EXPÉDITION DES ÉCHANTILLONS

- Les prélèvements doivent être envoyés au laboratoire dans un **colis rigide** afin d'éviter tout risque d'écrasement.
- L'envoi d'échantillons potentiellement porteurs d'infection doit respecter la réglementation en matière de risque infectieux** (cf. règles concernant les matières biologiques de catégorie B / UN 3373 : triple emballage et mentions d'étiquetage du colis. Voir guide pratique de l'OMS : <https://www.who.int/fr/publications/item/WHO-WHE-CPI-2019-20>).
- Veiller au respect de la chaîne du froid lorsque cela est nécessaire.**
- La fiche de renseignements doit impérativement être jointe aux prélèvements.** Ne pas la placer au contact direct de l'échantillon pour éviter tout risque de salissures.
- Eviter les envois en fin de semaine** (après mercredi). Les prélèvements pourraient rester à la poste tout le week-end et la qualité des échantillons (et de fait des résultats analytiques) pourrait être altérée.

Indiquer sur le colis les informations suivantes :

ANSES - Sophia Antipolis

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE

Unité Pathologie de l'Abeille, Echantillons pour analyses

Les Templiers, 105 route des Chappes, 06410 BIOT

Tél : 04 92 94 37 00 - Fax : 04 92 94 37 01 - Email : Inr.abeille@anses.fr

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT

Nature et quantité des prélèvements à effectuer

Recherche d'agents pathogènes biologiques :

▪ Abeilles

- ✓ Prélever si possible des abeilles vivantes « symptomatiques », c'est-à-dire présentant les signes cliniques ou comportements anormaux qui motivent la demande d'analyse. Des abeilles mortes peuvent également échantillonnées. *Nota bene* : si les abeilles sont en mauvais état de conservation (ex : desséchées ou putréfiées), l'analyse ne sera pas toujours réalisable ou le résultat difficile à interpréter.

Nature de la recherche	Quantité minimale à prélever
Nosémose (<i>Nosema apis</i> , <i>N. ceranae</i>)	> 10 abeilles
Viroses	> 10 abeilles
Acariose des trachées (<i>Acarapis woodi</i>)	> 20 abeilles
Varroose (<i>Varroa destructor</i>)	> 30 abeilles

- ✓ En l'absence de signes cliniques, et afin de déterminer l'état infectieux de la colonie (dépistage) : prélever des abeilles vivantes asymptomatiques à l'intérieur ou à l'entrée de la ruche.

Pour la recherche de *Nosema*, des virus et d'*Acarapis woodi*, effectuer le prélèvement sur des cadres de rive, dans les hausses ou à l'entrée de la ruche (pour privilégier le prélèvement de butineuses susceptibles d'être plus infectées/infestées).

Nature de la recherche	Quantité minimale à prélever
Agents de la nosémose (<i>Nosema apis</i> , <i>N. ceranae</i>)	> 60 abeilles
Virus	> 60 abeilles
Agent de l'acariose des trachées (<i>Acarapis woodi</i>)	> 200 abeilles

▪ Couvain

Découper un morceau de couvain d'une taille supérieure à 10 x 10 cm contenant au moins 10 larves et/ou nymphes dont l'aspect anormal motive la demande d'analyse. Il est possible également d'envoyer un cadre entier.

Dans le cas où des signes cliniques particuliers ont été mis en évidence, des larves/nymphes/écailles (>10) ou cellules royales peuvent être prélevés de façon spécifique. Il est important dans ce cas de bien décrire la nature des signes cliniques associés au prélèvement dans la fiche au niveau du tableau récapitulatif (p. 2).

▪ Parasites suspects (ex : acariens, insectes)

Prélever plusieurs individus de chaque espèce, si possible à différents stades de développement (ex : œufs, larves, nymphes, adultes). Il est en effet parfois indispensable d'examiner plusieurs spécimens pour les identifier.

NB : En cas de suspicion de parasitose exotique, en raison de l'urgence de l'analyse, avertir le laboratoire de l'envoi des échantillons. Si possible, prendre des photos et les envoyer par email au Laboratoire national de référence (LNR) sur la santé des abeilles : Inr.abeille@anses.fr

▪ Produits de la ruche en vue de la recherche de la loque américaine par culture bactérienne et PCR

Miel : > 40 g	Cire : > 5 g
---------------	--------------

Recherche de contaminants chimiques :

Matrice	Quantité minimale à prélever *
Miel	30 g
Abeilles	30 g
Pollen	30 g
Pain d'abeilles (sans cadre)	20 g

Matrice	Quantité minimale à prélever *
Nectar	20 µL
Larves d'abeilles	10 g
Sirop de nourrissement	10 g

* Quantité minimale à prélever pour la réalisation de toutes les recherches proposées dans la matrice considérée.

Conditionnement, conditions de stockage et de transport

- D'une manière générale, placer les prélèvements dans des conditionnements propres (à usage unique) et hermétiquement fermés portant le code d'identification de l'échantillon.**
Indiquer l'identification de l'échantillon de manière lisible et indélébile sur le contenant de stockage et sur le bouchon s'il s'agit d'un tube ou pot à prélèvement.
- Si l'envoi est possible dans les heures ou le jour qui suit le prélèvement :** mettre les échantillons au réfrigérateur en attente de l'envoi (attention ils doivent rester secs) et les expédier à température ambiante.
- Dans le cas où l'envoi ne peut pas se faire rapidement :** stocker les échantillons selon les conditions préconisées (cf. tableau suivant) et veiller à ce que la chaîne du froid ne soit pas interrompue jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Pour ce faire, utiliser des plaques eutectiques (« blocs de froid ») et une boîte isotherme, ou dans l'idéal, faire appel à un transporteur spécialisé.
- Les spécimens entomologiques conditionnés dans l'éthanol peuvent être conservés et envoyés à température ambiante.**

Contenants primaires préconisés

Stockage avant envoi

Abeilles

▪ Emballages en papier (ex : enveloppes épaisses en papier kraft). NB : éviter tout risque d'écrasement.	Congélation à environ - 20°C
▪ Emballages rigides en carton	

Couvain

Cadre ou morceau de couvain :

▪ Enveloppe épaisse en papier kraft ou boîte en plastique (ou en carton). NB : éviter tout risque d'écrasement et de « coulures »	Congélation à environ - 20°C
Larves ou nymphes : ▪ Petit tube à bouchon fermé (ex : tube Eppendorf). Placer le tube dans un pot à prélèvement ou une enveloppe pour faciliter l'identification de l'échantillon. Indiquer le nombre de larves/nymphes échantillonnées. ▪ Pour la recherche de résidus chimiques : utiliser un pot à prélèvement en polypropylène et l'envelopper dans un sac en plastique.	Congélation à environ - 20°C

Parasites suspects (ex : acariens, insectes)

▪ Tube à prélèvement étanche. Placer les spécimens dans de l'éthanol à 70% dilué ou, si cela n'est pas possible, à sec	Température ambiante si conservés dans l'éthanol Ou congélation si à sec
NB : seul l'alcool éthylique (= éthanol) doit être utilisé. Ne pas employer d'alcool à brûler ou d'alcool dénaturé qui contiennent d'autres composés chimiques pouvant altérer le prélèvement. Les parasites doivent être envoyés morts et dans un contenant hermétique , afin d'éviter un risque de dissémination lors du transport. Les spécimens vivants peuvent être tués dans l'éthanol ou par congélation pendant une nuit.	

Produits de la ruche

Miel et sirop de nourrissement :

▪ Pot à prélèvement en polypropylène et l'envelopper dans un sac en plastique.	
Nectar : ▪ Microcapillaires. Boucher les microcapillaires pour éviter l'évaporation du nectar. Placer les microcapillaires dans des tubes et les envelopper dans un sac en plastique. ▪ Ou de préférence, extraire le nectar directement dans des petits tubes (ex : tubes Eppendorf) hermétiquement fermés.	Réfrigération environ + 5 °C

Cire :

▪ Boîte en plastique (ou en carton) ou pot à prélèvement en polypropylène ou enveloppe épaisse en papier kraft.	
Pollen frais et pain d'abeilles : ▪ Morceau de rayon : boîte en plastique (ou en carton) ou enveloppe épaisse en papier kraft. NB : éviter l'écrasement des prélèvements. ▪ Pollen frais ou pain d'abeilles extrait : pot à prélèvement en polypropylène ou tube à centrifuger de 50 mL ou enveloppe Kraft.	Congélation à environ - 20°C