

LOQUE AMÉRICAINE

RÉSUMÉ

La loque américaine affecte les stades larvaires de l'abeille domestique d'*Apis mellifera* et d'autres espèces d'*Apis*. Elle est présente dans le monde entier. *Paenibacillus larvae* sous-espèce *larvae* (White), l'agent causal, est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. Ces spores sont extrêmement résistantes à la chaleur et aux agents chimiques, et elles seules provoquent la maladie.

Identification de l'agent pathogène : les cadres de couvain des colonies infectées ont un aspect en mosaïque dû à un mélange de cellules operculées de couvain sain, de cellules non operculées contenant les restes des larves malades, et de cellules vides. Ceci n'est pas seulement caractéristique de la loque américaine. Les opercules d'une cellule de larve malade apparaissent mous et plus foncées, devenant concaves et souvent perforées à mesure que l'infection progresse. La couleur des larves et des pupes passe du brun crème au brun foncé avec un aspect visqueux une fois exposés à l'extérieur. Une odeur caractéristique se développe à un stade avancé d'infection. Le couvain malade se dessèche par la suite pour former des écailles caractéristiques très adhérentes au fond de la cellule. La formation d'une larve filante est un des signes les plus caractéristiques de la maladie, il précède la formation des écailles.

La méthode choisie pour le diagnostic de la loque américaine dépend de la présence ou non des signes cliniques de la maladie. En cas de maladie clinique, une gamme de techniques simples de laboratoire est disponible pour la confirmation. Certaines d'entre elles nécessitent l'isolement de l'agent pathogène par repiquages successifs. La présence de spores résistantes à la chaleur, la croissance caractéristique de la bactérie, la morphologie des colonies de bacilles, combinée avec des tests simples en laboratoire sont considérés comme concluants : la coloration de Gram, le test de la catalase, et le test de la nitrate réductase (facultatif). L'identification complète des bactéries isolées peut être faite par des profils biochimiques ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Cette dernière permet également d'analyser directement les échantillons, tout en évitant la longue étape de culture. Les techniques basées sur les anticorps sont utiles quand aucune réaction hétérospécifique avec d'autres bacilles n'a été observée, comme par exemple *Paenibacillus alvei*, qui est souvent trouvé en fin de stade de la loque européenne.

Quand les signes cliniques sont absents ou que l'information sur l'aspect des cadres de couvain est manquante, une identification complète de l'agent pathogène est recommandée. Celle-ci peut être faite par le profil biochimique (sur les colonies isolées suspectes) ou par PCR (directement sur les échantillons ou après culture). Seules des personnes expérimentées peuvent relier des caractéristiques de croissance, de morphologie des colonies, et les résultats des analyses de laboratoire mentionnées ci-dessus pour confirmer la maladie.

Épreuves sérologiques : il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : il n'y a aucun vaccin ou produit biologique disponible.

A. INTRODUCTION

La loque américaine est une maladie du couvain d'abeille domestique *Apis mellifera* et des autres espèces d'*Apis*, et est présente partout dans le monde où l'apiculture existe. *Paenibacillus larvae* sous-espèce *larvae* (White), l'agent causal, est une bactérie qui peut produire plus d'un milliard de spores par larve infectée. La bactérie est en forme de bâtonnet arrondi, droit ou/et parfois incurvé, avec une taille variable (0,5 µm de large par 1,5 à 6 µm de

long), apparaissant seule ou en chaînes filamenteuses ; certaines souches sont mobiles d'autres fixes. Les sporanges *in vitro* sont souvent clairsemés, et ellipsoïdaux, avec des spores centrales et subterminales, qui peuvent faire gonfler les sporanges. Les spores sont souvent trouvées libres (15). Les spores sont extrêmement thermostables et résistantes aux agents chimiques. Seules les spores sont capables d'induire la maladie.

L'infection peut être transmise à une larve par des abeilles nourrices ou par des spores restantes à la base d'une alvéole de couvain. Bien que les stades larvaires d'ouvrières, de faux-bourçons et de reines soient susceptibles de déclarer la maladie, on observe rarement des larves infectées de reines et de faux-bourçons dans les conditions naturelles. La sensibilité des larves à la loque américaine diminue avec l'augmentation de l'âge (32) ; les larves ne peuvent plus être infectées après 53 h suivant l'éclosion de l'œuf. La dose infectieuse moyenne (DI_{50} = nombre de spores avec lequel 50 % des larves sont tuées) requise pour déclencher l'infection, bien que très variable, est de 8,49 spores dans des larves d'abeilles âgées de 24 à 48 h (13). L'échange des cadres de couvain contenant des restes de larves malades est la voie de diffusion de la maladie la plus commune. En outre, l'alimentation ou le pillage de miel chargé en spores, les essaims artificiels et l'introduction de reines provenant de colonies infectées peut également disséminer la maladie. La détection précoce de la loque américaine permet de stopper sa diffusion.

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

1. Identification de l'agent pathogène

Une larve saine a un aspect brillant, blanc nacré. Elle se développe d'abord à la base de la cellule en forme de lettre « C » et poursuit sa croissance, droite dans la cellule. Les larves infectées meurent dans cette position droite. Dans les colonies sévèrement infectées, un couvain en mosaïque apparaît avec juxtaposition de couvains d'âges différents, de restes de larves malades, et de cellules vides. La cellule operculée qui contient une larve malade semble moite et de couleur plus foncée et devient concave et perforée lorsque l'infection progresse. En outre, la larve ou les nymphes changent de couleur, d'abord en brun crémeux puis en brun foncé. Les larves deviennent filantes, et lorsqu'on introduit dans l'alvéole une sonde on en retire une masse élastique correspondant aux restes larvaires. Une odeur forte d'ammoniac, se dégage à ce stade, ressemblant à celle de l'ancienne colle forte. Finalement, après 1 mois ou plus, les restes du couvain malade se dessèchent pour former des écailles typiques dures, brunâtres qui sont fragiles et très adhérentes sur les côtés inférieurs de la cellule (Fig. 1). Si la mort se produit au stade de puppe, la formation de la langue pupale (une saillie de la tête de la puppe qui traverse le dessus de la cellule de couvain) est l'un des signes les plus caractéristiques de la maladie, bien qu'il soit rarement observé (Fig. 2c). La langue peut persister également sur l'écaille sèche.

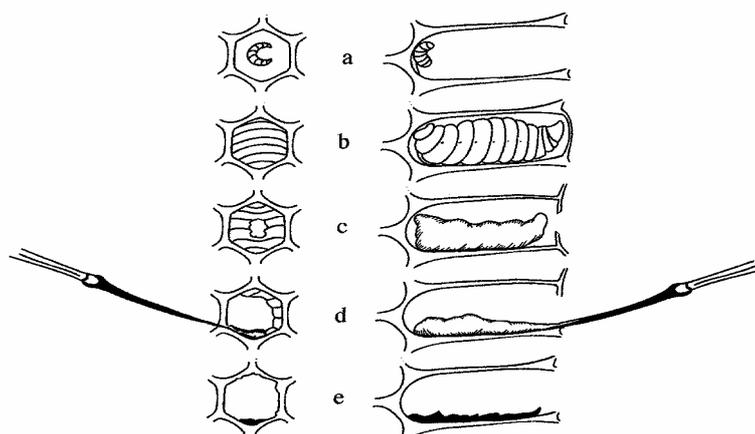


Fig. 1. Progression de la maladie : (a) Commencement de l'infection. (b) Développement larvaire au stade de puppe. (c) Le contenu de la cellule operculée est réduit, l'opercule est affaissé et perforé. (d) Le contenu de cellules devient visqueux. (e) Ecailles résiduelles très adhérentes au fond de la cellule.

La méthode choisie pour le diagnostic de la loque américaine dépend de la présence ou de l'absence des signes cliniques de la maladie. En cas de maladie clinique, une gamme de techniques simples de laboratoire est disponible. Certaines d'entre elles nécessitent l'isolement de l'agent pathogène par repiquages successifs. La présence des spores résistantes à la chaleur, les caractéristiques de croissance de la bactérie, la morphologie

des colonies de bacilles, combiné avec les simples tests de laboratoire suivants sont considérés comme concluants : la coloration de Gram, le test de la catalase et le test de la nitrate réductase (facultatif). L'identification complète des bactéries isolées peut être faite par le profil biochimique ou par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Cette dernière permet également d'examiner directement les échantillons, tout en évitant la longue étape de culture. D'autres méthodes consistent à observer directement les restes larvaires : la technique du dépôt sur lame et de la coloration d'un broyat larvaire, le test du lait d'Holst, et différentes techniques basées sur les anticorps. La technique du dépôt sur lame et de la coloration d'un broyat larvaire, basée sur les mouvements browniens des spores de *P. I. larvae* et sur leur morphologie, n'est pas très spécifique. De même, pour le test du lait d'Holst, basé sur le niveau élevé de l'activité protéolytique pendant la sporulation de *P. I. larvae*. Les 2 tests ne doivent pas être employés seuls. Les techniques basées sur les anticorps sont utiles quand aucune réaction croisée avec d'autres bacilles n'a été démontrée, comme par exemple avec *Paenibacillus alvei*, qui se retrouve en fin de stade de la loque européenne.

Lorsque les signes cliniques ou les données sur l'état des cadres de couvain sont absents, une identification précise de l'agent pathogène doit être effectuée. Celle-ci peut être faite par profil biochimique (sur les colonies isolées suspectes) ou par PCR (directement sur les échantillons ou après culture). Seules des personnes expérimentées peuvent relier des caractéristiques de croissance, de morphologie des colonies, aux résultats des tests mentionnés ci-dessus pour confirmer la maladie.

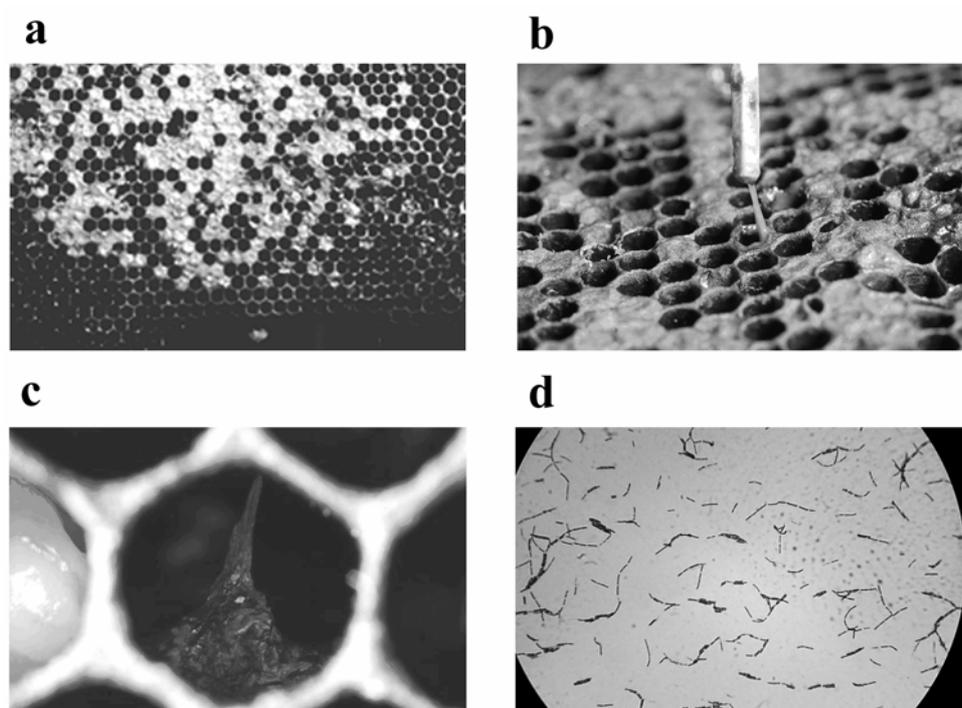


Fig. 2. Signes clinique de loque américaine (a-c) et coloration de Gram (d) : (a) Cadre de couvain en mosaïque, (b) Une allumette extrait une masse élastique brunâtre, fil visqueux de restes larvaires semi-fluides. (c) La formation d'une langue pupale est un signe très caractéristique, mais rarement observé. (d) L'examen au microscope des colonies isolées indique la présence de bâtonnets Gram positifs, isolés ou en chaînes.

a) Préparation de l'échantillon

Quand on observe les signes typiques de la maladie au rucher, il est recommandé d'envoyer au laboratoire un morceau de cadre de couvain d'environ 20 cm², contenant autant de couvain mort et décoloré que possible. Peu ou pas de miel doit être présent dans l'échantillon. L'échantillon peut être simplement enveloppé dans du papier, et les emballages, tels que les sachets en plastique, papier d'aluminium, papier ciré, étain ou verre, doivent être évités afin d'empêcher la moisissure des échantillons, rendant un diagnostic précis presque impossible. L'échantillon peut être expédié dans un carton épais ou une boîte en bois. Si une partie du cadre de couvain ne peut pas être envoyée, le prélèvement, doit contenir assez d'échantillons pour plusieurs tests. L'échantillon peut aussi être enveloppé dans du papier ou mis dans un tube approprié. Cependant, un si petit échantillonnage ne peut être effectué que si la personne est suffisamment expérimentée pour identifier les secteurs malades du cadre de couvain.

Parfois, il est difficile de localiser les restes larvaires en raison de l'état du cadre de couvain. Les écailles peuvent être commodément localisées par l'emploi de rayons ultraviolets ou d'une lumière proche des ultraviolets. L'exposition entre 310 et 400 nm fera entrer en fluorescence n'importe quelle écaille loqueuse. Une attention particulière doit être portée quand le miel et le pollen entrent également en fluorescence. Quand l'observation macroscopique au rucher par une personne expérimentée indique que les cadres de couvain ont un aspect sain, des échantillons de miel peuvent être envoyés pour l'analyse en laboratoire. Des échantillons de nectar et de pollen collectés dans des cellules operculées près du couvain peuvent être pris avec une cuillère et être transférés dans un sachet en plastique ou un tube (31). Du miel récolté prêt à la vente peut également être analysé, bien que ceci ne permette pas l'identification des colonies malades en cas de présence avérée de spores dans l'échantillon. La taille des échantillons devrait être de 30 à 50 g.

b) Techniques de culture

Pour cultiver *P. I. larvae* à partir de restes larvaires, des suspensions de spores sont préparées en mélangeant le matériel malade dans 5 à 10 ml d'eau stérile additionnée d'une solution physiologique (solution physiologique tamponnée au phosphate [PBS] ou 0,9 % de NaCl) ou d'un milieu liquide (de même composition que le milieu solide décrit ci-dessous, mais sans gélose) dans un tube à essai. Tous les milieux de culture doivent être soumis au contrôle de qualité et doivent supporter la croissance de *P. I. larvae* à partir de petits inoculums. Le témoin de référence doit également être cultivé parallèlement aux échantillons suspects pour s'assurer que les tests fonctionnent correctement.

La présence de spores dans les échantillons de miel est contrôlée en chauffant les échantillons à 45-50°C et en les agitant pour mélanger les éventuelles spores. La dilution avec un volume équivalent (25 ml) d'eau permet une manipulation plus facile. Le miel dilué est transféré dans un boudin à dialyse de 44 mm de largeur qui a été fermé à une extrémité. L'extrémité ouverte est fermée après remplissage. Les boudins sont submergés dans l'eau courante, qui circule pendant 18 h ou dans un bain d'eau renouvelé 3 à 4 fois pendant le même laps de temps. Après dialyse, le contenu est centrifugé à 2 000 **g** pendant 20 min. Le surnageant est éliminé laissant approximativement 1 ml (ou moins) de résidu dans chaque échantillon. Le dépôt est alors remis en suspension dans 9 ml d'eau (29).

Du miel peut également être préparé pour la culture sans étape de dialyse, toutefois cette méthode exige une période de centrifugation plus longue (30 min) et plus rapide (3 000 **g**). De même, le volume dans lequel le dépôt final est remis en suspension peut être beaucoup plus petit (200 µl) afin d'améliorer la sensibilité du test (6). Quelque soit la méthode choisie, quand les résultats des analyses de miel sont obtenus d'une manière quantitative et les valeurs seuils établies, la méthodologie employée pour établir ces valeurs doit toujours être suivie.

Les 2 préparations témoins issues des échantillons du cadre de couvain et des échantillons de miel peuvent être traités de la même manière à partir de ce moment-là. La suspension est chauffée à 80°C pendant 10 min pour tuer les bactéries non sporulantes. Un morceau de coton stérile est employé pour transférer une partie de la suspension à la surface des boîtes de Petri contenant le milieu de culture, celles-ci sont alors incubées pendant 2 à 4 jours à 34-37°C. Pour une évaluation quantitative, il est recommandé d'étaler un volume fixe de suspension sur la gélose avec un râteau stérile plutôt que d'employer des tampons de coton. Des boîtes inoculées sont mieux incubées dans une atmosphère entre 5 à 10 % de CO₂, bien que l'incubation aérobie fonctionne également.

Différents milieux de culture peuvent être employés comprenant le bouillon de cœur-cerveau complété avec de la thiamine HCl (29), le milieu J (19), le MYPGP (7), le milieu de Michael (5) et la gélose de Colombie contenant du sang de cheval à 5 % (15). Ce dernier peut être décoloré ou partiellement hémolysé quand *P. I. larvae* se développent dessus.

Les échantillons provenant des larves cliniquement malades seront à l'origine de cultures largement développées après 2 à 4 jours dans les boîtes, obligeant ensuite à un isolement des colonies lors d'une autre culture. Sur la gélose au sang de Colombie, les colonies sont petites (< 1 mm de diamètre), régulières, luisantes, butyreuses, grisâtres ou jaunies par les colorants du sang (15). Sur le milieu de Michael, les colonies sont blanchâtres, opaques, aplaties, avec les bords irréguliers et habituellement d'un diamètre de 1 à 3 mm (5). Quand les techniciens sont inexpérimentés, il est recommandé de cultiver en parallèle des souches de références de *P. I. larvae*, par exemple LMG 9820 (autre désignation : ATCC 9545) Un échantillon de couvain ou de miel, dont le résultat est confirmé être positif, pourrait servir de témoin positif pour l'examen entier.

Des difficultés peuvent se produire quand les suspensions de spores contiennent d'autres espèces de spores bactériennes, qui peuvent envahir la totalité de la culture. Si c'est le cas, il est recommandé d'ajouter au milieu de culture de l'acide nalidixique (18) et/ou l'acide pipémidique (2). Les solutions sont préparées en mélangeant 0,3 g d'acide nalidixique ou 0,4 g d'acide pipémidique dans 2 ml de 1 N NaOH et diluées dans 100 ml de tampon phosphate 0,01 M ou d'eau, stérilisées par filtration et stockées au réfrigérateur. Ces

solutions stockées sont ajoutées au milieu en gélose encore liquide pour donner une concentration finale de 6 à 9 µg/ml d'acide nalidixique et de 10 à 20 µg/ml d'acide pipémidique.

Des spores semblables à *P. I. larvae* ont également été retrouvées dans la cire d'abeilles par extraction au chloroforme (21) et dans du pollen par filtration aqueuse (10).

c) Tests de confirmation

Paenibacillus I. larvae est un bacille Gram positif avec certaines caractéristiques qui le distingue de beaucoup d'autres bacilles contaminant les abeilles et les produits de la ruche. En effet, la bactérie est catalase négative (14) et réduit le nitrate en nitrite (23). En conséquence, un certain nombre de tests courants de laboratoire peuvent confirmer la présence de la loque américaine, lorsque des signes cliniques ont été observés, et lorsque la culture d'échantillons de colonies soumis aux traitements thermiques montre des vitesses de croissance (lente) et une morphologie caractéristiques des bacilles Gram positifs.

Test de la catalase : une goutte d'eau oxygénée à 3 % est placée sur une culture en croissance active sur le milieu de culture. La plupart des bactéries aérobies décomposent le peroxyde en eau et en oxygène, produisant une mousse effervescente, mais *P. I. larvae* est presque toujours négatif pour cette réaction (14). Quand la gélose au sang de Colombie est employée pour la culture, le test ne peut pas être effectué sur ce milieu car la présence du sang de cheval entraînera une réaction faussement positive. Dans ce cas, des colonies devront être transférées sur une lame de microscope propre pour l'exécution du test.

Test de la nitrate réductase : la bactérie peut être cultivée sur un milieu tel que des géloses à base de cœur-cerveille contenant du nitrate de potassium (1 à 2 mg/litre de milieu). Quand la croissance a eu lieu, l'addition d'une goutte de réactif d'acide-alpha-naphtyle sulfanilique produit une couleur rouge si du nitrate a été réduit en nitrite. Des souches de *P. I. larvae* négatives au test de la nitrate réductase ont également été décrites (16, 20).

d) Profil biochimique

Quand il est impossible d'observer les signes cliniques (par exemple, examen des produits de la ruche tel que le miel) ou lorsque la maladie est encore dans sa phase subclinique, une identification plus poussée de l'agent pathogène est recommandée. Le profil biochimique des colonies isolées suspectes, en plus de leurs caractéristiques de base (résistance à la chaleur, vitesse de croissance, morphologie des colonies) peut être considéré comme concluant. Le profil biochimique – outre celui déterminé par les tests (mentionnés ci-dessus) de la catalase et de la nitrate réductase – est déterminé par les tests de production d'acide d'hydrates de carbone, d'hydrolyse de l'amidon et de la caséine, d'utilisation du citrate et de liquéfaction de la gélatine.

Production d'acide d'hydrates de carbone (11) : des bactéries sont mises en culture dans du bouillon J (même composition que le milieu J, mais sans gélose) dans lequel 0,5 % de substrat d'essai, (stérilisé séparément dans une solution aqueuse), est remplacé par des sucres. Les hydrates de carbone utilisés sont L (+)-arabinose, D (+)-glucose, D (+)-xylose et D (+)-tréhalose. Les cultures sont examinées au 14^e jour : 1 ml ou moins d'une colonie bactérienne est prélevé aseptiquement, l'échantillon est mélangé avec une goutte de 0,04 % d'alcool de bromocrésol pourpre et on observe la couleur de l'indicateur. *P. I. larvae* produit de l'acide en conditions aérobies à partir du glucose et du tréhalose. Aucun acide n'est produit à partir de l'arabinose et du xylose (1). La différenciation peut être faite entre les *P. I. larvae* et *P. I. pulvificiens* – ce dernier est associé à une maladie rare appelée « écaïlle pulvérulente » – Il peut produire de l'acide à partir du mannitol et de la salicine (15). Ceci semble être une des quelques caractéristiques permettant la différenciation au niveau de la sous-espèce. En outre, *P. I. pulvificiens* pousse également à 20°C (pas *P. I. larvae*) et quelques souches produisent des colonies jaunes ou à pigmentation orange (15).

Hydrolyse de l'amidon (11) : 1 g de fécule de pommes de terre est suspendu dans 10 ml d'eau froide distillée, mélangé à 100 ml de milieu J sans glucose, stérilisé à l'autoclave, refroidi à 45°C, puis après une bonne homogénéisation la préparation est répartie dans 5 boîtes de Petri. Après 3 jours de stockage à température ambiante (pour évaporer l'excès d'humidité), des repiquages de colonies sont effectuées à partir de chaque culture. Les colonies sont immergées dans du Lugol après 5 et 10 jours d'incubation. Après 15 à 30 min, l'amidon inchangé devient blanc et opaque. Un halo clair autour de la culture (après la croissance), indique une hydrolyse de l'amidon. Les souches *P. I. larvae* n'hydrolysent pas l'amidon.

Hydrolyse de la caséine (5) : le milieu qui est employé pour ce test se compose d'une solution A (10 g de lait écrémé en poudre, 90 ml d'eau distillée) et d'une solution B (3 g de gélose, 97 ml d'eau distillée) stérilisées séparément (à 121°C pendant 20 min), refroidies à 45°C puis mélangées. Le milieu ainsi préparé (25 ml) est versé dans les boîtes de Petri, celles-ci sont ensuite inoculées avec des cultures de 24 h. L'incubation se poursuit pendant 7 jours. Une réaction positive est indiquée par l'éclaircissement du milieu sous et autour de la zone de croissance de la colonie. *P. I. larvae* induit une réaction positive.

Utilisation de citrate : ce test utilise un milieu J semi-solide sans glucose mais avec un complément de 2 g de citrate de sodium (11). Le milieu, stérilisé dans des tubes à essai, est inoculé avec 2 ou 3 gouttes d'une jeune culture (de 3 à 4 jours) du milieu J semi-solide. Après une incubation de 14 et 21 jours, un peu de la culture est mélangé sur une colonie avec l'indicateur rouge de phénol. Une réaction alcaline signifie que *P. I. larvae* n'utilise pas le citrate.

Croissance en bouillon nutritif (11) : des bactéries sont inoculées dans un tube de bouillon nutritif (3 g d'extrait de bœuf, 5 g de peptone, 1 000 ml d'eau distillée) et incubées soit jusqu'à la croissance de la colonie ou pendant 14 jours. Si la culture se développe, une colonie est transférée dans un autre tube de bouillon nutritif. Ce procédé est répété successivement et périodiquement pour 10 transferts ou jusqu'à la fin de la croissance. Seule des cultures capables de survivre à 10 transferts sont aptes à se développer en bouillon nutritif. *P. I. larvae* ne peut pas résister au transfert périodique en bouillon nutritif (1). Par contre, *P. I. pulvificiens* peut se développer sur ce type de milieu (15).

Liquéfaction de la gélatine (11) : des cultures dans des tubes de gélatine claire (120 g de gélatine, 1 000 ml d'eau distillée, pH 7,0) incubés à 28°C sont testées pour la liquéfaction à 3 ou 4 jours d'intervalles, pendant 4 semaines. Avant le test, des cultures sont placées à 20°C pendant environ 4 h pour permettre le durcissement de la gélatine. *P. I. larvae* entraîne la liquéfaction de la gélatine (1).

L'utilisation de trousse de diagnostic commerciales, tels qu'API 50 CHB (5) et BBL CRISTAL (8), pour la caractérisation biochimique de *P. I. larvae* peut être prise en compte. Cependant, il a été montré que ces trousse de diagnostic produisent différents résultats pour certaines réactions biochimiques, un profil pour *P. I. larvae* doit être élaboré indépendamment pour chaque système (8).

e) Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est une technique d'empreinte génétique qui permet l'identification des isolats bactériens suspects et la détection de *P. I. larvae* dans des cas cliniques et subcliniques de la maladie chez des larves et dans les produits de la ruche. Le traitement de l'échantillon dépend de l'application du test.

Une colonie bactérienne suspecte est suspendue dans le 50 µl d'eau distillée et chauffée à 95°C pendant 15 min (12). Après centrifugation à 5 000 *g* pendant 5 min, 1 µl du surnageant est employé comme ADN cible dans 50 µl de mélange réactionnel d'une PCR, contenant 2 mM de MgCl₂, 50 pmol d'un couple d'amorce (voir tableau des séquences des amorces ci-dessous), une concentration de 25 à 200 mM de chaque désoxyribonucléoside triphosphate, et 1 à 1,25 unité de *Taq* polymérase. L'amplification d'un fragment spécifique d'ADNc s'effectue dans un thermocycleur réglé aux conditions de PCR suivantes : une étape à 95°C (1 à 15 min) ; 30 cycles à 93°C (1 min), 55°C (30 s) et 72°C (1 min) ; et un cycle final à 72°C (5 min). Les poids moléculaires des produits de PCR sont déterminés par électrophorèse dans de la gélose à 0,8 % avec du bromure d'éthidium pour la coloration.

Les restes de 2 larves malades d'abeille sont suspendus dans 1 ml d'eau distillée stérile et homogénéisées ; 100 µl de cette suspension sont dilués dans 900 µl d'eau distillée. Cette dilution est vortexée et 100 µl de celle-ci sont utilisés pour extraire l'ADNc par chauffage et centrifugation (voir ci-dessus) (9). La méthode de PCR reste la même pour les différentes applications.

La méthode mentionnée ci-dessus pour la préparation de l'échantillon d'ADNc basée sur le chauffage et la centrifugation peut seulement être effectuée sur des bactéries aux stades végétatifs. L'extraction de l'ADNc des spores exige une autre technique. En effet, des suspensions de spores sont centrifugées à la température de 4°C à 6 000 *g* pendant 30 min. La spore est alors soumise au micro-onde pendant 5 min à la puissance maximum pour casser les spores, l'ADNc libérée est suspendue dans 30 µl de 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, contenant 1 mM d'éthylène d'acide tétra-acétique de diamine (EDTA). Quand des spores doivent être détectées dans le miel, une série de dilution d'ADNc est effectuée dans de l'eau distillée stérile, pour éliminer le miel responsable de l'inhibition de la PCR (28). Une autre méthode d'extraction d'ADNc, basée sur des traitements aux lysozymes et protéinases K, a été décrite (4).

De bons résultats peuvent également être obtenus en incubant une suspension d'un culot de spore (par exemple, d'un échantillon de miel ou de larves infectées) en bouillon de MYPGP à 37°C pendant 2 à 24 h. Ensuite, la suspension est centrifugée à 14 500 *g* pendant 5 min, lavée avec de l'eau distillée stérile et resuspendue dans 200 µl d'eau distillée stérile. Cette courte étape d'incubation fait germer des spores, les rendant sensibles à un autre traitement thermique pour la préparation d'ADNc (voir ci-dessus) (22).

Plusieurs combinaisons d'amorces basées sur le gène de l'ARN 16S ont montré des spécificités différentes en fonction des espèces. La différenciation entre *P. I. larvae* et *P. I. pulvificiens* est possible avec l'ensemble des amorces fournies par Piccini *et al.*, quand le nombre de cycles est réduit de 30 à 25 (28). Les séquences d'amorces sont :

Réf.	Sens	Séquence	Taille des produits PCR	Niveau de spécificité
(12)	direct indirect	5'-AAG-TCG-AGC-GGA-CCT-TGT-GTT-TC-3' 5'-TCT-ATC-TCA-AAA-CCG-GTC-AGA-GG-3'	973 bp	espèces
(9)	direct indirect	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3' 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	1106 bp	espèces
(28)	direct indirect	5'-CGA-GCG-GAC-CTT-GTG-TTT-CC-3' 5'-TCA-GTT-ATA-GGC-CAG-AAA-GC-3'	700 bp	sous- espèces

L'identification des 2 sous-espèces est également possible par digestion des amplimères de PCR obtenus sur le fragment de l'ARN 16S avec la ribonucléase *HaellI* (3). Pour ce dernier, les amorces à employer ont une spécificité beaucoup plus faible et amplifient les gènes des ARN 16S des espèces de *Bacillus*, de *Paenibacillus*, de *Brevibacillus* et de *Virgibacillus*.

f) La technique du dépôt et de la coloration d'un échantillon

La technique du dépôt et de la coloration d'un échantillon (21) peut être faite directement sur les restes larvaires. Cependant, en raison de la faible spécificité de cette technique, elle n'est pas concluante.

Le matériel suspect est mélangé avec de l'eau, et une goutte de cette suspension est placée sur une lamelle, séchée et fixée par la chaleur, colorée au carbol fuchsin ou avec une coloration appropriée pour les spores pendant 30 s. Tout excès de coloration est lavé avec de l'eau. La préparation encore humide est montée entre lame et lamelle, sur laquelle est déposée de l'huile d'immersion. L'excès d'eau est expulsé. La lame est séchée, doucement époncée et examinée en microscopie à un fort grossissement. En examinant les champs formés par les poches d'eau dans l'huile, les spores de *P. I. larvae* seront observées en mouvement. Les spores d'autres bacilles restent souvent immobiles; en outre cette technique permet l'examen au microscope de la morphologie caractéristique des spores de loque. Si l'infection date de moins de 10 jours, les longues formes végétatives de la bactérie sont présentes et quelques spores nouvellement formées peuvent être vues (24).

g) Le test du lait d'Host

Le test du lait de Holst (17) utilise le fait qu'un niveau élevé d'enzymes protéolytiques est produit par la sporulation de *P. I. larvae*. L'essai est réalisé en suspendant une écaille suspecte, ou un reste de larve malade, dans un tube contenant 1 à 4 ml de 1 % de lait écrémé en poudre dans l'eau. Le tube est alors incubé à 37°C. Si *P. I. larvae* est présent, la suspension s'éclaircira en 10 à 20 min.

h) Techniques basées sur les anticorps

Différentes techniques basées sur les anticorps ont été développées pour le diagnostic de la loque américaine. La plupart d'entre elles sont effectuées à partir de sérums polyclonaux de lapin développés contre des cultures pures de *P. I. larvae*. Dans une épreuve d'immunodiffusion, les anticorps interagissent avec les antigènes bactériens lors d'un double procédé de diffusion, laissant ainsi des arcs de précipitation (27). Dans la technique des anticorps fluorescents ces anticorps sont conjugués avec un fluorochrome. L'anticorps fluorescent résultant réagit avec un frottis de *P. I. larvae* sur une lame. L'excès d'antisérum est lavé, l'échantillon est examiné en microscopie à fluorescence. *P. I. larvae* se colore spécifiquement par fluorescence (26, 30, 33). Les techniques basées sur les anticorps sont utiles lorsqu'aucune réaction croisée avec d'autres bacilles n'a été démontrée, comme par exemple avec *Paenibacillus alvei*, souvent trouvé en stade terminal de la loque européenne.

Une méthode immuno-enzymatique (ELISA) employant un anticorps monoclonal spécifique de *P. I. larvae* existe (25).

2. Épreuves sérologiques

Il n'existe pas d'épreuves sérologiques applicables pour le diagnostic.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Aucun vaccin ou produits biologiques pour le diagnostic n'est disponible.

REMERCIEMENTS

Illustrations par Karl Weiss, extrait de *Bienen-Pathologie*, 1984, elles sont reproduites avec l'aimable permission de l'auteur et de *l'Ehrenwirth-Verlag*, Munich (Allemagne). Les photographies proviennent du *Central Science Laboratory*, de York (R-U) et de *l'Informatiecentrum voor Bijenteelt*, Gent (Belgique), elles sont éditées avec la permission de Ruth Waite et Frans J. Jacobs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALIPPI A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, **24**, 67–72.
2. ALIPPI A.M. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinean honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologica SEM*, **11**, 343–350.
3. ALIPPI A.M., LOPEZ A.C. & AGUILAR O.M. (2002). Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (7), 3655–3660.
4. BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I, GRABENSTEINER E., NOWOTNY N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (3), 1504–1510.
5. CARPANA E., MAROCCHI L. & GELMINI L. (1995). Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, **26**, 11–16.
6. DE GRAAF D.C., VANDEKERCHOVE D., DOBBELAERE W., PEETERS J.E. & JACOBS F.J. (2001). Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, **32**, 587–599.
7. DINGMANN D.W. & STAHLY D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 860–869.
8. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001). Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.*, **40**, 37–40.
9. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & 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.
10. GOCHNAUER T.A. & CORNER J. (1987). Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.*, **13**, 264–267.
11. GORDON R.E., HAYNES W.C. & PANG C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427, United States Department of Agriculture, Washington DC, USA.
12. GOVAN V.A., ALLSOPP M.H. & DAVISON S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2243–2245.
13. HANSEN H. & BRODSGAARD C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, **80** (1), 5–23.
14. HAYNES W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *Am. Bee J.*, **112**, 130–131.
15. HEYNDRIKX M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., JANSSEN P., KERSTERS K., DE VOS P., LOGAN N.A., ALI N. & BERKELEY R.C. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 270–279.
16. HITCHCOCK J.D. & WILSON W.T. (1973). Pathogenicity to honey bees of a strain of *Bacillus larvae* that does not reduce nitrate. *J. Econ. Entomol.*, **66**, 901–902.

17. HOLST E.C. (1946). A single field test for American foulbrood. *Am. Bee J.*, **86**, 14–34.
18. HORNITZKY M.A.Z. & CLARK S. (1991). Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.*, **30** (1), 13–16.
19. HORNITZKY M.A.Z. & NICHOLLS P.J. (1993). J-medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J. Apic. Res.*, **32** (1), 51–52.
20. JELINSKI M. (1985). Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie*, **16** (1), 69–76.
21. KOSTECKI R. (1969). Studies on improvement of control of American foulbrood of the honey bee (in Polish). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, **13**, 97–135.
22. LAURO F.M., FAVARETTO M., COVOLO L., RASSU M. & BERTOLONI G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 195–201.
23. LOCHHEAD A.G. (1937). The nitrate reduction test and its significance in the detection of *Bacillus larvae*. *Can. J. Res.*, **C15**, 79–86.
24. MICHAEL A.S. (1957). Droplet method for observation of living unstained bacteria. *J. Bacteriol.*, **74**, 831–832.
25. OLSEN P.E., GRANT G.A., NELSON D.L. & RICE W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 732–735.
26. OTTE E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, **4** (4), 331–339.
27. PENG Y.S. & PENG K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, **33**, 284–289.
28. PICCINI C., D'ALESSANDRO B., ANTUNEZ K. & ZUNINO P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 761–765.
29. SHIMANUKI H. & KNOX D.A. (1988). Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am. Bee J.*, **128**, 353–354.
30. TOSHKOV A., VALARIANOV T. & TOMOV A. (1970). The immunofluorescence method and the quick and specific diagnosis of American foulbrood of brood (in German). *Bull. Apic.*, **13**, 13–18.
31. VON DER OHE W. & DUSTMANN J.H. (1997). Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee J.*, **137** (8), 603–606.
32. WOODROW A.W. (1941). Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, **69**, 148–151.
33. ZHAVNENKO V.M. (1971). Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of foulbrood (American and European) (in Russian). *Veterinariia*, **8**, 109–111.

*

* *

NB : Il existe plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE pour les maladies des abeilles (se reporter à la liste dans la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour la liste la plus récente : www.oie.int).