

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09 - Version 5

Mai 2016

Recherche de la nosémose : mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. par examen microscopique

Laboratoire de Sophia Antipolis
Laboratoire national de référence - Santé des abeilles
Laboratoire européen de référence - Santé de l'Abeille





Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V 04	Révision mineure	25/04/2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.09 - révision 4 du LNR Santé des abeilles.
V05	Révision mineure	10/05/2016	Modifications de formulation de l'intitulé de la méthode, de l'introduction et des paragraphes 1 et 9, sans impact sur le protocole d'analyse et les résultats.



Avant-propos

La présente méthode a été optimisée par :

Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis

Laboratoire national de référence sur la santé des abeilles

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

Contact : Inr.abeille@anses.fr



Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
L'identification de l'espèce de <i>Nosema</i> se fait en biologie moléculaire (PCR)	7
2 Termes, sigles et définitions	7
3 Principe de la méthode	7
4 Réactifs	8
4.1 Eau	8
5 Appareillage et matériels	8
6 Échantillons	8
6.1 Conditions d'acceptation des échantillons	8
6.2 Conservation des échantillons avant analyse	9
7 Mode opératoire	9
7.1 Mise en évidence de la présence de <i>Nosema</i> spp. : examen qualitatif	9
7.3 Description de l'agent pathogène	11
8 Résultats	11
8.1 Contrôle qualité	11
8.2 Calculs et expression des résultats	12
8.2.1 Examen qualitatif	12
8.2.2 Examen quantitatif	12
8.2.3 Conclusion analytique et interprétation	12
9 Caractéristiques de performance de la méthode	13
Bibliographie	14



Introduction

La nosémose est une maladie des abeilles adultes. Elle est causée par un parasite unicellulaire de la famille des Microsporidies : *Nosema*. Il existe deux espèces de *Nosema* à l'origine de troubles chez l'abeille : *Nosema apis* Zander et *Nosema ceranae*.

N. apis est un parasite de l'abeille européenne, *Apis mellifera* ; *N. ceranae* est un parasite de l'abeille asiatique, *Apis cerana*, et d'*A. mellifera*. *N. apis* est ubiquiste. *Nosema ceranae* a été détecté dans différentes populations géographiquement séparées d'*Apis mellifera* en Europe, en Amérique du sud et du Nord et en Asie.

La nosémose à *N. apis* est classée comme danger sanitaire de première catégorie dans la réglementation française. Cette maladie occasionne un affaiblissement de la colonie et une dépopulation hivernale ou printanière plus ou moins sévère, associée parfois à des signes cliniques peu spécifiques : abeilles mortes, abeilles trainantes marchant au sol, traces de diarrhées. Le diagnostic de la maladie pourra être porté au vu des signes cliniques constatés, les abeilles pouvant supporter des taux d'infection élevés sans troubles apparents.

Les effets pathogènes de *N. ceranae* sur les colonies d'*Apis mellifera* ne sont pas pleinement connus. *N. ceranae* serait impliqué dans des phénomènes d'affaiblissement de colonies d'abeilles, en présence d'autres facteurs de stress.

La présente méthode décrit une technique de diagnostic de la nosémose par examen microscopique. Elle est adaptée de la méthode référencée dans le Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (version 2008) de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale / Office International des Epizooties (OIE). Elle permet de détecter la présence de *Nosema* spp. et d'évaluer le taux moyen d'infection des abeilles par cet agent.

L'identification de l'espèce de *Nosema* se fait en biologie moléculaire (PCR).



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

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

Manipulation et élimination des matériaux susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non-dissémination de *Nosema* spp. dans l'environnement.



1 Objet et domaine d'application

La méthode décrite est une technique de diagnostic de la nosémose à *N. apis* pour une colonie présentant des signes cliniques de cette maladie.

Le mode opératoire développé ci-après est une technique de diagnostic adaptée de la méthode référencée par l'Office International des Epizooties (OIE), 2008 (chapitre 2.2.4). Il permet l'évaluation du taux moyen d'infection des abeilles par *Nosema* spp.

L'identification de l'espèce de *Nosema* se fait en biologie moléculaire (PCR).

2 Termes, sigles et définitions

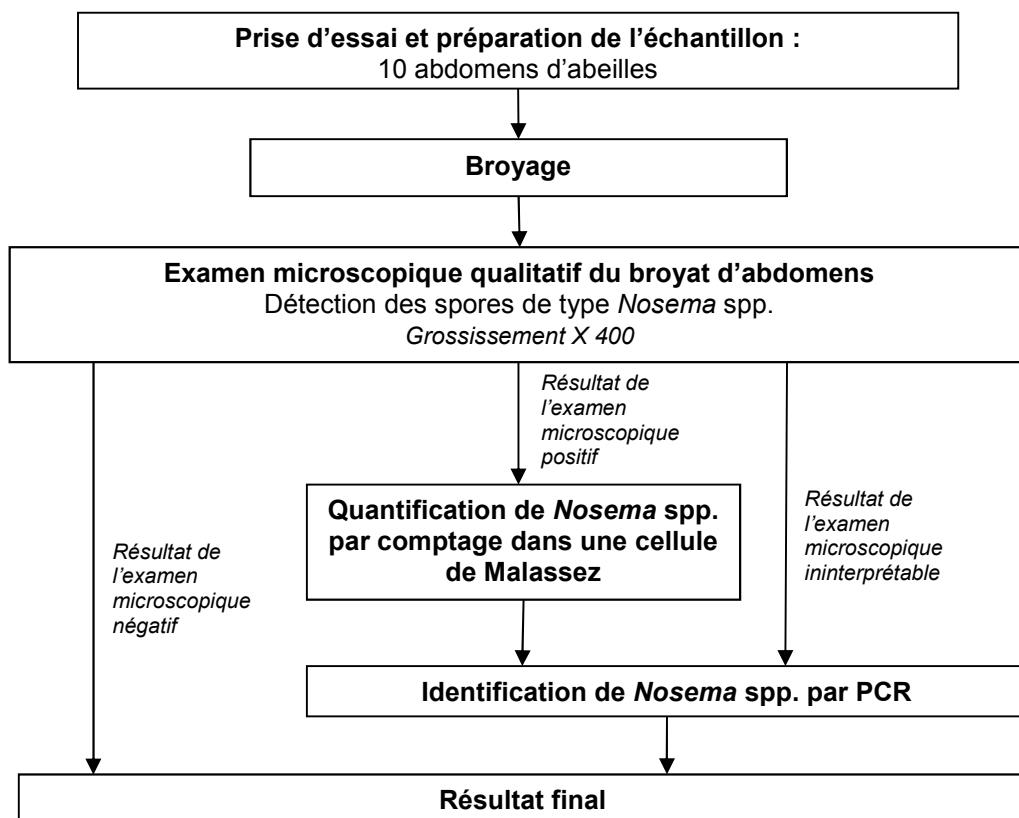
OIE : Office International des Epizooties / Organisation Mondiale pour la Santé Animale

LNR : Laboratoire National de Référence.

PCR : Réaction en chaîne par polymérase.

3 Principe de la méthode

Le but de l'analyse est l'évaluation du taux moyen d'infection des abeilles adultes par *Nosema* spp. Il est évalué à partir d'un échantillon de broyats d'abdomens. L'évaluation est soit qualitative, soit quantitative. Dans ce dernier cas, un comptage est réalisé au moyen d'une cellule de Malassez.





4 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.

4.1 Eau

Utiliser de l'eau ultra pure (eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente).

5 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.

- Pince
- Ciseaux à dissection droits
- Mortier et pilon de 100 ml
- Pipette à usage unique de 5 ml et de 10 ml
- Lames et lamelles microscopiques
- Cellule de dénombrement de Malassez
- Oese de 10 µl
- Pipette pasteur
- Tube à centrifuger (50 ml)
- Toile de filtration en coton
- Vortex
- Microscope optique (x 400)
- Compteur d'impulsions
- Centrifugeuse
- Gants de laboratoire

6 Échantillons

6.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif des troubles observés, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage.

L'échantillon doit compter au moins dix abeilles entières.

A réception au laboratoire, les échantillons ne doivent pas être en état de décomposition et doivent être en quantité suffisante et exploitables pour l'analyse.



6.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant mise en analyse, les échantillons doivent être conservés dans les conditions suivantes :

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

7 Mode opératoire

7.1 Mise en évidence de la présence de *Nosema* spp. : examen qualitatif

- Homogénéiser l'échantillon, prélever 10 abeilles et les mettre dans un récipient de type boîte de pétri.
- A l'aide des ciseaux et de la pince souple prélever les abdomens par découpe au niveau du pétiole.
- Mettre les abdomens dans le mortier, ajouter à l'aide de la pipette 5ml d'eau ultra pure.
- Broyer avec le pilon (bien écraser les abdomens).
- A l'aide d'une oese, déposer 10 µl de la suspension sur une lame de microscope, couvrir avec une lamelle.
- Examiner au microscope au grossissement x 400.
- Dans le cas de résultat positif, passer à l'examen quantitatif pour le comptage des spores.

7.2 Dénombrement des spores *Nosema* spp. : analyse quantitative

- Filtration du broyat d'abdomens

Filtrer la suspension dans le tube à centrifuger à l'aide du filtre en toile plié (compresse ramenée à deux épaisseurs).

Rincer le mortier et le pilon avec 5ml d'eau ultra pure et joindre l'eau de rinçage au filtrat.

Presser le filtre au moyen du pilon ayant servi au broyage afin d'en extraire totalement la suspension.

- Centrifugation

Centrifuger 6 minutes à 800g.

- Remise en suspension du culot

Eliminer le surnageant par épanchement.

Remettre le culot en suspension homogène avec 10ml d'eau ultra pure à l'aide du vortex.

- Comptage sur cellule de Malassez

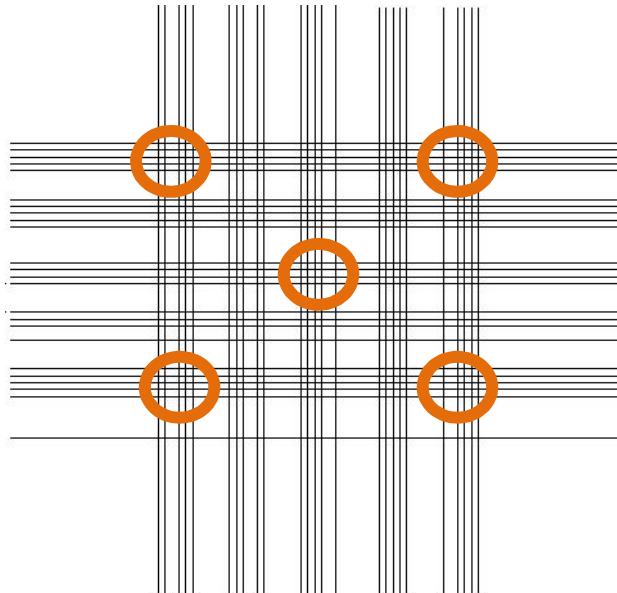
Humidifier légèrement avec le bout du doigt passé sous l'eau les deux plats encadrant la surface quadrillée d'une cellule de Malassez.

Poser délicatement la lamelle et appuyer.

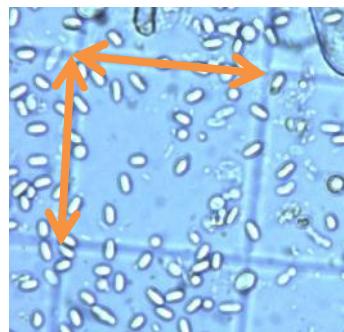
Attendre une trentaine de secondes pour le séchage.

Prélever avec une micropipette ou une pipette pasteur une quantité de solution comprise entre 20 et 30 µl. La faire diffuser sous la lamelle par capillarité de manière à remplir l'espace compris entre les 2 rigoles en évitant tout débordement vers les rigoles. Laisser reposer quelques minutes (environ 4 minutes) et observer.

Compter avec le compteur à impulsion le nombre de spores dans 5 rectangles (composés de 20 carrés). Les rectangles à compter sont choisis d'une manière toujours identique par rapport au quadrillage, telle que la représentation du chiffre 5 sur un domino :



Parmi les spores à cheval sur les lignes de bordure des carrés, seules sont comptées les spores à cheval sur les lignes hautes et les lignes gauches de chaque carré :



La moyenne n de spores par rectangle est calculée.

Le nombre de spores N par abeille est :

$$N = [n] \times 10^5 \text{ spores / abeille}$$



7.3 Description de l'agent pathogène

La spore a une forme ovale (5 à 7 x 3 à 4 µm). Elle est optiquement vide et réfringente (Fig.1).



Figure 1 - Spores de *Nosema* spp. en microscope sur cellule de Malassez (x 400)

8 Résultats

8.1 Contrôle qualité

En cas de résultat ininterprétable (i.e. incertitude sur l'identification morphologique et donc, de ce fait, sur la présence même de spores de *Nosema*), l'identification de *Nosema* pourra être confirmée par PCR.



8.2 Calculs et expression des résultats

8.2.1 Examen qualitatif

Les résultats de l'examen qualitatif sont présentés de la façon suivante :

Résultat de l'examen microscopique	Expression du résultat analytique dans le rapport d'analyses Paramètre de l'analyse : Spores de <i>Nosema</i> spp.
Mise en évidence de spores de <i>Nosema</i> spp.	Déetectées
Absence de spores de <i>Nosema</i> spp.	Non détectées
Interprétation difficile	Ininterprétable

8.2.2 Examen quantitatif

Si le comptage est inférieur à une moyenne de 10 spores par rectangle ($n < 10$), le résultat analytique est exprimé de la façon suivante : $< 10^6$ spores par abeille.

Après examen quantitatif	Résultat analytique LIMS Paramètre de l'analyse : Nombre de spores de <i>Nosema</i> spp. par abeille
$N > 10^6$ spores par abeille	N spores par abeille
$N < 10^6$ spores par abeille	$< 10^6$ spores par abeille

En cas de résultat positif, une discrimination entre *N. apis* – *N. ceranae* pourra être effectuée en biologie moléculaire par PCR.

8.2.3 Conclusion analytique et interprétation

La conclusion analytique, qui prend en compte les résultats de la PCR, est portée de la façon suivante :

Résultat examen microscopique (<i>Nosema</i> spp.)	Identification de l'espèce de <i>Nosema</i> par PCR (<i>N. apis</i> / <i>N. ceranae</i>)	Conclusion analytique
Non détecté	/	Recherche de la nosémose négative
Détecté	<i>N. apis</i>	Infection par <i>Nosema apis</i>
Détecté	<i>N. ceranae</i>	Infection par <i>Nosema ceranae</i>
Détecté	<i>N. apis</i> et <i>N. ceranae</i>	Infection par <i>Nosema apis</i> et <i>Nosema ceranae</i>
Détecté	Analyse non réalisée	Infection par <i>Nosema</i> spp.

/ : Non réalisé

Une interprétation du résultat analytique pourra portée en fonction des informations et des signes cliniques mentionnés dans le commémoratif, du taux d'infection des abeilles et des résultats du typage de *N. apis* et *N. ceranae* par PCR.



Les signes cliniques associés à la nosémose à *Nosema apis* sont les suivants :

- Dépopulation (manque d'abeilles pour couvrir le couvain),
- Abeilles mortes devant et/ou autour de la ruche,
- Abeilles traînantes,
- Abeilles accrochées aux brins d'herbe,
- Traces de diarrhées devant et/ou sur les parois de la ruche,
- Abeilles disposées en soleil.

En cas de nosémose à *N. apis* cliniquement déclarée, le taux d'infection est généralement supérieur à 1 million de spores de *N. apis* par abeille.

Les signes cliniques de la nosémose étant non spécifiques, un diagnostic différentiel avec d'autres maladies de l'abeille pourra être effectué en fonction des commémoratifs (ex : recherche de l'acariose des trachées, de la paralysie chronique, analyses toxicologiques).

La pathogénicité de *N. ceranae* est sujette à de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. En l'état des connaissances actuelles, *N. ceranae* serait impliqué dans des phénomènes d'affaiblissement et de dépopulation, notamment en présence d'autres facteurs de stress. Les résultats d'enquêtes épidémiologiques montrent une forte prévalence de l'infection par *N. ceranae* dans les ruchers, sans signes cliniques apparents et avec des taux d'infection parfois importants (Hendrikx, 2015).

9 Caractéristiques de performance de la méthode

Méthode validée par l'usage.



Bibliographie

1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Hendrikx P, Saussac M, Meziani F, Wendling S, Franco S, Chauzat M-P, 2015. Résabeilles : résultats de deux campagnes de surveillance programmée de la mortalité des abeilles en France. Bulletin Épidémiologique en Santé Animale-Alimentation 70(5): 19.
3. Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Nosémose des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.4, pp. 448-453.