

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11 - Version 3

Août 2016

Identification de l'espèce de *Nosema* par PCR

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



Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété de l'Anses. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée, par exemple en faisant mention de sa référence (incluant sa version et année) et de son titre.



Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
V 2	Révisions mineures	03/05/2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.11 - révision 2 du LNR Santé des abeilles.
V 3	Révisions mineures	08/07/2016	Corrections des concentrations finales § 9.3.2 (PCR β -actine).



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de Sophia - Antipolis

Laboratoire national de référence sur la santé des abeilles

Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la santé de l'Abeille

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

Contact : lnr.abeille@anses.fr



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet et domaine d'application	7
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	7
5 Réactifs	8
5.1 Eau	8
5.2 Tampon phosphate.....	8
5.3 10X TAE Buffer.....	8
5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle	8
5.5 Témoin positif de processus	9
5.6 Témoin négatif de processus	9
5.7 Témoin positif de PCR	9
5.8 Témoin négatif de PCR	9
6 Appareillage et matériels	9
6.1 Petit équipement de laboratoire	9
6.2 Thermocycleurs pour PCR conventionnelles	10
6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase).....	10
7 Échantillons.....	10
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	10
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	10
8 Mode opératoire.....	10
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	10
8.2 Extraction de l'ADN génomique du parasite.....	10
8.3 Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR.....	11
8.3.1. Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)	11
8.3.2. Préparation des mélanges réactionnels.....	11
8.3.3. Visualisation des fragments PCR générés	12
9 Résultats	12
9.1 Contrôle de la validité des résultats	12
9.2 Cas des résultats négatifs	12
9.3 Contrôle de l'inhibition de la réaction par la réalisation d'une « PCR β - actine »	13
9.3.1 Amorces utilisées	13
9.3.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel PCR (Mix PCR)	13
9.3.3 Préparation des mélanges réactionnels.....	13
9.4 Expression des résultats	14
9.4.1 Conclusion analytique et interprétation de la PCR	14
9.4.2 Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la nosémose	14
10 Caractéristiques de performance de la méthode	15
Annexe	16
Bibliographie	17



Introduction

La nosébose est une pathologie des abeilles adultes entraînant des diarrhées et des affaiblissements de colonies parfois importants. Elle est causée par des parasites de la famille des microsporidés (*Microsporidae*) : *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 nosébose 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 méthode de recherche des spores de *Nosema* spp. par examen microscopique (cf. Méthode « Recherche de la nosébose : mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. par examen microscopique », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09) appliquée pour le diagnostic de cette maladie ne permet pas l'identification de l'espèce de *Nosema*. Il est donc nécessaire de compléter l'analyse en effectuant le typage par PCR des spores détectées en microscopie.



Avertissements et précautions de sécurité

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

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

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



1 Objet et domaine d'application

Cette instruction vise à identifier l'espèce de *Nosema* spp. (*Nosema apis* ou *Nosema ceranae*), suite au diagnostic réalisé par microscopie optique. Ce protocole est basé sur la détection d'une séquence de l'ARNr 16S du parasite, spécifique d'espèces, soit à partir des échantillons préparés selon la méthode OIE, soit directement à partir de broyats d'abeilles.

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

La technique utilisée est basée sur une PCR duplex décrite par Martin-Hernandez *et al.*, (2007), et reprise dans le manuel OIE (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal*, édition 2008. Office International des Epizooties - 12, rue de Prony - 75017 PARIS – France, pp 410 – 414).

Cependant, des problèmes de mise en évidence de *N. apis* en cas de forte présence de *N. ceranae* ayant été mis en évidence par le LNR Santé des abeilles, la technique est utilisée sous forme de deux PCR monoplexes afin d'éviter la non détection de l'agent *N. apis* dans le cas de co-infection.

Deux couples d'amorces sont utilisés, chaque couple étant spécifique de l'espèce ciblée.

La technique d'identification de l'espèce de *Nosema* par amplification se décompose en 4 étapes :

1. Préparation des échantillons d'abeilles.
2. Extraction de l'ADN génomique du parasite (*Nosema* spp.)
3. Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR
4. Interprétation et validation des résultats



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1 Eau

Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase.

5.2 Tampon phosphate

Tampon phosphate 0,01 M pH 7,0.

5.3 10X TAE Buffer

Kit de purification des ADN.

Cette méthode a été caractérisée et validée avec le kit High Pure PCR template preparation (Roche Diagnostics).

5.4 Kit d'amplification pour PCR conventionnelle

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

10X PCR Buffer, Minus Mg (200mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCL)	Invitrogen
MgCl ₂ , 50mM	Invitrogen
dNTP 10mM mix	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase 5u/μl	Invitrogen

Les amorces spécifiques pour le typage de *N. apis* et *N. ceranae*, en solution de travail à 20 μM, sont conservées à environ -18°C. Les séquences des amorces sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Amorce	Séquence ^a	Taille Produit de PCR (pb)	Spécificité
218 MITOC FOR	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219 ^b	<i>N. ceranae</i>
218 MITOC REV	5'-CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG-3'		
321 APIS FOR	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	<i>N. apis</i>
321 APIS REV	5'-GGGGGGCGGTTTAAATGTGAAACAACATG-3'		

Selon les références Martin-Hernandez *et al.*, (2007), et Manuel OIE 2008 :

(a) les bases CG ajoutées aux primers sont soulignées.

(b) Il y a une paire de base de différence entre les taille des produits PCR qui dépend des séquences de *N. ceranae* disponible sur la banque de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



5.5 Témoin positif de processus

Le témoin positif de processus permet de contrôler l'efficacité de l'extraction et de la PCR. Deux témoins d'extraction positifs sont nécessaires :

- Une suspension de spores de *N. ceranae* obtenue à partir de broyats d'abdomens ajustée à la limite de détection de la méthode multipliée par 10 (10x LDméthode). La dilution d'ajustement est réalisée dans un broyat d'abeilles indemnes de *Nosema*.
- Une suspension de spores de *N. apis* obtenue à partir de broyats d'abdomens ajustée à la limite de détection de la méthode multipliée par 10 (10x LDméthode). La dilution d'ajustement est réalisée dans un broyat d'abeilles indemnes de *Nosema*.

5.6 Témoin négatif de processus

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

5.7 Témoin positif de PCR

Il est nécessaire d'ajouter un témoin positif pour chaque PCR Monoplex :

- PCR *N. apis* : contrôle positif plasmidique *N. apis* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD_{PCR}) multipliée par 10.
- PCR *N. ceranae* contrôle positif plasmidique *N. ceranae* dilué à la concentration de la Limite de Détection PCR (LD_{PCR}) multipliée par 10.

5.8 Témoin négatif de PCR

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

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

6.1 Petit équipement de laboratoire

Micropipettes (0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl), agitateur de paillasse, centrifugeuse de microtubes, bain sec chauffant.



6.2 Thermocycleurs pour PCR conventionnelles

Par exemple : C1000 (Biorad), Nexus (Eppendorf).

6.3 Matériel de laboratoire (stériles, exempts de nucléase)

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

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

L'identification des espèces *N. apis* et *N. ceranae* est réalisée sur des échantillons positifs issus du diagnostic réalisé par microscopie optique. Ces échantillons sont constitués de broyats d'abdomen d'abeilles, filtrés et centrifugés. Le culot contenant les spores est remis en suspension et les spores sont dénombrées.

Si le résultat est positif en microscopie, l'échantillon sera transféré pour typage.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Le tube contenant la suspension de spores à typer est conservé :

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

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

Les échantillons positifs issus du diagnostic de la nosérose réalisé par microscopie optique sont conservés à la température adéquate (voir § 7.2) en attendant son traitement pour la détermination de l'espèce de *Nosema* par PCR. L'échantillon est donc une suspension d'abdomens de 10 abeilles broyés et filtrée. Cette suspension est à la concentration d'1 abeille / 1 ml.

Après une centrifugation de 6 minutes à 800g, le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 1,5 ml d'eau de qualité biologie moléculaire (DNase/RNase free).

8.2 Extraction de l'ADN génomique du parasite

La préparation des réactifs du kit et la purification des ADN sont réalisées sous hotte filtrante selon les instructions du fabricant (Kit High Pure PCR template preparation - Version Décembre 2008).

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



8.3 Amplification de l'ADN cible et analyse des produits de PCR

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

Deux mix réactionnels (*N. apis* et *N. ceranae*) doivent être préparés en parallèle selon les indications du tableau ci-dessous :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction Mix <i>N. apis</i> (Volume final : 25 µL)	Volume par réaction Mix <i>N. ceranae</i> (Volume final : 25 µL)
H2O	-	13,8	13,8
Tp Taq Pol 10X	1X	2,5	2,5
MgCl ₂ , 50mM	3mM	1,5	1,5
dNTP 10mM mix	400µM	1	1
Amorce 1 <i>N. apis</i> (20 µM)	400nM	0,5	-
Amorce 2 <i>N. apis</i> (20 µM)	400nM	0,5	-
Amorce 1 <i>N. ceranae</i> (20 µM)	400nM	-	0,5
Amorce 2 <i>N. ceranae</i> (20 µM)	400nM	-	0,5
Taq Pol 5U/µl	1U	0,2	0,2
ADN	-	5	5

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

8.3.2. Préparation des mélanges réactionnels

Les échantillons et témoins sont ajoutés dans une autre pièce à raison de 5 µl chacun :

- ADN des témoins positifs de processus (*N. apis* et *N. ceranae*),
- ADN du témoin négatif de processus,
- ADN des échantillons à analyser,
- Témoin négatif de PCR (eau),
- Témoins positifs de PCR (plasmide à 10xLD_{PCR}).

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur.

Le programme suivant est lancé :

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| • Dénaturation de l'ADN | 94°C pendant 2 minutes |
| • Amplification (35 cycles) | 94°C pendant 30 secondes |
| | 62°C pendant 30 secondes |
| | 72°C pendant 30 secondes |
| • Elongation finale | 72°C pendant 7 minutes |
| • Conservation des échantillons | 10°C |



8.3.3. Visualisation des fragments PCR générés

L'analyse des produits de PCR est réalisée en salle post-PCR. La visualisation des fragments se réalise après la séparation par électrophorèse dans un gel d'agarose de 1,2% suivi d'une coloration à l'aide d'un agent spécifique de l'ADN (exemple bromure d'éthidium).

Dans le cadre de ces deux PCR monoplex d'identification de l'espèce de *Nosema*, l'interprétation des résultats est basée sur la détection d'ADN cible des deux espèces (*N. apis* et *N. ceranae*) suivant la taille des produits de PCR générés. Dans le cas d'un échantillon typé *N. apis*, la taille du produit de PCR généré sera de 321 paires de bases. Dans le cas d'un échantillon typé *N. ceranae*, la taille du produit de PCR généré sera de 218 paires de bases (ou 219 paires de bases suivant la séquence).

Puit 1 : *N. ceranae* 218pb Puit 2 : *N. apis* 321pb
PM : Marqueur de taille moléculaire 100bp



9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

Un résultat d'identification de l'espèce de *Nosema* par PCR n'est considéré comme validé que si :

- Les témoins positifs d'extraction et de PCR sont bien positifs,
- Les témoins négatifs d'extraction et de PCR sont bien négatifs.

9.2 Cas des résultats négatifs

En cas de résultat négatif de l'identification pour les deux agents sur un même échantillon dans lequel des spores de *Nosema* ont été visualisées, il est nécessaire de s'assurer de l'absence d'inhibiteur de PCR dans l'extrait qui pourrait conduire à un résultat « faussement négatif ». Une PCR β -actine (voir protocole §9.3) est donc réalisée afin de mettre en évidence la présence du gène de la β -Actine spécifique de l'espèce *Apis mellifera*, correspondant à un témoin positif endogène non cible.



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

9.3.1 Amorces utilisées

Amorce	Séquence	Taille Produit de PCR (pb)	Spécificité
A.m-actin-L	5'-AGGAATGGAAGCTTGC GGTA-3'	181	β - actine, <i>Apis mellifera</i>
A.m-actin-R	5'-AATTTTCATGGTGGATGGTGC-3'		

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

Le mix réactionnel est réalisé selon les indications du tableau ci-après :

Réactifs	Concentration finale	Volume par réaction (volume final : 25 μ L)
H2O	-	17,55
Tp Taq Pol 10X	1X	2,5
MgCl ₂ , 50mM	1,5mM	0,75
dNTP 10mM mix	200 μ M	0,5
Amorce 1 (20 μ M)	400nM	0,5
Amorce 2 (20 μ M)	400nM	0,5
Taq Pol 5U/ μ l	1U	0,2
ADN	-	2,5

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

9.3.3 Préparation des mélanges réactionnels

Les échantillons et témoins sont ajoutés dans une autre pièce à raison de 2,5 μ l chacun :

- ADN des témoins positifs de processus (*N.apis* et *N.ceranae*),
- ADN du témoin négatif de processus,
- ADN des échantillons à analyser,
- Témoin négatif PCR (eau),
- Témoins positifs PCR (plasmide O6 à 10xLD_{PCR}).

Les tubes sont centrifugés brièvement, puis sont placés dans le bloc du thermocycleur.

Le programme suivant est lancé :

- Dénaturation de l'ADN 94°C pendant 2 minutes
- Amplification (30 cycles) 94°C pendant 30 secondes
60°C pendant 30 secondes
72°C pendant 15 secondes
- Elongation finale 72°C pendant 5 minutes
- Conservation des échantillons 10°C



Si la présence du gène de la β -actine est confirmée, le résultat négatif de l'échantillon analysé est confirmé. Dans le cas contraire, il faut refaire les PCR en diluant l'échantillon ou ré-extraire l'échantillon en question.

9.4 Expression des résultats

9.4.1 Conclusion analytique et interprétation de la PCR

Résultat de la PCR <i>N. apis</i>	Résultat de la PCR <i>N. ceranae</i>	Résultat de la PCR β -actine	Interprétation
Négatif	Négatif	Négatif	Echantillon inhibé, pas d'identification possible
Négatif	Négatif	Positif	Aucune identification de <i>N. apis</i> , ni de <i>N. ceranae</i>
Négatif	Positif	/	Identification de <i>N. ceranae</i> positive, pas d'identification de <i>N. apis</i>
Positif	Négatif	/	Identification de <i>N. apis</i> positive, pas d'identification de <i>N. ceranae</i>
Positif	Positif	/	Identification de <i>N. apis</i> et <i>N. ceranae</i> positive

/ : Non réalisé

En cas de doute sur l'identification de *Nosema* spp., notamment dans le cas d'une taille d'amplicon anormale, l'amplicon obtenu pourra être séquencé.

9.4.2 Conclusion analytique et interprétation de la recherche de la nosérose

La conclusion analytique, prenant en compte les deux analyses, est portée de la façon suivante :

Résultat de l'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 nosérose 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	/	Infection par <i>Nosema</i> spp.

/ : Non réalisé

Une interprétation du résultat analytique pourra être 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 (cf. Méthode « Recherche de la nosérose : mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. par examen microscopique », ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09).



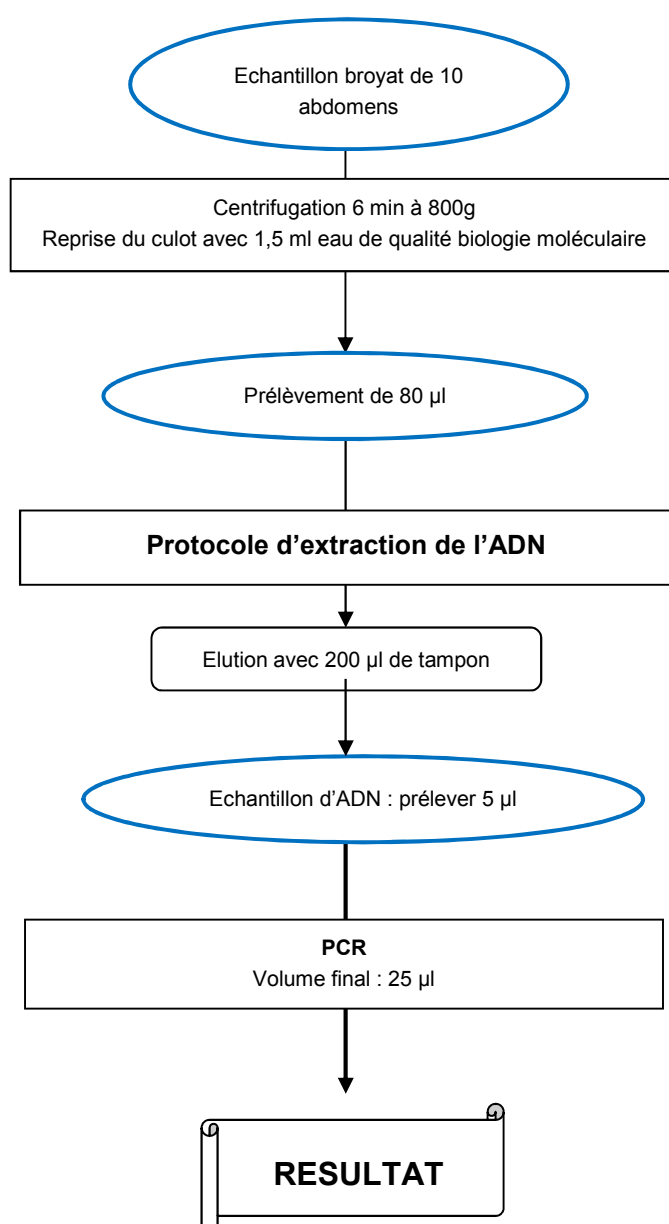
10 Caractéristiques de performance de la méthode

Critères	Critères de validité attendus	Performances observées
Spécificité analytique	100%	100%
Limite de détection PCR	-	* <i>N. apis</i> : 200 copies / réaction * <i>N. ceranae</i> : 1 300 copies / réaction
Limite de détection de la méthode	-	* <i>N. apis</i> : 376 spores / réaction * <i>N. ceranae</i> : 46 spores / réaction
Sensibilité diagnostique	≥ 90%	99%
Spécificité diagnostique	-	Remarque : la méthode PCR étant mise en œuvre uniquement sur les échantillons positifs en microscopie, ce critère n'a pas été évalué.



Annexe

Synoptique de la méthode d'identification de l'espèce de *Nosema* par PCR sur broyat d'abdomens





Bibliographie

1. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
2. Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., & Undeen, A. H., 1994. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. J. Invertebr. Pathol. 64, 100-106.
3. Bourgeois, A.L., Rinderer, T.E., Beaman, L.D., Danka, R.G., 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. J. Invertebr. Pathol. 103, 53-58.
4. Chauzat, M.P., Higes, M., Martin, R., Meana, A. & Faucon, J.P, 2006. *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in France: co-infections in honey bee colonies. Proceedings of the Second European Conference of Apidology 2006, 30.
5. Chauzat, M.-P., Blanchard, Ph., Ribière, M., Celle, O., Villier A., 2009. Rapport Afssa : Etude co-financée par le programme apicole communautaire. Lutte contre la varroase et les maladies associée. *Nosema apis* et *Nosema ceranae*, 2 agents pathogènes de l'abeille : mise en place de tests moléculaires discriminants et essais d'infection. Rapport Final, pp 1-19.
6. Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S., 2008. *Nosema ceranae* is a long present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J. Invertebr. Pathol. 97, 186-188.
7. Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J., 1996. *Nosema ceranae* (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). European Journal of Protistology 32, 356-365.
8. Fries I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), J. Invertebr. Pathol. 103, 73-79.
9. Gatehouse, H. S. & Malone, L. A., 1998. The Ribosomal RNA Gene Region of *Nosema apis* (Microspora): DNA Sequence for Small and Large Subunit rRNA Genes and Evidence of a Large Tandem Repeat Unit Size. J. Invertebr. Pathol. 71, 97-105.
10. Higes, M., Martin, R., & Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J. Invertebr. Pathol. 92, 93-95.
11. Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., & Wang, C. H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie 38, 30-37.
12. Klee, J., Tek, T. W., & Paxton, R. J., 2006. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporida: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. J. Invertebr. Pathol. 91, 98-104.
13. Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., &



- Paxton, R. J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96, 1-10.
14. Malone, L. A., Broadwell, A. H., Lindridge, E. T., McIvor, C. A., & Ninham, J. A., 1994. Ribosomal RNA Genes of two microsporidia, *Nosema apis* and *Vavraia oncoperae*, are very variable. J. Invertebr. Pathol. 64, 151-152.
 15. Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., & Higes, M., 2007. The outcome of the colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6331-6338.
 16. 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.
 17. Office Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2010. Principles and Methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. Chapter 1.1.5.
 18. Ritter, W., 2008. Nosemosis of honey bees. In: O.I.E Standards Commission (Ed.), Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Paris, pp.410-414.
 19. Webster, T. C., Pomper, K. W., Hunt, G., Thacker, E. M., & Jones, S. C., 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. Apidologie 35, 49-54.