

## Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.09 - Version 07

Avril 2020

# 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 – Bee Health





## Historique de la méthode

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

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

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

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

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V04	Révision mineure	25/04/2016	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-11.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.
V06	Révision mineure	24/07/2019	Mise à jour éditoriale : nouvelle trame Anses. Ajout de précisions : <ul style="list-style-type: none"><li>- Ajout de la possibilité d'utiliser une micropipette pour faire l'étalement sur lame : § 6, § 8.1.</li><li>- Taille des spores de <i>Nosema</i> (meilleure prise en compte des dimensions extrêmes de spores de <i>N. ceranae</i>) : § introduction, § 8.3.</li><li>- Meilleure prise en compte des cas « ininterprétables » et de l'importance de la qualité de l'échantillon à réception : § 7.1, § 8.3, § 9.2.</li><li>- Modalités de présentation des résultats analytiques sur le rapport d'analyse et avis-interprétations : § 9.2.</li><li>- Ajout de références bibliographiques et documents de référence : § 2.</li></ul>
V07	Révision mineure	01/04/2020	Correction d'une erreur de copier-coller : § 7.3 Ajout de précisions : <ul style="list-style-type: none"><li>- Cas où de rares spores sont détectées en dehors de la zone de comptage sur la cellule de Malassez : § 8.2 et § 9.2</li><li>- Concernant les avis et interprétations : § 9.3</li><li>- Ajout d'une référence bibliographique</li></ul>



## Avant-propos

La présente méthode a été optimisée par :

**Anses - Laboratoire de Sophia Antipolis**

Laboratoire national de référence sur la santé des abeilles

European Reference Laboratory for Bee Health

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

Contact : [lnr.abeille@anses.fr](mailto:lnr.abeille@anses.fr)



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>3</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>5</b>
<b>Avertissements et précautions de sécurité</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Objet et domaine d'application</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Documents de référence</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Termes, sigles et définitions</b> .....	<b>7</b>
<b>4. Principe de la méthode</b> .....	<b>7</b>
<b>5. Réactifs</b> .....	<b>8</b>
5.1 Eau.....	8
<b>6. Appareillage et matériels</b> .....	<b>9</b>
<b>7. Échantillons</b> .....	<b>9</b>
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons .....	9
7.2 Conservation des échantillons avant analyse .....	10
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse .....	10
<b>8. Mode opératoire</b> .....	<b>10</b>
8.1 Mise en évidence de la présence de <i>Nosema</i> spp. : examen qualitatif .....	10
8.2 Dénombrement des spores <i>Nosema</i> spp. : analyse quantitative.....	10
8.3 Description de l'agent pathogène .....	12
<b>9. Résultats</b> .....	<b>13</b>
9.1 Contrôle de la validité des résultats .....	13
9.2 Calculs et expression des résultats .....	13
9.3 Interprétation et avis sur les résultats .....	14
<b>10. Caractéristiques de performance de la méthode</b> .....	<b>15</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>16</b>

### Table des figures

<b>FIGURE 1 - LOGIGRAMME DE LA METHODE</b> .....	<b>8</b>
<b>FIGURE 2 - SPORES DE NOSEMA SPP. EN MICROSCOPE SUR CELLULE DE MALASSEZ (X 400)</b> .....	<b>12</b>



## Introduction

La nosérose 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.

Les spores de *N. ceranae* sont en moyenne plus petites que celles de *N. apis* (Fries, 2013) :

- *N. ceranae* : environ 4.7 x 2.7 µm. Selon Chen (2009), leur taille varie de 3.9–5.3 µm de long à 2.0–2.5 µm de large.
- *N. apis* : environ 6 x 3 µm.

La nosérose 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 nosérose 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 / méthode ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11).



## **Avertissements et précautions de sécurité**

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

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

**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

La méthode décrite est une technique de diagnostic de la nosérose 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 Epizootie (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. Documents de référence

- [1] Organisation Mondiale pour la Santé Animale (OIE), 2008. Nosérose des abeilles mellifères. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre 2.2.4, pp. 448-453.
- [2] Méthode interne du LNR Santé des abeilles : ANA-I1.MOA.09. Recherche de la nosérose - Mise en évidence et quantification de *Nosema* spp. (méthode OIE 2008).
- [3] Méthode officielle du LNR Santé des abeilles : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11. Identification de l'espèce de *Nosema* par PCR.

## 3. Termes, sigles et définitions

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

LNR : Laboratoire National de Référence.

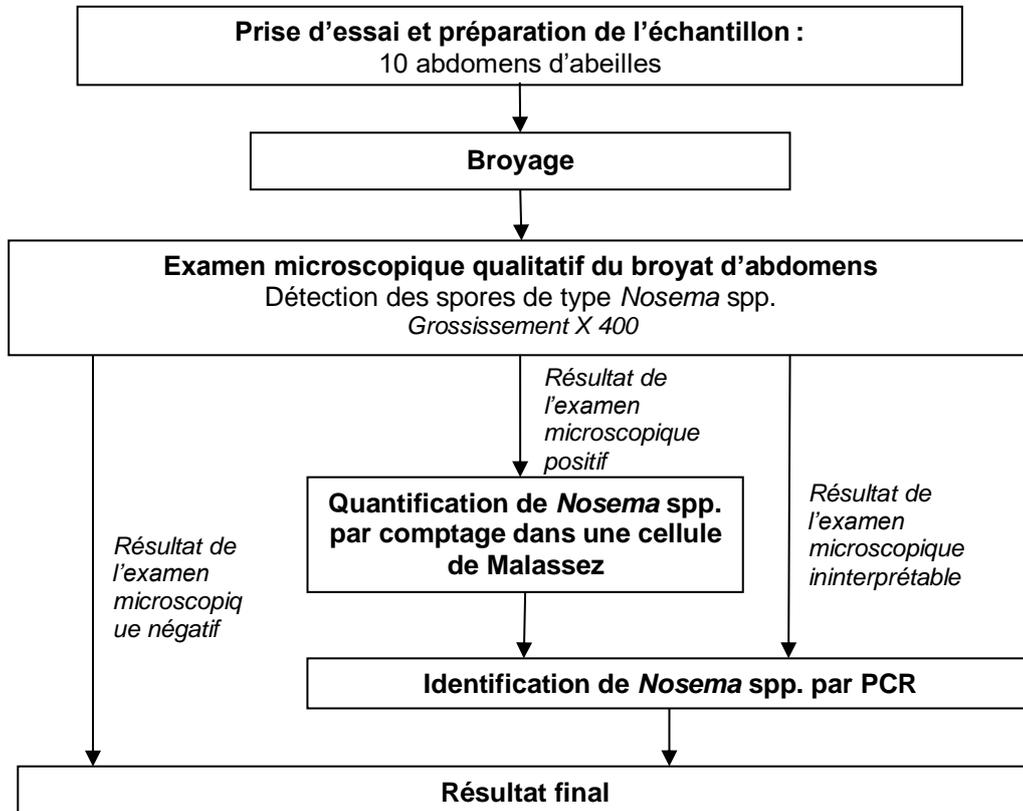
PCR : Réaction en chaîne par polymérase.

## 4. 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.



**Figure 1 - Logigramme de la méthode**



## 5. Réactifs

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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

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



## 6. Appareillage et matériels

**Avertissement :** Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient 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 ou micropipette
- Tube à centrifuger (50 ml)
- Toile de filtration en coton
- Vortex
- Microscope optique (x 400)
- Compteur d'impulsions
- Centrifugeuse
- Gants de laboratoire

## 7. Échantillons

### 7.1 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 conservation (décomposition, présence de moisissures notamment).

En effet, la présence de champignons microscopiques (autres que *Nosema*) ou de levures peut rendre difficile l'identification et le comptage des spores des *Nosema* spp..



## 7.2 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.

## 7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Après l'analyse effectuée, les échantillons (abeilles ou broyat d'abdomens) doivent être conservés en condition de congélation à environ – 20 °C.

# 8. Mode opératoire

## 8.1 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 ou d'une micropipette, 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.

## 8.2 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

Éliminer 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**

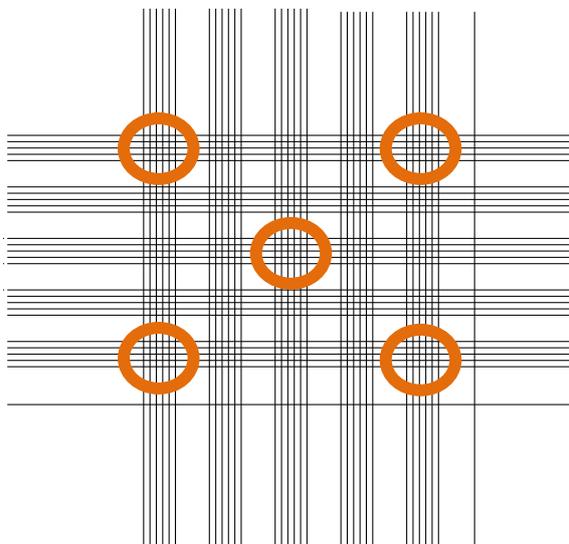
Humidifier légèrement avec le bout du doigt passé sous l'eau les deux plats encadrant la surface quadrillée d'une cellule de Malassez.

Poser délicatement la lamelle et appuyer.

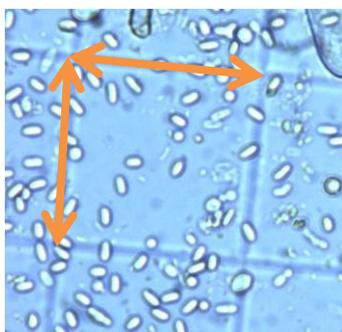
Attendre une trentaine de secondes pour le séchage.

Prélever avec une micropipette ou une pipette pasteur une quantité de solution comprise entre 20 et 30  $\mu\text{l}$ . 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 :  **$N = [n] \times 10^5$  spores / abeille**



Notes :

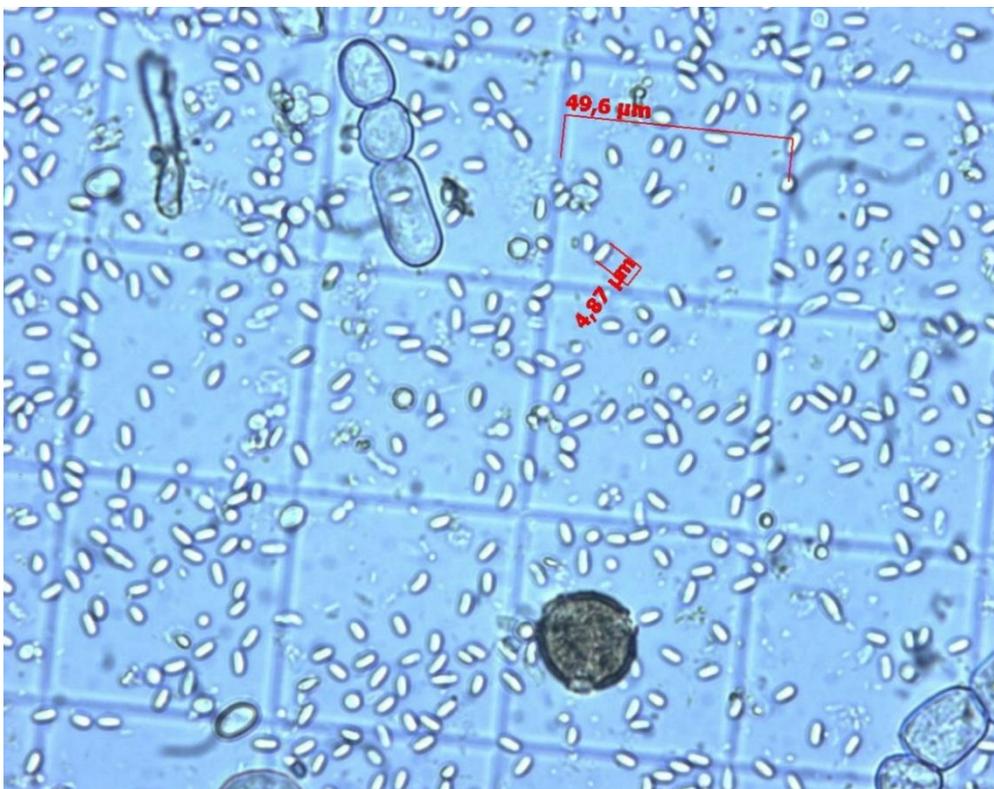
- Il est possible d'effectuer deux comptages sur cellules de Malassez, à partir de deux prises d'essais réalisées sur le broyat d'abdomens. Dans ce cas, le résultat final de l'analyse est la moyenne de ces deux comptages.
- Dans le cas où des spores sont détectées mais non quantifiables, c'est-à-dire en présence de rares spores en dehors des zones de comptage de la cellule, le résultat analytique à indiquer sera : < 2E+04 spores / abeille (la charge de 2E+04 correspondant à la détection d'une spore sur la zone de comptage).

### 8.3 Description de l'agent pathogène

La spore a une forme ovale et mesure une taille d'environ 4 à 7 x 2 à 4 µm. Elle est optiquement vide et réfringente (figure 2).

Les spores de *Nosema* doivent être différenciées d'autres champignons microscopiques (présents par exemple en cas de moisissures), des levures ou autres particules, susceptibles également d'être présents dans les abeilles analysées.

*Figure 2 - Spores de Nosema spp. en microscopie sur cellule de Malassez (x 400)*





## 9. Résultats

### 9.1 Contrôle de la validité des résultats

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.

### 9.2 Calculs et expression des résultats

- Examen qualitatif

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

Résultat de l'examen microscopique	Expression du résultat 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.	Détectées
Absence de spores de <i>Nosema</i> spp.	Non détectées
Interprétation difficile (présence d'éléments susceptibles d'être confondus avec <i>Nosema</i> )	Ininterprétable

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 (méthode ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11).

- Examen quantitatif

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

Après examen quantitatif	Expression du résultat dans le rapport d'analyses Paramètre de l'analyse = Nombre de spores de <i>Nosema</i> spp. par abeille
Comptage réalisé (résultat qualitatif positif) : indiquer le nombre N de spores par abeille	N  (ou < 2E+04 spores par abeille dans le cas où uniquement de rares spores sont détectées en dehors de la zone de comptage)
Absence de spores de <i>Nosema</i> spp.	Sans objet
Résultat ininterprétable	Sans objet

En cas de résultat positif, une discrimination entre *N. apis* – *N. ceranae* pourra être effectuée en biologie moléculaire par PCR (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11).



• **Cas particulier : résultats ininterprétables**

En cas de résultat ininterprétable (présence d'éléments susceptibles d'être confondus avec *Nosema*), la démarche suivante sera mise en œuvre :

- 1) Si la quantité d'échantillon est suffisante : refaire une analyse avec 10 nouvelles abeilles.
- 2) Si le résultat demeure ininterprétable ou si une nouvelle analyse n'est pas possible, effectuer un comptage du nombre d'éléments microscopiques susceptibles d'être confondus avec *Nosema*.
- 3) Si la charge évaluée est :
  - supérieure  $2 \times 10^4$  / abeille (soit environ la limite de détection de la PCR) : une analyse moléculaire pourra être réalisée pour confirmer l'identification de *Nosema* ;
  - inférieure  $2 \times 10^4$  / abeille : le nombre d'éléments microscopiques « ininterprétables » étant inférieur à la limite de détection de la méthode PCR, l'analyse moléculaire ne permettra pas de confirmer l'identification de *Nosema*. Cette charge étant faible, elle peut être considérée comme non significative d'un point de vue diagnostique et non explicative des troubles observés sur le rucher (cf. paragraphe suivant).

**9.3 Interprétation et avis sur les résultats**

L'interprétation, qui prend en compte les résultats de la PCR (ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.11), est donnée de la façon suivante :

		Résultat PCR					
		An. non réalisée	Non détecté	<i>N. apis</i> détecté	<i>N. ceranae</i> détecté	<i>N. apis</i> et <i>N. ceranae</i> détectés	PCR Inhibée
Résultat examen microscopique	Non détecté	(1)	/	/	/	/	/
	Détecté < $2 \times 10^4$ sp./ab.	(2)	/	/	/	/	/
	Détecté > $2 \times 10^4$ sp./ab.	(2)	(1) (3)	(4)	(5)	(6)	(7)
	Ininterprétable	(8)	(1) (3)	(4)	(5)	(6)	(9)
	An. non réalisée	/	(1)	(4)	(5)	(6)	(9)

Remarque : la charge de  $2 \times 10^4$  sp./ab. correspond au seuil de limite de détection de la PCR.

- (1) : « Recherche de la nosérose négative. »
- (2) : « Infection par *Nosema* spp. »
- (3) : « *Nosema apis* et *Nosema ceranae* non identifiés. »
- (4) : « Infection par *Nosema apis*. »



(5) : « Infection par *Nosema ceranae*. »

(6) : « Infection par *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. »

(7) : « Infection par *Nosema* spp. Identification de l'espèce de *Nosema* non possible (réaction de PCR inhibée). »

(8) : « Résultat de la recherche de la nosérose non interprétable. »

(9) : « Résultat de la recherche de la nosérose non interprétable (réaction de PCR inhibée). »

Un avis sur le résultat analytique pourra être donné 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 la nosérose à *Nosema apis* sont les suivants (Fernandez et al., 2007)

:

- Abeilles mortes devant et/ou autour de la ruche,
- Et/ou abeilles traînantes.
- Dépopulation constatée (manque d'abeilles pour couvrir le couvain),
- 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 nosérose 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 nosérose 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).

Il est de plus à souligner que la nosérose à *N. apis* est devenue très rare en France (Hendrikx et al., 2015). Seule la nosérose à *N. apis* est classée comme danger sanitaire de catégorie 1 dans la réglementation française.

La pathogénicité de *N. ceranae* est quant à elle 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).

## 10. Caractéristiques de performance de la méthode

Méthode validée par l'usage.



## Bibliographie

Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.

Chen, Y. P., J. D. Evans, C. Murphy, R. Gutell, M. Zuker, D. Gundensen-Rindal, and J. S. Pettis. 2009. "Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*." *J Eukaryot Microbiol* 56 (2):142-7. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x.

Fernandez N., Coineau Y., 2007. Maladies, parasites et autres ennemis de l'abeille mellifère. Paris: Atlantica, 498 pp.

Fries, Ingemar, Marie-Pierre Chauzat, Yan-Ping Chen, Vincent Doublet, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Mariano Higes, Dino P. McMahon, Raquel Martín-Hernández, Myrsini Natsopoulou, Robert J. Paxton, Gina Tanner, Thomas C. Webster, and Geoffrey R. Williams. 2013. "Standard methods for *Nosema* research." *Journal of Apicultural Research* 52 (1):1-28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14.

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 Epidémiologique en Santé Animale-Alimentation* 70(5): 1.