



Préparation et examen d'échantillons d'abeilles pour la détection de spores de *Nosema*

Traduction d'un article de Rogers, Bishop et Mac Kenzie
des laboratoires Wildwood Labs Inc.

Introduction

La nosérose affecte les abeilles adultes. Elle est causée par un protozoaire, *Nosema apis*, microorganisme unicellulaire qui infecte l'épithélium de la paroi digestive de l'abeille adulte. *Nosema* forme des spores résistantes qui restent viables pendant de longues durées. L'infection peut aboutir à des diarrhées, des ailes tremblantes, une incapacité à voler et un déclin de la colonie jusqu'à sa disparition. Bien que la nosérose soit trouvée dans la plupart des régions apicoles, elle est principalement un problème dans les zones de climat tempéré

caractérisées par de longs printemps frais. La nosérose est une des maladies qui, non détectée, peut détruire une colonie à la fin de l'hiver ou au début du printemps.

Les apiculteurs sont souvent trop confiants vis-à-vis des symptômes et des conséquences de la nosérose. La dysenterie peut être causée par *Nosema*. Ce symptôme est facile à détecter au printemps, mais il est alors souvent trop tard pour empêcher le dépérissement et la perte d'abeilles associée à cette infection.



Peu d'apiculteurs ont les outils ou le temps de détecter les spores de *Nosema* pour avoir des informations en temps réel et pouvoir prendre les décisions nécessaires à la gestion de la nosérose. Le protocole suivant de diagnostic et de quantification des spores de *Nosema* est inspiré de nombreuses publications. Des modifications concernant les différentes étapes ont été réalisées à partir de notre propre expérience. Nous espérons que les apiculteurs

trouveront ces informations utiles pour améliorer la surveillance de *Nosema* au sein de leurs ruchers.

Vos commentaires et suggestions pour améliorer ce protocole seront appréciées. Envoyez les à nosema@wildwoodlabs.com. Wildwood Labs Inc propose également un service de détection de *Nosema* pour les apiculteurs et les chercheurs qui ont de nombreux prélèvements à réaliser.

Matériel

- Alcool éthylique à 70 et 90%
- Lampe à alcool
- Mortier et pilon
- Seringue de 10 mL
- Hémocytomètre et lamelles
- Microscope
- Flacons de 10 mL
- Inoculateurs anses plastiques de 0,01 mL (10 µL)
- Eau
- Gants de latex ou vinyle
- Pincettes (à bords mousses et pointues)
- Plateau en plastique
- Papier de nettoyage pour optique de microscope
- Lingettes Kimwipes™

Méthode

Préparation des échantillons :

1. Rincer le mortier, le pilon et flacon avec de l'alcool à 70%. Laisser sécher à l'air libre.
2. Tremper les pincettes dans de l'alcool à 70% et passer à la flamme (lampe à alcool, alcool 95%)
3. Mettre les gants.
4. Prélever 10 abeilles du sac de l'échantillon et les déposer sur le plateau. N'UTILISEZ PAS de jeunes abeilles.
5. Avec la pincette, retirer les abdomens et les placer dans le mortier. Placer la tête et le thorax dans un sac en plastique.
6. Prélever 10 mL d'eau distillée avec la seringue et en verser une petite partie dans le mortier avec les abdomens.
7. Ecraser précautionneusement et consciencieusement les abdomens.
8. Après écrasement, ajouter le reste des 10 ml d'eau distillée.
9. Retirer les gros débris à la pincette, vous les placerez dans le sac de plastique avec les têtes.
10. Verser le contenu du mortier dans un flacon de 10 ml, que vous étiquetterez..
11. Retirer les gants.
12. Rincer le mortier et le pilon à l'eau distillée et sécher avec les lingettes de papier.
13. Recommencer le protocole pour chaque échantillon.



Technique d'examen microscopique

1. Tremper l'hémocytomètre et une lamelle dans de l'alcool à 70% et essuyer avec les lingettes KimWipes™.
2. Nettoyer avec du papier à optiques pour retirer la poussière.
3. Placer la lamelle sur l'hémocytomètre.
4. Retourner le flacon de prélèvement 15 fois, de façon à obtenir une suspension homogène.
5. Sortir l'inoculateur de 0,01 mL de son emballage stérile et la tremper dans la suspension. Ressortir l'anse avec précautions sans toucher les bords du flacon.
6. Toucher avec l'anse le bord de la lamelle sur l'hémocytomètre. La suspension présente sur l'anse doit diffuser par capillarité sous la lamelle et recouvrir ainsi la grille de l'hémocytomètre.



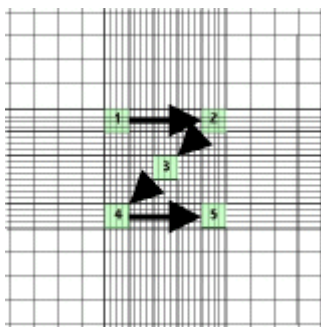
7. Laisser l'échantillon reposer quelques secondes.
8. Placer l'hémocytomètre sous le microscope et centrer sur la grille à l'objectif x 10. Une fois la grille centrée, passer à l'objectif x 40 pour compter les spores.



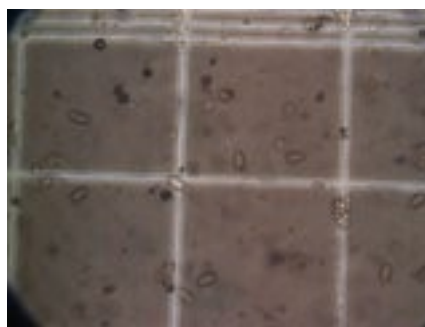
9. Compter 5 blocs de 16 carrés (les quatre blocs des coins et celui du centre).



10. La façon de compter doit être la même pour chaque échantillon (voir la figure ci-dessous).



11. Compter toutes les spores de chacun des 5 blocs entourés par une triple ligne, mais ne compter que les spores qui touchent les triples lignes du haut et de gauche : NE PAS compter celles qui touchent les lignes de droite et du bas.



12. En utilisant l'équation suivante, calculer le nombre de spores par abeille.

$$\text{Spores par abeille} = [(\text{Bloc 1} + \dots + \text{bloc 5}) / 80] \times 4 \times 10^6$$

Interprétation des résultats

La charge parasitaire par abeille peut être très variable et il n'y a pas de seuil établi pour mettre en place un traitement. Les infections sont normalement minimales en septembre et en octobre avec des infections de l'ordre de 0 à 1 million de spores par abeille. Des comptages plus importants durant ces mois aboutissent de manière certaine à des problèmes majeurs. Les spores sont normalement les plus abondantes pendant le printemps. Des comptages supérieurs à 12 millions d'abeilles ont été enregistrés. La magnitude des comptages est certainement plus importante que le dénombrement précis des spores. Par exemple, des comptages qui

diffèrent de quelques milliers, voire de dizaines de milliers peuvent être considérés comme similaires. Des comptages différents de quelques millions sont plus certainement différents.

Idéalement, il serait utile de faire ce comptage trois fois par an : printemps, été et automne. Cela pourrait aider les apiculteurs à déterminer la tendance de l'infection par *Nosema* et évaluer l'efficacité des stratégies de contrôle de *Nosema*. Au moins, les comptages de printemps et d'automne apportent de bonnes informations pour la prise de décision.