



Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.07 - Version 4

Juin 2017

Recherche de la varroose sur abeilles et/ou couvain par examen lésionnel et mise en évidence de *Varroa destructor*

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 4	Révision mineure	01/06/2017	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses à la méthode ANA-I1.MOA.07 - révision 4 du LNR santé des abeilles.



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
2 Documents de référence	7
3 Termes, sigles et définitions	7
4 Principe de la méthode	7
5 Réactifs	7
6 Appareillage et matériels	7
7 Échantillons.....	8
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	8
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	8
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	8
8 Mode opératoire	8
8.1 Examen lésionnel	8
8.1.1 Examen des abeilles.....	8
8.1.2 Examen du couvain	8
8.2 Mise en évidence de l'acarien <i>Varroa destructor</i>	9
8.2.1 Détection de l'acarien.....	9
8.2.2 Identification de <i>Varroa destructor</i>	9
9 Résultats	11
9.1 Contrôle de la validité des résultats	11
9.2 Calculs et expression des résultats	11
9.2.1 Mise en évidence de l'acarien <i>Varroa destructor</i>	11
9.2.2 Recherche de la varroose	11
9.2.3 Conclusion analytique et interprétation	12
10 Caractéristiques de performance de la méthode	12
Bibliographie	13



Introduction

La varroose est une maladie qui affecte les abeilles adultes et leur couvain. Elle est à l'origine d'affaiblissement et de mortalités de colonies d'abeilles. La varroose est causée par un acarien ectoparasite, *Varroa destructor* Anderson et Trueman, 2000, qui se multiplie dans le couvain. Il perce l'enveloppe tégumentaire des larves et la membrane inter segmentaire de l'abeille adulte afin de se nourrir d'hémolymphe.

L'acarien est par ailleurs le vecteur de différents virus, en particulier du virus des ailes déformées et du virus de la paralysie aigue de l'abeille, pour qui il constitue un vecteur actif (multiplication du virus dans *Varroa*). De par son action spoliatrice en protéines, *V. destructor* est également un facteur favorisant de la loque européenne (maladie d'origine bactérienne affectant le couvain d'abeilles). *Varroa* est un facteur d'affaiblissement important pour les colonies, pouvant favoriser le développement d'autres maladies.

L'infestation se propage par contact direct entre abeilles adultes et à la faveur des déplacements d'abeilles et de couvain infestés. Le nombre de parasites s'accroît progressivement avec le développement du couvain et l'augmentation de la population d'abeilles dans la colonie. Les signes cliniques apparaissent plus particulièrement en fin de saison apicole (août - septembre).

La varroose est une maladie enzootique en France métropolitaine. Elle est classée comme danger sanitaire de deuxième catégorie pour les abeilles dans la réglementation française et fait partie de la liste des maladies de l'Organisation Mondiale pour la Santé Animale / Office International des Epizooties (OIE).

La présente méthode décrit une technique de diagnostic de la varroose par examen des lésions observées sur un échantillon d'abeilles ou de couvain. L'examen s'appuie également sur la mise en évidence de *V. destructor*.



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 matériels susceptibles d'être contaminants : le laboratoire doit mettre en œuvre des mesures prenant en compte ces risques pour garantir la non dissémination dans l'environnement de *Varroa* spp., ou autre agents pathogènes éventuellement présent dans les échantillons analysés.



1 Objet et domaine d'application

La méthode décrite est une technique de diagnostic de la varroose basée sur l'examen visuel d'un échantillon de couvain et / ou d'abeilles issu d'une une colonie suspecte d'être atteinte par cette maladie. Il s'agit d'une méthode interne du Laboratoire National de Référence (LNR) sur la santé des abeilles.

2 Documents de référence

Sans objet.

3 Termes, sigles et définitions

OIE : Office International des Epizooties.

LNR : Laboratoire National de Référence.

4 Principe de la méthode

La méthode s'appuie sur :

- D'une part, sur la mise en évidence de l'acarien *V. destructor* par examen visuel direct de l'échantillon d'abeilles et/ou de couvain ;
- D'autre part, sur l'examen des lésions présentes sur l'échantillon, permettant de statuer sur la varroose « maladie », stade où l'infestation parasitaire a des conséquences cliniques sur la colonie.

Les signes cliniques de la varroose (résultat de l'infestation par *V. destructor* et des virus dont il est le vecteur) ne sont visibles que dans les derniers stades de la maladie. La complémentarité des lésions observées sur un échantillon d'abeilles et de couvain provenant d'une même colonie permet de conclure à une pression parasitaire passée ou présente trop forte.

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.

Sans objet.

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.

- Pinces à pointes fines,
- Lampe à lumière froide,



- Loupe avec graduation millimétrique ou loupe binoculaire.

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.

Les échantillons reçus pour la recherche de la varroose sont de deux natures :

- morceau de couvain d'une taille d'au moins 10 x 10 cm, non écrasé, présentant des alvéoles atteintes ;
- échantillon d'abeilles symptomatiques d'au moins 20 abeilles adultes.

Les échantillons en état de décomposition ainsi que les échantillons de couvains vides ne sont pas recevables pour l'examen.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant 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 analyse, les échantillons sont conservés en congélation à environ -20°C.

8 Mode opératoire

L'examen de l'échantillon de couvain ou d'abeilles adultes est réalisé par observation visuelle directe à l'œil nu et à l'aide de la loupe, et vise à :

- Mettre en évidence la présence de lésions associées à la maladie ;
- Mettre en évidence la présence de *V. destructor*.

8.1 Examen lésionnel

8.1.1 Examen des abeilles

L'examen vise à mettre en évidence *V. destructor* (formes adultes ou immatures) et les lésions de varroose suivantes :

1	Abeilles aux ailes déformées et/ou atrophiées
2	Abeilles à l'abdomen rétréci
3	Présence de parasites (femelles phorétiques)

8.1.2 Examen du couvain

Pour identifier les lésions de la maladie, il faut considérer l'aspect général du couvain et l'examen des alvéoles douteuses.



L'identification des lésions demande la connaissance préalable de la conformation d'un couvain sain.

L'examen vise à mettre en évidence *V. destructor* (formes adultes ou immatures) et les lésions de varroose suivantes :

1	Couvain en mosaïque
2	Présence de parasites (femelles fondatrice de couleur marron ; protonymphes et deutonymphes de couleur blanche)
3	Opercules percés d'un petit trou (en plus ou moins grand nombre)
4	Cadavres de larves de couleur marron clair à brun (absence du caractère filant de la loque américaine)
5	Cadavres de larves et/ou nymphes desséchés
6	Abeilles et ou nymphes mortes avec les ailes déformées sous l'opercule dans les alvéoles
7	Cannibalisme
8	Abeilles mortes lors de la sortie de l'alvéole (seule la tête émerge, la langue tirée)

Un diagnostic différentiel devra être conduit avec les autres maladies du couvain (ex : loques, viroses).

8.2 Mise en évidence de l'acarien *Varroa destructor*

8.2.1 Détection de l'acarien

Nota bene : Avant l'analyse, vérifier visuellement la présence éventuelle d'acariens dans les déchets contenus dans l'emballage dans lequel était placé l'échantillon (congélation et transport font fréquemment tomber les varroas phorétiques).

Examiner l'échantillon d'abeilles (toutes les abeilles ou au minimum 30 si l'échantillon comporte plus de 30 abeilles).

Désoperculer les cellules du couvain (toutes ou au minimum 30 si l'échantillon comporte plus de 30 cellules) pour les examiner.

Remarque : privilégier l'examen du couvain de faux-bourçons, si présent dans l'échantillon reçu (*Varroa* se multiplie en effet de façon préférentielle dans ce type de cellules).

8.2.2 Identification de *Varroa destructor*

Le parasite est présent sur les abeilles adultes (varroas phorétiques) et/ou dans le couvain operculé.

Il est visible à l'œil nu et mesurable à la loupe binoculaire.

La femelle est la forme de dissémination de la maladie (Fig. 1). Elle est aplatie dorso-ventralement et possède quatre paires de pattes musculeuses. La première paire ressemble à des antennes et aurait une fonction olfactive. Son appareil buccal est spécialisé pour la prise d'hémolymphe. Son corps est plus large que long (ratio de la largeur sur la hauteur supérieur à 1.4) (Dietemann, Nazzi et al. 2013) (Fig. 1).



Figure 1 – *Varroa* femelle sur le thorax d'une abeille adulte.

Source : Anses, Sophia Antipolis

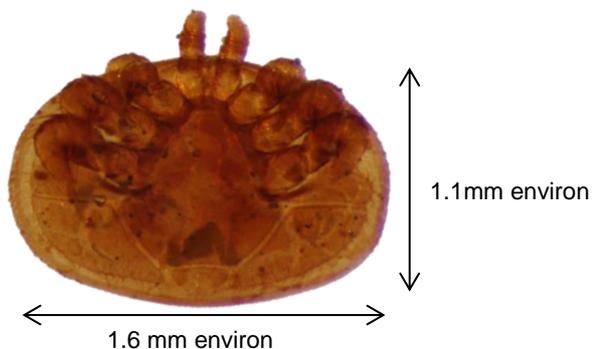


Figure 2 – *Varroa destructor* (femelle), vue ventrale. (microscope x 100)

Source : Anses, Sophia Antipolis

La femelle pond ses œufs dans le couvain avant l'operculation. Les œufs donnent naissance à des protonymphes et à des deutonymphes qu'il est possible de visualiser au fond des alvéoles après avoir enlevé la nymphe d'abeille (Fig. 3).



Figure 3 - Différents stades de développement de *Varroa destructor* dans une cellule de couvain d'abeilles (après retrait de la nymphe).

Source : Denis Anderson (In: Dietemann, Nazzi et al. 2013)

V. destructor ne devra pas être confondu avec l'acarien *Tropilaelaps* spp. classé comme danger sanitaire de première catégorie pour les abeilles mais non présent en Europe.



Contrairement à *V. destructor*, *Tropilaelaps* spp. est plus long que large (Fig. 4):

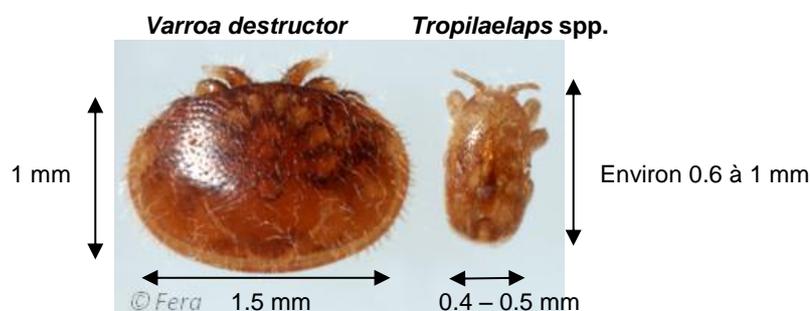


Figure 4. *Varroa destructor* et *Tropilaelaps* spp. (vue dorsale).
Photo : FERA, Crown.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

En cas de besoin, des spécimens de référence de *V. destructor* peuvent être observées en comparaison afin d'assurer la qualité des résultats obtenus.

9.2 Calculs et expression des résultats

9.2.1 Mise en évidence de l'acarien *Varroa destructor*

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

Résultat de l'examen	Expression du résultat analytique dans le rapport d'analyse Paramètre de l'analyse : <i>Varroa destructor</i>
Mise en évidence de l'acarien sur l'échantillon (abeilles / couvain)	Déecté
<i>Varroa destructor</i> non mis en évidence sur l'échantillon	Non déecté

9.2.2 Recherche de la varroose

Le diagnostic de la varroose (maladie) sera porté en fonction de la présence concomitante de certaines lésions caractéristiques au niveau du couvain et/ou des abeilles adultes :



Résultats de l'examen	Expression du résultat analytique dans le rapport d'analyse Paramètre de l'analyse : lésions de varroose
Présence de lésions caractéristiques de la varroose (cf. tableaux précédents § 8.1), c'est-à-dire : <ul style="list-style-type: none">- point 1 pour les abeilles- points 5 et/ou 6 et/ou 7 pour le couvain	Présence
Absence de lésions caractéristiques de la varroose (cf. tableaux précédents § 8.1)	Absence

9.2.3 Conclusion analytique et interprétation

▪ Mise en évidence de l'acarien *Varroa destructor*

Dans le cas où *V. destructor* a été « détecté » au cours de l'examen, la conclusion analytique portée sera : « Infestation par *Varroa destructor* ».

Dans le cas où *V. destructor* n'a été pas été « détecté » au cours de l'examen, la conclusion analytique portée sera : « *Varroa destructor* non détecté ».

▪ Recherche de la varroose (maladie)

L'interprétation du résultat est portée en fonction des lésions observées au laboratoire sur l'échantillon reçu et/ou des signes cliniques caractéristiques de la varroose, mentionnés dans le commémoratif :

- point 1 pour les abeilles,
- points 5 et/ou 6 et/ou 7 pour le couvain (cf. tableaux § 8.1).

Si ces lésions ou signes cliniques sont :

- présents, la conclusion ou l'interprétation portée sera : présence de lésions et/ou de signes cliniques de varroose.
- absents, la conclusion ou l'interprétation portée sera : absence de lésions et/ou de signes cliniques de varroose.

Nota bene : la présence de parasites au niveau des abeilles adultes et/ou du couvain n'est pas obligatoire pour conclure à une atteinte de la colonie d'abeilles par la varroose. La présence seule de lésions/signes cliniques signera une infestation antérieure. L'absence de parasites peut être en effet observée pour des raisons inhérentes au cycle de vie de *Varroa* et/ou d'ordre technique (ex : traitement acaricide réalisé par l'apiculteur).

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Méthode validée par l'usage.



Bibliographie

1. Dietemann, V., F. Nazzi, S. J. Martin, D. L. Anderson, B. Locke, K. S. Delaplane, Q. Wauquiez, C. Tannahill, E. Frey, B. Ziegelmann, P. Rosenkranz and J. D. Ellis (2013). "Standard methods for varroa research." *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1.
2. OIE, 2008. Varroose des abeilles mellifères. In: *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*. Chapitre 2.2.7, pp. 464-468.