

Bienenviren

BENJAMIN DAINAT, ANTON IMDORF, JEAN-DANIEL CHARRIÈRE, PETER NEUMANN
ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, AGROSCOPE LIEBEFELD-POSIEUX ALP, 3003 BERN

Nach der Vorstellung der wichtigsten Bienenviren und der von ihnen verursachten Krankheiten, gehen wir auf die neuen molekularbiologischen Methoden der Virendiagnose ein. Überwachungsprogramme lassen Viren als Mitursache der ungewöhnlichen Völkerverluste vermuten. Ein Forschungsprogramm in Liebefeld soll die Frage nach einem ursächlichen Zusammenhang zwischen Bienenviren, Varroa und Völkersterben abklären. Bis dahin bleibt uns nur auf gute Hygiene im Bienenstand zu achten und die Varroa konsequent zu bekämpfen.

Wir haben im ersten Teil gesehen, dass es eine ganze Reihe auf Bienen spezialisierte Viren gibt, die quasi weltweit verbreitet sind. Es ist jedoch für epidemiologische Studien (Studien zur Ausbreitung von Krankheiten) notwendig, gute Diagnosemethoden zur Verfügung zu haben. Die Fortschritte auf diesem Gebiet möchten wir erläutern und auf die möglichen Übertragungswege der Viren eingehen. Wir weisen auf die einfachen Massnahmen zur Vermeidung von Virenkrankheiten hin, die ein Imker selber durchführen kann und stellen die aktuelle Virenforschung am ZBF vor.

Molekularbiologische Diagnose der Bienenviren

Wie bei allen anderen Bienenkrankheiten ist selbstverständlich auch bei den Viren eine genaue Diagnose notwendig. Die verschiedenen Viren müssen eindeutig nachgewiesen und unterschieden werden können. Dazu wurden bis in die 90er Jahre häufig so genannte serologische Techniken und die Immunodiffusion verwendet. Ein Nachteil dieser, auf der immunologischen Antigen-Antikörper-Reaktion beruhenden Diagnosemethoden ist, dass sie nicht spezifisch genug waren. Das heisst, es kann zu Verwechslungen verschiedener Virustypen kommen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass es nicht gelang, kleine Mengen an Viren in einer Probe nachzuweisen. Viren liessen sich somit erst nachweisen, wenn sie bereits in sehr grosser Menge vorhanden waren.

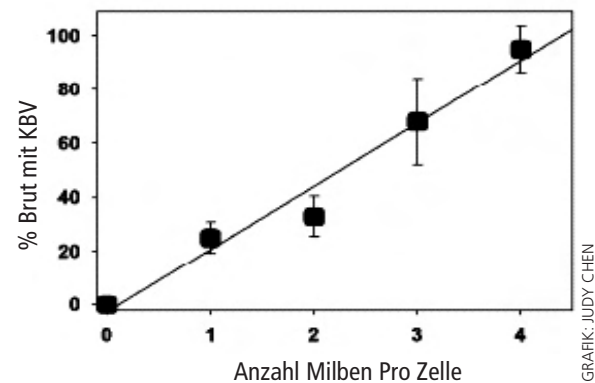
Ende der 90er Jahre gelang ein Durchbruch, indem neue molekularbiologische Techniken, die so genannte qualitative und quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction) entwickelt

wurden. Die PCR ist eine Methode, die es erlaubt, sehr kleine Mengen Erbmaterials in einer Probe sehr schnell und einfach auf eine enorm grosse Menge an Kopien zu vervielfältigen und damit die Diagnose zu erleichtern.

Mit der einfacheren qualitativen PCR kann nur das prinzipielle Vorhandensein eines bestimmten Virus nachgewiesen werden. Die anspruchsvollere quantitative PCR erlaubt es auch die Menge an Virenkopien in der ursprünglichen Probe zu ermitteln. Das Vorhandensein von vielen Kopien eines Virus deutet auf eine aktive Vermehrung hin. Diese kann mit einer genauen funktionsanalytischen PCR auch direkt nachgewiesen werden. Die PCR Methode ermöglicht es, präzise Auskunft darüber zu erhalten:

- 1) welcher Virustyp vorkommt
- 2) welche Menge Virusmaterial vorliegt
- 3) ob sich das Virus aktiv oder nicht vermehrt

Der Nachweis der Virenvermehrung stellt einen erheblichen Fortschritt dar. Er ist eine wichtige Grundlage für aussagekräftige Diagnosen zum Virenbefall. Dadurch kann nicht nur das in latentem Zustand befindliche Virus (ohne Symptome) genau nachgewiesen werden, sondern auch ob die Viren «aktiv» sind und somit



GRAFIK: JUDY CHEN

Krankheitssymptome auftreten können. Erst dadurch war es unter anderem möglich, neue Erkenntnisse zu den Übertragungswegen der Viren zu erhalten.

Die verschiedenen Übertragungswege

Prinzipiell gilt ein Volk als infiziert, wenn ein Virus in einer Bienenprobe nachweisbar ist. Auch Varroa können Bienenviren in sich tragen. Varroa stellt also sowohl einen wichtigen Überträger als auch ein Reservoir der Viren² dar. Das Beispiel des KBV zeigt eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl der Varroa pro Brutzelle und dem Anteil infizierter Brut (Grafik oben). Dies ist aber ebenso beim DWV (Flügeldeformationsvirus) und

Anteil an mit KBV (Kashmir-Bienenvirus) infizierter Brut (%) in Abhängigkeit von der Anzahl Varroa destructor pro Zelle.

Wichtigste Bienenviren.

Deutscher Name	Englischer Name	Internationale Abkürzung
Akutes Bienenparalysevirus	Acute Bee Paralysis Virus	ABPV
Langsames Lähmungsvirus	Slow Paralysis Virus	SPV
Flügeldeformationsvirus	Deformed Wing Virus	DWV
Sackbrutvirus	Sac Brood Virus	SBV
Kashmir-Bienenvirus	Kashmir Bee Virus	KBV
Schwarzes Königinnenzellvirus	Black Queen Cell Virus	BQCV
Chronisches Bienenparalysevirus	Chronic Bee Paralysis Virus	CBPV

wahrscheinlich auch bei anderen Viren der Fall. Es ist aber nicht jede Varroa zwingend ein Virusträger. In einer 2005 veröffentlichten Studie waren beispielsweise je nach Volk 45 bis 100 % der Varroamilben mit dem DWV infiziert.¹

Varroa kann aber auch die Gefährlichkeit der Bienenviren erhöhen. Es scheint, als ob die Milbe die Viren «aktivieren» kann. Im Allgemeinen gilt: Je höher der Varroabefall, umso grösser ist das Risiko, dass im Volk eine bestimmte Virenkrankheit ausbricht. Das macht aus der Sicht des Imkers eine gründliche Milbenbekämpfung noch wichtiger.

Aber auch schon lange vor der Einschleppung der Milbe gab es die Bienenviren. Von daher müssen auch andere Übertragungswege im Bienenvolk existieren. Für das Verständnis dieser Übertragungswege muss man die Organisation des Bienenvolkes berücksichtigen. Honigbienen leben in sozialen und gut organisierten Insektenstaaten. Mehrere Generationen leben auf engem Raum zusammen: eine Königin (= Mutter), 10 000 bis 40 000 Arbeiterinnen (= Töchter) und je nach Saison bis zu einigen hundert Drohnen (= Söhne). Damit sind Austausch von Nahrung und Information sowie häufiger enger Körperkontakt unter den Arbeiterinnen, mit der Königin

und der Brut verbunden. Dadurch werden sehr gute Bedingungen für die Übertragung von Krankheiten (wie z.B. Viren) innerhalb einer Generation geschaffen (horizontale Übertragung; Grafik unten). Kürzlich wurde nachgewiesen, dass sich die Viren aber auch im Sperma der Drohnen sowie in den Eiern der Königin befinden können. Wahrscheinlich können die Drohnen Viren bei der Paarung auf Königinnen übertragen. In Anbetracht der mehrfachen Paarungen der Königinnen (im Durchschnitt ca. 12-mal) sollte das nicht unterschätzt werden. Die Königinnen können dann vermutlich die Viren über die infizierten Eier an viele oder sogar alle ihre Nachkommen weitergeben (= vertikale Übertragung). Bei den Bienen können mehrfache Infektionen mit verschiedenen Viren auftreten. Sowohl bei der Königin als auch bei den Arbeiterinnen und Drohnen lassen sich mehrere Virustypen gleichzeitig finden.^{2,3}

Einige Viren wurden auch im Honig, Pollen, Gelée Royale oder Exkrementen nachgewiesen.⁴ Das deutet darauf hin, dass sich die Bienen möglicherweise bei fast allen Tätigkeiten im Volk mit Viren infizieren können (Fressen von Honig, Putzen anderer Bienen und des Stockes, Füttern von Brut etc.; Grafik unten).⁵

Fachbegriffe zu Diagnosemethoden

serologische Techniken: Methoden der Immunologie zum Messen der Antikörper-Antigen Reaktion.

Immunodiffusion: Ein häufig benutzter Test für die Antikörper-Antigen Reaktion.

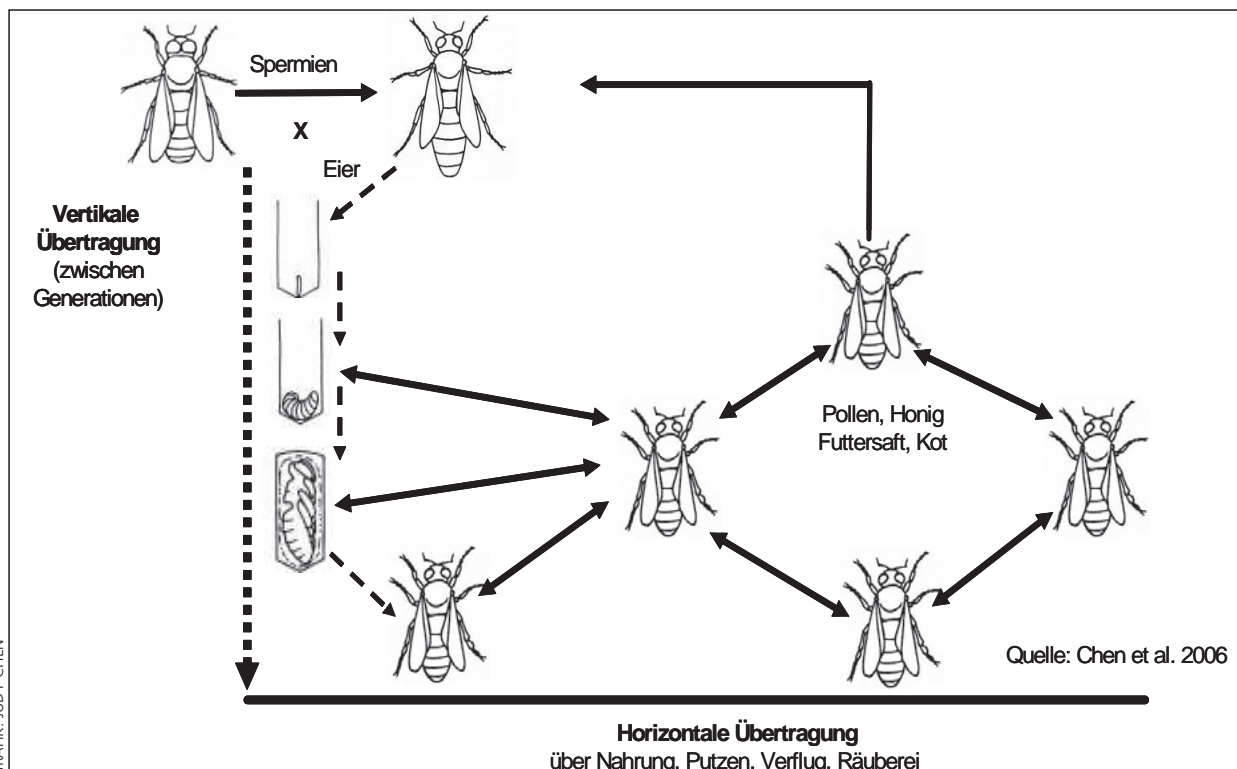
PCR: Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine molekularbiologische Methode, um kleinste Mengen von Erbgut (DNA) für eine Analyse zu vervielfältigen.

qualitative PCR: Sie erlaubt nur den Nachweis des Vorhandenseins einer bestimmten Gensequenz in der untersuchten Probe.

quantitative PCR: Sie ist eine anspruchsvollere Variante der PCR und erlaubt zusätzlich Rückschlüsse auf die Menge des gesuchten Erbmaterials in der ursprünglichen Probe.

funktionsanalytische PCR: Sie weist die aktive Virenvermehrung anhand der dafür notwendigen –RNA-Matrize nach (siehe Box Bienenviren Teil 1, SBZ 3/2008).

Die Tatsache, dass Viren im Honig festzustellen sind, bedeutet nicht zwingend, dass Honig infektiös ist und das Virus übertragen kann. Dennoch sollte man immer noch den gesunden Menschenverstand walten lassen. Wir wissen dazu einfach viel zu wenig und Studien fehlen. Wenn ein Volk vermutlich von einem Virus ausgelöscht wurde, scheint es daher gerechtfertigt, kein Material dieses Bienenstocks wieder zu verwenden.



Die verschiedenen Übertragungsmöglichkeiten für Viren in einem Bienenvolk. Es gibt zwei unterschiedliche Formen der Übertragung: vertikal (gepunktete Linie) von einer Generation zur anderen und horizontal (durchgezogene Linie) innerhalb einer Generation.⁵



FOTO: USDA, [HTTP://WWW.SCIENCEANDCOOL.COM/2006/07/FRIDAY_PARASITE_3.HTML](http://www.scienceandcool.com/2006/07/FRIDAY_PARASITE_3.HTML)

Welche Massnahmen sind vom Imker zu ergreifen, um die Krankheitsrisiken durch Viren zu minimieren?

Der Imker kann eine Reihe einfacher Massnahmen ergreifen, um das Krankheitsrisiko zu minimieren:

- Bei der Ein- und Auswinterung schwache Völker eliminieren.
- Rechtzeitig eine wirksame Varroa-kontrolle durchführen.
- Übertragung durch Verflug und Räuberei minimieren.
- Vermehrt Jungvölker bilden und sie von den Wirtschaftsvölkern getrennt aufstellen.
- Nicht die gleichen Imkermaterialien auf den unterschiedlichen Ständen verwenden (Waben, Stockmeissel, Handschuhe etc.).

Ein besseres Verständnis der Funktionsweise der Viren wird helfen, in Zukunft angepasste Bekämpfungsstrategien zu entwickeln. Bis heute existiert aber kein wirksames Mittel, um die Viren direkt zu bekämpfen. Da die Bienenviren in der Pharmaindustrie ein viel kleineres Gewicht haben als die Viren des Menschen (HIV etc.), besteht, auch mittelfristig, wenig Hoffnung, dass direkte Bekämpfungsmittel entwickelt werden. Aus diesem Grund ist es dringend erforderlich, durch Forschung unsere

Kenntnisse zu verbessern und die Bekämpfung vorläufig auf die möglichen Überträger/Aktivierungsfaktoren wie beispielsweise die Varroamilbe zu konzentrieren. Kurzum, eine gute imkerliche Praxis und gute Bienenstockhygiene minimieren das Krankheitsrisiko erheblich!

Aktuelle Forschung

In Deutschland wird momentan ein breit abgestütztes Monitoring Projekt, das **DEBIMO (Deutsches Bienen Monitoring)** zu den unerklärlichen Winterverlusten, wie sie 2007 in den USA auftraten, durchgeführt.⁶ Dies ist die weltweit grösste Studie zu diesem Thema. Das ZBF würde gerne in Partnerschaft mit dem VDRB, der SAR und der STA eine Erhebung der Völkerverluste in der Schweiz starten. Um die möglichen Ursachen für die Völkerverluste zu verstehen, koordiniert das ZBF zusätzlich zu diesen lokalen Aktivitäten die internationale Arbeitsgruppe **COLOSS (= prevention of honeybee COLony LOSSes)** mit über 100 Mitgliedern aus 29 Ländern. Innerhalb dieser Arbeitsgruppe arbeitet das ZBF mit mehreren Partnern zusammen. Für die Völkerverluste kommen verschiedene Ursachen in Frage, unter anderem die Viren.

Varroa destructor ist nicht nur der wichtigste Überträger für Bienenviren, sondern auch ein Reservoir. Rasterelektromikroskopische Aufnahme einer Varroa auf einer Biene.

Das ZBF hat deshalb bereits im Jahr 2004 ein Forschungsprojekt zum Thema Viren⁷ lanciert. Es hatte zum Ziel, Diagnosemethoden zu etablieren und anschliessend eine CH-Bestandesaufnahme über das mögliche Vorkommen und die Verbreitung von Bienenviren durchzuführen. Es wurde festgestellt, dass verschiedene Viren in der Schweiz auftreten und zum Teil weit verbreitet sind, auch in Völkern mit «gesundem» Erscheinungsbild (= latente Infektionen). Aufgrund schwerer CH-Völkerverluste wurden 2005 und 2006 am ZBF Versuche durchgeführt, um die mögliche Rolle der Viren und anderer Faktoren für die Völkerverluste besser zu verstehen.⁸ Diese Versuche fanden im Winter statt, und es wurden Bienenproben aus gesunden, geschwächten und toten Bienenvölkern entnommen. Dabei konzentrierten wir uns bei den quantitativen Analysen auf die Viren ABPV (Akutes Bienenparalysevirus) und DWV. Die Ergebnisse zeigten, dass geschwächte und tote Bienenvölker unter einem hohen Befall mit DWV und ABPV standen, wohingegen gesunde Völker nur sehr schwach oder gar nicht befallen waren. Ähnliche Ergebnisse wurden jetzt in den USA für CCD-Völker (Colony Collapse Disorder) und den IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus) publiziert. Das ist aber noch kein zwingender Beweis für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Virenbefall und dem Zusammenbruch der Völker. Die zu klärende Frage lautet: Schwächen die Viren die Völker oder vermehren sich Viren nur stärker in bereits geschwächten Völkern?

Um Antworten auf diese zentrale Frage zu erhalten, hat das ZBF im September 2007 eine auf drei Jahre geplante Doktorarbeit im Rahmen eines vom BVET (Bundesamt für Veterinärwesen) finanzierten Forschungsprojektes zum Thema Bienenviren initiiert. Das Projekt hat zum Ziel, die Zusammenhänge zwischen Viren, Bienen und der Varroamilbe zu untersuchen. Es soll die Mechanismen der Übertragung und der Virulenz der Viren weiter aufklären helfen. Wir werden uns dabei auf die langlebigen Winterbienen konzentrieren, da deren Überleben und Verhalten sich entscheidend



auf die Winterverluste auswirkt. Uns interessiert dabei, wie gross der Einfluss der Viren auf die Winterbienen ist, wie lange eine infizierte Biene lebt und wie sie sich verhält? Beeinflusst der Virenbefall die Physiologie (Stoffwechsel) der Bienen?

Dank

Wir möchten uns ganz herzlich bei Judy Chen und der IBRA für die zur Verfügung gestellten Abbildungen bedanken.



Literatur

1. Yue, C.; Genersch, E. (2005) RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* 86: 3419–3424.
2. Chen, Y. P.; Zhao, Y.; Hammond, J.; Hsu, H. T.; Evans, J.; Feldlaufer, M. (2004) Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87(2–3): 84–93.
3. Tentcheva, D.; Gauthier, L.; Zappulla, N.; Dainat, B.; Cousserans, F.; Colin, M. E.; Bergoin, M. (2004) Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12): 7185–7191.
4. Yue, C.; Schröder, M.; Bienefeld, K.; Genersch, E. (2006) Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invertebr. Pathol.* 92(2): 105–108.
5. Chen, Y. P.; Evans, J.; Feldlaufer, M. (2006) Horizontal and vertical

transmission of viruses in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92(3): 152–159.

6. Rosenkranz, P.; Garrido, C. (2006) Monitoring, Winterverluste, 4. Das Zünglein an der Waage? – Der Einfluss von Virusinfektionen auf die Überwinterungsfähigkeit von Bienenvölkern. Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V., 53. Jahrestagung in Hohenheim vom 28.–30. März 2006. *Apidologie* 37(5): 595–697.
7. Berthoud, H.; Imdorf, A.; Haueter, M.; Charrière, J.-D.; Fluri, P. (2005) Bienenviren – ein wenig bekanntes Gebiet. *Schweiz. Bienen-Ztg.* 128(8): 19–22.
8. Imdorf, A.; Charrière, J.-D.; Gallmann, P. (2006) Mögliche Ursachen für die Völkerverluste der letzten Jahre. *Schweiz. Bienen-Ztg.* 129(8): 6–10.



FOTO: FRANZ-XAVER DILLIER

Mit vor die Völker gehängten Fallen kann der Totenfall der Winterbienen in mit Viren befallenen und virenfreien Völkern verglichen werden. Um gleichzeitig den Zustand der Völker zu verfolgen, erfassen Rolf Kuhn (links) und Benjamin Dainat (rechts) regelmässig die Volksstärke und den Brutzustand nach der Liebefelder Schätzmethode. Rolf schätzt routiniert den Wabenbesatz und Benjamin erfasst die Daten mit einem Auswertungsprogramm auf einem feldtauglichen Computer.