

Empfehlung der ZKBS

zur Risikobewertung von *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV), *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), *Black queen cell virus* (BQCV), *Varroa destructor virus 1* (VDV-1), *Slow bee paralysis virus* (SBPV), *Varroa destructor macula-like virus* (VdMLV) und *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Mit Ausnahme des *Varroa destructor macula-like virus* und des *Chronic bee paralysis virus* (beide nicht klassifiziert) handelt es sich bei den hier betrachteten Viren um Vertreter der *Dicistroviridae* oder *Iflaviridae*. Beide Virusfamilien gehören zur Ordnung Picornavirales und besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität.

Dicistroviridae

Acute bee paralysis virus (ABPV)

Das *Acute bee paralysis virus* (ABPV) wurde erstmals 1963 aus der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera*) isoliert [1]. Das Virus ist weltweit verbreitet und kann auch Hummeln infizieren [2]. Insekten, die nicht zur Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera) gehören, werden nicht infiziert [2]. Bei oraler Aufnahme des Virus ist eine hohe Dosis (10^{11} Partikel pro Biene) erforderlich, um eine Erkrankung auszulösen [2]. In Übereinstimmung damit verlaufen natürliche Infektionen, bei welchen in der Regel eine geringe Dosis ABPV oral aufgenommen wird, häufig inapparent. Wird das Virus jedoch direkt in die Hämolymphe injiziert, so verursacht es bereits bei einer geringen Dosis (10^2 Partikel pro Biene) eine Erkrankung, die mit Symptomen wie Zittern und Lähmung einhergeht und schließlich zum Tod der infizierten Tiere führt [1,2]. Diese Infektionsroute tritt dann unter natürlichen Bedingungen auf, wenn ABPV von der Milbe *Varroa destructans* übertragen wird. *Varroa destructans* ernährt sich von der Hämolymphe der Bienen und parasitiert sowohl an Puppen als auch an adulten Tieren. Die Milbe dient dabei als mechanischer Vektor für das Virus; in ihr findet keine Virusreplikation statt [3]. Eine Infektion mit ABPV hat darüber hinaus auch Auswirkungen auf das gesamte Bienenvolk, so ist ABPV mit einer erhöhten Wintersterblichkeit von Kolonien assoziiert [4].

Kashmir bee virus (KBV)

Das *Kashmir bee virus* (KBV) wurde erstmals 1974 aus der Östlichen Honigbiene (*Apis cerana*) isoliert [5] und ist weltweit verbreitet. Das Virus kann auch die Westliche Honigbiene, die Deutsche Wespe (*Vespula germanica*) sowie Hummeln infizieren [6]. Ähnlich wie bei ABPV ist die Letalität von KBV von der Dosis und der Infektionsroute abhängig [5,7,8]. Die Erkrankung ist jedoch nicht mit Lähmungserscheinungen assoziiert. KBV kann neben der fäkal-oralen Transmissionsroute auch mechanisch von der Varroamilbe übertragen werden [9]. Ein Zusammenhang zwischen KBV und einer erhöhten Wintersterblichkeit von Bienenvölkern sowie einer besonderen Form des Kolonieverlustes (*colony collapse disorder* [CCD]) wird diskutiert [10-12].

Israeli acute bee paralysis virus (IAPV)

Das *Israeli acute bee paralysis virus* (IAPV) wurde erstmals 2002 isoliert [13] und ist weltweit verbreitet. Der einzige bislang bekannte Wirt ist die Westliche Honigbiene, bei welcher das Virus eine ähnliche Erkrankung wie ABPV verursacht [14]. Die Letalität von IAPV ist von der

Dosis und der Infektionsroute abhängig [14]. IAPV kann neben der fäkal-oralen Transmissionsroute auch mechanisch von der Varroamilbe übertragen werden [15]. In einer Studie von Cox-Foster *et al.* korrelierte die Infektion mit IAPV zudem in hohem Maße mit Kolonieverlusten durch CCD [12].

Black queen cell virus (BQCV)

Das *Black queen cell virus* (BQCV) wurde erstmals 1977 aus der Westlichen Honigbiene isoliert [5] und ist weltweit verbreitet. Das Virus kann auch Wildbienen und Hummeln infizieren [16,17]. Charakteristisch für die Infektion ist eine dunkle Verfärbung der Wand der (Königinnen-)Zellen. Die befallenen Puppen entwickeln sich nicht zu adulten Tieren und sterben schließlich ab [5,18]. BQCV-Ausbrüche treten häufig im Zusammenhang mit *Nosema apis*, dem Erreger der Nosemose, auf, wobei noch unklar ist, welchen Anteil BQCV an der Symptomatik und der Letalität dieser Ausbrüche hat [19]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Wintersterblichkeit einer Kolonie bei einer Ko-Infektion mit *Nosema apis* und BQCV höher ist als bei einer Einzelinfektion mit *Nosema apis* [20]. Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt vermutlich fäkal-oral; daneben gibt es auch Hinweise auf eine vertikale Übertragung von der infizierten Königin auf die Eier [21].

Iflaviridae

Varroa destructor virus 1 (VDV-1)

Das *Varroa destructor virus 1* (VDV-1) wurde erstmals 2004 aus der Varroamilbe isoliert [22]. Es ist am nächsten mit dem *Deformed wing virus* (DWV) verwandt (Nukleotidsequenzhomologie 84 %), welches in die Risikogruppe 2 eingestuft ist. In mehreren Studien wurden natürlich vorkommende Chimären zwischen DWV und VDV-1 beschrieben [23,24]. VDV-1 vermehrt sich in der Varroamilbe und wird von dieser auf Bienen übertragen, wo es möglicherweise ein ähnliches Erkrankungsbild wie DWV (Flügeldefektbildungen, vergrößertes Abdomen, verkürzte Lebensdauer) verursacht [23].

Slow bee paralysis virus (SBPV)

Das *Slow bee paralysis virus* (SBPV) wurde erstmals 1974 aus der Westlichen Honigbiene isoliert [25]. Auf der Basis von Sequenzanalysen sowie der Genomorganisation des Virus wird eine Zuordnung zur Familie der *Iflaviridae* vorgeschlagen [26]. Das Virus wurde bislang lediglich in Großbritannien, der Schweiz, Westsamoa sowie auf den Fidschi-Inseln nachgewiesen und scheint damit nicht so weit verbreitet wie andere bienenpathogene Viren zu sein [26]. Bei adulten Tieren führte eine experimentelle Infektion 12 Tage nach der Injektion der Virussuspension zur Lähmung der beiden vorderen Beinpaare [25]. Unter natürlichen Bedingungen wird SBPV entweder oral oder von der Varroamilbe übertragen [27]. Auf Kolonieebene wurde ein Zusammenhang zwischen SBPV und einem Verlust der befallenen Kolonie beschrieben [28].

Nicht klassifiziert

Varroa destructor macula-like virus (VdMLV)

Das *Varroa destructor macula-like virus* (VdMLV) wurde kürzlich aus der Westlichen Honigbiene sowie aus der Varroamilbe isoliert [29 (noch nicht publiziert)]. Über die taxonomische Zuordnung, das Wirtsspektrum, die Pathogenität und den Übertragungsweg liegen noch keine weiteren Informationen vor. In Studien aus Frankreich und Schweden waren die untersuchten Kolonien nicht mit dem Virus infiziert [30,31].

Chronic bee paralysis virus (CBPV)

Das *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) wurde erstmals 1963 aus der Westlichen Honigbiene isoliert [1] und ist weltweit verbreitet. CBPV ist keiner Virusfamilie zugeordnet, weist jedoch Gemeinsamkeiten mit den *Nodaviridae* (Fisch- und Insektenviren) sowie den *Tombusviridae*

(Pflanzenviren) auf [32]. Das Genom von CBPV besteht aus zwei Segmenten einzelsträngiger RNA positiver Polarität. Bei adulten Bienen führt die Infektion mit CBPV zu einem charakteristischen Krankheitsbild, welches Zittern und den Verlust der Körperbehaarung sowie der Flugfähigkeit umfasst [33,34]. Für gewöhnlich tritt nach wenigen Tagen der Tod der infizierten Tiere ein. Ähnlich wie bei ABPV, KBV und IAPV ist auch die Letalität von CBPV von der Dosis und der Infektionsroute abhängig [35]. Neben den adulten Tieren infiziert CBPV auch Eier und Puppen, führt jedoch aufgrund einer geringen Viruslast in diesen Entwicklungsstadien nicht zu Brutverlusten [36]. CBPV wird vermutlich hauptsächlich oral (z. B. über virushaltigen Pollen) oder fäkal-oral übertragen [37]. Daneben gibt es Hinweise auf eine vertikale Übertragung von der infizierten Königin auf die Eier [21]. In einer Studie von Celle *et al.* wurde das Virus auch in der Varroamilbe sowie in zwei Ameisenspezies nachgewiesen, wobei noch unklar ist, welche Rolle diese Insekten als Überträger oder als Virusreservoir für CBPV spielen [38]. Auf Kolonieebene kann CBPV mit Kolonieverlusten oder mit einer erhöhten Wintersterblichkeit assoziiert sein [33,39].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV), *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), *Black queen cell virus* (BQCV), *Varroa destructor virus 1* (VDV-1), *Slow bee paralysis virus* (SBPV), *Varroa destructor macula-like virus* (VdMLV) und *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet. Bei gentechnischen Arbeiten mit diesen Organismen muss das Entkommen aus dem Laborbereich durch geeignete Maßnahmen zuverlässig verhindert werden. Folgende Maßnahmen werden als geeignet angesehen:

- Bei Arbeiten mit der Varroamilbe: Verwendung von autoklavierbaren, verschließbaren Kunststoff- oder Glasgefäßen zur Aufbewahrung der Milben
- Nicht öffnende oder mit Insektenschutzgaze abgedichtete Fenster
- Einfangen und Töten von dennoch im Labor aufgefundenen Bienen und anderen Insekten

Begründung

Die hier beschriebenen Viren besitzen ein enges Wirtsspektrum, welches sich in den meisten Fällen auf Bienen sowie Hummeln beschränkt. Sie verursachen potenziell tödliche Erkrankungen bei diesen Nutztieren und stehen möglicherweise im Zusammenhang mit dem Absterben ganzer Kolonien. Ein humanpathogenes Potenzial ist für keines dieser Viren beschrieben.

Das *Varroa destructor macula-like virus* (VdMLV) wird ebenfalls der Risikogruppe 2 zugeordnet, da noch nicht genügend Informationen über dieses Virus vorliegen.

Literatur

1. Bailey, L., Gibbs, A.J., and Woods, R.D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* **21**:390-395.
2. Bailey, L., and Gibbs, A.J. (1964). Acute infection of bees with paralysis virus. *J Insect Pathol* **6**:395-407.
3. Genersch, E., and Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet Res* **41**:54.
4. Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., and Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**:332-352.

5. Bailey, L., and Woods, R.D. (1977). Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *J Gen Virol* **37**:175-182.
6. Anderson, D.L. (1991). Kashmir bee virus – a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am Bee J* **131**:767-770.
7. Hung, A.C., Shimanuki, H., and Knox, D.A. (1996). Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *Am Bee J* **136**:874-876.
8. Dall, D.J. (1987). Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **49**:279-290.
9. Chen, Y.P., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., and Feldlaufer, M.F. (2004). Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**:441-448.
10. Pettis, J.S. (2008). Status of colony losses in the US. In: OIE Symposium: Diagnosis and control of bee diseases, Freiburg, Germany.
11. Todd, J., de Miranda, J., and Ball, B.V. (2007). Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie* **38**:354-367.
12. Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J.H., Cui, L.W., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., and Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**:283-287.
13. Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., and Sela, I. (2007). Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honey bees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J Gen Virol* **88**:3428-3438.
14. de Miranda, J.R., Cordonni, G., and Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus – Kashmir bee virus – Israeli acute bee paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol* **103**:S30-S47.
15. Prisco, G.D., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani, H.F., Evans, J.D., and Chen, Y. (2010). *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Gen Virol* **92**:151-155.
16. Zhang, X., He, S.Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., Yin, G.F., and Chen, Y.P. (2012). New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *J Invertebr Pathol* **109**:156-159.
17. Peng, W.J., Li, J.L., Boncristiani, B., Strange, J.P., Hamilton, M., and Chen, Y.P. (2011). Host range expansion of honey bee black queen cell virus in the bumble bee, *Bombus huntii*. *Apidologie* **42**:650-658.
18. Siede, R., and Büchler, R. (2003). Symptomatic black queen cell virus infection of drone brood in Hessian apiaries. *Berl Munch Tierärztl Wochenschr* **116**:103-133.
19. Higes, M., Esperón, F., and Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2007). Short communication. First report of black queen-cell virus detection in honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. *Sp J Agricult Res* **5**:322-325.
20. Bailey, L., Ball, B.V., and Perry, J.N. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann Appl Biol* **103**:13-20.
21. Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A., and Feldlaufer, M.F. (2006). Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**:606-611.
22. Ongus, J.R., Peters, D., Bonmatin, J.M., Bengsch, E., Vlak, J.M., and van Oers, M.M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol* **84**:3747-3755.
23. Zioni, N., Soroker, V., and Chejanovsky, N. (2011). Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1-Deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology* **417**:106-112.

24. Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D.J., and Ryabov, E.V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *J Gen Virol* **92**:156-161.
25. Bailey, L., and Woods, R.D. (1974). Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J Gen Virol* **25**:175-186.
26. de Miranda, J.R., Dainat, B., Locke, B., Cordonj, G., Berthoud, H., Gauthier, L., Neumann, P., Budge, G.E., Ball, B.V., and Stoltz, D.B. (2010). Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Gen Virol* **91**:2524-2530.
27. Santillán-Galicia, M.T., Ball, B.V., Clark, S.J., and Alderson, P.G. (2010). Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *J Apic Res* **49**:141-148.
28. Carreck, N.L., Ball, B.V., and Martin, S.J. (2010). Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J Apic Res* **49**:93-94.
29. de Miranda, J.R., Tournaire, M., Hadad, N., and Gauthier, L. (2009). Discovery of a Macula-like virus in honeybees (*Apis mellifera* L.) and *Varroa destructor* mites: prevalence, distribution and initial characterisation. *Virus Genes*. In manuscript.
30. Gauthier, L., Ravallec, M., Tournaire, M., Cousserans, F., Bergoin, M., Dainat, B., and de Miranda, J.R. (2011). Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS ONE* **6**:e16217.
31. Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., and de Miranda, J.R. (2011). Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Appl Environ Microbiol* **78**:227-235.
32. Olivier, V., Blanchard, P., Chaouch, S., Lallemand, P., Schurr, F., Celle, O., Dubois, E., Tordo, N., Thiery, R., Houlgatte, R., and Ribière, M. (2008). Molecular characterization and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. *Virus Res* **132**:59-68.
33. Ribière, M., Olivier, V., and Blanchard, P. (2010). Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol* **103**:S120-S131.
34. Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiéry, R., and Ribière, M. (2012). Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Res* **167**:173-178.
35. Bailey, L. (1965). Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J Invertebr Pathol* **7**:132-140.
36. Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., and Faucon, J.P. (2007). Evaluation of a real-time two step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J Virol Methods* **141**:7-13.
37. Ribière, M., Lallemand, P., Iscache, A.L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., and Faucon, J.P. (2007). Spread of infectious Chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl Environ Microbiol* **73**:7711-7716.
38. Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Cougoule, N., Faucon, J.P., and Ribière, M. (2008). Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and RNA replication in various hosts: possible ways of spread. *Virus Res* **133**:280-284.
39. Faucon, J.P., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A.C.M., Drajudel, P., Zeggane, S., Aurières, C., and Aubert, M. (2002). Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World* **83**:14-23.