FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methode
und Falldefinition

Befall mit der Tropilaelapsmilbe (*Tropilaelaps* spp.)

Inhaltsverzeichnis

Amtliche Methode **3**

1. Charakterisierung des Befalls **3**

1.1 Erreger 3

1.2 Klinische Symptomatik 3

1.3 Differenzialdiagnose 3

1.4 Diagnostische Indikation 3

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung 4

1.6 Rechtsgrundlagen 4

2. Untersuchungsmaterial **5**

2.1 Untersuchungsmaterial Gemüll 5

2.2 Untersuchungsmaterial Bienenbrut 5

2.3 Untersuchungsmaterial adulte Bienen 5

3. Untersuchungsgang **6**

3.1 Untersuchung von Wabenoberflächen 6

3.2 Untersuchung von Gemüll 6

3.3 Untersuchung von Bienenbrut 6

3.4 Untersuchung von adulten Bienen 7

3.5 Molekularbiologische Methoden: PCR 7

3.6 Serologische Tests 8

Falldefinition – Befall mit der Tropilaelaps-Milbe; *Tropilaelaps spp.* **9**

Amtliche Methode

1. Charakterisierung des Befalls

1.1 Erreger

Bislang wurden vier Arten beschrieben: *Tropilaelaps clarea*, *Tropilaelaps koenigerum*, *Tropilaelaps mercedesae* und *Tropilaelaps thaii*. Tropilaelapsmilben sind braun-rot gefärbte, längliche Ektoparasiten der Bienenbrut mit einer Größe von 0,7 - 1 mm. Ausschließlich von *Tropilaelaps clareae* und *Tropilaelaps mercedesae* ist bekannt, dass sie *Apis mellifera* als Wirt nutzen. Tropilaelapsmilben können sich sehr schnell auf den Waben der Honigbienen fortbewegen. Im Gegensatz zu *Varroa destructor* halten sie sich nur kurz (ca. ein bis zwei Tage) auf erwachsenen Bienen auf ~~(phoretische Phase)~~ und parasitieren diese nicht, da es ihnen ihr Körperbau und ihre Mundwerkzeuge nicht ermöglichen. Die Milbenweibchen suchen kurz vor der Deckelung die Brutzellen der Bienen auf (bis zu einem Dutzend pro Zelle) und legen ein bis vier Eier (in der Regel drei bis vier). Die Milbenentwicklung dauert ca. eine Woche, danach verlassen die ausgewachsenen Milben einschließlich des Gründerweibchens mit der schlüpfenden Biene die Zelle.

1.2 Klinische Symptomatik

Bienen mit verkürztem Abdomen und missgebildeten Flügeln sowie missgebildeten oder fehlenden Gliedmaßen können ein Anzeichen für den Befall mit *Tropilaelaps* spp. sein. Brutwaben zeigen ähnlich wie bei einem Befall mit *Varroa destructor* ein lückiges Brutbild und tote Brut mit eingesunkenem oder teilweise entferntem Zelldeckel.

1.3 Differenzialdiagnose

Die Differenzialdiagnose mit *Varroa destructor* oder Bienenläusen (*Braula coccea*) ist leicht visuell oder makroskopisch mit einer schwachen Lupe (vierfache Vergrößerung) möglich. Eine genauere Abgrenzung hinsichtlich der morphologischen Merkmale ist bei Pollenmilben und anderen auf den Waben laufenden Milben notwendig.

1.4 Diagnostische Indikation

Tierverkehr
Klinischer oder epidemiologischer Verdacht
Untersuchung im Rahmen des Nachweises der Seuchenfreiheit (Gesundheitszeugnis)

Befall mit der Tropilaelapsmilbe (*Tropilaelaps* spp.)

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungsämter, Tiergesundheitsämter bzw. staatliche Lebensmittel- und Veterinärunter-suchungsämter der Bundesländer
- Friedrich-Loeffler-Institut (NRL für Bienenkrankheiten), Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 038351 7-0

1.6 Rechtsgrundlagen (in der jeweils geltenden Fassung)

- ~~Tiergesundheitsgesetz~~
- ~~Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen~~
- ~~Bienenseuchenverordnung~~
- ~~Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung~~
- ~~Verordnung (EU) Nr. 206/2010 der Kommission vom 12. März 2010 zur Erstellung von Listen der Drittländer, Gebiete und Teile davon, aus denen das Verbringen bestimmter Tiere […] in die Europäische Union zulässig ist […]~~
- ~~Entscheidung 2003/881/EG der Kommission vom 11. Dezember 2003 über die Tiergesundheitsbedingungen und -bescheinigungen für die Einfuhr von Bienen […]~~
- ~~Richtlinie 92/65/EWG des Rates vom 13. Juli 1992 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen für den Handel mit Tieren […]~~
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG)
- Bienenseuchen-Verordnung (BienSeuchV)
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV)
- Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung – BmTierSSchV)
- Verordnung (EU) 2016/429 des europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit (…)
- Verordnung (EU) 2017/625 des europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel (…)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften be-treffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ (…)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 der Kommission vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten Tieren (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/2235 der Kommission vom 16. Dezember 2020 mit Durchführungsbestimmungen zu den Verordnungen (EU) 2016/429 und (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen (…)

- Durchführungsverordnung (EU) 2021/403 der Kommission vom 24. März 2021 mit Durchführungsbestimmungen zu den Verordnungen (EU) 2016/429 und (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/404 der Kommission vom 24. März 2021 zur Festlegung der Listen von Drittländern, Gebieten und Zonen derselben, aus denen der Eingang in die Union von Tieren, Zuchtmaterial und Erzeugnissen tierischen Ursprungs (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/619 der Kommission vom 15. April 2021 zur Änderung der Durchführungsverordnungen (EU) 2020/2235, (EU) 2020/2236 und (EU) 2021/403 im Hinblick auf Übergangsbestimmungen für die Verwendung von Veterinärbescheinigungen (…)

2. Untersuchungsmaterial

Um einen Befall in einem Volk zu erkennen, müssen die Proben gezielt gesammelt und entnommen werden. Zur Untersuchung eignet sich Gemüll, Bienenbrut und Bienenproben.

2.1 Untersuchungsmaterial Gemüll

Eine einfache Methode zur Diagnose des Befalls mit Tropilaelapsmilben besteht in der Untersuchung von dem im Bienenvolk gewonnenen Gemüll, das auf einer am Boden der Beute eingelegten Einlage gesammelt wird. Die Bodeneinlagen sollten nicht länger als zwei Tage im Volk liegen, da die Milben sonst von Ameisen entfernt werden könnten. Es kann von Vorteil sein, die Bodeneinlagen mit Vaseline oder Melkfett zu bestreichen, damit die Milben darin haften.

2.2 Untersuchungsmaterial Bienenbrut

Für die Diagnose des Befalls der Brut mit Tropilaelapsmilben kann nur gedeckelte Brut verwendet werden. Drohnenbrut eignet sich besser als Arbeiterbrut.

2.3 Untersuchungsmaterial adulte Bienen

Bienenproben eigen sich nur bedingt zur Untersuchung auf den Befall mit Tropilaelapsmilben, denn die Milbe sitzt nur sehr selten, und wenn, dann nur sehr locker auf adulten Bienen auf. Es eignen sich nur lebende Bienen, diese füllt man direkt in ein Gefäß und tötet sie darin durch Einfrieren ab.

3. Untersuchungsgang

3.1 Untersuchung von Wabenoberflächen

Für ein Screening des Befalls mit Tropilaelapsmilben eignet sich die Untersuchung der Oberfläche von Brutwaben einzelner Bienenvölker. Dazu werden die Bienen von der Wabe in das Bienenvolk abgefegt und anschließend die Wabe über einem offenen mit Wasser oder Alkohol gefüllten Behälter abgeklopft. Die Flüssigkeit wird anschließend durch ein doppeltes Siebsystem gewaschen. Die Teile aus dem oberen groben Sieb (Maschenweite 2 - 3 mm) kann man verwerfen. Die Milben können im unteren feinen Sieb (Maschenweite < 1 mm) gesammelt werden. Zur leichteren Identifizierung der Milben schlägt man den Inhalt des Siebes auf eine helle Unterlage.

3.2 Untersuchung von Gemüll

Ist nur wenig Gemüll vorhanden, kann die Bodeneinlage direkt makroskopisch auf vorhandene adulte Milben untersucht werden. Bei sehr großen Gemüllmengen ist es vorteilhaft, eine Untersuchung mit Hilfe des Flotationsverfahrens durchzuführen. Das Gemüll sollte vor der weiteren Verarbeitung für die Dauer von 24 Stunden getrocknet werden. Anschließend wird es mit der doppelten Menge vergälltem Alkohol aufschwemmt und für eine Minute gerührt. Nur wenn das Gemüll Propolispartikel enthält, muss es 10 – 20 Minuten gerührt werden. Die an der Oberfläche schwimmenden Milben können nun identifiziert werden.

3.3 Untersuchung von Bienenbrut

Welche der folgenden Methoden verwendet wird, hängt von dem Umfang der Probe und von der notwendigen Genauigkeit der Untersuchung ab. Soll ein Überblick über einen Befall gegeben werden, so kann die Brutfläche insgesamt untersucht werden.

Untersuchung von Brutflächen

Mit einem Messer werden die Zelldeckel der Brutfläche entfernt und die Brut direkt mit warmem Wasser aus der Handbrause in ein doppeltes Siebsystem gewaschen. Die Brut und andere Teile aus dem oberen groben Sieb (Maschenweite 2 - 3 mm) kann man verwerfen. Die Milben können im unteren feinen Sieb (Maschenweite < 1 mm) gesammelt werden. Zur leichteren Identifizierung der Milben schlägt man den Inhalt des Siebes auf eine helle Unterlage.

Untersuchung von einzelnen Brutzellen

Zur Untersuchung von einzelnen Brutzellen werden die Zelldeckel mit einer Pinzette oder einem Skalpell geöffnet, die Brut der Honigbienen aus der Zelle entfernt und dann die Brut sowie das Innere der Zelle unter Zuhilfenahme einer Kaltlichtlampe auf vorhandene Milben bzw. andere Anzeichen eines Milbenbefalls untersucht.

3.4 Untersuchung von adulten Bienen

Bei einer kleinen Probe (< 50 Bienen) reicht es aus, die Bienen makroskopisch zu untersuchen. Bei großen Bienenmengen kann ein Auswaschungsverfahren verwendet werden.

Auswaschungsverfahren

Noch lebende Bienen durch Tiefkühlen für die Dauer von mindestens zwei Stunden abtöten. Die toten Bienen in einen Glaskolben mit der doppelten Menge an vergälltem Alkohol füllen und 10 Minuten lang schütteln. Anschließend die Bienen von den Tropilaelapsmilben mit einem doppelten Siebsystem (oben: grob, Maschenweite 2 - 3 mm; unten: fein, Maschenweite < 1 mm) trennen und auszählen.

Auswertung

Tropilaelapsmilben können mit bloßem Auge erkannt werden. Die Bestimmung der Milben und deren Nachkommen erfolgt aufgrund ihres Aussehens und ihrer morphologischen Besonderheiten. Nähere Angaben sind im „Manual Standards for Diagnostic and Vaccines“ der OIE (2018) enthalten. Als Vergleichsmaterial dienen abgestorbene Milben.

3.5 Molekularbiologische Methoden: PCR

Die Extraktion sollte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) oder einem vergleichbaren System durchgeführt werden. Bei allen Reaktionen sind stets Kontrollen (eine positive sowie eine negative) mitzuführen.

Mastermix

- 10 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen) oder vergleichbares System
- 1 µl TCF1 20 pmol/µl
- 1 µl TCR2 20 pmol/µl
- 3 µl Steriles Nuklease-freies Wasser

Vom Mastermix 10 % mehr herstellen, als tatsächlich benötigt wird. Mastermix auf die Reaktionsgefäße verteilen und anschließend jeweils 5 µl Template, Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle zugeben.

Temperatur/Zeit-Regime im Thermocycler

Aktivierung	95 °C	15 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing	48 °C	30 sec	35 Zyklen
Extension	72 °C	1 min	
Abschluss	72 °C	10 min	1 Zyklus
Kühlung	4 - 8 °C	∞	

Befall mit der Tropilaelapsmilbe (*Tropilaelaps* spp.)

Primer Konfiguration

TCF1	CTATCCTCAATTATTGAAATAGGAAC	538 bp
TCR2	TAGCGGCTGTGAAATAGGCTCG	

Gelelektrophorese

20 µl des Produktes werden unter Mischung mit 5 µl Ladepuffer in die Taschen eines Agarosegels (1,5 %) aufgetragen, in dem Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml enthalten ist. Als Laufpuffer wird 1 × TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wird bei 100 V mit 50 Minuten Laufzeit durchgeführt. Als Vergleichsmarker wird ein 100 bp Ladder mitgeführt. Die PCR-Produkte können anschließend unter Verwendung eines Transilluminators erkannt und beurteilt werden. Ein positiver Verlauf der PCR liegt vor, wenn Bandengrößen von 538 bp auftreten und die mitgeführten Kontrollen die entsprechenden Ergebnisse aufweisen.

3.6 Serologische Tests

Antiseren sind zurzeit nicht käuflich zu erwerben.

Falldefinition – Befall mit der Tropilaelaps-Milbe; *Tropilaelaps spp.*

Klinisches Bild

Die klinischen Symptome sind denen der in ganz Deutschland verbreiteten Varroosis sehr ähnlich: unregelmäßiges Brutbild, vereinzelt missgebildete Bienen (verkürzter Hinterleib, gekräuselte Flügel), aus geöffneten Brutzellen laufen die sehr agilen Milben sofort heraus, Milben laufen auf den Wabenoberflächen.

Inkubationszeit: keine

Labordiagnostischer Nachweis

Erregernachweis:

- Mikroskopische Bestimmung der Adulten und der Nymphen mithilfe eines Bestimmungsschlüssels
- Molekulargenetische Untersuchung: PCR mit Differenzierung der DNA der Milbe in Nymphen und Adulten

Epidemiologischer Zusammenhang

Die Übertragung der Milbe erfolgt durch Verbringen von Bienenvölkern und Austausch von Bienenmaterial (Beuten, Gerätschaften, Waben). Die Milbe parasitiert nicht auf adulten Bienen, sondern nur in der Bienenbrut. Sie kann ohne Bienenbrut nur wenige Tage überleben. Andere Wirte außer Honigbienen sind nicht bekannt.

Voraussetzung für den Verdacht

Auftreten der klinischen Symptome und Vorkommen von längsovalen (etwa 0,9 mm lang und 0,5 mm breit) Milben im Bienenvolk: auf Waben, in Bienenbrut sowie im Gemüll auf dem Boden der Bienenbeute.

Durch TSN zu übermittelnder Fall

Voraussetzung für die Feststellung eines Falles:
Labordiagnostischer Nachweis der Milbe

Rechtsvorschriften (in der jeweils geltenden Fassung)

- ~~Tiergesundheitsgesetz (TierGesG) in der jeweils geltenden Fassung~~
- ~~Bienenseuchen-Verordnung (BienSeuchV) in der jeweils geltenden Fassung~~
- Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG)
- Bienenseuchen-Verordnung (BienSeuchV)
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV)
- Verordnung über das innergemeinschaftliche Verbringen sowie die Einfuhr und Durchfuhr von Tieren und Waren (Binnenmarkt-Tierseuchenschutzverordnung – BmTierSSchV)

Befall mit der Tropilaelapsmilbe (*Tropilaelaps* spp.)

- Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 9. März 2016 zu Tierseuchen und zur Änderung und Aufhebung einiger Rechtsakte im Bereich der Tiergesundheit (…)
- Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz (…)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/689 der Kommission vom 17. Dezember 2019 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften betreffend Überwachung, Tilgungsprogramme und den Status „seuchenfrei“ (…)
- Delegierte Verordnung (EU) 2020/692 der Kommission vom 30. Januar 2020 zur Ergänzung der Verordnung (EU) 2016/429 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Vorschriften für den Eingang von Sendungen von bestimmten Tieren (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2020/2235 der Kommission vom 16. Dezember 2020 mit Durchführungsbestimmungen zu den Verordnungen (EU) 2016/429 und (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/403 der Kommission vom 24. März 2021 mit Durchführungsbestimmungen zu den Verordnungen (EU) 2016/429 und (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der Muster für Veterinärbescheinigungen (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/404 der Kommission vom 24. März 2021 zur Festlegung der Listen von Drittländern, Gebieten und Zonen derselben, aus denen der Eingang in die Union von Tieren, Zuchtmaterial und Erzeugnissen tierischen Ursprungs (…)
- Durchführungsverordnung (EU) 2021/619 der Kommission vom 15. April 2021 zur Änderung der Durchführungsverordnungen (EU) 2020/2235, (EU) 2020/2236 und (EU) 2021/403 im Hinblick auf Übergangsbestimmungen für die Verwendung von Veterinärbescheinigungen (…)

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de