

ZUKUNFT BIENE



Zukunft Biene 2

2. Zwischenbericht

Stichtag: 1. September 2019

Forschungsprojekt Nr. 101295

**Zukunft Biene 2 – Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des
Bienenschutzes und der Bienengesundheit
(Kurztitel: Zukunft Biene 2)**

Mit Unterstützung von Bund, Ländern und Europäischer Union

 **Bundesministerium
Nachhaltigkeit und
Tourismus**

Europäische Union



Dieser Zwischenbericht wurde am 29.08.2019 über Dafne (www.dafne.at) zur Approbation eingereicht.

1. Zwischenbericht

(Stichtag: 1. September 2019)

An der Projektabwicklung und Berichtserstellung beteiligte Einrichtungen:

- Karl-Franzens-Universität Graz
 - o Institut für Biologie

- AGES
 - o Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz
 - o Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling
 - o Fachbereich Daten, Statistik, integrative Risikobewertung

- Veterinärmedizinische Universität Wien
 - o Institut für Virologie

Ansprechpartner für Rückfragen:

Projektleiter: Univ. Prof. Dr. Karl Crailsheim, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie, Tel: 0316 380 5616; karl.crailsheim@uni-graz.at

Dr. Robert Brodschneider, Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Biologie, Tel: 0316 380 5602; robert.brodschneider@uni-graz.at

Dr. Linde Morawetz, AGES, Institut für Saat- und Pflanzgut, Pflanzenschutzdienst und Bienen, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz Wien, Tel: 050 555 33 120; linde.morawetz@ages.at

Dr. Benjamin Lamp, Veterinärmedizinische Universität Wien, Institut für Virologie, Tel: 01 25077 2709; Benjamin.Lamp@vetmeduni.ac.at

Autoren und Autorinnen des Zwischenberichts:

Vorwort: Karl Crailsheim

Modul (U): Robert Brodschneider, Isabel Krobath

Modul (A): Linde Morawetz, Hemma Köglberger, Adi Steinrigl, Antonia Griesbacher, Sabrina Kuchling, Irmgard Derakhshifar, Katharina Etter, Sigrid Träger, Rudolf Moosbeckhofer

Modul (V): Kerstin Seitz, Till Rümenapf, Benjamin Lamp

Finanzierung

Laufzeit: 22.12.2017 – 30.09.2021

Das Projekt wurde im Rahmen der Bund-Bundesländer-Kooperation finanziert durch:

Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus	€ 251.397,00
Biene Österreich	€ 270.000,00
Bundesländer	€ 160.000,00
Eigenmittel Universität Graz	€ 33.347,62
Eigenmittel AGES	€ 74.015,69
Eigenmittel Vetmed	€ 85.262,00

Inhaltsverzeichnis

Autoren und Autorinnen des Zwischenberichts	IV
Finanzierung	V
Vorwort	IX
Danksagung	X
Zusammenfassung	1
Project Summary	3

(U) Wintersterblichkeit

1.1 Zusammenfassung der Untersuchung der Wintersterblichkeit 2018/19	5
1.2 Einleitung	5
1.3 Methodik und Ergebnisse	10
1.3.1 Datenerhebung	10
1.3.2 Statistik	11
1.4 Ergebnisse	11
1.4.1 Beteiligung	11
1.4.2 Repräsentativität	12
1.4.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme	12
1.4.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten	12
1.4.2.3 Betriebsgröße	13
1.4.2.4 Geografische Herkunft	14
1.4.2.5 Bienenstandort	14
1.4.3 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken	14
1.4.3.1 Österreich	14
1.4.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich	15
1.4.3.2 Bundesländer	17
1.4.3.3 Ausgewählte Bezirke	19
1.4.4 Symptome	22
1.4.5 Verteilung der Völkerverluste	24
1.4.6 Risikoanalyse	24
1.4.6.1 Betriebsgröße	24
1.4.6.2 Stand- versus Wanderimkereien	25
1.4.6.3 Wabenhygiene	26
1.4.6.4 Trachtangebot	27
1.4.6.5 Seehöhe	28
1.4.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe	28
1.4.6.6.1 Bestimmung des Varroabefalls	31
1.4.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen	33
1.4.6.6.3 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste	33
1.4.6.6.4 Ameisensäure-Behandlung	36
1.4.6.6.5 Oxalsäure	38
1.4.6.6.6 Hiveclean/Bienenwohl/Varromed	39
1.4.6.6.7 Thymol	40
1.4.6.6.8 Hyperthermie	41
1.4.6.6.9 Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie/Drohnenbrutentnahme)	42

1.4.6.7 Königinnen-Probleme	42
1.4.6.8 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)	43
1.4.6.9 Verkrüppelte Flügel	44
1.4.6.10 Betriebsweise 2018/19	44
1.5 Diskussion	46
(A) Virenmonitoring	
2.1 Zusammenfassung des Virenmonitorings 2018	53
2.2 Einleitung	54
2.3 Material und Methoden	55
2.3.1 Zeitablauf	55
2.3.2 Werbung und Auswahl der TeilnehmerInnen	56
2.3.3 Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen	58
2.3.4 Durchführung der Probenahme	60
2.3.5 Probenbearbeitung	61
2.3.6 Abfrage Winterverluste	62
2.3.7 Virusanalytik	62
2.3.7.1 Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung	62
2.3.7.2 Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten	64
2.3.7.3 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV (ABCDS)	65
2.3.7.4 CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben	66
2.3.7.5 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV	67
2.3.7.6 Testung und Quantifizierung der Projektproben	68
2.3.8 Statistik	69
2.3.8.1 Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Standort- bzw. Volksfaktoren	69
2.3.8.2 Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Winterverlusten	69
2.4 Ergebnisse	71
2.4.1 Projektfortschritt	71
2.4.1.1 Kontakt mit den ProjektteilnehmerInnen	71
2.4.1.2 Virusdiagnostik: Methodenentwicklung	72
2.4.1.3 Datenauswertung	72
2.4.2 Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe	72
2.4.3 Ergebnisse Virusdiagnostik	73
2.4.3.1 Prozesskontrollen	73
2.4.3.2 Negativextraktionskontrollen	73
2.4.3.3 Semi-quantitativer Nachweis der Apis-Actin mRNA	73
2.4.4 Virusprävalenz und Viruskonzentration	73
2.4.5 Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration	75
2.4.5.1 Bundesländer	75
2.4.5.2 Seehöhe	80
2.4.6 Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste	84
2.4.7 Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit den berichteten Symptomen der Völker	87
2.4.7.1 Totenfall vor dem Bienenvolk	87

2.4.7.2 Varroamilben auf Bienen	87
2.4.7.3 Bienen mit verkrüppelten Flügeln	88
2.4.7.4 Schwarz-glänzende Bienen	89
2.4.7.5 Sackbrutsymptome	90
2.5 Diskussion	90
2.5.1 Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen	90
2.5.2 Prävalenzlevel	91
2.5.3 Höhe Virustiter	93
2.5.4 Winterverluste	93
2.5.5 Zusammenfassung und Ausblick	94
2.6 Anhang I: Anleitung zur Probenahme	95
2.7 Anhang II	99
2.8 Anhang III	101
(V) Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen	
3.1 Kurzzusammenfassung des bisherigen Verlaufs der Studie	104
3.2 Einleitung	104
3.3 Methodik	105
3.3.1 Ausgangslage der Studie	106
3.4 Ergebnisse	106
3.4.1 Antikörper	106
3.4.2 Antigene	106
3.4.3 Immunisierungen	107
3.4.4 ELISA-Tests mit definierten Proben	107
3.4.5 ELISA-Tests mit Feldproben	107
3.5 Diskussion	107
Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum der Projektdauer (01. September 2018 bis 29. August 2019)	109
Literaturzitate	111

Vorwort

Die Basis der Projekte Zukunft Biene bildeten die Winterverlusterhebungen des Institutes für Zoologie (jetzt Institut für Biologie) der Universität Graz, die seit nunmehr 12 Jahren durchgeführt werden. Die immer größere Datendichte hatte es im ersten Projekt Zukunft Biene erlaubt profunde Aussagen über verschiedene Zusammenhänge der Winterverluste mit Wetter und Landnutzung zu tätigen. Auch im abgelaufenen Projektjahr, einem Jahr mit durchschnittlichen Winterverlusten aber relativ großen lokalen Unterschieden, konnten Ergebnisse der letzten Jahre bestätigt und somit verfestigt werden. Diese sind insbesondere der positive Effekt der Verwendung von jungen Königinnen und der Anwendung biotechnischer Methoden zur Varroa-Bekämpfung. Auch der Einfluss der Betriebsgröße, der Wanderimkerei und der Tracht konnte wieder gezeigt werden. Eine Brücke zum Viren-Schwerpunkt des Projektes "Zukunft Biene 2" stellt auch das Ergebnis dar, dass wenn von den Imkereien Bienen mit verkrüppelten Flügeln beobachtet wurden, unter anderem ein Symptom von Virenbefall, dies ein Alarmsignal für statistisch signifikant erhöhte Winterverluste darstellt.

Die immer größere Datendichte dieser Ergebnisse zeigt auch eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Uni Graz und der AGES hinsichtlich der Wintersterblichkeit. Die beiden Institutionen hatten wohlüberlegt unterschiedliche Konzepte bei teilweise überlappenden Fragestellungen verwendet. Hatte die AGES gezielt definierte Stände beprobt, so verwertete die Uni Graz die größere Stichprobe der freiwilligen Einsendung der österreichischen ImkerInnen.

Einer der großen Vorzüge des Projektes Zukunft Biene 2 ist der lange Untersuchungszeitraum der uns für die Virendetektion in Österreichs Bienenvölkern - untersucht werden 8 unterschiedliche Viren - zur Verfügung steht. Im ersten der drei anberaumten Jahre konnten bereits interessante Befunde über das Auftreten von Bienenviren in Österreich erarbeitet werden. So zeigten sich sowohl lokale Unterscheide als auch, und das ist neu, eine Abhängigkeit von der Meereshöhe. Manche Viren kamen in nahezu allen untersuchten Völkern vor. Bisher liegen erst die Resultate eines Untersuchungsjahres vor, die Ergebnisse der weiteren Untersuchsjahre werden eine spannende Sache.

Die jüngste Partnerin des Kombinationsprojektes, die Veterinärmedizinische Universität Wien, bemüht sich um eine kostengünstige und einfach durchzuführende Bestimmungsmethode für Infektionen mit den wichtigsten Bienenviren. Diese Methoden sollen in weiterer Folge auch den BienenhalterInnen im Freiland zur Verfügung stehen. Besonders weit und vielversprechend sind dabei die Experimente mit I flaviren, wie den weit verbreiteten Flügeldeformationsviren und Sackbrutviren.

Karl Crailsheim, Projektleiter

Graz, am 22.8.2019

Danksagung

Großer Dank gebührt den Geldgebern dieses Projektes, dem Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus, den Bundesländern, der Biene Österreich, und den beteiligten Forschungseinrichtungen (Universität Graz, AGES, Veterinärmedizinische Universität Wien), letzteren auch für die Stellung des wissenschaftlichen Personals.

Der Großteil unserer Untersuchungen wäre nicht möglich, gäbe es nicht eine hervorragende Kooperation zwischen der österreichischen ImkerInnenschaft und den beteiligten WissenschaftlerInnen sowie den technischen MitarbeiterInnen – auch hierfür besonderen Dank.

Karl Crailsheim
Projektleiter *Zukunft Biene 2*

Zusammenfassung

Im Modul U werden die Winterverluste von Bienenvölkern erhoben und auf Risikofaktoren hin untersucht. In Österreich wird diese Untersuchung seit nunmehr zwölf Jahren durchgeführt. Die Verlustraten der eingewinterten Völker reichen dabei von 8,1% (Winter 2015/16) bis 28,4% (Winter 2014/15). Die 1534 Antworten betreffend 33.651 eingewinterte Bienenvölker der Untersuchung 2019 wurden auf ihre Repräsentativität überprüft und Analysen zur geografischen Verteilung der Verluste, zu den die Winterverluste begleitenden Symptomen, sowie zur Betriebsweise durchgeführt. Ein wichtiger Faktor war außerdem die Analyse der Behandlungsmethoden, welche zur Bekämpfung von *Varroa destructor* eingesetzt wurden und der Einfluss dieser Methoden auf die Wintersterblichkeit.

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2018/19 bei 15,2% (95% Konfidenzintervall: 14,4-16,1). Die Unterschiede zwischen den Verlustraten der einzelnen Bundesländer waren mit 9,9% (im Burgenland) und 19,6% (in Wien) stärker ausgeprägt als im Vorjahr. Wie in den vorangegangenen Jahren konnte ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die Wintersterblichkeit nachgewiesen werden, mit geringeren Verlusten bei größeren Betrieben. Von höchsten Verlusten betroffen waren Imkereien mit weniger als 20 Völkern. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor, der unterschiedliche Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet, zu diskutieren. Die im Winter 2018/19 erlittenen Winterverluste liegen, verglichen mit bisherigen Ergebnissen, im mittleren Bereich (der Mittelwert aller bisher für Österreich erhobenen Werte liegt bei 16,3%).

Wie bereits aus den vorangegangenen Untersuchungsjahren bekannt, konnten auch heuer wieder negative Effekte bei Imkereien mit im Vergleich zum Vorjahr häufiger aufgetretenen Königinnenproblemen während der Saison, sowie beim Vorkommen der Trachtpflanze Mais festgestellt werden. Die Verluste in Lagen über 600 m Seehöhe waren signifikant niedriger als jene zwischen 200 und 600 m. Zusätzlich konnten weitere für die Überwinterung wichtige Faktoren, wie geringere Verluste bei Wanderimkereien sowie der positive Effekt der Verwendung junger Königinnen oder eines eigenen Wachskreislaufes identifiziert werden. Bei der Varroabekämpfung zeigte sich ein weiteres Mal, dass biotechnische Methoden (totale Brutentnahme, Königin käfigen) ein probates Mittel zur Reduktion von Völkerverlusten sind. Als Brücke zu den anderen Modulen sei auf das Ergebnis signifikant höherer Winterverluste bei Imkereien hingewiesen, die während der Saison Bienen mit verkrüppelten Flügeln beobachteten, unter anderem ein Symptom für eine Virenerkrankung, hingewiesen.

Im Modul A wird ein österreichweites Monitoring von Bienenviren durchgeführt. Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden, das keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der Bienenviren in Österreich erlaubt. Daher wird die Prävalenz von acht Bienenviren auf Bienenstandniveau über drei Jahre erhoben. Diese Viren umfassen das Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV), das Schwarze Königinnenzellen-Virus (BQCV), das Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV), das Flügeldeformationsvirus (getrennt in Typ A (DWV-A) und Typ B (DWV-B)), das Israelische Akute Paralyse-Virus (IAPV), das Kashmir-Bienenvirus (KBV) und das Sackbrutvirus (SBV).

Mit dem 2. Zwischenbericht liegen nun die Ergebnisse für die erste Probenahme im Herbst 2018 vor, an der 198 ImkerInnen aus ganz Österreich teilnahmen. In den Bienenproben wurden sechs der acht untersuchten Viren gefunden, die Viren IAPV und KBV wurden in keiner Probe nachgewiesen. Die beiden am häufigsten nachgewiesenen Viren, BQCV und DWV-B, waren in fast allen Bienenproben nachweisbar. BQCV war in 191 der 198 Proben (Prävalenz: 96%;

Konfidenzintervall: 93-98%) und DWV-B in 181 der Proben nachweisbar (91%; Konfidenzintervall: 87-95%). ABPV und SBV wurden in etwa der Hälfte der untersuchten Proben gefunden. ABPV war in 106 Proben (54%; Konfidenzintervall: 47-60%) und SBV in 123 Proben nachweisbar (62%; Konfidenzintervall: 55-69%). CBPV und DWV Typ A (DWV-A) wurden selten nachgewiesen: CBPV in 17 Proben (9%; Konfidenzintervall: 5-13%) und DWV-A in 2 Proben (1%; Konfidenzintervall: 0-3%).

Der Virustiter der positiven Proben variierte bei allen nachgewiesenen Viren um mehrere Zehnerpotenzen. Der minimal gemessene Titer lag zwischen 10^4 und 10^5 RNA-Kopien/ml Homogenat, der maximal gemessene Wert zwischen 10^9 und 10^{12} RNA-Kopien/ml Homogenat. Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median zwischen 10^5 und 10^6 RNA-Kopien/ml Homogenat). Bei CBPV und DWV-B wurden höhere Virustiter gemessen (Median zwischen 10^6 und 10^7 RNA-Kopien/ml Homogenat). DWV-A wurde nur in zwei Proben gemessen (Werte: 2×10^4 ; 4×10^8 RNA-Kopien/ml Homogenat).

Auswertungen der Faktoren Bundeslandzugehörigkeit, Seehöhe und Virussympomatik im Volk zeigten signifikante Zusammenhänge. Dabei traten vier Viren (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV) vermehrt in den östlichen Bundesländern auf und selten in den Bundesländern Tirol und Kärnten. Dies scheint vor allem mit der unterschiedlichen Seehöhe der Bundesländer zusammenzuhängen, da BQCV, DWV-B und SBV in höheren Lagen signifikant seltener auftraten als in niederen Lagen. Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Bienen mit verkrüppelten Flügeln und einem erhöhten DWV-B Titer in den Proben. Das CBPV-assoziierte Symptom schwarz-glänzende Bienen trat signifikant häufiger auf Ständen auf, in deren Proben CBPV gefunden wurde.

Die Daten der nächsten zwei Versuchsjahre werden es erlauben, Aussagen über die Varianz der Virusprävalenz zwischen verschiedenen Jahren zu machen. Außerdem wird durch die mehrjährigen Untersuchungen die Menge verfügbarer Daten erhöht, was die Aussagekraft bezüglich möglicher Zusammenhänge zwischen Virustiter und Winterverlusten bzw. Virussympomatik erhöhen kann.

Im Modul V sollen Antikörper zum Nachweis viraler Genprodukte generiert und „Enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld entwickelt werden. Im ersten Schritt müssen geeignete Antigen-Präparationen für die Immunisierungen und Tests produziert werden. Als Projektdauer wurden drei bis vier Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn ab Mai 2018 nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte. Durch den günstigen Startzeitpunkt konnte die saisonale Brutaktivität der Honigbienen 2018 effizient ausgenutzt werden, um durch Infektionsexperimente authentische Antigene verschiedener Virus-Spezies zu produzieren. In den ersten vier Monaten des Projektes wurden viele verschiedene Virusstämme auf ihre Reinheit untersucht und die Infektionseffizienz der Viruspräparationen getestet. Es gelang, Antigene des Deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sackbrutvirus (SBV), Virus der chronischen Bienenparalyse (CBPV) sowie des Virus der akuten Bienenparalyse (ABPV) zu produzieren. Durch Ultrazentrifugation wurden Antigen-Konzentrate erzeugt, die in Screening- und Charakterisierungsversuchen eingesetzt werden können. Im Jahr 2019 wurde das Strukturprotein VP1 des SBV exprimiert, gereinigt und für Immunisierungen von Mäusen herangezogen. Die B-Lymphozyten aus der Milz wurden bereits fusioniert und befinden sich derzeit im Screening und in der Selektion der einzelnen Hybridomzellklone. Rekombinante Antigene wurden von den monoklonalen Antikörpern bereits effizient im ELISA detektiert.

Project Summary

In module U, winter losses of bee colonies are monitored and examined for risk factors. So far, this study has been carried out in Austria for twelve years. The loss rates of overwintering colonies range from 8.1% (winter 2015/16) to 28.4% (winter 2014/15). The 1534 answers concerning 33,651 winterized bee colonies of the 2019 study were checked for their representativeness and analyses were carried out on the geographical distribution of the losses, on the symptoms accompanying the winter losses, and on the beekeeping practices. An important factor was also the analysis of treatment methods used to combat *Varroa destructor* and the influence of these methods on winter mortality.

The winter loss rate for the whole of Austria was 15.2% in 2018/19 (95% confidence interval: 14.4-16.1). The differences between the loss rates of the provinces were larger than in the previous year ranging from 9.9% (in the Burgenland) to 19.6% (in Vienna). As in previous years, a significant impact of the size of beekeeping operation on winter mortality could be demonstrated, with lower losses for larger apiaries. Highest losses affected beekeepers with less than 20 colonies. The size of the apiary as a factor is to be discussed as a lumping factor that includes different parameters such as degree of professionalism, experience in beekeeping, etc. The winter losses suffered in winter 2018/19 can be described as medium (the average winter loss rate of all winters with data so far is 16.3%).

The negative effects that were already known from several previous studies, such as queen problems that occurred more frequently during the season than in the previous year, the occurrence of maize as pollen plant and the size of the farm, could be confirmed as factors that significantly increase winter losses. Loss rates in altitudes above 600 m were significantly lower than those between 200 and 600 m above sea level. We could identify further factors important for successful overwintering, such as lower losses for migratory beekeeping operations, positive effects of young queens in the colonies and use of own wax (in contrast to wax obtained from outside the operation). Previous results on significantly positive effects of biotechnical methods to combat the varroa mite (complete brood removal, queen confinement) could be confirmed. As a bridge to other modules of this project, we want to stress that the observation of bees with crippled wings during the bee's active season, a possible sign for viral diseases, results in significantly higher winter losses.

In module A, an Austria-wide monitoring of bee viruses will be carried out. Despite the importance of bee viruses for bee health, only limited knowledge is currently available on the occurrence of viruses in Austria's bee colonies, which does not allow reliable statements on the general prevalence of bee viruses in Austria. Therefore the prevalence of eight bee viruses found at an apiary level is measured over three years. These viruses comprise Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), the Black Queen Cell Virus (BQCV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Deformed Wing Virus (separated in Type A (DWV-A) and Type B (DWV-B)), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), Kashmir Bee Virus (KBV) and the Sacbrood Virus (SBV).

This second status report presents the results of the first sampling in autumn 2018, in which 198 beekeepers from all over Austria participated. In the analysed bee-samples, six of the eight viruses were detected, the viruses IAPV and KBV were not detected in any sample. The two most frequently detected viruses, BQCV and DWV-B, were present in nearly every bee-sample. BQCV was detected in 191 of the 198 samples (prevalence: 96%; confidence interval: 93-98%) and DWV-B in 181 samples (91%; confidence interval: 87-95%). ABPV and SBV were detected in approximately half of the samples. ABPV was detected in 106 samples (54%; confidence interval:

47-60%) and SBV in 123 samples (62%; confidence interval: 55-69%). CBPV and DWV A were seldom present: CBPV in 17 samples (9%; confidence interval: 5-13%) and DWV A in two samples (1%; confidence interval: 0-3%).

The virus titre of the positive samples varied by several decimal powers in all detected viruses. The titre minimum ranged between 10^4 and 10^5 RNA-copies/ml homogenate, the maximum between 10^9 and 10^{12} RNA-copies/ml homogenate. The three viruses ABPV, BQCV and SBV had the lowest titre values (Median between 10^5 and 10^6 RNA-copies/ml homogenate). With CBPV and DWV-B higher titre values were measured (Median between 10^6 and 10^7 RNA-copies/ml homogenate). DWV-A was detected just in two samples (values: 2×10^4 ; 4×10^8 RNA-copies/ml homogenate).

The analysis of the factors province, sea level and virus symptoms in the colonies showed significant correlations. Four viruses (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV) were frequently present in the eastern provinces and seldom in the provinces Tirol and Carinthia. This pattern may be correlated with the differences in sea level between the provinces, because the prevalence of BQCV, DWV-B and SBV was significantly increased at higher altitudes in comparison to lower altitudes. The data showed a significant correlation between the observation of bees with deformed wings and an elevated DWV-B titre. The CBPV-associated symptom black and shiny bees was present significantly more often in apiaries with CBPV-positive samples.

The data of the next two project years will allow to make statements about the variance in virus prevalence between different years. Furthermore, the available dataset will be increased by the multi-year approach, which will increase the explanatory power regarding possible correlations between virus titre and winter losses or virus symptoms.

The aim of Module V is to generate monoclonal antibodies for the detection of viral gene products and for the development of enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). The ELISA will be used for the rapid and cost-effective detection of viral infections in honey bee colonies in the laboratory and under field conditions. The first step of this module is the production of antigen preparations that can be used for vaccination of experimental animals and antigen tests. The project will run for three to four years and started as planned in May 2018. Due to the favourable project start time, the seasonal breeding activity of our honey bees in 2018 could be used to produce authentic antigens of different virus species through infection experiments. In this first phase of the project, preparations of different virus species were generated and studied to determine their purity and infectivity. Antigens of Deformed Wing Virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sacbrood Virus (SBV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) and Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) were produced. Concentrated antigen preparations have been generated by ultracentrifugation and can be used for future screening and immune response characterization experiments. In 2019 the protein VP1 of SBV was expressed in bacteria, purified and used for the immunization of mice. The B-lymphocytes of the mouse spleen were fused with tumor cells and the generated hybridomas secrete different monoclonal antibodies. Individual hybridoma cell clones are further selected depending on the reactivity of the secreted IgGs. The recombinant antigens used for immunization have already been successfully detected in ELISA by several newly generated monoclonal antibodies. For use in diagnostic tests, antibodies must now be found that have the highest possible specificity for SBV VP1 and are simultaneously reactive with the SBV-VP1 molecules from different strains. The project part is therefore on schedule.

(U) Wintersterblichkeit

1.1 Zusammenfassung der Untersuchung der Wintersterblichkeit 2018/19

Im Modul U werden die Winterverluste von Bienenvölkern erhoben und auf Risikofaktoren hin untersucht. In Österreich wird diese Untersuchung seit nunmehr zwölf Jahren durchgeführt. Die Verlustraten der eingewinterten Völker reichen dabei von 8,1% (Winter 2015/16) bis 28,4% (Winter 2014/15). Die 1534 Antworten betreffend 33.651 eingewinterte Bienenvölker der Untersuchung 2019 wurden auf ihre Repräsentativität überprüft und Analysen zur geografischen Verteilung der Verluste, zu den die Winterverluste begleitenden Symptomen, sowie zur Betriebsweise durchgeführt. Ein wichtiger Faktor war außerdem die Analyse der Behandlungsmethoden, welche zur Bekämpfung von *Varroa destructor* eingesetzt wurden und der Einfluss dieser Methoden auf die Wintersterblichkeit.

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2018/19 bei 15,2% (95% Konfidenzintervall: 14,4-16,1). Die Unterschiede zwischen den Verlustraten der einzelnen Bundesländer waren mit 9.9% (im Burgenland) und 19,6% (in Wien) stark ausgeprägt. Wie in den vorangegangenen Jahren konnte ein signifikanter Einfluss der Betriebsgröße auf die Wintersterblichkeit nachgewiesen werden, mit geringeren Verlusten bei größeren Betrieben. Von höchsten Verlusten betroffen waren Imkereien mit weniger als 20 Völkern. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor, der unterschiedliche Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet, zu diskutieren. Die im Winter 2018/19 erlittenen Winterverluste liegen, verglichen mit bisherigen Ergebnissen, im mittleren Bereich (der Mittelwert aller bisher für Österreich erhobenen Werte liegt bei 16,3%).

Wie bereits aus mehreren vorangegangenen Untersuchungen bekannt, konnten auch heuer wieder negative Effekte bei den im Vergleich zum Vorjahr häufiger aufgetretenen Königinnenproblemen während der Saison, sowie beim Vorkommen der Trachtpflanze Mais und Unterschieden in der Betriebsgröße festgestellt werden. Zusätzlich konnten weitere für die Überwinterung wichtige Faktoren, wie geringere Verluste bei Wanderimkereien sowie der positive Effekt eines eigenen Wachskreislaufes, identifiziert werden. Bei der Varroabekämpfung zeigte sich ein weiteres Mal, dass biotechnische Methoden (totale Brutentnahme, Königin käfigen) ein probates Mittel zur Reduktion von Völkerverlusten sind. Als Brücke zu den anderen Modulen sei auf das Ergebnis signifikant höherer Winterverluste bei Imkereien hingewiesen, die während der Saison verkrüppelte Flügel zeigten, unter anderem ein Symptom für Virenerkrankung, hingewiesen.

1.2 Einleitung

In den letzten Jahren hat das Thema Bienensterben weltweit immer mehr an Bedeutung gewonnen, nicht zuletzt dadurch, dass auch die Zahl der natürlichen Bestäuber wie Wildbienen, Hummeln, Schmetterlinge und Schwebfliegen deutlich sichtbar abnimmt. Die Bedeutung der Honigbiene – ökologisch und ökonomisch – ist entscheidend und unumstritten. Sie bestäubt beim Sammeln von Pollen und Nektar einerseits viele Wildpflanzen, wodurch sie erheblich zur Erhaltung der Artenvielfalt beiträgt, und andererseits auch viele vom Menschen genutzte Pflanzen. Aufgrund der Stärke ihrer Völker, der Zucht- und Transportmöglichkeit an den Ort des gewünschten Bestäubungseinsatzes kann sie gezielt als Bestäuber von Kulturpflanzen eingesetzt werden. Ihre

Bestäubungsleistung ist enorm, sie wird weltweit jährlich auf einen finanziellen Wert von 153 Milliarden Euro geschätzt (Gallai et al., 2009). Damit ist die Biene nach dem Rind und dem Schwein das dritt wichtigste Tier für die Ernährung des Menschen (Kearns et al., 1998).

Die größten Gefahren für Bienen, Hummeln, Schmetterlinge und andere Insekten sind von Menschen verursacht. Es wird vermutet, dass der Rückgang der natürlichen Bestäuber mit dem Verlust von Habitaten, dem Einsatz von Pestiziden, der Ausbreitung von Parasiten und Pathogenen sowie mit Umweltverschmutzung und dem Klimawandel zusammenhängt (Biesmeijer et al., 2006; Cameron et al., 2011; vanEngelsdorp et al., 2011; Cornman et al., 2012; Goulson, 2013; Steinhauer et al., 2014; 2018; van der Zee et al., 2014; Clermont et al., 2015a, 2015b; Woodcock et al., 2016). Für die ökonomisch wie auch ökologisch so wichtige Honigbiene *Apis mellifera* konnte auch der Einfluss des Menschen durch die Betriebsweise (Krankheitsprophylaxe und -bekämpfung) auf Völkerverluste nachgewiesen werden (Jacques et al., 2017).

Generell ist das Bienensterben kein neues Phänomen, im Gegenteil, schon seit Beginn der Bienenhaltung vor etwa 7000 Jahren in Mesopotamien gibt es Überlieferungen von krankheitsbedingten Völkerverlusten (Flügel, 2015). Bereits zu dieser Zeit gab es ausführlichere Schriften, aus Griechenland und dem Römischen Reich stammend, über die Haltung der Biene und Vorgehensweisen bei Erkrankungen. Im deutschsprachigen Raum sind bis ins 17. Jahrhundert keine Aufzeichnungen über Bienenverluste bekannt. Erst der Wunsch von Teilen der Bevölkerung, die Bienenhaltung zu verbessern, sorgte dafür, dass Bienenkrankheiten, wie etwa die Faulbrut oder Ruhr, dokumentiert wurden. Völkerverluste, die nicht auf Pathogene zurückzuführen sind, wurden während der industriellen Revolution durch die Optimierung der Beuten sowie Züchtung der Honigbiene weitestgehend reduziert. Dies, sowie der Fortschritt der Bakteriologie zu Beginn des 20. Jahrhunderts und etwas später die Möglichkeit Viren nachzuweisen, ermöglichte erstmals die Erforschung von Krankheitserregern, welche für hohe Bienenverluste verantwortlich sind. Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Massensterben von Bienenvölkern verzeichnet, bei welchen die genaue Ursache nicht bekannt war. Als erstes großes Massensterben wurde 1906 jenes auf der englischen Insel Wight („Isle of Wight Disease“) dokumentiert (Neumann & Carreck, 2010; Flügel, 2015).

Im letzten Jahrzehnt hatten besonders die USA immer wieder mit extremen Winterverlusten von Bienenvölkern zu kämpfen. Mehrere Jahre in Folge haben dort etwa 30% der eingewinterten Völker nicht überlebt (vanEngelsdorp et al., 2007, 2008, 2010, 2011; Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015). Auch Brasilien verzeichnete in den Jahren 2013-2017 sehr hohe Verluste, wobei hier Pestizide als Hauptursache für die Verluste vermutet werden (Castilhos et al., 2019). Dennoch häufen sich die Fälle, in denen keine eindeutigen Gründe für das Massensterben festgestellt werden können. Es wird angenommen, dass die Ursachen für das Bienensterben komplex sind und dass der Auslöser für dieses Phänomen eine Kombination von mehreren Faktoren ist (Moritz et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2013; Steinhauer et al., 2014). In den USA spricht man von „colony collapse disorder“, kurz CCD (vanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010). Im deutschsprachigen Raum wird CCD auch als „Bienen-Verschwindkrankheit“ bezeichnet (Flügel, 2015). Die Symptome sind: wenige adulte Bienen in den Völkern, verdeckelte Brut kann aber vorhanden sein, es finden sich aber keine toten Bienen in und um die Völker (vanEngelsdorp et al., 2009).

Seit einigen Jahren werden auch in Europa immer wieder hohe Winterverluste von Bienenvölkern verzeichnet (Chauzat et al. 2016). In Österreich ist ein Massensterben von Honigbienenvölkern im Winter mit derart hohen Verlusten von bis zu dreißig Prozent über mehrere Jahre in Folge – wie in den USA – bislang, mit Ausnahme der Winter 2011/12 und 2014/15, nicht aufgetreten. Im internationalen Vergleich waren die Verluste in Österreich in den vergangenen Jahren, mit

Ausnahme der Winter 2011/12, 2014/15 und 2016/17, gering bis durchschnittlich (van der Zee et al., 2012, 2014; Brodschneider et al., 2016, 2018a, 2019). In den ersten vier Jahren der vom Zoologischen Institut der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführten Untersuchungen lagen sie zwischen 9,3% und 16%. Verluste dieser Größenordnung können durch Nachzucht im Sommer kompensiert werden. Im Winter 2011/12 verloren die österreichischen ImkerInnen jedoch 25,9% ihrer eingewinterten Völker (Brodschneider & Crailsheim, 2013) und im Winter 2014/15 sogar 28,4% (Brodschneider et al., 2018b). Als Ursachen für die hohe Wintersterblichkeit werden Parasiten und Pathogene, allen voran die Milbe *Varroa destructor*, durch den Menschen ausgebrachte Pestizide, mangelhafte Ernährung durch ein einseitiges oder zeitlich verkürztes Trachtangebot, sowie die unzureichende Betreuung durch den Menschen, aber auch sozioökonomische Faktoren vermutet (Genersch et al., 2010; Budge et al., 2015a, 2015b; Goulson et al., 2015; Lee et al., 2015; Moritz & Erler, 2016; Tsvetkov et al., 2017; Woodcock et al., 2017; Jacques et al., 2017). Weitere Gründe können außerdem Verluste von Königinnen, Probleme mit Königinnen – etwa aufgrund von Schädigungen durch Neonicotinoide (Williams et al., 2015; Dussaubat et al., 2016; Wu-Smart & Spivak, 2016) – oder schlichtweg das Verhungern von Völkern während des Winters sein. Auch eine Rolle spielen die Betriebsgröße der Imkerei, sprich die Anzahl der vorhandenen Völker und die damit einhergehende Professionalität im Bienenmanagement, sowie das Wandern mit Bienenstöcken zu verschiedenen Trachtquellen (van der Zee et al., 2012, 2014; Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015; Gray et al., 2019). Eine einfache, alleinige Ursache für die Winterverluste ist sehr selten auszumachen. Vielmehr sind die Ursachen auch in Österreich komplex und vielfältig und somit in ihrer Bedeutung schwer einzuschätzen (Brodschneider et al., 2010; Moritz et al., 2010; Potts et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2013; Staveley et al., 2014; Döke et al., 2015; Goulson et al., 2015).

Ein Parasit, welcher seit den 1980er Jahren für Völkerverluste in Österreich und Deutschland verantwortlich gemacht wird ist die aus Asien eingeschleppte, ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* (Rosenkranz et al., 2010; Genersch et al., 2010; Morawetz et al., 2019). Die Analyse der von den ImkerInnen durchgeführten Behandlungen gegen diesen Risikofaktor ist daher von großer Bedeutung um Verluste zu reduzieren. Ursprünglich war nur die östliche Honigbiene *Apis cerana* von diesem Parasiten befallen. Heute ist die Varroamilbe beinahe weltweit – mit Ausnahme einiger Gebiete im Norden Europas und einigen Inseln – verbreitet (Dahle, 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2011). *Apis mellifera* hat mit dem ursprünglichen Wirt *Apis cerana* nur das aggressive Verhalten als Abwehrstrategie gegenüber dem Parasiten gemein, wenngleich das bei der westlichen Honigbiene *Apis mellifera* geringer ausgeprägt ist. Unterschiede zwischen den beiden Arten zeigen sich etwa im Hygieneverhalten und bei *Apis cerana* der weitgehenden Limitierung des Befalls auf Drohnenbrut (Rosenkranz et al., 2010).

Die Vermehrung von *Varroa destructor* findet in verdeckelten Drohnen- und Arbeiterinnenbrutzellen statt. Als Nahrung der Milbe dient die Hämolymphe und der Fettkörper der Larven und adulten Bienen. Nach dem Schlupf der Biene betreibt die Milbe Phoresie. Das bedeutet, dass *Varroa destructor* die adulte Biene als Transportmittel benutzt, um in neue Brutzellen oder gar entfernt liegende Bienenvölker zu gelangen. Die Parasitierung der Brut führt unter anderem zu einem Gewichtsverlust, welcher sich auf den späteren Paarungserfolg von Drohnen auswirkt, außerdem kann sich die Lebensspanne von Arbeiterinnen verkürzen. Der Befall von Sammlerinnen beeinflusst das Lernvermögen und das Heimflug-Verhalten (Kralj & Fuchs, 2006; Kralj et al., 2006; Rosenkranz et al., 2010). Die betroffenen Bienen leiden zudem unter Orientierungsschwierigkeiten, was möglicherweise der Verbreitung der Milbe dient. Zudem wird der Aufbau wichtiger Proteinreserven, die für den Überwinterungserfolg entscheidend sind, erschwert (Amdam et al., 2004). Durch die Parasitierung mit der Varroamilbe wird durch eine Immunsuppression die Vermehrung von Viren bei Sekundärinfektionen erleichtert. Am besten bekannt ist die durch

Varroose begünstigte Infektion mit dem Deformed Wing Virus (DWV, Flügeldeformationsvirus), welche sich durch die stark verkümmerten Flügel und verkürzten Abdomina (Hinterleibe) der Bienen auszeichnet (Rosenkranz et al., 2010). Bienenvölker, in denen dieses Virus nachgewiesen wurde, waren schwächer, das heißt sie hatten weniger mit Bienen besetzte Waben und Brut als nicht befallene Völker (Budge et al., 2015a). Mit DWV infizierte adulte Bienen zeigen eine verkürzte Lebensspanne, ein jüngeres Sammelalter und eine verkürzte Sammelzeitspanne (Benaets et al., 2017), aber auch die Übertragung anderer Viren steht in Zusammenhang mit der Varroamilbe (Traynor et al., 2016). Ein hoher Parasitierungsgrad durch *Varroa destructor* im Monat September hat neben anderen Faktoren wie dem Alter der Königinnen, dem Erfahrungsgrad der ImkerInnen, der Stärke der Völker im September, einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Winterverluste (Morawetz et al., 2019).

Fehlende oder mangelhaft vom Imker durchgeführte Behandlung gegen *Varroa destructor* führt zumeist zu einer Schwächung oder sogar zum Verlust des Volkes innerhalb von zwei bis drei Jahren (Rosenkranz et al., 2010). Die Bekämpfung des Parasiten basiert entweder auf biotechnischen Maßnahmen (zum Beispiel Entnahme von verdeckelter Drohnen- oder Arbeiterinnenbrut, Bannwabenverfahren, Brutunterbrechung), Einsatz zugelassener Tierarzneimittel auf Basis organischer Säuren (Ameisen-, Oxal-, Milchsäure), ätherischer Öle (Thymol, Eucalyptol, Menthol, Kampfer) und Acariziden aus verschiedenen Wirkstoffgruppen. Je nach chemischen Eigenschaften der eingesetzten Stoffe (fett- bzw. wasserlöslicher Wirkstoff) kann es dabei zu einer ungewollten Ansammlung der Stoffe in Honig und Wachs, bis hin zur Beeinflussung der Gesundheit des Volkes kommen (Rosenkranz et al., 2010). Entscheidend für den Erfolg der Behandlung ist der Zustand des Volkes (mit bzw. ohne verdeckelte Brut), die Art und der Zeitpunkt der jeweiligen Varroabehandlung (Brodschneider & Crailsheim, 2013; van der Zee et al., 2014).

Neben der Varroamilbe existieren in Österreich noch andere Schädlinge, die der Gesundheit der Völker zusetzen. Zu erwähnen ist unter anderem das Mikrosporidium *Nosema* spp., das in den Arten *N. ceranae* und *N. apis* in Österreich nachgewiesen wurde. Dieser Einzeller befällt die Epithelzellen des Mitteldarms adulter Tiere und wirkt dort als intrazellulärer Parasit, der Dysenterie, eine Entzündung des Darms mit einhergehender Diarrhö, auslöst. Die durch *Nosema* spp. ausgelöste Krankheit wird als Nosemose bezeichnet. Weitere Bedrohungen sind Bakterien, die Amerikanische Faulbrut (*Paenibacillus larvae*) oder Europäische Faulbrut (*Melissococcus plutonius*) auslösen, Pilze (*Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*), Amöben (*Malpighamoeba mellificae*), weitere Arthropoden wie die Tracheenmilbe (*Acarapis woodi*) und in geringem Ausmaß Innenschädlinge wie zum Beispiel die Große und Kleine Wachsmotte oder der Totenkopfschwärmer (Brodschneider & Crailsheim, 2011).

Der Mensch fördert durch die räumliche Nähe vieler Bienenvölker an einem Bienenstand die horizontale Verbreitung der Krankheitserreger (Seeley & Smith, 2015; DeGrandi-Hoffman et al., 2017). Die Verbreitung von Krankheiten kann aber nicht nur durch eine hohe Völkerdichte an einem Standort, sondern auch durch Handel und Wanderimkerei über weite Entfernungen stattfinden. Internationale Untersuchungen von van der Zee et al. (2012, 2014) sowie Ergebnisse aus den USA (Steinhauer et al., 2014; Lee et al., 2015) zeigen, dass größere Betriebe in manchen Jahren sogar geringere Winterverluste als kleinere Betriebe verzeichneten, was neben der hohen Völkerdichte auch auf andere Faktoren bei der Verbreitung schließen lässt. Auch eine vertikale Erregerübertragung mancher Krankheiten über Ei- oder Samenzellen ist möglich (Peng et al., 2015; Yue et al., 2007).

Immer mehr Studien widmen sich der Erforschung der synergistischen Wirkung verschiedener Stressfaktoren. Untersuchungen von Pettis et al. (2012), Di Prisco et al. (2013) sowie von Alburaki et al. (2016) machen auf die Zusammenhänge zwischen dem subletalen Einfluss von Pestiziden

und gesteigertem Pathogenbefall bei Honigbienen aufmerksam. Zum Beispiel verursacht das Neonicotinoid Clothianidin eine Schwächung des Immunsystems, und damit eine stärkere Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (Di Prisco et al., 2013). Auch die Kombination von Neonicotinoiden und der Varroamilbe resultieren in höheren Verlustraten, insbesondere bei den langlebigen Winterbienen (Straub et al., 2019). Pettis et al. (2012) stellte zudem eine höhere Anzahl von *Nosema* spp.-Sporen unter dem Einfluss von Imidacloprid fest, ein Hinweis für eine gesteigerte Anfälligkeit für den Darmparasit *Nosema* spp. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Larven, die mit Amerikanischer Faulbrut infiziert und gleichzeitig subletalen Dosen bestimmter Pestizide ausgesetzt waren, eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen als Larven die nur einem dieser beiden Stressoren ausgesetzt waren (Hernández López et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Studien unterstützen somit die Annahme multifaktorieller Ursachen hoher Winterverlust-raten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Aufsummierung mehrerer Risikofaktoren, wie zum Beispiel Krankheitserreger, Mangelernährung und Pestizidkontamination, stärker als ein Faktor allein, und auch die Summe der einzelnen Schädigungen auf den Überwinterungserfolg auswirken kann (Goulson et al., 2015; Barroso-Arevalo et al., 2019). Eine gezielte Einleitung von Gegenmaßnahmen wird dadurch erschwert (Brodschneider & Crailsheim, 2013).

Die Dokumentation der Winterverluste ist aus mehreren Gründen sehr wichtig: einerseits wegen der bereits erwähnten ökonomischen und ökologischen Bedeutung der Honigbiene und andererseits, um die Ursachen zu ergründen und entsprechend darauf reagieren zu können. Die Erhebung der Winterverluste in Österreich erfolgte seit 2008 durch das Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Karl-Franzens-Universität Graz im Rahmen des Forschungsnetzwerkes COLOSS (prevention of honey bee COlony LOSSes; Brodschneider et al., 2010; Brodschneider & Crailsheim, 2013). Seit der Überwinterungsperiode 2013/14 erfolgen diese Erhebungen im Rahmen des Projektes „Zukunft Biene“ unter Einhaltung der von COLOSS etablierten und immer weiter angepassten Standards. Die Befragung erfolgte anhand des im Rahmen von COLOSS erarbeiteten Fragebogens: ImkerInnen in ganz Österreich werden auf freiwilliger Basis und auf Wunsch auch anonym zur Zahl ihrer eingewinterten Völker, deren Standort sowie zum Völkerverlust befragt. Zudem werden auch Fragen zur Betriebsweise, Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe und zu ökologischen Faktoren (etwa zum Trachtangebot) gestellt. Diese standardisierte Vorgehensweise, auch als Citizen Science oder Bürgerbeteiligung bezeichnet, erlaubt die Gewinnung großer Datensätze über das Bienensterben im Winter und ermöglicht zusätzlich zur Analyse der Winterverluste in Österreich auch internationale Vergleiche (Brodschneider et al. 2016, 2018a, 2019). Die Befragung der ImkerInnen stellt aber nur eine der im Rahmen von „Zukunft Biene“ getätigten Maßnahmen dar. In weiteren Untersuchungen im Rahmen von „Zukunft Biene“ wurden ausgewählte Völker auch Inspektionen durch geschulte Experten unterzogen und aufwändige Untersuchungen von Probenmaterial durchgeführt. Die Umfragen bilden eine wichtige Datenbasis für vertiefende Untersuchungen und sind somit, gemeinsam mit weiteren Untersuchungen (zum Beispiel gezielte Probenahmen im Teilprojekt „Virenmonitoring“), der Grundstock im Kampf gegen hohe Winterverlustraten (van der Zee et al., 2015).

1.3 Methodik und Ergebnisse

1.3.1 Datenerhebung

Die Erhebungen der Winterverluste von Bienenvölkern in Österreich wurden zwischen Februar und Mai 2018 mittels eines von COLOSS festgelegten Fragebogens durchgeführt. Der Fragebogen, der auch Fragen zur Betriebsweise inkludiert, ist so aufgebaut, dass ein breites Spektrum an Informationen mit einem für die ImkerInnen relativ geringen zeitlichen Aufwand abgefragt wird. Es werden außerdem von jeder Imkerei nur einfach festzustellende Fakten abgefragt, die ohne technische Hilfsmittel beantwortet werden können. Aus dem Fragebogen können die Winterverluste und mögliche, damit in Zusammenhang stehende, Risikofaktoren ermittelt werden.

Die Teilnahme kann entweder anonym oder nicht-anonym, durch Hinterlassen von Kontaktdaten, erfolgen. Die Papierfragebögen werden per Post an Imkervereine versendet, bei Veranstaltungen verteilt, die Umfrage ist online auf www.bienenstand.at verfügbar sowie, in einer Kurzversion, in der April-Ausgabe der Zeitschrift „Biene Aktuell“ veröffentlicht.

Die im Fragebogen gestellten Fragen beziehen sich auf Standort und Größe der Imkerei, die Anzahl der verlorenen Völker, sowie auch den möglichen Transport der Völker, die Betriebsweise, bestimmte Nahrungsquellen der Bienen und auch die Behandlung gegen die Varroamilbe.

Bei Winterverlusten wurde zwischen Völkerverlusten und Völkern mit Königinnen-Problemen unterschieden. Für die Gesamtverluste wurden beide addiert. Des Weiteren wurden auch in Bezug auf die verlorenen Völker leicht erkennbare Symptome abgefragt. Dabei konnten die ImkerInnen berichten, ob sie viele tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob sie keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk hatten, ob tote Bienen in Zellen gefunden wurden, ob die Bienen kein Futter im Stock hatten (verhungert sind), verhungert sind, obwohl genug Futter im Volk war (Futterabritt), ob sie keines der oben genannten oder unbekannte Symptome hatten und letztlich ob sie, unabhängig vom Schadbild, aufgrund von Elementarschäden (Flut, Vandalismus, Specht, etc.) Völker verloren hatten. Bei der Umfrage 2017/18 wurden die TeilnehmerInnen außerdem zum Auftreten von verkrüppelten Flügeln befragt, einem möglichen Hinweis auf eine Infektion mit dem Flügeldeformationsvirus (DWV).

Da es zwei Versionen von Fragebögen gab, wurden bei der längeren Version noch Fragen zur Erneuerung der Waben und zum Alter der Königinnen gestellt bzw. wollten wir wissen, welche Auswirkungen das nach Einschätzung der ImkerInnen auf die Völkerverluste hatte. Zur Auswahl standen folgende Antwortmöglichkeiten: gleich, besser, schlechter oder weiß nicht. Zusätzliche Fragen bezogen sich auf Trachtquellen und die Varroabehandlung.

Unser Ziel war es, so viele Daten wie möglich zu sammeln und eine gute Repräsentation der Situation in Österreich zu bekommen. Alle beteiligten ImkerInnen haben an der Umfrage freiwillig teilgenommen. Eine Verpflichtung bestand lediglich für jene Imkereien, die (freiwillig) am Österreichischen Bienengesundheitsprogramm (ÖBGP) teilnahmen. Alle Imkereien unabhängig von der Größe ihrer Betriebe konnten mitmachen.

In die Auswertung wurden nur jene Fragebögen aufgenommen, aus denen die Winterverluste berechnet werden konnten. Fehlerhafte oder unvollständige Fragebögen wurden nicht ausgewertet. Dazu zählten beispielsweise Fragebögen, wo Angaben zum Standort fehlten und/oder keine Angaben über die Zahl der eingewinterten oder überlebenden Völker gemacht wurden. Wenn eine Kontaktmöglichkeit angegeben wurde, wurde diese zur Nachfrage verwendet um fehlende oder fehlerhafte Daten zu korrigieren. Offensichtliche Duplikate wurden nach eingehender Prüfung ebenfalls entfernt.

1.3.2 Statistik

Alle Antworten wurden in einer Excel-Datenbank zusammengeführt, um die Auswertung der gesamten Daten, das heißt sowohl jener aus den Online-Fragebögen als auch der von den Papierfragebögen, durchführen zu können. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm „R“ durchgeführt (R Development Core Team, 2017). Berechnet wurde die Verlustrate sowie das 95%-Konfidenzintervall, in welchem der Standardfehler aus den Intercept des Null-Modells berücksichtigt wird, nach wissenschaftlich etablierten Methoden (vanEngelsdorp et al., 2013; van der Zee et al., 2013). Das Berechnungswerkzeug wurde auch online zugänglich gemacht: <http://bienenstand.at/uncategorized/confidence/>.

Kommt es beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen zu keiner Überlappung der Konfidenzintervalle, so unterscheiden sich diese Gruppen signifikant voneinander. Auf weitere grafische Hinweise signifikanter Unterschiede wird in den gezeigten Grafiken aus diesem Grund verzichtet, in der Bildunterschrift wird auf das Vorhandensein oder Fehlen signifikanter Unterschiede hingewiesen.

1.4 Ergebnisse

1.4.1 Beteiligung

Bei der Erhebung der Winterverluste 2018/19 haben wir von 1534 Imkereien Datensätze betreffend 33.651 eingewinterten Bienenvölkern erhalten. Prozentuell betrachtet erreicht die Beteiligung österreichischer Imkereibetriebe dabei einen Wert von 5,2%. Diese gaben Rückmeldung über 9% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölker. In der nachstehenden Tabelle 1.1 werden auch die Rückmeldungen der vorangegangenen Winter dargestellt. Die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen (in %) bilden die Angaben der „Biene Österreich“ (Tabelle 1.1).

Die Teilnahme war online, mittels Papierfragebogen oder mittels Kurzfragebogen in der Zeitschrift „Biene Aktuell“ möglich. Tabelle 1.2 zeigt, wie viele ImkerInnen sich von 2013/14 bis 2018/19 online, auf Papier oder über die Zeitschrift an unserer Untersuchung beteiligt haben. Von den 2018/19 insgesamt 1534 Imkereien haben 549 anonym teilgenommen und 985 haben eine Kontaktadresse, E-Mail oder Telefonnummer hinterlassen.

Tabelle 1.1: Beteiligungsrate der österreichischen Imkereien an unserer Untersuchung.

Jahr	Anzahl Imkereien gesamt*	Anzahl teilnehmende Imkereien	Beteiligungsrate Imkereien [%]	Anzahl Völker gesamt*	Anzahl eingewinterte Völker	Rückmeldung Völker [%]
2013/14	25.492	1023	4,0	382.638	18.794	4,9
2014/15	25.277	1259	5,0	376.121	22.882	6,1
2015/16	26.063	1289	4,9	347.128	23.418	6,7
2016/17	26.609	1656	6,2	354.080	43.852	12,4
2017/18	27.580	1391	5,0	353.267	28.373	8,0
2018/19	29.745	1534	5,2	372.889	33.651	9,0

* Die in den Spalten „Anzahl Imkereien“ und „Anzahl Völker“ angeführten Zahlen beziehen sich auf Imkereien und Bienenvölker in Österreich und beruhen auf Angaben der „Biene Österreich“. Diese Zahlen bilden die Grundlage für die Berechnung der Rückmeldungen.

1.4.2 Repräsentativität

1.4.2.1 Anonyme Teilnahme versus nicht anonyme Teilnahme

Im Untersuchungsjahr 2018/19 haben 64,2% der TeilnehmerInnen eine Kontaktmöglichkeit hinterlassen, wo hingegen 35,8% der teilnehmenden Imkereien die Möglichkeit der anonymen Teilnahme an der Umfrage bevorzugt haben. Beim Vergleich der Verlustrate zwischen anonymen und nicht-anonymen Teilnehmern konnte in diesem Jahr ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 1.1). Die Gruppe der anonymen Teilnehmer hatte im Untersuchungsjahr 2018/2019 signifikant höhere Verluste zu verzeichnen.

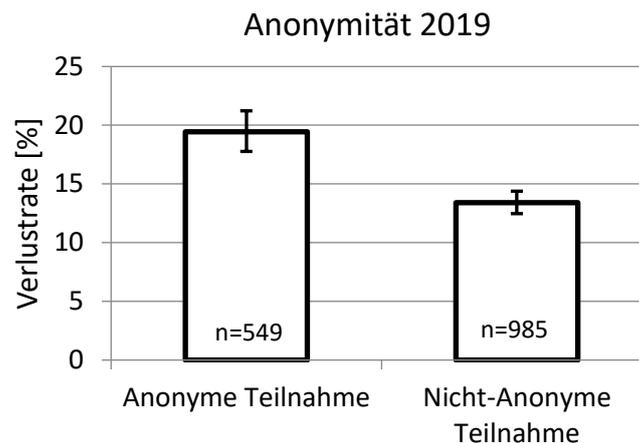


Abbildung 1.1: Höhe der Winterverluste 2018/19 anonymer TeilnehmerInnen und nicht-anonymer TeilnehmerInnen in Prozent ($\pm 95\%CI$). Im Vergleich hatten anonyme TeilnehmerInnen signifikant höhere Verlustraten als nicht-anonyme TeilnehmerInnen (anonyme TeilnehmerInnen 19,4%, Konfidenzintervall: 17,8-21,2%; nicht-anonyme TeilnehmerInnen 13,4%, Konfidenzintervall: 12,5-14,4%).

1.4.2.2 Online-Antworten versus Papierfragebogen-Antworten

Wie auch in den vergangenen Jahren, hatten die TeilnehmerInnen die Möglichkeit, sowohl online als auch über Papier (inklusive Zeitschrift) mitzumachen. Die meisten Antworten erreichten uns online (Tabelle 1.2). In diesem Winter, wie in den meisten zuvor, besteht kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate zwischen der durch Online-Teilnahme und der Papier-Teilnahme erhobenen Daten (Abbildung 1.2).

Tabelle 1.2: Art der Teilnahme an der Erhebung der Winterverluste von 2013/14 bis 2018/19 (Anzahl TeilnehmerInnen (%)).

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19
Summe	1023	1259	1289	1656	1391	1534
Papier	318 (31,1%)	249 (19,8%)	290 (22,5%)	332 (20,0%)	238 (17,1%)	93 (6,1%)
Zeitschrift	26 (2,5%)	63 (5,0%)	55 (4,3%)	56 (3,4%)	52 (3,7%)	63 (4,1%)
Internet	679 (66,4%)	947 (75,2%)	944 (73,2%)	1268 (76,6%)	1101 (79,2%)	1378 (89,8%)

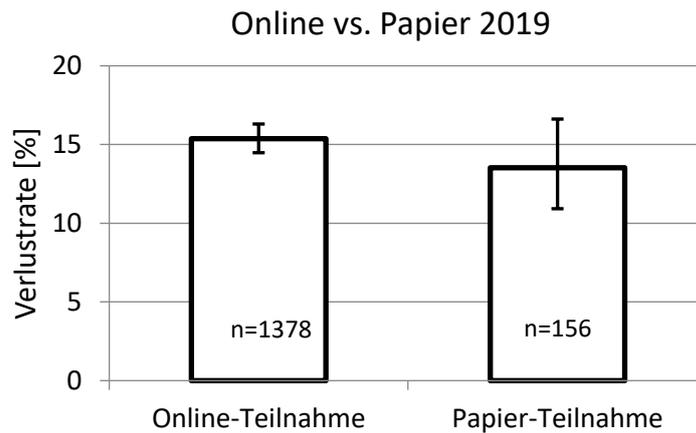


Abbildung 1.2: Höhe der Winterverluste 2018/19 der Online-TeilnehmerInnen und der TeilnehmerInnen per Papierfragebogen in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Online-Teilnahme 15,4%, Konfidenzintervall: 14,5-16,3%; Papier-Teilnahme 13,5%, Konfidenzintervall: 10,9-16,6%).

1.4.2.3 Betriebsgröße

Für das Jahr 2018/19 liegt die durchschnittliche Anzahl der eingewinterten Bienenvölker aller teilnehmenden Imkereien bei 21,9. Das ist etwas mehr als der österreichweit erwartete Mittelwert, was durch die Teilnahme von 26 großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern zustande kommt. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt jedoch bei 10 eingewinterten Völkern, was der österreichischen Imkerei-Demographie entspricht. Die Verteilung der Größen der teilnehmenden Betriebe ist in Abbildung 1.3 grafisch dargestellt.

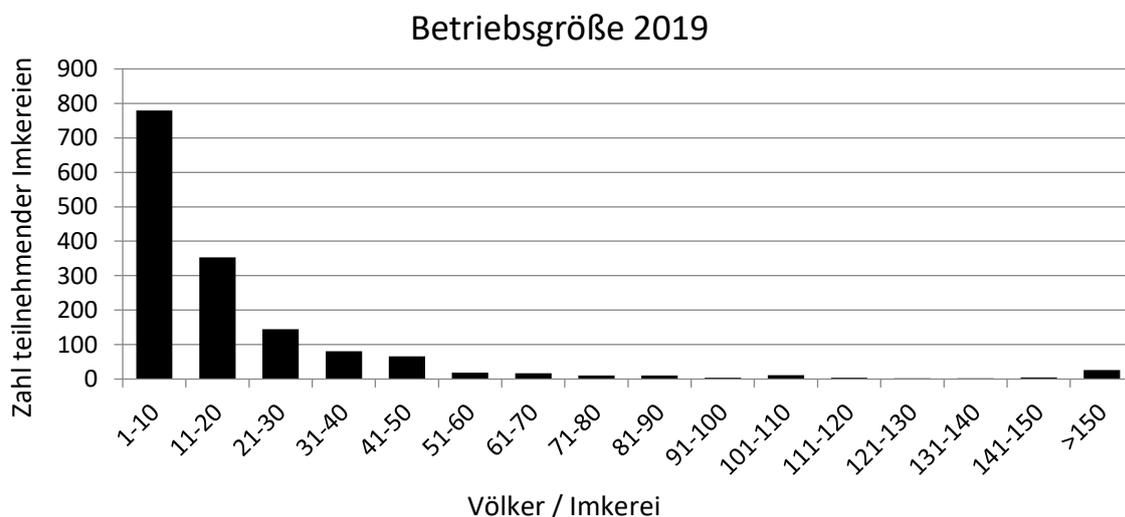


Abbildung 1.3: Betriebsgröße der teilnehmenden Imkereien 2018/19

1.4.2.4 Geografische Herkunft

Abbildung 1.4 zeigt die geografische Herkunft der TeilnehmerInnen unserer Erhebung für den Winter 2018/19. Rückmeldungen mit derselben Postleitzahl sind als je ein Punkt dargestellt.

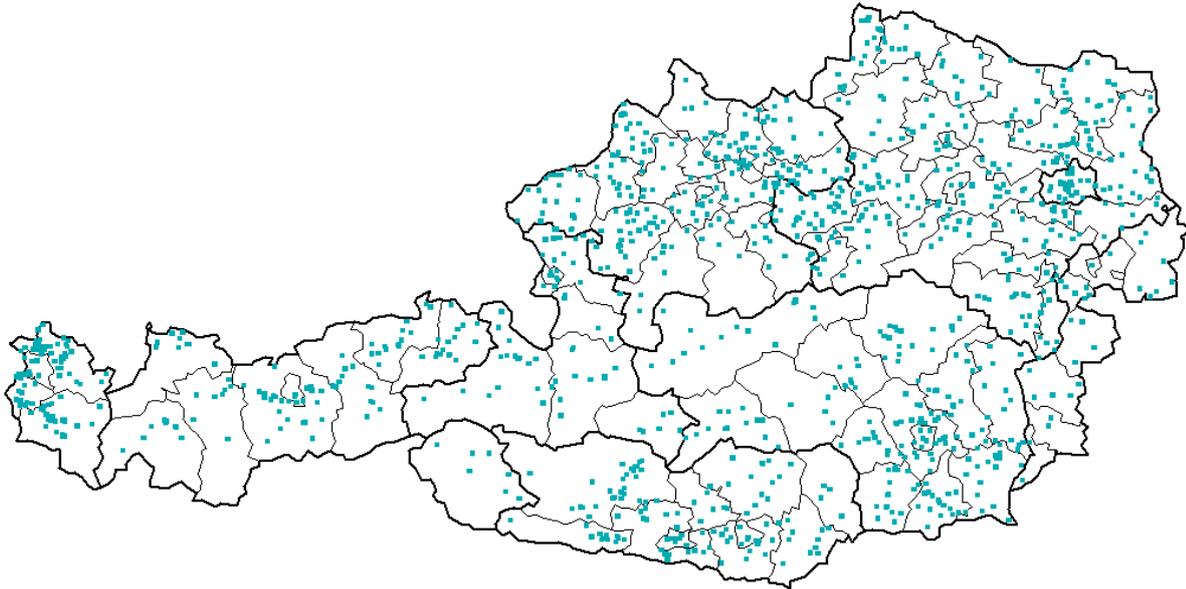


Abbildung 1.4: Geografische Herkunft der an der Untersuchung der Winterverluste teilnehmenden Imkereien 2018/19.

1.4.2.5 Bienenstandort

Des Weiteren wurden die TeilnehmerInnen in unserer Erhebung gefragt, ob sich all ihre Bienenvölker innerhalb eines 15 km-Radius zum angegebenen Winterstandort befinden. Diese Information ist wichtig für weitere standortbezogene Auswertungen, in denen mögliche Zusammenhänge zwischen den Winterverlusten und dem Wetter, der Landnutzung sowie der Seehöhe näher betrachtet werden können.

In diesem Untersuchungsjahr gaben 88,2% der TeilnehmerInnen an, dass sich all ihre Bienenvölker innerhalb 15 km des angegebenen Winterstandortes befanden. 10,8% gaben an diesen Radius zu überschreiten. Nur 1% der eingelangten Antworten entfielen auf die Kategorie „unsicher“ oder enthielten keine derartige Information.

1.4.3 Verlustrate in Österreich, den Bundesländern und den Bezirken

1.4.3.1 Österreich

Die teilnehmenden 1534 Imkereien haben im Untersuchungsjahr 2018/19 33.651 Völker eingewintert. Seit Beginn der Erhebung schwanken die Winterverlustraten jährlich. Die Verlustrate aus dem Winter 2015/16 stellt mit 8,1% die niedrigste, jene aus dem Winter 2014/15 mit 28,4% die höchste seit Beginn der Erhebungen von Winterverlusten im Jahr 2007/08 dar. Die Winterverluste von Bienenvölkern über den Winter 2018/19 betragen 15,2%. In Abbildung 1.5 werden, neben der im Untersuchungsjahr 2018/19 gemessenen Verlustrate, auch die in den Jahren davor erhobenen Werte zum Vergleich dargestellt.

Winterverluste von Bienenvölkern in Österreich

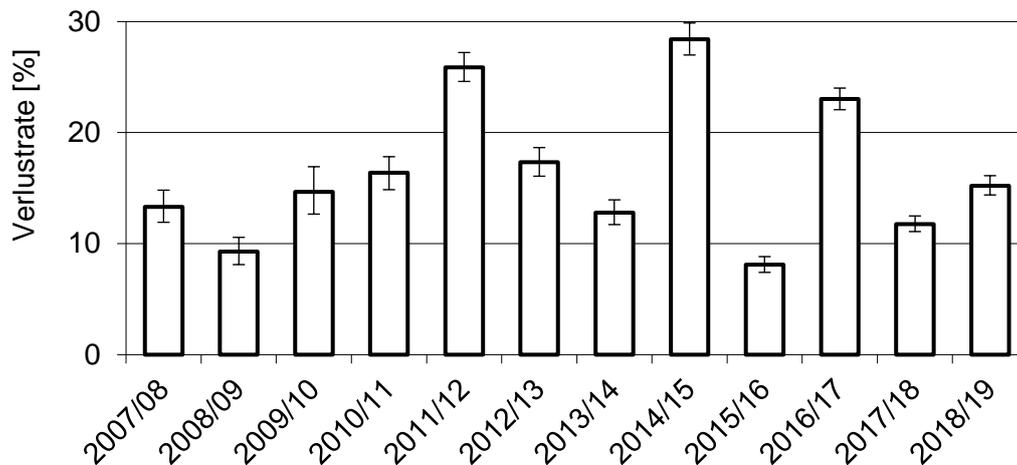


Abbildung 1.5: Höhe der Winterverluste in Österreich von 2007/08 bis 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI).
n = 16.217, 18.141, 7.676, 13.179, 32.471, 19.406, 18.794, 22.882, 23.418, 43.852, 28.373 und 33.651 eingewinterte Bienenvölker.

1.4.3.1.1 Populationsdynamik in Österreich

Die Berechnungen zur Populationsdynamik basieren auf den Angaben jener Imkereien, die auch die Anzahl ihrer Völker im Frühjahr des Einwinterungsjahres bekannt gegeben haben (Subpopulation). Mit Hilfe dieser Information konnte die Netto-Änderung der Population bis zum Herbst desselben Jahres (Einwinterungsvölker) berechnet werden. Die Zahl an Bienenvölkern im Frühjahr des Auswinterungsjahres konnte aus der Differenz zwischen eingewinterten und der im Winter verlorenen Völker berechnet werden. Dies berücksichtigt aber nicht etwaige im Winter zugekaufte oder verkaufte Völker, sowie die Netto-Änderung über den Sommer. Die Informationen zur Anzahl der Völker im Frühjahr, eingewinterten Völkern und zum Völkerverlust über den Winter des jeweiligen Jahres ermöglichten eine grafische Darstellung der Populationsdynamik österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2019 (Abbildung 1.6). Ausgehend von der Völkeranzahl im Frühjahr des Einwinterungsjahres stieg die Zahl an Bienenvölkern durch Vermehrung und Zukäufe jeweils bis zum Herbst an (Tabelle 1.3, „Vermehrung über den Sommer [%]“). Die prozentuelle Änderung der Anzahl der Bienenvölker vom Frühjahr des Auswinterungsjahres zum Frühjahr des Einwinterungsjahres ist in Tabelle 1.3 („Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]“) zu finden. Allgemein zeigt sich, dass die Vermehrung im Sommer manchmal eine konstante, manchmal sogar eine wachsende Bienenpopulation ermöglicht (Abbildung 1.6). Welche Netto-Zuwachsrate erforderlich wäre, um nach dem Winter wieder auf den Stand der Bienenpopulation im Herbst des Einwinterungsjahres zu kommen, ist unter „Frühjahrs-Herbst-Schätzung [%]“ ersichtlich. Die tatsächliche Netto-Vermehrung über den Sommer liegt für das Untersuchungsjahr 2018/19 deutlich über der Schätzung des letzten Jahres, in der berechnet worden war, welche Netto-Zuwachsrate erforderlich gewesen wäre, um eine konstante Population zu ermöglichen.

Tabelle 1.3: Populationsdynamik der Subpopulation (Imkereien mit vollständigen Angaben) untersuchter österreichischer Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2019. Teilnehmende Imkereien mit vollständigen Angaben; Verlustrate dieser Untergruppe; Anzahl an Bienenvölkern im Frühjahr des Einwinterungsjahres, Herbst und Frühjahr des Auswinterungsjahres; Zuwachsrate über den Sommer; Frühjahrs-Frühjahrs-Vergleich und Frühjahrs-Herbst-Schätzung.

	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19
Imkereien	973	1.188	1.195	1.537	1.285	1.465
Verlustrate der Untergruppe [%]	12,9	28,6	7,9	22,5	11,6	15,3
Frühjahr des Einwinterungsjahres	14.319	17.355	15.102	27.695	18.983	24747
Herbst (Zahl Völker)	17.816	21.616	21.800	40.141	25.670	31.036
Frühjahr (Zahl Völker)	15.518	15.437	20.070	31.108	22.695	26.277
Vermehrung über den Sommer [%]	24,4	24,6	44,4	44,9	35,2	25,4
Vergleich Frühjahr-Frühjahr [%]	8,4	-11,1	32,9	12,3	19,6	6,2
Frühjahr-Herbst-Schätzung [%]	14,8	40,0	8,6	29,0	13,1	18,1

Populationsdynamik 2013-2019

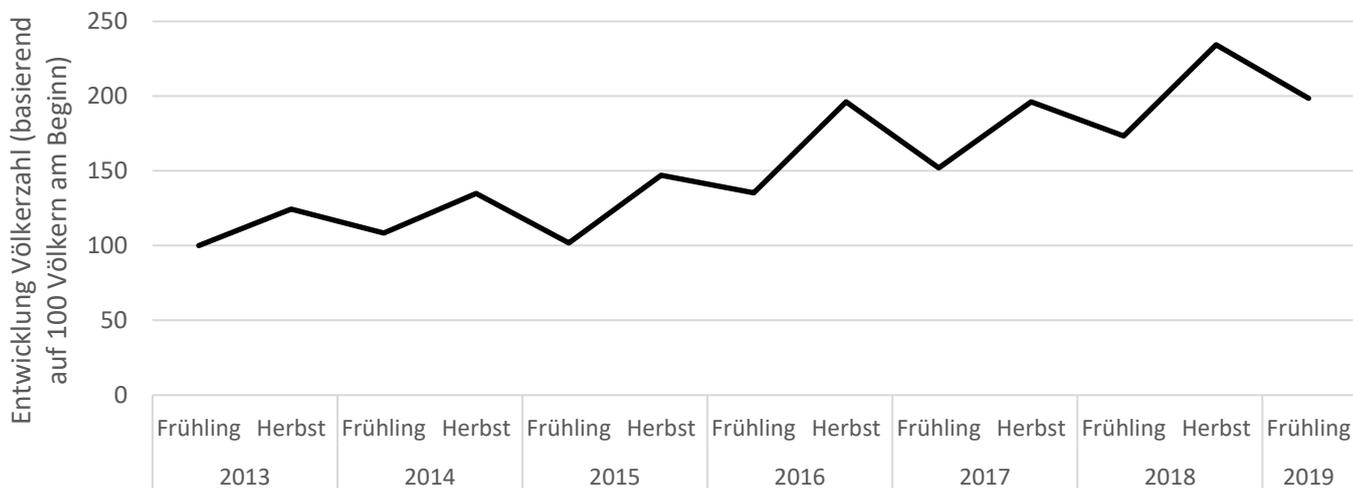


Abbildung 1.6: Veranschaulichte Populationsdynamik von Bienenvölkern der Teilnehmer in Österreich vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2019 basierend auf Winterverlusten und Vermehrung über den Sommer aus Tabelle 1.3 Diese theoretische Entwicklung der Völkeranzahl basiert auf 100 Völkern zu Beginn.

1.4.3.2 Bundesländer

Die Winterverlustrate für ganz Österreich lag 2018/19 bei 15,2%. Zwischen den Bundesländern sind die Völkerverluste jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Die Tabelle 1.4 zeigt die Anzahl der teilnehmenden Betriebe, die Anzahl der eingewinterten Völker, die Anzahl der verlorenen Völker, Winterverluste aufgrund von Königinnen-Problemen und die Verlustrate in Summe und Prozent (inklusive 95% Konfidenzintervall) für Österreich und die Bundesländer. Einen Überblick über die Winterverluste in ganz Österreich sowie in den Bundesländern für einen Untersuchungszeitraum von 6 Jahren, bietet die Tabelle 1.5. Grafisch dargestellt werden die Verlustraten für Österreich und die Bundesländer in Abbildung 1.7.

Tabelle 1.4: Teilnehmende Imkereibetriebe, eingewinterte Völker und Verlustraten von Bienenvölkern im Winter 2018/19 für Österreich und pro Bundesland. In dieser Tabelle wird der Völkerverlust durch „Elementarschaden (Flut, Vandalismus, etc.)“ nicht berücksichtigt.

Land	Teilnehmende Imkereien	Völker eingewintert	Tote Völker	Völkerverlust (Königinnen-Probleme)	Summe Verlust	Verlust [%]	Konfidenzintervall [%]
Österreich	1534	33651	3823	1304	5127	15.2	14,4-16,1
Burgenland	35	759	49	26	75	9.9	6,9-13,9
Kärnten	147	3784	311	126	437	11.5	9,4-14,0
Niederösterreich	387	9486	1149	459	1608	17.0	15,3-18,7
Oberösterreich	276	5951	812	232	1044	17.5	15,5-19,8
Salzburg	74	1586	203	54	257	16.2	11,7-22,0
Steiermark	218	5706	554	188	742	13.0	11,0-15,3
Tirol	141	2963	245	93	338	11.4	9,3-14,0
Vorarlberg	178	2333	341	73	414	17.7	15,0-20,8
Wien	78	1083	159	53	212	19.6	14,9-25,3

Winterverluste von Bienenvölkern 2018/2019

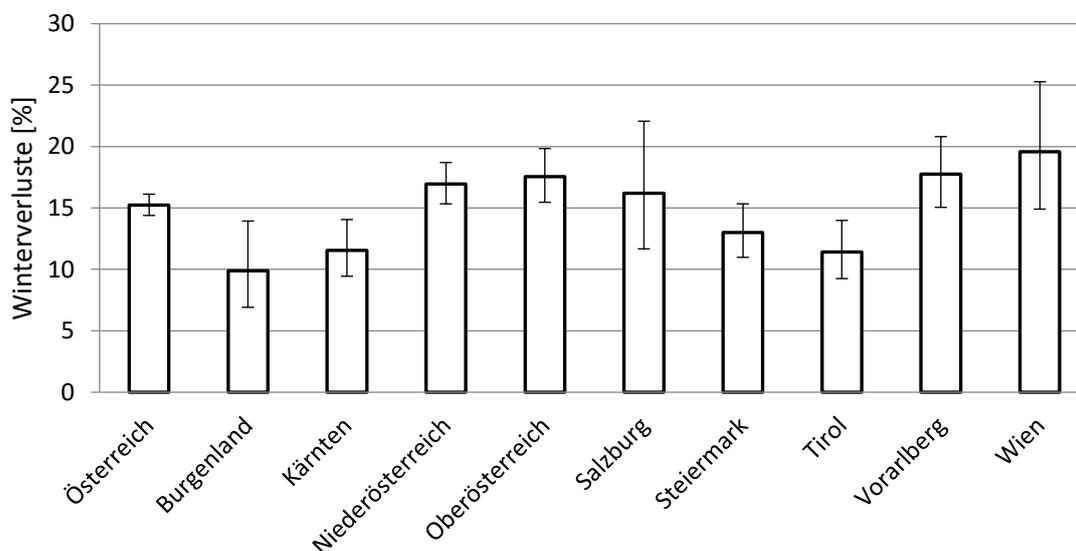


Abbildung 1.7: Höhe der Winterverluste 2018/19 für Österreich und die Bundesländer in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Die jeweilige Anzahl der teilnehmenden Imkereien kann aus der Tabelle 1.4 entnommen werden.

Tabelle 1.5: Vergleich der Winterverlustraten ($\pm 95\%$ Konfidenzintervall) von 2013/14 bis 2018/19 für Österreich sowie die einzelnen Bundesländer.

Land	Verlust % (Konfidenzintervall [%])					
	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19
Österreich	12,8 (11,7-14,0)	28,4 (27,0-29,9)	8,1 (7,4-8,8)	23,0 (22,1-24,0)	11,8 (11,1-12,5)	15,2 (14,4-16,1)
Burgenland	32,9 (15,1-57,5)	40,4 (33,5-47,6)	11,0 (6,7-17,6)	20,2 (15,2-26,4)	7,9 (4,8-12,7)	9,9 (6,9-13,9)
Kärnten	9,9 (7,8-12,5)	30,6 (27,0-34,5)	6,6 (5,4-7,9)	21,9 (18,6-25,6)	14,5 (10,5-15,7)	11,5 (9,4-14,1)
Niederösterreich	15,4 (13,6-17,4)	27,8 (25,2-30,6)	11,5 (9,8-13,5)	24,2 (22,8-25,7)	12,3 (12,5-15,2)	17,0 (15,3-18,7)
Oberösterreich	9,9 (7,6-12,8)	25,2 (21,6-29,2)	6,8 (5,5-8,4)	18,9 (16,7-21,4)	9,9 (10,1-13,1)	17,5 (15,5-19,8)
Salzburg	18,6 (13,5-25,1)	33,6 (27,3-40,5)	6,1 (4,1-9,1)	16,8 (12,3-22,6)	10,8 (9,1-17,5)	16,2 (11,7-22,1)
Steiermark	8,5 (6,7-10,7)	22,5 (19,4-25,8)	8,7 (7,0-10,6)	19,3 (17,0-21,9)	8,2 (7,3-10,3)	13,0 (11,0-15,3)
Tirol	12,9 (9,0-18,1)	26,7 (21,6-32,4)	5,1 (3,7-6,9)	25,1 (20,6-30,3)	12,0 (9,0-14,6)	11,4 (9,3-14,0)
Vorarlberg	18,1 (12,1-26,2)	28,0 (22,3-34,4)	5,8 (3,7-9,1)	33,8 (29,5-38,3)	10,1 (8,1-12,5)	17,7 (15,0-20,8)
Wien	19,2 (12,7-27,9)	52,6 (44,9-60,2)	11,5 (7,2-17,8)	24,8 (20,2-30,0)	14,4 (9,3-16,0)	19,6 (14,9-25,3)

1.4.3.3 Ausgewählte Bezirke

Die Verlustraten, Anzahl der teilnehmenden Imkereien und Anzahl der eingewinterten Völker sind in Tabelle 1.6 aufgelistet. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungsjahre seien hier zum Vergleich ebenfalls dargestellt. Aus Gründen des Datenschutzes und der Repräsentativität werden nur jene Bezirke aufgelistet, bei denen mindestens Daten von fünf Imkereien zur Verfügung stehen.

Tabelle 1.6: Jahresvergleich der Verlustraten in den Bezirken. Verlustrate in % (TeilnehmerInnen; eingewinterte Völker). -: weniger als fünf TeilnehmerInnen; *: Bezirksfusionen in der Steiermark 2013 (Bruck und Mürzzuschlag → Bruck-Mürzzuschlag, Fürstenfeld und Hartberg → Hartberg-Fürstenfeld, Feldbach und Radkersburg → Südoststeiermark); **: Bezirksauflösung Wien-Umgebung 2017.

Bezirk	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19
Burgenland / Eisenstadt	-	-	-	-	-	-
Burgenland / Eisenstadt-Umgebung	-	40,30% (6; 67)	-	-	-	-
Burgenland / Güssing	-	42,24% (13; 161)	-	31,46% (6; 89)	-	-
Burgenland / Jennersdorf	-	42,71% (8; 96)	23,53% (5; 85)	-	-	-
Burgenland / Mattersburg	-	-	-	28,93% (9; 121)	9,49% (8; 137)	16,30% (8; 135)
Burgenland / Neusiedl am See	-	24,72% (7; 178)	3,55% (5; 169)	12,22% (8; 311)	6,45% (5; 62)	8,16% (7; 147)
Burgenland / Oberpullendorf	-	53,72% (12; 376)	20,51% (7; 78)	20,95% (12; 253)	5,00% (5; 60)	-
Burgenland / Oberwart	31,82% (5; 88)	30,08% (17; 256)	4,17% (9;144)	27,57% (15; 185)	11,96% (7; 92)	5,58% (9; 269)
Burgenland / Rust	-	-	-	-	-	-
Kärnten / Feldkirchen	11,39% (7; 202)	32,46% (6; 191)	3,86% (5;233)	40,11% (7; 187)	13,99% (5; 193)	7,06% (6; 354)
Kärnten / Hermagor	5,48% (20; 365)	56,41% (11;195)	5,93% (17; 337)	19,95% (19; 436)	14,51% (22; 448)	12,03% (18; 316)
Kärnten / Klagenfurt am Wörthersee	12,66% (5; 79)	54,55% (10; 77)	12,10% (9; 124)	52,43% (9; 103)	25,79% (8; 159)	13,54% (10; 192)
Kärnten / Klagenfurt-Land	6,76% (10; 281)	34,55% (18; 330)	4,98% (15; 301)	15,34% (10; 189)	6,16% (9; 276)	11,22% (16; 401)
Kärnten / Sankt Veit an der Glan	15,32% (15; 385)	26,45% (25; 881)	7,28% (12; 604)	41,05% (16; 592)	20,48% (16; 420)	7,22% (16; 568)
Kärnten / Spittal an der Drau	7,09% (35; 705)	28,75% (33; 574)	5,81% (56; 1445)	17,34% (67; 1632)	12,11% (35; 950)	11,96% (36; 836)
Kärnten / Villach	12,32% (14; 138)	25,84% (13; 178)	11,32% (5; 106)	19,05% (5; 63)	12,82% (5; 78)	12,17% (9; 115)
Kärnten / Villach-Land	-	32,36% (50; 615)	5,60% (30; 393)	20,64% (22; 344)	15,12% (25; 324)	23,28% (20; 262)
Kärnten / Völkermarkt	7,47% (13; 482)	21,78% (20; 652)	6,60% (12; 303)	11,76% (13; 561)	6,51% (15; 538)	12,32% (11; 682)
Kärnten / Wolfsberg	-	-	-	8,37% (9; 203)	-	-
Niederösterreich / Amstetten	15,75% (22; 419)	19,76% (24; 506)	9,35% (38; 631)	37,09% (47; 647)	13,86% (39; 635)	24,74% (44; 663)
Niederösterreich / Baden	7,92% (8; 101)	31,63% (12; 98)	0,00% (6; 54)	16,36% (6; 55)	-	8,43% (8; 83)
Niederösterreich / Bruck an der Leitha	-	47,78% (8; 90)	-	8,86% (8; 158)	16,42% (10; 67)	18,42% (7; 76)
Niederösterreich / Gänserndorf	27,78% (20; 198)	28,33% (23; 300)	16,83% (23; 208)	19,53% (13; 379)	17,48% (25; 286)	10,84% (27; 821)

Niederösterreich / Gmünd	7,66% (29; 444)	26,32% (6; 133)	14,24% (24; 316)	21,04% (22; 461)	21,45% (18; 275)	11,43% (17; 420)
Niederösterreich / Hollabrunn	33,46% (7; 254)	31,07% (12; 280)	12,00% (8; 200)	12,05% (8; 83)	5,45% (8; 110)	28,69% (7; 237)
Niederösterreich / Horn	18,15% (17; 325)	34,38% (17; 349)	8,32% (17; 505)	14,57% (22; 597)	19,07% (19; 708)	13,44% (13; 491)
Niederösterreich / Korneuburg	14,06% (14; 192)	43,64% (19; 236)	8,42% (17; 95)	21,77% (22; 372)	16,47% (18; 334)	11,95% (20; 728)
Niederösterreich / Krens a.d. Donau	-	-	-	-	-	-
Niederösterreich / Krens-Land	-	25,19% (9; 135)	2,13% (7; 47)	13,41% (9; 179)	15,97% (12; 119)	14,59% (13; 233)
Niederösterreich / Lilienfeld	14,89% (5; 47)	10,58% (5; 104)	-	6,13% (15; 212)	10,98% (11; 246)	13,25% (15; 166)
Niederösterreich / Melk	7,64% (16; 157)	32,53% (26; 332)	15,17% (34; 422)	29,30% (19; 314)	12,29% (21; 301)	17,89% (33; 598)
Niederösterreich / Mistelbach	17,85% (43; 521)	22,35% (27; 671)	9,47% (29; 581)	26,84% (38; 991)	11,58% (41; 1408)	15,63% (26; 416)
Niederösterreich / Mödling	16,56% (14; 151)	29,08% (17; 141)	15,15% (9; 66)	25,23% (13; 107)	14,50% (18; 262)	15,24% (11; 164)
Niederösterreich / Neunkirchen	11,34% (9; 97)	44,83% (14; 145)	29,38% (13; 160)	25,41% (17; 303)	10,19% (14; 157)	17,24% (17; 174)
Niederösterreich / Scheibbs	7,74% (18; 594)	14,48% (41; 808)	10,46% (29; 526)	44,31% (42; 686)	8,38% (37; 752)	19,65% (27; 692)
Niederösterreich / St. Pölten	-	-	-	-	-	-
Niederösterreich / St. Pölten-Land	12,15% (32; 288)	24,62% (21; 260)	-	25,55% (26; 274)	13,38% (25; 284)	8,14% (25; 258)
Niederösterreich / Tulln	18,71% (9; 465)	12,63% (13; 372)	7,53% (5; 93)	13,07% (20; 153)	13,83% (10; 94)	20,86% (13; 465)
Niederösterreich / Waidhofen an der Ybbs	-	-	-	-	-	65,33% (7; 150)
Niederösterreich / Waidhofen an der Thaya	19,61% (20; 311)	-	13,45% (36; 394)	28,21% (34; 560)	21,39% (35; 561)	11,82% (8; 330)
Niederösterreich / Wiener Neustadt	-	-	-	-	-	-
Niederösterreich / Wiener Neustadt-Land	10,08% (8; 129)	46,37% (12; 317)	17,93% (9; 184)	13,66% (10; 205)	12,36% (11; 259)	11,49% (14; 348)
Niederösterreich / Wien-Umgebung	20,63% (14; 160)	31,99% (20; 372)	28,99% (14; 69)	**	**	**
Niederösterreich / Zwettl	2,17% (7; 138)	20,93% (9; 172)	8,77% (11; 171)	30,96% (15; 239)	16,51% (9; 109)	17,97% (11; 217)
Oberösterreich / Braunau am Inn	10,31% (11; 151)	13,72% (19; 277)	10,68% (22; 468)	13,21% (24; 613)	7,17% (20; 502)	8,09% (30; 618)
Oberösterreich / Eferding	-	-	-	19,64% (5; 168)	13,33% (6; 75)	-
Oberösterreich / Freistadt	3,97% (11; 151)	34,72% (10; 144)	3,79% (13; 211)	27,13% (21; 328)	8,11% (19; 296)	7,28% (18; 261)
Oberösterreich / Gmunden	5,21% (6; 96)	32,14% (10; 168)	5,88% (7; 85)	16,88% (17; 154)	6,80% (8; 103)	16,13% (12; 155)
Oberösterreich / Grieskirchen	6,85 (5; 219)	44,79% (8; 96)	5,77% (8; 104)	34,85% (7; 66)	10,30% (9; 165)	23,95% (8; 167)
Oberösterreich / Kirchdorf an der Krens	-	34,74% (7; 95)	6,94% (10; 620)	18,27% (10; 646)	9,16% (9; 262)	36,36% (8; 627)
Oberösterreich / Linz	-	-	5,26% (5; 38)	21,93% (12; 114)	11,81% (13; 127)	10,10% (7; 99)
Oberösterreich / Linz-Land	13,31% (24; 248)	25,37% (12; 205)	8,04% (24; 311)	23,72% (21; 253)	7,56% (26; 344)	20,60% (21; 267)
Oberösterreich / Perg	7,29% (8; 96)	39,39% (7; 66)	4,75% (14; 316)	15,79% (17; 288)	9,00% (14; 289)	18,08% (22; 448)
Oberösterreich / Ried im Innkreis	-	21,43% (6; 182)	5,80% (10; 207)	8,99% (11; 278)	7,24% (7; 152)	10,86% (13; 359)

Oberösterreich / Rohrbach	10,16% (23; 256)	-	8,48% (16; 165)	19,25% (10; 187)	-	7,43% (6; 202)
Oberösterreich / Schärding	15,84% (13; 202)	26,44% (14; 174)	2,48% (26; 807)	14,95% (15; 388)	14,21% (17; 570)	17,82% (28; 606)
Oberösterreich / Steyr	-	-	-	-	-	-
Oberösterreich / Steyr-Land	8,33% (20; 252)	22,56% (15; 266)	7,73% (13; 233)	20,13% (18; 313)	18,22% (14; 236)	15,19% (13; 283)
Oberösterreich / Urfahr-Umgebung	26,29% (18; 251)	14,70% (16; 279)	5,18% (21; 560)	19,48% (31; 775)	9,88% (46; 688)	19,40% (37; 866)
Oberösterreich / Vöcklabruck	8,57% (14; 245)	32,67% (23; 300)	5,68% (19; 176)	21,39% (34; 631)	7,14% (25; 350)	12,28% (31; 505)
Oberösterreich / Wels	-	-	-	-	-	-
Oberösterreich / Wels-Land	9,47% (8; 190)	45,07% (9; 213)	21,14% (11; 246)	24,10% (8; 83)	19,80% (11; 202)	19,08% (15; 325)
Salzburg / Hallein	-	55,77% (6; 407)	-	8,01% (6; 287)	10,16% (5; 256)	5,16% (5; 252)
Salzburg / Salzburg	-	13,64% (5; 44)	-	-	-	48,94% (7; 235)
Salzburg / Salzburg-Umgebung	24,62% (12; 260)	24,51% (17; 408)	13,52% (16; 244)	32,89% (20; 152)	8,61% (20; 267)	12,53% (20; 415)
Salzburg / Sankt Johann im Pongau	17,48% (15; 143)	37,80% (12; 127)	6,07% (15; 428)	31,31% (18; 198)	30,26% (9; 228)	8,18% (12; 159)
Salzburg / Tamsweg	6,35% (5; 63)	24,00% (6; 100)	2,55% (10; 157)	18,64% (7; 118)	9,43% (6; 53)	0,00% (6; 75)
Salzburg / Zell am See	11,89% (11; 143)	17,46% (18; 252)	2,74% (22; 402)	9,98% (23; 601)	6,09% (15; 345)	12,26% (23; 367)
Steiermark / Bruck	3,97% (12; 126)	*	*	*	*	*
Steiermark / Bruck-Mürzzuschlag	*	21,23% (25; 405)	12,93% (21; 263)	24,94% (23; 405)	10,95% (20; 210)	13,59% (19; 390)
Steiermark / Deutschlandsberg	13,46% (5; 52)	14,15% (9; 205)	9,09% (8; 154)	24,70% (12; 247)	4,99% (13; 341)	17,60% (20; 392)
Steiermark / Feldbach	7,57% (12; 383)	*	*	*	*	*
Steiermark / Fürstenfeld	-	*	*	*	*	*
Steiermark / Graz	23,81% (8; 42)	18,97% (11; 195)	22,41% (11; 58)	20,69% (13; 145)	10,61% (16; 179)	5,34% (6; 131)
Steiermark / Graz-Umgebung	10,06% (19; 318)	29,59% (22; 365)	6,61% (28; 363)	21,73% (41; 543)	9,47% (32; 486)	6,65% (34; 722)
Steiermark / Hartberg	10,44% (6; 249)	*	*	*	*	*
Steiermark / Hartberg-Fürstenfeld	*	43,97% (11; 614)	5,92% (16; 608)	13,51% (13; 259)	8,33% (12; 396)	6,42% (12; 654)
Steiermark / Leibnitz	10,18% (14; 285)	27,04% (18; 196)	11,28% (23; 390)	17,52% (21; 314)	10,93% (24; 549)	14,85% (17; 303)
Steiermark / Leoben	-	-	-	26,98% (8; 441)	5,09% (7; 216)	18,84% (10; 207)
Steiermark / Liezen	16,30% (7; 184)	10,59% (9; 255)	9,41% (18; 372)	16,45% (24; 614)	7,69% (16; 351)	14,37% (21; 508)
Steiermark / Murau	6,19% (17; 452)	10,36% (8; 193)	5,96% (10; 235)	13,14% (8; 312)	6,50% (9; 323)	22,48% (14; 347)
Steiermark / Murtal	-	8,40% (10; 119)	6,25% (6; 64)	8,82% (11; 170)	13,07% (11; 176)	22,90% (5; 131)
Steiermark / Mürzzuschlag	5,48% (6; 73)	*	*	*	*	*
Steiermark / Radkersburg	-	*	*	*	*	*
Steiermark / Südoststeiermark	*	19,60% (17; 352)	15,71% (18; 350)	12,95% (23; 448)	8,22% (15; 304)	12,04% (20; 382)

Steiermark / Voitsberg	-	-	-	38,97% (10; 195)	12,00% (7; 150)	10,00% (10; 190)
Steiermark / Weiz	7,47% (17; 522)	28,42% (15; 366)	3,89% (13; 386)	13,65% (18; 740)	7,50% (19; 533)	8,56% (23; 841)
Tirol / Imst	-	-	5,43% (10; 184)	40,58% (9; 313)	9,84% (9; 244)	4,87% (7; 226)
Tirol / Innsbruck	17,24% (5; 29)	24,53% (7; 53)	5,07% (16; 296)	-	6,29% (7; 159)	7,79% (8; 77)
Tirol / Innsbruck Land	7,81% (20; 320)	28,07% (17; 171)	6,10% (31; 426)	17,85% (33; 521)	12,27% (35; 481)	13,67% (34; 490)
Tirol / Kitzbühel	5,76% (9; 243)	24,00% (5; 75)	2,88% (14; 208)	10,26% (18; 273)	6,55% (13; 168)	8,15% (21; 270)
Tirol / Kufstein	22,26% (27; 539)	40,30% (26; 335)	3,85% (14; 260)	31,85% (12; 248)	5,58% (15; 215)	13,81% (20; 572)
Tirol / Landeck	-	20,62% (7; 97)	5,08% (12; 177)	11,43% (10; 175)	18,87% (8; 106)	19,69% (10; 127)
Tirol / Lienz	3,05% (7; 262)	19,56% (12; 409)	4,62% (9; 238)	9,42% (12; 276)	15,98% (8; 338)	11,33% (11; 450)
Tirol / Reutte	-	-	9,56% (20; 272)	23,29% (13; 249)	14,38% (14; 313)	8,62% (14; 290)
Tirol / Schwaz	21,07% (7; 261)	32,10% (17; 486)	3,80% (22; 526)	46,85% (18; 444)	10,36% (11; 251)	10,86% (15; 442)
Vorarlberg / Bludenz	9,42% (9; 138)	20,65% (12; 155)	6,80% (16; 147)	30,13% (62; 707)	4,24% (29; 377)	16,39% (49; 659)
Vorarlberg / Bregenz	16,16% (20; 359)	20,35% (27; 285)	4,86% (14; 288)	22,01% (69; 977)	11,54% (38; 797)	17,86% (69; 980)
Vorarlberg / Dornbirn	31,52% (6; 92)	39,62% (9; 106)	3,39% (8; 59)	61,92% (23; 239)	12,10% (14; 124)	23,20% (22; 250)
Vorarlberg / Feldkirch	23,44% (14; 128)	40,37% (19; 161)	8,57% (12; 105)	48,07% (52; 491)	12,86% (24; 280)	16,71% (37; 431)
Wien / Wien	19,18% (32; 318)	51,53% (66; 458)	11,48% (41; 479)	24,76% (70; 832)	12,59% (59; 945)	19,58% (78; 1083)

1.4.4 Symptome

Für eine umfassende Analyse der Winterverluste ist es wichtig, die Symptome, welche mit den Völkerverlusten einhergehen, zu kennen. Imkereien mit Winterverlusten wurden daher gebeten, die an ihren Völkern beobachteten Symptome zu nennen. Folgende einfach und ohne weitere Hilfsmittel zu beurteilenden Symptome standen zur Auswahl: a) hatten viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) hatten keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) hatten tote Bienen in Zellen, und kein Futter im Stock (verhungert), d) hatten tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht), e) hatten keine der oben genannten oder unbekannte Symptome.

Abbildung 1.8 zeigt die Häufigkeiten der die Winterverluste 2018/19 begleitenden Symptome anhand drei unterschiedlicher Berechnungsarten. Korrekterweise sollten sich die Angaben der Symptome nur auf die toten oder verlorenen Völker und nicht zusätzlich auch auf Völker mit Königinnen-Problemen beziehen. Der schwarze Balken in Abbildung 1.8 zeigt die Häufigkeit der genannten Symptome der toten oder verlorenen Völker (unter Ausschluss von Völkern, die durch Königinnen-Probleme verloren wurden). In diesem Fall inkludierte die Analyse nur Angaben ohne Mehrfachnennungen, das heißt die Summe der genannten Symptome entspricht exakt der Anzahl der von dieser Teilgruppe (1083 Imkereien) verlorenen Völker (n=3538 verlorene Völker). Die Häufigkeiten wurden anschließend bezogen auf den Gesamtverlust berechnet. Die Gesamtverluste inkludieren die verlorenen Völker und Völker mit Königinnen-Problemen. Zuerst wurden nur jene Antworten ausgewertet, bei denen der Gesamtverlust mit der Anzahl der Symptom-Nennungen übereinstimmt. Diesen Sachverhalt stellt der graue Balken in Abbildung 1.8 für 1107 Imkereien und 3603 Völker dar. Zusätzlich wurden alle Symptom-Nennungen inklusive Mehrfach-

nennung und unvollständigen Angaben für die Analyse herangezogen. Der weiße Balken in Abbildung 1.8 zeigt somit alle von den 1135 TeilnehmerInnen genannten Symptome (n=3725 Symptomnennungen).

Im Untersuchungsjahr 2018/19 war das häufigste Symptom der verlorenen Völker „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“ (b). Am zweithäufigsten wurden „tote Bienen im oder vor dem Volk“ festgestellt (a), gefolgt von (d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock (Futter nicht erreicht). Klassisches Verhungern durch Futtermangel (c) wurde seltener beobachtet. Nur wenige Schadbilder konnten von den Imkereien keiner Kategorie zugeordnet werden (e).

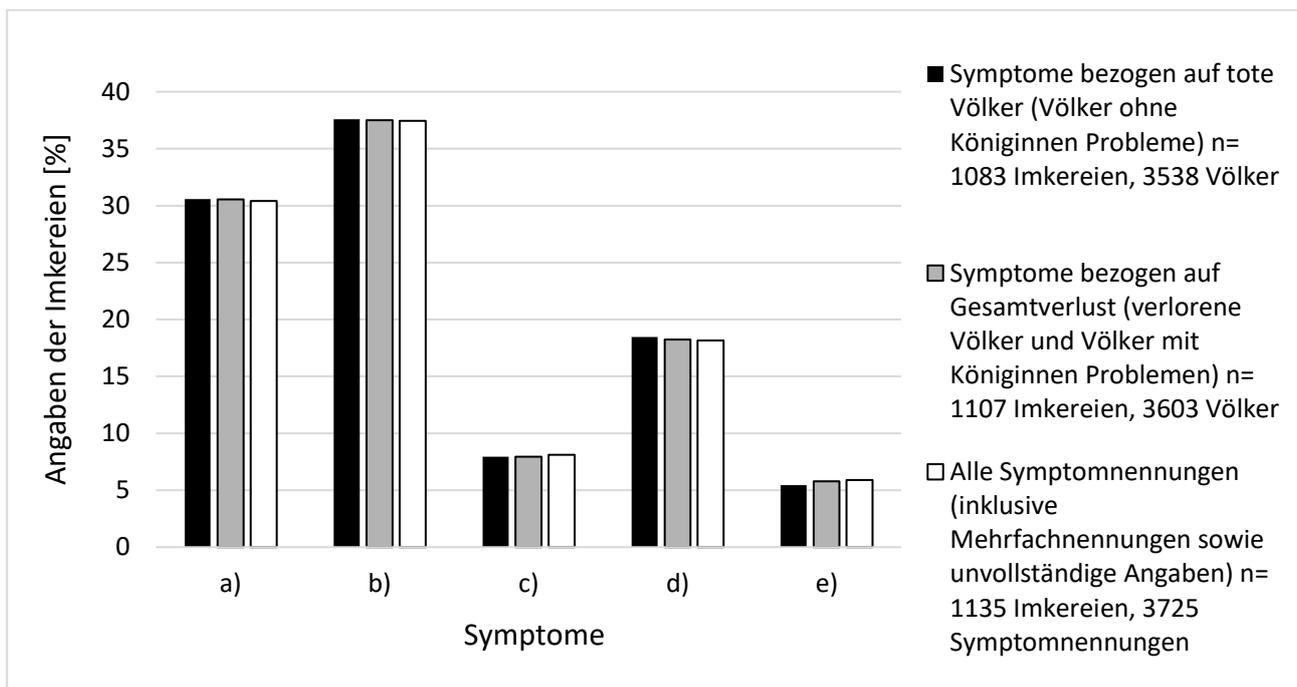


Abbildung 1.8: Häufigkeit der von ImkerInnen berichteten Symptome a) bis e) in Prozent für 2018/19: a) Viele tote Bienen im oder vor dem Volk, b) keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk, c) tote Bienen in Zellen, kein Futter im Stock, d) tote Bienen in Zellen, aber genug Futter im Stock, e) keines der oben genannten oder unbekannte Symptome.

1.4.5 Verteilung der Völkerverluste

Für die Berechnung wird für jeden einzelnen Imkereibetrieb die Höhe des Gesamtverlustes (d.h. die Summe der toten oder verlorenen Völker und der von Königinnen-Problemen betroffenen Völker) der insgesamt eingewinterten Völker in Prozent berechnet. Grafisch ist die Verteilung der Verluste in Abbildung 1.9 dargestellt. Im Winter 2018/19 lagen mehr als die Hälfte der von Verlusten betroffenen Imkereibetriebe (51,43%) im Bereich zwischen 0% und 10% Verlustrate. Bei 30,25% der teilnehmenden Betriebe war eine Verlustrate zu verzeichnen die über 20% lag.

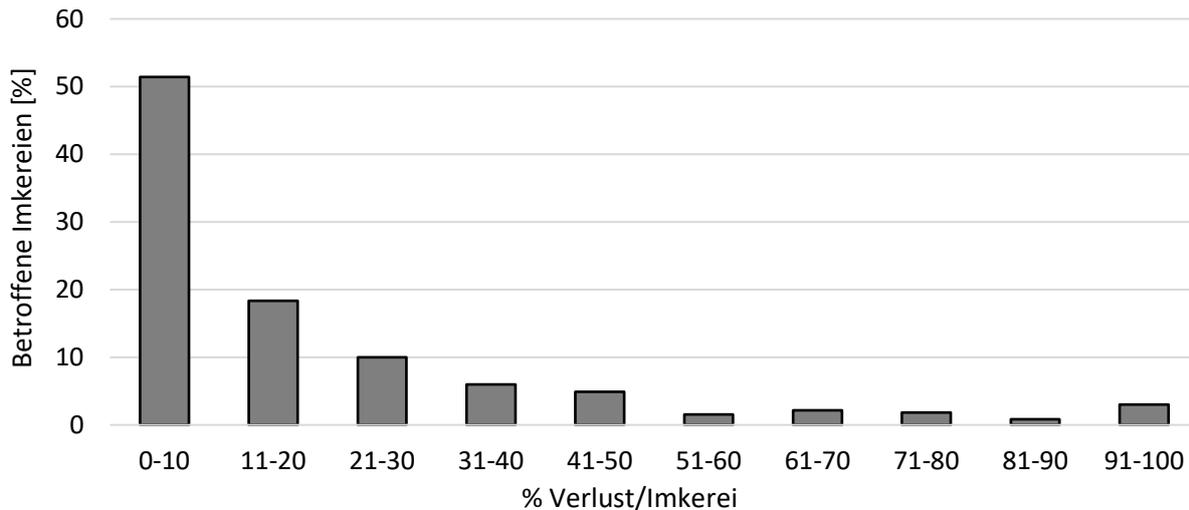


Abbildung 1.9: Verteilung der Völkerverluste 2018/19 in Prozent pro teilnehmender Imkerei.

1.4.6 Risikoanalyse

In der Risikoanalyse werden die Winterverlustraten verschiedener Gruppen von Betriebsweisen miteinander verglichen. Besteht beispielsweise zwischen zwei Gruppen von Betriebsweisen ein signifikanter Unterschied, kann man daraus Schlussfolgerungen über die Bedeutung dieses Risikofaktors für Winterverluste von Bienenvölkern ziehen. Überlappen die Konfidenzintervalle der Verlustraten von zwei oder mehreren Gruppen nicht, kann die untersuchte Betriebsweise, oder andere damit verknüpfte aber nicht erhobene Faktoren, als signifikanter Einflussfaktor auf die Höhe der Winterverluste betrachtet werden. In weiterer Folge werden die folgenden Faktoren dargestellt: 1.4.6.1 Betriebsgröße, 1.4.6.2 Stand- versus Wanderimkereien, 1.4.6.3 Wabenhygiene, 1.4.6.4 Trachtangebot, 1.4.6.5 Seehöhe, 1.4.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe, 1.4.6.7 Königinnen-Probleme, 1.4.6.8 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“), 1.4.6.9 Verkrüppelte Flügel und 1.4.6.10 Betriebsweise 2018/19.

1.4.6.1 Betriebsgröße

Die Analyse der Erhebung 2018/19 hat gezeigt, dass die Betriebsgröße von Imkereien, wie auch in vergangenen Jahren, einen Risikofaktor für Winterverluste darstellt. Kleinere Betriebe mit bis zu 50 Völkern weisen im Winter 2018/19 (15,75%, Konfidenzintervall: 14,74-16,80%) zunächst keine signifikant höheren Verluste als Betriebe mit über 50 Völkern (14,55%, Konfidenzintervall: 12,25-17,20%) auf. In Abbildung 1.10 sind diese zwei Gruppen grafisch dargestellt.

Wurde diese Aufgliederung zur genaueren Betrachtung hingegen in drei Gruppen (Betriebe mit 1 bis 20 Völkern, solche mit 21-50 Völkern und Betriebe mit mehr als 50 Völkern) anstatt zwei unterteilt, zeigten sich 2018/19 signifikant höhere Verluste bei der Gruppe „1-20“ (17,90%, Konfidenzintervall: 16,59-19,30%) im Vergleich zur Gruppe „21-50“ (13,54%, Konfidenzintervall: 11,86-15,41%). Die Gruppe „>50“ (14,55%, Konfidenzintervall: 12,25-17,20%) unterscheidet sich von den anderen beiden Gruppen nicht signifikant (Abbildung 1.11).

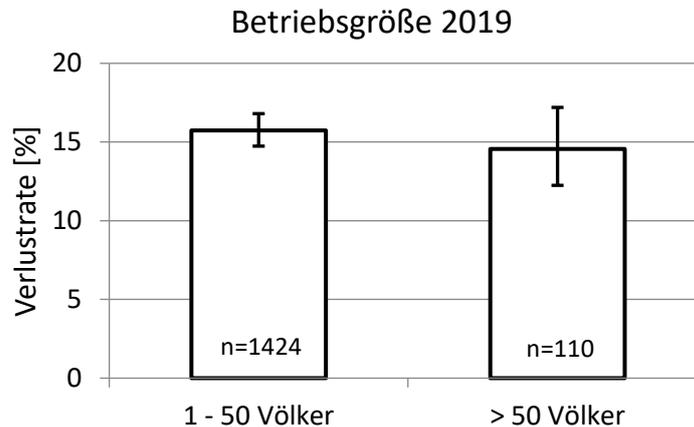


Abbildung 1.10: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße. Einteilung in 1-50 und >50 Völker. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

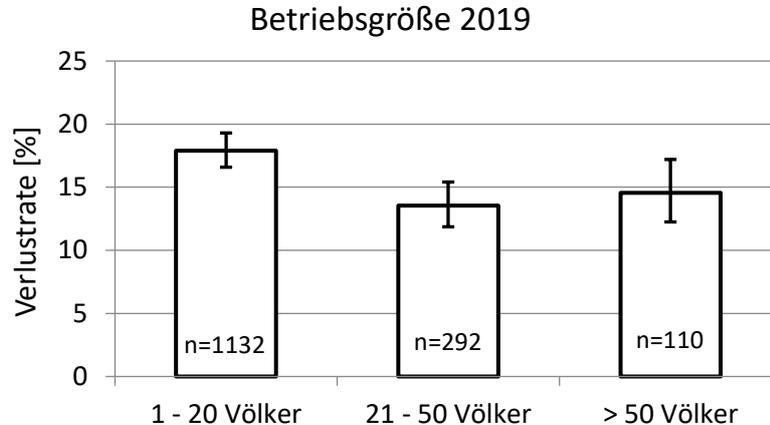


Abbildung 1.11: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Betriebsgröße. Einteilung in 1-20, 21-50 und >50 Völker. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1-20 und der Gruppe 21-50. Für Details zu den Unterschieden siehe Text.

1.4.6.2 Stand- versus Wanderimkereien

Der Transport von Bienenvölkern kann Stress für die Bienen bedeuten, aber durch den Transport zu Trachtquellen eine verbesserte Nahrungsversorgung ermöglichen. Für den Winter 2018/19 wurde untersucht, ob sich Wanderimkerei auf die Wintersterblichkeit auswirkt. Die an unserer Studie teilnehmenden ImkerInnen wurden gefragt, ob sie ihre Bienen zu Trachtquellen oder Bestäubungseinsätzen transportieren (Verbringungen im Zuge der Zucht oder Ablegerbildung sind damit exkludiert). Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Verlustrate zwischen

Wanderimkereien (11,32%, Konfidenzintervall: 9,94-12,87%) und Standimkereien (17,33%, Konfidenzintervall: 16,29-18,42%) festgestellt werden (siehe Abbildung 1.12). Bei Bienenvölkern die zu Trachtquellen transportiert wurden konnte im Untersuchungsjahr 2018/19 eine signifikant niedrigere Winterverlustrate verzeichnet werden.

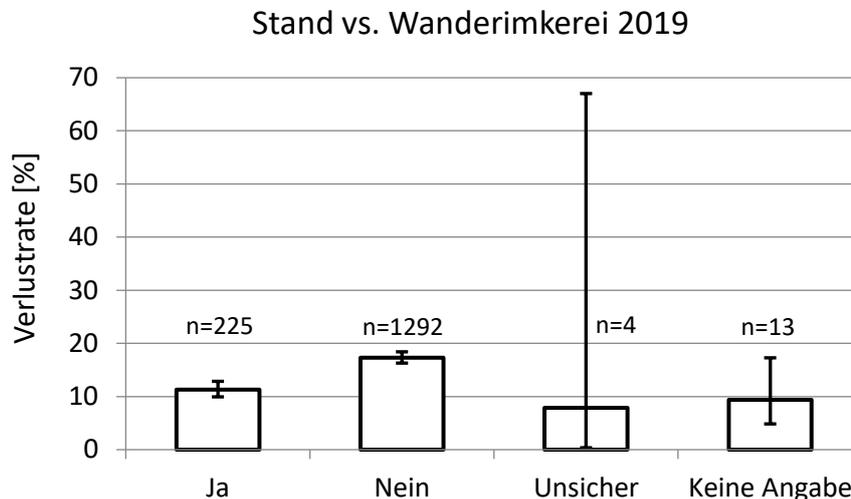


Abbildung 1.12: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) von Wander- und Standimkereien. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „Ja“ und „Nein“ – also zwischen Wander- und Standimkereien.

1.4.6.3 Wabenhygiene

Wabenhygiene in Form von Erneuerung alter Brutwaben kann einen positiven Einfluss auf die Gesundheit der Bienen haben und möglicherweise auch das Überleben der Bienen im Winter beeinflussen. Die ImkerInnen wurden gefragt, welchen Anteil ihrer Brutwaben (in Prozent) sie erneuert haben. Bei der Erhebung der Winterverluste 2018/19 konnte nur zwischen den Gruppen „1-30%“ (17,13%, Konfidenzintervall: 15,51-18,87%) und „keine Angabe“ (11,18%, Konfidenzintervall: 8,23-15,03%) ein signifikanter Unterschied in der Verlustrate aufgrund der Wabenhygiene festgestellt werden (Abbildung 1.13). Die Verlustrate bei keiner Wabenerneuerung („0“) betrug 15,91% (Konfidenzintervall: 8,94-26,73%), bei „31-50%“ 14,69% (Konfidenzintervall: 13,32-16,17%) und bei „>50%“ 14,84 (Konfidenzintervall: 13,27-16,55%). Die geringsten aber statistisch nicht abweichenden Verluste verzeichneten jene ImkerInnen, die keine Angaben über die Erneuerung ihres Wabenbaus machten.

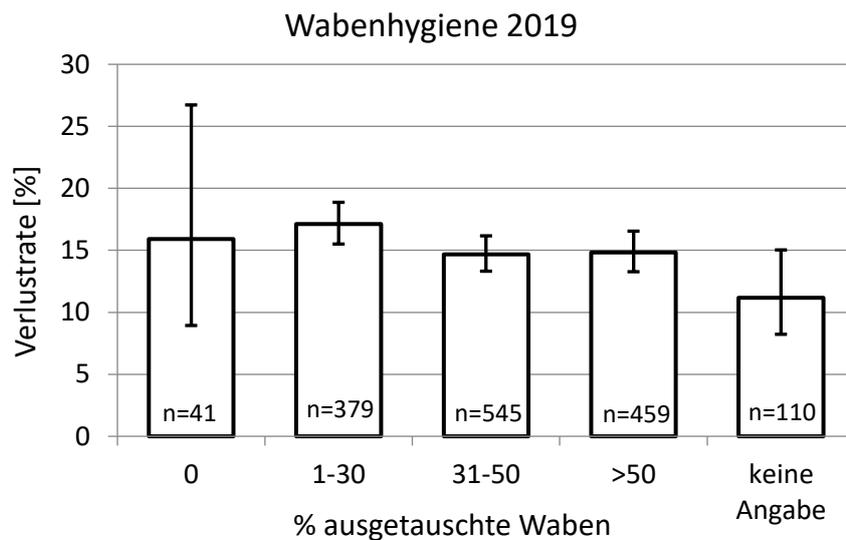


Abbildung 1.13: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Abhängigkeit vom Anteil der im Einwinterungsjahr erneuerten Brutwaben in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Ein signifikanter Unterschied besteht nur zwischen den Gruppen „1-30%“ und „keine Angabe“.

1.4.6.4 Trachtangebot

Die teilnehmenden ImkerInnen wurden nach spezifischen Trachtquellen, die von ihren Bienen befliegen wurden, gefragt, um mögliche Risikotrachtquellen herauszufinden. Zur Auswahl standen für die Untersuchung der Winterverluste 2018/19 Raps, Mais, Sonnenblume, spätblühende Zwischenfrüchte, Waldtracht sowie Waldtracht mit Melezitose. Bei Vorhandensein der Trachtpflanze Mais berichteten Imkereien signifikant höhere Verlustraten als bei Fehlen dieser Trachtpflanze (Abbildung 1.14). Ansonsten konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

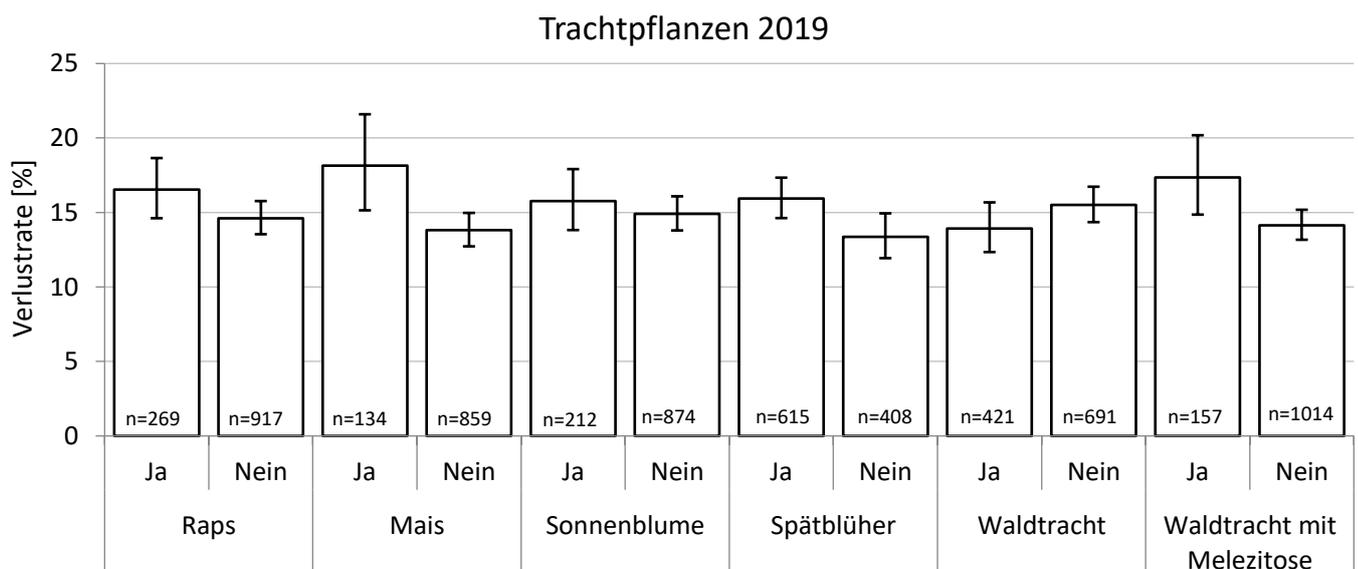


Abbildung 1.14: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Abhängigkeit vom Vorhandensein spezifischer Trachtpflanzen in Prozent ($\pm 95\%$ CI); n = Anzahl der Betriebe. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Wintersterblichkeit in Abhängigkeit vom Vorhandensein beziehungsweise Fehlen der Trachtpflanze Mais.

1.4.6.5 Seehöhe

Um den Einfluss der Seehöhe auf die Wintersterblichkeit von Bienenvölkern zu untersuchen, wurden die Winterstandorte bezüglich ihrer Seehöhe in fünf Klassen eingeteilt: $\leq 200\text{m}$, 201-400m, 401-600m, 601-800m, $>800\text{m}$. Im Untersuchungsjahr 2018/19 konnte eine signifikant niedrigere Verlustrate bei den Gruppen „601-800m“ und „ $>800\text{m}$ “ im Vergleich zu den Gruppen „201-400m“ und „401-600m“ festgestellt werden. Die Verlustraten verteilen sich wie folgt: die Klasse „ $\leq 200\text{m}$ “ weist eine Verlustrate von 15,29% (Konfidenzintervall 12,93-18,00%) auf; Bienenstandorte auf einer Seehöhe von 201-400m zeigen eine Verlustrate von 17,07% (Konfidenzintervall: 15,38-18,90%). Die Verlustrate von Betrieben zwischen 401-600 weist eine Verlustrate von 16,60% (Konfidenzintervall: 15,03-18,30%) auf; für Betriebe zwischen 601-800m liegt die Verlustrate bei 12,65% (Konfidenzintervall: 10,94-14,57%). Für Betriebe, welche über 800m Seehöhe liegen errechnet sich für den Winter 2018/19 eine Verlustrate von 12,24% (Konfidenzintervall: 10,25-14,55%).

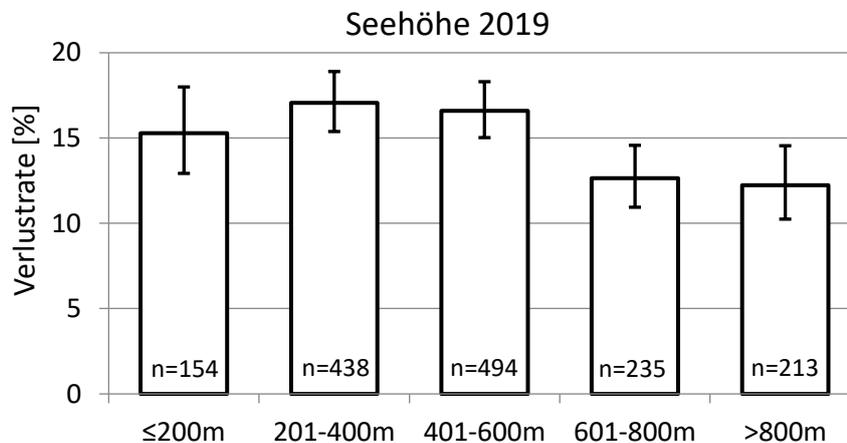


Abbildung 1.15: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Seehöhe der Winterstandorte. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „601-800m“ und „ $>800\text{m}$ “ zu den Gruppen „201-400m“ und „401-600m“ festgestellt werden.

1.4.6.6 Bekämpfung der Varroamilbe

Ein wichtiger Teil der Untersuchung sind Erhebungen über die Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe und deren Auswirkung auf die Winterverluste. Abbildung 1.16 zeigt die am Fragebogen zur Auswahl gestellten Behandlungsmethoden. Dabei wird aus Gründen der internationalen Vergleichbarkeit, der von COLOSS erarbeitete Katalog von möglichen Bekämpfungsmethoden verwendet. Nachfolgend wird zuerst die Häufigkeit der verwendeten Methoden dargestellt. Anschließend wurden die einzelnen Methoden im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Winterverlustrate betrachtet. Für die detaillierte Risikoanalyse wurden nur jene Behandlungsmethoden berücksichtigt, von denen auch genügend Datensätze vorhanden waren, um eine valide Aussage treffen zu können. Bei der Befragung mittels Zeitschrift oder Fragebogen wurden keine Details abgefragt.

19 In welchen Monaten haben Sie Befallsmessungen oder Bekämpfungen gegen die Varroa-Milbe (bei Wirtschaftsvölkern) durchgeführt oder <u>begonnen</u> ?	Bitte nennen Sie bei monatsübergreifenden Behandlungen nur den ersten Monat!												
	2018												
	April	Mai	Juni	Juli	August	September	Oktober	November	Dezember	Jänner	Februar	März	April
Bestimmung Varroa-Befall (Milbenfall o.ä. Methode)													
Drohnenbrutentnahme													
Hyperthermie (Hitzebehandlung)													
Andere biotechnische Methode (Fangwabe, Bannwabe, totale Arbeiterinnen-Brutentnahme etc.)													
Ameisensäure Kurzzeitbehandlung (inkl. MAQS)													
Ameisensäure Langzeitbehandlung													
Milchsäure													
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)													
Oxalsäure Verdampfen													
Oxalsäuremischungen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)													
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, Thymovar)													
Tau-fluvalinat (Apistan)													
Flumethrin (Bayvarol, Polyvar)													
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)													
Amitraz (Verdampfen)													
Coumaphos (Perizin)													
Coumaphos (Checkmite+)													
Anderes chemisches Produkt (welches?)													
Anderer Methode (welche?)													

Aufgrund des internationalen Ansatzes dieser Untersuchung finden Sie in dieser Liste auch in Österreich nicht empfohlene/zugelassene Mittel. Eine Nennung dieser stellt keine Empfehlung dar.

Abbildung 1.16: Im Fragebogen zur Auswahl stehende Behandlungsmethoden gegen die Varroamilbe.

Tabelle 1.7 zeigt die durchgeführten Methoden der Varroabekämpfung von allen Imkereien, die uns Daten im Untersuchungszeitraum von 2018/19 zur Verfügung gestellt haben. 92,5% der Imkereien bestimmten in mindestens einem Monat des abgefragten Zeitraums den Varroabefall ihrer Völker (zum Beispiel natürlicher Milbenfall mit Stockwindel oder Diagnose mittels Staubzuckermethode).

Eine der häufigsten Methoden zur Varroabekämpfung ist die Drohnenbrutentnahme, welche von 54,7% der ImkerInnen in zumindest einem Monat durchgeführt wurde. Danach folgten, nach Häufigkeit der Anwendung, Bekämpfungsmaßnahmen mit organischen Säuren (Ameisensäure Kurzzeit oder Langzeit, unterschiedliche Anwendungsformen der Oxalsäure). Insgesamt 77,0% der Imkereien in Österreich führten eine Ameisensäurebehandlung durch (Kurzzeit und/oder Langzeit, wobei Langzeitbehandlungen mit 47,9% in der Imkerschaft etwas häufiger angewandt werden). Von den unterschiedlichen Anwendungen der Oxalsäure, wird die Verdampfung von 47,6% aller Imkereien angewandt, das Träufeln oder Sprühen von 39,4% und das Träufeln von Oxalsäureprodukten mit weiteren Inhaltsstoffen (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed) von 26,2% der Imkereien. Die Kombinationsanwendung der beiden organischen Säuren (Ameisensäure kurz oder lang, sowie eine Restentmilbung mit Oxalsäure) wird von 73,0% der österreichischen Imkereien angewandt.

Thymol, egal ob in alleiniger Anwendung oder in Kombination mit anderen Methoden, wurde von 8,9% der Imkereien als Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet. Biotechnische Methoden abseits der Drohnenbrutentnahme oder Hyperthermie wurden von 20,8% der Imkereien angewandt, dazu zählen etwa die Fangwabe, die Bannwabe oder die komplette Arbeiterinnen-Brutentnahme. Hyperthermie (=Hitzebehandlung) oder Milchsäure wurden von 4,6%

beziehungsweise 3,9% der Imkereien angewandt. Synthetische Acarizide zur Bekämpfung der Varroamilbe wurden nur in einem geringen Ausmaß genannt (2,0%), wobei am häufigsten Amitraz (0,7%) genannt wurde.

Tabelle 1.7: Anzahl (Prozent) der Imkereien, welche die genannte Methode zur Bekämpfung der Varroamilbe in zumindest einem Monat angewendet haben.

	Anzahl Ja [%]	Anzahl Nein [%]	Keine Angabe [%]	Summe
Bestimmung Varroabefall (Milbenfall o. ä. Methode)	1360(92,5%)	84 (5,7%)	27 (1,8%)	1471
Drohnenbrutentnahme	805 (54,7%)	666 (45,3%)	-	1471
Hyperthermie	68 (4,6%)	1403 (95,4%)	-	1471
Andere biotechnische Methode (Fangwabe, Bannwabe, Arbeiterinnen-Brutentnahme etc.)	306 (20,8%)	1165 (79,2%)	-	1471
Ameisensäure Kurzzeitbehandlung (inkl. MAQS)	605 (41,1%)	866 (58,9%)	-	1471
Ameisensäure Langzeitbehandlung	704 (47,9%)	767 (52,1%)	-	1471
Milchsäure	57 (3,9%)	1414 (96,1%)	-	1471
Oxalsäure Träufeln (oder Sprühen)	580 (39,4%)	891 (60,6%)	-	1471
Oxalsäure Verdampfen	700 (47,6%)	771 (52,4%)	-	1471
Hiveclean/Bienenwohl/Varromed	385 (26,2%)	1086 (73,8%)	-	1471
Thymol (Apiguard, Apilife VAR, Thymovar)	131 (8,9%)	1340 (91,1%)	-	1471
Tau-fluvalinat (Apistan)	2 (0,1%)	1469 (99,9%)	-	1471
Flumethrin (Bayvarol)	7 (0,5%)	1464 (99,5%)	-	1471
Amitraz (in Streifen, Apivar, Apitraz)	10 (0,7%)	1461 (99,3%)	-	1471
Amitraz (Verdampfen)	3 (0,2%)	1468 (99,8%)	-	1471
Coumaphos (Perizin)	2 (0,1%)	1469 (99,9%)	-	1471
Coumaphos (Checkmite+)	2 (0,1%)	1469 (99,9%)	-	1471
Anderes chemisches Produkt	5 (0,3%)	1466 (99,7%)	-	1471
Anderere Methode	26 (1,8%)	1445 (98,2%)	-	1471
Ameisensäure (Kurzzeit- ODER Langzeitbehandlung)	1133(77,0%)	338 (23,0%)	-	1471
Ameisensäure (Kurzzeit- ODER Langzeitbehandlung) und Oxalsäurebehandlung (Träufeln oder Sprühen oder Verdampfen oder Hiveclean/Bienenwohl/Varromed)	1074 (73,0%)	397 (27,0%)	-	1471

1.4.6.6.1 Bestimmung des Varroabefalls

Um herauszufinden, ob die Bestimmung des Varroabefalls und möglicherweise daraus resultierende Handlungen einen Einfluss auf die Wintersterblichkeit haben könnte, wurden die ImkerInnen gefragt, ob sie den Varroabefall mit einer Methode bestimmt hatten oder nicht. Bei ImkerInnen, die den Varroabefall bestimmt hatten, lag die Verlustrate 2018/19 bei 14,74% (Konfidenzintervall: 13,86-15,67%) und bei jenen die keine Bestimmung des Varroabefalls durchgeführt hatten bei 21,7% (Konfidenzintervall: 17,73-26,3%). Somit hatte die Durchführung einer Bestimmung des Varroabefalls und die damit einhergehende genauere Kenntnis einen signifikant positiven Einfluss auf die Winterverlustrate im Untersuchungsjahr 2018/19 (Abbildung 1.17).

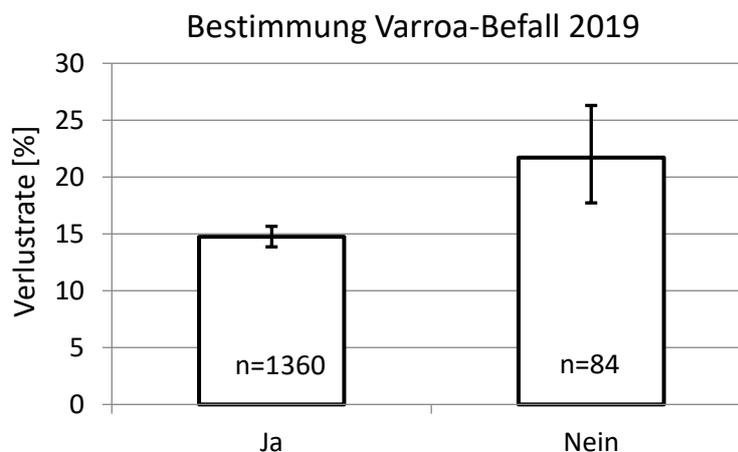


Abbildung 1.17: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von einer durchgeführten Abschätzung des Varroabefalls mit nicht näher abgefragten Methoden. Die Gruppe, die den Varroabefall bestimmt hat, hatte eine signifikant niedrigere Verlustrate.

Auswirkung einer Varroabestimmung über mehrere Monate auf die Winterverluste

Auch ein möglicher Effekt der Bestimmungsdauer wurde analysiert, das heißt die Anzahl der Monate, in denen die Bestimmung durchgeführt wurde. Die Bestimmungsdauer wurde in drei Klassen unterteilt: Null Monate (keine Bestimmung), Bestimmungszeitraum von einem bis drei Monaten und Bestimmungszeitraum über mehr als drei Monate. Für das Untersuchungsjahr 2018/19 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe die den Varroa-Befall nicht bestimmt hat (18,75%, Konfidenzintervall: 16,46-21,28%) zu den beiden anderen Gruppen (1-3 Monate: 14,55%, Konfidenzintervall: 13,13-16,09%; >3 Monate: 14,82%, Konfidenzintervall: 13,63-16,10%) festgestellt werden: sie erlitt signifikant höhere Verluste (Abbildung 1.18).

Analog zu den vorangegangenen Untersuchungsjahren wurden die Häufigkeiten der Varroabestimmung für jeden Monat des Zeitraums zwischen April des Einwinterungsjahres und April des Auswinterungsjahres errechnet. Diese sind in Abbildung 1.19 dargestellt. Auch in diesem Untersuchungsjahr wurde die Methode „Varroabestimmung“ vorwiegend in den Monaten Juli bis September, von jeweils über 50% der Imkereien angewandt.

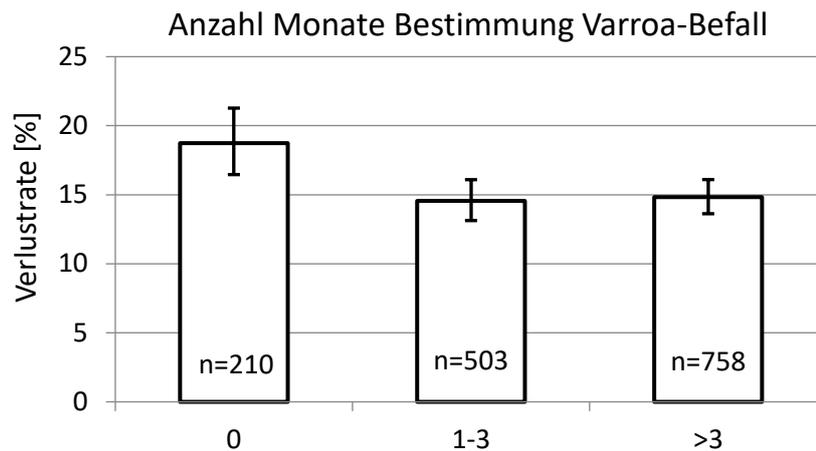


Abbildung 1.18: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Dauer der Bestimmung des Varroabefalls. Auch hier verzeichneten ImkerInnen die keine Bestimmung durchführten signifikant höhere Verlustraten als die anderen Gruppen. Der Bestimmungszeitraum an sich (1-3 Monate vs. >3 Monate) bringt keine signifikanten Unterschiede.

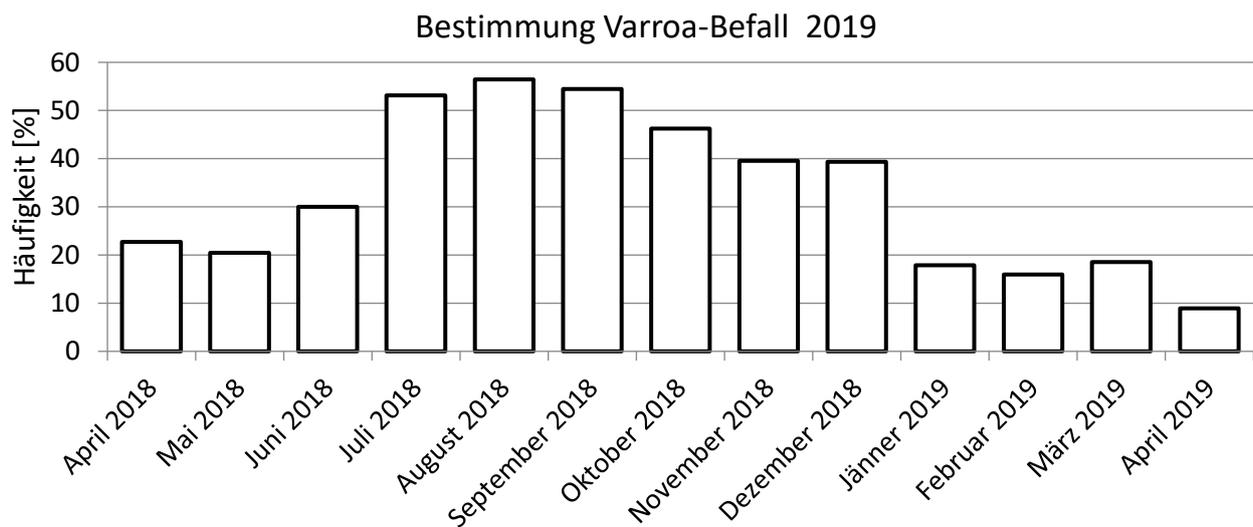


Abbildung 1.19: Häufigkeiten der Bestimmung des Varroabefalls 2018/19 vom April des Einwinterungsjahres bis April des Auswinterungsjahres in Prozent (n=1471).

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Bestimmung des Varroabefalls einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Abbildung 1.20 zeigt die Winterverlustrate der TeilnehmerInnen, welche eine Bestimmung des Varroabefalls im jeweiligen Monat durchgeführt haben im Vergleich zur Winterverlustrate der TeilnehmerInnen, die keine Bestimmung im jeweiligen Monat durchgeführt haben. Es konnte in den Monaten April (ja: 12,81%, Konfidenzintervall: 11,23-14,57%; nein: 16,11%, Konfidenzintervall: 15,11-17,17%), Mai (ja: 12,51%, Konfidenzintervall: 11,04-14,14%; nein: 15,98%, Konfidenzintervall: 14,98-17,04%), März (ja: 12,41%, Konfidenzintervall: 10,72-14,32%; nein: 15,90%, Konfidenzintervall: 14,92-16,92%) und April (ja: 10,83%, Konfidenzintervall: 8,72-13,38%; nein: 15,75%, Konfidenzintervall: 14,84-16,72%) eine signifikant niedrigere Verlustrate bei den Gruppen, welche eine Varroa-Bestimmung durchgeführt haben, verzeichnet werden.

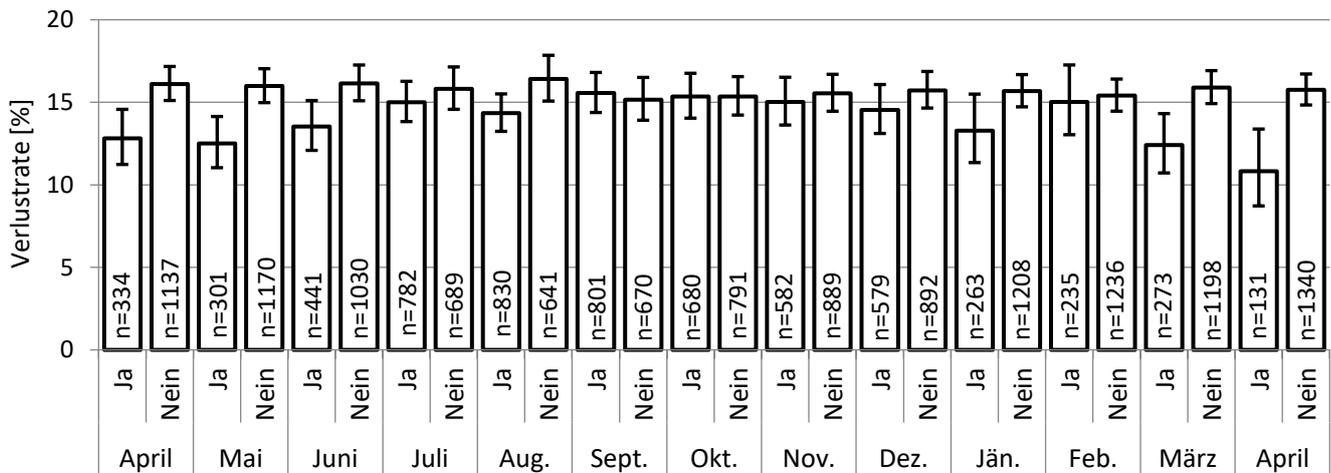


Abbildung 1.20: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Bestimmung des Varroa-Befallsgrades im jeweiligen Monat. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen den paarweisen Vergleichen der Monate: April, Mai, März und April, wobei bei allen Gruppen die eine Varroa-Bestimmung durchgeführt haben eine signifikant geringere Verlustrate verzeichnet wurde.

1.4.6.6.2 Zeitpunkt und Häufigkeit der Anwendungen

Die TeilnehmerInnen wurden zu ihren verwendeten Methoden zur Bekämpfung der Varroamilbe befragt. Aus den erhaltenen Antworten haben wir die Häufigkeiten, mit der die jeweiligen Methoden in den einzelnen Monaten des Untersuchungsjahres 2018/19 angewendet wurden, bestimmt und in den Abbildungen 1.21 (a-h) dargestellt.

1.4.6.6.3 Auswirkungen der Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Verringerung des Varroabefalls ist die Drohnenbrutentnahme, da die Varroamilbe vermehrt innerhalb der Drohnenbrut zu finden ist. Von den teilnehmenden Imkereien 2018/19 haben 54,7% diese Methode in zumindest einem Monat angewandt. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Verlustrate zwischen Imkereien, die Drohnenbrut entnommen haben und solchen, die dies nicht gemacht haben, feststellen. Die Verlustrate, bei Imkereien welche die Drohnenbrutentnahme durchgeführt hatten lag bei 14,80% (Konfidenzintervall: 13,69-15,98%), bei Verzicht der Drohnenbrutentnahme wurde eine Verlustrate von 15,99% (Konfidenzintervall: 14,66-17,41%) festgestellt (Abbildung 1.22).

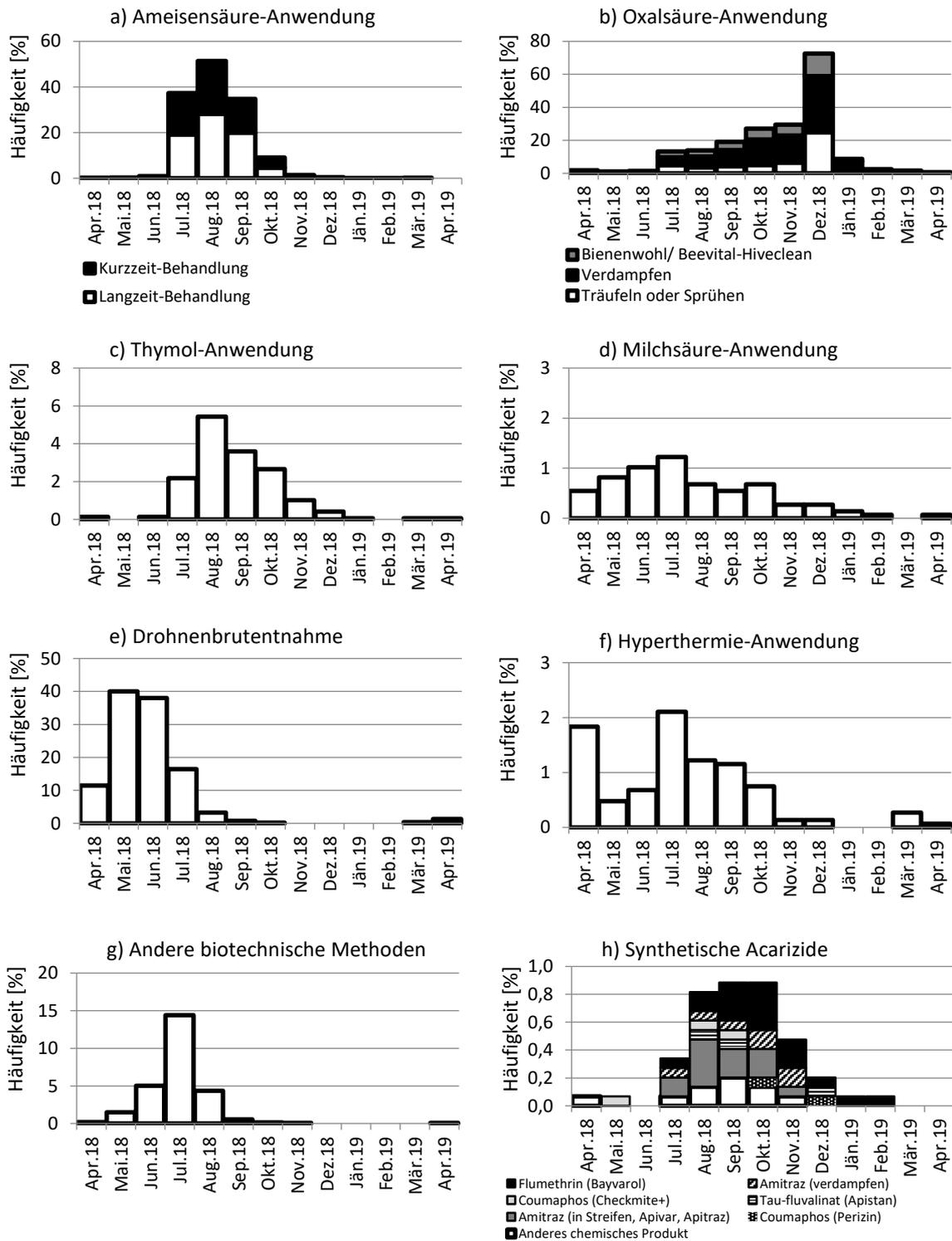


Abbildung 1.21 a-h: Zusammenfassung der zur Bekämpfung der Varroamilbe angewandten Methoden für das Untersuchungsjahr 2018/19.

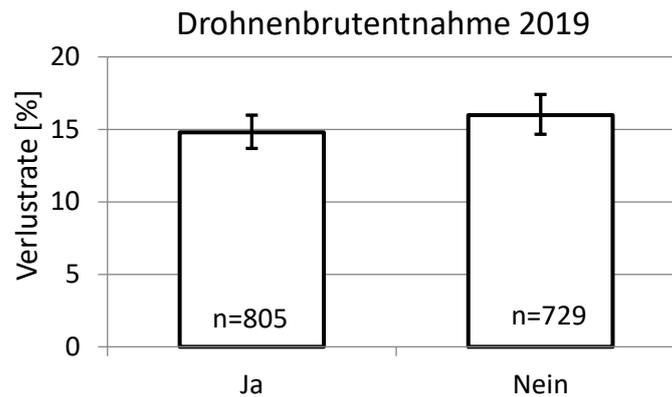


Abbildung 1.22: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Drohnenbrutentnahme“ in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ob der Zeitpunkt der Entnahme von Drohnenbrut einen Einfluss auf die Winterverlustrate hat, wurde durch eine Gegenüberstellung der Verlustraten für die Monate April bis Juli bei Anwendung und Verzicht dieser Methode betrachtet. In Abbildung 1.23 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Es konnte nur im Mai ein signifikanter Unterschied in der Verlustrate festgestellt werden: die Gruppe, bei der eine Drohnenbrutentnahme stattfand (13,67%, Konfidenzintervall 12,43-15,02%) hatte eine geringere Verlustrate als die Gruppe, bei der keine Drohnenbrutentnahme stattfand (16,51%, Konfidenzintervall 15,35-17,74%).

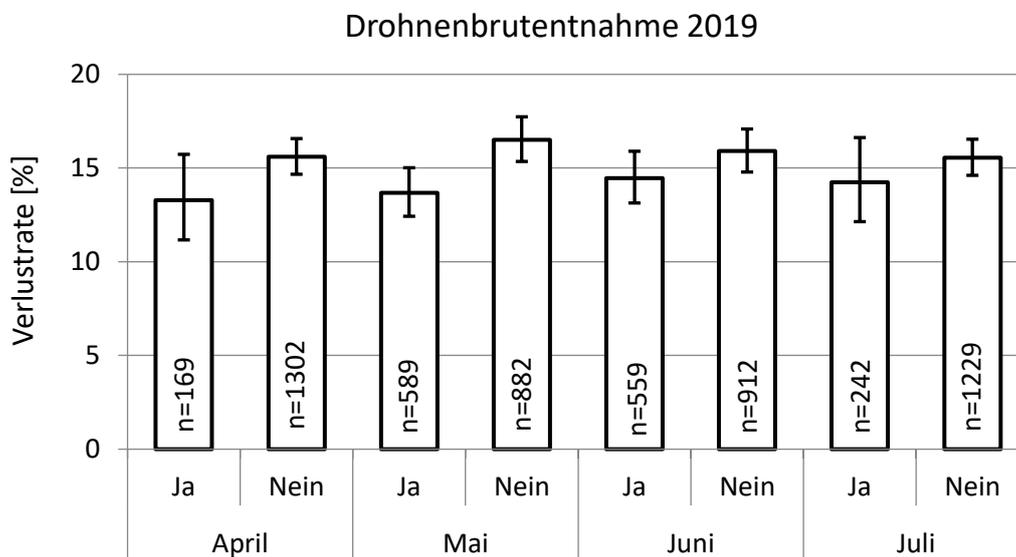


Abbildung 1.23: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Drohnenbrutentnahme in den Monaten April bis Juli des Einwinterungsjahres. Es besteht nur im Monat Mai ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Auswirkung einer mehrfachen Drohnenbrutentnahme auf die Winterverluste

Es wurde untersucht, ob die Anzahl der Monate, in denen eine Drohnenbrutentnahme durchgeführt wurde, einen Einfluss auf den Überwinterungserfolg hat. Dazu wurden die Verlustraten der Gruppen „0“ (=keine Behandlung), „1-3 Monate“ und „>3 Monate“ verglichen. Bei dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der Dauer der Behandlung festgestellt werden (Abbildung 1.24).

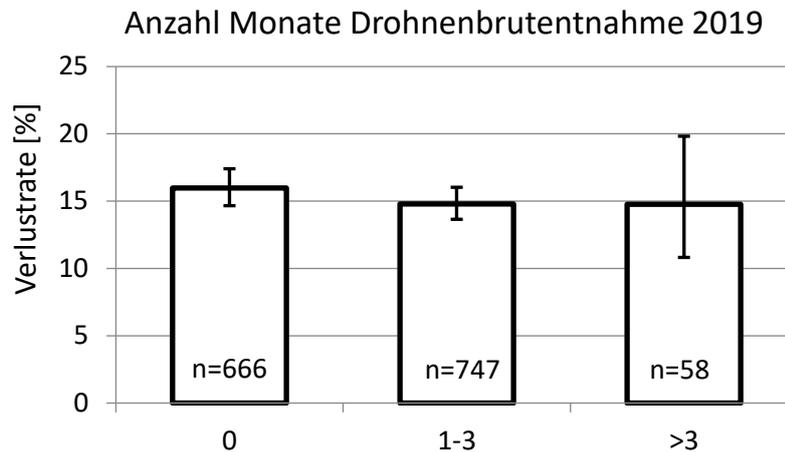


Abbildung 1.24: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Dauer der Drohnenbrutentnahme. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

1.4.6.6.4 Ameisensäure-Behandlung

Wir haben bei unseren Analysen zwischen Kurzzeit- und Langzeitbehandlung mit Ameisensäure unterschieden und die daraus resultierenden Verlustraten miteinander verglichen. Es ist zu vermerken, dass bei keiner der Methoden die Konzentration der verwendeten Ameisensäure abgefragt wurde.

In Abbildung 1.25 wird die Verlustrate bei Anwendung der Kurzzeitbehandlung (15,24%, Konfidenzintervall: 13,95-16,62%) mit jener bei Nichtanwendung dieser Behandlung (15,44%, Konfidenzintervall: 14,30-16,66%) verglichen und grafisch dargestellt. Die Verlustrate bei Behandlung war nicht höher als bei Nichtanwendung dieser Methode.

In Abbildung 1.26 wird die Verlustrate bei Anwendung der Langzeitbehandlung jener bei Nichtanwendung dieser Methode gegenübergestellt. Die Verlustrate bei Behandlung (14,62%, Konfidenzintervall: 13,48-15,83%) war nicht signifikant unterschiedlich als bei Nichtanwendung dieser Methode (16,09%, Konfidenzintervall: 14,82-17,44%).

In Abbildung 1.27 werden die beiden Methoden Kurzzeit- und Langzeitbehandlung gegenübergestellt, und zwar nur für Betriebe, die ausschließlich entweder die eine oder die andere Ameisensäure-Anwendung durchgeführt haben. Die Verlustrate bei ausschließlicher Kurzzeitbehandlung (15,64%, Konfidenzintervall: 14,14-17,28%) war nicht signifikant unterschiedlich zu jener bei ausschließlicher Langzeitbehandlung (14,72%, Konfidenzintervall: 13,45-16,09%).

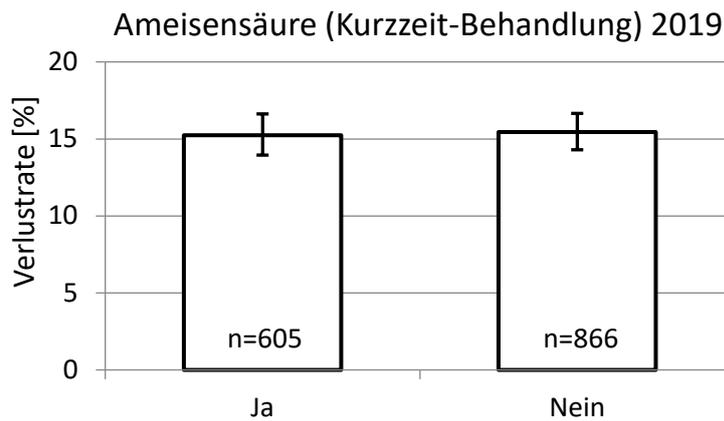


Abbildung 1.25: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure-Kurzzeitbehandlung“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

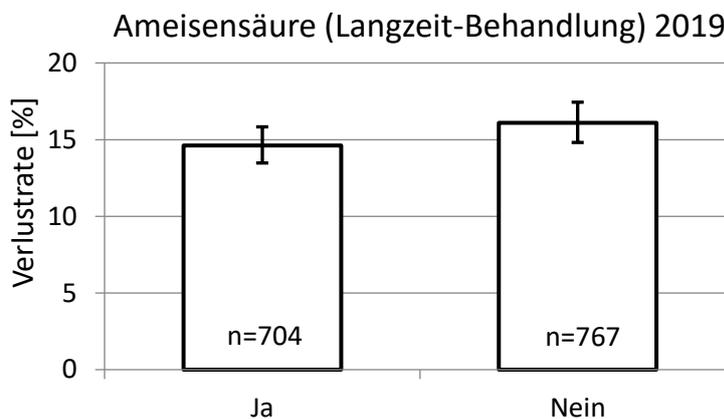


Abbildung 1.26: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Ameisensäure-Langzeitbehandlung“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

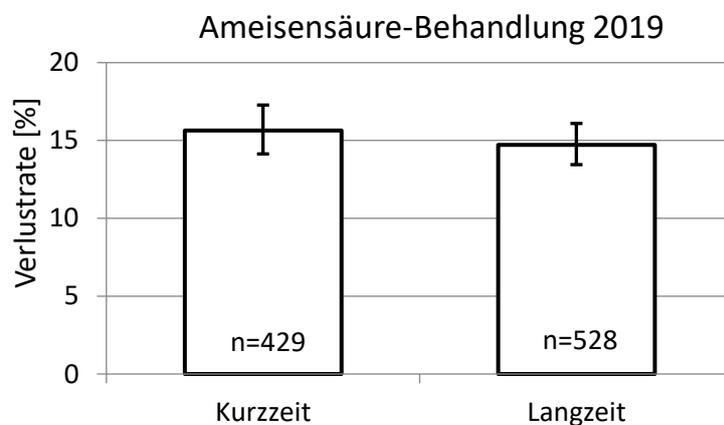


Abbildung 1.27: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von alleiniger Anwendung einer Ameisensäure-Kurzzeit- oder -Langzeitbehandlung. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.5 Oxalsäure

Während der Wintermonate setzen viele ImkerInnen Oxalsäure zur Bekämpfung der Varroamilbe zur sogenannten Restentmilbung ein. In besonderen Situationen kann eine Anwendung auch in der warmen Jahreszeit erfolgen. Die Anwendung dieser Methode erfordert allerdings, dass die Völker brutfrei sind, da die Oxalsäure nicht in die verdeckelte Brut wirkt. Die Oxalsäure kann entweder durch Träufeln oder durch Verdampfen eingesetzt werden. Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed sind kommerziell erhältliche Fertigmischungen aus Oxalsäure, Zucker und anderen Stoffen, die ebenfalls geträufelt werden. Es wurde untersucht, ob sich die Winterverlusten bei ImkerInnen, die eine dieser Methoden eingesetzt haben, von jenen, die diese Methoden nicht angewandt haben, unterscheiden. Wie auch in den vorangegangenen Untersuchungsjahren war die Verlustrate bei Anwendung des Träufelns (16,17%, Konfidenzintervall: 14,80-17,65%) nicht signifikant unterschiedlich zu jener bei Nichtanwendung (14,69%, Konfidenzintervall: 13,60-15,85%). Auch bei Anwendung des Verdampfens (15,50%, Konfidenzintervall: 14,27-16,83%) war kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe, welche diese Methode nicht durchgeführt hat (15,19%, Konfidenzintervall: 14,00-16,46%), festzustellen (Abbildung 1.28 und 1.29).

Oxalsäurebehandlung im November, Dezember und Jänner

Wir haben des Weiteren untersucht, ob der Zeitpunkt der Anwendung von Bedeutung ist. Dafür wurden die Monate November, Dezember und Jänner zur Analyse herangezogen (unabhängig von der restlichen Anwendungshäufigkeit im Untersuchungszeitraum), wobei die Methode am häufigsten im Dezember eingesetzt wird (siehe Abb. 1.21b). Abbildung 1.30 zeigt die Verlustrate bei Anwendung einer Oxalsäurebehandlung (Träufeln und/oder Verdampfen und/oder Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed) im November (17,21%, Konfidenzintervall: 13,03-22,39%), im Dezember (13,99%, Konfidenzintervall: 12,44-15,50%) und jene im Jänner (14,68%, Konfidenzintervall: 8,87-23,31%). Bei diesem Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen festgestellt werden.

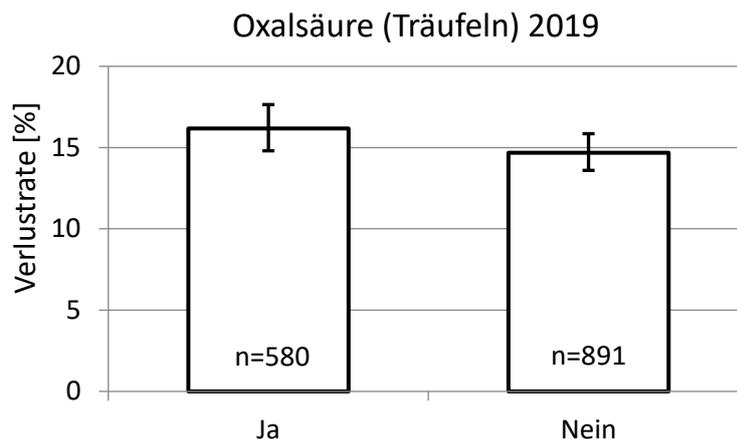


Abbildung 1.28: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure (Träufeln)“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

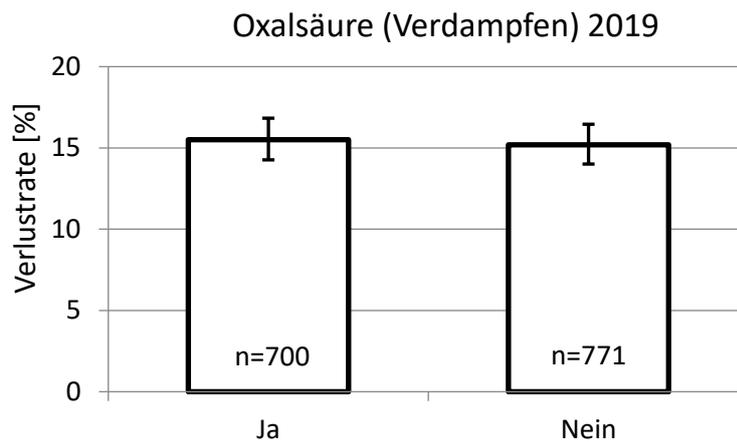


Abbildung 1.29: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure (Verdampfen)“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

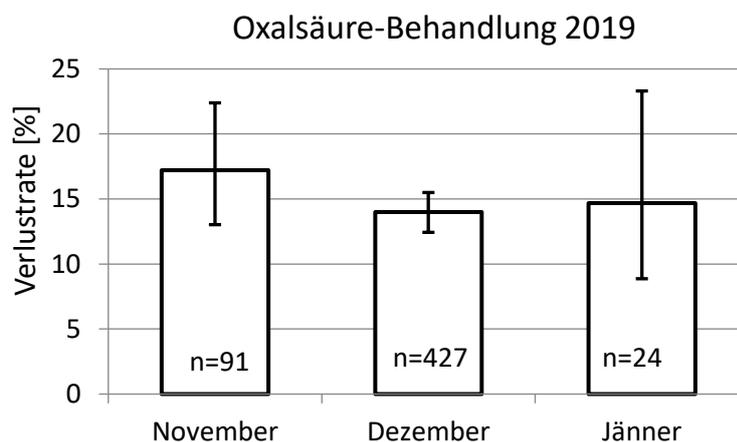


Abbildung 1.30: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Oxalsäure“ (Träufeln und/oder Verdampfen und/oder Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed) im November, Dezember und Jänner. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen.

1.4.6.6 Hiveclean/Bienenwohl/Varromed

Bienenwohl mit dem Wirkstoff Oxalsäure (und weiteren Hilfsstoffen) wird für einen guten Behandlungserfolg im brutfreien Volk eingesetzt. Im Untersuchungsjahr 2018/19 setzten 26,2% aller befragten ImkerInnen eines dieser Produkte zur Bekämpfung der Varroa-Milbe ein. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate beobachtet werden, wenn Bienenwohl zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet wurde (14,55%, Konfidenzintervall: 12,95-16,32%) verglichen mit Nichtanwendung (15,60%, Konfidenzintervall: 14,59-16,66%; Abbildung 1.31).

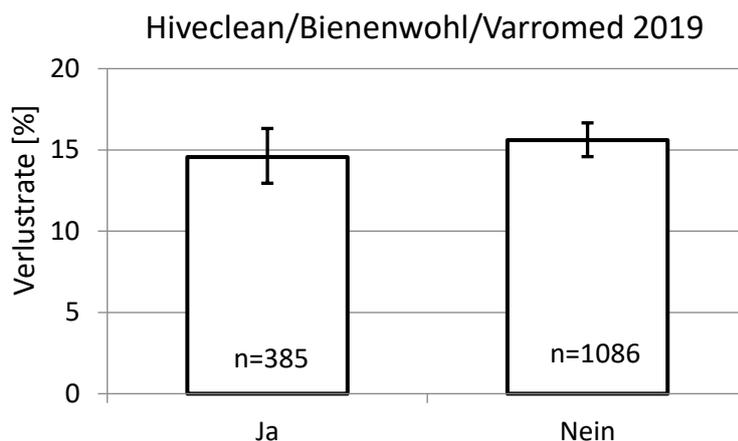


Abbildung 1.31: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Varroa-bekämpfung mit einer Oxalsäure Fertigmischung (Hiveclean/Bienenwohl/ Varromed). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.7 Thymol

Von 8,9% aller befragten ImkerInnen wurde angegeben, eine Behandlung mit Thymol durchgeführt zu haben. Wie auch in den vorangegangenen Untersuchungsjahren, zeigte sich auch für 2018/19 kein signifikanter Unterschied in der Verlustrate, wenn Thymol zur Bekämpfung der Varroamilbe verwendet wurde (16,99%, Konfidenzintervall: 13,67-20,92%) beziehungsweise nicht verwendet wurde (15,24%, Konfidenzintervall: 14,35-16,18%; Abbildung 1.32).

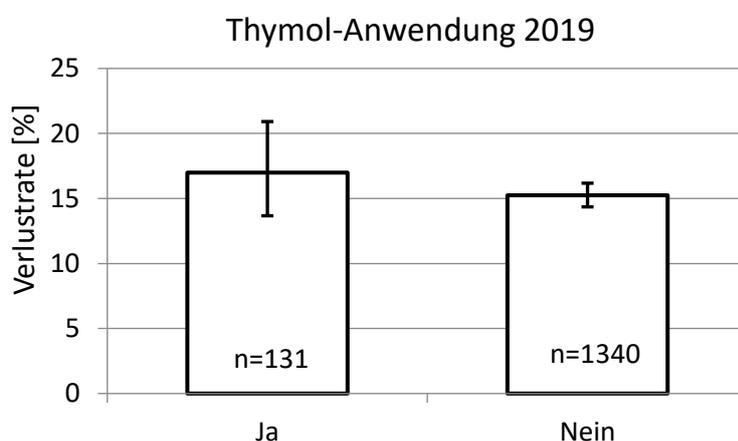


Abbildung 1.32: Höhe der Winterverluste von 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Thymol“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Auswirkung einer mehrfachen Thymolbehandlung auf die Winterverluste

Es wurde analog zu den vorangehenden Beobachtungsjahren untersucht, ob sich eine mehrfache Behandlung der Völker mit Thymol auf die Winterverlustrate auswirkt. Die Einteilung dazu wurde mit den Gruppen „0“ (keine Behandlung), „1“ (Behandlung in einem Monat) und „>1“ (Behandlung in mehr als einem Monat) festgelegt. Auch bei dieser genaueren Betrachtung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anwendung bzw. Nichtanwendung von Thymol festgestellt werden (Abbildung 1.33).

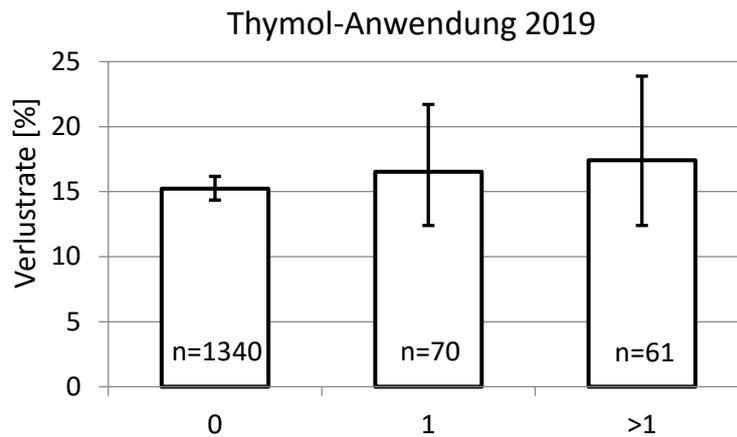


Abbildung 1.33: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Anzahl der Anwendungen von Produkten auf Thymolbasis. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen.

1.4.6.6.8 Hyperthermie

Eine Alternative zur chemischen Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe stellt die Hitzebehandlung (=Hyperthermie) dar. Sie beruht auf der unterschiedlichen Wärmetoleranz von Bienen und Milben. 4,6% der ImkerInnen, die sich an der Erhebung der Winterverluste beteiligt haben, wendeten diese nicht-chemische Behandlung in zumindest einem Monat an. Es wurde nicht zwischen den verschiedenen am Markt erhältlichen Systemen zur Hitzebehandlung unterschieden. Hinsichtlich der Verlustrate fanden wir keine signifikanten Unterschiede zwischen Völkern, die mit Hyperthermie behandelt wurden und jenen, bei denen diese Methode nicht angewandt wurde (Abbildung 1.34).

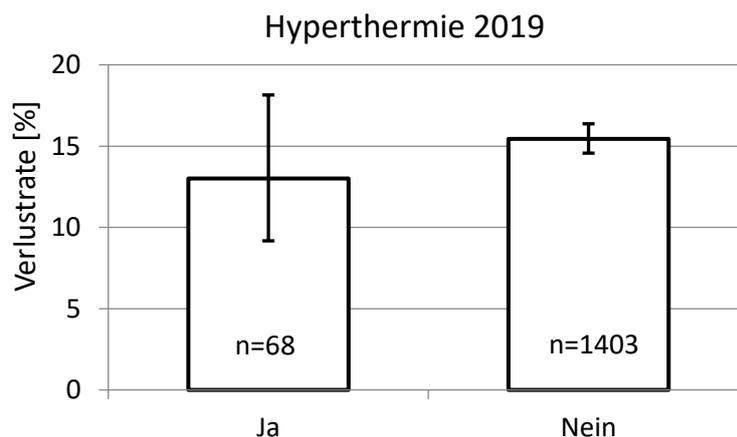


Abbildung 1.34: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „Hyperthermie“. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

1.4.6.6.9 Andere biotechnische Methoden (ohne Hyperthermie und ohne Drohnenbrutentnahme)

Andere biotechnische Methoden, mit Ausnahme von Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme, wurden zusammengefasst abgefragt. 20,8% der befragten ImkerInnen gaben an eine solche biotechnische Methode angewendet zu haben. Dazu zählen die Verwendung von Fangwaben oder Bannwaben oder die komplette Arbeiterinnenbrutentnahme. Im Untersuchungsjahr 2018/19 lag die Verlustrate bei Anwendung solcher Methoden bei 13,16% (Konfidenzintervall: 11,59-14,92%) und damit signifikant unter der Verlustrate von jenen, die keine dieser biotechnischen Methoden anwendeten (16,28; Konfidenzintervall: 15,26-17,35%; Abbildung 1.35).

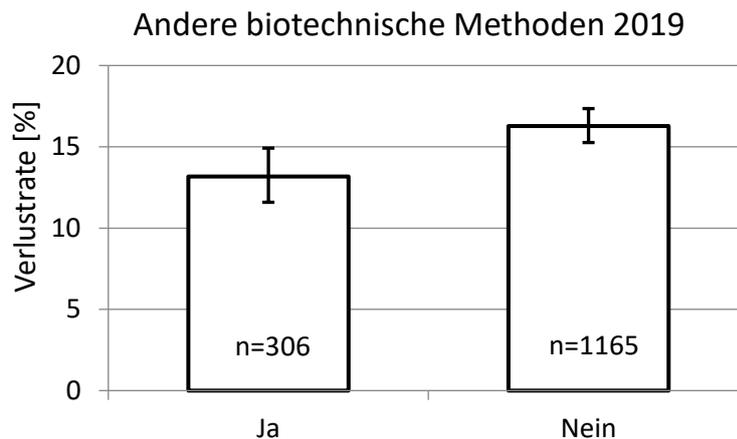


Abbildung 1.35: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode „andere biotechnische Methoden“. Bei Anwendung solcher Verfahren konnte eine signifikant niedrigere Verlustrate verzeichnet werden.

1.4.6.7 Königinnen-Probleme

Die Überlebenschance der Völker hängt in großem Maße auch von der Gesundheit der Königin ab. Die Imkereien wurden deshalb auch über das Auftreten von Königinnen-Problemen befragt und konnten zwischen den vier Antworten „Häufiger“, „Normal“, „Seltener“ und „Weiß nicht“ (im Vergleich zu den Vorjahren) entscheiden. Tabelle 1.8 zeigt die Angaben der TeilnehmerInnen von 2013/14 bis 2018/19. Bei der Erfassung der Winterverluste 2018/19 konnten in Bezug auf Königinnen-Probleme keine signifikanten Unterschiede zwischen den Angaben „Häufiger“ (18,48%, Konfidenzintervall: 15,35-22,08%) im Vergleich zu „Normal“ (15,64%, Konfidenzintervall: 14,34-17,03%) und „Seltener“ (13,86%, Konfidenzintervall: 12,10-15,84%) festgestellt werden (Abbildung 1.36).

Tabelle 1.8: Häufigkeit der Königinnen-Probleme im Vergleich zum Vorjahr. Vergleich mehrerer Winter, Angaben in Prozent. n=Anzahl der Betriebe.

Königinnen-Probleme [%]	2013/14 (n=953)	2014/15 (n=1166)	2015/16 (n=1206)	2016/17 (n=1570)	2017/18 (n=1096)	2018/19 (n=1534)
Häufiger	8,0	16,6	5,2	10,2	6,6	6,2
Normal	48,1	44,0	40,7	47,4	48,4	38,3
Seltener	22,2	15,5	33,1	25,2	30,3	25,4
Weiß nicht	21,7	23,9	21,0	17,3	14,8	30,2

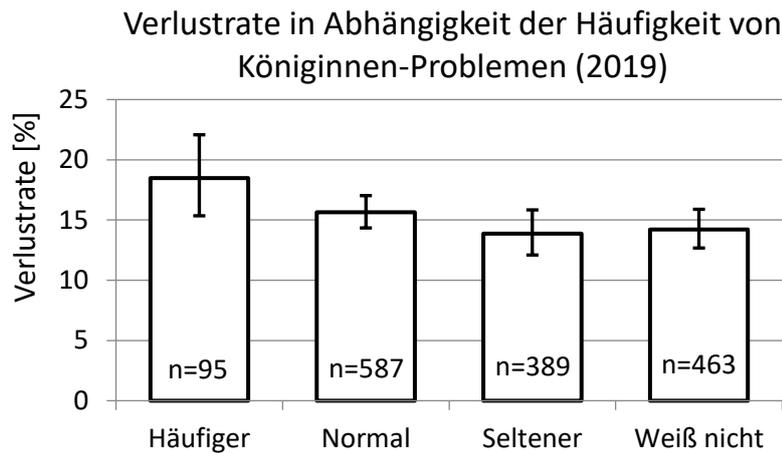


Abbildung 1.36: Höhe der Winterverluste 2018/19 im Zusammenhang mit den beobachteten Königinnen-Problemen in Prozent ($\pm 95\%$ CI). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

1.4.6.8 Im Einwinterungsjahr begattete Königin („junge Königin“)

Die ImkerInnen wurden nach der Anzahl ihrer Völker mit junger Königin befragt, um zu sehen, ob sich die Überlebenschancen von Völkern mit einer jungen, das heißt im Jahr 2018 begatteten Königin, im Vergleich zu Völkern mit einer älteren Königin unterscheiden. Es wurde die Verlustrate von Imkereien miteinander verglichen, die 0-25% Völker mit junger Königin, 26-50%, 51-75% oder 76-100% Völker mit junger Königin hatten.

Es konnte festgestellt werden, dass die Verlustrate mit zunehmendem Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei signifikant niedriger wurde (Abbildung 1.37). Die Verlustrate lag bei Imkereien mit 0-25% jungen Wirtschaftsköniginnen bei 21,77% (Konfidenzintervall: 19,12-24,67%), bei Imkereien mit 76-100% junger Königinnen hingegen bei 12,14% (Konfidenzintervall: 10,38-14,15%).

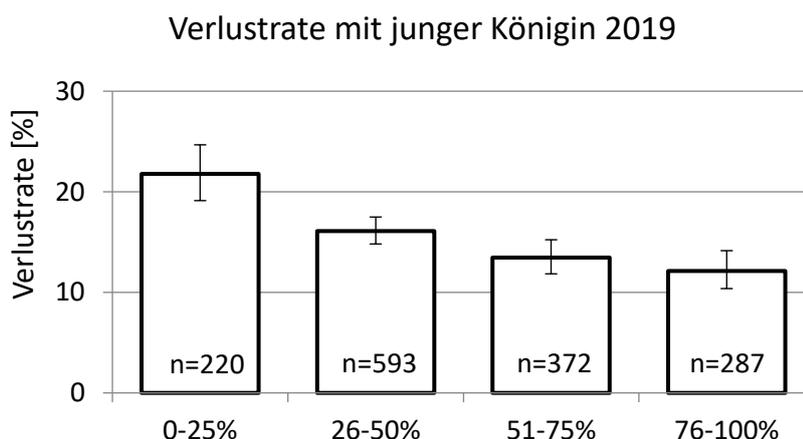


Abbildung 1.37: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%$ CI) in Abhängigkeit vom Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei. Je mehr junge Königinnen, desto niedriger die Verlustrate.

1.4.6.9 Verkrüppelte Flügel

In der Erhebung 2018/19 wurde nach dem Auftreten von Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln während der Sammelsaison 2018 gefragt. Nur 2,1% der Imkereien beobachteten diese häufig. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Verlustrate und der Häufigkeit des Auftretens festgestellt werden: die Gruppe von ImkerInnen, welche das Auftreten verkrüppelter Flügel häufig beobachtete, hatte eine signifikant höhere Verlustrate (36,27%, Konfidenzintervall: 26,74-47,01%) als alle anderen drei Gruppen („Überhaupt nicht“: 13,50%, Konfidenzintervall: 12,49-14,58%; „Wenig“: 16,85%, Konfidenzintervall: 15,30-18,52%; „Weiß nicht“: 13,99%, Konfidenzintervall: 11,09-17,50%; Abbildung 1.38).

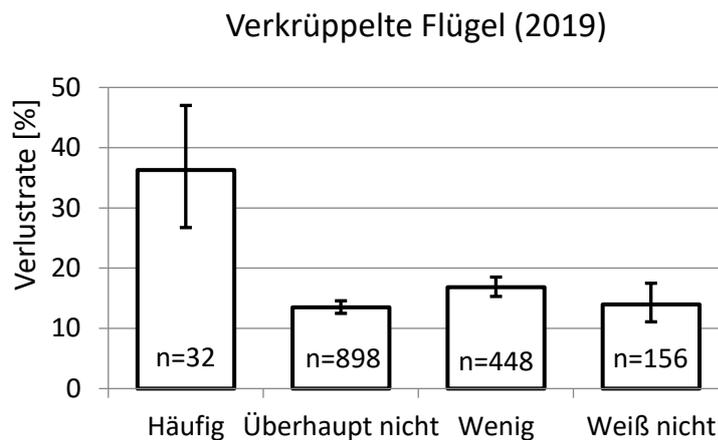


Abbildung 1.38: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit vom Auftreten verkrüppelter Flügel bei Arbeiterinnen. Es konnte eine signifikant höhere Verlustrate bei der Gruppe, die häufig verkrüppelte Flügel beobachtete, festgestellt werden.

1.4.6.10 Betriebsweise 2018/19

Seit 2016/17 werden die ImkerInnen, auch auf eigenen Wunsch, zu weiteren Details ihrer Betriebsweise befragt. Dabei konnten Angaben zu den Beuten gemacht und festgehalten werden, ob der Betrieb eine zertifizierte Bio-Imkerei ist, Bienen auf Varroa-Toleranz züchtet oder Wachs zukaufte. Über die Hälfte der TeilnehmerInnen haben angegeben, im Winter einen offenen Gitterboden in ihren Beuten zu haben oder Wachs von außerhalb des Betriebes zuzukaufen. Wie auch in der vorjährigen Befragung gab nur ein kleiner Anteil an Betrieben (6,3%) an, Naturwabenbau ohne Mittelwand zu verwenden. Als per Gütesiegel zertifizierte Bio-Imkerei nahmen 182 Betriebe an der Befragung teil. Einen Überblick über die Häufigkeit der verschiedenen Betriebsweisen (Angaben „Ja“, „Nein“ und „Unsicher“) bietet die Abbildung 1.39. Abbildung 1.40 zeigt den Einfluss der verschiedenen Betriebsweisen auf die Winterverlustrate. Jene Imkereien, die Wachs zukaufen, verzeichneten eine signifikant höhere Verlustrate (17,44%, Konfidenzintervall: 15,99-19,00%) als jene, die kein Wachs zukaufen (14,00%, Konfidenzintervall: 12,89-15,20%). Bei allen anderen für den Winter 2018/19 untersuchten Betriebsweisen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

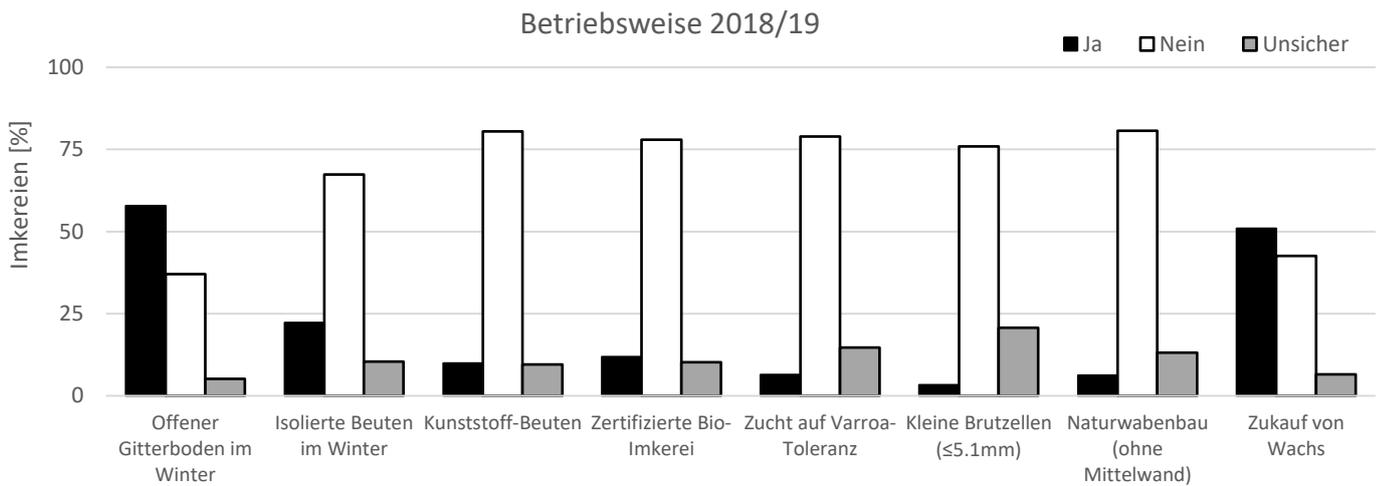


Abbildung 1.39: Häufigkeit der Betriebsweisen 2018/19 in Prozent.

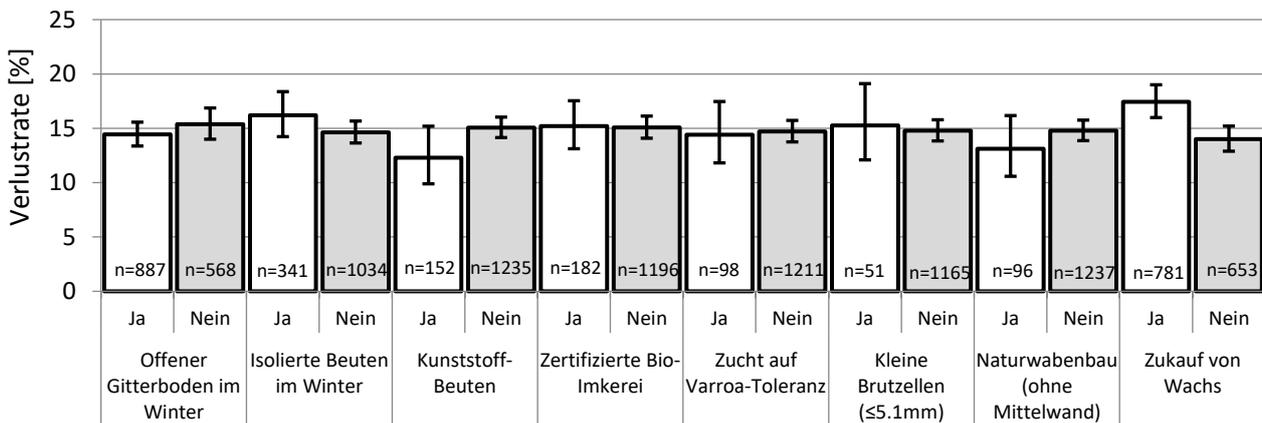


Abbildung 1.40: Höhe der Winterverluste 2018/19 in Prozent ($\pm 95\%CI$) in Abhängigkeit von der Betriebsweise der TeilnehmerInnen. Imkereien, die Wachs zukaufen, verzeichneten signifikant höhere Verluste (17,44%, Konfidenzintervall: 15,99-19,00%) als jene, die kein Wachs zukaufen (14,00%, Konfidenzintervall: 12,89-15,20%).

1.5 Diskussion

Die Erhebung der Winterverluste von Bienenvölkern wird seit 2008 vom Institut für Biologie (vormals: Zoologie) der Universität Graz durchgeführt. In diesem Bericht werden die Ergebnisse des Untersuchungsjahres 2018/19 zusammengefasst und zum Teil mit denen der Vorjahre verglichen. Die im Winter 2018/19 in Österreich erhobene Verlustrate von Bienenvölkern betrug 15,2%, bei einer Teilnahme von 1534 Imkereien, was einer prozentualen Beteiligung von 5,2% aller österreichischen Imkereibetriebe entspricht. Diese stellten insgesamt Information über 33.651 eingewinteter Bienenvölker zur Verfügung, was wiederum 9% aller in Österreich gehaltenen Bienenvölkern entspricht. Die Verlustrate liegt, verglichen mit den bisherigen Ergebnissen, im mittleren Bereich. Die mittlere Verlustrate aller in Österreich erhobenen Winterverlusten liegt bei 16,3%. Die bisher niedrigste in dieser Erhebung gemessene Verlustrate lag bei 8,1% (2015/16) und die bisher höchste gemessene Verlustrate bei 28,4% im Winter 2014/15. Diese großen Schwankungen in den Verlusten, deren genaue Ursachen größtenteils noch unverstanden sind, machen die große Bedeutung des Bienen-Monitorings und der anschließenden Ursachenforschung deutlich. Eine internationale Vergleichbarkeit der erhobenen Daten wird durch die vom Forschungsnetzwerk COLOSS festgelegten Fragen ermöglicht (van der Zee et al., 2013; Brodschneider et al., 2016; Brodschneider et al., 2018a). Diese Art der Untersuchung ist nur eine Möglichkeit, den Ursachen hoher Winterverluste auf den Grund zu gehen. Diese durch Umfragen erlangten Erkenntnisse sollen zusätzlich durch gezielte Probenentnahmen ergänzt werden (van der Zee et al., 2015).

Die in diesem Bericht präsentierten Ergebnisse beruhen auf den Angaben der österreichischen ImkerInnen. Um eine möglichst große Beteiligung der ImkerInnen zu erreichen, wurde sowohl online, in der Fachzeitschrift Bienen Aktuell, bei Veranstaltungen als auch über bereits bestehende Kontakte zu einer Teilnahme an unserer Untersuchung aufgerufen. Diese über Jahre etablierten Kontakte helfen, eine nahezu vollständige Abdeckung an Rückmeldungen von einzelnen Gemeinden und Imkervereinen zu erhalten. Um möglichst klare und eindeutige Antworten zu erhalten, wurden die Fragen bewusst einfach gestaltet. Den Großteil der Antworten, annähernd 90%, haben wir online erhalten, wohingegen der Anteil derer, die den Fragebogen aus der Zeitschrift Bienen Aktuell retournieren über die Jahre immer geringer geworden ist, und 2019 nur mehr bei 4,1% lag. Wir können die Ergebnisse unserer Untersuchung hinsichtlich des Erfassungsmodus als repräsentativ erachten: Es konnten weder signifikante Unterschiede in den Verlusten zwischen anonymer und nicht-anonymer Teilnahme, noch zwischen Online-Teilnahme versus Papierfragebogen-Teilnahme, festgestellt werden. Im Untersuchungsjahr 2018/19 haben 64,2% der TeilnehmerInnen freiwillig eine Kontaktmöglichkeit genannt, was zum einen von Vertrauen in die Untersuchung zeugt, uns aber auch die Möglichkeit gibt bei Unklarheiten nachzufragen.

Die durchschnittliche Völkeranzahl der an dieser Erhebung teilnehmenden Imkereien lag 2018/19 bei 21,9 eingewinterten Völkern, was etwas mehr ist als der in Österreich aufgrund der Angaben der Biene Österreich erwartete Mittelwert. Dazu trägt die Teilnahme von 26 großen Imkereien mit jeweils über 150 eingewinterten Völkern bei. Der Median der eingewinterten Völkerzahlen liegt jedoch bei 10 eingewinterten Völkern, was der erwarteten österreichischen Imkerei-Demographie durchaus entspricht. Auch daraus folgern wir, dass die dieser Auswertung zugrundeliegenden Daten einer durchmischten und annähernd repräsentativen Gruppe der österreichischen Imkereien entstammen.

Generell lässt sich sagen, dass die Winterverluste in Österreich nicht gleich verteilt sind. Betrachtet man die Verlusten der einzelnen Bundesländer (siehe Abschnitt 1.4.3.2, Tabelle 1.4), so kann

man feststellen, dass es zum Teil beträchtliche Unterschiede gibt. Die Verluste reichen von 9,9% im Burgenland bis zu 19,6% in Wien. Damit liegen die höchsten Völkerverluste eines Bundeslandes im Winter 2018/19 unter den niedrigsten eines Bundeslandes im Winter 2016/17, im Mittel aber bei der Mehrheit der Bundesländer etwas höher als im Vorjahr (Brodschneider & Karrer, 2018; Brodschneider et al., 2018b). Die österreichweite Gesamtverlustrate von 15,2% im Jahr 2018/19 liegt im mittleren Bereich und spiegelt sich größtenteils auch in den Bezirksergebnissen wider. In nur 4 Bezirken mit mehr als 5 teilnehmenden Imkereien wurden Verluste von mehr als 25% verzeichnet: Hollabrunn (NÖ), Kirchdorf an der Krems (OÖ), Salzburg (S) und mit einer hervorstechend hohen Verlustrate von 65,33% Waidhofen an der Ybbs (NÖ), einem Bezirk von dem es in den Vorjahren noch keine Aufzeichnungen gab. Im Gegensatz dazu betrug die Verlustrate in 20 Bezirken mit mehr als je 5 teilnehmenden Imkereien weniger als 10%. Die niedrigsten Verluste von 0,0% wurden aus dem Bezirk Tamsweg (S) von 6 Imkereien berichtet, einem Bezirk der im Vorjahr auch schon eine Verlustrate unter der 10%-Marke verzeichnet hatte (Brodschneider & Karrer, 2018; Brodschneider et al., 2018b).

Den wichtigsten Teil der Winterverlusterhebungen bildet die Auswertung der Symptome der in Österreich verstorbenen Bienenvölker, über die wir anhand dieser Untersuchung detaillierte Informationen erhalten. Dadurch können die Ursachen für die Winterverluste, wenn auch nicht klar einer einzelnen Ursache zugeordnet, so zumindest doch eingegrenzt und näher erforscht werden. Der Symptomkatalog wurde dabei bewusst einfach gewählt, um den ImkerInnen eine eindeutige Zuordnung ohne Hilfsmittel wie Laboruntersuchungen zu erleichtern. Auch bei demselben Schadbild können noch immer unterschiedliche Gründe hinter dem Völkerverlust stecken. Außerdem gilt es zu berücksichtigen, dass zwischen dem Auftreten des Verlusts und der Symptombeschreibung durch ImkerInnen ein beträchtlicher Zeitraum liegen kann, in dem Spuren, wie tote Bienen vor dem Volk, verwischen und daher nicht mehr eindeutig zugeordnet werden können. Im Untersuchungsjahr 2018/19 war das häufigste Symptom der verlorenen Völker „keine oder nur wenige tote Bienen im oder vor dem Volk“. Dieses Symptom ist relativ unspezifisch, und kann unterschiedlichste Ursachen haben. Dieses Schadbild wurde auch als charakteristisch für CCD beschrieben und in den USA aber auch in Europa (Dainat et al., 2012a) in den letzten Jahren häufig beobachtet (VanEngelsdorp et al., 2009; Williams et al., 2010; Steinhauer et al., 2014). Auch in Österreich wird dieses Schadbild Jahr für Jahr am häufigsten berichtet (Brodschneider et al., 2018b).

Eines der wenigen relativ eindeutig einer Ursache zuordenbaren Symptome ist das Vorhandensein von toten Bienen, die mit dem Kopf voran in Zellen stecken. Bei gleichzeitigem Mangel an Futter im Volk kann dieses Schadbild relativ sicher als Verhungern gedeutet werden. Dabei gilt es zwei unterschiedliche Formen zu unterscheiden: Zum einen der bereits erwähnte Futtermangel, zum anderen aber auch noch verbliebene Futterreserven, wobei die Bienen aus der Wintertraube durch widrige Umstände diese aber nicht erreicht haben. Dieser auch als Futterabriss bezeichnete Winterverlust trat 2018/19 häufiger auf als das Verhungern.

Unsere Untersuchung hat auch heuer wieder gezeigt, dass Betriebe mit wenigen (1-20) Bienenvölkern die höchste Winterverlustrate verzeichnen. Der Faktor Betriebsgröße ist dabei als Sammelfaktor zu verstehen, der unterschiedlichste, im Detail nicht näher abgefragte, Parameter wie Professionalität, Erfahrung in der Imkerei etc. beinhaltet. Wir konnten signifikante Unterschiede zwischen Imkereien, die ein bis 20 Völker und Imkereien, die 21 bis 50 Völker betreuten, verzeichnen, es waren vor allem Betriebe mit weniger als 20 Völkern von erhöhten Winterverlusten betroffen. Dieses Ergebnis, als auch jene Resultate, die wir während der Projektlaufzeit von „Zukunft Biene“ (Brodschneider et al., 2018b) gefunden haben, werden durch internationale Untersuchungen, die mehrere europäische Länder umfassen, bestätigt (van der Zee et al., 2014;

Brodtschneider et al., 2016; Brodtschneider et al., 2018a). Auch in den USA sind in bestimmten, aber nicht allen Untersuchungsjahren bei steigender Betriebsgröße geringere Winterverluste festgestellt worden. Die an der Untersuchung teilnehmenden ImkerInnen wurden dort anhand der Anzahl ihrer Völker in drei Kategorien eingeteilt: „backyard beekeepers“ (<50 Völker), „sideline beekeepers“ (51-500 Völker) und „commercial beekeepers“ (>500 Völker). Als Ursache für die Unterschiede in den Verlusten werden mehrere Faktoren diskutiert. Es wird zum Beispiel ein Einfluss der Betriebsgröße auf die Betreuungsqualität der Völker angenommen: „Commercial beekeepers“ zeigen oft mehr technisches Wissen in der Krankheits- und Schädlingsbekämpfung – insbesondere bei der Bekämpfung der Varroamilbe – als „backyard beekeepers“, welche die Bienenhaltung nicht gewerbsmäßig betreiben (Lee et al., 2015). Auch die Wahl der Methode und die Qualität der verwendeten Bekämpfungsmaßnahmen könnte in Abhängigkeit von der Betriebsgröße eine andere sein (Underwood et al., 2019; Thoms et al., 2018). Diese Argumente lassen sich möglicherweise eingeschränkt auch auf die österreichischen Imkereien übertragen, auch wenn hier Betriebe mit über 500 Völkern die Ausnahme bilden.

Wir konnten im Untersuchungsjahr 2018/19 erstmals im Vergleich zu den Vorjahren einen Unterschied in den Verlusten von Wander- und Standimkereien feststellen. Demnach erlitten Wanderimkereien, welche ihre Bienenvölker zu Trachtquellen transportieren, signifikant weniger Verluste als Standimkereien. Der Transport von Bienenvölkern kann einerseits zwar Stress für die Bienen bedeuten, ermöglicht andererseits aber eine verbesserte Nahrungsversorgung, wodurch dieses Ergebnis erklärt werden könnte.

Wie in den Vorjahren wurden signifikant höhere Winterverluste bei Vorhandensein der Trachtpflanze Mais berichtet. Als Ursachen dafür werden der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln und einseitige Ernährung (Brodtschneider & Crailsheim, 2013) diskutiert. Höcherl et al. (2011) konnten zeigen, dass im Pollen von Maispflanzen zwar nur sehr geringe Mengen Histidin vorhanden sind, jedoch alle anderen essentiellen Aminosäuren in größerer Menge als in gemischten Pollen vorkommen. Dennoch hatten in dieser Studie Bienen, die mit einer ausschließlichen Mais-Pollen Diät gefüttert wurden, eine auffällig niedrigere Lebenserwartung als Bienen, die mit einem Pollengemisch gefüttert wurden. Rundlöf et al. (2015) zeigen in ihrer Studie aus Schweden negative Effekte von mit Pestiziden behandelten Kulturen auf Wildbienen (solitäre Bienen, Hummeln), die Untersuchung konnte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Überwinterung von Honigbienenvölkern nachweisen. Ein solcher Beweis wurde von Woodcock et al. (2017) in einer groß angelegten Feldstudie teilweise erbracht. Als weitere Ursache für hohe Winterverluste im Zusammenhang mit Trachtpflanzen wird eine einseitige Ernährung durch mangelndes Trachtangebot, welches durch Monokulturen zustande kommt, angenommen (Brodtschneider & Crailsheim, 2013). Aus epidemiologischer Sicht können wir also einen signifikanten Zusammenhang mit bestimmten vorhandenen Trachtquellen festhalten, wobei diese Trachtquellen auch stellvertretend für andere (nicht abgefragte oder bisher unbekante) abträgliche Standortverhältnisse stehen können. Es können keine kausalen Gründe für die erhöhten Verluste beim Vorhandensein bestimmter Trachtpflanzen genannt werden, diese Trachtpflanzen können aber als Indikator von für Bienenvölker nicht idealen Standorten gesehen werden, wie auch in der Untersuchung zum Einfluss der Landnutzung auf die Wintersterblichkeit des Vorläuferprojekts diskutiert wird (Kuchling et al., 2018). 2018 haben wir, in Anlehnung an COLOSS, neue Trachten in den Katalog aufgenommen, die zwar immer wieder als Einflussfaktoren diskutiert werden, die aber noch nicht empirisch untersucht wurden. Dazu zählen die Waldtracht, Waldtracht mit Melezitose (sogenannter Zementhonig) und spätblühende Zwischenfrüchte (zum Beispiel Ölrettich, Phacelia und Senf). Im untersuchten Winter konnte keine dieser Trachten als signifikanter Risikofaktor identifiziert werden, da aber zum Beispiel Melezitose

von den Witterungsbedingungen abhängig ist, werden wir diese Fragestellungen in den nächsten Jahren beibehalten.

Für die Seehöhe konnte im Winter 2018/19, nachdem im Vorjahr erstmals kein statistisch signifikanter Einfluss festgestellt werden konnte, wieder ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen dem Überwinterungserfolg von Bienenvölkern und der Seehöhe des Bienenstandes nachgewiesen werden. Bienenstände die über 600m Seehöhe liegen haben signifikant weniger Winterverluste als Betriebe welche auf einer Höhe von 201m bis 600m liegen. Mögliche Gründe für diese Unterschiede können klimatische Unterschiede, aber auch unterschiedliche Landnutzung sein. Die Seehöhe hat Auswirkungen auf das Klima, was sich einerseits in Vegetationsunterschieden, und andererseits in höheren Lagen zu verspätetem Brutbeginn und früherer Brutfreiheit bemerkbar macht. Dadurch verkürzt sich die Zeitspanne, in der sich die Varroamilbe in der Brut vermehren kann.

Bei den Untersuchungen bezüglich Wabenhygiene konnte festgestellt werden, dass jene Imkereien die 1 bis 30% ihrer Waben austauschen eine signifikant höhere Verlustrate verzeichneten als Imkereien, die über die Wabenhygiene in ihren Bienenvölkern keine Angaben machten. Generell können Ansammlungen von Pestizidrückständen, wie auch von Krankheitserregern im Wachs, die Überlebensrate von Bienenvölkern vermindern. Eine vollständige Rückstandsfreiheit des neuen Wabenmaterials kann in unserer Untersuchung mangels Überprüfung allerdings nicht als gegeben angenommen werden.

Seit 2016/17 wird auf Wunsch der ImkerInnen auch der Einfluss der verschiedenen Betriebsweisen (zum Beispiel, Bio-Imkerei, kleine Brutzellen, Beutenisolierung) auf die Winterverlustrate getestet. In Winter 2018/19 verzeichneten Imkereien, die Wachs zukaufen, signifikant höhere Verlustraten als Imkereien, die kein Wachs zukaufen, sondern einen eigenen Wachskreislauf realisierten. Die Durchführung eines eigenen Wachskreislaufes kann für Professionalität des Imkereibetriebes sprechen. Zusätzlich ermöglicht das Verfahren aber auch eine bessere Kontrolle über Inhaltsstoffe des Wachses wie zum Beispiel Pestizidrückstände, welche in eingelagerte Pollen gelangen können und so wiederum einen negativen Einfluss auf die Wintersterblichkeit des Bienenvolkes haben können (Calatayud-Vernich et al., 2018; Payne et al., 2019). Berry et al. (2001) konnten zeigen, dass auch das Alter der Waben Einfluss auf das Wachstum und die Überlebensrate eines Bienenvolkes haben kann: Völker mit neuen Waben produzierten im Durchschnitt größere Bereiche mit Brut, größere Bereiche mit eingedeckelter Brut sowie Jungbienen mit höherem Individualgewicht. Die Überlebensrate der Brut war in diesen Versuchen allerdings in Völkern mit älteren Waben signifikant höher, was an der Regulation des Mikroklimas in der Zelle liegen könnte. Koenig et al. (1986) zeigten in ihrer Arbeit den Einfluss von verschiedenen Brutwabentypen auf das Vorkommen von Kalkbrut in Honigbienenvölkern, wobei hier alte Brutwaben die Entwicklung von Kalkbrut im Volk fördern.

Im Kampf gegen hohe Winterverluste spielt die Behandlung der Völker gegen die Varroamilbe eine wichtige, wenn nicht sogar die zentrale Rolle. Der Parasit hat einen großen Einfluss auf den Überwinterungserfolg von Bienenvölkern (Dahle, 2010), insbesondere auch dadurch, dass die Milbe als Vektor für andere Pathogene, wie Viren, dient (Rosenkranz et al., 2010). Deshalb waren nicht nur die Erhebungen über die verschiedenen Behandlungsmethoden, sondern auch über die Häufigkeit und den Zeitpunkt der Behandlungen wichtiger Bestandteil unserer Untersuchungen.

Im aktuellen Untersuchungsjahr haben 92,5% aller ImkerInnen in Österreich eine Bestimmung des Varroa-Befalls durchgeführt. Vergleicht man diese Betriebe mit jenen, die eine solche Bestimmung nicht durchgeführt haben, lässt sich sagen, dass erstere eine signifikant niedrigere Verlustrate verzeichnen, wobei der Bestimmungszeitraum (ob in ein bis 3 oder in mehr als 3 Monaten der

Varroa-Befall bestimmt wurde) an sich keine Unterschiede mit sich bringt. Erklären lässt sich dies möglicherweise dadurch, dass ImkerInnen die über den Varroa-Befall ihrer Bienen Bescheid wissen einerseits besser über den Gesundheitszustand ihrer Völker informiert sind, aber auch dementsprechend besser auf den Befall reagieren können.

Die Mehrheit der ImkerInnen in Österreich bestimmten den Varroa-Befall im Untersuchungsjahr 2018/19 in den Monaten Juli bis September. Bei einer Analyse der Zeitpunkte wann die Bestimmung des Varroa-Befalls durchgeführt wurde, konnte jedoch herausgefunden werden, dass die Winterverlustrate der Bienenvölker von ImkerInnen, die den Befall in den Monaten April und Mai des Einwinterungsjahres, sowie März und April des Auswinterungsjahres, bestimmten, signifikant niedriger war. Die Bestimmung in den Monaten März und April ist hier wenig relevant, da diese bereits nach der Auswinterung der Bienenvölker stattfand. Der positive Einfluss der frühen Bestimmung in den Monaten April und Mai des Einwinterungsjahres könnte allerdings ein Hinweis auf eine gute Betreuung der Bienenvölker durch den Imkereibetrieb sein und die möglicherweise damit einhergehende frühere Reaktion der ImkerInnen auf die Milbe.

Der vorherrschenden Lehrmeinung (Moosbeckhofer et al., 2015) folgend wenden 73,0% aller österreichischen Imkereien sowohl Ameisensäure als auch Oxalsäure zur Bekämpfung der Varroamilbe an. Die Nichtanwendung sowohl der einen als auch der anderen Säure führte jedoch zu keinen signifikant unterschiedlichen Überwinterungsergebnissen. Wir schließen daher, dass auch die angewandten Alternativen (zum Beispiel Thymolprodukte anstelle der Ameisensäure) fachgerecht angewandt ähnlich gut zur erfolgreichen Überwinterung verwendet werden können. Betriebsweisen, die auf Ameisensäure verzichten und zum Beispiel mit biotechnischen Methoden und Oxalsäure die Hauptentmilbung durchführen, erleiden keine signifikant höheren Winterverluste. In zwei vergangenen Wintern mit sehr hohen Winterverlusten erwiesen sich solche biotechnischen Methoden sogar als besser (Brodschneider et al., 2018b).

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass sich eine Drohnenbrutentnahme im April positiv auf den Überwinterungserfolg auswirkt (Brodschneider & Crailsheim, 2013). In der aktuellen Untersuchung konnte dies zwar nicht bestätigt werden, jedoch hatte diesmal die Drohnenbrutentnahme im Monat Mai einen positiven Einfluss auf den Überwinterungserfolg. Verglichen mit Imkereien, die in den Monaten April, Juni und Juli keine Drohnenbrut entfernt haben, hatte die Entnahme der Drohnenbrut in diesen Monaten keine statistisch signifikant geringere Verlustrate im Winter 2018/19 zur Folge. Hier ist auch anzumerken, dass eine einmalig durchgeführte Drohnenbrutentnahme den Anstieg der Varroa-Population nicht so konsequent verringert, wie eine mehrmals durchgeführte (Calderone, 2005).

An dieser Stelle sei auf die oftmalige Verwendung mehrerer unterschiedlicher Bekämpfungsmaßnahmen in Kombination hingewiesen. Es war nicht das Ziel dieser Untersuchung, den Überwinterungserfolg von Betrieben mit einer ausschließlichen Varroabekämpfungsstrategie mit Betrieben die ausschließlich eine andere Strategie verfolgen zu vergleichen. Vielmehr haben wir die in Österreich tatsächlich angewandten Strategien dargestellt und diese auf die daraus erfolgte Überwinterung hin untersucht.

Für den Winter 2018/19 lässt sich sagen, dass die Anwendung von biotechnischen Methoden (Hyperthermie und Drohnenbrutentnahme ausgenommen), wie die Verwendung von Fangwaben oder Bannwaben oder die komplette Arbeiterinnenbrutentnahme, zu einer signifikant niedrigeren Verlustrate geführt hat. Dabei ist zu berücksichtigen, dass auch diese Methoden zumeist in Kombination mit anderen Bekämpfungsmaßnahmen angewendet werden. Auch Lodesani et al. (2019) konnten in einer Feldstudie einen positiven Effekt von früh angewendeten biotechnischen Methoden auf Varroabefallene Völker nachweisen. Ansonsten lässt sich für den Winter 2018/19

zusammenfassen, dass keine besonders erfolgreiche oder erfolglose Strategie in der Varroabekämpfung identifiziert werden konnte.

Unsere Untersuchung hat gezeigt, dass ein Großteil der teilnehmenden ImkerInnen eine Form der Oxalsäurebehandlung im Winter zur sogenannten Restentmilbung eingesetzt haben. Dabei kann die Oxalsäure verdampft, geträufelt, gesprüht oder als Fertigmischung (Hive-clean/Bienenwohl/Varromed) eingesetzt werden. Die Art und Weise der Winterbehandlung mit Oxalsäure hatte keinen Einfluss auf die Bienensterblichkeit im aktuellen Winter. Wir haben des Weiteren untersucht, ob der Zeitpunkt der Anwendung von Bedeutung ist. Dafür wurden die Monate November, Dezember und Jänner zur Analyse herangezogen (unabhängig von der restlichen Anwendungshäufigkeit im Untersuchungszeitraum), wobei die Methode am häufigsten im Dezember eingesetzt wird. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Oxalsäurebehandlung fast flächendeckend stattfand und dadurch fast immer eine solche Behandlung angewandt wurde. Es gibt also keine verlässliche Kontrollgruppe von Imkereien, die nicht mit Oxalsäure arbeitet. Das unterstreicht die Bedeutung der Oxalsäure und die Alternativlosigkeit in der Winterbehandlung. Außerdem wirken Behandlungen mit Oxalsäure auf die an Bienen ansitzenden Varroamilben, und damit ausschließlich bei Brutfreiheit der Völker (Rosenkranz et al., 2010). Über das tatsächliche Vorherrschen von Brutfreiheit bei Anwendung der Oxalsäure kann im Rahmen dieser Untersuchung keine Aussage getroffen werden. Die Behandlung mit Oxalsäure zielt dabei auf eine Reduktion der Milbenpopulation für das Folgejahr ab.

Ein weiterer wichtiger Faktor im Überleben von Bienenvölkern ist die Vitalität der Königin. Eine internationale Untersuchung von van der Zee et al. (2014) dazu ergab, dass Imkereien, die angaben, mehr Königinnen-Probleme als im Vorjahr beobachtet zu haben, auch höhere Winterverluste hatten. Wir konnten keinen solchen Zusammenhang mit der Frage nach Königinnen-Problemen beobachten – die Winterverluste der vier Gruppen „Häufiger“, „Normal“, „Seltener“ und „Weiß nicht“ unterscheiden sich nicht signifikant. Die Beurteilung der Königinnen durch die ImkerInnen fiel mit nur 6,2% Angaben „häufiger“ auftretender Königinnenprobleme, auch im Vergleich der letzten Jahre, gut aus.

Zudem stellten sowohl van der Zee et al. (2014) als auch Genersch et al. (2010) fest, dass junge Königinnen, das bedeutet im Vorjahr begattete Königinnen, einen positiven Einfluss auf die Überlebenschancen der Völker haben. Im Vergleich zu Völkern mit einer älteren Königin haben Völker mit einer jungen Königin signifikant höhere Chancen den Winter zu überleben. Auch wir konnten dieses Ergebnis heuer bestätigen: die Winterverluste nahmen mit zunehmendem Prozentsatz junger Königinnen pro Imkerei signifikant niedriger ab. Als Grund wird unter anderem die größere Menge an Brut angenommen. Genauere Ursachen für den gesteigerten Überwinterungserfolg konnten jedoch noch nicht gefunden werden (Genersch et al., 2010). Eine weitere Ursache für einen verminderten Überwinterungserfolg von Völkern mit einer älteren Königin könnte in der gesundheitlichen Beeinträchtigung dieser Königin aufgrund von Neonicotinoiden liegen (Williams et al., 2015).

Bienenviren stehen im Fokus des Projektes „Zukunft Biene 2“. Wir haben deshalb nach einem Prädiktor gefragt, der mit dem Flügeldeformationsvirus in Zusammenhang steht (siehe Modul A). Hierfür wurde das Auftreten von Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln abgefragt, wobei die Optionen „Häufig“, „Wenig“, „Überhaupt nicht“ und „Weiß nicht“ zur Auswahl standen. 32 Imkereien haben angegeben, solche verkrüppelten Flügel während der Bienen Saison 2018 „Häufig“ beobachtet zu haben. Diese Betriebe hatten auch eine signifikant höhere Verlustrate an Bienenvölkern als alle anderen Gruppen. Das bedeutet, dass ein vermehrtes Vorkommen von

Arbeitsbienen mit verkrüppelten Flügeln als Alarmsignal für hohe Winterverluste betrachtet werden kann.

Wie auch im Vorjahr haben wir aus den Winterverlusten und dem Völkerstand im Frühjahr davor eine hypothetische Populationsdynamik der Bienenvölker vom Frühjahr 2013 bis zum Frühjahr 2019 modelliert (siehe Abschnitt 1.4.3.1.1., Abbildung 1.6). Dabei zeigt sich, dass eine Vermehrung über den Sommer, etwa durch eigene Nachschaffung oder Zukäufe, eine konstante, sogar steigende, Bienenpopulation in Österreich erlaubt. In Jahren mit geringen Völkerverlusten, wie etwa im Winter 2015/16, aber auch im hier vorliegenden Untersuchungswinter 2018/19, sind die ImkerInnen in der Lage, diese Verluste im Sommer auszugleichen und eine größere Anzahl an Bienenvölkern im folgenden Herbst einzuwintern. Unser Modell ist aber nur begrenzt gültig – je nach Höhe der Winterverluste sind von den ImkerInnen dementsprechend Zeit und Geld zu investieren, um eine Population vergleichbar mit dem Vorjahr aufzubauen beziehungsweise zu erhalten. Die Arbeit und Kosten für die Nachschaffung werden dabei vorwiegend von Kleinimkereien, welche den Großteil der Bienenpopulation in Österreich betreuen, getragen. Ökonomische Abschätzungen dieser Leistungen zum Erhalt einer starken Bienenpopulation sollten für eine nachhaltige Entwicklung des Imkereisektors berücksichtigt werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass hohe Winterverluste von Bienenvölkern, wie Sie 2014/15 aufgetreten sind, zumindest in einem bestimmten Ausmaß durch eine zeitgemäße Bekämpfung der Varroamilbe, wie zum Beispiel mit Hilfe biotechnischer Methoden, reduziert werden können. Im Winter 2018/19 konnte mit 15,2% eine Winterverlustrate erfasst werden die im mittleren Bereich liegt. Es konnten bereits bekannte negative Effekte, wie im Vergleich zum Vorjahr häufiger auftretende Königinnenprobleme während der Saison und geringere Betriebsgrößen als auch neue Effekte, wie zum Beispiel der positive Einfluss der Wanderimkerei und der Bestimmung des Varroa-Befalls, nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten allerdings epidemiologisch auch andere Gründe für die hohen Verluste identifiziert werden, die jedoch außerhalb des direkten Einflussbereichs der Imkereien liegen. So konnten wir beispielsweise signifikante Einflüsse der Seehöhe des Bienenstands und der von Bienen laut ImkerInnen genutzten Trachtpflanzen nachweisen.

Weiterhin nicht vollständig geklärt bleibt die Frage, warum in manchen Jahren sehr viele und in anderen Jahren sehr wenige Bienenvölker den Winter nicht überleben. In Ansätzen scheinen Betriebsweisen-unabhängige Faktoren wie das Wetter (Switanek et al., 2017) oder, eingeschränkt, weil weniger stark schwankend, die Landnutzung (Kuchling et al., 2018) für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Die Belastung der Bienenvölker variiert von Jahr zu Jahr, und in manchen Jahren ist es schwieriger, die Völker erfolgreich zu überwintern als in anderen Jahren. Gerade aus Wintern mit hohen Verlusten können wir wissenschaftlich belegte Empfehlungen über Anpassungen der Betriebsweisen (inklusive Varroa-Bekämpfungsstrategien) ablesen, wohingegen uns ein Winter mit geringen Verlusten wenig Gelegenheit bietet, die Spreu vom Weizen der Betriebsweisen zu trennen. Ein weiteres Argument bei der Interpretation stark schwankender Verlusten ist der mögliche Einfluss von betrieblich bis überregional auftretenden Mehrjahresdynamiken, der noch weiterer Untersuchungen bedarf.

(A) Virenmonitoring

2.1 Zusammenfassung des Virenmonitorings 2018

Im Modul A wird ein österreichweites Monitoring von Bienenviren durchgeführt. Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden, das keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der Bienenviren in Österreich erlaubt. Daher wird die Prävalenz von acht Bienenviren auf Bienenstandniveau über drei Jahre erhoben. Diese Viren umfassen das Akute Bienenparalyse-Virus (ABPV), das Schwarze Königinnenzellen-Virus (BQCV), das Chronische Bienenparalyse-Virus (CBPV), das Flügeldeformationsvirus (getrennt in Typ A (DWV-A) und Typ B (DWV-B)), das Israelische Akute Paralyse-Virus (IAPV), das Kashmir-Bienenvirus (KBV) und das Sackbrutvirus (SBV).

Mit dem 2. Zwischenbericht liegen nun die Ergebnisse für die erste Probenahme im Herbst 2018 vor, an der 198 ImkerInnen aus ganz Österreich teilnahmen. In den Bienenproben wurden sechs der acht untersuchten Viren gefunden, die Viren IAPV und KBV wurden in keiner Probe nachgewiesen. Die beiden am häufigsten nachgewiesenen Viren, BQCV und DWV-B, waren in fast allen Bienenproben nachweisbar. BQCV war in 191 der 198 Proben (Prävalenz: 96%; Konfidenzintervall: 93-98%) und DWV-B in 181 der Proben nachweisbar (91%; Konfidenzintervall: 87-95%). ABPV und SBV wurden in etwa der Hälfte der untersuchten Proben gefunden. ABPV war in 106 Proben (54%; Konfidenzintervall: 47-60%) und SBV in 123 Proben nachweisbar (62%; Konfidenzintervall: 55-69%). CBPV und DWV Typ A (DWV-A) wurden selten nachgewiesen: CBPV in 17 Proben (9%; Konfidenzintervall: 5-13%) und DWV-A in 2 Proben (1%; Konfidenzintervall: 0-3%).

Der Virustiter der positiven Proben variierte bei allen nachgewiesenen Viren um mehrere Zehnerpotenzen. Der minimal gemessene Titer lag zwischen 10^4 und 10^5 RNA-Kopien/ml Homogenat, der maximal gemessene Wert zwischen 10^9 und 10^{12} RNA-Kopien/ml Homogenat. Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median zwischen 10^5 und 10^6 RNA-Kopien/ml Homogenat). Bei CBPV und DWV-B wurden höhere Virustiter gemessen (Median zwischen 10^6 und 10^7 RNA-Kopien/ml Homogenat). DWV-A wurde nur in zwei Proben gemessen (Werte: 2×10^4 ; 4×10^8 RNA-Kopien/ml Homogenat).

Auswertungen der Faktoren Bundeslandzugehörigkeit, Seehöhe und Virussyptomatik im Volk zeigten signifikante Zusammenhänge. Dabei traten vier Viren (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV) vermehrt in den östlichen Bundesländern auf und selten in den Bundesländern Tirol und Kärnten. Dies scheint vor allem mit der unterschiedlichen Seehöhe der Bundesländer zusammenzuhängen, da BQCV, DWV-B und SBV in höheren Lagen signifikant seltener auftraten als in niederen Lagen. Es gab einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Bienen mit verkrüppelten Flügeln und einem erhöhten DWV-B Titer in den Proben. Das CBPV-assoziierte Symptom schwarz-glänzende Bienen trat signifikant häufiger auf Ständen auf, in deren Proben CBPV gefunden wurde.

Die Daten der nächsten zwei Versuchsjahre werden es erlauben, Aussagen über die Varianz der Virusprävalenz zwischen verschiedenen Jahren zu machen. Außerdem wird durch die mehrjährigen Untersuchungen die Menge verfügbarer Daten erhöht, was die Aussagekraft bezüglich möglicher Zusammenhänge zwischen Virustiter und Winterverlusten bzw. Virussyptomatik erhöhen kann.

2.2 Einleitung

Bienenviren gelten gemeinsam mit der Varroamilbe (*Varroa destructor*) als wichtige Faktoren für das Absterben von Bienenvölkern über den Winter (= Winterverluste; Carreck et al., 2010; Genersch et al., 2010; Dainat et al., 2012b). Vor allem die Viren ABPV (Akute Bienenparalyse-Virus), DWV (Flügeldeformationsvirus) und IAPV (Israelisches Akute Paralyse-Virus) stehen im Verdacht, Winterverluste zu verursachen (Cox-Foster et al., 2007; Berthoud et al., 2010; Genersch et al., 2010). Schwere Infektionen mit ABPV oder DWV gehen meist mit einem schweren Befall mit der Varroamilbe einher. Diese fungiert als Vektor und überträgt die Viren auf Bienen und Bienenbrut (Bowen-Walker et al., 1999; Chen et al., 2004). Dadurch werden die Bienen doppelt geschädigt; sowohl direkt durch die Saugtätigkeit und den Nährstoffentzug durch die Milbe und ihre Nachkommen als auch durch die Funktion als Virusvektor (Amdam et al., 2004; Highfield et al., 2009). Auch während des Jahres können Virusinfektionen zu Ausfällen und Schwächungen von Bienenvölkern führen. In diesem Zusammenhang sind vor allem CBPV (Chronische Bienenparalyse-Virus), BQCV (Schwarzes Königinnenzellen-Virus) oder SBV (Sackbrutvirus) zu nennen (Chen & Siede, 2007; Ribière et al., 2010; Roy et al., 2015).

Zahlreiche internationale Studien zeigen, dass es bezüglich der Prävalenz von Bienenviren zwischen den Regionen und den Erhebungsjahren beträchtliche Unterschiede gibt (Tentcheva et al., 2004; Genersch et al., 2010; Traynor et al., 2016). Es sind daher entsprechende eigene Untersuchungen erforderlich, um Informationen zur Situation in Österreich zu erhalten.

Trotz der Bedeutung der Bienenviren für die Bienengesundheit ist über das Vorkommen von Viren in Österreichs Bienenvölkern bisher nur begrenztes Wissen vorhanden. Dieses stammt aus Vorläuferprojekten; meist von Bienen- und Brutproben aus abgestorbenen, kranken und zusammenbrechenden Völkern und von Völkern mit Vergiftungssymptomen (Berényi et al., 2006; Köglberger et al., 2009; Girsch & Moosbeckhofer, 2012; Moosbeckhofer & Mayr, 2014). In toten, geschwächten und erkrankten Völkern ist jedoch mit einem anderen Virenspektrum zu rechnen als in gesunden Völkern (Amiri et al., 2015; Morawetz et al., 2018). Die Ergebnisse der Vorprojekte erlauben somit keine gesicherten Aussagen zur generellen Prävalenz der untersuchten Bienenviren in Österreich. Auch kann mit den vorhandenen Daten nicht unterschieden werden, welche Viren allgemein häufig in Bienenvölkern auftreten und welche tendenziell bei Völkern mit Problemen zu finden sind.

Im vorliegenden Projekt wird daher die Prävalenz von sieben Bienenviren in Österreich über mehrere Jahre erhoben (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV [Kashmir-Bienenvirus], SBV). Vom DWV-Virus wurden in den letzten Jahren mehrere Typen beschrieben (Martin et al., 2012, Mordecai et al., 2016). Im vorliegenden Projekt werden bei DWV die zwei Typen A und B unterschieden (Martin et al., 2012). DWV Typ B wird in der Literatur auch als *Varroa destructor virus-1* (= VDV-1) bezeichnet. Daher werden im Projekt de facto acht Bienenviren erfasst und wird im weiteren Bericht auf acht Bienenviren Bezug genommen.

Alle acht Viren wurden bereits in österreichischen Bienenvölkern nachgewiesen (Berényi et al., 2006; Girsch & Moosbeckhofer, 2012; Köglberger et al., 2009; Morawetz et al., 2018), wobei IAPV und KBV nur in wenigen Einzelvölkern nachgewiesen wurden (Girsch & Moosbeckhofer, 2012).

Primäres Ziel des Virenmonitorings im Projekt „Zukunft Biene 2“ ist die Klärung folgender Fragen bezüglich der Virenprävalenz:

- Wie hoch ist die Prävalenz der acht genannten Bienenviren in Österreich?
- Gibt es Schwankungen in der Virusprävalenz zwischen den drei Untersuchungsjahren?

Das sekundäre Ziel ist es, den möglichen Einfluss der in den Bienenvölkern nachgewiesenen Viren in Bezug auf Winterverluste zu untersuchen. Dabei können mit dem zu erwartenden Datensatz folgende Fragen behandelt werden:

- Gibt es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von einzelnen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten bei den Probenvölkern/dem beprobten Bienenstand im darauffolgenden Winter?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Höhe des Virustiters der unterschiedlichen Bienenviren vor der Einwinterung und den Winterverlusten bei den Probenvölkern/dem beprobten Bienenstand im darauffolgenden Winter?

Die zu erwartenden Gesamtergebnisse werden es möglich machen abzuschätzen, welche der untersuchten Bienenviren für die Bienengesundheit – und damit für den Bienenbestand und die Imkereiwirtschaft in Österreich – von hoher Relevanz sind. Gleichzeitig werden Viren und deren kritische Titerwerte identifiziert, die im Untersuchungszeitraum einen negativen Einfluss auf die Überwinterung der Bienenvölker haben.

2.3 Material und Methode

2.3.1 Zeitablauf

Im Modul A – „Virenmonitoring“ wird im September die Prävalenz von acht Bienenviren in drei aufeinander folgenden Jahren erhoben (2018-2020). Der September wurde als Beprobungsmonat gewählt, weil die meisten Viren zu diesem Zeitpunkt die höchste Prävalenz aufweisen (De Miranda et al., 2013). Die dreijährige Laufzeit erlaubt es, die Prävalenz der Viren zwischen den Jahren zu vergleichen.

Vor Beginn des ersten Versuchsjahres wurden interessierte Imkerinnen und Imker für eine Teilnahme gewonnen (Februar - Mai 2018, Kapitel 2.3.2). Aus diesen wurden mittels einer stratifizierten Zufallsauswahl die 200 Teilnehmerinnen und Teilnehmer für die Studie ausgesucht und ihre Teilnahme fixiert (Abbildung 2.1, Kapitel 2.3.3). Es ist geplant, dass diese über den gesamten Zeitraum an dem Projekt teilnehmen. Eventuelle Ausfälle werden im Frühsommer des jeweiligen Jahres durch Interessentinnen und Interessenten von der Warteliste ersetzt.

Das Virenmonitoring läuft in allen drei Jahren ident ab (Abbildung 2.1). Ende August werden die Materialien zur Durchführung der Probenahme von der Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz (BIEN) an die Teilnehmerinnen und Teilnehmer verschickt. In den ersten Septemberwochen führen die Teilnehmerinnen und Teilnehmer die Probenahme gemäß der beigelegten Arbeitsanleitung durch (siehe Kapitel 2.3.4, Kapitel 2.6) und verschicken die Bienen danach lebend in Königinnenversandkäfigen an die Abteilung BIEN. Sofort nach Eintreffen werden die Proben bei -18°C tiefgekühlt und gelagert. Im weiteren Verlauf werden die Proben dann für die Virusanalytik vorbereitet.

Die Probenanalyse auf die acht zu untersuchenden Bienenviren wird an der AGES, Abteilung Molekularbiologie (MOBI) des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling (IVet-Mödling), mittels quantitativer real time RT-PCR im jeweils der Probenahme folgenden Winter durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.7). Die Teilnehmerinnen und Teilnehmer werden jedes Jahr voraussichtlich im auf die Probenahme folgenden Februar über die Ergebnisse der Virusanalyse informiert. Im darauffolgenden Frühling melden die teilnehmenden Imkerinnen und Imker die Überwinterungsergebnisse für die Probenvölker sowie für den gesamten beprobten Bienenstand an die Abteilung BIEN zurück. Diese Daten werden für die Prüfung möglicher statistischer

Zusammenhänge zwischen der Virusprävalenz / der Höhe der Virusbelastung (Virustiter) und Winterausfällen verwendet.

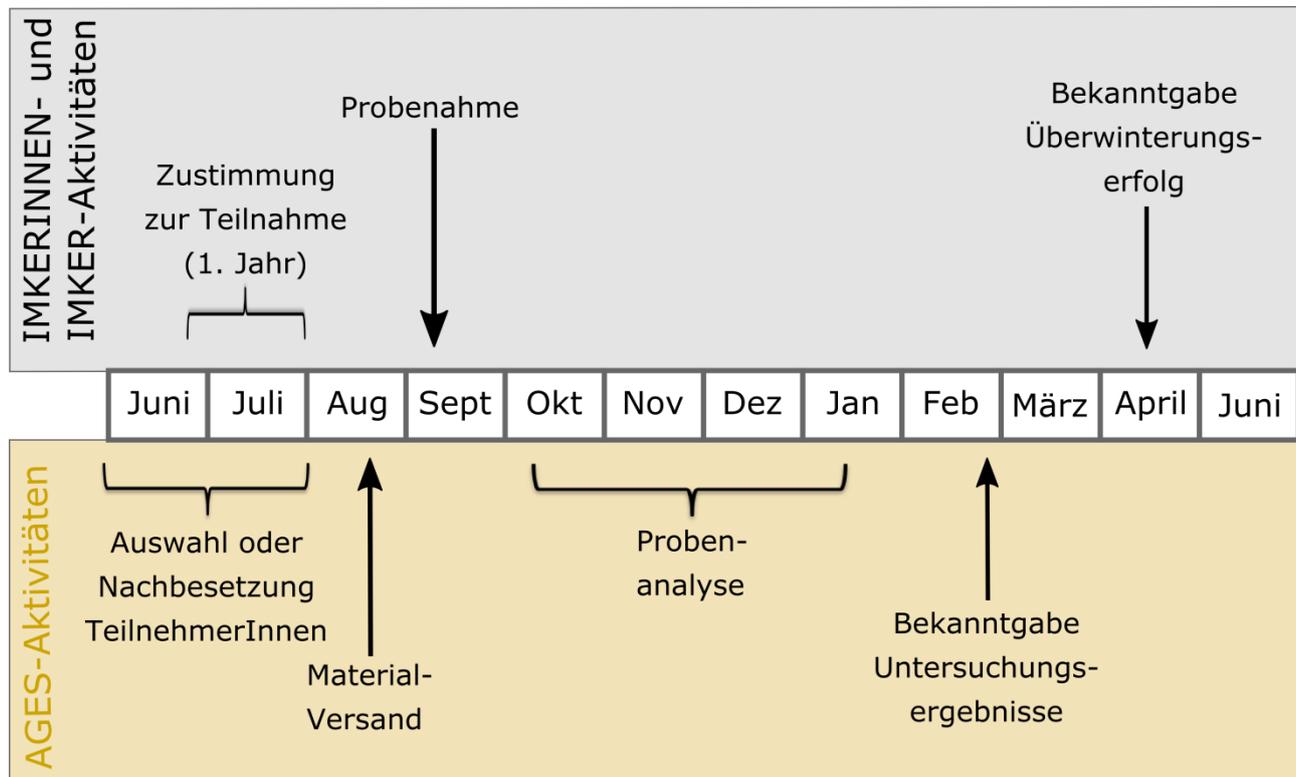


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf des Virenmonitorings pro Versuchsjahr.

2.3.2 Werbung und Auswahl der TeilnehmerInnen

Eine Stichprobe sollte repräsentativ für die Grundgesamtheit sein, damit ihre Ergebnisse deren Eigenschaften wahrheitsgemäß wiedergeben. Eine repräsentative Stichprobe lässt sich unter anderem dadurch erstellen, dass die Elemente der Stichprobe zufällig aus der Grundgesamtheit ausgewählt werden (van der Zee et al., 2013). Dies hieße im Falle des Virenmonitorings, dass die teilnehmenden Bienenstände zufällig aus einer Liste aller in Österreich vorhandenen Bienenstände gezogen werden. Ein solches Bienenstandregister liegt in Österreich seit dem Jahr 2017 im Rahmen des Veterinärinformationssystems (VIS) vor. Diese VIS-Aufzeichnungen dürfen jedoch ausschließlich zum Zwecke der Überwachung und Bekämpfung von Tierseuchen und der Überwachung der Lebensmittelsicherheit verwendet werden (TSG § 8 Abs. 6). Daher war es nicht möglich, diese Daten zur Auswahl der TeilnehmerInnen des Virenmonitorings heranzuziehen. Stattdessen wurde in der Imkerschaft für die Teilnahme am „Virenmonitoring“ geworben.



AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
about 3 months ago

Wir machen den #Viren-Check bei unseren #Bienen, "weil es uns wichtig ist, unsere Bienenvölker durch zielgerichtete Maßnahmen zu schützen und schonend einzugreifen" - 🐝 R. Rumpler, B., E. & H. Tobler, E. Wallner - Foto: ImkerInnengruppe aus NÖ - Bezirk Neunkirchen. ImkerInnen können sich noch bis 31. Mai zum kostenlosen Viren-Check anmelden <https://bit.ly/2joq0oY>



AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
about 3 months ago

Wir machen den #Viren-Check bei unseren #Bienen, "weil ich in der Zusammenarbeit mit Zukunft Biene immer Erstaunliches über meine Bienen erfahre und Neues lerne." - Ingeborg Hirsch, Imkerin aus Wien. 🐝 ImkerInnen können sich noch bis 31. Mai zum kostenlosen Viren-Check anmelden <https://bit.ly/2joq0oY>



AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
about 3 months ago

Wir machen den #Viren-Check bei unseren #Bienen. "Ich unterstütze gerne das Virenmonitoring weil mir gesunde Bienenvölker ein Anliegen sind" - Erich Landner, Imker aus der Steiermark, Bezirk Leoben. 🐝 ImkerInnen können sich noch bis 31. Mai zum kostenlosen Viren-Check anmelden <https://bit.ly/2joq0oY>

Abbildung 2.2: Beispiele der Werbung für das Virenmonitoring auf Facebook und Twitter.

Bei der Teilnehmerwerbung wurde eine Vielzahl an Informationskanälen verwendet, um eine möglichst breite Bandbreite an Imkerinnen und Imkern zu erreichen und einen systematischen Auswahlfehler zu vermeiden. Wir informierten die Imkerinnen und Imker über die Möglichkeit zur Teilnahme sowohl über die Verbandstrukturen (Werbung auf Jahreshauptversammlungen, Email-Aufruf an die Landesverbände, etc.) und die österreichische Imkerzeitschrift „Bienen aktuell“ als auch über alternative Kanäle wie den AGES Facebook- und Twitter-Account (Tabelle 2.1, Abbildung 2.2). Dabei wurden zur Verstärkung der Botschaft „Wir machen den Viren-Check“ auch Imker und Imkerinnen, die sich dazu bereit erklärt hatten, als aktive Vorbilder präsentiert.

Außerdem wurden Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus der Beobachtungsstudie und der COLOSS-Studie des Vorprojektes „Zukunft Biene“, die einer weiteren Kontaktaufnahme schriftlich zugestimmt hatten, gezielt angeschrieben. Die Anmeldung zur Teilnahme erfolgte sowohl über ein Online-Formular als auch per Papierformular, das in der Fachzeitschrift „Bienen aktuell“ abgedruckt war, sowie auf Imkerveranstaltungen ausgelegt wurde.

Tabelle 2.1: Maßnahmen zur TeilnehmerInnenwerbung für das Virenmonitoring im Zeitraum Februar bis Mai 2018

Art der Werbung	Datum	Maßnahme
Internet	Februar 2018	Aufruf auf „www.zukunft-biene.at“
	Februar 2018	Aufruf auf „www.imkerbund.at“
	Februar 2018	Aufruf auf „www.biene-oesterreich.at“
	Mai 2018	Facebook und Twitter Kampagne (6 Postings)
Artikel	März 2018	Artikel in „Bienen aktuell“
	Mai 2018	Erinnerung in „Bienen aktuell“
Vortrag/Werbung auf Imkertagungen	27. Jänner 2018	Jahreshauptversammlung des Imkervereins Oberes Feistritzal - Waldheimat
	17. Februar 2018	Jahreshauptversammlung des Wiener Landesverbandes für Bienenzucht
	24. Februar 2018	Österreichische Erwerbsimkertagung
	24. März 2018	Jahreshauptversammlung des NÖ Landesverbandes für Bienenzucht
	21. April 2018	Bundesversammlung des österreichischen Imkerbundes
	25. April 2018	Gesundheitsreferententagung
Individuelle Email-Aufrufe	März, April 2018	Email-Aufrufe an die Landesverbände mit der Bitte auf den Generalversammlungen für die Teilnahme zu werben (sofern nicht ohnehin ein Vortrag über das Projekt „Zukunft Biene 2“ auf der Versammlung stattfand)
	Februar 2018	Email-Aufrufe an 91 TeilnehmerInnen der Beobachtungsstudie von „Zukunft Biene“, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt hatten
	29. März 2018	Email-Aufrufe an ca. 1500 österreichische ImkerInnen der COLOSS-Studie, die einer weiteren Kontaktaufnahme zugestimmt hatten
	April, Mai 2018	Zweiter Email-Aufruf mit der Bitte um TeilnehmerInnen-Werbung an die Landesverbände der Bundesländer Kärnten, Salzburg, Oberösterreich, Vorarlberg aufgrund unterdurchschnittlicher Meldungsfrequenz in diesen Bundesländern

2.3.3 Stichprobengröße und Auswahl der TeilnehmerInnen

Als Stichprobengröße für das Virenmonitoring wurde die Anzahl von 200 Ständen gewählt. Bei einer Stichprobe dieser Höhe können wir davon ausgehen, dass die Prävalenz eines Virusaufkommens innerhalb eines 95%igen Konfidenzintervalls angegeben werden kann, das in etwa $\pm 7\%$ Schwankungsbreite besitzt (Abbildung 2.3). Dies heißt, dass Prävalenzunterschiede von 14% zwischen den Versuchsjahren bei einer Stichprobengröße von 200 als signifikant erkannt werden können. Um die Sensitivität des Monitorings derart zu senken um Prävalenzunterschiede zwischen den Versuchsjahren von 10% erkennen zu können (Schwankungsbreite $\pm 5\%$), müsste die Stichprobengröße auf fast das Doppelte erhöht werden (Abbildung 2.3) und wäre daher mit einem unverhältnismäßigen Aufwand an Kosten verbunden. Im vorliegenden Monitoring wird pro Stand eine Sammelprobe von fünf Völkern ausgewertet. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit eines positiven Virusnachweises, da nur eines von fünf Völkern infiziert sein muss, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Es ist daher zu erwarten, dass auf Standniveau tendenziell höhere Prävalenzen auftreten werden als dies bei der Auswertung von Einzelvölkern der Fall wäre.

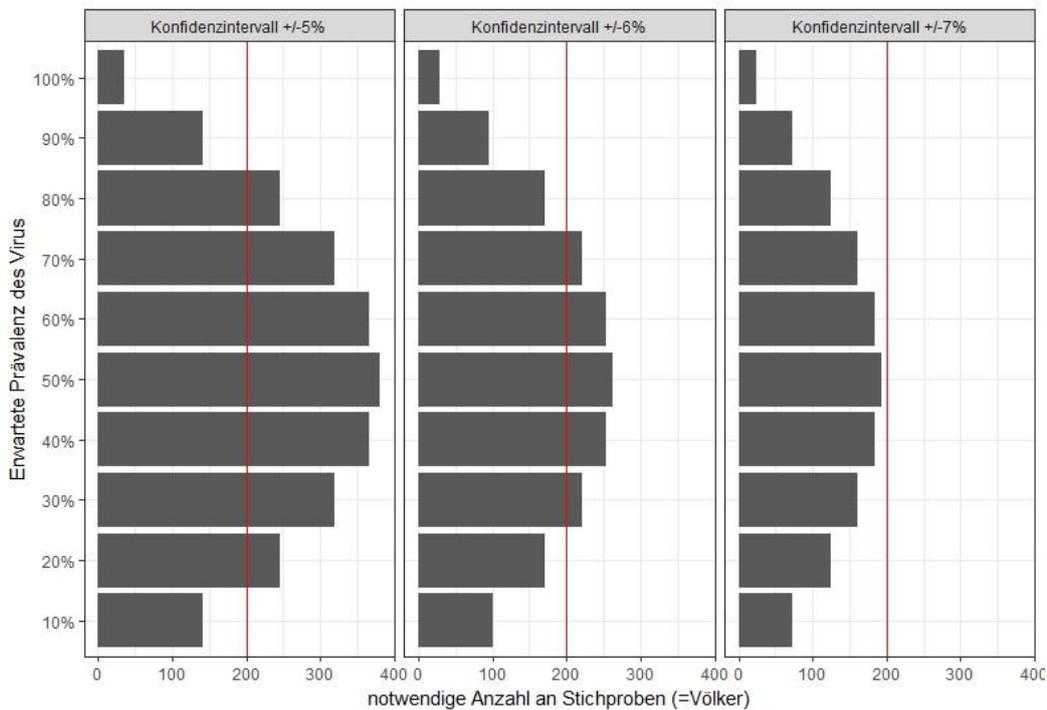


Abbildung 2.3: Berechnung der notwendigen Stichprobengröße, um bei einer binomialen Verteilung der unterschiedlichen zu erwartenden Prävalenzen ein 95%iges Konfidenzintervall von $\pm 5\%$, $\pm 6\%$ und $\pm 7\%$ zu erreichen. Basis der Berechnung ist das Wilson-Konfidenzintervall, Berechnung durchgeführt in R mit der Version 3.4.1 (R Development Core Team, 2017) mit dem package „binomSamSize“ (Höhle, 2017). Die gewählte Stichprobengröße von 200 Ständen ist als rote Linie eingezeichnet. Überschreitet der graue Balken die rote Linie, wäre eine höhere Anzahl an Stichproben als die gewählten 200 notwendig um die gewünschte Schwankungsbreite des Konfidenzintervalls zu erreichen (fast immer bei $\pm 5\%$, nie bei $\pm 7\%$).

Vor Durchführung der Auswahl wurde der Interessenten-Datensatz von Mehrfachmeldungen bereinigt (insgesamt 297 Interessenten meldeten 339 Standorte). Dies gewährleistete, dass Imkerinnen und Imker mit Einfachmeldungen eine gleich große Chance hatten ausgewählt zu werden, wie jene, die mit mehreren Standorten im Datensatz vertreten waren. Die Auswahl der Teilnehmer erfolgte nach einer stratifizierten Zufallsauswahl. Die Stratifizierung betraf die geografische Verteilung der ausgewählten Bienenstände über Österreich. Das heißt jedes Bundesland war anteilig in dem Ausmaß vertreten, der dem Anteil der im VIS gemeldeten Bienenstände des Bundeslandes an der Gesamtanzahl der österreichischen Bienenstände entsprach (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: VIS-Angaben zur Verteilung der Bienenstände und Imkereibetriebe über die österreichischen Bundesländer (Quelle: BMASGK, Stichtag: 31.10.2017) sowie Angaben zur Anzahl der Meldungen von Interessenten und Interessentinnen zur Teilnahme am Virenmonitoring 2018 und 2019 (Stichtag 12.08.2019), sowie die Anzahl der erhaltenen Proben im Monitoringjahr 2018. Für die Berechnungen anhand der VIS-Daten wurde nur auf Imkereibetriebe und Bienenstände zurückgegriffen, die mit mindestens einem Volk im VIS registriert waren.

Bundesländer	VIS Angaben		Anzahl Meldungen von InteressentInnen	Monitoring 2018		Monitoring 2019
	Verteilung Imkereibetriebe	Verteilung Bienenstände		Anzahl (Verteilung) ausgewählter Bienenstände	Anzahl (Verteilung) erhaltener Proben	Anzahl (Verteilung) teilnehmender Bienenstände
Burgenland	3%	3%	13	6 (3%)	6 (3%)	6 (3,0%)
Kärnten	12%	11%	38	23 (11%)	23 (12%)	23 (11,5%)
NÖ	17%	20%	64	40 (20%)	39 (20%)	39 (19,5%)
OÖ	25%	22%	60	43 (22%)	42 (21%)	43 (21,5%)
Salzburg	9%	7%	21	14 (7%)	16 (8%)	14 (7,0%)
Steiermark	15%	18%	37	36 (18%)	35 (18%)	37 (18,5%)
Tirol	12%	10%	30	21 (10%)	20 (10%)	20 (10,0%)
Vorarlberg	5%	6%	16	11 (6%)	10 (5%)	11 (5,5%)
Wien	2%	3%	18	6 (3%)	7 (4%)	7 (3,5%)
Gesamt	100%	100%	297	200 (100%)	198 (100%)	100 (100,0%)

2.3.4 Durchführung der Probenahme

Die Probenahme wird jeweils im September der drei Versuchsjahre von den Imkerinnen und Imkern selbst durchgeführt (Abbildung 2.4, Kapitel 2.6). Dafür werden sie von der Abteilung BIEN per Post mit allen notwendigen Materialien zur Durchführung ausgestattet (eine ausführliche bebilderte Arbeitsanleitung, Fragebogen, Plastiketiketten, Königinnenkäfige samt Futterteig, einen Fragebogen, frankiertes Rücksendekуверт). Die Arbeitsanleitung zur Probenahme ist im Anhang I (Kapitel 2.6) zu finden, der Fragebogen im Anhang II (Kapitel 2.7).

Im ersten Versuchsjahr wählten die Imkerinnen und Imker die fünf Versuchsvölker nach einem vorgegebenen Schema aus und markierten sie mit Plastiketiketten (Details siehe Kapitel 2.6). Sie wurden angewiesen, diese Etiketten die ganze Versuchsdauer an den jeweiligen Völkern zu belassen, um die Völker zweifelsfrei während der gesamten Studiendauer identifizieren zu können. Sollte im Laufe der drei Studienjahre ein Volk ausfallen, wird es durch ein anderes Volk des Bienenstandes ersetzt.

Die Bienenproben werden aus jener Zarge entnommen, in der sich die Brut befindet oder in der Zarge des Bienensitzes, falls keine Brut vorhanden ist. Sie wird auf jener brutfreien Wabe genommen, die an die äußerste Brutwabe anschließt (Abbildung 2.4a). Falls keine Brut vorhanden ist, wird die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes genommen. Pro Probenvolk wird ein Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen gefüllt (Abbildung 2.4b). Als optionale Zusatzaufgabe bitten wir die Imkerinnen und Imker ihre Völker auf folgende fünf Krankheitssymptome durchzusehen, die mit Virenbefall in Verbindung stehen können: erhöhter Bientotenfall vor dem Volk, Varroamilben auf Bienen, Bienen mit verkrüppelten Flügeln, schwarz glänzende Bienen,

Sackbrutsymptome in der Brut. Diese Aufgaben sind optional, da zur Durchführung die bienenbesetzten Waben des gesamten Bienenvolks überprüft werden müssen, was sehr zeitaufwändig ist.



Abbildung 2.4a-c: Ablauf der Probenahme. Die teilnehmenden Imkerinnen und Imker (a) identifizieren die Wabe zur Probenahme (hier: Wabe angrenzend an das Brutnest) und (b) füllen einen Königinnenversandkäfig mit zehn Bienen. (c) Käfig und Fragebogen werden in ein vorfrankiertes und adressiertes Kuvert gefüllt und schnellstmöglich an die AGES geschickt. Fotos aus der bebilderten Arbeitsanleitung (siehe auch Kapitel 2.6).

Die fünf gefüllten Königinnenversandkäfige werden gemeinsam mit dem ausgefüllten Fragebogen in das vorfrankierte Rücksende-Kuvert gegeben (Abbildung 2.4c). Das Kuvert ist entsprechend dem PRIO-Tarif der österreichischen Post für Päckchen frankiert, der einen raschen Versand mit Zustellung am nächsten Tag verspricht (Tarif ab 1.7.2018). Das Kuvert wird noch am selben oder am nächsten Tag bei der Post aufgegeben. Wir ersuchen die Imkerinnen und Imker das Kuvert zwischen Montag und Mittwoch aufzugeben, um zu verhindern, dass der Bienenversand über das Wochenende abläuft und damit unnötig verlängert wird. Sofort nach Eintreffen der Kuverts in der AGES werden diese auf -18°C gekühlt und die Bienen somit schnell abgetötet.

Zusätzlich werden die Teilnehmerinnen und Teilnehmer ersucht den beigelegten Fragebogen aus zehn Fragen zu beantworten (Kapitel 2.7). Dieser enthält allgemeine Fragen zu Imkerbetrieb und Bienenstand, sowie Fragen zu Hygienemaßnahmen und Volksgesundheit. Zusätzlich wird abgefragt, bei wie vielen der Probenvölker die definierten Krankheitssymptome beobachtet wurden (optional).

2.3.5 Probenbearbeitung

Nachdem die geschlossenen Proben-Kuverts mit den Bienenproben mindestens 24 Stunden bei minus 18°C gelagert worden waren, wurden sie weiterbearbeitet. Der Fragebogen wurde entnommen, auf Angabe des Probenahmedatums überprüft und mit einem Etikett des Laborinformationssystems (LISA) versehen. Aus jedem der fünf Bienenkäfige wurden zehn Arbeiterinnen in ein „Extracting Bag“ (BIOREBA AG) überführt und 50ml DEPC-behandeltem autoklaviertem Wasser (Ambion) dazupipettiert (15ml bzw. 3ml pro 10 Bienen). Eventuell vorhandene Drohnen wurden aussortiert. Bei 27 Proben waren zu wenige Arbeiterinnen in den Käfigen (durchschnittliche Anzahl Bienen: $49,6 \pm 1,1$ SD: minimale Anzahl Bienen: 39). Dies wurde vermerkt und die Menge an DEPC-Wasser angepasst. Die Bienen wurden mit Hilfe eines Homogenisators (HOMEX 6, Bioreba) homogenisiert. Das Homogenat wurde bis zur Weiterverwendung bei -18°C gelagert.

2.3.6 Abfrage Winterverluste

Es wurden die Winterverluste sowohl für die fünf Probenvölker als auch für den gesamten Bienenstand, auf dem das Monitoring durchgeführt wurde, abgefragt. Es wurde die Anzahl der eingewinterten Völker sowie die Anzahl der Völker, die am Ende des Winters abgestorben waren (tote Völker, leere Beuten), erhoben. Zusätzlich wurde abgefragt, wie viele der bei der Auswinterung lebenden Völker weisellos oder drohnenbrütig waren. Derartige Völker werden in der COLOSS-Studie ebenfalls zu den Winterverlusten gezählt und wurden erfasst um eine Vergleichbarkeit zu erzielen (Brodschneider et al., 2016, 2018b).

Die Winterverluste wurden bei den meisten TeilnehmerInnen online durch einen an die TeilnehmerInnen per Email verschickten Link abgefragt. Auf Wunsch wurde auch ein Fragebogen auf Papier ausgeschiedt. In Ausnahmefällen erfolgte die Abfrage per Telefon.

2.3.7 Virusanalytik

Die Bienenproben wurden an der AGES, Abteilung für Molekularbiologie (MOBI), des Instituts für veterinärmedizinische Untersuchungen (Mödling), mittels quantitativer real time RT-PCR (RT-qPCR) auf acht Bienenviren untersucht (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, IAPV, KBV, SBV).

Für die Analyse wurden die Bienen aller fünf Bienenproben eines Standes zu einer Sammelprobe vereint. Dies hat den Vorteil, dass mit einer einzigen Probe kostengünstig ein Überblick über die vorkommenden Viren und die Virusbelastung am Bienenstand möglich ist. Allerdings ist als Folge der Sammelprobenbildung eine statistische Prüfung auf mögliche Korrelationen mit Winterverlusten ausschließlich auf der Ebene der Sammelprobe und nicht auf der Ebene des Einzelvolks möglich.

2.3.7.1 Plasmide und Bienenhomogenate zur Methodenetablierung und Validierung

Vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) wurden die in der Tabelle 2.3 aufgelisteten Plasmide (ABCDS als Abkürzung für die fünf Viren ABPV, BQCV, CBPV, DWV und SBV, wobei bei DWV hier die beiden Genotypen DWV-A und DWV-B, letzteres auch bekannt als *Varroa destructor virus-1* – VDV-1 –, unterschieden werden) als Standards zur Methodenetablierung und zur absoluten Quantifizierung der entsprechenden Bienenviren zur Verfügung gestellt. Alle Plasmide standen nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung, jeweils 12 µl der G9 Verdünnung ($0,2 \times 10^9$ Kopien/µl). Zudem wurden sechzehn Bienenhomogenate vom EU-RL zur Methodenetablierung und im Rahmen eines Ringversuches für CBPV zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.3: Vom EU-RL im Jahr 2017 zu Etablierungs- und Validierungszwecken zum Nachweis von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV zur Verfügung gestellte Plasmide.

Virus	Plasmid, Bezeichnung EU-RL	Größe in Basenpaaren (bp)
ABPV	pB2	4371
BQCV	pNC14	3716
CBPV	pAb1	3815
DWV-A	pC1	4393
DWV-B (VDV-1)	pFab1	4651
SBV	pD1	4442

Tabelle 2.4: Vom EU-RL zu Validierungs- und Ringversuchszwecken zum Nachweis von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV zur Verfügung gestellte Bienenhomogenate.

Probennummer MOBI (Jahr des Probeneingangs)	Probenbezeichnung EU-RL	Virus
3155-5 (2017)*	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV
3155-6 (2017)*	ABCDS Method adoption sample	ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV
3156-1 bis -10 (2017) (n=10)	ILPT (CBPV) samples	CBPV
913-1 (2018)	CBPV-5.58	CBPV
913-2 (2018)	CBPV-6.79	CBPV
913-3 (2018)	CBPV-8.02	CBPV
913-4 (2018)	CBPV-9.24	CBPV

*Bei diesen Proben handelt es sich laut Auskunft vom EU-RL um Replikate

Von der Abteilung BIEN wurden zehn Proben (Bienenhomogenate, Nukleinsäureextrakte, cDNA bzw. Plasmide) für die Etablierung der Reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) für IAPV und KBV zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Von der Abteilung BIEN zu Etablierungs- Validierungszwecken zum Nachweis von IAPV und KBV zur Verfügung gestellte Proben. Zitate geben über die Arbeiten Auskunft, im Rahmen derer die jeweiligen Proben gewonnen worden waren.

Probennummer MOBI (Jahr des Probeneingangs)	Bezeichnung BIEN	Probenart	Virus (Nachweis mittels qualitativer RT-PCR, BIEN)
856-1 (2018)	IT-1/730	RNA-Extrakt (verdünnt 1:30), 20 µl	SBV, IAPV
856-2 (2018)	IT-2/730	Bienenhomogenat, 500 µl	SBV, IAPV
856-3 (2018)	IT-3/733	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, DWV, SBV, IAPV
856-4 (2018)	IT-4/IAPV-Plasmid	Plasmidischer Klon pTB-47 der publizierten Sequenz EF219380 aus Israel; ca. 2 ml	IAPV
856-5 (2018)	IT-5/IAPV-Plasmid	Plasmidischer Klon A5 (Blanchard et al., 2008), ca. 100 µl	IAPV
856-6 (2018)	IT- IAPV- cDNA	cDNA aus Isolat 57-2, (Blanchard et al., 2008), ca. 40 µl	IAPV
856-7 (2018)	KT-1/1125	RNA-Extrakt, 20 µl	BQCV, SBV, KBV
856-8 (2018)	KT-2/1125	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, SBV, KBV
856-9 (2018)	KT-3/1126	Bienenhomogenat, 500 µl	BQCV, SBV, KBV
856-10 (2018)	KT-4/KBV-cDNA	cDNA (Siede et al., 2005) aus Deutschland, ca. 100 µl	KBV

Da die vom EU-RL bereitgestellten ABCDS Plasmide nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung standen, wurden diese nach Rücksprache mit dem EU-RL vermehrt. Dazu wurden Verdünnungen (1:10 in Wasser) dieser Plasmide in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien transformiert (MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells; Invitrogen), auf Agarplatten mit Ampicillin (imMedia™ Growth Medium, agar, ampicillin, X-gal/IPTG; ThermoFisher) ausplattiert und entsprechende Kolonien selektiert und in Liquid Broth plus Ampicillin (50µg/ml) kultiviert. Aus

diesen Flüssigkulturen wurden danach die in *E. coli* vermehrten Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) aufgereinigt und deren Reinheit und Menge mithilfe eines Photometers (SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer, BIORAD) bestimmt. Zusätzlich wurde die DNA-Menge noch mit Fluorimetrie (Qubit 3 Fluorometer und Qubit dsDNA BR Assay Kit; ThermoFisher) bestimmt. Sämtliche Plasmide zeigten eine hohe Reinheit (OD260/280 Ratio >1,7). Die Ergebnisse der beiden Quantifizierungsmethoden stimmten sehr gut überein (maximale Abweichung 25%). Die Kopienanzahl wurde aus der bekannten Plasmidgröße (Tabelle 2.3) und der mittels Fluorimetrie bestimmten DNA-Konzentration der Plasmidlösung ($c_{\text{Plasmidlösung}}$) mit folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{Plasmidlösung}} = \frac{\text{DNA - Konzentration}}{\text{Molekulargewicht des Plasmids}}$$

$$\frac{\text{Anzahl Kopien}}{\mu\text{l}} = c_{\text{Plasmidlösung}} \times 6,02 \times 10^{23}$$

Entsprechende Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich von $10^1 - 10^8$ Kopien/5 μl wurden für alle sechs (Tabelle 2.3) Plasmide in nukleasefreiem Wasser unter Zusatz von 30ng/ μl tRNA angefertigt. Ein mittels qPCR durchgeführter Vergleich der Ct-Werte aus Verdünnungsreihen, die einerseits anhand der in der Abteilung MOBI klonierten Plasmide, andererseits anhand der vom EU-RL zur Verfügung gestellten Plasmide hergestellt worden waren, ergab mit Ausnahme von CBPV eine nahezu perfekte Übereinstimmung der erhaltenen Ct-Werte. Bei CBPV ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Plasmiden, die einerseits von der Abteilung MOBI, andererseits vom EURL hergestellt, bzw. quantifiziert worden waren. Nachdem die von der Abteilung MOBI erhaltenen Werte auch durch Wiederholung und Nachtestung mit einem weiteren CBPV-Klon reproduzierbar waren und alle Plasmide auf die gleiche Art hergestellt, quantifiziert und deren Konzentration berechnet worden war, wird davon ausgegangen, dass die seitens MOBI berechneten Werte korrekt sind und es wurden in der Folge sämtliche CBPV-Quantifizierungen der Projektproben basierend auf dem von der MOBI hergestellten CBPV-Plasmid durchgeführt. Der Unterschied zwischen dem CBPV-Plasmid der Abteilung MOBI und dem vom EU-RL wirkt sich in der absoluten Quantifizierung in einem etwa zehnfachen Unterschied in der berechneten Viruslast aus. Die anhand des EU-RL Plasmides berechneten Viruslasten wären etwa zehnfach höher. Eine vergleichende Quantifizierung der EU-RL ABCDS-Referenzproben, sowohl mit den vom EU-RL bereitgestellten Standardplasmiden als auch den an der Abteilung MOBI propagierten Plasmiden, ergab weitgehend übereinstimmende Werte für alle sechs Bienenviren. Dementsprechend konnten die neu hergestellten Plasmide, die nun in ausreichender Menge vorlagen, für die Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV im Rahmen dieses Projektes verwendet werden.

2.3.7.2 Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenaten

Die Nukleinsäureextraktion aus Bienenhomogenat-Proben erfolgte semi-automatisiert mit dem LSI MagVet™ Universal Isolation Kit mit dem Protokoll „RNA purification from total blood & serum“ auf dem KingFisher™ Flex (beides ThermoFisher). Die Extraktion erfolgte aus 100 μl Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 80 μl Puffer eluiert und bis zur Analyse bei -20°C (Langzeitlagerung bei -80°C) gelagert. Zu Vergleichszwecken wurden ausgewählte Bienenhomogenatproben manuell mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), sowie automatisiert mit dem NucleoSpin® 96 Virus Core Kit (Macherey-Nagel) auf der Freedom EVO® 150 Plattform (Tecan) extrahiert. Die Extraktion erfolgte im Fall des QIAamp Viral RNA Mini Kit aus 140 μl Homogenat und die gereinigte Nukleinsäure wurde in 60 μl Puffer eluiert. Beim NucleoSpin® 96 Virus Core Kit erfolgte die Extraktion aus 100 μl Homogenat und die Elution in

100 µl Puffer. Diese unterschiedlichen Verhältnisse im Proben- zu Eluatvolumen wurden bei der Berechnung der Viruskopienanzahl/ml berücksichtigt.

2.3.7.3 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B und SBV (ABCDS)

Für den Nachweis und die Quantifizierung von ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B und SBV mittels RT-qPCR existiert eine Standard operating procedure (SOP), die vom EU-Referenzlabor (EU-RL) für Bienengesundheit in Frankreich (Anses Sophia Antipolis) zur Verfügung gestellt wurde. Die in der SOP beschriebene ABPV RT-qPCR basiert auf der Quantifizierung der Kapsidprotein-Gensequenz (Jamnikar-Ciglenc̆ki & Toplak, 2012); die BQCV RT-qPCR auf dem C-terminalen Bereich der Polyprotein Gen-Sequenz (Chantawannakul et al., 2006); die DWV-A und DWV-B RT-qPCR Methoden auf der Quantifizierung der jeweiligen VP3-Kodiersequenz (Schurr et al., 2019) und der SBV-Nachweis auf der Quantifizierung des N-terminalen Bereich der Polyprotein Gensequenz (Blanchard et al., 2014). Für den Nachweis und die Quantifizierung von CBPV stand eine weitere SOP zur Verfügung. Die Methode beruht auf der Quantifizierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Rd-Rp) Gensequenz des CBPV-Genoms (Blanchard et al., 2007). Sämtliche Primer- und Sondensequenzen wurden anhand der oben zitierten Literatur bestellt (ThermoFisher bzw. Eurofins), mit der Ausnahme, dass die Sonden für ABPV, BQCV, DWV-A, DWV-B und CBPV – anstelle des vom in den SOPs empfohlenen TAMRA – mit dem Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) versehen wurden.

In den beiden oben genannten SOPs erfolgt die Detektion und Quantifizierung der Bienenvirus RNAs als two-step RT-qPCR (=Reverse Transkription-qPCR) mit getrennter Reverser Transkription und darauffolgender qPCR Amplifikation der im Reverser Transkriptions-Schritt erzeugten cDNA. Demgegenüber erfolgte die RT-qPCR im Rahmen dieses Arbeitspaketes als one-step RT-qPCR, wobei RT und qPCR hintereinander im selben Reaktionsgefäß stattfinden. Hauptvorteil der one-step RT-qPCR ist, dass die Anzahl an Pipettierschritten und damit mögliche Fehlerquellen reduziert werden. Zudem wird weniger Zeit für das Probenhandling benötigt, was die one-step RT-qPCR besonders für einen höheren Probendurchsatz, wie er in diesem Arbeitspaket gegeben ist, attraktiv macht. Ein weiterer Unterschied zu den in den beiden EU-RL SOPs angegebenen Protokollen besteht darin, dass hier keine parallele Amplifikation von interner Kontroll-DNA durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren im Rahmen dieses Projektes durch den gesondert durchgeführten Nachweis der Apis-Actin mRNA in allen Proben bestätigt.

Die 25 µl Reaktionsmixes für die ABCDS one-step RT-qPCRs bestanden aus 12,5 µl 2x RT-PCR buffer, 1 µl 25x RT-PCR enzyme mix (AgPath-ID One-step RT-PCR kit, ThermoFisher), 5 µl Nukleinsäureextrakt und den jeweils spezifischen Primern und fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden, sowie nukleasefreiem Wasser. Die Konzentrationen der verwendeten Primer und Sonden entsprachen den in den beiden EU-RL SOPs angegebenen Werten. Demnach wurden für die ABPV RT-qPCR die Primer ABPV1 und ABPVRn (je 800 nM), sowie die Sonde ABPVnTaq (100 nM) verwendet (Jamnikar-Ciglenc̆ki & Toplak, 2012). Für die BQCV RT-qPCR wurden die Primer BQV8195F und BQV8265R (je 320 nM), sowie die Sonde BQCV8217T (200 nM) eingesetzt (Chantawannakul et al., 2006). Für die CBPV RT-qPCR wurden die Primer qCBPV 9 und qCBPV 10 (je 500 nM), sowie die Sonde CBPV 2 probe (200 nM) verwendet (Blanchard et al., 2007). Für die DWV-A RT-qPCR wurden die Primer F-DWV_4250 und R-DWV_4321 (je 400 nM), sowie die Sonde Pr-DWV_4293 (100 nM) verwendet, für die DWV-B RT-qPCR wurden die Primer F-VDV1_4218 und R-VDV1_4290 (je 1200 nM), sowie die Sonde Pr-VDV1_4266 (400 nM) eingesetzt (Schurr et al., 2019). Für die SBV RT-qPCR wurden die Primer SBV-F434 und SBV-R503 (je 320 nM), sowie die Sonde SBV-P460 (200 nM) eingesetzt (Blanchard et al., 2014).

Zum Nachweis der erfolgreichen Nukleinsäureextraktion aus den Bienenhomogenaten, respektive zum Nachweis der Abwesenheit PCR-inhibitorischer Substanzen, wurde – wie schon im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ – die Apis-Actin mRNA in den Bienenhomogenatproben semiquantitativ (d.h. ohne entsprechender Eichkurve) bestimmt (Morawetz et al., 2018). Für die Apis-Actin RT-qPCR wurden die Primer Apis- β -actin-F und Apis- β -actin-R (je 400 nM), sowie die Sonde Apis- β -actin-Probe (200 nM) verwendet (Chen et al., 2005).

Das Temperaturprofil für die ABCDS-, sowie die Apis-Actin RT-qPCRs bestand aus einem RT-Schritt bei 45°C/10 min, gefolgt von 95°C/10 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Taq-Polymerase und 42 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C/10 sec und Annealing/Extension bei 60°C/1 min. Die RT-qPCRs wurden auf dem 7500Fast Real-time PCR System (ThermoFisher) oder auf dem Mx3005P (Agilent) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der 7500 Software v2.3 (ThermoFisher), bzw. mit der MxPro – Mx3005P v4.10 Software (Agilent).

Die eigentliche Methodenetablierung lief in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt wurden die RT-qPCR Parameter, wie Limit of detection (LOD_{PCR}), Linearität der Quantifizierung, PCR-Effizienz und Limit of quantification (LOQ_{PCR}), erhoben. Im zweiten Schritt wurde die komplette Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung anhand der Erhebung von LOD_{Method} und LOQ_{Method} evaluiert. Für beide Schritte hatte das EU-RL anhand einer Französischen Norm (AFNOR, 2015) Referenzwerte definiert, anhand derer die Konformität der Methode mit den EU-RL Standards überprüft werden konnte.

LOD_{PCR} , Linearität, PCR-Effizienz und LOQ_{PCR} waren bei ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV unter Verwendung von vom EU-RL zur Verfügung gestellten Berechnungsvorlagen konform mit den EU-RL Standards: die G2-Verdünnungsstufe (100 Kopien/Reaktion) wurde in allen fünf Tests positiv detektiert, die PCR-Effizienz war bei allen fünf Tests im Bereich von 95-104%, die Linearität der Quantifizierung wurde bei allen Tests im Bereich von 10^2 - 10^8 Kopien/Reaktion bestätigt. Bei Anwendung derselben Vorlage für DWV-B wurde die Konformität der verwendeten RT-qPCR Methode auch für diesen Test bestätigt, hier lag die PCR-Effizienz etwas niedriger (87-90%).

Bei der Überprüfung der kompletten Methode von der Nukleinsäureextraktion bis zur RNA-Quantifizierung konnten hinsichtlich DWV-B keine Aussagen getroffen werden, da kein entsprechender Standard vom EU-RL verfügbar war. Die übrigen fünf Methoden waren im Hinblick auf das LOD_{Method} ebenfalls konform mit den EU-RL Standards. Beim LOQ_{Method} schreibt das EU-RL eine maximale Abweichung der erhobenen Viruslast von +/- einer \log_{10} -Stufe zum Erreichen der Konformität mit dem EU-RL Standard vor. Diese Konformität wurde für CBPV, DWV-A und SBV erreicht. Bei ABPV und BQCV lagen die Viruslasten/Biene aber um einen Faktor von durchschnittlich 1,78 (ABPV) bzw. 2,14 \log_{10} (BQCV) über den EU-RL Referenzwerten. Diese Überschätzung der Viruslast bei den beiden genannten Bienenviren zeigte sich bei beiden verwendeten Extraktionsmethoden (zwei Methoden wurden hier anhand derselben Proben verglichen). Sie war jedoch bei Verwendung der semiautomatisierten Extraktion mit dem KingFisher™ Flex etwas niedriger, sodass diese Methodik hier bevorzugt wurde.

Interessanterweise hat das EU-RL bei eigenen Untersuchungen eine systematische Überschätzung der ABPV und BQCV Viruslasten beobachtet und in der Folge die Werte rechnerisch korrigiert (Schurr et al., 2019). Eine derartige Korrektur wurde hier nicht durchgeführt. Die an derselben Stelle vom EU-RL beschriebene und rechnerisch korrigierte systematische Unterschätzung der DWV-B und SBV Viruslasten wurde bei unseren Untersuchungen nicht gesehen.

2.3.7.4 CBPV-Ringversuch und Quantifizierung weiterer CBPV Referenzproben

Im Dezember 2017 nahm MOBI an einem Ringversuch des EU-RL für Bienengesundheit teil. Alle zehn Ringversuchsproben wurden qualitativ richtig erkannt. Bei der quantitativen Analyse der drei

CBPV-positiven Ringtestproben wurden vergleichsweise niedrige Viruslasten erzielt (im Bereich von 6,31 bis 63,1-fach unter dem robusten Mittelwert/der robusten Standardabweichung aller Teilnehmer), jedoch waren die Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit konform mit dem EU-RL Standard. Der Ringversuch wurde somit erfolgreich absolviert.

Vier weitere CBPV-Referenzproben (913-1 bis 913-4, Tabelle 2.4) mit unterschiedlicher CBPV-Last wurden ebenfalls vom EU-RL bezogen und mit der beschriebenen Methodik quantifiziert. Bei Verwendung der Extraktion mit dem KingFisher™ Flex wurden alle vier Proben mit einer Abweichung von unter einer log₁₀ Stufe richtig quantifiziert.

2.3.7.5 Methodenetablierung und -validierung zum Nachweis und zur Quantifizierung von IAPV und KBV

Für diese beiden RNA-Bienenviren standen keine Empfehlungen oder SOPs vom EU-RL für Bienengesundheit zur Verfügung. Die Methodenauswahl wurde daher anhand verfügbarer Literaturstellen (Chantawannakul et al., 2006; Cox-Foster et al., 2007; de Miranda et al., 2010; Maori et al., 2007; Palacios et al., 2008; Stoltz et al., 1995) oder von in der Abteilung BIEN vorhandenen Erfahrungen getroffen. Basierend auf de Miranda et al. (2010) wurden verschiedene IAPV und KBV-spezifische Primer und Sonden *in silico* evaluiert. Dazu wurden mithilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Sequenzen mit entsprechender Homologie zu den von den jeweiligen Primern amplifizierten Genabschnitten gesucht und in der Folge mithilfe der Software BioEdit (Hall, 1999) die Anzahl an nicht-passenden Basenpaarungen zwischen den Primern und den entsprechenden Zielsequenzen analysiert. Basierend auf dieser Analyse erschienen die Primer KBV 6639F/6801R und IAPV 6627F/6792R (de Miranda et al., 2010) als am vielversprechendsten. Daher wurden diese Primer für eine SYBR-Green RT-qPCR synthetisiert (ThermoFisher). Zusätzlich wurden auch die Primer KBV 5425F/5800R (Stoltz et al., 1995) und IAPV 8880F/9336R (Maori et al., 2007) synthetisiert, da diese bereits in der Abt. BIEN verwendet worden waren und die Hintergrundinformation in Tabelle 2.5 teilweise auf der Verwendung dieser beiden Primersysteme basiert.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die KBV und IAPV Primer nach de Miranda et al. (2010) jedoch bei den aus Österreich stammenden Proben 856-1 bis -3, sowie 856-7 bis -9 (2018) (Tabelle 2.5) kein positives Ergebnis erbrachten, sodass das in Österreich vorkommende IAPV und KBV damit möglicherweise nicht erfasst würden. Im Gegensatz wurden in konventionellen RT-PCRs mit den KBV und IAPV Primern nach Stoltz et al. (1995) und Maori et al. (2007) auch in den österreichischen Bienenproben (Tabelle 2.5) Amplifikate in den erwarteten Größen erhalten, die sich bei Sequenzierung (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit und 3130xl Genetic Analyzer; Thermo Fisher) und anschließender BLAST-Analyse zuerst als IAPV und KBV bestätigen ließen. In der Folge wurden zwei aus österreichischen Bienenproben stammende IAPV- und KBV-Amplifikate (aus den Proben 856-2 und 856-8; Tabelle 2.5) mithilfe des TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) in ein Plasmid-Backbone inseriert und mit der in Kapitel 2.3.7.1 bereits beschriebenen Methodik in *E. coli* vermehrt, die Plasmid-DNA daraus präpariert und quantifiziert. Zusätzlich wurde das Vorhandensein des IAPV- bzw. KBV Amplifikates in der gereinigten Plasmid-DNA mittels Sequenzierung bestätigt. Allerdings stellte sich bei weiteren Untersuchungen heraus, dass die mittels RT-PCR nach Maori et al. (2007) aus österreichischen Proben erhaltenen IAPV Sequenzen möglicherweise als Resultat einer Kreuzkontamination zu betrachten sind, während es sich bei den mittels RT-PCR nach Stoltz et al. (1995) aus österreichischen Proben erhaltenen Sequenzen nach phylogenetischer Analyse nicht um KBV, sondern um ein verwandtes, allerdings weder ABPV, IAPV oder KBV zuzuordnendes Virus handeln dürfte. In derselben phylogenetischen Analyse wurde gezeigt, dass die Proben 856-6 (2018) und 856-10 (2018) tatsächlich als IAPV bzw. KBV anzusprechen sind (Tabelle 2.5). Beide Proben wurden aus dem Ausland (Frankreich bzw.

Deutschland) bezogen (Blanchard et al., 2008; Siede et al., 2005). Somit bestätigte sich die Darstellung von de Miranda et al. (2010), wonach die RT-PCR nach Stoltz et al. (1995) als nicht spezifisch für KBV anzusehen ist. In der Folge wurde daher beschlossen, in Abwesenheit anderer als geeignet erscheinender RT-PCR Protokolle für die weiteren Untersuchungen mit den Primern KBV 6639F/6801R und IAPV 6627F/6792R (de Miranda et al., 2010) weiterzuarbeiten. Bei den Reverse Primern KBV 6801R und IAPV 6792R handelt es sich um denselben Primer, der zu Vereinfachungszwecken hier auf KBV-IAPV-R umbenannt wurde.

Für die KBV, beziehungsweise die IAPV RT-qPCR, wurden somit jeweils die Primer KBV 6639F/KBV-IAPV-R, beziehungsweise die Primer IAPV 6627F/KBV-IAPV-R (je 450 nM), zusammen mit 1x POWER SYBR Green Master Mix und 1x RT Enzyme Mix (ThermoFisher), sowie nukleasefreiem Wasser und 5 µl Probe in einem Reaktionsvolumen von 20 µl angesetzt. Das Temperaturprofil bestand aus einem RT-Schritt bei 48°C/30 min, gefolgt von 95°C/10 min zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der Taq-Polymerase und 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95°C/10 sec, Annealing bei 58°C/30 sec und Extension bei 72°C/30 sec. Auf die Amplifizierung folgte hier noch eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die Schmelztemperatur (T_M) der gebildeten RT-qPCR Produkte bestimmt wurde. Zur absoluten Quantifizierung wurden die aus den Proben 856-6 und 856-10 (2018) amplifizierten RT-qPCR Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ausschneiden der Banden und Aufreinigung der DNA (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) fluorimetrisch quantifiziert (Qubit 3 Fluorometer und Qubit dsDNA BR Assay Kit; ThermoFisher). Die Berechnung der Kopienanzahl erfolgte nach der unter 2.3.7.1 angegebenen Formel. RT-qPCRs wurden auf dem 7500Fast Real-time PCR System (ThermoFisher) oder auf dem CFX96 Touch Real-Time PCR System (Bio-Rad) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der 7500 Software v2.3 (ThermoFisher), bzw. CFX Maestro 1.1 Software (Bio-Rad). Auf beiden Geräten lagen die Schmelztemperaturen für die IAPV bzw. KBV Amplifikationsprodukte bei ca. 79-80°C.

2.3.7.6 Testung und Quantifizierung der Projektproben

Zusätzlich zu den 198 Projektproben wurden während der Homogenisierung der Proben in der Abteilung BIEN sieben Wasserproben als Prozesskontrollen mitgeführt. Zudem wurde bei der Nukleinsäureextraktion in jeder zweiten Spalte einer 96-well Platte (also pro 15 Proben) eine PBS-Negativextraktionskontrolle zur Erkennung von Kreuzkontaminationen während der Extraktion mitgeführt. Alle Proben, Prozesskontrollen und Extraktionskontrollen wurden wie unter 2.3.7.2 beschrieben mit dem LSI MagVet™ Universal Isolation Kit auf dem KingFisher™ Flex (beides ThermoFisher) extrahiert und in der Folge im Einzelansatz auf Apis-Actin mRNA, sowie auf ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, DWV-B, SBV, IAPV und KBV RNA getestet. Alle im Erstantatz positiven Proben wurden dann erneut extrahiert und unter Zuhilfenahme von externen Standardverdünnungsreihen mit bekannter Konzentration im Doppelansatz quantifiziert. Proben, die nach der Erstuntersuchung positiv, in der Wiederholungstestung im Doppelansatz aber negativ getestet wurden, wurden als negativ beurteilt. Ergab sich nach Wiederholungsextraktion und RT-qPCR Ansatz ein qualitativ und/oder semiquantitativ deutlich abweichendes Ergebnis wurde zur Verifikation erneut extrahiert und im Doppelansatz quantifiziert. Die Angabe der finalen Kopienanzahl für jedes Virus pro ml Bienenhomogenat ergab sich aus der Formel: $\text{Kopienanzahl/Reaktion (Mittelwert aus zwei Replikaten)} \times 160$. Während der Extraktion ist es teilweise zu geringgradigen Verschleppungen von viruspositivem Material gekommen (positive Ergebnisse bei den Negativextraktionskontrollen, siehe Kapitel 2.4.3.2). In allen Fällen blieben diese Nachweise in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, unterhalb des vom EU-RL definierten $\text{LOD}_{\text{PCR}}/\text{LOQ}_{\text{PCR}}$ von 100 Kopien/Reaktion (= $1,6 \times 10^4$ Kopien/ml Homogenat). Daher wurde dieses als Grenze zwischen letztendlich als positiv bzw. negativ bewerteten Proben

definiert, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von geringen Verunreinigungen weitgehend auszuschließen.

2.3.8 Statistik

2.3.8.1 Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Standort- bzw. Volksfaktoren

Die gesamte Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm R mit der Version 3.5.2. durchgeführt (R Core Team, 2018). Alle Abbildungen wurden mit R erstellt (package „ggplot2“: Wickham, 2016; package „rpart.plot“: Milborrow, 2019).

Für alle Virus-Prävalenzen wurde das 95% Konfidenzintervall mittels eines General Linear Models mit einer quasibinomialen Verteilung berechnet und angegeben (van der Zee et al., 2013). Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen der Virusprävalenz und den Variablen Bundesland, Seehöhe und Winterverlust sowie dem Auftreten dreier Virussymptome mit der gleichen Modellierung berechnet. Die Signifikanz dieser Modelle wurde mit Hilfe eines log-likelihood Chi²-Tests berechnet (package „car“: Fox & Weisberg, 2011). Als Posthoc-Test wurde ein Tukey Test durchgeführt (package „multcomp“: Hothorn et al., 2008).

Zur Auswertung möglicher Zusammenhänge zwischen den genannten Faktoren und dem Virustiter wurden die nicht-parametrischen statistischen Methoden Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Kruskal-Wallis-Test angewandt. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung in der Variable Virustiter wurden diese mittels Median beschrieben. Der Median stellt jenen Wert dar, unter dem die eine Hälfte aller Werte liegt, während die andere Hälfte der Werte darüber liegt. Um die Streuung darzustellen, wurde das untere Quartil (Q1, 25% der Werte liegen darunter) und das obere Quartil (Q3, 75% der Werte liegen darunter) angegeben.

2.3.8.2 Zusammenhang zwischen Prävalenz bzw. Virustiter und Winterverlusten

Für die Auswertung des Zusammenhanges Virusauftreten bzw. des Virustiters und Winterverlusten wurde die Methodik der Regression Trees (RT) gewählt (James et al., 2013). Dies wurde gemacht, weil die Streuung der Virustiter um bis zu sieben Zehnerpotenzen für parametrische Modellierungen nicht gut geeignet sind. Dieses Problem tritt bei RT nicht auf, weil RT numerische Variablen nur auf ordinalem Level betrachten. Außerdem können mit RT Wechselwirkungen zwischen Variablen besser herausgearbeitet werden.

Die Methodik der RT fällt in die umfangreiche Methodenklasse des maschinellen Lernens. Ziel ist es mit Variablen (sogenannten Features) das Ergebnis (=Outcome) für ein Zufallsereignis vorherzusagen. In diesem Fall soll anhand des in den Bienenproben gemessenen Virustiters vorhergesagt werden, wie hoch die Wintersterblichkeitsrate bei den beprobten Bienenvölkern ist. Die Wintersterblichkeitsrate ist hierbei der Outcome, die gemessenen Virustiter sind die Features.

Die Grundidee eines Regression Trees ist es, die Stichprobe zuerst in zwei Gruppen aufzuteilen und dann diese erhaltenen Gruppen schrittweise immer wieder in zwei Gruppen aufzuteilen, sodass jede neu gebildete Gruppe in sich möglichst homogen bezüglich des Outcomes ist. Dabei sollen diese sogenannten Splits, also die Unterteilungen in zwei Gruppen, immer anhand der Werte der Features durchgeführt werden. In diesem konkreten Fall könnte das bedeuten, dass die beobachteten Bienenstände eingeteilt werden in Bienenstände mit hohen und in Bienenstände mit niedrigem Titer bezüglich Virus A. Ziel ist es die Teilungsgrenze (=Cut Off Wert) bei den Messwerten von Virus A so zu optimieren, dass beispielsweise Bienenstände unter dieser Grenze

eine tendenziell niedrigere Sterblichkeitsrate aufweisen und Bienenstände über dieser Grenze eine tendenziell höhere Sterblichkeitsrate. Nach einem ersten Split wird weiter untersucht, ob eine weitere Auftrennung nach anderen oder aber auch denselben Features die Vorhersage der Sterblichkeitsrate wesentlich verbessert. So entsteht nach und nach ein Regression Tree mit verschiedenen Ästen, die zum Schluss in möglichst homogenen Gruppen enden. Für jede dieser Gruppen wird zum Schluss ein Vorhersagewert für den Outcome berechnet, in dem alle beobachteten Outcomes aller Objekte einer Gruppe gemittelt werden.

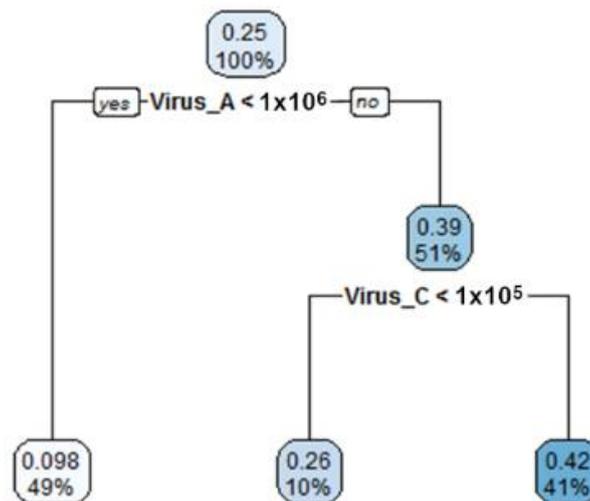


Abbildung 2.5: Beispiel und schematische Darstellung eines Regression Trees. Die linke Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die Bedingung zutrifft („yes“) und die rechte Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die jeweilige Bedingung nicht zutrifft („no“). Die Ergebniskästchen geben in der oberen Zeile die Höhe der Winterverluste in der entsprechenden Gruppe (0.00 = 0% Winterverlust; 1.00 = 100% Winterverlust) und in der unteren Zeile den Anteil der Stichproben, die in diese Gruppe fallen.

Zur Verdeutlichung kann folgendes Beispiel herangezogen werden (Abbildung 2.5). In einem ersten Schritt wurde die gesamte Stichprobe in zwei Gruppen anhand ihrer Werte zu Virus A aufgeteilt. Die rechte Gruppe mit einem hohen Wert wird weiter anhand der Werte zu Virus C in zwei Gruppen gesplittet. Weitere Variablen verbesserten die Vorhersage nicht relevant, daher wurden keine weiteren Splits mehr vorgenommen. Die finalen Gruppen für die Vorhersage sind somit von links nach recht gelesen eine erste Gruppe mit einer vorhergesagten Wintersterblichkeitsrate von 9,8%, eine zweite Gruppe mit einer vorhergesagten Wintersterblichkeitsrate von 26,0% und eine dritte Gruppe mit einer vorhergesagten Wintersterblichkeitsrate von 42,0%. Für einen Bienenstand mit einem Virustiter für Virus A von $0,1 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat würde eine Wintersterblichkeitsrate von 9,8% prognostiziert werden, unabhängig von der Titerhöhe von Virus C (erste Entscheidung links, erste Gruppe). Für einen Bienenstand mit einem Virustiter für Virus A von 10×10^6 RNA-Kopien/ml Homogenat und Virus C von 20×10^6 RNA-Kopien/ml Homogenat würde ein Verlust von 42% prognostiziert werden (erste Entscheidung rechts, zweite Entscheidung rechts, dritte Gruppe).

Um die Vorhersagequalität eines Regression Trees zu bewerten, betrachtet man die Abweichungen der vorhergesagten Werte von den real beobachteten Werten. Diese Differenzen werden quadriert und aufsummiert. Der erhaltene Kennwert wird RSS („Residual Sum of Squares“) genannt. Je geringer die RSS ist, desto besser sind die Vorhersagen für das Modell. Es kann bei diesem Verfahren allerdings passieren, dass ein Modell gute Vorhersagen für die verwendete Stichprobe liefert, bei neuen Fällen aber versagt. Um dies zu prüfen, wurde in der vorliegenden

Modellierung der Datensatz in zwei Gruppen unterteilt. 160 Bienenstände („Trainingsdatensatz“) wurden verwendet, um einen Regression Tree anzupassen, anhand der restlichen 38 Bienenstände („Testdatensatz“), wurde die Performance des Regression Trees getestet. Diese Unterteilung der Gesamtstichprobe in Trainings- und Testdatensatz wurde zufällig vorgenommen und drei Mal durchgeführt, um zu untersuchen, wie sehr sich die drei verschiedenen Regression Trees voneinander unterscheiden. Regression Trees können gerade bei kleinen Stichproben instabile Ergebnisse liefern. Das heißt, die Ergebnisse können sehr unterschiedlich ausfallen, je nachdem wie die Aufteilung der Stichprobe in Trainings- und Testdatensatz erfolgt.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Projektfortschritt

2.4.1.1 Kontakt mit den ProjektteilnehmerInnen

Probenahme 2018

Insgesamt erhielten wir im Jahr 2018 von 99% der teilnehmenden Imkerinnen und Imker Proben (198 Proben, Tabelle 2.2). Ein Imker fiel aufgrund massiver Völkerverluste auf dem Probenstand aus. Die Probe eines zweiten Imkers ging auf dem Postweg verloren. Eine zusätzliche Ersatz-Probenahme kam nicht zustande. Es kam zu einer geringfügigen Verschiebung der Anteile der Bundesländer, da vier Imkerinnen und Imker einen Bienenstand in einem anderen Bundesland als dem ursprünglich angegebenen Bundesland gewählt hatten (Tabelle 2.2: Vergleich „Anzahl ausgewählter Bienenstände“, „Anzahl erhaltener Proben“).

Die Proben wurden zwischen 31. August 2018 und 8. Oktober 2018 genommen, wobei 181 der TeilnehmerInnen (91%) die Proben im anvisierten Zeitfenster zwischen 1.-16. September 2018 genommen haben. Die Proben trafen in der überwiegenden Zahl der Fälle innerhalb von zwei Tagen nach der Probenahme in der AGES ein (1 Tag: 40%, 2 Tage: 51% der Proben). Die maximale Transportzeit betrug vier Tage (zwei Proben).

Die Fragebögen wurden von allen Teilnehmerinnen und Teilnehmern ausgefüllt. Bei etwa einem Drittel der Fragebögen wurde aufgrund unlogischer oder fehlender Angaben seitens der TeilnehmerInnen noch bei den TeilnehmerInnen rückgefragt und die Angaben gegebenenfalls korrigiert. Die optionale Zusatzaufgabe einer Durchsicht auf ausgewählte Krankheitssymptome wurde von 185 der Imkerinnen und Imker vollständig durchgeführt (93,9% von 198). Weitere vier ImkerInnen gaben zu einem Teil der Symptome Beobachtungen an. Neun ImkerInnen führten keine Völkerdurchsicht durch.

Mitteilung der Ergebnisse der Probenahme 2018

Die teilnehmenden ImkerInnen erhielten Ende März 2019 die individualisierten Ergebnisse der Virusuntersuchungen ihrer Sammelprobe per E-Mail oder per Brief. Die Ergebnismittelung enthielt folgende Information über die acht untersuchten Viren: den Nachweis (positiv/negativ), den Virustiter und dessen Beurteilung (niedrig, mittel, hoch). Die Beurteilung erfolgte als relative Einschätzung im Vergleich zu den in der gesamten Stichprobe gemessenen Titerwerten des jeweiligen Virus (niedrig: Titer im Bereich der niedrigsten 25%; mittel: Titer liegt zwischen 25% und 75%, hoch: Titer liegt im Bereich der 25% höchsten Werte).

Aufgrund der zahlreichen Detailanfragen der TeilnehmerInnen wurde ein Informationsdokument erstellt und an alle TeilnehmerInnen ausgesandt. Dieses lieferte Basiswissen zu den untersuchten Bienenviren, Informationen zur Interpretation der Ergebnisse und zur Vorbeugung und Bekämpfung von Viruserkrankungen (siehe 2.8 Anhang III).

Abfrage Winterverluste 2018/19

Die Umfrage zu den Winterverlusten 2018/19 wurde allen 198 ImkerInnen, die im September 2018 Proben eingeschickt hatten, Mitte März 2019 per E-Mail-Link oder Brief zugeschickt. ImkerInnen, die noch keine Winterverluste gemeldet hatte, wurden im Monats-Rhythmus per E-Mail oder Telefon daran erinnert, uns die Daten zukommen zu lassen. Mit 24. Juni 2019 hatten alle 198 TeilnehmerInnen ihre Überwinterungsergebnisse gemeldet.

Probenahme 2019

Zwischen den Probenahmen im Jahr 2018 und im Jahr 2019 meldeten sich drei Imkerinnen und Imker von der Teilnahme im Projekt ab (Stand 09.08.2019). Daher wurden fünf Imkerinnen und Imker aus der bestehenden Warteliste neu angeworben (drei Abmeldungen + zwei Ausfälle bei Probenahme 2018). Somit werden auch in der kommenden Probenahme-Saison 200 Imkerinnen und Imker am Virenmonitoring teilnehmen (Tabelle 2.2).

2.4.1.2 Virusdiagnostik: Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung zur Detektion und Quantifizierung der Bienenviren ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A und SBV war zum Zeitpunkt des letzten Zwischenberichtes bereits abgeschlossen. Mittlerweile wurden nun auch die Methoden zur Detektion und Quantifizierung von DWV-B, IAPV und KBV etabliert. Daher konnten die Analysen der Proben von September 2018 wie geplant bis Februar 2019 durchgeführt und die StudienteilnehmerInnen wie geplant informiert werden. Ein offenes Projektziel ist noch der Vergleich der vom EU-RL empfohlenen Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von DWV-A und -B mit der im Vorgängerprojekt angewandten Methode nach Highfield et al. (2009).

2.4.1.3 Datenauswertung

Für das Monitoringjahr 2018 wurden die Virusprävalenz und die Virustiter der acht gemessenen Bienenviren für Gesamtösterreich und die neun Bundesländer ausgewertet. Da ein Zusammenhang zwischen Bundesland und Seehöhe vorhanden war, wurde zusätzlich der Faktor Seehöhe ausgewertet.

Die Auswertung des Zusammenhanges zwischen Virusprävalenz/Virustiter und den Winterverlusten wurde begonnen. Die angewandte Methode „Regression Tree“ zeigt vielversprechende Ergebnisse, ist jedoch derzeit noch zu unzuverlässig. Es ist geplant die Aussagekraft durch die Adaptierung der Methodik zu erhöhen. Außerdem wird durch die mehrjährigen Untersuchungen die Menge verfügbarer Daten erhöht und trägt damit auch zur Verbesserung der Modellierung bei.

Zusätzlich wurden die Zusammenhänge zwischen beobachteter Symptomatik in den Probenvölkern und dem Virusauftreten ausgewertet.

2.4.2 Kennwerte der teilnehmenden Imkereibetriebe

Die Betriebsgröße der teilnehmenden Imkereibetriebe bewegte sich zwischen fünf und 350 Völkern pro Betrieb. Im Mittel besaß ein teilnehmender Betrieb 38,8 Völker (Standardabweichung: $\pm 51,2$ Völker). Die Stichprobe bestand aus 85 Betrieben mit bis zu 20 Völkern, 81 Betrieben mit 21 bis 50 Völkern und 32 Betrieben mit über 50 Völkern (42,9%; 40,9% und 16,2% der 198 teilnehmenden Betriebe).

Die teilnehmenden ImkerInnen setzten sich sowohl aus sehr erfahrenen ImkerInnen mit maximal 58 Jahren Imkereierfahrung als auch aus NeueinsteigerInnen mit einem Jahr Imkereierfahrung zusammen. Der Mittelwert der Stichprobe betrug 16,6 Jahre Imkereierfahrung (Standardabweichung: $\pm 15,0$ Jahre). Der Anteil der ImkerInnen mit wenigen Erfahrungsjahren überwog: 53,5% der ImkerInnen hatten bis zu 10 Erfahrungsjahre (106 von 198 TeilnehmerInnen),

weitere 27,8% zwischen 11 und 30 Jahre (55 von 198) und die restlichen 18,7% der TeilnehmerInnen imkerten schon über 30 Jahre (37 von 198).

Die TeilnehmerInnen betrieben zu 78,3% konventionelle Imkerei (155 Betriebe) und zu 21,2% imkerten sie mit einem Biozertifikat (42 Betriebe). Sechs der konventionellen Betriebe gaben jedoch an, in der Umstellung zum Biobetrieb zu sein, und könnten daher eventuell in den nächsten Jahren in die Gruppe der Biobetriebe eingereicht werden.

2.4.3 Ergebnisse Virusdiagnostik

2.4.3.1 Prozesskontrollen

Im Zuge der Probenaufarbeitung wurden sieben Wasserproben als Prozesskontrollen mitgeführt. Alle sieben Prozesskontrollen waren negativ auf Apis-Actin mRNA, ABPV, BQCV, CBPV, DWV-A, IAPV und KBV RNA (kein nachweisbarer Ct-Wert); bei einigen Proben wurden späte Ct-Werte ($> Ct 34$) für DWV-B ($n=1$) und SBV-RNA ($n=5$) beobachtet. Nach Neuextraktion und wiederholter Testung dieser Proben waren alle Proben negativ auf SBV, während eine Probe eine Viruslast unter dem als Grenzwert definierten LOD_{PCR}/LOQ_{PCR} in der DWV-B RT-qPCR zeigte (eine andere Probe als im ersten Durchlauf). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es während der Homogenisation der Proben zu keinen nennenswerten Verschleppungen viruspositiven Materials zwischen den Proben gekommen ist.

2.4.3.2 Negativextraktionskontrollen

Bei einem gewissen Anteil der Negativextraktionskontrollen wurden je nach Virus unterschiedliche Anteile an positiven Virusnachweisen beobachtet. Diese reichten von 0% (BQCV, DWV-A, IAPV, KBV) über 17% (ABPV, SBV) und 25% (CBPV), bis zu 64% (DWV-B). In allen Fällen blieben diese Nachweise in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich, unterhalb des LOQ_{PCR} . Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es im Zuge der Extraktion, bzw. im Zuge der darauffolgenden wiederholten PCR-Untersuchungen ausgehend von denselben Extrakten nicht zu nennenswerten Kreuzkontaminationen der Proben gekommen ist. Ein geringes Ausmaß an Kreuzkontaminationen ist trotz sorgfältiger Aufarbeitung bei den im Rahmen dieses Projektes beobachteten Anteilen an viruspositiven Proben und den teilweise sehr hohen Viruslasten zu erwarten.

2.4.3.3 Semi-quantitativer Nachweis der Apis-Actin mRNA

Die Apis-Actin mRNA war in allen 198 Projektproben eindeutig mit Ct-Werten von 16 bis 25 nachweisbar, was auf eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion und die Abwesenheit nennenswerter Anteile an inhibitorischen Substanzen in den Nukleinsäureextrakten hinweist.

2.4.4 Virusprävalenz und Viruskonzentration

Sechs der untersuchten acht Viren wurden in den Bienenproben des Versuchsjahres 2018 gefunden (Abbildung 2.6), die Viren IAPV und KBV waren in keiner Probe nachgewiesen. Die beiden am häufigsten nachgewiesenen Viren, BQCV und DWV Typ B (DWV-B), waren in fast allen Bienenproben nachweisbar. BQCV war in 191 der 198 Proben (Prävalenz: 96%; 95%CI: 93-98%) und DWV-B in 181 der Proben nachweisbar (91%; 95%CI: 87-95%). ABPV und SBV wurden in etwa der Hälfte der untersuchten Proben gefunden. ABPV war in 106 Proben (54%; 95%CI: 47-60%) und SBV in 123 Proben nachweisbar (62%; 95%CI: 55-69%). CBPV und DWV Typ A (DWV-A) wurden selten nachgewiesen: CBPV in 17 Proben (9%; 95%CI: 5-13%) und DWV-A in 2 Proben (1%; 95%CI: 0-3%).

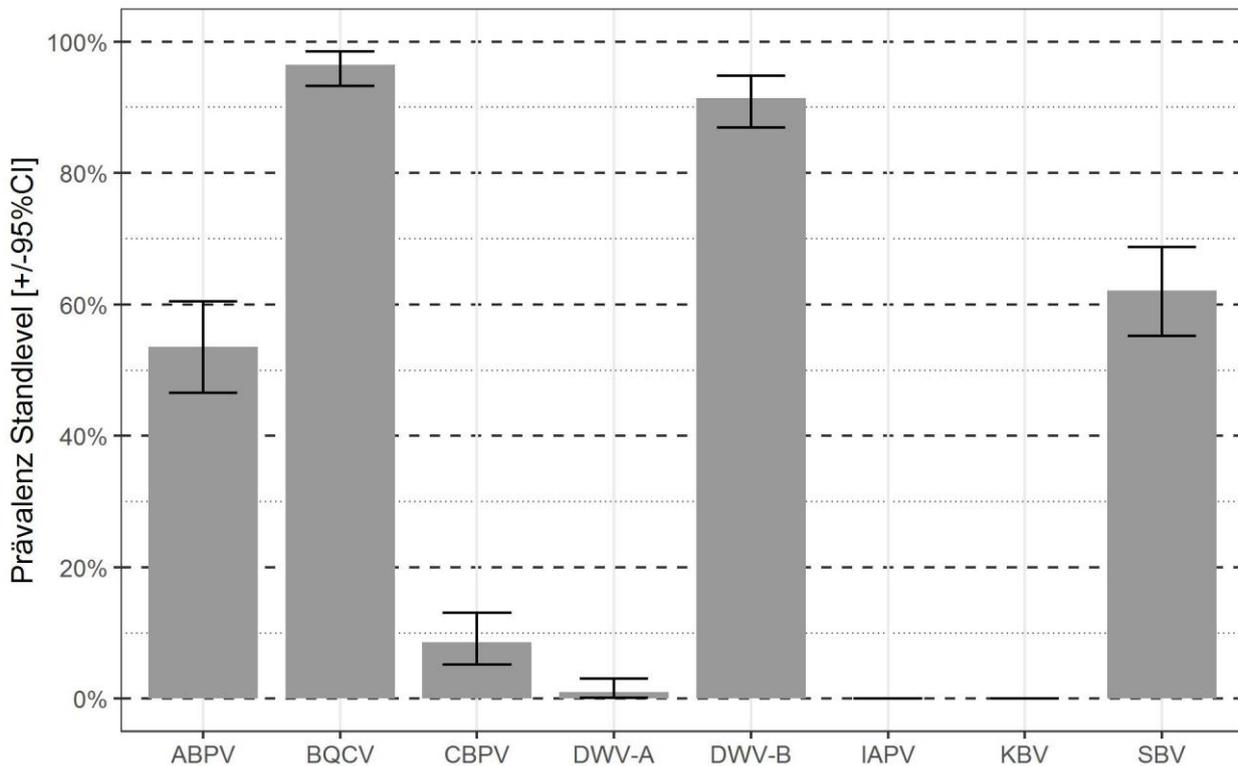


Abbildung 2.6: Prävalenz von acht Viren in Bienenproben vom Herbst 2018 ($\pm 95\%$ CI). Stichprobenumfang: 198 Proben.

In 99% der Proben wurde zumindest ein Virus gefunden (196 von 198 Proben). Die maximale Anzahl an gemessenen Viren pro Probe war fünf (3% der Proben). In den meisten Proben wurden entweder drei Viren (42% der Proben) oder vier Viren (34%) nachgewiesen. In 15% der Proben wurden zwei Viren nachgewiesen, sehr selten nur ein einziger Virus (5% der Proben).

Der Virustiter der positiven Proben variiert bei allen gemessenen Viren um mehrere Zehnerpotenzen. Der minimal gemessene Titer liegt bei allen Viren zwischen 10^4 und 10^5 RNA-Kopien/ml Homogenat. Der maximal gemessene Wert lag zwischen 10^9 und 10^{12} RNA-Kopien/ml Homogenat (Tabelle 2.6, Abbildung 2.7). Anders ausgedrückt, wurden in den Proben zwischen Zehntausenden und mehreren Milliarden RNA-Kopien/ml Homogenat gemessen. Die drei Viren ABPV, BQCV und SBV hatten die geringsten Titer (Median zwischen 10^5 und 10^6 RNA-Kopien/ml Homogenat). Bei diesen drei Virusarten wurden jedoch Einzelwerte von über 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat gemessen. Bei CBPV und DWV-B wurden höhere Virustiter gemessen (Median zwischen 10^6 und 10^7 RNA-Kopien/ml Homogenat). Entsprechend hatten auch etwa 25% der positiven Proben einen Virustiter über 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat. Die statistischen Angaben zum Virus DWV-A sind aufgrund der geringen Stichprobenanzahl von nur zwei positiven Proben nicht aussagekräftig.

Tabelle 2.6: Virustiter der sechs in den Proben nachgewiesenen Viren im Herbst 2018.

Virus	Anzahl positive Proben	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Minimum	Maximum
ABPV	106	$1,10 \times 10^5$	$3,84 \times 10^4$	$1,18 \times 10^7$	$1,60 \times 10^4$	$2,25 \times 10^{11}$
BQCV	191	$7,09 \times 10^5$	$3,49 \times 10^5$	$2,89 \times 10^6$	$2,88 \times 10^4$	$2,77 \times 10^9$
CBPV	17	$1,38 \times 10^8$	$1,64 \times 10^7$	$9,69 \times 10^8$	$1,94 \times 10^4$	$7,10 \times 10^9$
DWV-A	2	$2,14 \times 10^8$	$1,07 \times 10^8$	$3,21 \times 10^8$	$2,48 \times 10^4$	$4,28 \times 10^8$
DWV-B	181	$6,10 \times 10^7$	$1,61 \times 10^6$	$1,17 \times 10^9$	$1,62 \times 10^4$	$1,64 \times 10^{10}$
SBV	123	$1,36 \times 10^5$	$3,95 \times 10^4$	$7,28 \times 10^5$	$1,65 \times 10^4$	$4,08 \times 10^{10}$

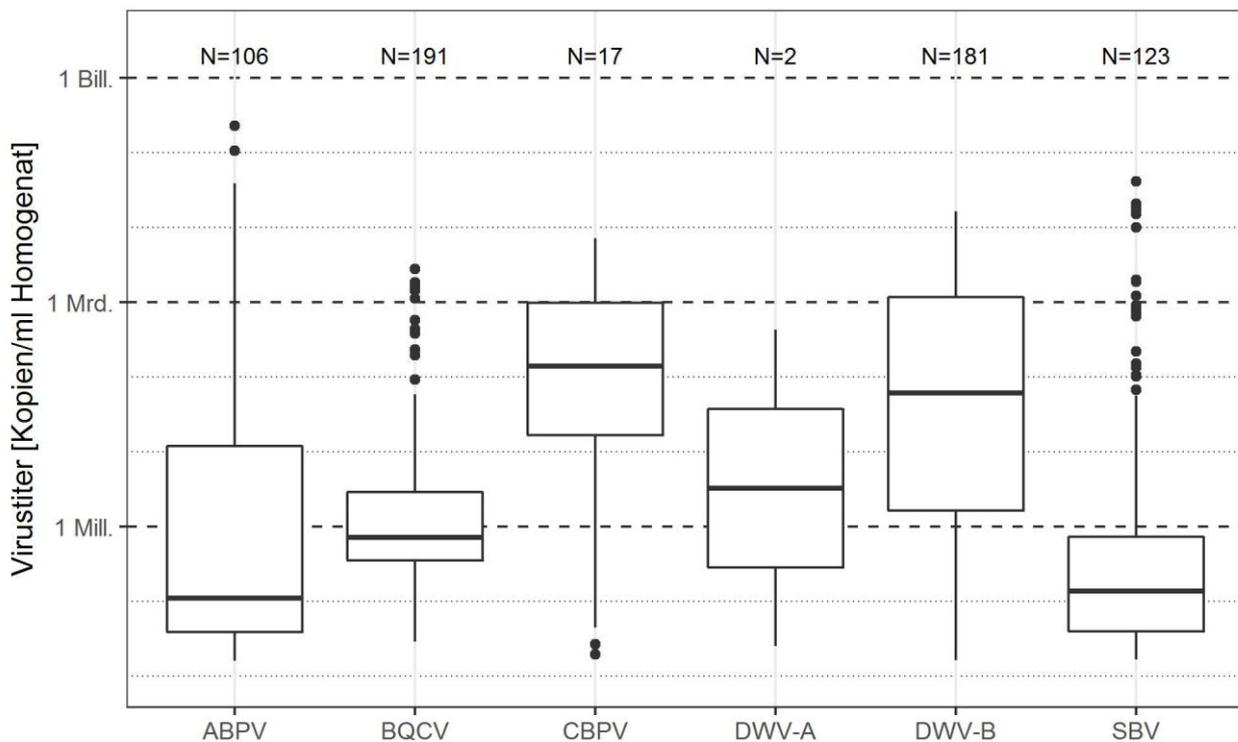


Abbildung 2.7: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren im Herbst 2018. Es sind nur die Werte der positiven Proben gezeigt (N= Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=10⁶); „Mrd.“ Milliarde (=10⁹), „Bill.“ Billion (=10¹²). Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.5 Geographische Varianz in der Virusprävalenz und Viruskonzentration

2.4.5.1 Bundesländer

Die Virusprävalenz von vier der gefundenen Viren unterscheidet sich signifikant zwischen den einzelnen Bundesländern (ABPV, BQCV, DWV-B, SBV, Abbildung 2.8, Tabelle 2.7). Bei allen vier Viren wurden die geringsten Prävalenzwerte in den Bundesländern Kärnten und Tirol und die höchsten Prävalenzwerte im Burgenland gemessen. Für CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen Virusprävalenz und Bundesland gemessen. DWV-A wurde aufgrund der geringen Stichprobe von zwei positiven Werten nicht statistisch ausgewertet. Bei BQCV variiert auch der Virustiter der positiven Proben zwischen den Bundesländern (BQCV, Abbildung 2.9). Auch bei

DWB-B wurde ein Trend zu Unterschieden in der Höhe des Virustiters zwischen den Bundesländern beobachtet, dieser war jedoch nicht signifikant. Bei beiden Viren ist der höchste mediane Virustiter im Burgenland und der geringste mediane Virustiter in Salzburg gefunden worden.

Tabelle 2.7: Virusprävalenz (Konfidenzintervall) nach Bundesländern dargestellt.

Bundesland	Anzahl Proben	ABPV	BQCV	CBPV	DWV-A	DWV-B	SBV
Bgl.	6	83,3% (44,4-99%)	100%	0%	0%	100%	83,3% (44,4-99%)
Ktn	23	34,8% (17,6-55,2%)	95,7% (85,9-99,4%)	4,3% (0,3-17,6%)	4,3% (1,8-8,5%)	69,6% (52,7-83,4%)	30,4% (14,3-50,7%)
NÖ.	39	59% (43,3-73,5%)	94,9% (87,6-98,6%)	2,6% (0,2-10,7%)	0%	92,3% (83,4-97,4%)	76,9% (62,2-88,2%)
OÖ.	42	69% (54,1-81,7%)	100%	16,7% (7,6-29,6%)	0%	100%	52,4% (37,4-67,1%)
Sbg	16	68,8% (44,3-87,5%)	100%	12,5% (2,2-33,6%)	0%	93,8% (79-99,3%)	50% (26,8-73,2%)
Stm.	35	60% (43,4-75,2%)	97,1% (90,6-99,6%)	8,6% (2,2-20,6%)	0%	91,4% (81,6-97,1%)	80% (64,8-90,9%)
Tirol	20	30% (13,1-51,8%)	85% (70,2-94,4%)	5% (0,3-20%)	0%	85% (69,1-94,9%)	50% (29-71%)
Vbg	10	30% (8,4-60,8%)	100%	20% (3,7-49,6%)	0%	100%	60% (29,9-85,5%)
Wien	7	0%	100%	0%	14,3% (6,1-26,5%)	100%	100%

Die Virusprävalenz von ABPV unterschied sich signifikant zwischen den neun Bundesländern ($\chi^2=29,643$; $df=8$; $P<0,001$). Sie variierte zwischen einer maximalen Prävalenz von 83,3% im Burgenland (Konfidenzintervall: 44,4-99%) und einer minimalen Prävalenz von 30% in Tirol (Konfidenzintervall: 13,1-51,8%) und Vorarlberg (Konfidenzintervall: 8,4-60,8%). In Wien wurde ABPV in keiner Probe gefunden. Der Virustiter der ABPV-positiven Proben zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bundesländern ($H=8,185$; $df=7$; $P=0,317$).

Für BQCV unterschied sich sowohl die Virusprävalenz als auch die Höhe des Virustiters bei positiven Proben signifikant zwischen den Bundesländern (Prävalenz: $\chi^2=17,039$; $df=8$; $P=0,03$; Titer: $H=23,277$; $df=8$; $P=0,003$). BQCV ist in Tirol mit 85,0% (Konfidenzintervall: 70,2-94,4%) am seltensten aufgetreten. Im Burgenland, Oberösterreich, Salzburg, Vorarlberg und Wien kam es in 100% der Proben vor. Für Salzburg war der mediane Virustiter am geringsten ($4,2 \times 10^5$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $2,5 \times 10^5$ – $5,2 \times 10^5$ RNA-Kopien/ml Homogenat) und für das Burgenland am höchsten ($5,5 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $2,9 \times 10^6$ – $12,1 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

CBPV trat in allen Bundesländern etwa gleich häufig auf ($\chi^2=10,331$; $df=8$; $P=0,243$). Keine der Proben aus den Bundesländern Burgenland und Wien war positiv auf CBPV. Aufgrund der

geringen Zahl positiver Proben in den einzelnen Bundesländern wurde keine Auswertung des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.9).

Für DWV-A wurden aufgrund der geringen positiven Stichprobenzahl keine statistischen Auswertungen der Virusprävalenz und des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.9).

Die Prävalenz von DWV-B unterschied sich zwischen den neun Bundesländern signifikant ($\chi^2=30,813$; $df=8$; $P<0,001$). In Kärnten trat es mit 69,9% am seltensten auf (Konfidenzintervall: 52,7-83,4%). Im Burgenland, Oberösterreich, Vorarlberg und Wien war es in 100% der Proben vorhanden. Es war ein Trend zu Unterschieden im Virustiter der positiven Proben zu finden ($H=15,171$; $df=8$; $P=0,056$). Dabei wurden die geringsten Werte in Salzburg (Median: $9,7 \times 10^5$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $5,2 \times 10^5$ - $7,6 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat) und die höchsten im Burgenland gemessen (Median: $2,0 \times 10^9$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $0,6 \times 10^9$ - $10,2 \times 10^9$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

Die Prävalenz von SBV unterschied sich zwischen den Bundesländern signifikant ($\chi^2=30,081$; $df=8$; $P<0,001$). In Kärnten wurde es mit einer Prävalenz von 30,4% (Konfidenzintervall: 14,3-50,7%) am seltensten gefunden und in Wien wurde es in 100% der Proben gefunden. Es gab keinen Unterschied in der Höhe der Virusprävalenz zwischen den Proben aus den neun Bundesländern ($H=11,973$; $df=8$; $P=0,152$).

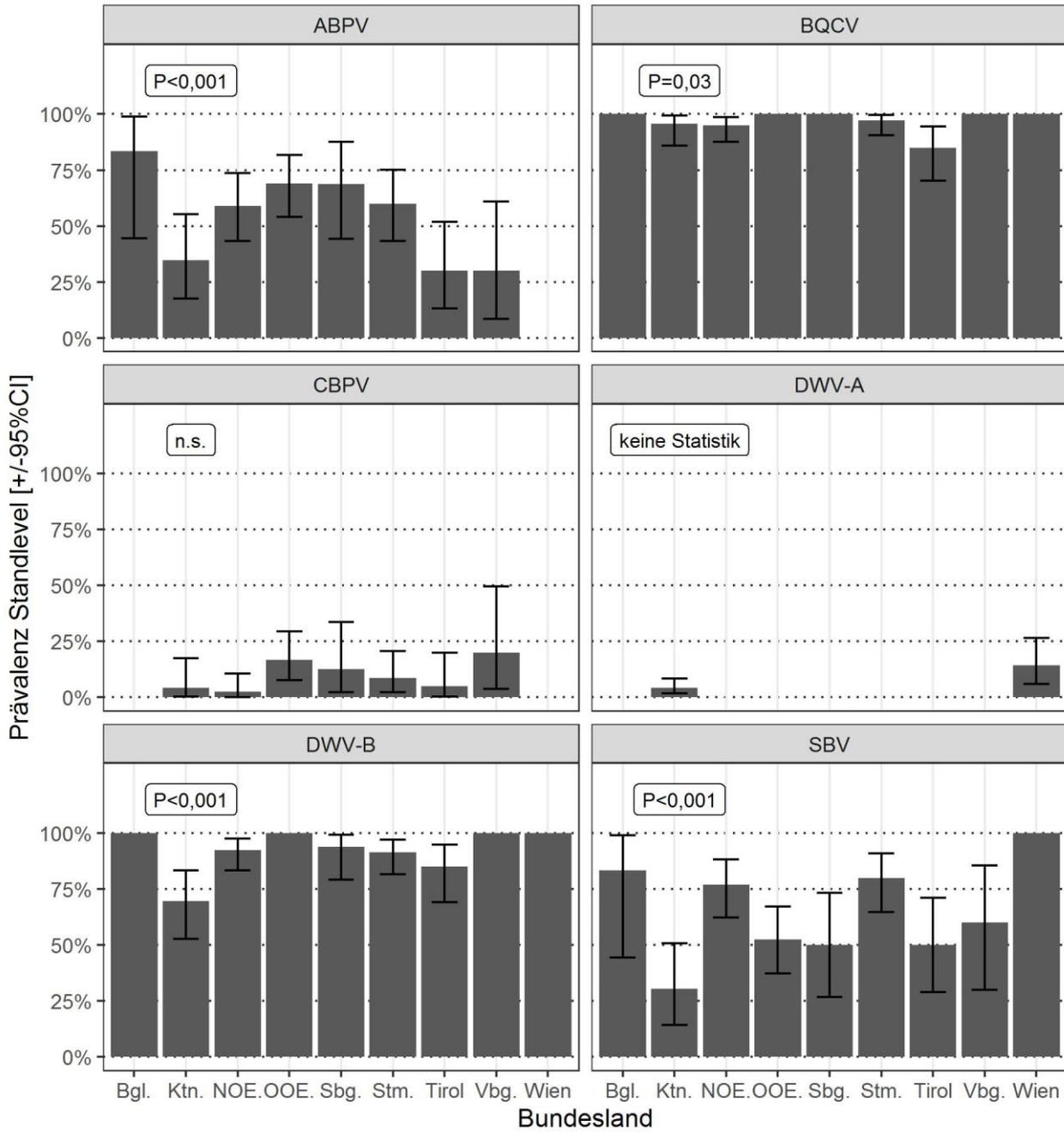


Abbildung 2.8: Virusprävalenz in den neun Bundesländern (\pm 95%CI). Anzahl Stände pro Bundesland: Bgl. N=6; Ktn. N=23; NÖ. N=39;.OÖ. N=42; Sbg. N=16; Stm. N=35; Tirol N=20; Vbg. N=10; Wien N=7.

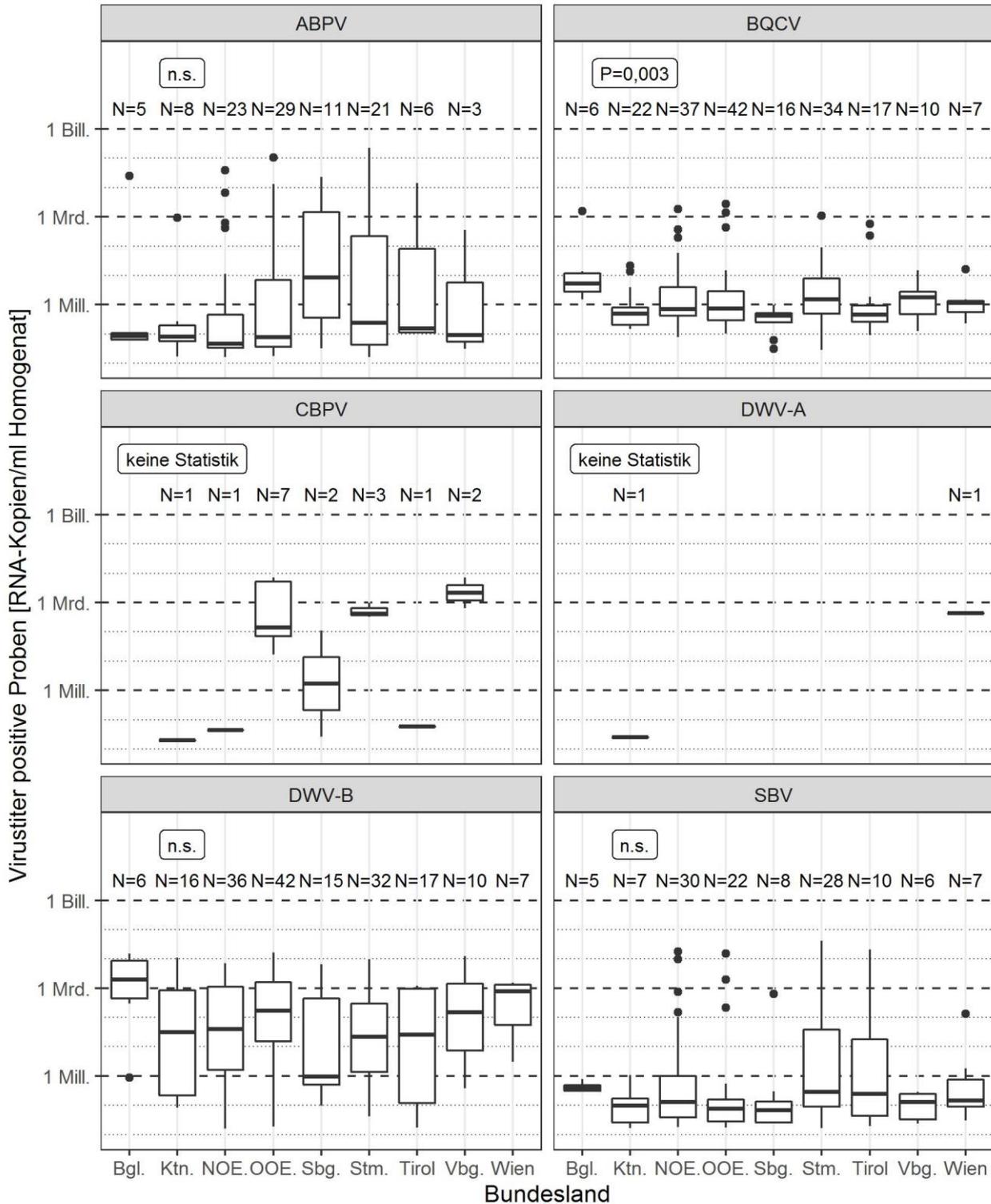


Abbildung 2.9: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den neun Bundesländern (N=Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million; „Mrd.“ Milliarde, „Bill.“ Billion. Statistik in der Grafik: Kruskal-Wallis-Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.5.2 Seehöhe

Entsprechend den orographischen Gegebenheiten bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Seehöhe des Bienenstandes und dem jeweiligen Bundesland ($H=91,337$; $df=8$; $P<0,001$; Abbildung 2.10). Die beschriebenen Unterschiede im Virusauftreten zwischen den Bundesländern könnten auch mit den Unterschieden in der Seehöhe zusammenhängen. Daher wurde diese als zusätzlicher Faktor ausgewertet.

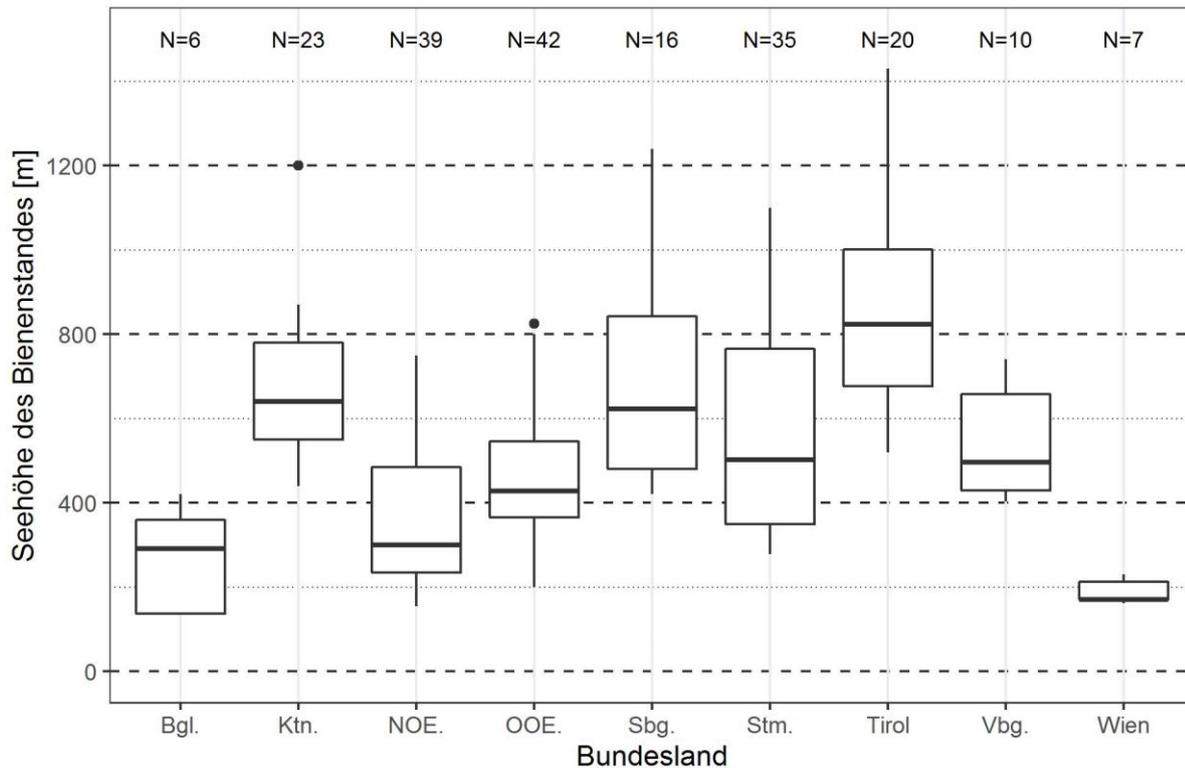


Abbildung 2.10: Seehöhe der Bienenstände nach Bundesländern. N=Anzahl der Proben. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

Die Virusprävalenz von drei der gefundenen Viren unterscheidet sich signifikant zwischen den einzelnen Kategorien für Seehöhe (BQCV, DWV-B, SBV, Abbildung 2.11, Tabelle 2.8). Bei allen drei Viren wurden die niedrigsten Prävalenzwerte über 800 m Seehöhe gefunden. Die höchsten Prävalenzwerte wurden bei BQCV und DWV-B zwischen ≤ 200 m und ≤ 600 m Seehöhe, bei SBV ≤ 200 m Seehöhe gemessen. Für ABPV und CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen Virusprävalenz und Seehöhe festgestellt. DWV-A wurde aufgrund der geringen Stichprobe von zwei positiven Werten nicht statistisch ausgewertet. Bei BQCV und DWV-B variiert auch der Virustiter der positiven Proben mit der Seehöhe (BQCV, DWV-B, Abbildung 2.12). Bei beiden Viren ist der höchste mediane Virustiter bei ≤ 200 m Seehöhe und der geringste mediane Virustiter bei >800 m Seehöhe gefunden worden.

Tabelle 2.8: Virusprävalenz (Konfidenzintervall) nach Seehöhe dargestellt.

Seehöhe [m]	Anzahl Proben	ABPV	BQCV	CBPV	DWV-A	DWV-B	SBV
≤200	13	46,2% (21,4-72,4%)	100%	0%	7,7% (1,8-19,4%)	92,3% (69,9-99,6%)	100%
≤400	57	66,7% (53,7-78,1%)	100%	8,8% (3,3-17,7%)	0%	98,2% (92,4-99,9%)	77,2% (65,5-86,6%)
≤600	58	53,4% (40,5-66,1%)	100%	8,6% (3,3-17,4%)	1,7% (0,4-4,6%)	98,3% (92,5-99,9%)	63,8% (51,3-75,1%)
≤800	42	38,1% (24,3-53,4%)	90,5% (84,3-94,9%)	11,9% (4,6-23,6%)	0%	90,5% (79,1-97%)	47,6% (33,3-62,2%)
>800	28	53,6% (35,2-71,3%)	89,3% (81,1-94,9%)	7,1% (1,3-20,1%)	0%	64,3% (45,6-80,4%)	32,1% (17,2-50,1%)

ABPV trat in den fünf Seehöhe-Kategorien etwa gleich häufig auf ($\chi^2=8,154$; $df=4$; $P=0,087$). Der Virustiter der ABPV-positiven Proben zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seehöhe-Kategorien ($H=0,661$; $df=2$; $P=0,719$).

Für BQCV unterschied sich sowohl die Virusprävalenz als auch die Höhe des Virustiters bei positiven Proben signifikant zwischen den fünf gewählten Seehöhe-Kategorien (Prävalenz: $\chi^2=41,515$; $df=4$; $P<0,001$; Titer: $H=34,942$; $df=2$; $P<0,001$). BQCV ist in >800 m Seehöhe mit 89,3% am seltensten aufgetreten (Konfidenzintervall: 81,1-94,9%). In den Seehöhen ≤200, ≤400 und ≤600 m kam BQCV in 100% der Proben vor. Für >800 m war der mediane Virustiter am geringsten ($2,57 \times 10^5$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $2,11 \times 10^5$ – $3,9 \times 10^5$ RNA-Kopien/ml Homogenat), und für ≤200 m Seehöhe am höchsten ($2,81 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $1,2 \times 10^6$ – $4,41 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

Für CBPV wurden keine Unterschiede in der Virusprävalenz zwischen den Seehöhe Kategorien festgestellt ($\chi^2=3,074$; $df=4$; $P=0,546$). Aufgrund der geringen positiven Probenanzahl in den einzelnen Seehöhe- Kategorien wurde keine Auswertung des Virustiters durchgeführt (siehe Stichprobenzahlen in Abbildung 2.12).

Aufgrund der geringen positiven Stichprobenanzahl für DWV-A wurden weder statistische Auswertungen für die Virusprävalenz noch für den Virustiter durchgeführt.

Die Virusprävalenz von DWV-B unterschied sich signifikant zwischen den fünf Seehöhe-Kategorien ($\chi^2=25,173$; $df=4$; $P<0,001$). In >800 m Seehöhe trat es mit 64,3% am seltensten auf (Konfidenzintervall: 45,6-80,4%). In ≤400 m und ≤600 m Seehöhe war DWV-B mit 98,2% (Konfidenzintervall: 92,4-99,9%) und 98,3% (Konfidenzintervall: 92,5-99,9%) am häufigsten vorhanden. Die Höhe des Virustiters unterschied sich signifikant zwischen den Seehöhe-Kategorien ($H=7,003$; $df=2$; $P=0,03$). Die geringsten Werte wurden in >800 m Seehöhe ($2,22 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $0,27 \times 10^6$ – $32,2 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat) und die höchsten Werte in ≤200 m Seehöhe festgestellt ($7,74 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $0,66 \times 10^6$ – $1,79 \times 10^9$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

Die Prävalenz von SBV unterschied sich zwischen den Seehöhe Kategorien signifikant ($\chi^2=33,692$; $df=4$; $P<0,001$). In >800 m war die Virusprävalenz mit 32,1% am niedrigsten (Konfidenzintervall: 17,2-50,1%) und in ≤200 m wurde es in 100% der Proben gefunden. In der

Höhe des Virustiters wurde zwischen den Seehöhe-Kategorien kein Unterschied festgestellt ($H=4,227$; $df=2$; $P=0,121$).

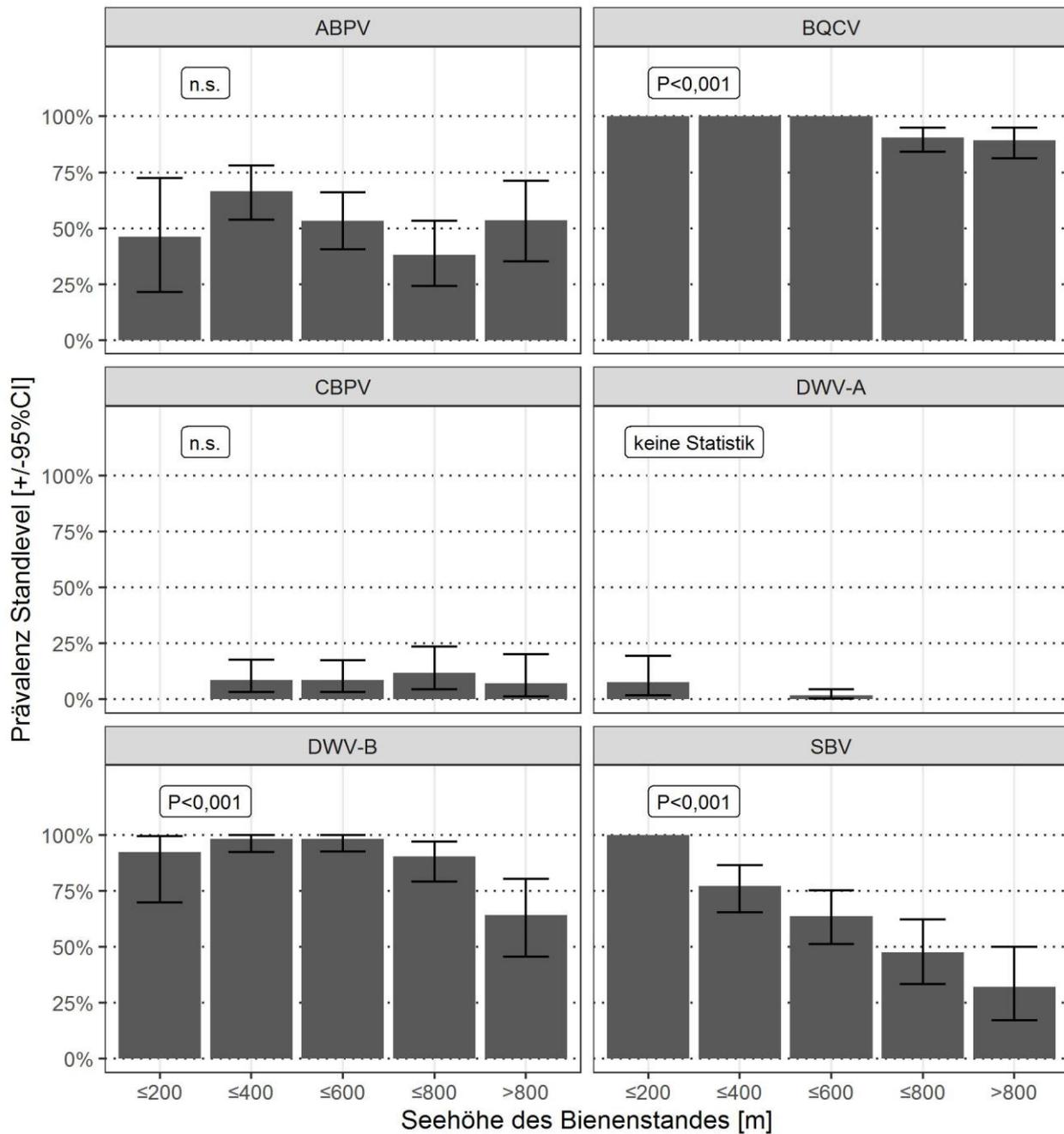


Abbildung 2.11: Virusprävalenz der Bienenstände auf unterschiedlichen Seehöhen ($\pm 95\%$ CI). Anzahl Stände pro Kategorie: ≤ 200 : $N=13$; ≤ 400 : $N=57$; ≤ 600 : $N=58$; ≤ 800 : $N=42$; > 800 : $N=28$.

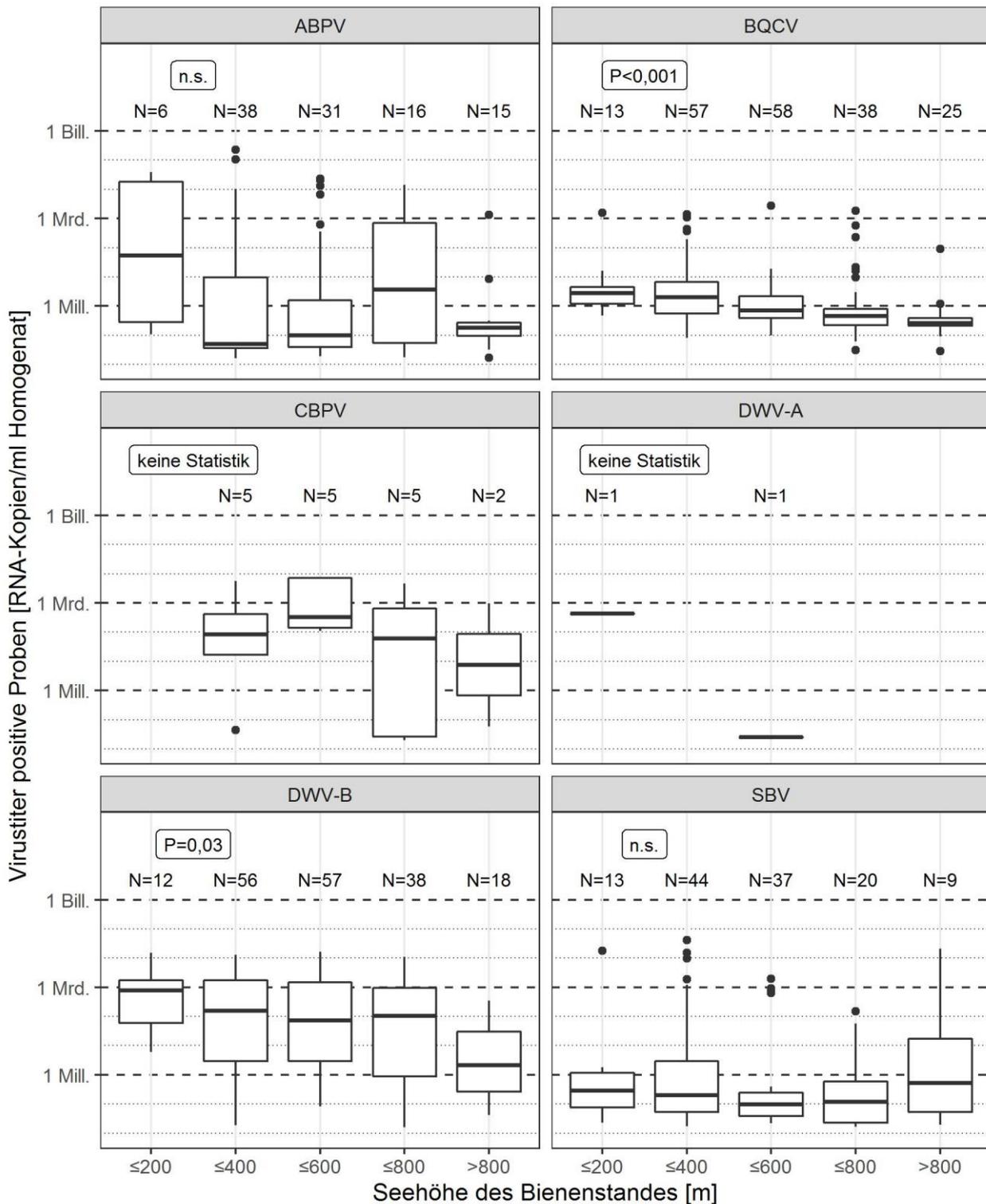


Abbildung 2.12: Virustiter der sechs nachgewiesenen Viren in den positiven Proben in den fünf Kategorien für Seehöhe (N=Anzahl der positiven Proben). „Mill.“ Million (=1x10⁶); „Mrd.“ Milliarde (=1x10⁹); „Bill.“ Billion (=1x10¹²). Statistik in der Grafik: Kruskal-Wallis-Test. Darstellung als Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.6 Zusammenhang Viruskonzentration und Winterverluste

Die Winterverluste (tote Völker) unter den Probenvölkern betragen 16,4% (Konfidenzintervall 12,9-20,2%) und unterschieden sich nicht von den Winterverlusten der Monitoringstände (=Stände, auf dem die Probenahme durchgeführt wurde; Tabelle 2.9). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Modul U sind die Winterverluste auch als „tote + weisellose Völker“ dargestellt.

Tabelle 2.9: Winterverluste unter den Probenvölkern (n=5 pro Stand) und auf den Monitoringständen (N=198 Stände).

Art der Berechnung der Winterverluste	Gruppe	Eingewinter [Anzahl Völker]	Winterverluste [Anzahl Völker]	Winterverluste	Konfidenzintervall
Nur tote Völker	Probenvölker	990	162	16,4%	12,9-20,2%
	Monitoringstand	2959	389	13,1%	10,6-16,0%
Tote + weisellose Völker	Probenvölker	990	191	19,3%	15,8-23,2%
	Monitoringstand	2959	505	17,1%	14,4-20,0%

Bei der Berechnung des Zusammenhanges zwischen Virusaufkommen im September und der Höhe der Winterverluste unter den beprobten Völkern wurden die Daten von fünf Viren berücksichtigt (ABPV, BQCV, CBPV, DWV-B, SBV). Die Daten der restlichen drei Viren flossen nicht in die Berechnung ein, da sie zu selten (DWV-A) waren oder gar nicht aufgetreten sind (IAPV, KBV). Es wurden drei Regression Trees (RTs) gerechnet, die in der Zusammensetzung des Trainingsdatensatzes und damit in der Ausgangslage der Berechnung variierten (Abbildung 2.13).

Die größte Gemeinsamkeit der drei RTs ist ihre Ähnlichkeit in der ersten Entscheidungsebene. Alle drei RTs nehmen den Virustiter von DWV-B als ersten Split und teilen den Datensatz bei einem DWV-B Titer von etwa 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat. Dabei beträgt die vorhergesagte Winterverlustrate in der Gruppe mit einem Titer unter 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat etwa 9% und bei der Gruppe, in der der Titer 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat überschritten wurde, zwischen 34% und 39%.

In allen drei RTs gibt es jeweils zwei Gruppen, für die ein Winterverlust von über 40% vorhergesagt wird. Solche hohen Winterverluste werden unter den folgenden Bedingungen prognostiziert:

- DWV-B Titer $>8 \times 10^8$ und ABPV Titer $>5 \times 10^4$ bzw. $>6 \times 10^8$ (RT 1, RT 2, RT 3)
- DWV-B Titer $>8 \times 10^8$ und BQCV Titer $>4 \times 10^6$ (RT 1, RT 2)
- DWV-B Titer $>6 \times 10^9$ (RT 3)

Die Kombination zwischen hohem DWV-B Titer und hohem ABPV Titer prognostiziert in allen drei RTs hohe Winterverluste. Das lässt daher die Vermutung zu, dass eine Kombination von hohem Titer der beiden Viren DWV-B und ABPV die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes erhöht. Ebenso sagt die Kombination zwischen hohem DWV-B Titer und hohem BQCV Titer in zwei von drei Bäumen sehr hohe Verluste voraus.

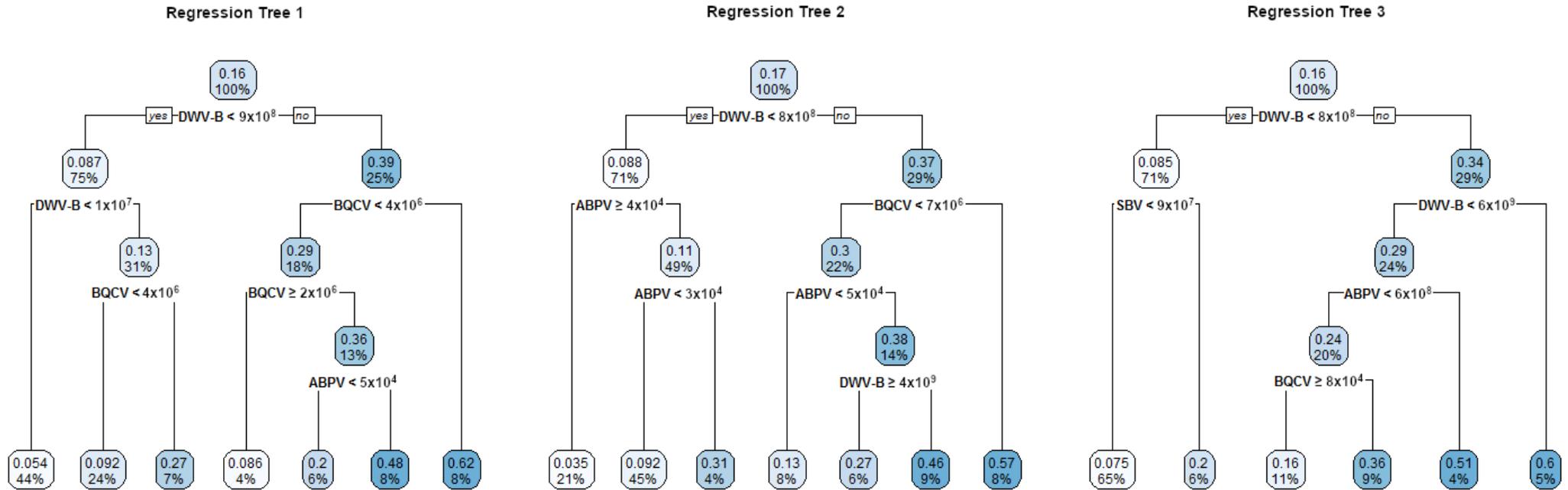


Abbildung 2.13: Zusammenhang zwischen Winterverlusten und Höhe des Virustiters anhand von drei Regression Trees. Die linke Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die Bedingung zutrifft („yes“) und die rechte Abzweigung stellt die Untergruppe dar, auf die die jeweilige Bedingung nicht zutrifft („no“). Die Ergebniskästchen geben in der oberen Zeile die mittlere Höhe der Winterverluste in der entsprechenden Gruppe (0.00 = 0% Winterverlust; 1.00 = 100% Winterverlust) und in der unteren Zeile den Anteil der Stichproben, die in diese Gruppe fallen, an.

Diese Auswertung zeigt das Potential des Anwendens von maschinellen Lernmethoden auf den vorliegenden Datensatz. Es ist jedoch Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse angebracht, da diese aufgrund von nur drei RTs gewonnen wurden. Da die Struktur der RTs stark von der Zusammensetzung des Trainingsdatensatzes abhängt, ist die derzeitige Auswertung zu wenig umfassend um verlässliche Daten zu liefern. Daher sind weiterführende Auswertungen durch Anwendung der Methode „Random Forest“ geplant. Diese Methode basiert ebenfalls auf maschinellem Lernen und entwickelt das Prinzip der Regression Trees weiter. Hier werden viele (je nach Einstellung mehrere tausend) einzelne Regression Trees zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst, um damit die Anfälligkeit von einzelnen Regression Trees auf Änderungen im Trainingsdatensatz ausgleichen zu können. Ähnlich was hier mit drei Bäumen gemacht wurde, kann dann mit mehreren Tausend Bäumen automatisiert (nach vorgegebenen Richtlinien) erfolgen.

Die mittels des Regression Trees gebildeten Klassen können auch dahingehend überprüft werden, ob man zwischen diesen auch signifikante Unterschiede im klassischen statistischen Sinn nachweisen kann. Hierfür wurden beispielhaft die folgenden Grenzwerte gewählt, um zwischen „niedrigem Titer“ und „hohem Titer“ zu trennen: 5×10^4 für ABPV, 4×10^6 und 8×10^8 für DWV-B (Abbildung 2.13).

Betrachtet man die gemeinsamen Auswirkungen des Virustiters von DWV-B und ABPV auf die Winterverluste, variiert der Winterverlust signifikant zwischen den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten ($\chi^2=42,404$; $df=3$; $P<0,001$; Abbildung 2.13 A). Dabei liegt der Winterverlust in der Gruppe „DWV hoch + ABPV hoch“ bei 38,8% (Konfidenzintervall: 28,3-50,0%) und ist damit signifikant höher als in den Gruppen „DWV niedrig + ABPV niedrig“ (10,5%; Konfidenzintervall: 7,0-14,8%) und „DWV niedrig + ABPV hoch“ (6,0%; Konfidenzintervall: 2,3-12,1%). Diese Aussage stimmt mit den Ergebnissen der RTs überein. Die Gruppe „DWV hoch + ABPV hoch“ unterscheidet sich jedoch nicht von der Gruppe „DWV hoch + ABPV niedrig“ (29,1%; Konfidenzintervall: 17,8-42,5%). Das heisst, dass Stände die sowohl einen hohen DWV Titer als auch einen hohen ABPV Titer in den Proben aufwiesen, in etwa gleich hohe Winterverluste hatten, wie Stände, die nur einen hohen DWV Titer aufwiesen. Ein hoher ABPV Titer hatte damit keine zusätzliche schädliche Wirkung zu einem schon vorhandenen hohen DWV Titer.

Die Winterverluste der Probenvölker wurden von der Kombination des Virustiters von DWV-B und BQCV signifikant beeinflusst ($\chi^2=46,41$; $df=3$; $P<0,001$; Abbildung 2.13 B). Dabei waren die Winterverluste in der Gruppe „DWV niedrig + BQCV niedrig“ mit 7,8% am niedrigsten (Konfidenzintervall: 5,0-11,3%) und in der Gruppe „DWV hoch + BQCV hoch“ mit 45,9% am höchsten (Konfidenzintervall: 30,9-61,4%). Dies bestätigt die Aussage der RTs. Interessanterweise unterschieden sich die zwei Gruppen „DWV niedrig + BQCV hoch“ (17,3%; Konfidenzintervall: 8,6-29,2%) und „DWV hoch + BQCV niedrig“ (30,0%; Konfidenzintervall: 21,0-40,1%) nicht signifikant voneinander. Das heisst, die Wintersterblichkeit war ähnlich hoch auf Ständen, in deren Proben ein hoher DWV Titer bei niedrigem BQCV Titer gemessen wurde, wie auf Ständen, auf denen ein hoher BQCV Titer bei niedrigem DWV Titer gemessen wurde.

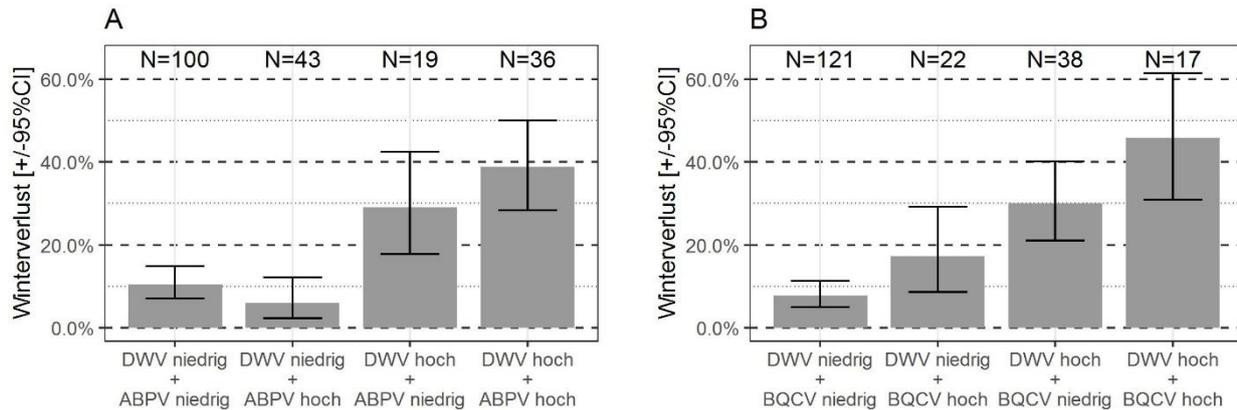


Abbildung 2.13: Zusammenhang zwischen dem Winterverlust ($\pm 95\%CI$) der Probenvölker im Winter 2018/19 und dem Virustiter in den Proben vom September 2018. Es wurden jeweils Kombinationen zweier Virustiter dargestellt: (A) DWV (=DWV-B) und ABPV und (B) DWV und BQCV. DWV niedrig: $\leq 8 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat, DWV hoch: $> 8 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat, ABPV niedrig: $\leq 5 \times 10^4$ RNA-Kopien/ml Homogenat, ABPV hoch: $> 5 \times 10^4$ RNA-Kopien/ml Homogenat, BQCV niedrig: $\leq 4 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat, BQCV hoch: $> 4 \times 10^6$ RNA-Kopien/ml Homogenat

2.4.7 Zusammenhang Virusprävalenz und Viruskonzentration mit den berichteten Symptomen der Völker

2.4.7.1 Totenfall vor dem Bienenvolk

Insgesamt haben 95% der TeilnehmerInnen Angaben zu dem Symptom „Totenfall vor dem Bienenvolk“ gemacht (188 von 198 TeilnehmerInnen). Dieses Symptom wurde auf fünf Ständen vor mindestens einem Probenvolk beobachtet und ist damit auf 2,7% der Stände aufgetreten. Ein erhöhter Totenfall vor dem Bienenvolk kann viele verschiedene Ursachen haben und kann auch ein Hinweis auf eine CBPV Infektion sein. Aufgrund des seltenen Auftretens der Symptomatik war eine Auswertung dieses Merkmals auf Zusammenhang mit CBPV nicht möglich.

2.4.7.2 Varroamilben auf Bienen

94% der TeilnehmerInnen (187 von 198) machten Angaben zu dem Symptom „Varroamilben auf Bienen“ in ihren fünf Probenvölkern (187 von 198). Davon haben 17,6% das Symptom in zumindest einem der Völker beobachtet (33 von 187). „Varroamilben auf Bienen“ ist ein Hinweis auf einen hohen Befall mit Varroamilben und damit einhergehend auf eine Infektion mit DWV. Aufgrund dessen wurde ausschließlich der Zusammenhang zwischen DWV-B und dem Symptom ausgewertet. DWV-A war mit zwei positiven Proben zu selten für eine aussagekräftige Auswertung.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DWV-B und der Beobachtung des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“ festgestellt ($\chi^2=0,342$; $df=1$; $P=0,559$; Abbildung 2.14 A). DWV-B wurde in 93,9% der Proben aus Völkern mit Symptomatik (Konfidenzintervall: 82,3-99,0%) und in 90,9% der Proben aus Völkern ohne Symptome (Konfidenzintervall: 85,7-94,8%) festgestellt.

Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“ und der Höhe des DWV-B Titers bei DWV-positiven Proben festgestellt ($W=2602$; $P=0,084$; Abbildung 2.14 B). Der geringe P-Wert deutet jedoch auf einen Trend zu einem höheren Virustiter bei beobachteter Symptomatik hin (Median= $7,1 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $0,2 \times 10^8$ - $16,2 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat), im Vergleich zu nicht beobachteter Symptomatik

(Median= $4,0 \times 10^7$ RNA-Kopien/ml Homogenat; Q1-Q3: $0,2 \times 10^7$ - $85,1 \times 10^7$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

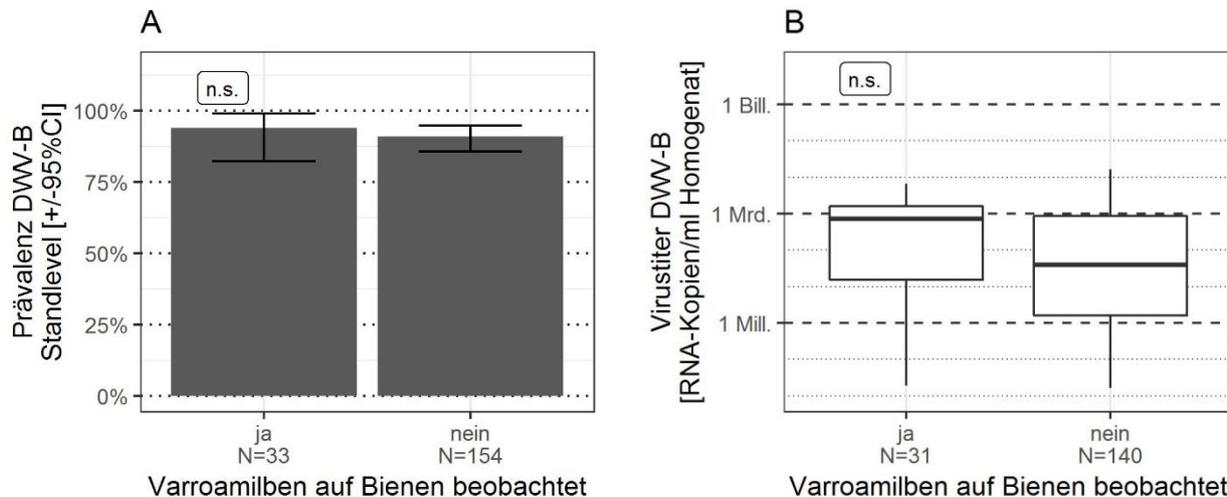


Abbildung 2.14: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von DWV-B bzw. (B) dem Titer der DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „Varroamilben auf Bienen“. „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker Varroamilben auf Bienen beobachtet; „nein“ in keinem der fünf Probenvölker Varroamilben auf Bienen beobachtet; „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million ($=1 \times 10^6$); „Mrd.“ Milliarde ($=1 \times 10^9$); „Bill.“ Billion ($=1 \times 10^{12}$). Statistik in der Grafik: (A) GLM mit quasibinomiale Verteilung; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.7.3 Bienen mit verkrüppelten Flügeln

93,9% der ImkerInnen haben Angaben zum Symptom „verkrüppelte Flügel“ gemacht (186 von 198 TeilnehmerInnen). Davon haben 10,2% der ImkerInnen das Symptom in mindestens einem Probenvolk beobachtet (19 von 186) und 89,8% der ImkerInnen das Symptom in keinem der Probenvölker beobachtet (167 von 186). Da verkrüppelte Flügel ein Symptom für eine DWV Infektion sind, wurde der Zusammenhang zwischen der Symptomatik und dem Virus DWV-B ausgewertet. DWV-A war mit zwei positiven Proben zu selten für eine aussagekräftige Auswertung.

DWV-B wurde signifikant häufiger in Proben von Ständen nachgewiesen, in deren Probenvölkern die Symptomatik „verkrüppelte Flügel“ beobachtet wurde, als auf Ständen mit Probenvölkern ohne Symptomatik ($\chi^2=3,983$; $df=1$; $P=0,046$). In 100% der Proben von Ständen mit symptomatischen Probenvölkern und in 90,4% der Proben von Ständen ohne Symptomatik (Konfidenzintervall: 85,6-94,1%) wurde DWV-B nachgewiesen (Abbildung 2.15 A).

Die DWV-positiven Proben von Ständen mit symptomatischen Probenvölkern wiesen einen signifikant höheren DWV-B Titer auf als die Proben von Ständen mit nicht-symptomatischen Probenvölkern ($W=2117$; $P<0,001$). DWV-B positive Proben von Ständen, in deren Probenvölkern das Symptom „verkrüppelte Flügel“ beobachtet wurde, hatten im Median einen DWV-B Titer von $1,2 \times 10^9$ RNA-Kopien/ml Homogenat (Q1-Q3: $0,5 \times 10^9$ - $4,0 \times 10^9$ RNA-Kopien/ml Homogenat). DWV-B positive Proben von Ständen mit Probenvölkern ohne das Symptom hatten im Median einen DWV-B Titer von $3,8 \times 10^7$ RNA-Kopien/ml Homogenat (Q1-Q3: $0,1 \times 10^7$ - $88,0 \times 10^7$ RNA-Kopien/ml Homogenat).

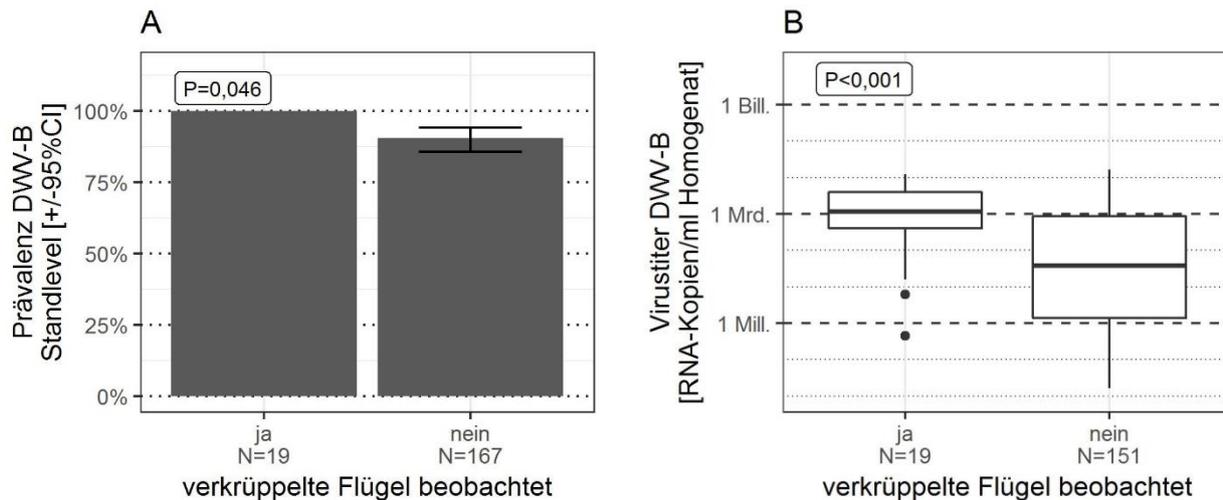


Abbildung 2.15: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von DWV-B bzw. (B) dem Titer der DWV-B positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „verkrüppelte Flügel“. „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker Varroamilben auf Bienen beobachtet; „nein“ in keinem der fünf Probenvölker Varroamilben auf Bienen beobachtet. „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million ($=1 \times 10^6$); „Mrd.“ Milliarde ($=1 \times 10^9$); „Bill.“ Billion ($=1 \times 10^{12}$). Statistik in der Grafik: (A) GLM mit quasibinomiale Verteilung; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.7.4 Schwarz-glänzende Bienen

94% der teilnehmenden ImkerInnen haben Angaben zu dem Symptom „schwarz-glänzende Bienen“ in ihren Probenvölkern gemacht (188 von 198 TeilnehmerInnen). Davon haben 32,4% das Symptom beobachtet (61 von 188) und 67,6% das Symptom nicht beobachtet (127 von 188). Da schwarz-glänzende Bienen ein Symptom für CBPV sein können, wurden die Daten auf Korrelation zwischen CBPV und der beobachteten Symptomatik ausgewertet.

CBPV trat signifikant häufiger in Proben auf, wenn bei der Probenahme schwarz-glänzende Bienen in den Probenvölkern beobachtet wurden, als in Proben, bei deren Probenahme keine schwarz-glänzenden Bienen beobachtet wurden ($\chi^2=4,166$; $df=1$; $P=0,041$; Abbildung 2.16 A). In 14,7% der Proben von Ständen, deren Probenvölker die Symptomatik aufwiesen, wurde CBPV nachgewiesen (Konfidenzintervall: 7,3-25,1%). Im Gegensatz dazu war dies nur in 5,5% der Proben von Ständen mit Probenvölkern ohne Symptomatik der Fall (Konfidenzintervall: 2,4-10,4%).

Insgesamt liegen 16 Proben vor, in denen CBPV nachgewiesen wurde und die Information über das Auftreten des Symptoms „schwarz-glänzende Bienen“ vorhanden ist (Abbildung 2.16 B). Der Median der CBPV positiven Proben lag bei $1,1 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat (Q1-Q3: $5,8 \times 10^4$ - $4,1 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat), wenn das Symptom beobachtet wurde, und bei $3,3 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat (Q1-Q3: $0,4 \times 10^8$ - $63,3 \times 10^8$ RNA-Kopien/ml Homogenat), wenn das Symptom nicht beobachtet wurde. Der Unterschied ist damit nicht signifikant ($W=22$; $P=0,351$).

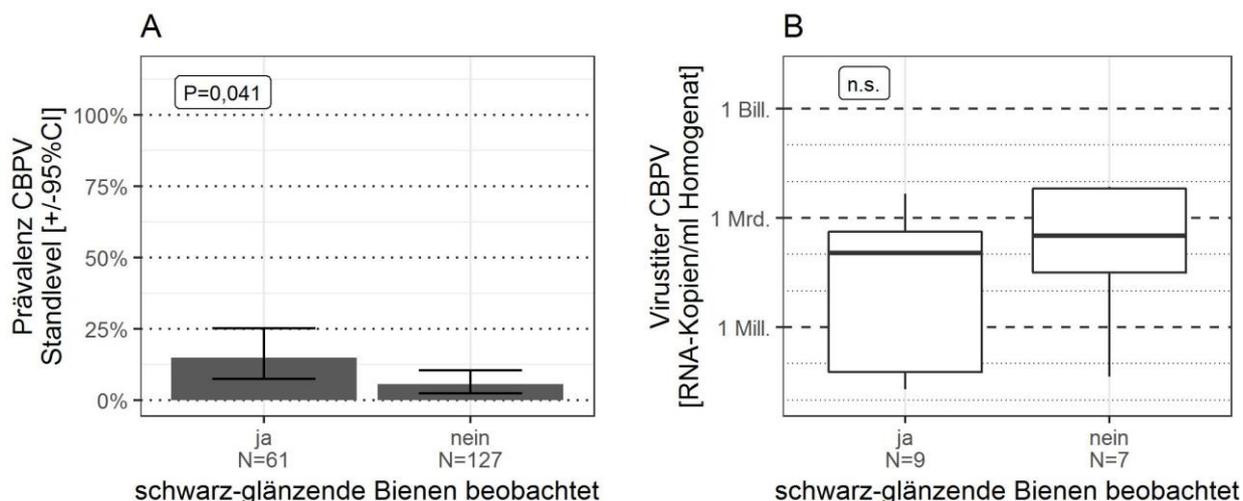


Abbildung 2.16: Zusammenhang zwischen der (A) Prävalenz von CBPV bzw. (B) dem Titer der CBPV positiven Proben mit dem Auftreten des Symptoms „schwarz-glänzende Bienen“. „ja“: in zumindest einem der fünf Probenvölker schwarz-glänzende Bienen beobachtet; „nein“ in keinem der fünf Probenvölker schwarz-glänzende Bienen beobachtet. „n“ Probenanzahl; „Mill.“ Million ($=1 \times 10^6$); „Mrd.“ Milliarde ($=1 \times 10^9$); „Bill.“ Billion ($=1 \times 10^{12}$). Statistik in der Grafik: (A) GLM mit quasibinomiale Verteilung; (B) Kruskal-Wallis-Test. Boxplot Diagramm: dicker Mittelstrich: Median; untere/obere Grenze der Box: unteres/oberes Quartil; Antennen: maximal 1,5-facher Interquartilsabstand.

2.4.7.5 Sackbrutsymptome

Insgesamt haben 94% der TeilnehmerInnen Angaben zu Sackbrut-Symptomen gemacht (187 von 198 TeilnehmerInnen). Sackbrutsymptome wurden auf vier Ständen in mindestens einem Probenvolk beobachtet und sind damit auf 2,1% der Stände aufgetreten. Aufgrund des seltenen Auftretens des Symptoms war eine Auswertung auf Zusammenhang mit SBV nicht möglich.

2.5 Diskussion

2.5.1 Repräsentativität der StudienteilnehmerInnen

Vorrangiges Ziel des Virenmonitorings ist es, eine für Österreich repräsentative Aussage über die Prävalenz von Bienenviren zu machen. Deswegen wurde bei der Auswahl Sorge getragen, dass eine geographische Repräsentativität der einzelnen Bundesländer gewährleistet ist (Tabelle 2.2). Dies wurde erreicht, indem die TeilnehmerInnen anhand der Bundesländer-Zugehörigkeit ihrer Bienenstände aus den freiwilligen Meldungen ausgewählt wurden.

Auch die Winterverluste 2018/19 der StudienteilnehmerInnen sind repräsentativ für Österreichs ImkerInnen. Sie unterscheiden sich nicht signifikant von den Winterverlusten der COLOSS-Studie (= Ergebnisse des Moduls U der vorliegenden Studie). Bei der COLOSS-Studie haben 1534 Imkereibetriebe teilgenommen und es wurde ein Winterverlust von 15,2% der Völker (Konfidenzintervall: 14,4-16,1%) gemeldet (Winterverlust = tote und im Frühling weisellose Völker). Die Monitoringstände im Virenmonitoring hatten einen Winterverlust von 17,1% der Völker (Konfidenzintervall: 14,4-20,0%; Tabelle 2.9). Die überlappenden Konfidenzintervalle zeigen, dass sich diese Werte nicht signifikant unterscheiden und das Virenmonitoring trotz wesentlich kleinerer Stichprobe die diesjährigen Winterverluste für Österreich repräsentativ abbildet.

Die Repräsentativität der Stichprobe ist für die Kenngrößen Imkererfahrung, Betriebsgröße und Biozertifizierung vermutlich nicht voll gegeben. Leider liegen uns diese Kenngrößen für die Österreichische Imkerschaft nicht vor, wir können sie jedoch teilweise mit den Daten der COLOSS-Studie vergleichen, die eine wesentlich größere Stichprobe aufweist. So sind wahrscheinlich die

jungen unerfahrenen ImkerInnen in der Stichprobe des Virenmonitoring überrepräsentiert, da etwa die Hälfte aller teilnehmenden ImkerInnen weniger als elf Jahre Imkererfahrung aufweisen. Ebenso sind die Imkerbetriebe mit weniger als 20 Völkern im Vergleich zu COLOSS-Studien unterrepräsentiert (Virenmonitoring: 42,9% der TeilnehmerInnen; COLOSS-Studien: >70%, Brodschneider et al., 2018b). Der Anteil an Bio-zertifizierten Imkereien scheint mit 21,2% der TeilnehmerInnen ebenso über dem österreich-weiten Schnitt zu liegen. In den COLOSS-Studien lag der Anteil der Bio-zertifizierten Imkereien bei etwa 10% (Brodschneider & Karrer, 2018; Brodschneider et al, 2018b).

Die beschriebenen Abweichungen der drei Kenngrößen kommen vermutlich aufgrund der TeilnehmerInnen-Aquisition mittels freiwilligen Meldungen zustande. Bei Gesprächen oder in Emails nannten die TeilnehmerInnen vorrangig drei Gründe für die Teilnahme an der Studie: die Bereitschaft die wissenschaftliche Forschung zum Thema Bienenviren zu unterstützen, die Möglichkeit exakte Daten über Virusinfektionen in den eigenen Völkern zu erhalten und das Interesse, sich Wissen über das Thema Bienenviren anzueignen. Aus dieser Motivation heraus war eine Teilnahme an dem Projekt und damit eine freiwillige Meldung vor allem für JungimkerInnen und NeueinsteigerInnen interessant, die die Chance wahrnahmen ihr Wissen zu erweitern. Ebenso ist das vermehrte Interesse von Bioimkereien erklärbar, die aufgrund ihrer Betriebsweise einen besonderen Fokus auf Prävention und damit auf das sichere Erkennen von Krankheiten haben. Die geringe Beteiligung von kleinen Imkereibetrieben lag zum Teil an der Projektanforderung von minimal fünf Probenvölkern, die einen Teil der ImkerInnen ausschloss. Um die beschriebenen Abweichungen zu vermeiden, hätte man eine Zufallsauswahl aus dem österreichweiten Bienenstandsregister (VIS) durchführen müssen. Dies war leider aus rechtlichen Gründen nicht möglich.

2.5.2 Prävalenzlevel

Die errechneten Prävalenzwerte können als Prävalenzwerte auf Bienenstand-Niveau betrachtet werden. Der Bienenstand ist eine epidemiologische Einheit, da aufgrund der gruppenweisen Aufstellung auf engem Raum (Blockaufstellung, große Zahl von Bienenvölkern auf einem Bienenstand), imkerlicher Eingriffe (gleiches Werkzeug für alle Bienenvölker, Wechsel von Beutenteilen, Rähmchen, Futter- und Brutwaben zwischen Völkern, etc.) und Verhalten der Bienen (Verflug der Arbeiterinnen und Drohnen, Räuberei in anderen Standvölkern, auf anderen Ständen und bei Völkern außerhalb der imkerlichen Obhut) ein ständiger Austausch von viruskontaminiertem Material zwischen den Völkern zu erwarten ist. Deswegen haben wir in der vorliegenden Studie die fünf eingesandten Bienenproben eines Standes zu jeweils einer Sammelprobe zusammengefasst und untersucht. Mit einer Sammelprobe aus mehreren Völkern steigt die Wahrscheinlichkeit, dass alle häufig auf einem Stand vorkommenden Bienenviren in der Sammelprobe enthalten sind und das gesamte Virusspektrum auf dem Bienenstand damit beschrieben werden kann (Tentcheva et al., 2004; Mouret et al., 2013).

Die Bienenproben vom September 2018 wurden insgesamt auf acht Bienenviren getestet, wovon sechs Viren in mindestens einer Probe gefunden wurden. Die beiden Viren BQCV und DWV-B waren am häufigsten und wurden in über 90% der Proben gefunden (Abbildung 2.6). SBV und ABPV traten signifikant seltener auf als BQCV und DWV-B und wurden in etwa der Hälfte aller Proben nachgewiesen. CBPV trat mit rund 10% Häufigkeit signifikant seltener als die vier genannten Viren, aber häufiger als DWV-A auf. IAPV und KBV wurden in keiner der 198 untersuchten Proben detektiert.

Vorhergehende österreichische Daten zeigen nur teilweise ein vergleichbares Bild, wenn man die Reihung der Prävalenz zwischen den Viren vergleicht. In der Vorgängerstudie „Zukunft Biene“

wurden 210 Bienenproben, die im September 2015 genommen wurden, auf ABPV, CBPV, DWV-A und DWV-B untersucht (Morawetz et al., 2018). ABPV ist damals signifikant häufiger in Bienenproben gefunden worden als die anderen drei Viruspezies und die Häufigkeit von DWV-A und DWV-B unterschied sich nicht signifikant. Auch in einer früheren österreichischen Studie, die Proben von 43 asymptomatischen Völkern im Jahr 2009 auf sechs Viren untersuchte, war ABPV gemeinsam mit SBV das am häufigsten nachgewiesene Virus, gefolgt von BQCV und DWV (Köglberger et al., 2009). Das negative Untersuchungsergebnis für IAPV und KBV stimmt mit früheren österreichischen Untersuchungen überein, in denen diese Viren entweder gar nicht oder nur in Einzelfällen detektiert wurden (Köglberger et al., 2009; Girsch & Moosbeckhofer, 2012; Moosbeckhofer & Mayr, 2014). Ein Vergleich der absoluten Häufigkeiten mit den Vorgängerstudien ist nicht sinnvoll, da diese das Virusauftreten in Einzelvölkern gemessen haben und damit nicht mit den Daten aus Sammelproben des vorliegenden Projektes vergleichbar sind. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Jahren wird ab Vorliegen der Daten des Versuchsjahres 2019 möglich sein.

DWV-B war im September 2018 am zweithäufigsten auf den Bienenständen zu finden (91%; 95%CI: 87-95%), während DWV-A sehr selten auftrat (1%; 95%CI: 0-3%). Im Vorgängerprojekt „Zukunft Biene“ wurde DWV-A zwar tendenziell seltener als DWV-B gefunden, doch die beiden unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Morawetz et al., 2018). Doch in den beiden Projekten wurden unterschiedliche Detektionsmethoden angewandt: während im vorliegenden Projekt die vom EU-RL empfohlenen Methoden zum Einsatz kamen, wurde im Vorgängerprojekt die Methode von Highfield (2009) verwendet. Eine Überprüfung von Unterschieden in der Detektion zwischen den beiden Methoden ist geplant.

Die vier Viren ABPV, BQCV, DWV-B, SBV unterschieden sich in der Prävalenz zwischen den neun Bundesländern (Abbildung 2.8). Dabei war bei allen vier Viren ein ähnliches Muster zu erkennen. Stände aus Tirol und Kärnten hatten die geringsten Prävalenzen, während Stände im Burgenland und meist auch Wien die höchsten Prävalenzen aufwiesen. Diese Unterschiede stehen wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Seehöhe, da die teilnehmenden Bienenstände in Tirol und Kärnten zusammen mit den Bienenständen in Salzburg am höchsten gelegen sind, während die Bienenstände in Wien und Burgenland im Flach- und Hügelland lagen (Abbildung 2.10). Tatsächlich war für die Viren BQCV, DWV-B und SBV die Prävalenz auf Ständen in größerer Seehöhe signifikant niedriger als auf tiefer gelegenen Ständen (Abbildung 2.11).

Der Zusammenhang zwischen der Virus-Prävalenz und der Seehöhe ist wahrscheinlich durch klimatische und ökologische Faktoren bedingt, die sowohl Einfluss auf die Vegetation und die Art der Landnutzung als auch auf die Entwicklung der Bienenvölker haben. So hat die durch die klimatischen Bedingungen bedingte kürzere Brutzeit der Völker in höheren Lagen einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung der Varroa-Population und damit auf die Verbreitung von Varroa-assoziierten Viren wie DWV, SBV und vermutlich auch BQCV im Bienenvolk (McMenamin & Genersch, 2015; Sumpter & Martin, 2004). Es ist außerdem zu vermuten, dass die Dichte der Bienenvölker in höheren Regionen geringer ist als in niedrigeren Lagen. Mit einer geringen Völkerdichte sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass Varroamilben und die von ihnen verbreiteten Viren zwischen Bienenvölkern durch Räuberei, Bienen-Verflug oder Kontakte bei Blütenbesuchen übertragen werden (Peck et al., 2016; Forfert et al., 2015; Nolan & Delaplane, 2016). Ebenso ist es zu erwarten, dass sich die Höhenlagen durch Unterschiede im Futterpflanzenspektrum und der Pflanzendiversität unterscheiden. Da die Ernährung einen wichtigen Einfluss auf die Gesundheit und Abwehrkräfte eines Volkes besitzt, können ungünstige Ernährungssituationen mitverantwortlich für die Ausbreitung von Viren in Bienenvölkern sein (DeGrandi-Hoffman & Chen,

2015; Alaux et al., 2017). Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungsjahre werden zeigen, ob der Zusammenhang zwischen Virusprävalenz und Seehöhe regelmäßig auftritt.

2.5.3 Höhe Virustiter

Der Virustiter bewegte sich bei allen sechs positiv getesteten Viren in einer sehr großen Spannweite zwischen fünf und acht Zehnerpotenzen. Viren können in Bienen sowohl als verdeckte Infektionen als auch als im Zuge einer offen ausgebrochenen Krankheit vorhanden sein. Bei einer verdeckten Infektion (covert infection) sind der infizierten Biene keine Symptome anzumerken, während eine Biene bei einer offenen Infektion (overt infection) Symptome der entsprechenden Viruserkrankung zeigt (Yue et al., 2007). Eine offene Virusinfektion ist in der Regel mit einem hohen Virustiter verbunden, während verdeckte Infektionen einen geringen Virustiter aufweisen (Zioni et al., 2011; Schurr et al., 2019). Die große Spannweite im Virustiter zeigt daher, dass sich die Bienenproben in der Art der Infektion – also offen oder verdeckt – unterscheiden. Zusätzliche Variation in der Spannweite entsteht dadurch, dass sich die Sammelprobe aus insgesamt 50 Bienen zusammensetzte, von denen jedes einzelne Individuum in seinem Infektionsgrad zwischen einer nicht vorhandenen, einer verdeckter und einer offener Infektion variieren kann.

Bei DWV-B war das Auftreten einer offenen Infektion mit einem signifikant erhöhten Virustiter verbunden. Verkrüppelte Flügel und Varroamilben auf Bienen sind Symptome für eine offene DWV-Infektion (Bowen-Walker et al., 1999). Tatsächlich hatten die Proben einen signifikant höheren DWV-B Titer, wenn Bienen mit verkrüppelten Flügeln in mindestens einem Volk beobachtet wurden. Ebenso gibt es einen Trend zu einem erhöhten Virustiter bei der Beobachtung von Varroamilben auf Bienen.

Bei CBPV wurde kein Zusammenhang zwischen der Höhe des Virustiters und zwei Symptomen für CBPV festgestellt (Abbildung 2.16). Symptome für eine offene CBPV-Infektion sind unter anderem schwarz-glänzende Bienen und ein erhöhter Totenfall vor dem Volk (Ribière et al., 2010). Zwar war das Auftreten des Virus signifikant häufiger auf Ständen mit Beobachtungen von schwarz-glänzenden Bienen als auf Ständen ohne diese Beobachtung. Doch auch wenn das Symptom beobachtet wurde, lag die Wahrscheinlichkeit bei nur 14,7% (Konfidenzintervall: 7,3-25,1%), dass die Probe positiv auf CBPV getestet wurde. Die Beobachtung des Symptoms war daher kein verlässlicher Hinweis auf das Auftreten von CBPV. Bienen sehen schwarz-glänzend aus, weil die Haare auf ihrem Abdomen abbrechen. Nur können diese Haare auch aus anderen Gründen (Räuberei, Waldtrachtkrankheit, erbliche Schwarzsucht) oder generell aufgrund des hohen Alters der Biene verloren gehen. Diese Bienen können mit den CBPV-geschädigten schwarz-glänzenden Bienen verwechselt werden. Ein erhöhter Totenfall vor dem Volk, das zweite abgefragte CBPV-Symptom, wurde zu selten beobachtet um ausgewertet zu werden.

Sackbrutsymptome wurden ebenfalls zu selten beobachtet um sie aussagekräftig auszuwerten.

2.5.4 Winterverluste

Die Auswertungen zum Zusammenhang zwischen Winterverlusten und Virusauftreten sind noch in Arbeit. Es zeigt sich jedoch selbst bei diesem Auswertungsstand der klare Zusammenhang zwischen einem hohen DWV-Titer und hohen Winterverlusten in den Probenvölkern. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Vorgängerstudie sowie aus anderen europäischen Ländern überein (Berthoud et al., 2011; Highfield, 2009; Morawetz et al., 2018). Die vorliegende Auswertung weist darauf hin, dass sehr hohe Winterverluste ab einem DWV-B Titer von etwa 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat auftreten (Abbildung 2.16). Dies ist insofern bemerkenswert, da auch die DWV-Symptome „Varroamilben auf Bienen“ und „verkrüppelte Bienen“ vermehrt ab einem DWV-B Titer von 10^9 RNA-Kopien/ml Homogenat beobachtet wurden (Abbildungen 2.14, 2.15). Unsere Daten

sind damit ein klarer Hinweis, dass Völker schon nachhaltig durch DWV und die Varroamilbe geschädigt sind, wenn der Imker/die Imkerin klare Symptome von DWV beobachten kann. Der enge Zusammenhang zwischen Winterverlusten und dem beobachteten Symptom verkrüppelte wurde ebenfalls in den Untersuchungen des Moduls U für diesen Winter gezeigt. Außerdem bestätigen sie die Bedeutung einer effektiven Varroakontrolle im Sommer um das Ausbrechen einer offenen DWV-Infektion mit sichtbaren Symptomen zu verhindern und die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes zu reduzieren (Dainat & Neumann, 2013; Locke et al., 2017).

2.5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Nach Abschluss des ersten Versuchsjahres liegen nun die ersten österreichweit repräsentativen Daten über die Virusprävalenz von acht Bienenviren vor. Um dies zu erreichen wurden die RT-qPCR-Methoden für die entsprechenden acht Viren etabliert und validiert. Ebenso wurde erfolgreich eine funktionierende Probenahme-Logistik aufgebaut und ein guter Kontakt mit den teilnehmenden ImkerInnen hergestellt. Die Detailauswertung der Ergebnisse wurde begonnen, in der unter anderem eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe des Virustiters und der Virussyptomatik bei DWV-B beobachtet wurde.

Die Daten der nächsten zwei Versuchsjahre werden es erlauben Aussagen über die Varianz der Virusprävalenz zwischen verschiedenen Jahren zu machen. Außerdem wird durch die mehrjährigen Untersuchungen die Menge verfügbarer Daten erhöht, was die Aussagekraft bezüglich der Zusammenhänge zwischen Virustiter und Winterverlusten bzw. Virussyptomatik erhöhen kann. Des Weiteren werden die Methoden zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Virusauftreten und Winterverlusten weiter verfeinert werden.

2.6 Anhang I: Anleitung zur Probenahme

Auf den folgenden Seiten finden Sie eine detaillierte Anleitung, wie Sie die Probenahme der Bienen durchführen werden. Bei Unklarheiten und Fragen können Sie sich jederzeit an uns wenden (Kontaktdaten auf der letzten Seite).

Wir bedanken uns bei Ihnen für die Zusammenarbeit und hoffen, gemeinsam einen weiteren Schritt in der Erforschung der Bienengesundheit in Österreich zu gehen!

Der zeitliche Ablauf im Überblick:

Probenahme: zwischen 1. und 16. September 2018 (möglichst Sonntag bis Mittwoch)

Abschicken per Post: Am Tag oder Folgetag der Probenahme (möglichst Montag bis Mittwoch)

Sie erhalten die Ergebnisse der Virentests voraussichtlich im März 2019

Meldung der Winterverluste: Frühjahr 2019

Weitere Probenahmeterminen: Herbst 2019 und Herbst 2020

Arbeitsanleitung

Arbeitsschritte für die Probenahme 2018:

1. Auswahl und Markierung der Probenvölker
2. Probenahme
3. *Optional, falls es Ihnen möglich ist: Völkerdurchsicht und Kontrolle auf Krankheitssymptome, Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“*
4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“
5. Befüllen der Versandtasche und Versand

1. Auswahl und Markierung der Probenvölker:

Es werden insgesamt 5 Völker eines einzigen Standes beprobt (=Probenvölker). Wählen Sie diese bitte nach folgendem Schema aus:

- **bei 5 Völkern** am Stand: alle Völker beproben.
- **bei 6 bis 9 Völkern** am Stand: das erste Volk auslassen und ab dem 2. Volk die nächsten 5 Völker auswählen.

Bsp.:

<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Volk	Volk	Volk	Volk	Volk	Volk	Volk	Volk	Volk
1	2	3	4	5	6	7	8	9

- **bei 10 oder mehr Völkern** am Stand: das erste Volk auslassen und dann jedes zweite Volk auswählen bis 5 Völker ausgewählt sind.

Bsp.:

<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>								
Volk	Volk								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Die ausgewählten Probenvölker mit den beigelegten **Plastiketiketten** markieren. Die Plastiketiketten mit Reißnägeln oder ähnlichem auf dem Beutenteil, der in der Regel beim Volk bleibt (Beutenboden oder Zarge), befestigen. Wenn Sie die Zarge oder den Boden, auf dem das Etikett befestigt ist, austauschen, das Etikett ebenfalls umhängen.

Damit sollen die Probenvölker zweifelsfrei für den weiteren Versuchsverlauf über 3 Jahre identifizierbar bleiben. Bei Ausfall eines Volkes in den nächsten beiden Jahren wählen Sie bitte ein Ersatzvolk aus und teilen Sie uns dies bei der nächsten Beprobung mit.

2. Probenahme:

Bitte führen Sie die Probenahme folgendermaßen durch:

Wabe zur Probenahme identifizieren:

Die Bienenprobe soll aus jener Zarge entnommen werden, in der sich die Brut befindet bzw. dort, wo die Bienen sitzen, falls keine Brut vorhanden ist.

Die Bienenprobe soll auf jener brutfreien Wabe genommen werden, die an die äußerste Brutwabe anschließt.

Wenn keine Brut vorhanden ist, die Probe von einer äußeren Wabe des Bienensitzes nehmen.



Die Probe auf der ausgewählten brutfreien Wabe nehmen:

Bitte entnehmen Sie die Probe durch Auflegen der offenen Seite des Käfigs auf die Wabe (offenen Käfig auf kleine Bienengruppe legen) und vorsichtiges Zuschieben des Deckels.



Im Käfig sollten sich 10 Bienen befinden, etwas mehr ist im Zweifelsfall in Ordnung.



3. Optional: Völkerdurchsicht, Feststellen der Symptome und Ausfüllen des Fragebogens – „optionaler Teil“

Falls es Ihnen möglich ist, bei den Probenvölkern eine Völkerdurchsicht durchzuführen, könnten Sie das Projekt mit wertvoller Information unterstützen. Dazu ist es nötig, **alle bienenbesetzten Waben** der Probenvölker, sowie den Bereich vor den Probenvölkern zu inspizieren. Im Fragebogen – „optionaler Teil“ ist anzugeben, bei wie vielen der Probenvölker Sie die angeführten Symptome beobachtet haben. Da diese abgefragten Symptome Hinweise auf eine akute Virusinfektion geben können, helfen uns Ihre Beobachtungen, die Ergebnisse der Virusuntersuchung besser zu interpretieren. In der Beilage „Arbeitsanleitung zur optionalen Völkerdurchsicht“ finden Sie die genauen Informationen, wie dabei vorzugehen ist.

4. Ausfüllen des Fragebogens – „Pflichtteil“

Bitte füllen Sie den Pflichtteil des Fragebogens aus.

5. Befüllen der Versandtasche und Absenden

Bitte die vorfrankierte und adressierte Versandtasche wie folgt befüllen:

Den ausgefüllten Fragebogen in das graue Briefkuvert stecken. Dieses Kuvert einmal zusammenfalten und in die braune Versandtasche schieben.



Die 5 Käfige flach darauflegen und flach hineinschieben (geht sich knapp aus).





Die Versandtasche am Wochenbeginn (Montag bis Mittwoch) bei einer Poststelle aufgeben oder in einen Postkasten werfen, der noch am selben Tag ausgehoben wird. Dies soll eine kurze Transportdauer gewährleisten, um die Bienen zu schonen. Da der Versand rasch nach der Probenahme erfolgen sollte, ist eine Probenahme im Zeitraum von Sonntag bis Mittwoch ideal.

Kontakt

Falls Sie Fragen haben, können Sie uns erreichen unter:

Dr. Linde Morawetz:	050 555-*****	linde.morawetz@ages.at
DI Hemma Köglberger:	050 555-*****	hemma.koeglberger@ages.at

Im Probenahmezeitraum (1. bis 16. September 2018) können Sie uns jederzeit (auch am Wochenende) erreichen unter:

Handy Bienenkunde: *****

Ausblick

Die Untersuchungen auf sieben Bienenviren werden im Winter stattfinden. Sobald die Ergebnisse vorliegen, werden Sie diese erhalten.

Im Frühling 2019 werden wir die Winterverluste am betreffenden Stand und bei den fünf Probevölkern abfragen.

Gutes Gelingen! – und Danke für Ihre Teilnahme

ZUKUNFT
BIENE



2.7 Anhang II

Pflichtteil (Bitte unbedingt vollständig ausfüllen!)

Name Imker/Imkerin: Datum Probenahme:

Verortung des Bienenstandes

Bundesland: Seehöhe:

Standgemeinde: PLZ:

Fragen zum Imkereibetrieb

- 1.) Seit wie vielen Jahren imkern Sie? Jahre
- 2.) Wie hoch ist die derzeitige Gesamtvölkeranzahl Ihres Betriebes? Völker
- 3.) Ist der Betrieb ein zertifizierter Biobetrieb? ja nein
- 4.) Welchen Anteil der Brutwaben Ihrer Völker haben Sie 2018 erneuert?
 0% 1-30% 31-50% mehr als 50%
- 5.) Was machen Sie mit Futterwaben oder Leerwaben aus abgestorbenen Völkern (Mehrfachnennungen möglich)?
 einschmelzen oder aus dem Betrieb ausscheiden
 in andere Völker oder Ableger einhängen
 sonstiges:
- 6.) Wie vermehren Sie die Völker in Ihrem Betrieb (Mehrfachnennungen möglich)?
 Naturschwarm Kehrschwarm bisher noch gar nicht
 Brutableger sonstiges:

Fragen zum beprobten Bienenstand (= Monitoringstand)

- 7.) Wie viele Völker stehen zum Datum der Probenahme am Monitoringstand? Völker
- 8.) Ihre Maßnahmen zur Varroabekämpfung auf dem Monitoringstand im Jahr 2018 bis zum Datum der Probenahme (Mehrfachnennungen möglich)?
 biotechnisch (Drohnenbrut schneiden, Wärmebehandlung, Königinnensperren, etc.)
 medikamentös (Präparate auf Basis von Ameisensäure, Oxalsäure, Thymol, Amitraz, etc.)
 keine
 andere:
- 9.) Wie viele der 5 Probenvölker sind Ihrer Einschätzung nach:
 - sehr schwach: Völker
 - normal groß: Völker
 - sehr stark: Völker

Optionaler Teil

Durchsicht der Völker auf Krankheitssymptome

10.) Bei wie vielen der 5 Probenvölker haben Sie folgende Symptome gesehen?

- erhöhter Bientotenfall vor dem Volk: Völker
- Varroamilben auf Bienen: Völker
- Bienen mit verkrüppelten Flügeln : Völker
- schwarz glänzende Bienen: Völker
- Sackbrut-Symptome in der Brut: Völker

11.) Haben Sie weitere Auffälligkeiten in den 5 Probenvölkern beobachtet?

- ja nein

wenn ja, welche:

2.8 Anhang III

Zukunft Biene 2 - Virenmonitoring

Ergebnis Virenanalyse Probenahme Herbst 2018

ID Bienenstand: VIM***

Datum Probenahme: **.09.2018

Ort Probenahme: *****, Steiermark

Probenahme:

Es wurden von Ihnen insgesamt etwa 50 Arbeiterinnen aus fünf Bienenvölkern entnommen (zehn Bienen pro Volk) und lebend in Königinnenversandkäfigen an die AGES, Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz, geschickt. Dort wurden die Bienen umgehend auf -20°C tiefgefroren und damit abgetötet. Aus den Bienen wurde eine Sammelprobe von 50 Arbeiterinnen erstellt und diese mittels einer molekularbiologischen Analyse (RT-PCR) auf insgesamt acht Bienenviren untersucht:

- Akute Bienenparalyse Virus (=ABPV)
- Schwarzes Königinnenzellen Virus (=BQCV)
- Chronische Bienenparalyse Virus (=CBPV)
- Flügeldeformationsvirus Typ A (=DWV A)
- Flügeldeformationsvirus Typ B (=DWV B)
- Israelisches Akute Paralyse Virus (=IAPV)
- Kashmir-Bienenvirus (=KBV)
- Sackbrutvirus (=SBV)

Die Ergebnisse des Bienenstandes VIM076 werden auf den folgenden zwei Seiten sowohl als Tabelle als auch als Grafik dargestellt.

Ergebnisse Tabelle (ID Bienenstand VIM***)

In der Tabelle werden die Ergebnisse aller Viren wie folgt dargestellt:

- Virus (ABPV, ..., SBV)
- Nachweis (positiv/negativ)
- Viruskonzentration (RNA-Kopien pro ml Homogenat)
- Beurteilung des Virusbefalls (hoch, mittel, niedrig)

Virus	Nachweis	Viruskonzentration [RNA-Kopien/ml Homogenat]	Beurteilung
ABPV	negativ	---	---
BQCV	positiv	1,46 Mill.	mittel
CBPV	negativ	---	---
DWV A	negativ	---	---
DWV B	positiv	137,36 Mill.	mittel
IAPV	negativ	---	---
KBV	negativ	---	---
SBV	positiv	0,05 Mill.	mittel

Legende:

positiv: Virus-RNA wurde in der Sammelprobe festgestellt

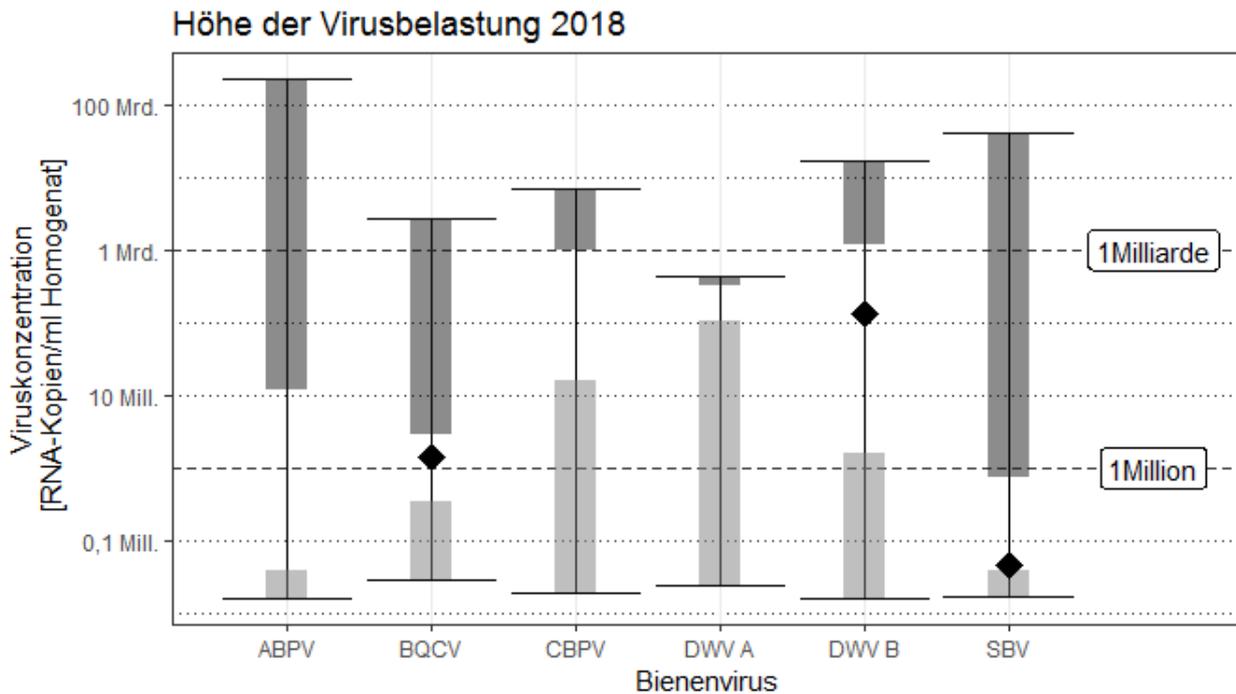
Konzentration: gibt an wie viele RNA-Kopien pro Milliliter untersuchter Lösung (=Homogenat) gemessen wurden

Beurteilung: setzt die Viruskonzentration Ihres Standes in Beziehung zu den positiven gemessenen Werten der anderen teilnehmenden Stände:

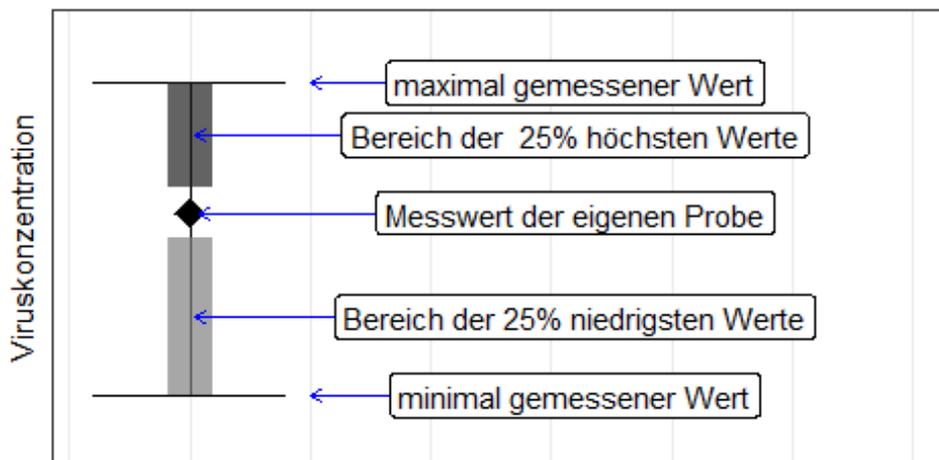
- *niedrig*: Konzentration der Probe liegt im Bereich der 25% niedrigsten Werte
- *mittel*: Konzentration der Probe liegt im mittleren Bereich aller Werte
- *hoch*: Konzentration der Probe liegt im Bereich der 25% höchsten Werte
- - - -: nicht nachweisbar

Ergebnisse Grafik (ID Bienenstand VIM***)

Die Grafik vergleicht das Messergebnis Ihres Standes mit den Messergebnissen der anderen teilnehmenden Bienenstände, die positiv auf das entsprechende Virus getestet wurden. Dabei stellt die Grafik Ihren Messwert (=schwarzer Diamant), den niedrigsten und den höchsten gemessenen Wert (unterer und oberer Balken), sowie die oben definierten Bereiche "hoch", "mittel" und "niedrig" dar. Wenn kein Messwert (schwarzer Diamant) dargestellt ist, war dieses Virus in Ihrer Probe nicht nachweisbar. Bitte beachten Sie dass die Skala logarithmisch ist, das heißt die Darstellung der Konzentration erfolgt in 10er Potenzen (0,1 Millionen, 1 Million, 10 Millionen etc.)



Legende zur Grafik



(V) Virendiagnostik und –prophylaxe bei Honigbienen

3.1 Kurzzusammenfassung des bisherigen Verlaufs der Studie

Im Modul V sollen Antikörper zum Nachweis viraler Genprodukte generiert und „Enzyme linked immuno sorbent assays (ELISA)“ zum schnellen und kostengünstigen diagnostischen Nachweis von Virusinfektionen bei Honigbienen im Labor und im Feld entwickelt werden. Im ersten Schritt müssen geeignete Antigen-Präparationen für die Immunisierungen und Tests produziert werden. Als Projektdauer wurden drei bis vier Jahre veranschlagt, wobei ein planmäßiger Projektbeginn ab Mai 2018 nach Eingang der Finanzierung eingehalten werden konnte. Durch den günstigen Startzeitpunkt konnte die saisonale Brutaktivität der Honigbienen 2018 effizient ausgenutzt werden, um durch Infektionsexperimente authentische Antigene verschiedener Virus-Spezies zu produzieren. In den ersten vier Monaten des Projektes wurden viele verschiedene Virusstämme auf ihre Reinheit untersucht und die Infektionseffizienz der Viruspräparationen getestet. Es gelang, Antigene des Deformed wing virus (DWV-A), Varroa destructor Virus (VDV/DWV-B), Sackbrutvirus (SBV), Virus der chronischen Bienenparalyse (CBPV) sowie des Virus der akuten Bienenparalyse (ABPV) zu produzieren. Durch Ultrazentrifugation wurden Antigen-Konzentrate erzeugt, die in Screening- und Charakterisierungsversuchen eingesetzt werden können. Im Jahr 2019 wurde das Strukturprotein VP1 des SBV exprimiert, gereinigt und für Immunisierungen von Mäusen herangezogen. Die B-Lymphozyten aus der Milz wurden bereits fusioniert und befinden sich derzeit im Screening und in der Selektion der einzelnen Hybridomzellklone. Rekombinante Antigene wurden von den monoklonalen Antikörpern bereits effizient im ELISA detektiert.

3.2 Einleitung

Durch dieses Projekt soll die Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen vereinfacht werden. Die ektoparasitische Varroamilbe (*Varroa destructor*) und virale Krankheitserreger werden für einen Großteil der Kolonieverluste vor (Dainat et al., 2012b) und während der Überwinterung verantwortlich gemacht (Kielmanowicz et al., 2012). Untersuchungen aus verschiedenen Ländern belegen einen direkten Einfluss von I flaviren (SBV, DWV) und Dicistroviren (ABPV) auf die Vitalität von Bienenvölkern. Die viralen Erreger der Bienen sind den Picornaviren ähnlich, untereinander phylogenetisch nah verwandt, aber in der Nukleinsäure-Sequenz sehr variabel. Im Gegensatz zu hochspezifischen RT-PCR-Protokollen, die in den meisten Fällen nur bestimmte Varianten bzw. Virusspezies detektieren können und sehr teuer sind, sind serologische Assays häufig in der Lage, größere Erregergruppen diagnostisch zu erfassen. In diesem Projekt sollen bereits vorhandene serologische Reagenzien gegen das Flügeldeformationsvirus (DWV) zur Etablierung von Hochdurchsatz-Tests im Labor sowie „Point of care“ Tests am Bienenstock genutzt werden. Gleichzeitig sollen neue Reagenzien gegen Sackbrutvirus (SBV) und Dicistroviren (Virus der akuten Bienenparalyse) produziert werden, um auch diese Pathogengruppen abdecken zu können.

Viele frühe wissenschaftliche Studien zu Viruserkrankungen der Honigbienen nutzten zum Nachweis der Erreger serologische Reagenzien (Anderson et al., 1984). Serologische Nachweisverfahren wurden früher auch erfolgreich zur Diagnostik von Feldinfektionen eingesetzt. In allen Studien wurden polyvalente Seren verwendet, die durch Immunisierung von Versuchstieren mit Virusextrakten gewonnen wurden und eine komplexe Mischung aus unterschiedlichen Immunglobulinen darstellten. Da es für Honigbienen weder Zellkultursysteme noch klonale Virusstämme gab, war die Spezifität der Antiseren beschränkt. Neben Hintergrundreaktionen mit Bienenproteinen aus der Virusproduktion waren auch unerwünschte Reaktionen mit kontaminierenden Viren nie auszuschließen. Obwohl man Reinigungsprotokolle für

diese Reagenzien entwickelte (z. B. Adsorption der Seren gegen Bienenlysate), wurden die etablierten ELISA-Systeme in der Diagnostik wegen der limitierten Verfügbarkeit der Reagenzien bald durch RT-PCR Protokolle ersetzt. In jüngster Vergangenheit sollte im Programm „Bees in Europe and the Decline Of honeybee Colonies (BEE DOC)“ im europäischen „Research Framework 7“ ein Bienenviren-ELISA entwickelt werden. Das Problem der unspezifischen Reaktionen mit Bienenproteinen sollte dabei durch Immunisierungen mit synthetischen viralen Peptiden umgangen werden. Die Immunisierungen mit Peptiden verliefen aber nicht erfolgreich, so dass kein Assay entwickelt werden konnte. Monoklonale Antikörper können dagegen durch Immunisierung mit authentischen Proteinen generiert werden, wobei durch Isolierung einzelner B-Zellen und damit IgGs eine hohe Spezifität und Sensitivität der Reagenzien gewährleistet werden kann. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper könnten die Nachteile der etablierten serologischen Nachweissysteme, wie mangelhafte Spezifität und begrenzte Verfügbarkeit der verwendeten Reagenzien, aufgehoben werden und kostengünstige, quantifizierende Testsysteme etabliert werden (Usuda et al., 1999).

Die Spezifität und Sensitivität der ELISA wird vorrangig durch die verwendeten serologischen Reagenzien bestimmt. In diesem Projekt werden monoklonale Antikörper verwendet bzw. generiert, die nach Charakterisierung der Reaktivität in unbeschränkter Menge zur Verfügung stehen. Die neuen Testverfahren sollen eine kostengünstige Diagnostik von Virusinfektionen bei Honigbienen in Österreich ermöglichen. ELISA Systeme geben schnell ein zuverlässiges quantitatives Ergebnis und können vor Ort durchgeführt werden („On-site-Tests“). Mit Plattenbasierten ELISAs können in Laboratorien kostengünstige Massentests („high throughput systeme“) durchgeführt werden, während Lateral-Flow-Tests (bekannt aus Schwangerschaftstests) zu einem etwas höheren Preis direkt vor Ort angewendet werden können. Ein Lateral-Flow-Test zum Nachweis der Amerikanischen Faulbrut wurde bereits für die Imkerei entwickelt und wird weltweit vertrieben (Vita Europe Ltd.).

3.3 Methodik

Antikörper sind die Schlüsselreagenzien für die Etablierung der ELISA. Während die Reagenzien für DWV bereits vorhanden sind, müssen geeignete Antikörper gegen andere Bienenviren erst erzeugt werden. Nach Viruskultur in Bienenpuppen und Präparation der Virionen können die Strukturproteine von ABPV und SBV gereinigt werden. Nach Immunisierung von Mäusen mit diesen bzw. rekombinanten Antigenen sollen neue Hybridomzellklone generiert, monoklonale Antikörper produziert und charakterisiert werden. Hochspezifische Antikörper gegen ABPV und SBV werden dann in Virusneutralisations-Experimenten, Westernblot und Immunfluoreszenztest validiert und in der Kreuzkompetition getestet. Durch rekombinante Expression werden außerdem geeignete Boost-Antigene und Positivkontrollen generiert. Geeignete Antikörper werden in großen Mengen produziert, gereinigt und untersucht, ob sie zur Anwendung in Sandwich-ELISA geeignet sind. Gleichzeitig werden die Antikörper sequenziert, um als chimäre Moleküle für breite ELISA-Anwendungen zur Verfügung zu stehen. Zur Generierung der Antikörper sind im Modul V Tierversuche erforderlich. In diesen Versuchen werden Mäuse mit gereinigten Antigenen immunisiert („Impfung“) und der Erfolg der Immunisierung anhand der Serokonversion geprüft (Blutentnahme). Die Versuchstiere werden nach erfolgreicher Immunisierung euthanasiert und B-Lymphozyten aus ihrer Milz gewonnen. Die Tierversuche werden im Rahmen eines genehmigten Antrages zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen Bienenviren durchgeführt (BMWF-68.205/0107-II/3b/2013). Die neu generierten Reagenzien und bereits charakterisierte Antikörper gegen DWV werden zur Etablierung diagnostischer ELISA genutzt. Dabei werden Probenlysis (Puffer, Zerkleinerung, Probenmaterial) und verschiedene ELISA-Systeme untersucht. Mit Hilfe

von Feldproben, die vom Kooperationspartner AGES (Modul A) bereitgestellt werden sollen, werden die Verfahren optimiert und validiert.

3.3.1 Ausgangslage der Studie

In den letzten Jahren wurden substantielle Vorarbeiten zur serologischen Diagnostik von Bienenviren an der Vetmeduni geleistet. Das Institut für Virologie der Vetmeduni hat langjährige Erfahrung in der Diagnostik von Virusinfektionen. Es wurden bereits rekombinante Antigene und serologische Reagenzien gegen Bienenviren hergestellt und serologische Nachweisverfahren für den Einsatz in der Forschung etabliert. Neben dem ersten molekularen Klon des Flügeldeformationsvirus wurden auch die ersten monoklonalen Antikörper gegen Strukturproteine von DWV präsentiert (Lamp et al., 2016). Einen Forschungsschwerpunkt bildet die molekulare Pathologie von Virusinfektionen bei Honigbienen.

Die vorhandenen monoklonalen Antikörper gegen DWV VP1 und 3c-Protease wurden bereits charakterisiert, die Bindung an die viralen Proteine untersucht und eine orientierende Epitopbestimmung durchgeführt. Im hier vorgestellten Projekt wird die praktische Anwendung dieser Antikörper in der Diagnostik untersucht, um belastbare Assays zum Nachweis von DWV zu entwickeln. Zur rekombinanten Expression von ABPV Strukturproteinen und der Produktion von ABPV wurden bereits Vorarbeiten geleistet, so dass bakteriell exprimierbare Proteinkonstrukte und definierte Virusstocks vorliegen.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Antikörper

Eine Testung und Produktion der vielversprechendsten anti-DWV Immunglobuline wurde gestartet. Die entsprechenden Hybridome wurden in Kultur genommen und es wurde begonnen, serumfreie Zellkulturen dieser Hybridome zu etablieren. Zur Reinigung der betreffenden IgG1 Antikörper der Maus mittels Protein-G-Affinitätschromatographie ist eine serumfreie Kultur Voraussetzung, da ansonsten kontaminierende IgGs aus dem Kälberserum mit gereinigt werden. Gleichzeitig wurden die Nukleotid-Sequenzen der Immunglobuline zweier Hybridome (DWV-VP1A1 und DWV-VP1B1) bestimmt, um eine rekombinante Expression der Antikörper und eine Manipulation der Moleküle zu ermöglichen. Zur Etablierung der gewünschten Sandwich-ELISA sollen rekombinante Moleküle mit anderen FC-Regionen erzeugt werden, um kostengünstige, kommerziell erhältliche Sekundärantikörper verwenden zu können. Erste bakterielle Plasmide, die chimäre Immunglobuline kodieren, wurden bereits generiert. Erste Ergebnisse zur Reaktivität der chimären Antikörper zeigen eine hohe Reaktivität mit den authentischen Virusproteinen von DWV im Westernblot und in Immunfluoreszenz-Assays. Eine präparative Expression und Reinigung der Antikörper von den betreffenden Klonen (anti-DWV VP1A1 und anti-DWV VP1B1) werden gerade vorbereitet.

3.4.2 Antigene

Bislang wurden reine Virusstocks von DWV, SBV, ABPV und CBPV produziert, um die saisonale Bruttätigkeit der Honigbienen möglichst gut auszunutzen. Im nächsten Schritt werden rekombinante Proteine der verwendeten SBV, ABPV und CBPV-Stämme in bakteriellen Expressionssystemen generiert.

Das Strukturprotein VP1 des SBV konnte bereits erfolgreich in Bakterien exprimiert werden und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das gereinigte Antigen wurde im Anschluss dazu verwendet, Mäuse zu immunisieren (s.u.).

Der Versuch der bakteriellen Expression des Strukturproteins (pSP) von CBPV verlief auch nach zahlreichen Modifikationen des Expressionskonstruktes nicht erfolgreich. Daher wird derzeit an der Etablierung eines neuen Systems zur Produktion rekombinanter Proteine gearbeitet. Hierfür werden rekombinante Baculoviren zur Expression des gewünschten Proteins herangezogen. Mit diesen Viren werden Insektenzellen infiziert, um in den Zellen die rekombinanten Proteine produzieren zu können, da es sich höchstwahrscheinlich um Membranproteine handelt, die nur in Eukaryonten produziert werden können. Die Rekombination des CBPV Strukturproteins in das virale Genom konnte bereits erfolgreich durchgeführt werden. Derzeit laufen Vorversuche zur Proteinexpression und -reinigung aus den Sf9-Insektenzellen.

3.4.3 Immunisierungen

Zwei Mäuse wurden mit gereinigten viralen Strukturproteinen von SBV und CBPV immunisiert, um Vergleichsseren zu generieren. Die Antigenpräparationen wurden mittels chromatographischer Verfahren aus inaktivierten Viruspräparationen hergestellt (siehe oben). Erwartungsgemäß trat eine sehr starke Reaktion der Antiseren gegen unterschiedliche Bienenproteine (v.a. Hexamerin) auf, die eine Präparation monoklonaler Antikörper gegen virale Proteine aus den B-Lymphozyten dieser Mäuse unmöglich machte. Beide Seren können aber für Kontrollversuche genutzt werden, um zu zeigen, dass die in E. coli erzeugten rekombinanten Antigene in Virusproteinpräparationen vorkommen.

Nach erfolgreicher Testung der rekombinanten Antigene mit den Testseren wurden zwei Mäuse mit dem rekombinanten, gereinigten VP1 des SBV über einen Zeitraum von sechs Wochen immunisiert. Die Serokonversion wurde mittels Blutentnahme im Westernblot bestätigt. Im Anschluss wurden die B-Lymphozyten der Mäuse mit Myelomzellen (sp2/0) fusioniert und Hybridomzellklone gewonnen. Das erste initiale Screening mittels ELISA auf Reaktivität gegen das rekombinante Antigen ergab insgesamt etwa 55 positive Zellklone pro Maus.

Die weitere Charakterisierung der Hybridomüberstände umfasste Westernblots mit dem rekombinanten Antigen (VP1) sowie Virus aus SBV infizierten Bienenpuppen. Diejenigen Hybridomzellklone, welche eine ausreichende Sensitivität sowie Spezifität gegen das Antigen gezeigt haben, befinden sich derzeit in der Re-Selektion, um eine homogene (klonale) Hybridomzellpopulation mit stabiler Antikörperproduktion aufzubauen.

3.4.4 ELISA-Tests mit definierten Proben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit im Labor erzeugten, Antigen-definierten Proben aus Virusinfektionen durchgeführt.

3.4.5 ELISA-Tests mit Feldproben

Es wurden noch keine ELISA-Tests mit Feldproben durchgeführt.

3.5 Diskussion

Nach Stand der Forschung sind neben der Varroabelastung hohe Virustiter von DWV, SBV und ABPV verantwortlich für die epidemisch auftretenden Völkerverluste im Herbst und Winter bei Honigbienen in Europa und Nordamerika. Die Belastung der Völker mit diesen Varroa-assoziierten Viren ist dabei auch ein prädiktiver Marker für die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenbruchs des Bienenvolkes (siehe Modul U, Abschnitt 1.4.6.9). Die Virusdiagnostik basiert auf qRT-PCR Protokollen, bei denen Laborkosten von mindestens 20 € für die Nukleinsäure-Extraktion und 15-20 € je Virusnachweis entstehen (je nach Sensitivität), so dass eine Untersuchung auf die drei Viren mindestens 65 bis 80 € kostet. Trotz des vergleichsweise hohen Wertes eines Bienenvolkes von mehr als 200 € bei starken Kolonien mit Reinzuchtkönigin ist eine Untersuchung der

Virenbelastung daher unwirtschaftlich. In Massentests zur Diagnostik in der Humanmedizin und auch zur Tierseuchenbekämpfung werden meist serologische Verfahren genutzt, da sie unempfindlich gegenüber der Probenlagerung, sehr sensitiv und wesentlich kostengünstiger sind. In dem hier vorgestellten Projekt werden bereits vorhandene Reagenzien gegen Struktur- und Nichtstrukturproteine von DWV genutzt und neue Reagenzien gegen SBV, ABPV und CBPV generiert, um serologische Testverfahren zu etablieren. Ziel des Projektes ist die Entwicklung plattenbasierter Hochdurchsatztests, die im Massentest Analysen zu einem Preis zwischen 5 und 10 € ermöglichen. Die Entwicklung handelsüblicher „On-site“ Tests im Lateral-Flow-Format (z.B. Schwangerschaftstest) soll dem Imker die Möglichkeit eröffnen, die Kolonien im Verdachtsfall vor Ort zu testen. Da bei der Diagnostik am Stock Versand- und Transportaufwand entfallen und der Imker unmittelbar vor Ort handeln kann, werden solche Testverfahren trotz höherer Assaykosten (ca. 20-30 € pro Schnelltest) sehr hilfreich sein. Erste Versuche mit den bereits vorhandenen Reagenzien gegen DWV ergaben, dass einige der Antikörper in Immun-Fluoreszenzmarkierungen und Westernblot-Applikationen die viralen Antigene hochspezifisch binden (Lamp et al., 2016). Die neuen Reagenzien und Testverfahren sollen helfen, die Verluste der Imkereien einzudämmen, da positive Untersuchungsergebnisse im Spätsommer eine Sanierung der Völker (z. B. Kunstschwarmbildung mit neuer Königin) ermöglichen, bevor sichtbare Schäden auftreten.

Veröffentlichungen und Vortragstätigkeit im Zeitraum 01.09.2018–29.8.2019

Projektbezogene Publikationen

Morawetz L, Köglberger H, Griesbacher A, Derakhshifar I, Crailsheim K, Brodschneider R, Moosbeckhofer R. (2019) Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PLOS ONE* **14**(7): e0219293.

Projektbezogene Kongressbeiträge (Poster und Vorträge)

Morawetz L, Köglberger H, Derakhshifar I, Mayr J, Moosbeckhofer R, Crailsheim, K. Health status and factors identified for winter losses of honey bee colonies. Vortrag: Eurbee 8, Gent 2018

Morawetz L, Griesbacher A, Kuchling S, Mayr J, Brodschneider R, Crailsheim K, Moosbeckhofer R. Österreichisches Bienenbrot-Monitoring auf Pestizidbelastung in unterschiedlichen Landnutzungstypen (Projekt Zukunft Biene). Poster: 66. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V; Frankfurt 2019

Morawetz L, Steinrigl A, Köglberger H, Derakhshifar I, Griesbacher A, Moosbeckhofer R, Crailsheim, K. Bienen und ihre Viren - Gesundheitsmonitoring in Österreichs Bienenvölkern („Zukunft Biene 2“). Poster: 5. Österreichische Citizen Science Konferenz, Obergurgl 2019

Seitz K, Rümenapf T, Dinhopf N., Plevka P., Dikunová A., Lamp B. (2019) First molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV); Poster: 29. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Düsseldorf 2019

Seitz K, Power K, Rümenapf T., Buczolic K., Dinhopf N., Lamp B. (2019) First molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV); Vortrag; Honeybee Health Symposium Apimondia 2019, Rom

Projektbezogene Vorträge Science to Stakeholders

Morawetz Linde „Beobachtungsstudie des Projekts Zukunft Biene: Ursachenforschung zur Wintersterblichkeit“ Wanderlehrerfortbildungstagung des Österr. Imkerbundes, Graz, 27.10.2018

Morawetz L „Beobachtungsstudie und Posthoc Untersuchungen: Einflussfaktoren auf den Überwinterungserfolg“ Runder Tisch Zukunft Pflanzenbau, AGES, Wien, 8.11.2018

Moosbeckhofer R „Ergebnisse der Beobachtungs- und Post hoc-Studie zu Einflussfaktoren auf den Überwinterungserfolg von Bienenvölkern“ Fachtagung Österreichischer Erwerbsimkerbund, Premstätten 24.02.2019

Morawetz L „Zukunft Biene 2 – Virenmonitoring“ Gesundheitsreferententagung des Österreichischen Imkerbundes, AGES, Wien, 09.05.2019

Projektbezogene Beiträge in den Medien

Crailsheim K, Brodschneider R (2019) Ursachen der Verluste an Honigbienen in Österreich. *Der Pflanzenarzt*, 5: 27-29.

Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K (2019) Winterverluste 2017/18 und Aufruf zur Teilnahme an der Untersuchung 2019. *Bienen aktuell*, 4: 20-23.

Lamp B, Seitz K (2019) Ursachen und Folgen des Bienensterbens. Reportage. ServusTV. <https://www.servus.com/tv/ursachen-und-folgen-des-bienensterbens>

Projektbezogene Nennungen in den Medien

studium.at.13.06.2019. Bienensterben: Winterverluste laut Studie an Uni Graz im Mittelwert.

orf.at. 13.06.2019. 15 Prozent der Bienenvölker starben im Winter. <https://orf.at/stories/3126641/>

orf.at. 13.06.2019. Bienensterben: Winterverluste im Mittelwert. <https://steiermark.orf.at/stories/3000281/>

citizen-science.at. 13.06.2019. Virenmonitoring. <https://www.citizen-science.at/citizen-science-projekte/item/448-virenmonitoring>

derstandard.at. 13.06.2019. So schlimm steht es wohl doch nicht um unser liebstes Insekt. <https://www.derstandard.at/story/2000104810957/so-schlimm-steht-es-um-unser-liebstes-insekt-wohl-doch>

krone.at. 13.06.2019. Bienensterben im Winter heuer im Mittelwert. <https://www.krone.at/1941068>

wienerzeitung.at. 13.06.2019. Bienenverluste im Mittelwert. <https://www.wienerzeitung.at/nachrichten/wissen/natur/2013822-Bienenverluste-im-Mittelwert.html>

Kronen Zeitung. 14.06.2019. Unseren Bienen geht es besser.

blickinsland.at. 14.06.2019. Bienenverluste im Winter durchschnittlich. <https://blickinsland.at/bienenverluste-im-winter-durchschnittlich/>

Der Standard. 14.06.2019. 15 Prozent Winterverlust bei Bienenvölkern.

Tiroler Tageszeitung. 14.06.2019. Weniger Verluste bei Bienen.

TT Kompakt. 14.06.2019. Harter Winter für Bienen.

Wiener Zeitung. 14.06.2019. Verluste an Bienen im mittleren Bereich.

Kleine Zeitung. 14.06.2019. Durchschnittliche Bienenverluste im Winter.

Literaturzitate

Alaux C, Allier F, Decourtye A, Odoux JF, Tamix T, Chabirand M, Delestra E, Decugis F, Le Conte Y, Henry M. (2017) A 'Landscape physiology' approach for assessing bee health highlights the benefits of floral landscape enrichment and semi-natural habitats. *Scientific Reports* **7**.

Alburaki M, Cheaib B, Quesnel L, Mercier P-L, Chagnon M, Derome N. (2016) Performance of honeybee colonies located in neonicotinoid-treated and untreated cornfields in Quebec. *Journal of Applied Entomology*. **141**, 112–121, Doi: 10.1111/jen.12336.

Amdam FV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. (2004) Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology* **97**, 741–747.

Amiri E, Meixner M, Nielsen SL, Kryger P. (2015) Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *PLOS ONE* **10**(10), e0140272.

Annoscia D, Brown S, Di Prisco G, De Paoli E, Del Fabbro S, Zanni V, Galbraith D, Caprio E, Grozinger CM, Pennacchio F, et al. (2018) Haemolymph removal by the parasite *Varroa destructor* can trigger the proliferation of the deformed wing virus in mite infested bees (*Apis mellifera*), contributing to enhanced pathogen virulence. *bioRxiv*, 257667.

Barroso-Arevalo S, Fernandez-Carrion E, Goyache J, Molero F, Puerta F, Sanchez-Vizcaino JM. (2019) High Load of Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Infestation Are Related to Weakness of Honey Bee colonies in Southern Spain. *Frontiers in Microbiology* **10**, 1331.

Benaets K, Van Geystelen A, Cardoen D, De Smet L, de Graaf DC, Schoofs L, Larmuseau MHD, Brettell LE, Martin SJ, Wenseleers T. (2017) Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B* **284**, 20162149.

Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. (2006) Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied & Environmental Microbiology* **72**(4), 2414–2420.

Berry JA & Delaplane KS. (2001) Effects of comb age on honey bee colony growth and brood survivorship. *Journal of Apicultural Research* **40**(1), 3-8.

Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff S, Neumann P. (2010) Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **49**(1), 60–65.

Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R., Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Poots SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**, 351–354.

Blanchard P, Guillot S, Antúnez K, Köglberger H, Kryger P, de Miranda JR, Franco S, Chauzat M-P, Thiéry R, Ribière M. (2014) Development and validation of a real-time two-step RT-qPCR TaqMan® assay for quantitation of Sacbrood virus (SBV) and its application to a field survey of symptomatic honey bee colonies. *Journal of Virological Methods* **197**, 7–13.

Blanchard P, Olivier V, Iscache A-L, Celle O, Schurr F, Lallemand P, Ribiere M. (2008) Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *J. of Invertebrate Pathology* **97**(2), 182–185.

Blanchard P, Ribière M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V, Iscache AL, Faucon JP. (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. of Virological Methods* **141**(1), 7-13.

- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. (1999) The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**(1), 101-106.
- Brodtschneider R, Brus J, Danihlik J. (2019) Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **274**, 24-32.
- Brodtschneider R, Crailsheim K. (2011) Völkerverluste der Honigbiene: Risikofaktoren für die Bestäubungssicherheit in Österreich. *Entomologica Austriaca* **18**, 73-86.
- Brodtschneider R, Crailsheim K. (2013) Fünf Jahre Untersuchung des Bienensterbens in Österreich. *Entomologica Austriaca* **20**, 195–205.
- Brodtschneider R, Gray A, Adjlane N, Ballis A, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, de Graaf DC, Dražić MM, Evans G, Fedoriak M, Forsythe I, Gregorc A, Grzeda U, Hetzroni A, Kauko L, Kristiansen P, Martikkala M, Martin-Hernandez R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Raudmets A, Ryzhikov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Uzunov A, Vejsnaes F, Wohl S, Zammit-Mangion M, Danihlik J. (2018a) Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **57**(3), 452–457.
- Brodtschneider R, Gray A, van der Zee R, Adjlane N, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, Crailsheim K, Dahle B, Danihlik J, Danneels E, de Graaf DC, Dražić MM, Fedoriak M, Forsythe I, Golubovski M, Gregorc A, Grzeda U, Hubbuck I, İvgin Tunca R, Kauko L, Kilpinen O, Kretavicius J, Kristiansen P, Martikkala M, Martín-Hernández R, Mutinelli F, Peterson M, Otten C, Ozkirim A, Raudmets A, Simon-Delso N, Soroker V, Topolska G, Vallon J, Vejsnæs F, Woehl S. (2016) Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* **55**(5), 375–378, DOI: 10.1080/00218839.2016.1260240.
- Brodtschneider R, Kalcher-Sommersguter E, Klinger S. (2018b) Winterverluste. In: Zukunft Biene: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. Endbericht. <http://www.zukunft-biene.at>.
- Brodtschneider R, Karrer M. (2018) Wintersterblichkeit. In: Zukunft Biene 2: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. 1. Zwischenbericht. <http://www.zukunft-biene.at>.
- Brodtschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K. (2010) Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *Journal of Apicultural Research* **49**(1), 23–30.
- Budge GE, Garthwaite D, Crowe A, Boatman ND, Delaplane KS, Brown MA, Thygesen HH, Pietravalle S. (2015a) Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. *Scientific Reports* **5**, 12574.
- Budge GE, Pietravalle S, Brown M, Laurenson L, Jones B, Tomkies V, Delaplane KS. (2015b) Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PLOS ONE* **10**, e0133228.
- Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simo E, Pico Y. (2018) Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution* **214**, 106-114.
- Calderone NW. (2005). Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *Journal of Economic Entomology* **98**, 645-650.
- Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL. (2011) Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS* **108**, 662–667.
- Carreck NL, Ball BV, Martin SJ. (2010) Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* **49**(1), 93–94.

Castilhos D, Bergamo GC, Gramacho KP, Goncalves LS. (2019) Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie* **50**(3), 263-272.

Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. (2006) A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**, 69–73.

Chauzat M-P, Jacques A, EPILOBEE Consortium, Laurent M, Bougeard S, Hendrikx P, Ribière-Chabert M. (2016) Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie* **47**, 348–378.

Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Matthew K, Feldlaufer MF. (2004) Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **35**, 441–448.

Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. (2005) Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied & Environmental Microbiology* **71**(1), 436–441.

Chen YP, Siede R. (2007) Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research* **70**, 33–80.

Clermont A, Eickermann M, Kraus F, Hoffmann L, Beyer M. (2015a): Correlations between land covers and honey bee colony losses in a country with industrialized and rural regions. *Science of the Total Environment* **532**, 1–13.

Clermont A, Pasquali M, Eickermann M, Kraus F, Hoffmann L, Beyer M. (2015b) Virus status, *Varroa* levels, and survival of 20 managed honey bee colonies monitored in Luxembourg between the summer of 2011 and the spring of 2013. *Journal of Apicultural Science* **59**, DOI: 10.1515/jas -2015-0005.

Cornman RS, Tarpay DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, vanEngelsdorp D, Evans JD. (2012) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLOS ONE* **7**(8): e43562.
doi:10.1371/journal.pone.0043562.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* **318**(5848), 283–287.

Dahle B. (2010) The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *Journal of Apicultural Research* **49**, 124–125.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. (2012a) Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLOS ONE* **7**(2), e32151.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. (2012b) Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(4), 981–987.

Dainat B, Neumann P. (2013) Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *Journal of Invertebrate Pathology* **112**(3), 278-80.

DeGrandi-Hoffman G, Ahumada F, Graham H. (2017) Are Dispersal Mechanisms Changing the Host–Parasite Relationship and Increasing the Virulence of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Managed Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies? *Environmental Entomology*, **46**, 737–746.

DeGrandi-Hoffman G, Chen Y. (2015) Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion on Insect Science* **10**(0), 170-176.

De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Philippe B, Budge GE, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, De Graaf D, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, Van der Steen JJM. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann, Ellis JD, Neumann P (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *Journal of Apicultural Research* **52**(4).

De Miranda JR, Cordoni G, Budge G. (2010) The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. of Invertebrate Pathology* **103**, Supplement, S30–S47.

Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and retards replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS* **110**, 18466–18471.

Döke MA, Frazier M, Grozinger CM. (2015) Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 185–193.

Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Tchamitchian S, Bonnet M, Cousin M, Kretzschmar A, Brunet J-L, Le Conte Y. (2016) Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific Reports* **6**, 31430. DOI: 10.1038/srep31430

Flügel H-J (2015) Von COLUMELLA bis CCD – das Bienensterben im Wandel der Zeit (Hymenoptera: Apidae). *Entomologische Zeitschrift* **125**, 27–40.

Forfert N, Natsopoulou ME, Frey E, Rosenkranz P, Paxton RJ, Moritz RFA. (2015) Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission. *PLOS ONE* **10**(10).

Fox J, Weisberg S. (2011) An R Companion to Applied Regression. Sage Publications, Thousand Oaks [CA].

Gallai N., Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**, 810–821.

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, Rosenkranz P. (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**(3), 332–352.

Girsch L, Moosbeckhofer R. (2012) Untersuchungen zum Auftreten von Bienenverlusten in Mais- und Rapsanbaugebieten Österreichs und möglicher Zusammenhänge mit Bienenkrankheiten und dem Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Abschlussbericht „MELISSA“; Dafne Proj. Nr. 100472); https://www.dafne.at/dafne_plus_homepage/download.php?t=ProjectReportAttachment&k=2661.

Goulson D. (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* **50**(4), 977–987.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. (2015) Combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers drives bee declines. *Science* **347** (6229).

Gray A, Brodschneider R, Adjlane N, Ballis A, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, Cornelissen B, daCosta CA, Csáki T, Dahle B, Danihlík J, Dražić MM, Evans G, Fedoriak M, Forsythe I, deGraaf D, Gregorc A, Johannesen J, Kauko L, Kristiansen P, Martikkala M, Martín-Hernández R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Patalano S, Petrov P, Raudmets A, Ryzhikov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Topolska G, Uzunov A, Vejsnaes F, Williams A, Zammit-Mangion M, Soroker V. (2019) Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research* **58**(4), 479-485.

Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.

- Hernández López J, Krainer S, Engert A, Schuehly W, Riessberger-Gallé U, Crailsheim K. (2017) Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Scientific Reports* **7**, 40853.
- Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LCM, Noel LM-LJ, Hall MJ, Martin SJ, Schroeder DC. (2009) Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(22), 7212–7220.
- Höcherl N, Siede R, Illies I, Gätschenberger H, Tautz J. (2011) Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. *Journal of Insect Physiology* **58**, 278-285.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. (2008) Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biom J.* **50**(3), 346-63.
- Jacques A, Laurent M, EPILOBEE Consortium, Ribière-Chabert M, Saussac M, Bougeard S, et al., (2017) A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLOS ONE* **12**(3), e0172591. doi:10.1371/journal.pone.0172591
- James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R (2013) An Introduction to Statistical Learning with Applications in R. Springer Verlag, New York.
- Jamnkar-Ciglencčki U, Toplak I. (2012) Development of a real-time RT-PCR assay with TaqMan probe for specific detection of acute bee paralysis virus. *Journal of Virological Methods* **184**(1-2), 63–68.
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. (1998) Endangered mutualism: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 83-112.
- Koenig JP, Boush GM, Erickson Jr. EH. (1986) Effect of Type of Brood Comb on Chalk Brood Disease in Honeybee Colonies. *Journal of Apicultural Research* **25**(1), 58-62.
- Köglberger H, Narath SH, Stüger HP, Derakhshifar I, Moosbeckhofer R. (2009) Das Auftreten von Viren und anderen Krankheitserregern der Honigbiene im Jahresverlauf. *Bienenaktuell* **3**(11), 15–19.
- Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J. (2006) The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A* **193**(3), 363–70.
- Kralj J, Fuchs S. (2006) Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie* **37**, 577–587.
- Kuchling S, Kopacka I, Kalcher-Sommersguter E, Schwarz M, Crailsheim K, Brodschneider R. (2018) Investigating the role of landscape composition on honey bee colony winter mortality: A long-term analysis. *Scientific Reports* **8**, 12263.
- Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpy DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, Skinner JA, Wilkes JT, Sagili R, D. vanEngelsdorp D. (2015) A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research* **46**, 292–305.
- Locke B, Semberg E, Forsgren E, de Miranda JR. (2017) Persistence of subclinical deformed wing virus infections in honeybees following *Varroa* mite removal and a bee population turnover. *PLOS ONE* **12**(7).
- Lodesani M, Franceschetti S, Dall'Ollio R. (2019) Evaluation of early spring bio-technical management techniques to control varroosis in *Apis mellifera*. *Apidologie* **50**, 131-140.
- Maori E, Tanne E, Sela I. (2007) Reciprocal sequence exchange between non-retroviruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* **362**, 342–349.

Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. (2012) Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* **336**(6086), 1304-6.

McMahon DP, Natsopoulou ME, Doublet V, Fürst M, Weging S, Brown MJF, Gogol-Döring A, Paxton RJ. (2016) Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B* **283**(1833), 20160811.

McMenamin AJ, Genersch E. (2015) Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion on Insect Science* **8**, 121-129.

McMenamin AJ, Brutscher LM, Glenn W, Flenniken ML. (2016) Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *Current Opinion on Insect Science*, **16**, 14–21.

Milborrow S. (2019). rpart.plot: Plot 'rpart' Models: An Enhanced Version of 'plot.rpart'. R package version 3.0.7. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot>.

Moosbeckhofer R, Köglberger H, Derakhshifar I, Morawetz L, Boigenzahn C, Oberrisser W. (2015) Varroa-Bekämpfung einfach – sicher – erfolgreich. *Biene Österreich*, 2. Auflage.

Moosbeckhofer R, Mayr J. (2014) Untersuchungen zur Identifizierung einer möglichen Exposition von Honigbienen gegenüber den Wirkstoffen Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid und Fipronil unter Feldbedingungen. Abschlussbericht http://www.ages.at/fileadmin/_migrated/content_uploads/Bienen-Expositionsmonitoring_2013_MO-Gesundheitsreferententagung_2014-vHP.pdf

Morawetz L, Griesbacher A, Köglberger H, Revilla-Fernández S, Derakhshifar I, Mayr J, Etter K, Steinrigl A, Reisp K, Moosbeckhofer R. (2018) Ursachenforschung zur Wintersterblichkeit durch Posthoc Untersuchungen ausgewählter Proben auf Bienengesundheit und eine vorangegangene Exposition. In: Zukunft Biene: Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit. Endbericht. <http://www.zukunft-biene.at>.

Morawetz L, Köglberger H, Griesbacher A, Derakhshifar I, Crailsheim K, Brodschneider R, Moosbeckhofer R. (2019) Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PLOS ONE* **14**(7), e0219293.

Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, Jones IM, Schroeder DC. (2016) Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME Journal* **10**(5), 1264-73.

Moritz RFA, De Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Neumann P, Paxton RJ. (2010) Research strategies to improve honeybee health in Europa. *Apidologie* **41**, 227–242.

Moritz RFA, Eler S. (2016) Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **216**, 44–50.

Mouret C, Lambert O, Piroux M, Beaudeau F, Provost B, Benet P, Colin ME, L'Hostis M. (2013) Prevalence of 12 infectious agents in field colonies of 18 apiaries in western France. *Revue de Medecine Veterinaire* **164**(12), 578-582.

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F. (2012) Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLOS Pathogens* **8**, e1002735.

Neumann P, Carreck NL. (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* **49**, 1–6.

Nolan MP, Delaplane KS. (2016) Distance between honey bee *Apis mellifera* colonies regulates populations of *Varroa destructor* at a landscape scale. *Apidologie*, 1-9.

- Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, Efrat H, Pettis J, Cox-Foster D, Holmes EC, Briese T, Lipkin WI. (2008) Genetic analysis of Israel Acute Paralysis Virus: distinct clusters are circulating in the United States. *Journal of Virology* **82**, 6209-6217.
- Payne AN, Walsh EM, Rangel J. (2019) Initial Exposure of Wax Foundation to Agrochemicals Causes Negligible Effects on the Growth and Winter Survival of Incipient Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies. *Insects* **10**(1), 19.
- Peck DT, Smith ML, Seeley TD. (2016) *Varroa destructor* Mites Can Nimble Climb from Flowers onto Foraging Bees. *PLOS ONE* **11**(12).
- Peng Y, Baer-Imhoof B, Millar AH, Baer B. (2015) Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* **5**, 10565. DOI: 10.1038/srep10565.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**, 153–158.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **25**(6), 345–353.
- R Development Core Team. (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Ribière M, Olivier V, Blanchard P. (2010) Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *Journal Invertebrate Pathology* **103**, 120–31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013> PMID: [19909978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909978/)
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, Supplement (0), S96–S119.
- Roy C, Vidal-Naquet N, Provost B. (2015) A severe sacbrood virus outbreak in a honeybee (*Apis mellifera* L.) colony: a case report. *Veterinari Medicina* **60**(6), 330–335.
- Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederstr m V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, Smith HG. (2015) Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* **521**, 77–80.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, Mead A, Burroughs N, Evans DJ. (2014) A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLOS Pathogens* **10**, e1004230.
- Schurr F, Tison A, Militano L, Cheviron N, Sircoulomb F, Riviere MP, Ribière-Chabert M, Thi ry R, Dubois E. (2019) Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *Journal of Virological Methods* **270**, 70-8.
- Seeley TD, Smith ML. (2015) Crowding honeybee colonies in apiaries can increase their vulnerability to the deadly ectoparasite *Varroa destructor*. *Apidologie* **46**(6), 716–727.
- Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berényi O, Bakonyi T, Köglberger H, B chler R. (2005) Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe. *Journal of Apicultural Research* **44**(3), 129.
- Staveley JP, Law SA, Fairbrother A, Menzie CA. (2014) A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Human and Ecological Risk Assessment* **20**, 566–591.
- Steinhauer N, Kulhanek K, Ant nez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat MP. (2018) Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 142-148

- Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, Caron DM, Lengerich EJ, Pettis JS, Rose R, Skinner JA, Tarpay DR, Wilkes JT, vanEngelsdorp D. (2014) A national survey of managed honey bee 2012–2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *Journal of Apicultural Research* **53**(1), 1–18.
- Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G. (1995) Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research* **34**, 153–160.
- Straub L, Williams GR, Vidono B, Khongphinitbunjong K, Retschnig G, Schneeberger A, Chantawannakul P, Dietemann V, Neumann P. (2019) Neonicotinoids and ectoparasitic mites synergistically impact honeybees. *Scientific Reports* **9**, 8159.
- Sumpter DJT, Martin SJ. (2004) The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *Journal of Animal Ecology* **73**(1), 51-63.
- Switaneck M, Crailsheim K, Truhetz H, Brodschneider R. (2017) Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of the Total Environment* **567**, 1581–1587. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.178>
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. (2004) Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(12), 7185–7191.
- Thoms CA, Nelson KC, Kubas A, Steinhauer N, Wilson ME, vanEngelsdorp D. (2018) Beekeeper stewardship, colony loss, and *Varroa destructor* management. *Ambio*, <https://doi.org/10.1007/s13280-018-1130-z>.
- Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, Madella S, Evans J, Lopez D, vanEngelsdorp D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* **47**(3), 325–347.
- Tsvetkov N, Samson-Robert O, Sood K, Patel HS, Malena DA, Gajiwala PH, et al. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, **356**(6345), 1395–1397.
- Underwood RM, Traver BE, Lopez-Urbe MM. (2019) Beekeeping Management Practices Are Associated with Operation Size and Beekeepers' Philosophy towards in-Hive Chemicals. *Insects* **10**(1), 10.
- van der Zee R, Brodschneider R, Brusbardis V, Charrière J-D, Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, Drazic MM, Kauko L, Kretavicius J, Kristiansen P, Mutinelli F, Otten C, Peterson M, Raudmets A, Santrac V, Seppälä A, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F, Gray A. (2014) Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *Journal of Apicultural Research* **53**(1), 19–34.
- van der Zee R, Gray A, Holzmann C, Pisa L, Brodschneider R, Chlebo R, Coffey MF, Kence A, Kristiansen P, Mutinelli F, Nguyen BK, Adjlane N, Peterson M, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F, Wilkins S. (2013) Standard survey methods for estimating colony losses and explanatory risk factors in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* **52**(4), 1–36.
- van der Zee R, Gray A, Pisa L, De Rijk T. (2015) An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors. *PLOS ONE* **10**, e0131611. doi:10.1371/journal.pone.0131611.
- van der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charrière J-D, Chlebo R, Coffey MF, Crailsheim K, Dahle B, Gajda A, Gray A, Drazic MM, Higes M, Kauko L, Kence A, Kence M, Kezic N, Kiprijanovska H, Kralj J, Kristiansen P, Martin Hernandez R, Mutinelli F, Nguyen BK, Otten C, Özkirim A, Pernal SF, Peterson M, Ramsay G, Santrac V, Soroker V, Topolska G, Uzunov A, Vejsnæs F, Wei S, Wilkins S. (2012) Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research* **51**(1), 100–114.

vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLOS ONE* **4**, DOI: 10.1371/journal.pone.0006481

vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Caron D, Pettis J. (2011) A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research* **50**, 1–10.

vanEngelsdorp D, Hayes JJR, Underwood RM, Pettis JS. (2008) A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLOS ONE* **3**, e4071.

vanEngelsdorp D, Hayes JJR, Underwood RM, Pettis JS. (2010) A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research* **49**, 7–14.

vanEngelsdorp D, Underwood R, Caron D, Hayes JJR. (2007) An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal* **147**, 599–603.

Wickham H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.

Williams GR, Tarpay DR, vanEngelsdorp D, Chauzat M-P, Cox-Foster DL, Delaplane KS, Neumann P, Pettis JS, Rogers REL, Shutler D. (2010) Colony Collapse Disorder in context. *Bioessays* **32**, 845–846.

Williams GR, Troxler A, Retschnig G, Roth K, Yanez O, Shutler D, Neumann P, Gauthier L. (2015) Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Scientific Reports* **5**, 14621.

Woodcock BA, Bullock JM, Shore RF, Heard MS, Pereira MG, Redhead J, Ridding L, Dean H, Sleep D, Henrys P, Peyton J, Hulmes S, Hulmes L, Sárospataki M, Saure C, Edwards M, Genersch E, Knäbe S, Pywell RF. (2017) Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* **356**, 1393–1395.

Woodcock BA, Isaac NJB, Bullock JM, Roy DB, Garthwaite DG, Crowe A, Pywell RF. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications* **7**, 12459. DOI: 10.1038/ncomms12459

Wu-Smart J, Spivak M. (2016) Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports* **6**, 32108.

Yue C, Schröder M, Gisder S, Genersch E. (2007) Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of General Virology* **88**(8), 2329-2336.

Zioni N, Soroker V, 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**(1), 106-12.