



# MASSNAHMEN DER IMKERLICHEN PRAXIS ZUR VERBESSERUNG DER BIENENGESUNDHEIT IN EUROPA

## BPRACTICES

### ERA-NET Cofund SusAn

## ZWISCHENBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT NUMMER 101232

## IMPRESSUM

### **IMPRESSUM**

Projektnehmer: AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH

Adresse: Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien

Projektleiterin: DI Dr. Alexandra Ribarits

Tel. : +43 (0)5 0555-34914

E-Mail: alexandra.ribarits@ages.at

Projektmitarbeiter: Dr. Rudolf Moosbeckhofer, Dr. Irmgard Derakhshifar, DI Hemma Köglberger, Dr. Josef Mayr, Dr. Linde Morawetz, Ing. Katharina Etter, Dr. Richard Gottsberger, Mag. Antonia Griesbacher, Oliver Alber, MA

Kooperationspartner: BPRACTICES-Konsortium

Finanzierungsstellen: Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus (EU Horizon 2020 Grant Agreement n° 696231, ERA-Net SusAn – European Research Area on Sustainable Animal Production Systems)

Projektlaufzeit: 01.02.2017 – 30.11.2020

1. Auflage

Alle Rechte vorbehalten.

Wien, 30.11.2018

# NEUE INDIKATOREN UND MASSNAHMEN DER IMKERLICHEN PRAXIS ZUR VERBESSERUNG DER BIENENGESUNDHEIT IN EUROPA IM ZEITALTER VON *AETHINA TUMIDA*



## LEITUNG DES KONSORTIUMS

**Dr. Giovanni Formato, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri",**  
Via Appia Nuova 1411, 00178 Rom, Italien.

## PARTNER IM KONSORTIUM

Dr. Mustafa Necati Muz, **University of Namik Kemal**, Namik Kemal Mahallesi Kampüs, Caddesi No:1 Süleymanpaşa – Tekirdağ, Türkei; Dr. Maja Ivana Smodiš Škerl, **Agricultural Institute of Slovenia**, Hayquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slowenien; Dr. Mariano Higes, **Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo/Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal de Castilla-La Mancha**, Carretera Toledo-Albacete s/n 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spanien; Dr. Licia Ravarotto, **Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie**, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Italien; Dr. Alexandra Ribarits und Dr. Rudolf Moosbeckhofer, **Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit**, Spargelfeldstraße 191, 1220 Wien, Österreich.



INHALTSVERZEICHNIS

IMPRESSUM..... 2

NEUE INDIKATOREN UND MASSNAHMEN DER IMKERLICHEN PRAXIS ZUR VERBESSERUNG DER BIENENGESUNDHEIT IN EUROPA IM ZEITALTER VON *AETHINA TUMIDA*..... 3

LEITUNG DES KONSORTIUMS ..... 3

PARTNER IM KONSORTIUM ..... 3

1 AMERIKANISCHE FAULBRUT UND EUROPÄISCHE FAULBRUT (LEITUNG AGES) ..... 6

    1.1 SAMMLUNG DER MASSNAHMEN GUTER IMKERLICHER PRAXIS (GOOD BEEKEEPING PRACTICE, GBP)..... 6

    1.2 LITERATURRECHERCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG UND AUSWAHL VON PCR-METHODEN ZUM NACHWEIS VON AFB- UND EFB-ERREGERN IN UNTERSCHIEDLICHEN PROBENMATRIZES AUS DEM BIENENSTOCK ..... 6

    1.3 AUSWAHL UND TEST DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT VON PCR-METHODEN ZUM NACHWEIS VON AFB- UND EFB-ERREGERN ..... 7

        1.3.1 SPEZIFITÄTSTESTS..... 10

        1.3.2 BEWERTUNG VON DNA-EXTRAKTIONSMETHODEN..... 12

        1.3.3 ABSOLUTE QUANTIFIZIERUNG DURCH DIGITAL DROPLET PCR ..... 13

    1.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR TESTLEISTUNG (TEST PERFORMANCE STUDY, TPS) ..... 14

        1.4.1 PLAN FÜR DIE TPS ..... 14

        1.4.2 LABORVERGLEICH (INTERLABORATORY COMPARISON, ILC): VORBEREITUNG DER PROBEN... 14

        1.4.3 ERGEBNISSE DER TPS ..... 17

    1.5 FELDVERSUCHE AMERIKANISCHE FAULBRUT (AFB): EVALUIERUNG DER KEHRSCHWARM-METHODE ZUR ELIMINIERUNG VON *P. LARVAE* IM SUBKLINISCHEN STADIUM ..... 19

        1.5.1 EINLEITUNG ..... 19

        1.5.2 MATERIAL UND METHODEN ..... 19

        1.5.3 FELDVERSUCHE..... 20

    1.6 AKTUELLER STAND BISHER ERFOLGTER PROBENAHMEN UND ERGEBNISSE..... 20

2 ARBEITSPAKET 1 (VARROA UND VARROOSE)..... 22

    2.1 EINLEITUNG..... 22

    2.2 MATERIAL UND METHODEN ..... 22

        2.2.1 ANWERBUNG UND AUSWAHL DER TEILNEHMENDEN IMKEREIBETRIEBE ..... 22

        2.2.2 EXPERIMENTELLER AUFBAU..... 22

            2.2.2.1 Erläuterungen zum Versuchsplan ..... 23

        2.2.1 SCHÄTZUNG DER VOLKSTÄRKE ..... 25

        2.2.2 SPERREN UND FREILASSEN DER KÖNIGINNEN..... 25

        2.2.3 VARROABEKÄMPFUNG..... 25

        2.2.4 PROBENAHE ..... 26

        2.2.5 ERMITTLUNG DER VARROABEFALLSRATE (%) BEI ERWACHSENEN BIENEN ..... 26

    2.3 AKTUELLER STAND DER ERGEBNISSE ..... 27

        2.3.1 AUSGEWÄHLTE IMKEREIEN UND BIENENSTÖCKE ..... 27

        2.3.2 VARROABEFALLSRATE DER BIENEN VOR VERSUCHSBEGINN ..... 27

        2.3.3 VARROABEFALLSRATE DER BIENEN NACH DER VARROABEHANDLUNG ..... 28

        2.3.4 VÖLKERVERLUSTE VON VERSUCHSBEGINN IM SOMMER 2017 BIS ZUR AUSWINTERUNG 2018 ... 28

        2.3.5 TRACHTREIFE VÖLKER IM FRÜHJAHR..... 29

        2.3.6 AUSFALL VON KÖNIGINNEN ..... 30

        2.3.7 DAUER DES KÖNIGINNENSPERRENS ..... 31

    2.4 ÄNDERUNGEN DES VERSUCHSPLANS 2018/19 ..... 31

3 ARBEITSPAKET 4: KLEINER BIENENSTOCKKÄFER ..... 33

## INHALT

3.1	EINLEITUNG.....	33
3.2	MATERIAL UND METHODEN .....	33
3.2.1	AUSWAHL DER ÜBERWACHUNGSGEBIETE UND BIENENSTÄNDE 2017 UND 2018 .....	33
3.2.2	IDENTIFIZIERUNG DER TEILNEHMER AN DER MONITORINGSTUDIE.....	33
3.3	PROBENAHEME UND VERSAND.....	35
3.4	LAUFENDE UND ZUKÜNFTIGE ARBEITEN IN DEN JAHREN 2019 UND 2020 .....	36
3.4.1	FORTSETZUNG DER ÜBERWACHUNG.....	36
3.4.1	METHODENETABLIERUNG ZUM SHB-NACHWEIS AUS GEMÜLLE.....	36
3.4.2	BEARBEITUNG DER MONITORING-PROBEN UND ANALYSEN .....	36
4	TEILNAHME AN „RINGVERSUCHEN“ IM RAHMEN DER ARBEITSPAKETE.....	37
5	ARBEITSPAKET 8: INFORMATIONENFLUSS UND -AUSTAUSCH .....	38
5.1	KOMMUNIKATION MIT DEN BETEILIGTEN ORGANISATIONEN .....	38
5.2	VORTRÄGE.....	38
5.3	PUBLIKATIONEN UND POSTER .....	39
5.4	VORSTELLUNG DES PROJEKTS ÜBER DEN AGES-INTERNET-AUFTRITT.....	39
6	TABELLENVERZEICHNIS.....	40
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	40
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	41



# 1 AMERIKANISCHE FAULBRUT UND EUROPÄISCHE FAULBRUT (LEITUNG AGES)

**AMERIKANISCHE FAULBRUT (AFB) UND EUROPÄISCHE FAULBRUT (EFB)** sind weit verbreitete, schädliche Brutkrankheiten der Honigbiene. Im Arbeitspaket 2 des Projekts BPRACTICES („New indicators and on-farm practices to improve honeybee health in the *Aethina Tumida* era in Europe“) unter der Leitung der AGES werden jene Maßnahmen der guten imkerlichen Praxis (Good Beekeeping Practices, GBPs) identifiziert, die am Bienenstand angewendet werden müssen, um das Vorkommen der für die Krankheiten verantwortlichen Bakterien in den Bienenstöcken zu verhindern beziehungsweise diese bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome festzustellen. Neue Verfahren (z. B. PCR-Analysen von Gemülle, Kehrschwarmtechnik) zur Vorbeugung und Bekämpfung dieser Krankheiten werden standardisiert bzw. auf ihre Praxiseignung überprüft.

Dauer: 30 Monate (01/02/2017-01/08/2019)

## 1.1 SAMMLUNG DER MASSNAHMEN GUTER IMKERLICHER PRAXIS (GOOD BEEKEEPING PRACTICE, GBP)

Für die Erhebung der GBPs wurde eine gemeinsame MS-Excel-Datei für die Verwendung in den Arbeitspaketen 1-4 entwickelt und den Partnern zur Verfügung gestellt. Die zur Vorbeugung, Diagnose und Kontrolle der wichtigsten Honigbienenkrankheiten, einschließlich AFB und EFB, empfohlenen GBPs wurden nach vordefinierten Kategorien gesammelt. Diese wurden gemäß OIE-FAO-Leitfaden „Guide to good farming practices for animal production food safety“ (FAO - OIE 2009) festgelegt und bei Bedarf angepasst. Eine umfassende Liste von GBPs wurde zusammengestellt und von den Partnern bewertet. Der gesammelte Datensatz enthielt die GBPs in den Zeilen und die Antworten der Partner in den Spalten. Mittelwerte der Antworten der Partner wurden zeilenweise berechnet und anschließend in absteigender Reihenfolge sortiert. Für die von den Partnern gegebenenfalls als "obligatorisch" bzw. "von hoher Relevanz" gekennzeichneten GBPs wurde die Häufigkeit dieser Angaben über alle Partner berechnet und zusammen mit dem Mittelwert sortiert. Um eine Liste der am höchsten bewerteten GBPs zu erhalten, wurde das 75. Perzentil (3. Quantil) der mittleren Antworten als Cut-Off gewählt, d. h. in die Liste wurden GBPs mit Werten, die höher als das 75. Perzentil waren, aufgenommen. Die endgültige Liste wird in Arbeitspaket 5 in Hinblick auf Wirksamkeit und Anwendbarkeit der GBP durch ImkerInnen in Zusammenarbeit mit dem Internationalen Verband der Bienenzüchtervereinigungen (APIMONDIA) und dem Dachverband der europäischen Berufsimkerverbände (EPBA) bewertet.

## 1.2 LITERATURRECHERCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG UND AUSWAHL VON PCR-METHODEN ZUM NACHWEIS VON AFB- UND EFB-ERREGERN IN UNTERSCHIEDLICHEN PROBENMATRIZES AUS DEM BIENENSTOCK

Bei der Sichtung der verfügbaren Literatur lag ein besonderer Schwerpunkt auf einfachen, zeitsparenden, nicht-invasiven Probenahmetechniken, z. B. der Verwendung von Gemülle als Matrix für PCR-basierte Nachweismethoden. Ziel war es, Methoden zu identifizieren, die den präklinischen Nachweis der beiden Erreger *Paenibacillus larvae* und *Melissococcus plutonius* ermöglichen. Die Früherkennung unterstützt die Anwendung wirksamer Gegenmaßnahmen bereits im präklinischen Stadium zur Verhinderung klinischer Ausbrüche.

## Literaturquellen der Recherchen

- BEE BOOK, Band II, Kapitel “Standard methods for American foulbrood research” (de Graaf et al. 2013); “Standard methods for European foulbrood research (Forsgren et al. 2013), einschließlich einer Sammlung ausgewählter Methoden (Primer).
- OIE Terrestrial Manual 2016, Kapitel 2.2.2. (American Foulbrood of Honey Bees) und Kapitel 2.2.3. (European Foulbrood of Honey Bees)
- In beiden Publikationen sind Primer für die Detektion von *P. larvae* mittels konventioneller PCR (Dobbelare et al. 2001; Govan et al. 1999); BEE Book zitiert zusätzlich Versalovic et al. (1994).
- Primer für *M. plutonius* für konventionelle PCR wurden von Govan et al. (1998), Djordjevic et al. (1998) und Budge et al. (2010) publiziert. Zusätzlich wurden eine konventionelle PCR-Methode von McKee et al. (2003) im OIE Manual bzw. eine qPCR-Methode von Roetschi et al. (2008) präsentiert.
- Dainat et al. (2018) veröffentlichten eine Triplex-Real-Time-PCR zur qualitativen Detektion der Erreger von Europäischer und Amerikanischer Faulbrut in Honigbienen. Die AGES-Abteilung für Bienenkunde und Bienenschutz beteiligte sich am entsprechenden Ringtest im Jahr 2017.
- EU-Referenzlabor für Bienengesundheit (EU-RL): Methoden des EU-RL für AFB und EFB (Anses 2013)
- Online-Suche nach AFB- und EFB-Erkennungsmethoden (siehe 8. Literaturverzeichnis)

### 1.3 AUSWAHL UND TEST DER LEISTUNGSFÄHIGKEIT VON PCR-METHODEN ZUM NACHWEIS VON AFB- UND EFB-ERREGERN

Aus der Liste der Veröffentlichungen wurden PCR-Methoden (sechs für AFB und fünf für EFB) ausgewählt, und die entsprechenden Primer und gegebenenfalls Sonden *in silico* auf ihre Spezifität getestet. Alle relevanten Informationen (Referenzen, Primersequenzen, Zielgen, Amplikongröße und Primer-Bezeichnungen – wie veröffentlicht) sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Dargestellt sind auch die Ergebnisse der *in silico*-Spezifitätskontrolle. Geeignete Methoden wurden basierend auf den Spezifitätsergebnissen der BLAST-Suche ausgewählt. Als Ergebnis des *in silico*-Vergleichs der Primer – wie aus der Literatur ausgewählt – mit der GeneBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul et al. 1990, Johnson et al. 2008) erschienen einige Primer aufgrund ihrer Spezifität für *P. larvae* bzw. *M. plutonius* und das Fehlen von *in silico*-Kreuzreaktionen mit anderen Organismen als für die Detektion von *P. larvae* und *M. plutonius* geeignet (Tabelle 1, Spalte „Vorauswahl“). Für AFB waren das 4 PCR- und 1 qPCR-Methode, für EFB 2 PCR- und 3 qPCR-Methoden. Die Selektion wurde nach der kombinierten Spezifität der Primerpaare und gegebenenfalls der Sonde eingestuft. Für jedes Pathogen wurden drei Methoden mit der besten *in silico*-Spezifität für die weiteren Tests ausgewählt.

Um die besten Methoden für die Durchführung der Ringversuche im Rahmen von BPRACTICES zu identifizieren, wurden vergleichende Leistungstests mit einigen dieser *in vitro* ausgewählten PCR-Nachweismethoden durchgeführt:

- zum Nachweis von *P. larvae* mehrere konventionelle PCR-Methoden (Kilwinski et al. 2004; Bakonyi et al., 2003 mit je zwei verschiedenen Primerpaaren) und eine Real-time-PCR (Dainat et al. 2018)
- zum Nachweis von *M. plutonius* zwei konventionelle PCRs (Govan et al. 1998; McKee et al. 2003) und 3 Real-time-PCRs (Budge et al. 2010; Roetschi et al. 2008; Dainat et al. 2018)

Als Ergebnis dieser vergleichenden Voruntersuchung (Tabelle 2) wurden die konventionelle PCR-Methoden von Bakonyi et al. (2003/16S, 237 bp) und von Kilwinski et al. (2004; metalloprotease, 273 bp) und das Real-time-PCR-Verfahren von Dainat et al. (2018) ausgewählt, da sie für den Nachweis von *P. larvae* am erfolgreichsten waren. Die Methode von Dainat et al. (2018) zeigte sich auch für den Nachweis von *M. plutonius* geeignet, ebenso wie die qPCR von Roetschi et al. (2008) und die konventionelle PCR-Methode (16S, 831 bp) von Govan et al. (1998).

TABELLE 1. AUSGEWÄHLTE METHODEN, PRIMER- UND SONDENSEQUENZEN, ERGEBNISSE DER IN SILICO-SPEZIFITÄTSANALYSE UND VORAUSWAHL DER GEEIGNETEN PROTOKOLLE AUFGRUND DER IN SILICO-ANALYSE

	Referenz	Primer Forward (F; 5'-3')	Primer Reverse (R; 5'-3')	Sonde (5'-3')	Spezifität in silico	Vorauswahl
<b>AFB</b>						
PCR	Govan et al. 1999	AAGTCGAGCGGA CCTTGTGTTTC	GGAGACTGGCCA AAACTCTATCT		F-Primer an 5' nicht immer spezifisch; R nicht spezifisch	
PCR	Dobbelaere et al. 2001	CTTGTGTTTCTTTC GGGAGACGCCA	TCTTAGAGTGCCC ACCTCTGCG		F-Primer eine Abweichung (mismatch) in der Mitte möglich; R-Primer an 5' nicht immer spezifisch	(X)
qPCR	Martinez et al. 2010	CGGGAGACGCCA GGTTAG	TTCTTCCTGGCA ACAGAGC		F-Primer voll spezifisch, R-Primer zeigt Übereinstimmung mit anderen <i>Paenibacillus</i> spp.	(X)
PCR	Kilwinski et al. 2004	GCAAGTCGAGCG GACCTGTG	AAACCGGTCAGA GGGATGTCAAG		F-Primer voll spezifisch, R-Primer zeigt Übereinstimmung mit anderen <i>Paenibacillus</i> spp.	(X)
		GCACTGGAAACTG GGAGACTTG	CGGCTTTTGAGGA TTGGCTC		F-Primer nicht spezifisch, R-Primer nicht spezifisch und Abweichungen von der <i>P. larvae</i> -Sequenz	
		CGGGCAGCAAAT CGTATTCAG	CCATAAAGTGTTG GGTCCTTAAGG		Primer spezifisch, aber nur wenige Vergleichssequenzen verfügbar	X
PCR	Bakonyi et al. 2003	GCAAGTCGAGCG GACCTTGT	GCATCGTCGCCTT GGTAAGC		F-Primer voll spezifisch, R-Primer nicht spezifisch	X
		CGTATTCAGAGAC GGTGATG	TCTAAGGAACGG AGAGCATC		Primer spezifisch, aber nur wenige Vergleichssequenzen verfügbar	X
<b>EFB</b>						
PCR	Govan et al. 1998	GAAGAGGAGTTA AAAGGCGC	TTATCTCTAAGGC GTTCAAAGG		Primer voll spezifisch	X
PCR (nested)	McKee et al. 2003	CTTTGAACGCCTT AGAGA	ATCATCTGTCCCA CCTTA		F-Primer nicht spezifisch, R-Primer nicht spezifisch	
		CTTTGAACGCCTT AGAGA	TTAACCTCGCGGT CTTGCGTCTCTC		F-Primer nicht spezifisch, R-Primer voll spezifisch	(X)
qPCR	Budge et al. 2010	TGTTGTTAGAGAA GAATAGGGGAA	CGTGGCTTTCTGG TTAGA	(FAM)AGAGTAACTGTTT TCCTCGTGACGGT	F-Primer voll spezifisch, R nicht spezifisch, Sonde voll spezifisch	X
qPCR	Roetschi et al. 2008	CAGCTAGTCGGTT TGGTTCC	TTGGCTGTAGATA GAATTGAC	(FAM)CTTGGTTGGTCGTT GAC(MGB)	F-Primer voll spezifisch, R-Primer voll spezifisch, Sonde hat Übereinstimmung mit zwei anderen nicht-Zielssequenzen	X
<b>AFB/EFB duplex qPCR</b>						
AFB	Dainat et al. 2018	TACGCTTTTCGAT TCTCTG	GTCTGTAAGCAAC CAAGTC	(HEX)ATCTGCTTCCACTT GTTCACTCACCW	F-Primer voll spezifisch, R-Primer hat Übereinstimmung mit 3 anderen Nichtziel-Sequenzen, Sonde: letzte Base am 3' nicht spezifisch (Abweichung von der Originalsequenz: W statt A)	(X)
EFB		GACCTGTTTAGCT ATTATCACTA	CACCTACAATGAA TGATTCATTC	(FAM)TCCGCCTAAGCTA CCACCTAAGAAC	F, R und Sonde voll spezifisch	X



TABELLE 2. AUSGEWÄHLTE PROTOKOLLE: BEWERTUNG DER SENSITIVITÄT UND REIHUNG NACH EFFIZIENZ.

Die Methoden wurden gemäß ihrer Effizienz gereiht. Drei Methoden pro Pathogen (2x PCR and 1x qPCR for *P. larvae*; 1x PCR and 2x qPCR for *M. plutonius*) wurden als geeignet für die Detektion von *P. larvae* (AFB) und *M. plutonius* (EFB) aus Gemülle ausgewählt.

	Referenz	Amplifikations- produkt	Primer-und Sondenbezeichnungen	Auswahl	Sensitivität	Reihung nach Effizienz	Anmerkungen
<b>AFB</b>							
PCR	Govan et al. 1999	973 bp	PL 1 / PL 2		-		
PCR	Dobbelaere et al. 2001	1106 bp	AFB-F / AFB-R		-		kann mit Primern aus Govan et al. 1999 kombiniert werden; Primer werden vom EU-RL verwendet
qPCR	Martínez et al. 2010	380 bp	PL2-Fw / PL2-Rev		-		SybrGreen
PCR	Kilwinski et al. 2004	965 bp	P11-16S E1 / P11-16S E2	X	zufriedenstellend		
		665 bp	P11-16S F6 / P11-16S B11		-		
PCR	Bakonyi et al. 2003	273 bp	P11-MP F3 / P11-MP B1	X	gut	3. (AFB)	
		237 bp	AF6/AF7	X	ausgezeichnet	2. (AFB)	wird von G. Formatos Team verwendet
		242 bp	Paeni 30f / Paeni 253r	X	schlecht		wird von G. Formatos Team verwendet
<b>EFB</b>							
PCR	Govan et al. 1998	831 bp	primer1 / primer2	X	ausgezeichnet	3. (EFB)	Primer werden von EU-RL verwendet (EFB 1/EFB 2)
PCR (nested)	McKee et al. 2003	486 bp	MP1 / MP2		-		basiert auf Djordjevic et al. 1998
		276 bp	MP1 / MP3	X	schlecht		
qPCR	Budge et al. 2010		EFBFor / EFBRev2 / EFBProbe	X	-		Taqman, Diese Methode wurde ausgeschlossen, da im Test nie ein Fluoreszenzsignal auftrat.
qPCR	Roetschi et al. 2008		MelissoF / MelissoR / MelissoP	X	ausgezeichnet	2. (EFB)	TaqmanMGB
<b>AFB/EFB duplex qPCR</b>						-	
AFB	Dainat et al. 2018	87 bp		X	ausgezeichnet	1. (AFB)	Taqman, Abweichung vom Originalprotokoll: HEX statt VIC und W statt A
EFB		92 bp	MP-F / MP-R / MP-PROBE	X	ausgezeichnet	1. (EFB)	Taqman

## 1.3.1 SPEZIFITÄTSTESTS

Primer und Sonden der ausgewählten Methoden (Tabelle 2) wurden bestellt. Die Protokolle wurden mit extrahierter DNA aus Proben unterschiedlicher Herkunft (Tabelle 3) auf Spezifität getestet: für *P. larvae* aus einem klinisch AFB-erkrankten Volk aus Österreich ("klinische Probe"; ERIC-I- und -II-Stämme) und für *M. plutonius* mit DNA aus Material aus der Schweiz (2011, Roetschi) und Italien (2017, Formato).

TABELLE 3. AUFSTELLUNG DER FÜR DIE SPEZIFITÄTSTESTS VERWENDETEN PROBEN ÖSTERREICHISCHER KLINISCHER AFB-FÄLLE

Jahr	Code	ERIC*-Typ	BOX*-Typ	MBO REP*-Typ	Bundesland	Matrix	
						Bakterien	DNA
2004	18	I	A	b	Salzburg	X	
2004	79	I	A	b	Steiermark	X	
2006	255a2	I	A	b	Vorarlberg		X
2004	77	I	a	b	Niederösterreich	X	
2006	210	I	a	b	Salzburg	X	
2004	104a	I	a	b	Steiermark	X	
2005	208a	II	A	B	Oberösterreich	X	
2005	200	II	A	B	Tirol		X
2005	274	II	A	B	Wien	X	
2006	142	II	a	B	Oberösterreich	X	
2006	162	II	a	B	Oberösterreich	X	
2006	201	II	a	B	Oberösterreich		X

\*ERIC, BOX und MBO-REP sind Sequenzabschnitte, die zur Typisierung von *P. larvae* verwendet werden.

Zusätzlich wurde eine Dezimalverdünnungsreihe von einer Probe pro Zielerreger (*P. larvae* und *M. plutonius*) hergestellt und mit allen ausgewählten Methoden zur Bestimmung der Sensitivität (Tabellen 4 und 5) getestet. Eine qPCR für EFB wurde ausgeschlossen, weil sie beim Spezifitätstest kein Ergebnis ergab.

TABELLE 4. VERGLEICHSPRÜFUNGEN DER SENSITIVITÄT UNTERSCHIEDLICHER PCR-PROTOKOLLE FÜR DIE DETEKTION VON *P. LARVAE* (AFB) UNTER VERWENDUNG EINER DEZIMALEN VERDÜNNUNGSREIHE

PCR-Protokoll	Probe	Verdünnungen																
		1:1	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:5x10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:5x10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:5x10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:5x10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:5x10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>7</sup>	1:5x10 <sup>7</sup>	1:10 <sup>8</sup>	1:5x10 <sup>8</sup>	1:10 <sup>9</sup>
Dainat 2018	04/18	12,59	15,81	19,16	21,52	22,73	25,05	26,23	28,55	29,35	31,78	33,11	34,36	36,79	36,81	0	0	0
Kilwinski 2004	04/18	++	++	++	++	++	+	+	(+)	((+))	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt
Kilwinski 2004 (MP)	04/18	++	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	(+)	-	-	nt	nt	nt	nt
Bakonyi 2003 (16S)	04/18	++	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	(+)	((+))	((++))	nt	nt	nt	nt
Bakonyi 2003 (MP)	04/18	++	++	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt

nt...not tested (nicht untersucht)

Die Ausprägung des Signals ist mit + angegeben, von (((+))) = gerade noch sichtbares Signal bis ++ = sehr stark sichtbares Signal.

TABELLE 5. VERGLEICHSPRÜFUNGEN DER SENSITIVITÄT UNTERSCHIEDLICHER PCR-PROTOKOLLE FÜR DIE DETEKTION VON *M. PLUTONIUS* (EFB) UNTER VERWENDUNG EINER DEZIMALEN VERDÜNNUNGSREIHE

PCR-Protokoll	Probe	Verdünnungen											
		1:1	1:5	1:10	1:50	1:10 <sup>2</sup>	1:5x10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:5x10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:5x10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	
Dainat 2018	EFB 12	21,38	23,58	24,94	27,38	28,39	30,5	32,07	33,65	35,24	36,44	0	
Budge 2010	EFB 12	0	nicht getestet										Kein Signal mit den fünf verschiedenen Proben der Spezifitätsuntersuchung
Roetschi 2008	EFB 12	22,64	24,94	25,99	28,17	29,25	31,74	32,65	35,92	36,38	0	0	
Govan 1998	EFB 12	++	++	++	++	++	++	++	+	(+)	-	-	
Djordjevic 1998	EFB 12	+	+	+	(+)	(+)	-	nt	nt	nt	nt	nt	

nt...not tested (nicht untersucht)

Die Ausprägung des Signals ist mit + angegeben, von (+) = schwach sichtbares Signal bis ++ = sehr stark sichtbares Signal.

## 1.3.2 BEWERTUNG VON DNA-EXTRAKTIONSMETHODEN

Eine Gemülleprobe eines an AFB erkrankten Bienenvolkes (Probe „GM“) wurde verwendet, um zwei verschiedene DNA-Extraktionsverfahren vergleichend zu testen. Um die Extraktionshomogenität zu testen, wurde die Isolierung dreimal durchgeführt (GM 1-3). Dazu wurde einerseits die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion mit einer DNA-Fällung mit Isopropanol durchgeführt. Der Vorteil der Verwendung dieser Methode ist, dass die Bienenwachspartikel im Gemülle durch die organischen Lösungsmittel aufgelöst werden. Die zweite Methode beinhaltet eine Oberflächenwaschung des Gemülles mit einer phosphatgepufferten Salzlösung, gefolgt von einer Extraktion mit einem kommerziellen Kit (Qiagen Blood and Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) auf Basis von Silikamatrix-Säulen.

Die Untersuchung der DNA-Extraktionsmethoden für *M. plutonius* erfolgte an zwei Gemülleproben aus an EFB erkrankten Bienenvölkern (Probe 14037538 und 14037541) und einer dankenswerterweise von Giovanni Formato 2017 erhaltenen Suspension eines Typstamms von *M. plutonius* (ACC 35311).

Alle Extraktionen wurden seriell verdünnt und vergleichend mittels der zuvor bestimmten empfindlichsten Nachweismethoden getestet (Tabellen 6 und 7).

**TABELLE 6. VERGLEICH VON ZWEI METHODEN ZUR EXTRAKTION VON DNA AUS GEMÜLLE KLINISCH AN AFB ERKRANKTER VÖLKER UNTER VERWENDUNG VON VERDÜNNUNGSREIHEN**

Alle Proben wurden mit der Methode von Dainat et al. (2018) untersucht. Die Extraktion erfolgte aus 1 g Gemülle. Der Vergleich der Methoden ist dargestellt anhand des Ct-Werts (Anzahl der Zyklen). Methoden: P...Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion, K...Qiagen Blood and Tissue Kit.

Probe	Verdünnung									
	1:1	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>7</sup>	1:10 <sup>8</sup>	1:10 <sup>9</sup>
<b>AFB</b>										
GM_P1	9,98 <sup>1</sup>	16,13	19,69	22,83	26,21	29,53	32,85	37,53 <sup>3</sup>	0	0
GM_P2	11,04 <sup>1</sup>	14,54	17,91	20,6	24,5	27,96	31,08	35,54 <sup>3</sup>	0	0
GM_P3	6,96 <sup>1</sup>	14,22	17,71	21	24,44	27,31	30,86	34,57 <sup>3</sup>	0	0
GM_K1	18,96 <sup>2</sup>	22,11 <sup>2</sup>	25,65 <sup>2</sup>	28,26 <sup>2</sup>	32,01 <sup>2</sup>	35,6 <sup>2</sup>	35,75 <sup>2</sup>	0	0	0
GM_K2	14,46 <sup>2</sup>	17,71 <sup>2</sup>	21,15 <sup>2</sup>	24,55 <sup>2</sup>	27,75 <sup>2</sup>	30,66 <sup>2</sup>	33,8 <sup>2</sup>	36,64 <sup>4</sup>	37,73 <sup>4</sup>	0
GM_K3	16,41 <sup>2</sup>	20,01 <sup>2</sup>	23,18 <sup>2</sup>	26,63 <sup>2</sup>	29,68 <sup>2</sup>	33,7 <sup>2</sup>	36,85 <sup>2</sup>	0	0	0

<sup>1</sup>Inhibierung aufgrund der Fluoreszenzkurvenform und der Abweichung der Werte der Replikate zu vermuten

<sup>2</sup>keine Inhibierung, aber Unterschiede in der Homogenität der Wiederholungen

<sup>3</sup>Vergleichbare Nachweisgrenze mit allen Wiederholungen

<sup>4</sup>eine Wiederholung mit Signalen in höherer Verdünnungsstufe (unterhalb der Nachweisgrenze)

TABELLE 7. VERGLEICH VON ZWEI METHODEN ZUR EXTRAKTION VON DNA AUS GEMÜLLE KLINISCH AN EFB ERKRANKTER VÖLKER UNTER VERWENDUNG VON VERDÜNNUNGSREIHEN

Alle Proben wurden mit der Methode von Dainat et al. (2018) untersucht. Die Extraktion erfolgte aus 1 g Gemülle. Der Vergleich der Methoden ist dargestellt anhand des Ct-Werts (Anzahl der Zyklen).

Probe	Methode		Verdünnung									
	P	K	1:1	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>6</sup>	1:10 <sup>7</sup>	1:10 <sup>8</sup>	1:10 <sup>9</sup>
<b>EFB ACC</b>		X	21,33	24,86	28,23	31,9	34,95	0	0	0	nt	nt
<b>EFB 38</b>		X	23,91	27,46	30,68	34,47	0	0	0	0	nt	nt
<b>EFB 41</b>		X	20,47	24,11	27,56	31,05	35,05	37,59	0	0	nt	nt
<b>EFB 38</b>	X		26,31	29,48	32,55	36,9	0	0	0	0	nt	nt
<b>EFB 41</b>	X		17,77	21,32	24,56	27,64	31,24	35,13	0	0	nt	nt

nt...nicht untersucht

Methoden: P...Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, K...Qiagen Blood and Tissue Kit

Beide Extraktionsverfahren hatten vergleichbare Extraktions- und Reinigungseffizienzen, jedoch wurde eine leichte Hemmung bei unverdünnter DNA aus der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion festgestellt (Tabelle 6). Als Schlussfolgerung wird die Extraktion mit dem kommerziellen Kit bevorzugt, da das Verfahren einfacher zu handhaben ist und die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, wie Phenol und Chloroform, vermeidet.

### 1.3.3 ABSOLUTE QUANTIFIZIERUNG DURCH DIGITAL DROPLET PCR

Die extrahierte DNA aus den Proben GM\_K1-3 wurde vereint. Die Proben EFB38 und EFB41 (1:10- und 1:100-Verdünnungen) wurden für die absolute Quantifizierung durch Digital Droplet PCR (ddPCR) verwendet. Digital Droplet PCR (ddPCR) ist eine Methode zur Durchführung digitaler PCR, die auf Wasser-Öl-Emulsion-Tröpfchentechnologie basiert. Eine Probe wird in 20.000 Tröpfchen fraktioniert. Die Amplifikation der Probenmoleküle erfolgt in jedem einzelnen Tröpfchen. Die ddPCR-Technologie verwendet Reagenzien und Arbeitsabläufe, die denen ähnlich sind, die für die meisten standardmäßigen, auf TaqMan-Sonden basierenden, Assays verwendet werden. Die massive Sample-Partitionierung ist ein Schlüsselaspekt der ddPCR-Technik (Beschreibung Biorad: <http://www.bio-rad.com/de-at/applications-technologies/droplet-digital-pcr-ddpcr-technology?ID=MDV31M4VY# 1>, abgerufen am 05.11.2018).

Die Reaktionen wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers (Biorad, Hercules, USA) hergestellt und die Amplifikation der Verdünnungen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die DNA, die aus klinisch positiven Gemülleproben (AFB; GM\_K1-3 und EFB; EFB38 und EFB41) extrahiert wurde, wurde für die absolute Quantifizierung durch ddPCR verwendet. Die aus der ddPCR resultierenden Mengen an Zielkopien waren:

- für *P. larvae*; GM\_K1-3 = 1.805.000 pro µl DNA,
- für *M. plutonius*; EFB38 = 2.304 und EFB41 = 26.496 pro µl DNA

Nach den Ergebnissen einer Studie mit Boden-DNA-Extrakten wurde eine DNA-Isolierungseffizienz von ca. 65 % angenommen (Wögerbauer et al. 2015). Dies entspricht Kopienzahlen für die Zielsequenz von  $3,52 \times 10^8$  für GM\_K1-3;  $4,49 \times 10^5$  für EFB38 und  $5,17 \times 10^6$  für EFB41 pro g Gemülle in den Proben.



## 1.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR TESTLEISTUNG (TEST PERFORMANCE STUDY, TPS)

### 1.4.1 PLAN FÜR DIE TPS

Der Probenahmeplan für die AFB-/EFB-TPS (Test Performance Study, „Ringversuch“) wurde mit dem Ziel erstellt, die diagnostische Sensitivität/Spezifität verschiedener Methoden zum Nachweis von *P. larvae*/*M. plutonius* aus Gemülle abzuschätzen. Obwohl auch die Spezifität geschätzt wurde, lag der Fokus primär auf der Sensitivität. Daher wurden alle Probengrößenberechnungen mit Schätzungen der Empfindlichkeit durchgeführt, die bei allen getesteten Methoden 95 % betrug. Ein 95 %-iges-Konfidenzintervall mit einer Länge von 10 % wurde als angemessen angesehen. Laut dem OIE-Handbuch für Landtiere beträgt die Stichprobengröße für einen Ringversuch mit diesen Spezifikationen 73. An dem TPS waren sechs Partnerlabore beteiligt: IZSLT (Italien), CIAPA (Spanien), AIS (Slowenien), NKU (Türkei), AGES (Österreich) und das EU-Referenzlabor für Bienengesundheit (EU-RL, Frankreich).

Um die genannten Qualitätsvorgaben zu erfüllen, wurden 20 Proben an jedes der teilnehmenden Labors verschickt. Auf dieser Grundlage folgte die TPS dem in Tabelle 8 zusammengefassten Design. Die positiven Proben enthielten Proben mit unterschiedlichen Verdünnungen (schwach und stark). Zwei Proben hatten eine niedrige und drei hatten eine hohe Konzentration von DNA aus *P. larvae* bzw. *M. plutonius*. Drei Proben hatten eine niedrige Konzentration von sowohl *P. larvae*- als auch *M. plutonius*-DNA, eine hatte eine hohe Konzentration von beiden und zwei hatten eine hohe Konzentration von *P. larvae* und eine niedrige Konzentration von *M. plutonius* und umgekehrt. Zwei Proben wurden mit nah verwandten Nichtziel-Organismen vorbereitet um die Exklusivität (Kreuzreaktion) der Methoden mit zu testen. Zusätzlich wurden eine positive und eine negative Kontrolle zur Verfügung gestellt.

TABELLE 8. MATRIX DES TPS-(“RINGTEST”-) DESIGNS

Konzentration	Konzentration	Zielorganismus: <i>M. plutonius</i>		
		negativ	niedrig	hoch
Zielorganismus: <i>P. larvae</i>	negativ	2	2	3
	niedrig	2	3	2
	hoch	3	2	1

Gemäß der Probenmatrix musste jedes teilnehmende Labor mit 13 positiven Proben pro Pathogen versorgt werden, was insgesamt 78 positive Proben für jedes Pathogen ergab. Zur Schätzung der Spezifität wurden sieben negative Proben für jedes Pathogen pro Labor analysiert, was zu insgesamt 42 Proben führte.

### 1.4.2 LABORVERGLEICH (INTERLABORATORY COMPARISON, ILC): VORBEREITUNG DER PROBEN

Der ILC wurde als Test Performance Study (TPS) für den molekularen Nachweis von *P. larvae* und *M. plutonius* aus Gemülle konzipiert. Ziel der TPS war es, die Leistung und die Genauigkeit der aus der Literatur ausgewählten PCR-Methoden für einen frühen Nachweis von *P. larvae* und *M. plutonius* aus Gemülle zu bewerten. Die anschließend als am besten bewerteten Methoden sollten für die Überwachung dieser zwei bakteriellen Pathogene in einem präklinischen Stadium verwendet werden. Präparierte DNA-Extrakte aus Fragmenten, die aus klinischen Proben (AFB und EFB) erhalten wurden, wurden vergleichend unter Verwendung von drei verschiedenen PCR-Protokollen und 3 qPCR-Protokollen getestet und die Proben für die TPS hergestellt (Tabelle 10). Die Konzentration der Zielorganismen wurde unter Verwendung der für die TPS ausgewählten qPCRs bestimmt. Die Konzentration (Kopien pro µl) der Proben wurde anhand einer zuvor mittels dd-RT-PCR bestimmten Standardkurve (Tabelle 9) bestimmt.

TABELLE 9. STANDARDREIHE BASIEREND AUF DER ABSOLUTEN QUANTIFIZIERUNG DER KOPIENANZAHL DER BEIDEN ERREGER MITTELS DD-RT-PCR

Probe	Verdünnung	Anzahl Kopien	
		<i>P. larvae</i>	<i>M. plutonius</i>
Standard 1	-	18.050	26.496
Standard 2	1:10	1.805	2.650
Standard 3	1:100	181	265
Standard 4	1:1.000	18,1	26,5
Standard 5	1:10.000	1,8	2,65
Standard 6	1:100.000	0,18	0,265

Das allgemeine Versuchsdesign war wie folgt: 20 Blindproben plus 1 positive und 1 negative Kontrolle für *P. larvae* und *M. plutonius* (das Set kann mit „koinfizierten“ Proben kombiniert werden), um mit drei Tests je Pathogen getestet zu werden (2x PCR und 1x qPCR) für *P. larvae*, 1x PCR und 2x qPCRs für *M. plutonius*) in doppelten technischen Replikaten, die zu einem qualitativen Ergebnis zusammengefasst werden.

Konkret erhielten die teilnehmenden Laboratorien: Proben und Kontrollen (Tabelle 10; fünf ausschließlich *P. larvae*, fünf ausschließlich *M. plutonius* und zehn gemischte Proben, wobei extrahierte und gemischte DNA hauptsächlich aus Gemülleproben AFB- und EFB-klinisch erkrankter Völker entnommen wurde), zwei Proben, die eine Mischung anderer Bakterien enthielten (z.B. *Bacillus* spp.), Primer und Sonden, Mastermixe, ein Protokoll und ein Formular zum Senden der Ergebnisse. Die Proben wurden den Teilnehmern der TPS in zufälliger Reihenfolge (randomisiert) zur Verfügung gestellt.

TABELLE 10. ZUSAMMENSETZUNG DER PROBEN FÜR DIE TPS (ERREGER UND KONZENTRATION) UND TESTERGEBNISSE ZUR BESTIMMUNG DER NACHWEISGRENZE DER AUSGEWÄHLTEN METHODEN

Probe		Verdünnung		Ziel	Wiederholung	Konzentration	Dainat durchschnittliche Anzahl Kopien <i>P. larvae</i>	Dainat durchschnittliche Anzahl Kopien <i>M. plutonius</i>	Roetschi durchschnittliche Anzahl Kopien <i>M. plutonius</i>	Ergebnisse PCR		
<i>P. larvae</i> (Pl)	<i>M. plutonius</i> (Mp)	Pl	Mp							Kilwinski Pl	Bakonyi Pl	Govan Mp
GM_K1-3		1:10 <sup>5</sup>		Pl	1	niedrig	14,8	0	0	neg	neg	neg
GM_K1-3		1:10 <sup>5</sup>		Pl	2	niedrig	8,41	0	0	neg	neg	neg
04/18		1:10		Pl	1	hoch	596.000	0	0	pos	pos	neg
04/18		1:10		Pl	2	hoch	605.000	0	0	pos	pos	neg
04/18		1:10		Pl	3	hoch	643.500	0	0	pos	pos	neg
	EFB 38		1:10 <sup>3</sup>	Mp	1	niedrig	0	2,045	1,2285	neg	neg	neg
	EFB 38		1:10 <sup>3</sup>	Mp	2	niedrig	0	0,27	1,4565	neg	neg	neg
	EFB 41		1:10	Mp	1	hoch	0	1.247	1.117	neg	neg	pos
	EFB 41		1:10	Mp	2	hoch	0	1.308,5	1.389	neg	neg	pos
	EFB 41		1:10	Mp	3	hoch	0	1.514	1.285	neg	neg	pos
GM_K1-3	EFB 38	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>3</sup>	Pl/Mp	3/3	niedrig/niedrig	12,495	0,8575	0,789	neg	neg	neg
04/104	EFB 12	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>3</sup>	Pl/Mp	1/1	niedrig/niedrig	12,14	6,92	6,185	neg	neg	pos
06/201	EFB 12	1:10	1:10 <sup>3</sup>	Pl/Mp	1/2	hoch/niedrig	62.550.000	10,335	6,335	pos	pos	pos
06/201	EFB 12	1:10	1:10 <sup>3</sup>	Pl/Mp	2/3	hoch/niedrig	54.700.000	13,13	6,24	pos	pos	pos
04/104	EFB ACC	1:10 <sup>5</sup>	1:10	Pl/Mp	2/1	niedrig/hoch	16,5	892,5	533,5	neg	neg	pos
04/104	EFB ACC	1:10 <sup>5</sup>	1:10	Pl/Mp	3/2	niedrig/hoch	4,865	764,5	526	neg	neg	pos
06/201	EFB ACC	1:10	1:10	Pl/Mp	3/3	hoch/hoch	54.950.000	725	591	pos	pos	pos
BB 2005-200	EFB 17	1:10 <sup>5</sup>	1:10 <sup>4</sup>	Pl/Mp	-	niedrig/niedrig	2.268,5	2,32	1,93	pos	pos	neg
SB				-	-	hoch, kein Ziel	0	0	0	neg	neg	neg
SP				-	-	hoch, kein Ziel	0	0	0	neg	neg	neg
BD 2005-274		1:10		Pl	-	hoch				pos	pos	
	EFB 13		1:10	Mp	-	hoch						pos
				-	-	Wasser				neg	neg	neg

## 1.4.3 ERGEBNISSE DER TPS

Alle Teilnehmer an der TPS übermittelten die Ergebnisse der Ringversuche. Die Analyse wurde in R (Version 3.5.0; R Core Team 2018) durchgeführt. Für jede Methode wurden Schätzungen der Sensitivität (Tabelle 11) und Spezifität (Tabelle 12) berechnet. Die zugehörigen Konfidenzintervalle wurden mit der Methode von Agresti-Coull berechnet (Brown et al. 2001).

TABELLE 11. SCHÄTZUNG DER SENSITIVITÄT DER AUSGEWÄHLTEN METHODEN

Methode	Schätzung	Konfidenzintervall
RT-PCR Dainat <i>M. plutonius</i>	64,1 %	[53,0 %, 73,9 %]
RT-PCR Dainat <i>P. larvae</i>	73,1 %	[62,3 %, 81,7 %]
PCR Bakonyi	48,7 %	[37,9 %, 59,6 %]
PCR Govan	44,9 %	[34,3 %, 55,9 %]
PCR Kilwinski	48,7 %	[37,9 %, 59,6 %]
RT-PCR Roetschi	64,1 %	[53,0 %, 73,9 %]

Im Allgemeinen zeigten die RT-PCR-Protokolle für beide Krankheitserreger eine bessere Sensitivität (zwischen 64,1 % und 73,1 %) als die herkömmlichen PCRs (44,9 % bis 48,7 %, Tabelle 8). Die Spezifität war für alle getesteten Protokolle hoch (Tabelle 9).

TABELLE 12. SCHÄTZUNG DER SPEZIFITÄT DER AUSGEWÄHLTEN METHODEN

Methode	Schätzung	Konfidenzintervall
RT-PCR Dainat <i>M. plutonius</i>	97,6 %	[86,6 %, 100,0 %]
RT-PCR Dainat <i>P. larvae</i>	92,9 %	[80,3 %, 98,2 %]
PCR Bakonyi	92,9 %	[80,3 %, 98,2 %]
PCR Govan	83,3 %	[69,1 %, 92,0 %]
PCR Kilwinski	97,6 %	[86,6 %, 100,0 %]
RT-PCR Roetschi	97,6 %	[86,6 %, 100,0 %]

TABELLE 13. ERGEBNISSE DER TPS FÜR DIE UNTERSCHIEDLICHEN PROBENARTEN AUS ALLEN AN DER TPS TEILNEHMENDEN LABORATORIEN

Die Ergebnisse für jede Methode sind separat aufgeführt. Die Spalten zeigen den Typ der Probe (negativ, schwach positiv und stark positiv). In den Zeilen werden die von den Labors für diese Proben vorgelegten Ergebnisse zusammengefasst.

Protokoll	Ergebnisse	Proben		
		negativ	positiv, 2 Konzentrationen	
			niedrig	hoch
<b>RT-PCR Dainat – <i>M. plutonius</i></b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	negativ	41	28	0
	positiv	1	14	36
<b>RT-PCR Dainat – <i>P. larvae</i></b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	negativ	39	18	3
	positiv	3	24	33
<b>PCR Bakonyi (<i>P. larvae</i>)</b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	nicht bewertbar	2	2	0
	negativ	39	38	0
	positiv	1	2	36
<b>PCR Govan (<i>M. plutonius</i>)</b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	kein Ergebnis	7	7	6
	nicht bewertbar	0	1	0
	negativ	35	29	0
	positiv	0	5	30
<b>PCR Kilwinski (<i>P. larvae</i>)</b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	nicht bewertbar	1	0	0
	negativ	41	40	0
	positiv	0	2	36
<b>RT-PCR Roetschi (<i>M. plutonius</i>)</b>				
Zusammengefasste Ergebnisse	negativ	41	28	0
	positiv	1	14	36

Tabelle 13 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aller an der TPS teilnehmenden Laboratorien nach Erregern. Zur Erläuterung dienen die Ergebnisse der PCR von Govan. Die Tabelle zeigt, dass für sieben "negative" Proben kein Ergebnis übermittelt wurde, aber die anderen 35 Proben von den Labors korrekt als negativ identifiziert wurden. Für sieben "schwach positive" Proben wurde kein Ergebnis vorgelegt, und für eine Probe war das Ergebnis nicht eindeutig; 29 wurden fälschlicherweise als negativ eingestuft, und nur 5 schwach positive Proben wurden korrekt als positiv identifiziert. Die Ergebnisse für "stark positive" Proben zeigen, dass für 6 Proben kein Ergebnis vorgelegt wurde. Alle übrigen 30 Proben wurden korrekt als positiv identifiziert.

Insgesamt konnten somit einige der sehr schwach positiven Proben in der TPS nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise führten Bearbeitungsprozesse vor (z.B. die Aliquotierung sehr kleiner Volumina) und während des Transports (z.B. Auftauen und Gefrieren der Proben) zu einem Schwund der DNA in den Probenröhrchen und damit zu einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der getesteten Protokolle.

Die Eignung der Protokolle für den vorgesehenen Verwendungszweck – den Nachweis von *P. larvae* und *M. plutonius* im Gemülle – wird im Rahmen des laufenden Monitorings für AFB, EFB und SHB bei Anwendung auf subklinische österreichische Proben weiter bewertet. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich die Empfehlung ableiten, vorzugsweise RT-PCR für den Nachweis aus Gemülleproben zu verwenden.



## 1.5 FELDVERSUCHE AMERIKANISCHE FAULBRUT (AFB): EVALUIERUNG DER KEHRSCHWARM-METHODE ZUR ELIMINIERUNG VON *P. LARVAE* IM SUBKLINISCHEN STADIUM

### 1.5.1 EINLEITUNG

Amerikanische Faulbrut (AFB) ist eine laut dem österreichischen Bienenseuchengesetz (BSG, Bundesgesetz vom 25. Mai 1988 über die Bekämpfung ansteckender Krankheiten der Bienen, BGBl. Nr. 290/1988) anzeigepflichtige Krankheit, die durch den Erreger *Paenibacillus larvae* ausgelöst wird. Bei einem Seuchenfall sind der betroffene Bienenstand zu sanieren und ein Sperrkreis mit einem Radius von drei Kilometer einzurichten, in dem sämtliche Bienenstände durch einen Bienensachverständigen oder Amtstierarzt auf klinische Symptome der Krankheit untersucht werden.

Ein positiver Nachweis von *P. larvae* in Futterkranzproben begründet einen Verdacht auf AFB, und die zuständige Behörde (Bezirkshauptmannschaft, Magistrat) muss nach dem österreichischen Bienenseuchengesetz informiert werden. Diesen Bestimmungen folgend wurde in derartigen Fällen eine gründliche Inspektion durch einen offiziellen Bienensachverständigen durchgeführt, um jeden Bienenstock innerhalb des Bienenstandes auf klinische Symptome zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Inspektionen wurden von den Amtstierärzten mit Zustimmung der ImkerInnen an das AGES-Labor der Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz (Nationales Referenzlabor für Bienengesundheit) übermittelt, wodurch die subklinischen Bienenstände für diesen Versuch identifiziert werden konnten.

### 1.5.2 MATERIAL UND METHODEN

Um die Wirksamkeit der durchgeführten Kehrschwarm-Methode zur Beseitigung von *P. larvae* in der Praxis zu bewerten, wurden Futterkranz- und Gemülleproben aus subklinisch erkrankten Völkern vor und nach Durchführung der Kehrschwarmbildung entnommen. Bienenstände wurden als "subklinisch" bewertet, wenn die Laboranalyse positive Ergebnisse für Futterkranzproben von einigen oder allen Völkern des Bienenstandes ergeben hatte, aber keine klinischen Symptome erkennbar waren. ImkerInnen mit solchen subklinischen Bienenständen wurden als TeilnehmerInnen für den Feldversuch zur Bewertung der Kehrschwarm-Methode rekrutiert. Auch aus einem Sperrkreis eines AFB-Falles wurden subklinische Fälle identifiziert, indem bei Ständen, auf denen bei der Inspektion keine erkrankten Völker entdeckt worden waren, anschließend auch Futterkranzproben entnommen und getestet wurden.

Grundsätzlich gilt die Empfehlung, dass bei der Feststellung eines subklinischen Befalls alle Völker des Standes saniert werden müssen. Die wesentlichen Schritte der Kehrschwarm-Methode bei subklinischem Erregervorkommen sind: Alle Bienen inklusive der Königin eines Volkes werden in eine Schwarmkiste abgekehrt und bis zu drei Tage ohne Futter unter kühlen und dunklen Bedingungen stehen gelassen. So wird eine Hungerphase erreicht, in der sämtliche Futtervorräte in den Honigblasen der Bienen aufgebraucht und verdaut werden, wodurch auch eine Infektion über den sozialen Futtertausch verhindert werden kann. Der Kehrschwarm wird anschließend in eine neue oder desinfizierte Beute eingeschlagen und mit Mittelwänden ausgestattet. Ist kein kühler, dunkler Raum verfügbar, kann der Kehrschwarm auch ohne Hungerphase in eine saubere, desinfizierte oder eine neue Beute eingeschlagen und im Freien aufgestellt werden. Günstig dafür ist eine Periode ohne Nektar- oder Honigtautracht, damit die Bienen den Honigblaseninhalte in dieser Zeit verbrauchen. Die brutlose Phase kann in beiden Fällen zur Behandlung gegen Varroamilben mit einem zugelassenen Oxalsäure-Präparat oder anderen dafür zugelassenen Arzneimitteln mit rascher Wirkung verwendet werden.

Die Futterkranzproben wurden mit der in der AGES etablierten und akkreditierten Kultivierungsmethode auf *P. larvae* getestet. Diese umfasst folgende Arbeitsschritte: Homogenisierung der Probe, Verdünnung mit sterilem destilliertem Wasser, Erhitzen der Lösung (90° C, 6 Minuten) in einem Wasserbad, Inokulation von Columbia-Blut-Agarplatten, Inkubation der Platten bei 37° C und die Kontrolle der Platten auf das Wachstum von Bakterien (Tag 3 und 6). Morphologisch verdächtige Bakterienkolonien werden durch den Katalase-Test überprüft. Katalase-negative Kolonien werden in Columbia-Blut-Schrägagar überimpft und 2-

4 Tage bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgt die lichtmikroskopische Untersuchung auf Sporen und Geißelzöpfe in der Flüssigkeitsphase. Die Untersuchung der gesammelten Gemülleproben der Jahre 2017 und 2018 wird im Laufe des Winters 2018/19 erfolgen.

### 1.5.3 FELDVERSUCHE

Die Auswahl der Bienenstände für die Feldversuche 2017 und 2018 erfolgte auf Basis der Untersuchungsergebnisse der Futterkranzproben und einer Völkerdurchsicht:

- 2017 schickten die ImkerInnen die Proben im Rahmen des generell empfohlenen AFB-Vorsorgeprogrammes an das AGES-Labor.
- 2018 wurden Proben von Bienenständen untersucht, die sich in einer AFB-Sperrzone befunden hatten, die im Herbst 2017 eingerichtet und Ende 2017 wieder aufgehoben wurde, nachdem alle Völker in den zwei klinisch befallenen Bienenständen abgetötet worden waren. Die Proben stammten jeweils aus Einzelvölkern, die bei der Inspektion durch einen amtlichen Bienensachverständigen keine klinischen Symptome gezeigt hatten.

Die ImkerInnen wurden gebeten, sich freiwillig an den AFB-Feldversuchen des BPRACTICES-Projekts zu beteiligen. Sie wurden über die erforderlichen Tätigkeiten im Zusammenhang mit ihrer Teilnahme informiert. Dazu zählten die Entnahme von Futterkranz- und Gemülleproben aus jedem Volk vor und ein bis zwei Monate nach der Durchführung der Kehrschwarmbehandlung. Im Gegenzug erhielten sie die Ergebnisse der Analysen, Informationen über AFB (z. B. Merkblätter) und konkrete weitere Ratschläge. Die Analysen der Futterkranzproben wurden im Labor der AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz mit der akkreditierten hauseigenen Kulturmethode durchgeführt. Die Gemülleproben werden nach Vorliegen der Ringversuchsergebnisse mit den am besten bewerteten PCR-Methoden analysiert.

## 1.6 AKTUELLER STAND BISHER ERFOLGTER PROBENAHMEN UND ERGEBNISSE

Insgesamt nahmen sieben ImkerInnen mit jeweils einem Stand am Feldversuch teil: 2017 wurden zwei Bienenstände im Zuge des Vorsorgeprogrammes aus den Bundesländern Tirol bzw. Niederösterreich rekrutiert; 2018 wurden Proben aus zehn Bienenständen, die sich in einem Sperrkreis in der Steiermark befanden, untersucht. Davon wurden fünf mit subklinischem Befall identifiziert. Bei fünf Bienenständen waren die Futterkranzproben negativ, daher lag kein subklinisches Stadium vor; diese Bienenstände wurden nicht in den eigentlichen Versuch einbezogen. Um die Ergebnisse der Untersuchungen von Futterkranz und Gemülle vergleichen zu können, werden auch die Gemülleproben der Stände mit negativem Futterkranzbefund zu einem späteren Zeitpunkt untersucht. Von den sieben subklinischen Bienenständen wurden im Rahmen des Feldversuchs 49 Futterkranzproben vor der Sanierung und 39 Proben nach der Sanierung eingeschickt und untersucht (Tabelle 14). Beim Bienenstand 1 wurden 2017 nach dem positiven Befund einer Futterkranzsammelprobe an zwei weiteren Zeitpunkten (im Frühling und im Sommer) vor der Sanierung Futterkranzproben der einzelnen Völker entnommen. Die erste Probenahme erbrachte Sporennachweise bei den Proben zweier Völker, die zweite Probenahme kurz vor der Sanierung erbrachte keine positiven Ergebnisse mehr. Dennoch wurde die Sanierung auf Wunsch der Imkerin nach Plan durchgeführt, um jegliches Risiko einer Erkrankung auszuschalten. Ähnlich war es bei Bienenstand 2: Hier war ebenfalls die Sammelprobe positiv, die später entnommenen Einzelvolkproben erbrachten jedoch negative Ergebnisse. Da in diesen beiden Fällen – zumindest in der Sammelprobe – der Erreger vor der Sanierung nachweisbar war, nach der Sanierung aber nicht mehr, ist die Sanierung als erfolgreich in Tabelle 14 eingetragen.

Wie in Tabelle 14 ersichtlich wurden 2017 die Empfehlungen zur Sanierung eingehalten. 2018 wichen die von den Imkern tatsächlich durchgeführten Sanierungsmaßnahmen maßgeblich von den Empfehlungen ab. Da die ImkerInnen die Arbeiten freiwillig und selbständig durchführten, spiegeln diese Vorgangsweisen die übliche ImkerInnenpraxis im Umgang mit einem positiven Erregernachweis wider. Dennoch konnten im Jahr 2018 drei der fünf teilnehmenden Imkereien die Erregerzahl unter die Nachweisgrenze der Futterkranzproben drücken.

TABELLE 14. ÜBERSICHT ÜBER DIE ERGEBNISSE DER FÜR DEN FELDVERSUCH AUSGEWÄHLTEN BIENENSTÄNDE MIT DEM ZIEL DER EVALUIERUNG DER KEHRSCHWARM-METHODE ZUR ELIMINIERUNG VON *P. LARVAE* IM SUBKLINISCHEN STADIUM

Jahr	Bienenstand	Grund der Teilnahme	Futterkranz-Einzelproben positiv		Sanierung mittels Kehrschwarm erfolgreich (= <i>P. larvae</i> nicht mehr nachweisbar)	Sanierung folgte den Empfehlungen	Abweichung von der Empfehlung zur Sanierung
			vor Sanierung	nach Sanierung			
2017	1	Futterkranz-sammelprobe positiv	2 von 10	0 von 10	ja	ja	-
2017	2	Futterkranz-sammelprobe positiv	0 von 5	0 von 5	ja	ja	-
2018	3	Bienenstand im AFB-Sperrkreis	1 von 5	0 von 5	ja	nein	nur das eine Volk mit positivem Sporennachweis (von insgesamt 5 Völkern am Stand) saniert
2018	4	Bienenstand im AFB-Sperrkreis	3 von 9	2 von 9	nein	nein	bei 3 Völkern (von 9 Völkern am Stand) nur Brutwaben entfernt und neue Rähmchen mit Mittelwänden eingehängt
2018	5	Bienenstand im AFB-Sperrkreis	5 von 5	1 von 5	nein	nein	sanierte Völker wurden mit 10 Mittelwänden und 10 Leerwaben ausgestattet
2018	6	Bienenstand im AFB-Sperrkreis	2 von 2	0 von 2	ja	nein	nur Brutwaben entfernt und neue Rähmchen mit Mittelwänden eingehängt
2018	7	Bienenstand im AFB-Sperrkreis	3 von 3	0 von 3	ja	nein	nur Brutwaben entfernt und neue Rähmchen mit Mittelwänden eingehängt

## 2 ARBEITSPAKET 1 (VARROA UND VARROOSE)

### 2.1 EINLEITUNG

Die Varroose, die durch die ektoparasitische Milbe *Varroa destructor* verursacht wird, ist eine der wichtigsten Bienenkrankheiten weltweit und kann vor allem in gemäßigten Klimazonen zu massiven Verlusten Honigbienenvölkern bei *Apis mellifera* führen. Um Verluste zu vermeiden, basieren die meisten Varroa-Kontrollstrategien auf dem Einsatz von Tierarzneimitteln auf Basis synthetischer Chemikalien.

Ziel des Arbeitspakets 1 ist es, die besten imkerlichen Maßnahmen (gute imkerliche Praxis, GBP) zur Überwachung des Befalls zu definieren und Methoden zur Bekämpfung der Varroamilbenpopulation ohne den Einsatz umweltfremder Chemikalien zu erarbeiten. Letzteres sollte durch die Kombination biotechnischer Bekämpfungsmethoden, die bereits in der Bienenzucht eingesetzt werden (z. B. Brutentnahme, befristetes Sperren der Königin), und der Anwendung von Wirkstoffen, die in Bienenprodukten natürlich vorkommen (z.B. Oxalsäure oder Ameisensäure), erreicht werden, um die Wirksamkeit zu erhöhen. Ein weiterer Vorteil einer effektiven Varroakontrolle ist die Prävention von Virusinfektionen, die durch eine Infektion mit der Varroamilbe ausgelöst oder übertragen werden.

### 2.2 MATERIAL UND METHODEN

#### 2.2.1 ANWERBUNG UND AUSWAHL DER TEILNEHMENDEN IMKEREIBETRIEBE

Die Beteiligung aktiver ImkerInnen ist für die Entwicklung und Etablierung guter imkerlicher Praxis unerlässlich. Deshalb wurden Imkereibetriebe angeworben, die sich bereit erklärten, die Effizienz der neuen Techniken in der Praxis zu testen. Wichtige Kriterien für die Auswahl dieser Imkereibetriebe waren langjährige Erfahrung in der Imkerei und praktische Erfahrungen in Feldstudien mit Honigbienenvölkern. Teilnehmer mit einer fundierten Ausbildung in der Imkerei (Imkermeister, Imkerfacharbeiter, etc.) wurden bevorzugt, dieses Kriterium war aber für die Teilnahme nicht verpflichtend. Um das Potenzial für die Verbreitung der Ergebnisse zu erhöhen, haben wir auch einige Imkerschulen und deren MitarbeiterInnen sowie (Wander)lehrerInnen in unsere Feldstudie einbezogen.

Potenzielle TeilnehmerInnen der Studie wurden über das Versuchsdesign und die zu bearbeitenden Aufgaben informiert. Schließlich verpflichteten sich 16 ImkerInnen, an dem Experiment teilzunehmen, die erforderlichen Arbeiten durchzuführen und die notwendigen Daten unentgeltlich zu übermitteln. Als Gegenleistung erhielten sie zeitnah die Ergebnisse zum Varroabefall der eingesendeten Bienenproben. Nach Abschluss des Projektes wird ihnen außerdem der Projektbericht zugeschickt werden.

#### 2.2.2 EXPERIMENTELLER AUFBAU

Die Experimente in Österreich verglichen die Wirksamkeit von drei verschiedenen Behandlungsprotokollen zur Varroakontrolle. Von diesen basieren zwei Protokolle auf dem befristeten Sperren der Königin plus der Anwendung von Oxalsäure und eines auf der zweifachen Anwendung von Ameisensäure ohne Sperren der Königin.

Kriterien für die Beurteilung des Erfolgs dieser Behandlungsprotokolle waren die erfolgreiche Überwinterung der Völker und die Entwicklung einer Bienenpopulation im Folgejahr, die ausreicht, um den Honig aus der Frühjahrstracht zu sammeln (d.h. Völker mit mindestens einem Honigraum in der Frühtracht).

Es wurden drei Versuchsgruppen definiert (Details siehe Tabelle 1):

- Gruppe A: 24 Tage Käfigen der Königin, gefolgt von einer Behandlung der brutlosen Völker mit Oxalsäure im Sommer;
- Gruppe B: 19 Tage Käfigen der Königin, gefolgt von einer Behandlung der Völker mit junger, unverdeckelter Brut (Eier, junge Larven) mit Oxalsäure im Sommer;
- Gruppe C: kein Käfigen der Königin, zwei Ameisensäurebehandlungen im Sommer in Völkern mit Brut

Darüber hinaus wurde eine Oxalsäurebehandlung in der Überwinterungszeit durchgeführt, in der die Völker in jeder Gruppe von Natur aus frei von Brut waren.

Alle TeilnehmerInnen mussten eine Gruppe A und eine Gruppe C (mit fünf Völkern in jeder Gruppe) auf ihren Bienenständen gemäß den Vorgaben des Versuchsprotokolls (Tabelle 15) einrichten. Die zusätzliche Einrichtung einer Gruppe B (fünf Völker) war freiwillig und wurde 2017/18 von acht ImkerInnen durchgeführt.

In den Jahren 2017/18 wurden 200 Völker in das Experiment einbezogen (Gruppe A: 80 Völker, Gruppe B: 40 Völker, Gruppe C: 80 Völker). Auf den jeweiligen Bienenständen wurden die Völker den Versuchsgruppen in wechselnder Reihenfolge zugeordnet: Gruppe A - (Gruppe B) - Gruppe C - Gruppe A - (Gruppe B) - Gruppe C -.....'.

Den ImkerInnen wurde empfohlen, ihre bisherige Art der Völkerbetreuung wenn möglich beizubehalten. Alle für die Probenahme und Durchführung des Experiments erforderlichen Zusatzausrüstungen und die erforderlichen zugelassenen Bekämpfungsmittel wurden von der AGES-Abteilung Bienkunde und Bienenschutz zur Verfügung gestellt und den ImkerInnen per Post zugestellt (Königinnensperrkäfige, Dosierspritze, Kunststoffbecher, Oxalsäurepräparat „API-Bioxal, 886 mg/g Pulver zur Anwendung im Bienenstock“, Ameisensäurepräparat „AMO Varroxal 85% Ameisensäure-Lösung zum Verdunsten im Bienenstock für Honigbienen“, Liebig-Dispenser zur Verdunstung der Ameisensäure inklusive Bedienungsanleitung).

Den ImkerInnen wurde von der AGES-Abteilung Bienkunde und Bienenschutz vorgeschlagen, das Experiment am 21.07.2017 zu beginnen (Tabelle 15). Jeder Imker und jede Imkerin konnte jedoch das Startdatum an die jeweiligen regionalen Betriebsbedingungen und an das erwartete Trachtende anpassen.

#### 2.2.2.1 ERLÄUTERUNGEN ZUM VERSUCHSPLAN

Eine Übersicht des Versuchsplans ist in Tabelle 15 dargestellt.

- Behandlungsgruppen A und C sind fixer Bestandteil des Versuches (5 Völker A, 5 Völker C); Behandlungsgruppe B optional 5 Völker in Fällen mit mindestens 15 Völkern am Stand.
- Die Einteilung der Völker zu den zwei oder drei Behandlungsgruppen soll zufällig erfolgen (z.B. fortlaufend: A, B, C, A, B, C ..).
- Der Starttermin des Versuches kann leicht variiert werden, die Sperrzeit der Gruppe A muss jedoch mindestens 24 Tage betragen.
- Bei 15 Völkern im Versuch: die Königinnen der Gruppe B müssen (bei gleichzeitigem Sperren mit Gruppe A) 6 Tage vor Behandlungsbeginn freigelassen werden.
- Der Sperrkäfig kann wahlweise mit einem Leerrähmchen ins Brutnest gehängt oder in eine Brutwabe eingeschnitten werden.



TABELLE 15. VERSUCHSPLAN FÜR DIE PERIODE SOMMER 2017 BIS FRÜHJAHR 2018

Bei allen Bienenvölkern (Gruppen A, B und C) wurde zur Bestimmung des Varroabefalls (%) die erste Probe am Tag des Sperrens der Königin entnommen, die zweite Probe mindestens drei Wochen nach dem Zeitpunkt der zweiten Ameisensäurebehandlung in Gruppe C. Beim Versuchsstart (Sommersonnenwende) und nach Versuchsende (Auswinterung) wurden belagerte Waben und Brutwaben erhoben. Am Ende des Versuchs wurde zusätzlich der Zustand der Völker dokumentiert.

Gruppen	Behandlungsvarianten	Königin	Völkerzahl	Start: 21.06. (Sommersonnenwende)				Daten zum Versuchsablauf						Auswinterung (nach der Weidenblüte)		
				Erhebungen		1. Probenahme „vor Behandlung“	Königin sperren	10.07.	15.07.	16.07. Behandlungen	Ende August - Anfang September Behandlungen	21.09. 2. Probenahme „nach Behandlung“	November - Dezember Behandlungen zur Restentmilbung brutfreier Völker	Erhebungen		
				belagerte Waben	Brutwaben			Tage nach dem Sperren der Königin						belagerte Waben	Brutwaben	Völkerzustand (lebendig, tot, weisellos, drohnenbrütig)
A	Königin sperren + Oxalsäure träufeln <b>brutfrei</b>	sperren für 24 Tage	5	ja	ja	ja	ja	---	- Honigernte Königin freilassen	1 x Oxalsäure	---	ja	1 x Oxalsäure <b>brutfrei</b>	ja	ja	ja
B	Königin sperren + Oxalsäure träufeln <b>offene Brut</b>	sperren für 19 Tage	5	ja	ja	ja	ja	Königin freilassen	Honigernte	1 x Oxalsäure	---	ja	1 x Oxalsäure <b>brutfrei</b>	ja	ja	ja
C	<b>Kontrolle:</b> 2x Ameisensäurebehandlung Liebig-Dispenser	frei	5	ja	ja	ja	nein	---	Honigernte	Erste Ameisensäure	Zweite Ameisensäure	ja	1 x Oxalsäure <b>brutfrei</b>	ja	ja	ja

### 2.2.1 SCHÄTZUNG DER VOLKSTÄRKE

Da die Anzahl der besetzten Waben mit der Größe der Bienenpopulation korreliert, wurde die Volksstärke zu Beginn des Experiments und nach der Auswinterung durch Zählen der Anzahl der besetzten Waben geschätzt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Völker jedes Bienenstandes nach der Anzahl der besetzten Waben gereiht und jeweils Völker gleicher Volksstärke auf die zwei bzw. drei Versuchsgruppen aufgeteilt.

### 2.2.2 SPERREN UND FREILASSEN DER KÖNIGINNEN

Königinnen der Gruppen A und B wurden am selben Tag (Start des Versuchs) mit Hilfe handelsüblicher Kunststoffkäfige (Var-Control, API-MO.BRU; di Mozato Bruno, pimobru via Palazzon, 48, 35010 Campodoro, Padua, Italien) gesperrt. In diesen Käfigen sind keine Eiablage und keine Aufzucht von Bienenbrut möglich. Die Käfige mit den Königinnen wurden in Waben eingesetzt oder in leeren Rahmen befestigt und zentral im Brutnest platziert. Die Königinnen der Gruppe A und Gruppe B wurden nach 24 bzw. 19 Tagen aus den Käfigen entlassen.

Aus Vorversuchen (Josef Mayr, AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz) war bekannt, dass es nach dem Freilassen aus dem Käfig zu Verlusten bei den Königinnen kommen kann. Daher wurde den ImkerInnen geraten, vor der Freilassung der gesperrten Königin das Volk auf Weiselzellen, frisch geschlüpfte oder legende junge Königinnen zu kontrollieren und gegebenenfalls entsprechend auf solche Ereignisse zu reagieren (z. B. Ausbrechen der Weiselzellen, Entnahme der Jungkönigin vor dem Freilassen der alten, gekäfigten Königin).

### 2.2.3 VARROABEKÄMPFUNG

Ziel des Experiments war die Evaluierung, ob ein Behandlungskonzept aus Sperren der Königin plus Oxalsäurebehandlung im brutfreien Volk im Sommer – in Kombination mit der Standard-Restentmilbung im brutlosen Wintervolk – für eine erfolgreiche Überwinterung ausreicht und in der nächsten Saison starke, trachtreife Völker für die Frühtracht bereitstehen.

Die Sommerbehandlung mit dem registrierten Oxalsäurepräparat „API-Bioxal, 886 mg/g Pulver zur Anwendung im Bienenstock“ (Registrierungsnummer: 836485; Chemikalien Laif SpA, Viale Dell'Artigianato 13, 35010 Vigonza (PD), Italien) wurde 24 Tage nach dem Käfigen der Königinnen sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Behandlung gab es in Völkern der Gruppe A (24 Tage gekäfigte Königinnen) keine Brut, in jenen der Gruppe B (19 Tage gekäfigte Königinnen) nur unverdeckelte Brut (Eier oder junge Larven mit einem Alter von maximal drei Tagen).

Die Ameisensäure-Sommerbehandlung von Völkern in Gruppe C wurde mit dem registrierten Ameisensäurepräparat „AMO-Varroxal, 85 % Ameisensäure-Lösung zum Verdunsten im Bienenstock für Honigbienen“ (Registernummer: 835658; Drogerie Resch GesmbH, Badstraße 10, 4701 Bad Schallerbach, Österreich) nach Beendigung der Honigernte durchgeführt. In dieser Gruppe war die Königin nicht gesperrt und daher enthielten diese Völker zum Zeitpunkt der Anwendung Brut in allen Entwicklungsstadien. Diese Völker wurden zweimal mit dem Liebig-Dispenser gemäß Gebrauchsanweisung behandelt. Die erste Behandlung mit Ameisensäure erfolgte am selben Tag wie die Oxalsäurebehandlung der Gruppen A und B. Die zweite Behandlung mit dem Ameisensäurepräparat erfolgte zwischen Mitte August und Mitte September. Die Aufwandmengen konnten entsprechend der Stärke der Völker gemäß der Gebrauchsanweisung angepasst werden.

Um ihnen die Handhabung und Zubereitung der Behandlungslösung gemäß der Gebrauchsanweisung (35g API-Bioxal-Pulver in 500 ml Zuckerlösung 1:1) zu erleichtern, stellte das AGES-Team den ImkerInnen Kunststoffflaschen zur Verfügung, die das API-Bioxal-Pulver (17,5 g oder 35,0 g) bereits enthielten. Die Menge an bereitgestelltem API-Bioxal-Pulver war abhängig von der Anzahl der Versuchsvölker am Bienenstand. Kurz vor der Behandlung fügten die ImkerInnen der Flasche mit dem API-Bioxal-Pulver Zuckerlösung (Zucker:Wasser = 1:1) hinzu, indem sie die Flasche bis zu einer Eichmarke füllten und das

Pulver durch Schütteln der Flasche auflösen. Anschließend wurde die Oxalsäurelösung mit der Dosierspritze (maximal 50 ml pro Volk) unter Beachtung der Gebrauchsanweisung auf die Bienen in den Bienenstöcken geträufelt und die Dosis an die Volksstärke angepasst.

Brutlose Wintervölker aller Versuchsgruppen wurden im November oder Dezember einmalig mit API-Bioxal-Lösung gemäß der Gebrauchsanweisung behandelt. Das Datum der Behandlung hing vom Erreichen der Brutfreiheit ab. Diese steht im Zusammenhang mit der geographischen und Höhenlage des Bienenstandes und hängt von der Außentemperatur ab (Frost als Auslöser eines Brutstopps). Die Oxalsäurelösung wurde mit der Dosierspritze (maximal 50 ml pro Volk) gemäß der Gebrauchsanweisung auf die Bienen in den Bienenstöcken geträufelt. Dabei wurde die verabreichte Dosis an die Volksstärke angepasst.

#### 2.2.4 PROBENAHME

Um den Grad des Varroabefalls bei erwachsenen Bienen vor und nach der Sommerbehandlung zu bewerten, wurden Bienenproben entnommen. Die teilnehmenden ImkerInnen entnahmen die Proben entweder von einer Wabe des Honigraums direkt über dem Brutnest oder von einer Wabe am Rand des Brutnests. Dazu füllten sie einen Kunststoffbecher von 125 ml bis 1 cm unter den oberen Rand, was etwa 300 Bienen entspricht. Die Proben wurden unmittelbar nach den Probenahmen eingefroren und zur Analyse an die AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz geschickt.

Bei allen Bienenvölkern (Gruppen A, B und C) wurde die erste Probe am Tag des Sperrens der Königin entnommen. Die zweite Probenahme erfolgte, ebenfalls bei allen Bienenvölkern, mindestens drei Wochen nach der zweiten Ameisensäurebehandlung der Behandlungsgruppe C. Zu diesem Zeitpunkt waren alle während der Ameisensäurebehandlung vorhandenen Brutzellen bereits geschlüpft und überlebende Milben hatten Zeit, sich an Bienen festzusetzen.

#### 2.2.5 ERMITTLUNG DER VARROABEFALLSRATE (%) BEI ERWACHSENEN BIENEN

Die Bienenproben wurden unmittelbar nach dem Eintreffen in der AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz auf den Varroabefall untersucht. Jede Probe wurde gewogen, um die Anzahl der Bienen pro Probe zu berechnen. Die Berechnung basierte auf dem mittleren Gewicht pro Biene aus einer Teilprobe von genau 20 abgezählten Bienen jeder einzelnen Probe (Anzahl der Bienen pro Probe = Gewicht der gesamten Bienenprobe/mittleres Gewicht einer Biene aus der Teilprobe). Dieses Verfahren ermöglichte es, Unterschiede im Bienengewicht zwischen den jeweiligen Proben zu berücksichtigen. Jede Probe wurde 15 Minuten in Seifenlauge (0,1 %) geschüttelt, in einem Honig-Doppelsieb ausgewaschen, und anschließend die Anzahl der Varroamilben pro Probe bestimmt (Büchler et al., 2006; Dietemann et al., 2013). Die Varroabefallsrate wurde als Anteil der Varroamilben pro Biene für jede Probe berechnet (Anzahl der Varroamilben/Anzahl der Bienen).

Für die Interpretation der Varroabefallsrate ist es notwendig, die kritische Überlebenschwelle zu kennen, oberhalb derer das Überleben des Volkes gefährdet ist. Die Behandlungsschwelle, ab der eine Varroabekämpfung empfohlen wird, ist niedriger als die Überlebenschwelle. Dies gewährleistet die Entwicklung gesunder, langlebiger Winterbienen, indem die Schäden durch einen hohen Anteil an Varroamilben – und mit diesen assoziierten Viren – gering gehalten werden. Die jeweils anzuwendende Behandlungsschwelle ändert sich im Laufe der Saison aufgrund der Populationsdynamik von Honigbienen und Varroamilben, da die Zahl der Bienen im Volk abnimmt, die Zahl der Varroamilben aber zunimmt. Wir haben den Schwellenwert auf 1 % im Juli und 3 % im September festgelegt, bezogen auf die Befallsrate bei erwachsenen Bienen (Büchler et al., 2006; Büchler, 2008; Genersch et al., 2010; Lodesani et al., 2014).

## 2.3 AKTUELLER STAND DER ERGEBNISSE

### 2.3.1 AUSGEWÄHLTE IMKEREIEN UND BIENENSTÖCKE

16 ImkerInnen mit insgesamt 16 Bienenständen nahmen an der Feldstudie teil. Diese befanden sich in den Bundesländern Steiermark (7), Kärnten und Niederösterreich (je 2), Oberösterreich, Salzburg, Tirol, Vorarlberg und Wien (je 1) in Höhen von 160 m bis 1500 m über dem Meeresspiegel (Tabelle 16). 50 % der Bienenstände befanden sich auf einer Höhe zwischen 400 m und 700 m. Der auf 1500 m gelegene Bienenstand war ein Wanderbienenstand, d. h. die Bienen wurden Anfang August dorthin gebracht und kehrten Anfang November auf den Überwinterungsstand auf 600 m Seehöhe zurück. Zwei weitere Bienenstände befanden sich ebenfalls auf über 1000 Meter Seehöhe. Für diese kann die sehr kurze Vegetationszeit einen Einfluss auf die Volksentwicklung nach dem Sperren und Freilassen der Königin haben.

TABELLE 16. HÖHENLAGEN DER 16 TEILNEHMENDEN BIENENSTÄNDE MIT 200 BIENENVÖLKERN

Seehöhe	Anzahl Bienenstände	Anzahl Bienenvölker
100 - 400 m	3	45
400 - 700 m	8	85
700 - 1000 m	2	30
>1000 m	3	40
<b>Total</b>	16	200

Vor Beginn des Experiments gab es keine signifikanten Unterschiede in der Volksstärke zwischen den drei Versuchsgruppen (Tabelle 17; Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 4,051, df = 2, P = 0,399).

TABELLE 17. ANTEILE DER VÖLKER GEMÄSS IHRER VOLKSSTÄRKE IN DEN DREI VERSUCHSGRUPPEN A, B UND C; IN KLAMMERN DIE JEWEILIGE ANZAHL AN VÖLKERN IN JEDER KATEGORIE

Gruppe	Verteilung der Völker nach ihrer Volksstärke		
	stark	mittel	schwach
A	67,5% (54)	30,0% (24)	2,5% (2)
B	62,5% (25)	30,0% (12)	7,5% (3)
C	58,8% (47)	31,3% (25)	10,0% (8)

### 2.3.2 VARROABEFALLSRATE DER BIENEN VOR VERSUCHSBEGINN

Bei 75,5 % der 200 Völker lag zu Versuchsbeginn die Varroabefallsrate der Bienen unter der im Juli anzusetzenden Behandlungsschwelle von 1%; 24,5% der Versuchsvölker hatten eine Varroabefallsrate über der Behandlungsschwelle. Der Anteil der Völker, die diesen Schwellenwert überschritten, unterschied sich zwischen den drei Versuchsgruppen nicht signifikant (Tabelle 18, Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 0,108, df = 2, P = 0,947). Bei Völkern, die diesen Schwellenwert vor Versuchsbeginn überschritten, war keine zusätzliche Varroabehandlung nötig, da unmittelbar nach Entnahme der Bienenprobe die befallsreduzierenden Maßnahmen gemäß Versuchsplan gesetzt wurden (d. h. Sperren der Königin in Gruppen A und B mit anschließender Oxalsäurebehandlung bei Brutfreiheit; Anwendung der Ameisensäure in Gruppe C).

Der Varroabefall wurde im Juli 2017 vor der Varroabehandlung und im September 2017 nach der Varroabehandlung ermittelt. Zehn Völker fielen zwischen erster und zweiter Probenahme aus (Tabelle 18).

**TABELLE 18. ANZAHL (ANTEIL) VON VÖLKERN MIT VARROABEFALLSRATEN ÜBER DER BEHANDLUNGSSCHWELLE VOR VERSUCHSBEGINN UND NACH DER VARROABEHANDLUNG**

Gruppe	Anzahl an Völkern	Vor der Varroabehandlung (N=200)			Nach der Varroabehandlung (N= 190)		
		Behandlungsschwelle			Behandlungsschwelle		
		unterschritten	überschritten		unterschritten	überschritten	
		Anzahl	Anzahl	Anteil (%)	Anzahl	Anzahl	Anteil (%)
<b>A</b>	80	60	20	25,0	53	18	25,4
<b>B</b>	40	31	9	22,5	27	12	30,8
<b>C</b>	80	60	20	25,0	59	21	26,3
<b>Gesamt</b>	200	151	49	24,5	139	51	26,8

### 2.3.3 VARROABEFALLSRATE DER BIENEN NACH DER VARROABEHANDLUNG

Von den ursprünglich 200 Völkern fielen zehn Völker durch den Ausfall der Königinnen während des Sperrens oder nach ihrer Freilassung aus (neun Völker aus Gruppe A und ein Volk aus Gruppe B). Von den verbleibenden 190 Versuchsvölkern hatten nach der Varroabehandlung 68 % eine Varroabefallsrate unter der anzusetzenden Behandlungsschwelle von 3% für September; bei 32 % lag die Befallsrate darüber. Der Anteil der Völker, die den Behandlungsschwellenwert überschritten, unterschied sich zwischen den drei Versuchsgruppen nicht signifikant (Tabelle 18, Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 0,401, df = 2, P = 0,818).

Die ImkerInnen wurden zeitnah über das Ergebnis der Varroa-Befallsermittlung informiert. So hatten sie die Möglichkeit, mit zusätzlichen Behandlungen zu reagieren, wenn die Behandlungsschwelle in den Völkern im September überschritten wurde. Zu Zeitpunkt und Art derartiger Zusatzbehandlungen liegen keine Informationen vor.

Von den 61 Völkern, deren Varroabefallsrate den Schwellenwert überschritten hatte, wurden drei aufgrund von Eigenentscheidungen der Imker nicht zusätzlich behandelt (ein Volk aus Gruppe A, zwei Völker aus Gruppe B). Von diesen erreichte ein Volk aus Gruppe B die erforderliche Volksstärke (Trachtreife) zum Sammeln der Frühjahrstracht nicht.

### 2.3.4 VÖLKERVERLUSTE VON VERSUCHSBEGINN IM SOMMER 2017 BIS ZUR AUSWINTERUNG 2018

Von den insgesamt 200 Bienenvölkern zu Beginn der Experimente fielen zehn Völker aus Gruppe A, ein Volk aus Gruppe B und ein Volk aus Gruppe C (insgesamt 12 Völker; 6,0 %) bis zum Herbst 2017 aus. Neun dieser Ausfälle waren Königinnenverlusten zuzuschreiben. Von den eingewinterten 188 Bienenvölkern fielen weitere 18 Völker (9,6 %) während der Überwinterung 2017/18 aus (sieben Völker aus Gruppe A, vier aus Gruppe B und sieben aus Gruppe C). Dieser Wert liegt unter der Schwankungsbreite der Winterverlustdaten 2018 für Österreich ([www.bienenstand.at](http://www.bienenstand.at)). Von den 18 ausgefallenen Völkern waren vier Völker im Sommer/Herbst 2017 nach dem Ausfall der Königin wieder beweiselt worden. Somit betrug der Gesamtausfall über alle Gruppen in diesem Zeitraum 30 Völker (15 % der ursprünglichen Völkerzahl bei Versuchsbeginn).

TABELLE 19. VÖLKERVERLUSTE WÄHREND DES VERSUCHS 2017/2018

Gruppe	Ausfälle bis zur Einwinterung			Ausfälle nach der Auswinterung		
	Völker	Völkerverluste		Völker	Völkerverluste	
		Anzahl Völker	%		Anzahl Völker	%
A	80	10	12,5	70	7	10
B	40	1	2,56	39	4	10,25
C	80	1	1,27	79	7	8,86
gesamt	200	12	6,00	188	18	9,57

### 2.3.5 TRACHTREIFE VÖLKER IM FRÜHJAHR

Wir definierten ein Volk als trachtreif, wenn zu Beginn der Frühjahrstracht (Blüte der Vogelkirsche) mindestens ein Honigraum aufgesetzt worden war, um das Beutenvolumen an die wachsende Bienenpopulation und den eingetragenen Nektar und Pollen anzupassen.

In Gruppe A erreichten 75 % (= 50 von 80 Völkern), in Gruppe B 72 % (= 29 von 40 Völkern) und in Gruppe C 85 % (= 68 von 80 Völkern) die erforderliche Stärke (Abbildung 1). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen im Anteil trachtreifer Völker (Abbildung 1; Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 3,437, df = 2, P = 0,179).

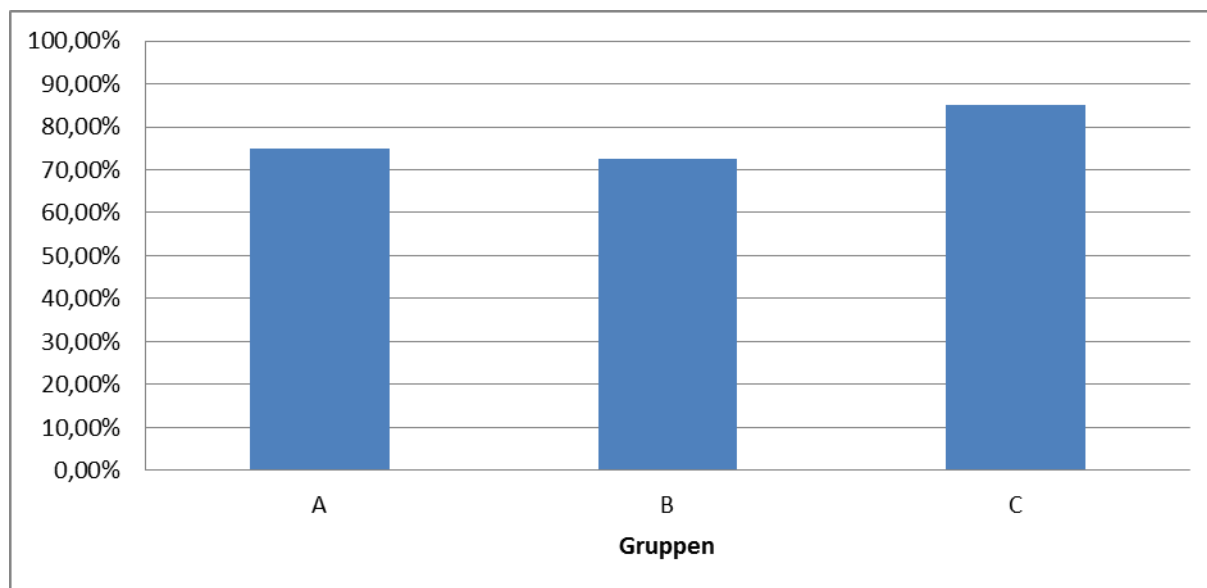


Abbildung 1. Anteil der Bienenvölker mit Trachtreife zum Zeitpunkt der Frühjahrstracht nach Gruppen. Gruppe A (50 von 80 Völkern, 75 %), Gruppe B (29 von 40 Völkern, 72 %), Gruppe C (68 von 80 Völkern, 85 %)

## 2.3.6 AUSFALL VON KÖNIGINNEN

Während der Versuche im Sommer 2017 wurde ein Ausfall von Königinnen in allen Versuchsgruppen beobachtet. Allerdings unterschied sich die Frequenz zwischen den drei Gruppen signifikant (Abbildung 2, Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 29,929, df = 2, P < 0,001). In Gruppe A verlor ein Drittel der Völker die Königin (= 26 von 80 Völkern), während in den anderen beiden Gruppen die Häufigkeit des Verlusts der Königin unter 10 % lag (3 Völker von 40 in Gruppe B, 2 von 80 in Gruppe C; Abbildung 2). Die teilnehmenden ImkerInnen führten die Königinnenausfälle in den Gruppen A und B auf die im Versuch angewendete Methode des Königinnensperrens zurück. Ein Imker vermutete die Ameisensäurebehandlung als Grund für den Königinnenausfall; ein weiterer machte dazu keine Angaben (beide aus Gruppe C).

Völker mit Königinverlust wurden von den ImkerInnen mit Reserveköniginnen wieder beweiselt. Dadurch war es möglich, dass von den insgesamt 31 Völkern mit Königinnenausfällen 17 Völker im Folgejahr die Trachtreife erreichten. Aus Gruppe A mit insgesamt 80 Völkern erreichten 14 Völker die Trachtreife zum Zeitpunkt der Frühjahrstracht nicht.

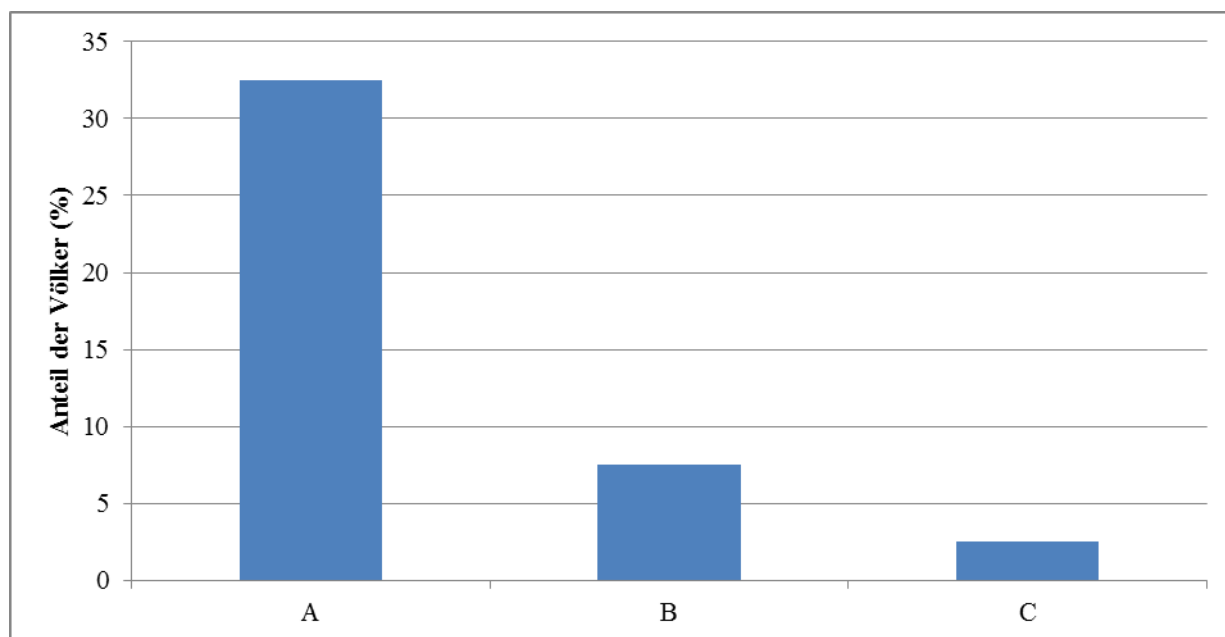


Abbildung 2. Anteil der Bienenvölker mit Königinnenausfällen im Sommer 2017 nach Gruppen. Gruppe A: 26 von 80 Völkern (n=80), Gruppe B: 3 (n=40), 2 (n= 80).

Das Alter der Königinnen unterschied sich zwischen den drei Versuchsgruppen signifikant (Tabelle 21, Chi<sup>2</sup>-Test: Chi<sup>2</sup> = 17,918, df = 6, P = 0,006). Königinnen im Alter von drei Jahren waren nur in Gruppe A anwesend, und in all diesen Völkern wurde der Verlust der Königin beobachtet. Dies macht es unmöglich zu entscheiden, ob die Verluste aufgrund der Behandlung oder des hohen Alters der Königin eingetreten sind. Als Reaktion darauf wurde mit den teilnehmenden ImkerInnen vereinbart, dass in der Versuchssaison 2018/19 keine Königinnen im Alter von drei Jahren verwendet werden.

TABELLE 20. ALTERSVERTEILUNG DER KÖNIGINNEN IN DEN DREI GRUPPEN A, B UND C

Alter der Königin	Gruppen		
	A	B	C
3 Jahre	8	0	0
2 Jahre	11	6	14
1 Jahr	56	27	53
0 Jahre	3	7	8
unbekannt	2	0	5
gesamt	80	40	80



### 2.3.7 DAUER DES KÖNIGINNENSPPERRENS

Gemäß dem Protokoll, das den ImkerInnen zur Verfügung gestellt wurde, sollten die Königinnen für 24 Tage in Gruppe A und für 19 Tage in Gruppe B gesperrt werden. Diese Vorgabe wurde bei 52 Völkern nicht eingehalten (Abbildung 3). In Gruppe A wurden die Königinnen von 75 Völkern für eine Dauer zwischen 23 und 27 Tagen bzw. von fünf Völkern eines Standes für 21 Tage gesperrt. Es ist daher möglich, dass in den Waben der genannten fünf Völker zum Zeitpunkt der Oxalsäurebehandlung noch einige wenige verdeckelte Brutzellen vorhanden waren. Eine Überprüfung der Wirksamkeit der Behandlung in diesen Völkern war nicht möglich, da alle fünf Völker vor der September-Stichprobe gestorben waren. In Gruppe B hielten sich die Imker bei 29 Völkern an das Protokoll. Die vorgegebene Sperrdauer von 19 Tagen wurde für ein Volk um einen Tag über- und für zehn Völker um einen Tag unterschritten (Abbildung 3).

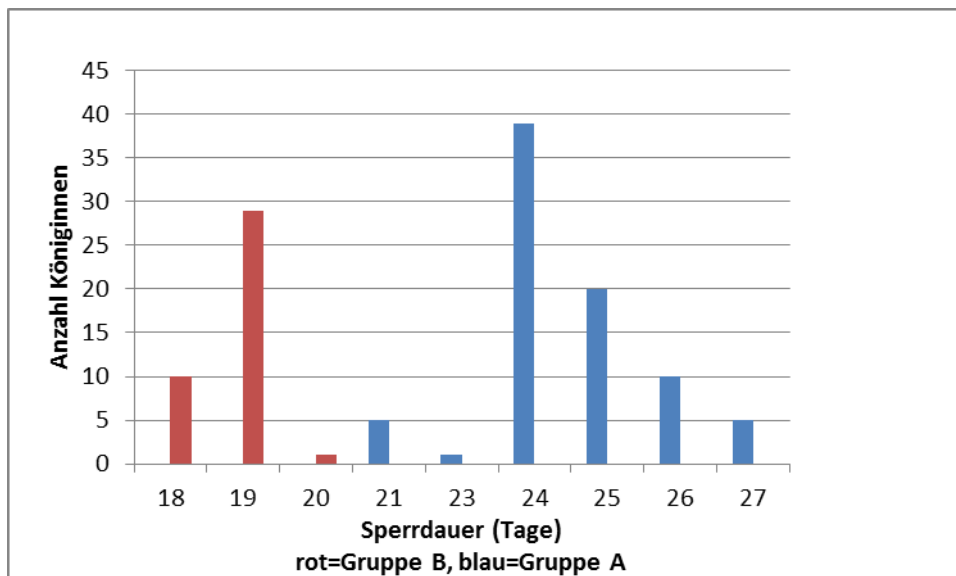


Abbildung 3. Die tatsächliche Sperrdauer der Königinnen in den Gruppen A (blau) und B (rot) zeigt das Ausmaß der Abweichungen vom Protokoll, das 24 Tage für Gruppe A und 19 Tage für Gruppe B vorgab.

## 2.4 ÄNDERUNGEN DES VERSUCHSPLANS 2018/19

Für die Versuchsperiode 2018/19 sind aufgrund der Ergebnisse der Vorperiode Änderungen im Versuchsaufbau geplant. Diese wurden in der Projektbesprechung mit den beteiligten Imkern am 24.02.2018 für die Experimente in der Saison 2018/19 vereinbart.

- Die Protokolle für die Sperrdauer der Königinnen müssen genau eingehalten werden (Gruppe A: 24 Tage, Gruppe B: 19 Tage).
- Königinnenalter: Verwendung von 1 und 2 jährigen Königinnen (keine 0, 3 jährigen oder älteren Königinnen)
- Ein zusätzliches Stichprobendatum zur Schätzung der Varroabefallsrate zum Zeitpunkt des Freilassens der Königin (vor der Varroabehandlung mit Oxalsäure bzw. vor der ersten Behandlung mit Ameisensäure) wird vorgesehen.
- Auf Wunsch mehrerer ImkerInnen wird zusätzlich die Erhebung des "natürlichen Milbenfalls" zur Bestimmung der Varroabefallsrate zu den gleichen drei Zeitpunkten wie bei der Auswaschmethode durchgeführt, d. h.
  - Windeleinlage 1 Woche vor dem Sperren der Königinnen
  - Windeleinlage 1 Woche vor dem Freilassen der Königinnen
  - Windeleinlage 4 Wochen nach Beginn der zweiten Ameisensäurebehandlung

Dazu wird eine Stockwindel für sieben Tage in das Bodenbrett des Volks eingelegt. Die abgefallenen Milben werden anschließend von den ImkerInnen gezählt.

- Zusätzliche Erhebung der Volksstärke fünf Wochen nach Beginn der zweiten Ameisensäurebehandlung
- Dokumentation des Honigertrages pro Volk (freiwillige Zusatzleistung)

# 3 ARBEITSPAKET 4: KLEINER BIENENSTOCKKÄFER

## 3.1 EINLEITUNG

Der Kleine Bienenstockkäfer (*Aethina tumida*; auch: Kleiner Beutenkäfer; engl. Small hive beetle, SHB) wurde im September 2014 in Kalabrien, Italien, nachgewiesen (Mutinelli et al. 2014, Palmeri et al. 2015). In Österreich wurde er bisher nicht entdeckt. Um eine mögliche Einschleppung frühzeitig zu erkennen, ist es ratsam, die Überwachung auf potenziell gefährdete Bienenstände zu konzentrieren (Chauzat et al. 2017).

Bientransporte bergen ein gewisses Risiko der Verbreitung von Schädlingen und Krankheitserregern. Aus diesem Grund müssen grenzüberschreitende Transporte von Honigbienenvölkern und Königinnen innerhalb der EU in TRACES (Trade Control and Expert System) registriert werden. Die Möglichkeit nicht registrierter grenzüberschreitender Transporte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies gilt insbesondere in Jahren mit hohen Winterverlusten, in denen diese häufig durch den Kauf von Bienenvölkern aus anderen Gebieten oder Ländern ausgeglichen werden.

In dieser Monitoring-Studie wurden daher zunächst gefährdete Bienenstände identifiziert und ausgewählt, um sie anschließend auf das Vorkommen von *A. tumida* zu untersuchen.

## 3.2 MATERIAL UND METHODEN

### 3.2.1 AUSWAHL DER ÜBERWACHUNGSGEBIETE UND BIENENSTÄNDE 2017 UND 2018

Für die Probensammlung 2017 folgte die Auswahl der österreichischen Bienenstände zwei unterschiedlichen Ansätzen. Zum einen wurden TRACES-Protokolle von ImkerInnen mit Transporten von Italien nach Österreich in den Jahren 2015, 2016 und 2017 verwendet, die vom österreichischen Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz (BMASGK) auf Anfrage für die Zwecke dieses Arbeitspakets zur Verfügung gestellt wurden. Zum anderen wurden regionale Risikogebiete definiert. Diese wurden im Jahr 2017 als die zehn österreichischen Bezirke mit den höchsten Winterverlusten 2016/2017 identifiziert, da hohe Verluste sehr oft durch den Kauf von Bienenvölkern aus anderen Gebieten, einschließlich Italien, ausgeglichen werden (Tabelle 22; Winterverluste von 37 % bis 60 %; COLOSS-Studie, persönliche Mitteilung R. Brodschneider 2017).

Für die Auswahl 2018 wurden drei Kriterien herangezogen. Einerseits wurden jene ImkerInnen um Teilnahme ersucht, die laut TRACES-Protokollen im Zeitraum August 2017 bis Juli 2018 Bienen aus Italien verbracht hatten. Die entsprechenden Daten wurden vom zuständigen Ministerium BMASGK bereitgestellt. Andererseits wurden jene Bezirke ausgewählt, in denen verstärkt „Bienenvermietung“ angeboten und beworben worden war, da der Transport und das Aufstellen von Bienenvölkern in größerer Zahl als monitoringwürdig erachtet wurden. Darüber hinaus wurden Bezirke entlang von wichtigen Nord-Süd Verbindungen in Tirol, Kärnten und Steiermark sowie bei Güterterminals der Bahn als Schwerpunktregionen ausgewählt. Die Winterverluste 2017/2018 waren österreichweit eher gering und überstiegen lediglich in vier Bezirken die 20 %-Marke (persönliche Mitteilung R. Brodschneider 2018). Da nicht anzunehmen war, dass in diese Bezirke vermehrt Völker aus Italien verbracht wurden, wurde das Kriterium der Winterverluste in diesem Jahr als nicht relevant für die Auswahl von Risikogebieten erachtet.

### 3.2.2 IDENTIFIZIERUNG DER TEILNEHMER AN DER MONITORINGSTUDIE

Im Jahr 2017 erklärten sich vier ImkerInnen, die in TRACES registrierte Sendungen erhalten hatten, bereit, auf freiwilliger Basis an der Monitoring-Studie teilzunehmen. Lokale Verbände des Österreichischen Imkerbundes und lokale Imkergruppen in den zehn Risikobereichen unterstützten die Anwerbung weiterer TeilnehmerInnen. So gab es insgesamt 67 Freiwillige, die bereit waren, Proben für die Feldstudie zu sammeln. Die Bienenstände aller TRACES-ImkerInnen wurden in die Überwachung einbezogen. Andere ImkerInnen wurden so ausgewählt, dass eine breite räumliche Verteilung der Bienenstände in den Risikogebieten erreicht wurde. 62 ImkerInnen stammten aus den definierten Risikogebieten, und ein Imker aus einem benachbarten Bezirk. Gemäß dem Überwachungsplan waren 60 Bienenstände vorgesehen, so dass aus dem Kreis der Freiwilligen 60 Personen für die Teilnahme ausgewählt wurden (Tabelle 22). Einer der TRACES-ImkerInnen nahm an der Studie mit zwei Bienenständen teil, daher umfasste das Monitoring 2017 61 Bienenstände.

Tabelle 22 zeigt das Ausmaß der Winterverluste 2016-2017, die die Grundlage für die Identifizierung von Risikogebieten waren, die Anzahl der ausgewählten Bienenstände pro Risikogebiet und die Anzahl der erhaltenen Sammelproben. Ein Bienenstand (Tirol/Innsbruck Land) stammte nicht aus einem der zehn Bezirke mit den höchsten Winterverlusten. Er wurde aufgrund der Nähe zu einem Bezirk mit hohen Winterverlusten (Tirol/Schwaz) ausgewählt. Insgesamt stellten die ImkerInnen Proben von 58 der 61 ausgewählten Bienenstände zur Verfügung. Drei ImkerInnen übermittelten keine Proben und schieden daher aus der Studie aus.

Die Auswahl der Risikogebiete erfolgte nach dem Ausmaß der registrierten Völkerverluste für den Winter 2016/2017 (R. Brodschneider 2017). TRACES-Imker wurden unabhängig vom Ausmaß der Winterverluste in ihrem Gebiet einbezogen. Die von den ImkerInnen übermittelten Gemülleproben bestanden jeweils aus ein bis fünf Einzelproben der verschiedenen Völker der Bienenstände (Tabelle 22). Die Einzelproben eines Standes wurden im AGES-Labor Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz zu jeweils einer Sammelprobe verinigt.

**TABELLE 21. AUSGEWÄHLTE BIENENSTÄNDE FÜR DIE SHB-MONITORING-STUDIE 2017 IN DEN ZEHN RISIKOGEBIETEN MIT DEN HÖCHSTEN GEMELDETEN WINTERVERLUSTEN UND ANZAHL DER EINGEREICHTEN PROBEN**

<b>Herkunft ([TRACES] Bundesland/Bezirk)</b>	<b>Winterverluste 2016/17 (%)</b>	<b>Anzahl ausgewählter Bienenstände</b>	<b>Anzahl Sammelproben</b>
<b>Vorarlberg / Dornbirn</b>	61,92	2	2
<b>Kärnten / Klagenfurt am Wörthersee</b>	52,43	6	6
<b>Vorarlberg / Feldkirch</b>	48,07	2	2
<b>Tirol / Schwaz</b>	46,85	9	7
<b>Niederösterreich / Scheibbs</b>	44,31	6	5
<b>Kärnten / Sankt Veit an der Glan</b>	41,05	8	8
<b>Tirol / Imst</b>	40,58	13	13
<b>Kärnten / Feldkirchen</b>	40,11	2	2
<b>Steiermark / Voitsberg</b>	38,97	6	6
<b>Niederösterreich / Amstetten</b>	37,09	1	1
<b>Tirol / Innsbruck Land</b>	17,85	1	1
<b>[TRACES] Kärnten / Sankt Veit an der Glan</b>	41,05	1	1
<b>[TRACES] Oberösterreich / Grieskirchen</b>	34,85	2	2
<b>[TRACES] Kärnten / Klagenfurt Land</b>	15,34	1	1
<b>[TRACES] Tirol / Lienz</b>	9,42	1	1
<b>Total</b>		<b>61</b>	<b>58</b>

Im Jahr 2018 wurden die TeilnehmerInnen aus der InteressentInnenliste für Projekte der AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz nach den unter 4.2.1. genannten Kriterien ausgewählt und um Bereitstellung

von Proben ersucht. In zwei für das Monitoring ausgewählten Bezirken konnten über diesen Weg keine Mitwirkenden eruiert werden. Daher wurden Imkervereine kontaktiert, um interessierte ImkerInnen zu finden. Weitere zwei ImkerInnen hatten im Frühjahr 2018 jeweils eine größere Anzahl von Paketbienen aus Süditalien (Lecce, Region Apulien) nach Österreich verbracht und stimmten der freiwilligen Mitarbeit beim Projekt zu. Einer dieser Imker erklärte sich bereit, bei 8 seiner Stände, die in mehreren Bundesländern liegen, Proben zu nehmen. Insgesamt konnten für das Jahr 2018 52 ImkerInnen mit 61 Ständen für die Mitarbeit beim Projekt gewonnen werden.

**TABELLE 22. AUSWÄHLTE BIENENSTÄNDE FÜR DAS SHB-MONITORING 2018**

Die Bezirke wurden aufgrund der Kriterien Verkehrsrouten oder Eisenbahnterminals (V), Bezirke mit angebotener Bienenvermietung (B) oder TRACES-Transporte (T) ausgewählt.

<b>Herkunft (Bundesland / Bezirk)</b>	<b>Auswahlgrund</b>	<b>Anzahl ausgewählter Bienenstände</b>
Burgenland / Neusiedl am See	B	1
Kärnten / Hermagor	V	2
Kärnten / Klagenfurt Stadt	V	1
Kärnten / Sankt Veit an der Glan	V	2
Kärnten / Spittal an der Drau	V	2
Kärnten / Villach Land	V	3
Kärnten / Villach Stadt	V	1
Kärnten / Völkermarkt	V	2
Kärnten / Wolfsberg	V	1
Niederösterreich / Bruck an der Leitha	B	2
Niederösterreich / Gänsersdorf	B	1
Niederösterreich / Hollabrunn	B	1
Niederösterreich / Sankt Pölten (Land)	B	2
Niederösterreich / Tulln	B	2
Niederösterreich / Waidhofen an der Thaya	B	1
Oberösterreich / Wels-Land	V	3
Salzburg / Sankt Johann im Pongau	V	2
Steiermark / Bruck-Mürzzuschlag	V, T	4
Steiermark / Graz-Umgebung	V	1
Steiermark / Leibnitz	V	1
Tirol / Innsbruck-Land	V	5
Tirol / Kufstein	V	2
Tirol / Schwaz	V	2
Wien / Wien (Stadt)	B, V	9
Oberösterreich, Niederösterreich, Steiermark, Burgenland [TRACES]	T	8
<b>Gesamt</b>		<b>61</b>

### 3.3 PROBENAHE UND VERSAND

Die TeilnehmerInnen erhielten das Material zur Gemülesammlung jeweils im Oktober 2017 und 2018, einschließlich einer bebilderten Anleitung für das Probenahmeverfahren, fünf Papiereinlagen (210 mm x 297 mm, ISO A4), einen beschrifteten Plastikbeutel für den Rückversand und einen adressierten Rückumschlag. Es wurde ihnen empfohlen, die Blätter bei fünf Völkern in die Varroatassen, falls vorhanden, oder direkt in das Bodenbrett während eines Zeitraums von zwei Wochen einzulegen. Im Falle von fünf oder weniger als

fünf Völkern am Bienenstand mussten alle Völker beprobt werden. Bei mehr als fünf Völkern am Stand waren die fünf Probevölker gemäß der an die TeilnehmerInnen versendeten Anleitung. Die Probenahme sollte nicht während der Varroabehandlung durchgeführt werden, um eine hohe Anzahl von Varroamilben auf den Einlagen zu vermeiden.

Nach Ablauf der zweiwöchigen Einlagedauer wurden die Einlagen herausgenommen, gefaltet und standweise in den Plastikbeutel gelegt, der anschließend verschlossen wurde. Die Daten für das Einlegen und Entnehmen der Blätter wurden auf den Plastikbeuteln angegeben. Zusätzlich wurde angegeben, ob die Blätter in eine Varroatasse oder direkt in das Bodenbrett gelegt wurden. Nach der Entnahme haben die ImkerInnen die Proben entweder innerhalb eines Tages eingesandt oder bis zum Versand in einem Gefrierschrank gelagert. Unmittelbar nach Eingang in der AGES-Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz wurden die Proben in den ungeöffneten Plastikbeuteln bis zur weiteren Bearbeitung bei -18° C gelagert.

Im Versuchsjahr 2017 konnte der Zeitraum der Probenahme individuell von Mitte Oktober bis Mitte Dezember gewählt werden. Ein Imker hat die Probe allerdings erst im Jänner 2018 entnommen. Alle ImkerInnen mit Ausnahme von einem haben die Daten für das Einlegen und Entfernen der Einlagen bekannt gegeben. Die Einlageblätter blieben durchschnittlich 16 Tage in den Völkern (Standardabweichung: 3 Tage, Minimum: 11 Tage, Maximum: 29 Tage).

Im Versuchsjahr 2018 konnte der Zeitraum der Probenahme von 10. Oktober bis 10. Dezember 2018 gewählt werden. Daher können zum Zeitpunkt der Zwischenberichtserstellung noch keine exakten Angaben zur tatsächlichen Beteiligung und Probenzahl gemacht werden.

### **3.4 LAUFENDE UND ZUKÜNFTIGE ARBEITEN IN DEN JAHREN 2019 UND 2020**

#### **3.4.1 FORTSETZUNG DER ÜBERWACHUNG**

Die Überwachung der Risikogebiete in Österreich ist im Gange und wird auch im Jahr 2019 fortgesetzt. Gefährdete Bienenstände werden jedes Jahr neu definiert, basierend auf der jeweiligen Überwinterungssituation, den gemeldeten TRACES-Transporten aus Italien und anderen Risikoparametern (z. B. Transitrouten und Terminals für den multimodalen Verkehr). Gemäß dem Überwachungsplan werden pro Jahr 60 neue TeilnehmerInnen angeworben.

#### **3.4.1 METHODENETABLIERUNG ZUM SHB-NACHWEIS AUS GEMÜLLE**

Im Zuge der Methodenetablierung und Vorbereitungen für die Teilnahme an weiteren Ringtests (SHB, *Nosema*, *Kodamaea*) wurde eine Real-time-PCR-Methode für den Nachweis von SHB in der AGES-Abteilung Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten (MBDP) etabliert. Als positives Kontrollmaterial dienten Suspensionen von homogenisierten SHB-Larven und adulten Tieren, die vom EU-Referenzlabor für Bienenkrankheiten zur Verfügung gestellt worden waren. Aus diesen wurde DNA extrahiert und für die Nachweise eingesetzt. In diesen Proben konnte SHB erfolgreich nachgewiesen werden und somit die Eignung der Nachweismethode an der AGES bestätigt werden. Außerdem wurde – um verschiedene Extraktionsmethoden aus Gemülle vergleichen zu können – aus einem in Ethylalkohol eingelegten adulten Käfer Tarsen und Tibia eines mittleren Beines homogenisiert und ebenfalls DNA extrahiert. Auch aus dieser Probe konnte ein positiver Nachweis geführt werden. Die weitere Vorgangsweise ist, Gemülle mit „Beinen“ von *A. tumida* zu dotieren, um die Extraktionseffizienz verschiedener Methoden zu vergleichen. Aus diesem Vergleich wird die am besten geeignete Methode für den Nachweis von SHB aus Gemülle ausgewählt werden.

#### **3.4.2 BEARBEITUNG DER MONITORING-PROBEN UND ANALYSEN**

Das Gemülle wird von den eingesendeten Einlageblättern gewonnen und standweise als Sammelprobe untersucht. Diese Arbeiten erfolgen nach Abschluss des von Partner 1 (IZSLT, Italien) durchgeführten SHB-Ringtests sowie nach Vorliegen der Testergebnisse der Extraktionsmethoden.

## 4 TEILNAHME AN „RINGVERSUCHEN“ IM RAHMEN DER ARBEITSPAKETE

Das Labor der AGES-Abteilung Molekularbiologische Diagnose von Pflanzenkrankheiten (MBDP) nahm als Partner an verschiedenen molekularbiologischen „Ringtests“ zur Detektion von Bienenkrankheiten und Schädlingen teil. Organisiert wurden diese Tests von Partner 1, IZSLT (Italien). Ziel ist es, die verschiedenen Zielorganismen im präklinischen Stadium aus dem Gemülle von Bienenstöcken nachzuweisen. Für *Aethina tumida* (kleiner Beutenkäfer, SHB) wurde eine Real-time PCR Methode von 6 verschiedenen Projektpartnern getestet. Darüber hinaus wurde für *Kodamaea ohmeri* (eine mit dem SHB assoziierte Hefe) eine konventionelle PCR von 4 Partnern getestet. Außerdem nahm die AGES noch gemeinsam mit 3 weiteren Partnern an der Vergleichsuntersuchung für *Nosema ceranae* und *Nosema apis* (Microsporidien) teil. Hier wurde jeweils eine spezifische Real-time PCR für jeden Erreger getestet. Für diese „Ringtests“ wurde bereits extrahierte DNA als Blindproben an die Versuchspartner geschickt. Die Gesamtergebnisse dieser Untersuchungen werden von den Versuchsanstellern (IZSLT) mit Unterstützung der AGES-Abteilung Statistik und analytische Epidemiologie ausgewertet und sind noch ausständig.



# 5 ARBEITSPAKET 8: INFORMATIONENFLUSS UND - AUSTAUSCH

## 5.1 KOMMUNIKATION MIT DEN BETEILIGTEN ORGANISATIONEN

Der Projektpartner AGES (Alexandra Ribarits) nahm an zwei Projekttreffen am Institut der Projektleitung (L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana *M. Aleandri*) in Rom, Italien, teil. Das Kick-off Meeting fand im Feber 2017 statt. Dabei wurde das Arbeitsprogramm der AGES gemäß Projektplan vorgestellt. Ein Schwerpunkt war Arbeitspaket 2 (Amerikanische und Europäische Faulbrut), das von der AGES geleitet wird. Ein weiteres Treffen fand im März 2018 statt. In diesem Meeting wurden die identifizierten GBPs diskutiert und eine Publikation vorbereitet. Außerdem berichtete die AGES vom Arbeitsfortschritt in den einzelnen Arbeitspaketen. Zusätzlich zu den Projekttreffen wurden vom Projektleiter mehrere Webkonferenzen organisiert. Es erfolgt außerdem ein laufender Austausch zwischen den einzelnen Projektpartnern über Email.

## 5.2 VORTRÄGE

- 21.03.2017: „WP2: American Foulbrood and European Foulbrood. Lead: Partner 5“ BPRACTICES Kick-off Meeting; Italien, Rom, Alexandra Ribarits.
- 21.03.2017: Vorstellung P5 – Austrian Agency for Health and Food Safety“. BPRACTICES Kick-off Meeting; Italien, Rom, Alexandra Ribarits.
- 25.02.2017: „Neue Indikatoren und Betriebsweisen zur Verbesserung der Gesundheit von Honigbienen in Europa in der Ära von *Aethina tumida*“ (ERA-NET SusAn, „BPRACTICES“). Kurzdarstellung der Aktivitäten, Arbeitspakete und Einladung an die Imker zur Teilnahme; Jährliche Fachtagung des Österreichischen Erwerbsimkerbundes; Österreich, Unterpremstätten, Rudolf Moosbeckhofer.
- 25.03.2017 „Neue Indikatoren und Betriebsweisen zur Verbesserung der Gesundheit von Honigbienen in Europa in der Ära von *Aethina tumida*“ (ERA-NET SusAn, „BPRACTICES“); Einführung in das Projekt und Einladung an ImkerInnen für die Teilnahme; Jahreshauptversammlung des Niederösterreichischen Landesverbandes für Bienenzucht; Österreich, St. Pölten; Rudolf Moosbeckhofer.
- 28.04.2017 SusAn - Projekt "BRACTICES": Überblick zum neuen Projekt und Einladung an die ImkerInnen zur Teilnahme; Jahrestagung der Gesundheitsreferenten des Österreichischen Imkerbundes; Österreich, Wien; Rudolf Moosbeckhofer.
- 24.02.2018: Workshop "Königinnensperren". Arbeitspaket 1. Josef Mayr, Katharina Etter.
- 13.03.2018: „WP2 American Foulbrood & European Foulbrood. BPRACTICES Meeting“, Italien, Rom, Alexandra Ribarits.
- 13.03.2018: „Data collection, test plan & evaluation methods“. BPRACTICES Meeting, Italien, Rom, Alexandra Ribarits.
- 25.04.2018: " Projekt „BPRACTICES“ (ERA-Net SusAn) - Kurzvorstellung der Arbeitspakete mit AGES-Beteiligung: Gute imkerliche Praxis; Erregernachweis aus Gemülle (SHB, AFB, EFB, Nosema); AFB-Erreger-Elimination – Feldversuch mit Imkern bei subklinisch positivem Futterkranzbefund; SHB-Monitoring – Feldversuch mit Imkern.“ Jahrestagung der Gesundheitsreferenten des Österreichischen Imkerbundes; Österreich, Wien; Rudolf Moosbeckhofer.
- 25.04.2018: Varroabehandlung mit Oxalsäure im Sommer nach vorangegangenem Käfigen der Königin. Jahrestagung der Gesundheitsreferenten des Österreichischen Imkerbundes; Österreich, Wien; Josef Mayr.

### 5.3 PUBLIKATIONEN UND POSTER

Rivera-Gomis J., Bubnic J., Cersini A., Chabert M., Chauzat M.P., Eggenhoeffner R., Erat S., Gregorc A., Haefeker W., Higes M., Jannoni-Sebastianini R., Lietaer C., Lubroth J., McCabe P., Moosbeckhofer R., Muz D., Muz M.N., Ozdemir N., Pietropaoli M., Ribarits A., Riviere M.P., Smodis Skerl M.I., Tiozzo B., Formato G. (2018) BPRACTICES: first attempt of definition of Good Beekeeping Practices (GBPs). EURBEE, Ghent, Belgien.

Rivera-Gomis J., Cersini A., Chabert M., Chauzat MP, Eggenhoeffner R., Erat S., Gregorc A., Haefeker W., Higes M., Jannoni Sebastianini R., Lietaer C., McCabe P., Moosbeckhofer R., Muz D., Necati Muz M., Ozdemir N., Pietropaoli M., Ravarotto L., Ribarits A., Riviere MP, Smodis Skerl, M, Formato G. (2017) BPRACTICES (ERA-NET SusAn) PROJECT: towards a sustainable European beekeeping. Apimondia publication 2017.

Della Marta U., Leto A., Pietropaoli M., Belardo V., Rivera Gomis J., Cersini A., Chabert M., Chauzat M.P., Eggenhoeffner R., Erat S., Gregorc A., Higes M., Moosbeckhofer R., Muz D., Muz M.N., Ozdemir N., Ribarits A., Riviere M. P., Vejsnæs F., Kilpinen O., Bagni M., Ravarotto L., Tiozzo B., Ruzza M., Smodis Skerl M.I., Lietaer C., McCabe P., Jannoni Sebastianini R., Haefeker W., Crovato S., Mascarello G., Mantovani C., Formato G. (2018). Apicoltura sostenibile: la proposta del progetto europeo B-PRACTICES. Argomenti 2: 35-38.

Della Marta Ugo, Leto Andrea, Pietropaoli Marco, Belardo Viviana, Rivera-Gomis Jorge, Cersini Antonella, Chabert Magali, Chauzat Marie-Pierre, Eggenhoeffner Roberto, Erat Serkan, Gregorc Ales, Higes Mariano, Moosbeckhofer Rudolf, Muz Dilek, Necati Muz Mustafa, Ozdemir Nurullah, Ribarits Alexandra, Riviere Marie-Pierre, Vejsnæs Flemming, Kilpinen Ole, Bagni Marina, Ravarotto Licia, Tiozzo Barbara, Ruzza Mirko, Smodis Skerl Maya Ivana, Lietaer Charlotte, McCabe Philip, Jannoni-Sebastianini Riccardo, Haefeker Walter, Formato Giovanni. (2018). "Apiculture durable: proposition du projet européen (BPRACTICES) « Nouveaux indicateurs et pratiques apicoles en Europe pour améliorer la santé des abeilles mellifères dans le domaine de la recherche européenne à l'ère d'Aethina tumida". La Santé de l'Abeille (LSA) 285 (5-6): 223-228.

### 5.4 VORSTELLUNG DES PROJEKTS ÜBER DEN AGES-INTERNET-AUFTRITT

AGES-Webseite: Allgemeine Online-Informationen zum Projekt BPRACTICES mit Link zur offiziellen Projektseite: <http://www.izslt.it/bpractices/en/>

## 6 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1. Ausgewählte Methoden, Primer- und Sondensequenzen, Ergebnisse der in silico-Spezifitätsanalyse und Vorauswahl der geeigneten Protokolle aufgrund der in silico-Analyse.....	8
Tabelle 2. Ausgewählte Protokolle: Bewertung der Sensitivität und Reihung nach Effizienz.....	9
Tabelle 3. Aufstellung der für die Spezifitätstests verwendeten Proben österreichischer klinischer AFB-Fälle .....	10
Tabelle 4. Vergleichsprüfungen der Sensitivität unterschiedlicher PCR-Protokolle für die Detektion von <i>P. larvae</i> (AFB) unter Verwendung einer dezimalen Verdünnungsreihe.....	11
Tabelle 5. Vergleichsprüfungen der Sensitivität unterschiedlicher PCR-Protokolle für die Detektion von <i>M. plutonius</i> (EFB) unter Verwendung einer dezimalen Verdünnungsreihe.....	11
Tabelle 6. Vergleich von zwei Methoden zur Extraktion von DNA aus Gemülle klinisch an AFB erkrankter Völker unter Verwendung von Verdünnungsreihen.....	12
Tabelle 7. Vergleich von zwei Methoden zur Extraktion von DNA aus Gemülle klinisch an EFB erkrankter Völker unter Verwendung von Verdünnungsreihen.....	13
Tabelle 8. Matrix des TPS-("Ringtest"-) Designs .....	14
Tabelle 9. Standardreihe basierend auf der absoluten Quantifizierung der Kopienanzahl der beiden Erreger mittels dd-RT-PCR.....	15
Tabelle 10. Zusammensetzung der Proben für die TPS (Erreger und Konzentration) und Testergebnisse zur Bestimmung der Nachweisgrenze der ausgewählten Methoden .....	16
Tabelle 11. Schätzung der Sensitivität der ausgewählten Methoden .....	17
Tabelle 12. Schätzung der Spezifität der ausgewählten Methoden .....	17
Tabelle 13. Ergebnisse der TPS für die unterschiedlichen Probenarten aus allen an der TPS teilnehmenden Laboratorien .....	18
Tabelle 14. Übersicht über die Ergebnisse der für den Feldversuch ausgewählten Bienenstände mit dem Ziel der Evaluierung der Kehrschwarmmethode zur Eliminierung von <i>P. larvae</i> im subklinischen Stadium.....	21
Tabelle 15. Versuchsplan für die Periode Sommer 2017 bis Frühjahr 2018.....	24
Tabelle 16. Höhenlagen der 16 teilnehmenden Bienenstände mit 200 Bienenvölkern .....	27
Tabelle 17. Anteile der Völker gemäss ihrer Volksstärke in den drei Versuchsgruppen A, B und C; in Klammern die jeweilige Anzahl an Völkern in jeder Kategorie .....	27
Tabelle 18. Anzahl (Anteil) von Völkern mit Varroabefallsraten über der Behandlungsschwelle vor Versuchsbeginn und nach der Varroabehandlung .....	28
Tabelle 19. Völkerverluste während des Versuchs 2017/2018 .....	29
Tabelle 20. Altersverteilung der Königinnen in den drei Gruppen A, B und C .....	30
Tabelle 21. Ausgewählte Bienenstände für die SHB-Monitoring-Studie 2017 in den zehn Risikogebieten mit den höchsten gemeldeten Winterverlusten und Anzahl der eingereichten Proben.....	34
Tabelle 22. Auswählte Bienenstände für das SHB-Monitoring 2018 .....	35

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Anteil der Bienenvölker mit Trachtreife zum Zeitpunkt der Frühjahrstracht nach Gruppen. Gruppe A (50 von 80 Völkern, 75 %), Gruppe B (29 von 40 Völkern, 72 %), Gruppe C (68 von 80 Völkern, 85 %) .....	29
Abbildung 2. Anteil der Bienenvölker mit Königinnenausfällen im Sommer 2017 nach Gruppen. Gruppe A: 26 von 80 Völkern (n=80), Gruppe B: 3 (n=40), 2 (n= 80).....	30
Abbildung 3. Die tatsächliche Sperrdauer der Königinnen in den Gruppen A (blau) und B (rot) zeigt das Ausmaß der Abweichungen vom Protokoll, das 24 Tage für Gruppe A und 19 Tage für Gruppe B vorgab.....	31

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410

Anses (2013) Protocol instruction: Test for the presence of the  $\beta$ -actin gene on honeybee samples using PCR (in-house method). Work instruction ANA-I1.MOA.3000. Sophia Antipolis Laboratory (EU-RL for honey bee health)

Anses (2013) Protocol instruction: Identification of *Paenibacillus larvae*, agent of American foulbrood, using PCR (in-house method) Work instruction ANA-I1.MOA.1900. Sophia Antipolis Laboratory (EU-RL for honey bee health)

Anses (2013) Protocol instruction: Identification of *Melissococcus plutonius*, agent of European foulbrood, using PCR (in-house method). Work instruction ANA-I1.MOA.2100. Sophia Antipolis Laboratory (EU-RL for honey bee health)

Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., Nowotny N. (2003) Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. Appl. Environ. Microbiol., 69 (3), 1504–1510

Bassi St., Carra E., Carpana E., Paganelli G. L., Pongolini St. (2010) A scientific note on the detection of spores of *Paenibacillus larvae* in naturally and artificially contaminated honey: comparison of cultural and molecular methods. Apidologie 41, 425–427, DOI: 10.1051/apido/2009059

Bienenseuchengesetz (1988) Bundesgesetz vom 25. Mai 1988 über die Bekämpfung ansteckender Krankheiten der Bienen (Bienenseuchengesetz), StF: BGBl. Nr. 290/1988 idgF

Brodtschneider R. (2017) Personal communication

Brown L.D., Cai T., DasGupta A. (2001) Interval Estimation for a Binomial Proportion Statistical Science 16(2), 101–133

Büchler R. (2008) Varroabefall ermitteln und Schadschwellen beachten. Allgemeine Deutsche Imkerzeitschrift 7/2008, 10–11

Büchler R., Radtke J., Garrido C., Bienefeld K., Ehrhardt K. (2006) Varroabefall richtig einschätzen. Allgemeine Deutsche Imkerzeitschrift 7/2006: 10

Budge G.E., Barrett B., Jones B., Pietravalle S., Marris G., Chantawannakul P., Thwaites R., Hall J., Cuthbertson A.G.S., Brown M.A. (2010) The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. J. Invertebr. Pathol., 105, 164–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.004>

Bzdil J. (2007) Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. Acta Vet. Brno, 76, 643–648

Chauzat M.-P., Laurent M., Brown M., Kryger P., Mutinelli F., Roelandt S., Roels S., van der Stede Y, Schäfer M.O., Franco S., Duquesne V., Riviere M.-P., Ribière-Chabert M., Hendrikx P. (2017) 'The surveillance of small hive beetle (*Aethina tumida*) in Europe.' in Norman L. Carreck (ed.), The small hive beetle - a growing problem in the 21st century (International Bee Research Association / Northern Bee Books)

- Dainat B., Grossar D., Ecoffeya B., Haldemann Ch. (2018) Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *J. of Microbiological Methods* 146 (2018) 61–63
- De Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smert L., Dingman D. W., Evans J.D., Forster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013) Standard methods for American foulbrood research. In: V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *J. of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.11>
- Dietemann V., Nazzi F., Martin S.J., Anderson D.L., Locke B., Delaplane K.S., Wauquiez Q., Tannahill C., Frey E., Ziegelmann B., Rosenkranz P., Ellis J.D. (2013) Standard methods for varroa research. *J. of Apicultural Research* 52(1):1-54
- Djordjevic S.P., Noone K., Smith L. and Hornitzky M.A.Z. (1998) Development of a semi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J. of Apicultural Research*, 37, 165–174
- Dobbelare W., De Graaf D.C., Peeters J.E., Jacobs F.J. (2001) Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32, 363–370
- Dorai-Raj S. (2014) binom: Binomical confidence intervals for several parameterizations. R package version 1.1-1. [Hts://CRAN.R-project.org/package=binom](https://CRAN.R-project.org/package=binom)
- FAO-OIE (Food and Agriculture Organization of the United Nations – World Organization for Animal Health (OIE) (2009) *Guide to good farming practices for animal production food safety*. ISBN 978-92-5-006145-0.
- Forsgren E., Budge G.E., Charrière J-D., Hornitzky M.A.Z. (2013) Standard methods for European foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *J. of Apicultural Research* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.12>
- 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
- Govan V.A., Brozel V., Allsopp M.H., Davison S. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1983–1985
- Govan V.A., Allsopp M.H., Davidson S. (1999) A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 65, 2243–2245
- Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. (2008) "NCBI BLAST: a better web interface". *Nucleic Acids Res.* 36:W5-W9
- Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A., Genersch E. (2004) Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Veterinary Microbiology* 104 (2004) 31–42
- Lodesani M., Costa C., Besana A., Dall'Olio R., Franceschetti S., Tesoriero D., Vaccari G. (2014) Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J. of Apicultural Research* 53(1), 155–164

Martínez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P. (2010) A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Letters in Applied Microbiology* 50, 603–610

McKee B.A., Djordjevic S.P., Goodman R.D., Hornitzky M.A. (2003) The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, 34, 19–27

Mutinelli F., Montarsi F., Federico G., Granato A., Ponti A.M., Grandinetti G., Ferre N., Franco S., Duquesne V., Rivièrè M.-P., Thiéry R., Hendrikx P., Ribière-Chabert M., Chauzat M.-P. (2014) Detection of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae.) in Italy: Outbreaks and early reaction measures. *Journal of Apicultural Research*. 53. 569-575. 10.3896/IBRA.1.53.5.13.

Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E. (2004) Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* 150: 2381-2390, doi: 10.1099/mic.0.27125-0

OIE (2016) American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*), Kapitel 2.2.2. In: OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: World Organisation for Animal Health

OIE (2016) European foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Melissococcus plutonius*) Chapter 2.2.3. In: OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Paris: World Organisation for Animal Health

Palmeri V., Scirtò G., Malacrinò A., Laudani F., Campolo O. (2015) A scientific note on a new pest for European honeybees: first report of small hive beetle *Aethina tumida*, (Coleoptera: Nitidulidae) in Italy *Apidologie* (46): 527. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0343-9>

R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Roetschi A., Berthoud H., Kuhn R., Imdorf A. (2008) Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39, 362–371

Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40

Wögerbauer M., Zeinzinger J., Gottsberger R.A., Pascher K., Hufnagl P., Indra A., Fuchs R., Hofrichter J., Kopacka I., Korschineck I., Schleicher C., Schwarz M., Steinwider J., Springer B., Allerberger F., Nielsen K.M., Fuchs K. (2015) Antibiotic resistance marker genes as environmental pollutants in GMO-pristine agricultural soils in Austria. *Environmental Pollution* 206, 342-351

