Aus dem Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Unit für Infektiologie und Virologie

(Leiter: Univ. Prof. Dr. rer.nat Doris Wilflingseder)

Vergleich der Viruslast des Chronischen Bienenparalysevirus im Rahmen eines Sanierungsverfahrens in Völkern der Westlichen Honigbiene (*Apis mellifera L.*)

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Elisabeth Reiter

Wien, im Juni, 2025

Betreuer: Univ.Prof. Dr.med.vet. Till Rümenapf

Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Institut für Infektiologie und Virologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Interne Betreuerin: Dr.med.vet. Kerstin Seitz

Department für Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Institut für Infektiologie und Virologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Johannes Novak

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Ort, Datum Elisabeth Reiter

ZUSAMMENFASSUNG

Das Chronische Bienenparalysevirus (CBPV) ist eine weltweit bekannte virale Erkrankung der adulten Honigbiene (*Apis mellifera*). Erkrankte Bienen präsentieren sich meist als zitternde, ataktische, flugunfähige Bienen vor dem Bienenstock. Man erkennt außerdem ein haarloses, schwarzes, von Dysenterie aufgeblähtes Abdomen bei den erkrankten Individuen. Durch seine Pathogenität führt das Virus besonders in den Sommermonaten zu großen Verlusten im Bienenvolk, wenn die Größe der Population ihr Maximum erreicht. Diese Verluste reichen oft aus, um das Bienenvolk zusammenbrechen zu lassen. In dieser Arbeit wird in einem Feldversuch in Österreich, ein sogenanntes Fluglingsverfahren getestet. Hierbei wurden 16 an CBPV erkrankte Völker in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Versuchsgruppe wurde dann einem Fluglingsverfahren unterzogen. Hierbei werden die Flugbienen bei der Rückkehr in eine nun abgetrennte Zarge geleitet. Anschließend werden die Flugbienen mittels Schwefelstreifen fachgerecht abgeschwefelt. Zeitgleich mit dem Fluglingsverfahren wurden verschiedene Varianten der Probennahme miteinander verglichen, um deren Vergleichbarkeit zu ermitteln. Hier wurden lebende Bienen mit Tupferproben von den inneren Waben des Volkes und Tupferproben vom Flugloch miteinander verglichen. Diese Proben wurden dann im Labor aufbereitet, extrahiert und mittels RT-qPCR ausgewertet. Weiters wurde das Virus isoliert und die Sequenz bestimmt. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde dann mittels Gendatenbank mit anderen CBPV-Sequenzen verglichen. Es zeigte sich die stärkste Übereinstimmung mit einem slowenischen und einem österreichischen Virusstamm.

ABSTRACT

The chronic bee paralysis virus is a globally known viral disease, affecting adult honeybees. The infected bees present as those trembling, ataxic, flightless bees at the entrance of the hive. Additionally, a hairless, black abdomen is observable in the infected bees, which is likely to be bloated. Due to its aggressive nature, the virus leads to significant losses in a hive, especially during summer months when the colony population size is at a high. These losses are often severe enough to collapse the affected colony. In this study, something called an “Fluglingsverfahren” – a procedure to separate the worker bees from the rest of the hive, was tested in an Austrian field trial. Sixteen infected colonies were divided into experiment group and control group and the experiment group was subjected to said procedure. In this procedure, worker bees leave the hive in the morning and then are guided into a separated box in their hives upon return. These worker bees are then euthanized using the standard procedure of sulphur strips. Additionally, to the “Fluglingsverfahren”, different methods of testing for chronic bee paralysis virus were tried. Those methods were then compared to determine credibility and comparability amongst them. The methods compared were: live bee samples, swab samples from the inner combs of the beehive and swab samples at the entrance of the hive. These samples were then processed in the lab and evaluated using RT-qPCR. Furthermore, the virus was isolated and sequenced. Those sequencing results were then compared with other chronic bee paralysis virus sequences, using a gene database. Here, the strongest overlap was found in a Slovenian virus strain, closely followed by an Austrian virus strain.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG 4

ABSTRACT 5

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 8

2. EINLEITUNG 1

2.1. ALLGEMEIN 1

2.2. CHRONISCHES BIENENPARALYSE VIRUS (CBPV) 4

2.3. ÜBERTRAGUNG 5

2.4. SYMPTOMATIK 5

2.5. VERBREITUNG 6

2.6. BEKÄMPFUNG 7

2.7. ZIEL DER ARBEIT 7

3. MATERIAL UND METHODEN 9

3.1. STANDORT DER BETROFFENEN BIENENVÖLKER/HERKUNFT DER PROBEN 9

3.2. VORBEHANDLUNG DER BETROFFENEN VÖLKER 9

3.2.1. Ablauf der Studie 10

3.2.2. Fluglingsverfahren 12

3.2.3. Umweiseln 12

3.2.4. Abschwefeln 13

3.2.5. Kontrollbesuche 13

3.3. MATERIAL 14

3.3.1. Probenmaterial und Entnahme 14

3.3.2. Verwendete Geräte 15

3.3.3. Verwendete Kits 15

3.3.4. Verwendete Oligonukleotide 15

3.4. METHODIK 16

3.4.1. Probenaufbereitung und Extraktion der Nukleinsäuren 16

3.4.1.1. Bienenproben 16
3.4.1.2. Tupferproben 16
3.4.2. RT- qPCR 16
3.4.3. Sequenzierung 17
3.5. Statistik 17
4. ERGEBNISSE 20
4.1. Erste Probennahme 20
4.2. Zweite Probennahme 23
4.3. Dritte Probennahme 25
4.4. Vierte Probennahme - Schlussrevision 27
4.5. Verlauf der Viruslast der Völker 28
4.6. Sequenzierung 32
5. DISKUSSION 34
5.1. Vergleichbarkeit der Probennahme 34
5.2. Verlauf 34
5.3. Lebendproben versus Totproben 35
5.4. Sequenzierung 36
5.5. Ausblick 36
6. LITERATURVERZEICHNIS 38
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 44
8. TABELLENVERZEICHNIS 46
9. ANHANG 48

1. Abkürzungsverzeichnis

µl – Microliter

AGES – Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

BP – Bienenprobe

Bp – Basenpaare

CBPV – Chronisches Bienenparalyse Virus

cDNA – Complimentary DNA

C_T-Wert – cycle threshold

FAO – Food and Agricultur Organization of the United Nations

FT – Fluglochtupfer

GE - Gesamteinheit

kb - Kilobasen

mL – Milliliter

ORF – Open reading frame

PCR – Polymerase Chain Reaction

qPCR – realtime Polymerase Chain Reaction

rcf – Zentrifugalbeschleunigung

RT-qPCR – Reverse Transkriptase realtime Polymerase Chain Reaction

WT – Wabentupfer

2. Einleitung

2.1. Allgemein

Die Westliche Honigbiene (*Apis mellifera L.)* ist mit einer langen Vorgeschichte von Domestikation und Transport, heute der weltweit am weitesten verbreitete Bestäuber von Nutzpflanzen (1). Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Bestäubung der Nutzpflanzen und steigert zudem erheblich die Ertragsleistung sowie die Qualität der Ernte (2). Laut FAO beträgt der ökonomische Wert der Bestäubungsleistung von Nutzpflanzen über 150 Milliarden Euro weltweit (3). In Europa beträgt der ökonomische Wert der Bestäubungsleistung 14,6 Milliarden Euro, was in etwa 12% des wirtschaftlichen Gesamtwertes der erzeugten Pflanzenprodukte ausmacht (4). Weltweit wird der wirtschaftliche Ertrag durch Pflanzenbestäubung auf rund 215 Millionen US-Dollar geschätzt (3, 5, 6). Laut EU-Parlament spielen Bienenzucht und -haltung außerdem eine essenzielle Rolle in der Erhaltung der Biodiversität durch Kreuzbestäubung. Weiters liefert die westliche Honigbiene, neben Honig und Bienenwachs, auch Rohstoffe vieler medizinischer Produkte (7). Somit ist die Gesundheit der westlichen Honigbiene nicht nur aus ökologischer Sicht, sondern auch aus wirtschaftlicher Sicht von großer Bedeutung für den Menschen.

Der langfristige Rückgang an Bienenvölkern beschäftigt Forscher seit mehr als 50 Jahren. In Europa verzeichnete man Mitte der 80er-Jahre bereits einen 25%igen Rückgang der Honigbienenvölker. Zeitgleich beobachtete man einen Rückgang von 60% in den USA in dem gleichen Zeitraum (6). Nicht lange danach, in den 1990er Jahren, gab es eine Reduktion der Bienenvölker in Osteuropa von 50%, der auf den Untergang der UdSSR und somit ausbleibende finanzielle Mittel für Imker, zurückzuführen ist (6, 8). Auch der Anstieg der Produktionskosten im Vergleich zu Honigalternativen wie Zucker-basierte Produkte, führte seit 1985 indirekt durch einen 30%igen Rückgang der Imker in Westeuropa und damit zu einem Rückgang von etwa 25% der westeuropäischen Honigbienenvölker (8, 9). Somit zeigt sich, dass sowohl politische-, als auch sozioökonomische Faktoren einen großen Einfluss auf den stetigen Rückgang der Honigbienenvölker haben (6). Seit den 2000 Jahren hat sich der Trend geändert und es ist wieder ein stetiger Zuwachs an Bienenvölkern zu verzeichnen. So zeigt sich in Österreich ein Anstieg sowohl an Bienenvölkern, als auch an Bienenhaltern wie in den folgenden 2 Grafiken des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft gezeigt wird (10).



Abbildung 1: Anzahl Bienenvölker in Österreich im Zeitraum 2000-2021, Daten: Bienen Österreich



Abbildung 2: Anzahl BienenhalterInnen in Österreich im Zeitraum 2000-2021, Daten: Bienen Österreich

Aber nicht nur in Österreich zeigt sich ein Anstieg an Bienenvölkern. Laut Schätzungen der Welternährungsorganisation (FAO) ist ein Anstieg besonders in Melanesien, Nordeuropa und West Afrika ersichtlich, während Osteuropa und Nordamerika Verluste verzeichnen (11). Nun gibt es viele Faktoren, die die Gesundheit der westlichen Honigbiene negativ beeinflussen. So sind neben Pestiziden, Pilzen, Bakterien und Parasiten wie zum Beispiel der die Varroamilbe (*Varroa destructor*), Viruserkrankungen wesentliche Einflussfaktoren für das Absterben von

Bienenvölkern (12, 3). Viele dieser Viren sind eng an die Varroamilbe und ihren Lebenszyklus gebunden und werden durch diese übertragen. Während die Varroamilbe eine große Rolle in der Verbreitung einiger Viren der Honigbiene spielt, konnte bislang noch kein Zusammenhang zwischen der vektorgebundenen Übertragung durch die Varroamilbe und dem in dieser Arbeit behandelten Virus, dem chronischen Bienenparalysevirus (CBPV) festgestellt werden (13–15). Allerdings soll hier erwähnt werden, dass einige Genomkopien von CBPV in Varroamilben nachgewiesen werden konnten. Dies zeigt, dass die Varroamilbe theoretisch als mechanischer Vektor für die Übertragung geeignet sein könnte (16). Ebenfalls wichtig zu nennen ist die Nosemamatose. Nosemaarten, insbesondere *Nosema apis* und *Nosema ceranae*, sind Mikrosporidien, die als bedeutende Parasiten der westlichen Honigbiene weltweit verbreitet sind. *N. apis*, welche in der westlichen Honigbiene entdeckt wurden und *N. cerana*, welche in der asiatischen Honigbiene entdeckt wurden, sind hier die wichtigsten zu nennenden Vertreter. Bei Nosema ssp. handelt es sich um Darmparasiten. Sie beeinträchtigen die Verdauung der Bienen und ihre Nährstoffaufnahme. Die betroffenen Bienen sind schwach und weisen eine reduzierte Sammelaktivität und Produktivität auf. Dies schwächt die betroffenen Bienenvölker noch zusätzlich (17–19). Es werden derzeit Wechselwirkungen von Nosema mit anderen Bienenkrankheiten diskutiert. Hierbei werden insbesonders amerikanische Faulbrut – ein sehr gefährliches und meldepflichtiges Bakterium (*Paenibacillus larvae*),– als auch Viren wie deformed wing virus (DWV) und CBPV diskutiert (20–22).

Es wurden bisher mehr als 20 Viren der Honigbiene beschrieben. Ein nennenswertes Beispiel ist DWV. DWV ist grundsätzlich in niedrigen Mengen persistierend in Bienenstöcken. Sowohl in Eiern bis hin zu ausgewachsenen Bienen konnten Spuren von DWV gefunden werden. Diese Infektionen erfolgen meist symptomlos. Ist die Kolonie jedoch von Varroamilben befallen, so ändert sich das Bild drastisch. DWV in Kombination mit Varroamilben führt zu dem bekannten Bild des DWV. Infizierte Brut stirbt ab und nur wenige adulte Bienen gelangen zum Schlupf. Geschlüpfte Jungbienen weisen häufig nicht entfaltete „deformierte“ Flügel auf und sind nicht lebensfähig. Der DWV-Titer ist in diesen Bienen massiv erhöht. Diese Symptome von DWV in Kombination mit einem starken Varroamilben Befall führt in vielen Fällen zum Kollaps der betroffenen Kolonie. Zusätzlich ist eine Wechselwirkung zwischen DWV und N. ceranae beschrieben. Hierbei soll die Infektion mit beiden Pathogenen zu einer signifikanten Beschleunigung der DWV-Replikation in den Bienen führen (22). In beiden Fällen konnte die Beteiligung anderer Pathogene von Forschern bisher nicht ausgeschlossen werden (14, 23, 22). Ebenfalls interessant ist das Sackbrut-Virus (SBV). SBV war das erste Virus, dass man in

infizierten Honigbienen identifizieren konnte. Selbst heute ist es noch immer das häufigste, in Bienen gefundene, Virus (24–27). SBV befällt sowohl Brut als auch adulte Bienen. Jedoch ist die Infektion der Brut weitaus fataler als der Befall der adulten Bienen. Larven im Alter von etwa 2 Tagen sind am schwersten von der Infektion betroffen. Das Virus vermehrt sich rapide in den Larven wodurch sich ein flüssigkeitsgefüllter Sack bildet. Die Larven werden am Häuten gehindert und können sich nicht richtig verpuppen. Dies führt zu einer signifikant erhöhten Sterberate nach dem Verschließen der Brutzellen (28, 25). Diese Belastung in Kombination mit anderen Bienenviren kann für die Völker den Zusammenbruch bedeuten (25). CBPV wird als eines der sieben am häufigsten vorkommende Bienenviren genannt (29). Bei der Chronischen Bienenparalyse handelt es sich um eine in den letzten Jahren vermehrt vorkommende Viruserkrankung der westlichen Honigbiene (13). Das Virus wurde erstmals 1963 von Bailey et al. isoliert und charakterisiert. Dies macht CBPV, gemeinsam mit dem Akuten Bienenparalyse Virus (ABPV), zu einem der beiden ersten, aus der Honigbiene isolierten Viren (13). CBPV ist als RNA-Virus klassifiziert, kann jedoch derzeit weder einer Familie, noch einem Genus weiter zugeordnet werden. Es teilt sich zwar gewisse Charakteristika mit den Familien der *Nodaviridae* und *Tombusviridae*, ist jedoch laut den Kriterien des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) als Gattung einer neuen Gruppe positiv-strängiger RNA-Viren anzusehen (15, 30).

2.2. Chronisches Bienenparalyse Virus (CBPV)

CBPV besteht aus zwei linearen RNA-Strängen mit positiver Polarität (15). Im Gegensatz zu den meist ikosahedralen Partikeln der meisten Bienenviren, hat CBPV anisometrische Partikel die in etwa 15-40µm breit und 20-100µm lang sind (13, 31). RNA 1 weist eine Größe von etwa 3,6 kb auf und kodiert drei offene Leserahmen (ORFs). Diese ORFs kodieren die sogenannten Nichtstrukturproteine. RNA 2 ist mit 2,3 kb etwas kleiner und weist vier ORFs auf, welche möglicherweise die Strukturproteine kodieren (15, 32–34). Bei einem ORF handelt es sich um einen offenen Leserahmen, welcher laut Sieber et al. (2018) allgemein als Gensequenz, deren Länge durch 3 dividierbar ist und deren Translation mit einem Startkodon (ATG) beginnt und bei einem Stoppkodon endet, definierbar ist (35). Die ORFs sind am 5‘- und 3‘ – Ende jeweils von nichttranslatierten Regionen umgeben. Nur die Aminosäuresequenz des ORF 3 der RNA 1 weist eine signifikante Ähnlichkeit mit den konservierten Sequenzbereichen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der *Nodaviridae* und *Tombusviridae* auf. Dadurch kann angenommen werden, dass CBPV eine intermediäre Position zwischen den zwei Virusfamilien annimmt (33, 15).

2.3. Übertragung

Bezüglich der Übertragung von CBPV kann grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Die natürliche Übertragung im Volk und die experimentelle Infektion im Rahmen von Forschungsprojekten. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie genau sich CBPV innerhalb des Bienenvolkes verbreitet. Man weiß jedoch, dass mehrere Millionen Viruspartikel aus nur einer einzigen infizierten Honigbiene extrahiert werden können (36). Rinderer et al. beschreibt hierbei eine Erhöhung des Risikos einer Infektion durch Härchen anderer Bienen im Gastrointestinaltrakt. Kommt es zu einem Kampf zwischen den Bienen, so konnten die Forscher im Durchschnitt 53 Härchen im Magen der angegriffenen Biene finden und 21 im Magen des Angreifers. Bienen die weder andere Bienen angegriffen hatten, noch angegriffen wurden, hatten im Durchschnitt 2 Härchen im Magen. In einem Laborversuch wurde dann gezeigt, dass Bienen, die Härchen und Viruspartikel gefüttert bekamen, eine durchschnittliche Mortalität von >70% aufwiesen, während Bienen, die Viruspartikel aber keine Härchen gefüttert bekamen eine durchschnittliche Mortalität von 37% aufwiesen. Zum Vergleich: die Kontrollgruppen bekamen entweder Saccharose Sirup gefüttert, oder Härchen und wiesen eine durchschnittliche Mortalität von 7% und 8% auf (37). Ein weiterer Risikofaktor für die Übertragung ist das Freilegen des epithelialen Cytoplasmas einer Biene. Dies kann passieren, wenn die kutikulären Härchen der Bienen abbrechen, zum Beispiel durch das Aneinander Vorbeilaufen der Bienen im Volk oder durch Kämpfe zwischen den Völkern. Somit sind eng gehaltene und große Völker einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt. Weitere negative Einflüsse sind außersaisonale Schlechtwettereinbrüche, die den Kontakt innerhalb des Volkes, den Futteraustausch und die Kontaminationsrate über Faeces erhöhen, sowie die Überbesiedelung von lokalen Trachtangeboten wie es manchmal in der kommerziellen Honigproduktion der Fall ist (38, 36, 15).

2.4. Symptomatik

Die Symptomatik von Chronischer Bienenparalyse ist breit gefächert. Betroffene Bienen stellen sich als zitternd, ataktisch oder flugunfähig dar. Sie sind typischerweise schwarz und haarlos, da die Härchen im Kampf verloren gehen, wenn die Wächterbienen die kranken Bienen aus dem Stock vertreiben. Meist werden sie vor oder auf dem infizierten Bienenvolk gefunden. Diese sogenannten „Krabbler“ versterben innerhalb weniger Tage. Die

neurologische Symptomatik ist darauf zurückzuführen, dass das Virus vermehrt im Gehirn der Bienen nachgewiesen werden kann (39, 40, 32, 41). In Situ Hybridisierung hat hier gezeigt, dass CBPV besonders Somata und Neuropile Regionen in den erkrankten Bienen beeinflusst. Es wurde hierbei eine erhöhte Konzentration an CBPV in höheren neuronalen Regionen festgestellt – insbesondere im Pilzkörper und im zentralen Komplex des Insektengehirns (32). Diese neuronal beeinflussten „Krabbler“ werden in weiterer Folge vor dem Bienenvolk als vermehrter – teils massiver – Totenfall aufgefunden. Ebenso versterben betroffene Bienen im Stock und werden somit am Bodenbrett des Volkes aufgefunden. Eine Kolonie, die von CBPV betroffen ist, kann innerhalb weniger Tage ihre gesamte Masse an Flugbienen verlieren. Durch das Fehlen der Flugbienen, die Nektar sammeln, läuft das Volk Gefahr zu verhungern. Oft führt dieser Verlust der Flugbienen zum Zusammenbruch des Volkes (42–44). Die erkrankten Bienen verlieren ihre Haare an Abdomen und Thorax und erleiden Angriffe durch die gesunden Bienen im Volk. Dadurch verändert sich das Erscheinungsbild der Biene zu schwarz glänzend. Deshalb wurde CBPV in älterer Literatur oft als ansteckende Schwarzsucht bezeichnet (45, 43, 46). Ein weiteres Symptom von CBPV ist die Dysenterie. Diese ist durch das aufgeblähte Abdomen der betroffenen Bienen erkennbar. CBPV führt in diesen nämlich zu einer vermehrten Flüssigkeitsansammlung im Honigmagen. Die betroffenen Bienen entwickeln eine Dysenterie und setzen Durchfallkot im Stock ab. Der Durchfallkot ist hochgradig mit Viruspartikeln belastet und erhöht wiederum die Ansteckung im betroffenen Stock (42, 36, 43, 15, 46).

2.5. Verbreitung

CBPV ist eine weltweit verbreitete Infektion der Honigbiene, die das ganze Jahr über auftreten kann. Jedoch bleibt sie oft unbemerkt aufgrund eines asymptomatischen Verlaufes in den Bienen (41). Ausbrüche von starken Symptomen sind oft unberechenbar, erscheinen jedoch gehäuft in Frühling und Sommer, wenn die Kolonien ihre maximale Größe erreichen (41, 47). Zahlreiche Studien zur CBPV Prävalenz in verschiedenen Ländern, zum Beispiel Uruguay (48), Frankreich (49), Deutschland (50) und Österreich (51) liegen vor. Eine Studie in England beschreibt zum Beispiel einen Anstieg in der Prävalenz von CBPV. Budge et al beschreiben hierbei CBPV als „emerging disease“ welche in England im Zeitraum von 2007 – 2017 einen exponentiellen Anstieg verzeichnet. Weiteres fand die Studie ernsthafte Clusterbildungen für Distanzen von bis zu 40km. Bei Clusterbildung handelt es sich um räumliche und zeitliche Häufungen der Krankheitsfälle innerhalb einer Population. Außerdem zeigt die Studie, dass es bei CBPV zu einem sogenannten „burnout“ kommen kann mit einer späteren

Wiedereinführung der Erkrankung in betroffenen Gebieten. Da CBPV eine positive Korrelation mit der Dichte an Bienenvölkern in einem Gebiet zeigt, ergibt sich hier ein 1,5x höheres Risiko für berufliche Imker, da diese meist mehr Völker auf engerem Raum besitzen als Hobbyimker. In der Studie wird außerdem von einem Anstieg an CBPV positiven Kolonien weltweit berichtet. In den USA zum Beispiel, wurde im Jahr 2010 eine Prävalenz von 0,7% an CBPV-positiven Kolonien verzeichnet, welche im Jahr 2014 bereits auf 16% anstieg. In Italien zeigte sich 2009 eine CBPV-Belastung von 5% und im Jahr 2010 bereits eine Belastung von 10%. In China gab es 2009 einen Zuwachs der CBPV-Belastung von 9%, welcher im Jahr 2010 auf 38% anstieg. Somit kann CBPV als weltweit bedeutende Erkrankung der Biene angesehen werden, deren Häufigkeit in den letzten Jahren weltweit zuzunehmen scheint (52–55).

2.6. Bekämpfung

Derzeit gibt es keine spezifische antivirale Therapie für CBPV. Dies führt dazu, dass Imker verschiedenste imkerliche Maßnahmen in vielen verschiedenen Kombinationen anwenden, um ihre Völker während der Erkrankung mit CBPV zu unterstützen. Hauptziele hier sind, die erkrankten Bienen aus dem Volk zu entfernen, sowie die verbliebenen Bienen zu unterstützen und das Volk zu stärken. Diskutierte Methoden sind hierbei die Stoßbehandlung mit Ameisensäure, welche nur gesunde Bienen überleben sollen und somit die CBPV infizierten Tiere reduziert. Das Zufüttern von Zuckerlösung zählt ebenfalls dazu. Dies soll das Volk unterstützen und stärken. Hierbei werden teils reine Zuckerlösungen verwendet, teilweise werden jedoch nährstoffreichere Futtermittel verwendet, wie zum Beispiel mit Zitronensaft angereicherte Zuckerlösung, Futterwabentauscher oder BeeStrong der Firma BeeVital. Eine weitere imkerliche Maßname ist das Einbringen neuer Genetik durch das Austauschen der Königin, welches eine potenzielle vertikale Infektion verhindern soll und vitaleres Bienenmaterial in das Volk einbringt (56) sowie beispielsweise das Fluglingsverfahren, welches in dieser Arbeit untersucht wird.

2.7. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit begleitet einen klinischen Ausbruch der Chronischen Bienenparalyse an einem Bienenstand in Österreich. Dabei wurde die Viruslast von CBPV im Rahmen eines Sanierungsverfahrens in Völkern der westlichen Honigbiene verglichen. Hierzu wurde ein Versuch durchgeführt in dem über einen Flugling die Arbeiterinnen vom Volk getrennt und abgeschwefelt wurden. Da die Arbeiterinnen im Volk die höchste Viruslast aufweisen, soll dies zur Senkung der Viruslast in den Bienenvölkern führen und das Bienenvolk bei der Erholung

unterstützen. Zusätzlich zur Viruslast wurden drei Arten der Probennahme im Vergleich getestet und hinsichtlich ihrer Praktikabilität und Aussagekraft geprüft.

Um zu bestimmen, woher das CBPV im untersuchten Ausbruch stammt, wurde das Gesamtgenom eines Isolats aus einem klinisch stark betroffenen Volk bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1. Standort der Betroffenen Bienenvölker/Herkunft der Proben

Durch die AGES (Dr. Josef Maier) wurde Kontakt mit einem Imker hergestellt, der sich bereiterklärte, seine 16 Völker CBPV belasteter Bienen für den Versuchszweck, ein Sanierungsverfahren zu testen, zur Verfügung zu stellen. Die Völker waren durchnummeriert und wiesen die Nummerierungen 1-14 sowie 19-20 auf. Die Nummerierung wurde von uns übernommen. Diese Völker standen jeweils paarweise auf Bienenständern mit etwa 2m Abstand zwischen den Standorten.

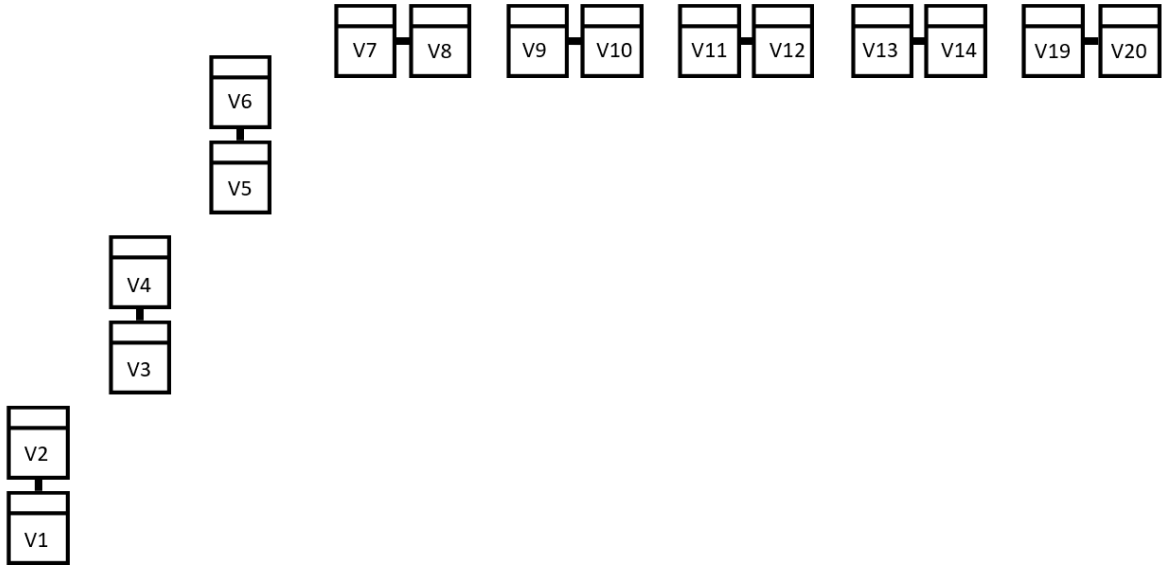


Abbildung 3: Aufstellung der Bienenvölker am betroffenen Bienenstand

3.2. Vorbehandlung der betroffenen Völker

Der Imker kauft seine Königinnen zu und tauscht diese alle 3-4 Jahre. Er behandelt jährlich die Stöcke gegen Varroamilben. Dazu benutzt er das Tierarzneimittel „VarroMed“ (geträufelt) der Firma BeeVital, welches primär Oxalsäure und zu geringen Mengen Ameisensäure zur Tötung der Varroamilben beinhaltet. Diese Methode wendet er üblicherweise einmal als Sommerbehandlung und einmal als Restentmilbung im Winter an. Da sich diese Methode in den letzten zwei Jahren für den Imker bewährt hatte, wurde auf weitere Behandlungsmethoden gegen die Milbe verzichtet. Für das Jahr 2022 sollte die Varroabehandlung nach demselben Schema erfolgen.

3.2.1. Ablauf der Studie

Am 27.06.2022 bemerkte der Imker das ein Volk erkrankt war, wenige Tage später bemerkte er das nächste Volk und eine Woche später alle 16 Völker des Standes. Zu diesem Zeitpunkt wendete sich der Imker an die Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Abteilung Bienenkunde (AGES). Der Imker bot an, eine Studie zur Bekämpfung der Chronischen Bienenparalyse bei seinen Völkern durchzuführen und gewährte die Möglichkeit der Probennahme. Die praktischen Arbeiten der Studie erfolgten in der Regel durch die Autorin, MitarbeiterInnen der AGES – Abteilung Bienenkunde und Bienenschutz, MitarbeiterInnen des Instituts für Infektiologie und Virologie und den Imker selbst. Die Varroadiagnose erfolgte durch die Autorin mit Unterstützung des Imkers und die Probennahme erfolgte durch die Autorin.

Bei dem ersten Besuch der Völker drei Wochen später, am 21.07.2022, wurden diese in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe zugeteilt. Da die Völker paarweise aufgestellt waren, wurden diese Paare entweder der Kontroll- oder der Versuchsgruppe zugeteilt, um Kontamination zu vermeiden. Dies führte zu folgender Aufteilung:

Tabelle 1: Gruppenaufteilung der Bienenvölker

Kontrollgruppe	Versuchsgruppe
Volk 1 + Volk 2	Volk 3 + Volk 4
Volk 5 + Volk 6	Volk 7 + Volk 8
Volk 9 + Volk 10	Volk 11 + Volk 12
Volk 13 + Volk 14	Volk 19 + Volk 20

Zusätzlich wurden bei dem Erstbesuch der Allgemeinzustand der Völker beurteilt. Sie waren deutlich geschwächt und hatten geringe Futtervorräte, daher hatte der Imker auch noch keinen Honig geerntet. An diesem Tag wurde die erste Probennahme durchgeführt. Hierbei wurden Lebendproben, sowie Fluglochtupfer und Wabentupfer entnommen. Am Tag darauf (22.07.2022) wurden die Völker vom Imker für die Varroazählung vorbereitet. Dazu wurde eine Varroatasse unterhalb des Volkes eingelegt.



Abbildung 4: Varroatasse, Quelle: https://www.wachs-hoedl.com/Varroatasse-Unterteil-Kunststoffwanne

Nach 5 Tagen, am 27.07.2022, wurden diese Varroatassen ausgezählt. Die Auszählung ergab 2-30 Milben pro Volk. Anschließend wurde erneut eine Varroatasse eingelegt um die Auszählung zu wiederholen. Am 28.07.2022 wurden die Völker vom Imker auf 3 Zargen reduziert und bedarfsgerecht mit Zuckerwasser zugefüttert, um die Völker zu stärken. Wieder einen Tag später, am 29.07.2022, wurden die Altköniginnen der Völker gekäfigt, um die Völker auf das Umweiseln vorzubereiten. Zwei Tage darauf, am 01.08.2022, erfolgte die zweite Auszählung der Varroatassen, erneut genau 5 Tage nach deren Einlage in die Völker. Die Zahlen lagen diesmal bei 5-30 Milben pro Volk. Der Imker entschied am 05.08.2022, bei einem Kontrollbesuch, eine Varroabehandlung durchzuführen. Hierbei wurde VarroMed von Beevital, in der Dosierung 20ml pro Volk, bei allen Bienenvölkern des Imkers angewendet. Am 08.08.2022, drei Tage nach der Varroabehandlung wurde gemeinsam mit der AGES bei der Versuchsgruppe das Fluglingsverfahren gestartet. Hier wurde die Königin in einem Käfig in die unterste Zarge zwischen zwei leere Rähmchen gehängt. Am nächsten Tag, dem 09.08.2022, wurden die Völker 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 19 und 20 umgeweiselt. Zwei Tage darauf, am 11.08.2022, konnten dann die Flugbienen, welche durch das Fluglingsverfahren in die abgesperrte Zarge geleitet wurden, fachgemäß durch Abschwefeln getötet werden. Bei der zweiten Probennahme wurden bei der Versuchsgruppe Lebendproben entnommen, sowie „Totproben“ von den abgeschwefelten Flugbienen. Vier Tage später, am 15.08.2022, erfolgte eine Nachkontrolle durch den Imker. Er hat sich hierbei einen Überblick über den Allgemeinzustand des Volkes, die Futterreserven und das Verhalten der Bienen geschaffen. Nach etwa einem Monat, am 12.09.2022, folgte eine weitere Kontrolle der Völker durch den Imker. Es wurden erneut der Allgemeinzustand des Volkes, die Futterreserven und das Verhalten der Bienen begutachtet. Der Imker stellte fest, dass die Völker eher schwach waren

und hatte Sorge, ob die Umweiselung erfolgreich gewesen war. Hierbei fiel auf, dass sich die Völker 1 und 4 sehr laut und etwas aggressiver verhielten und der Imker konnte bei genauerer Kontrolle feststellen, dass beide Völker weisellos waren – das heißt, dass keine Königin in den Völkern war. Die anderen Völker waren zu diesem Zeitpunkt bereits wieder mit Königinnen besetzt. Es fiel jedoch auf, dass die Völker geschwächt waren und trotz der neuen Königinnen wenige Stifte produzierten. Deshalb erfolgte drei Tage darauf, am 15.09.2022, eine erneute, genaue Kontrolle durch AGES und Imker, bei der der Königinnenstatus und die Stärke der Völker erhoben wurde. Dazu wurde eruiert ob Brut beziehungsweise Eier in den Völkern vorhanden waren. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Völker erneut mit Sirup gefüttert, da sie durch den Verlust der Flugbienen und durch den Trachtmangel über zu wenig Vorräte verfügten. Etwa einen Monat später, am 12.10.2022, wurde die dritte Probennahme vor der Überwinterung der Völker durchgeführt. Es wurden von der Authorin Bienenproben und Fluglochtupfer entnommen. Auf die Wabentupfer wurde zur Schonung der bereits geschwächten Völker erneut verzichtet. Da die Wabentupfer von der unteren Bruteinheit der Waben zu entnehmen sind, hätte diese Probennahme eine massive Störung der Völker dargestellt. Des Weiteren wäre dadurch das Klima im Volk gestört worden, was für die Bienen einen großen Stress und Energieaufwand darstellt. Zum Beginn des nächsten Bienenjahres am 26.04.2023, die Schlussrevision der überlebenden Völker und die letzte Probennahme von der AGES durchgeführt.

3.2.2. Fluglingsverfahren

Bei einem Fluglingsverfahren handelt es sich um eine Methode, Flugbienen vom Rest des Bienenvolkes zu trennen. Flugbienen kehren sehr präzise zu dem gewohnten Flugloch zurück. Wird eine neue Zarge anstelle des Volkes auf den Beutenboden mit dem Flugloch gesetzt, fliegen die Bienen bei ihrer Rückkehr in die separierte Zarge. Oberhalb dieser Zarge wird ein Zwischenboden mit einem Flugloch für die obere Zarge aufgesetzt, in der das Restvolk sitzt. Dieses Verfahren zur Trennung von Flug- und Stockbienen wurde bei der Versuchsgruppe durchgeführt.

3.2.3. Umweiseln

Hat ein Bienenvolk eine alte oder schwache Königin, gar keine Königin oder der Imker möchte neue Genetik einbringen, so muss er das Volk umweiseln. Die alte Königin wird entfernt und die neue Königin wird in das Volk eingebracht. Diese befindet sich in einem Schutzkäfig, der mit Futterteig verschlossen ist. Die Arbeiterinnen tragen den Futterteig Stück für Stück ab und

befreien somit die neue Königin. Dies gibt dem Volk genug Zeit, sich an die neue Königin zu gewöhnen, was zu einer verminderten Abstechungsrate führt.

3.2.4. Abschwefeln

Das Abschwefeln ist eine Methode, Bienen möglichst rasch und schmerzfrei abzutöten. Wenn der Imker eine Schwäche des Volkes feststellt und zu erwarten ist, dass das Volk den Winter nicht überleben würde, wird empfohlen es durch SO_2 zu töten, um den Aufwand für das Winterfutter zu sparen. In dieser Arbeit wurde entschieden, nur die Flugbienen, mit hoher Viruslast zu töten, um dem restlichen Volk eine Chance auf Abheilung zu geben. Hierbei wurde die Zarge mit den Flugbienen vom Volk entfernt und eine dicke Schwefelschnitte der Firma Bienen Meier AG aus dem Imkereifachhandel angezündet und in einen Schwefelofen gelegt. Dieser wurde dann in die Zarge mit den abzuschwefelnden Bienen gestellt und das Flugloch mit einem feuchten Tuch verschlossen. Durch die Verbrennung entsteht hierbei mit dem Sauerstoff der Umgebungsluft Schwefeldioxid, welches die Bienen rasch abtötet.

3.2.5. Kontrollbesuche

Da das Abschwefeln der Flugbienen für das Volk eine große Belastung darstellt, ist es notwendig die Völker regelmäßig zu kontrollieren. Zur Vorbereitung auf das Abschwefeln ist es angezeigt, Varroazählungen durchzuführen und die Völker gegebenenfalls gegen Varroa zu behandeln. Zudem sollten regelmäßig die Volksstärke, Brut und die Futtermengen kontrolliert werden. Ist die Futtermenge zu niedrig, so sollte den Völkern zur Unterstützung Zuckerwasser, oder andere nährstoffreiche Futtermittel wie zum Beispiel Futterwabentauscher oder mit Zitronensaft angereichertes Zuckerwasser, zugefüttert werden.

Es folgt der Zeitplan in Tabellenform:

Tabelle 2: Zeitplan des Versuches in Tabellenform

Datum	Tätigkeit
27.06.2022	Erste Symptome bemerkt
21.07.2022	**Erste Probennahme** (Bienenproben, Wabentupfer, Fluglochtupfer); Einteilung der Völker in Versuchs-/Kontrollgruppen
22.07.2022	Varroatasse einschieben um natürlichen Varroaabfall festzustellen.
27.07.2022	Auszählung der Varroatasse und Einlegen einer neuen Varroatasse
28.07.2022	Völker auf 3 Zargen reduzieren und bedarfsgerecht füttern
29.07.2022	Altköniginnen der Völker käfigen
01.08.2022	Zweite Auszählung der Varroatassen
05.08.2022	Varroabehandlung mittels VarroMed von Beevital durch Imker durchgeführt

08.08.2022	Fluglingsverfahren gestartet: separierende Zarge eingeschoben; Käfig mit Königin in unterste Zarge eingehängt
09.08.2022	Völker umweiseln: Jungköniginnen im Zusetzkäfig mit Futterteigverschluss eingehängt
11.08.2022	**Zweite Probennahme**; Fluglinge abschwefeln (Lebendproben, Totproben)
15.08.2022	Nachkontrolle der Völker
12.09.2022	Kontrolle
15.09.2022	Völkerinspektion zu Fütterungszustand und Königinnenstatus; bedarfsgerechte Fütterung
12.10.2022	**Dritte Probennahme** (Bienenproben, Fluglochtupfer)
26.04.2023	**Vierte Probennahme**/Schlussrevision durch AGES und Vetmed

3.3. Material

3.3.1. Probenmaterial und Entnahme

Als Probenmaterial für die virologischen Untersuchungen dienten adulte westliche Honigbienen (*Apis mellifera* mellifera), weiters wurden Fluglochtupfer und Wabentupfer den jeweiligen Bienenstöcken entnommen. Für die Beprobung wurden pro Volk 30 Bienen in einem sterilen Urinbecher der Firma Sarstedt gesammelt, dieser mit dem Deckel gut verschlossen und sofort auf Eis gekühlt. Zusätzlich wurde aus den zwei klinisch am stärksten betroffenen Völkern (V9 und V19) jeweils eine Probe bestehend aus rein symptomatischen Bienen (ca. 50 Flugbienen) entnommen. Bei der Schlussrevision wurden circa 15-20 Bienen außen am Flugloch entnommen.

Die Fluglochtupfer wurden außen am Flugloch entnommen. Dazu wurden die sterilen trockenen Stieltupfer der Marke Raucotupf von der Firma L&R bei jedem Volk vorne am Flugbrett jeweils 8x abgestrichen und anschließend in einem leeren 2ml Eppendorf Tube aufbewahrt.

Für die Wabentupfer wurde mit demselben Typ Wattetupfer gearbeitet. Hierfür wurden die zentralen 4 Waben der mittleren Zarge des jeweiligen Volkes vorsichtig aus dem Stock geholt und je beidseitig mit dem trockenen Wattetupfer abgestrichen. Anschließend wurden die Waben zurück in das Volk gehängt.

Um möglichst vergleichbare Proben zu erhalten, wurden alle Tupferproben am selben Tag von derselben Person entnommen. Zwischen jedem Volk wurden die Handschuhe gewechselt, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

3.3.2. Verwendete Geräte

Thermocycler SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems, Massachusetts

TANBead Maelstrom 4800 Nucleic Acid Extractor von Taiwan Advanced Nanotech Inc., Taiwan

Rotor Gene Q – Real Time PCR System von QIAGEN, Deutschland

3.3.3. Verwendete Kits

PCR & DNA Cleanup Kit von Monarch, Massachusetts

TANBead Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Auto Tube von Taiwan Advanced Nanotech Inc., Taiwan

3.3.4. Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für den Virusnachweis

Name	Sequenz	Richtung	Bindung	Quelle
BV210	CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC	Forward	RNA 1	Blanchard et al 2007
BV211	ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG	Reverse	RNA 1	Blanchard et al 2007
BV212	FAM-TCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTC-TAMRA	Probe	RNA 1	Blanchard et al 2007

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung

Name	Sequenz	Richtung	Bindung
BV296	GGTAAACTTTAGGACTAAGATG	Forward	RNA 1
BV537	ATGATAAAAGTGTGCCCACGA	Reverse	RNA 1
BV546	GCTCTGTCACTCCGATTACTACC	Forward	RNA 1
BV547	GTCGGCACCTCTCGATGTTATC	Reverse	RNA 1
BV554	CGGGCTGGAGAAATTTTGCCA	Forward	RNA 1
BV555	CATCTCTTCTTCGGTGTCAGCC	Reverse	RNA 1
BV539	TACATCAGCGCCATAGAACACG	Forward	RNA 1
BV548	TACATCAGCGCCATAGAACACG	Reverse	RNA 1
BV251	AGGCTTTCATCTATGGATAGAG	Forward	RNA 2
BV551	ATTGGTATTTGTTTGGGCGCG	Reverse	RNA 2
BV550	AACAGATGCCTGGACATATGGC	Forward	RNA 2
BV536	TGGGTTCGTCAAGATTTTCGGT	Reverse	RNA 2
BV549	CAGTAAACTTGCTCCTGCAGAT	Forward	RNA 2
BV384	CCGTGCTAAGCCAATCATGGCTAG	Reverse	RNA 2
BV363	CTCAATGAGAAGTACCGTG	Forward	RNA 2
BV256	GTTGGTAACTTGGACGATC	Reverse	RNA 1
β-Actin	CGACAGGATGCAGAAGGAGAT	Forward	cDNA
β-Actin	CAAGAAAGGGTGTAACGCAACTA	Reverse	cDNA

3.4. Methodik

3.4.1. Probenaufbereitung und Extraktion der Nukleinsäuren

3.4.1.1. Bienenproben

Um die Bienenproben aufzubereiten, wurden zuerst pro Volk 20 Bienen in individuelle sterile 50mL Schraubröhrchen der Firma Eppendorf überführt. In alle Röhrchen kamen jeweils 10mL sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), was zu einer Ratio von 0,5mL PBS pro Biene führt. Um das Exoskelett der Bienen aufzubrechen, wurden außerdem sterile Edelstahlkugeln mit Durchmesser 3,2mm in die Tubes gefüllt. Dann wurden die gut verschlossenen Tubes für 5 Minuten geschüttelt und gevortext, um eine möglichst homogene Masse zu erzeugen. Anschließend wurden die Kugeln mittels eines Magneten entfernt und die Tubes für 10 Minuten bei 2500xg zentrifugiert. Danach wurden 2mL der hierbei entstandenen Lösung in ein 2mL Eppendorf Tube pipettiert. Hiervon wurden 300µL für die Extraktion mittels TANBead Maelstrom 4800 Nucleic Acid Extractor von Taiwan Advanced Nanotech Inc. verwendet. Dazu wurden die 300µL auf den TANBead Nucleic Acid Extraction Kit OptiPure Viral Auto Tube von Taiwan Advanced Nanotech Inc. pipettiert und anschließend nach Herstellerangaben im Extraktor extrahiert.

3.4.1.2. Tupferproben

Die Tupfer wurden in einem 2mL Eppendorf Tube mit 500µL PBS für 2 Minuten gevortext. Anschließend wurden 300µL der Suspension in das Extraktionskit vorgelegt und nach demselben Protokoll wie die Bienenproben extrahiert.

3.4.2. RT- qPCR

Die RT- qPCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA oder RNA mittels der Polymerase Kettenreaktion. Bevor die eigentliche Amplifizierung der DNA stattfindet, muss die virale RNA erst in DNA umgeschrieben werden. Dazu wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Danach folgt die eigentliche PCR-Reaktion. Dafür kommen Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs), Primer, DNA-Polymerase und das Template in eine Pufferlösung. Durch thermische Denaturierung bei 95°C findet der erste Schritt statt. Die DNA wird dabei einzelsträngig, weshalb nun die Primer einen Bindungsort haben. Sie binden dann bei 60°C an die jeweilige komplementäre DNA-Sequenz und ermöglichen so die Bindung der Polymerase. Diese fügt dann, komplementär zur Matrize, die jeweiligen dNTPs an und elongiert damit den neuen DNA-

Strang. Dieser Zyklus wird 40x wiederholt und man erhält am Ende bis zu 2^{40} Kopien Ausgangs-DNA. Für eine qPCR wird, zusätzlich zu den beiden Primern, noch eine sogenannte Sonde benötigt. Diese Sonde ist mit einem Fluoreszenzmarker und einem „Quencher“ modifiziert. Befindet sich der Quencher nah genug am Fluoreszenzmolekül, neutralisiert („quencht“) er das Fluoreszenzsignal. Durch die 5‘ Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase wird der Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde (bzw. dem Quencher) abgetrennt und das Fluoreszenzsignal kann durch das jeweilige qPCR-Gerät gemessen werden. Im Thermocycler werden eine oder mehrere Farbkanäle ausgewählt – dies ermöglicht die Auswertung mehrerer PCR-Produkte, dessen Sonden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe aufweisen, gleichzeitig. Anhand der Farbspektren der verschiedenen Marker, wird hier das Ergebnis ausgewertet. Das Prinzip hier ist, je mehr Ziel-DNA in der RT-qPCR entsteht, umso stärkere Lichtsignale werden ausgesendet und diese Fluoreszenzen können dann von der Maschine gemessen werden. Dies bedeutet, je mehr der gesuchten RNA sich in dem Sample befindet, umso früher wird das Signal messbar. Die Intensität der Fluoreszenz ist hier direkt proportional zu der Menge an DNA, die nach Ablauf des jeweiligen Zyklus vorliegt. Der Thermocycler misst die Signale nach jedem Zyklus. Sobald ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal, verglichen mit dem Signal des Hintergrunds, gemessen wird, kann die Probe als positiv gewertet werden. Beim Überschreiten des sogenannten Schwellenwertes, erhält man den C_T-Wert (cycle threshold)(57, 58). In dieser Arbeit wurde mit zwei Kanälen gearbeitet. Ein Kanal maß β-actin zur Bestätigung, dass es sich um Bienengenom handelt. Der zweite Kanal maß den grün fluoreszierenden Marker und diente zum Nachweis und zur Quantifizierung des Genoms.

3.4.3. Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach einer Aufreinigung gemäß Herstellerangaben mithilfe des NEB Monarch DNA Purification Kit bei der Firma Eurofins sequenziert. Das Ergebnis wurde mit dem CLC Sequence Viewer der Firma Qiagen analysiert. Über das Programm Nucleotide BLAST vom National Center for Biotechnology Information wurde die Sequenz mit anderen Sequenzen verglichen. Hierbei wurde auf die NCBI-Gendatenbank zugegriffen.

3.5. Statistik

Die Statistik wurde mithilfe von Microsoft Excel berechnet. Es wurde Korrelationskoeffizient, Mittelwert, Median, Standardabweichung und Konfidenzintervall berechnet, sowie ein T-Test durchgeführt (Tab. 5-9).

Die Formel zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten lautet:

$$Korrelationskoeffizient(X,Y) = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß dafür, wie stark zwei Datensätze oder Variablen zusammenhängen. Je näher der Wert an 1, umso stärker ist der Zusammenhang. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,5 spricht man bereits von einem mittelstarken Zusammenhang (59). Dies bedeutet für die Proben, je stärker der Zusammenhang umso vergleichbarer sind die Testergebnisse (59).

Median und Mittelwert wurden zur Kontrolle der Vergleichbarkeit der Probennahmetechniken und für die Berechnung der Standardabweichung berechnet. Beim Mittelwert handelt es sich um das arithmetische Mittel, welches mit folgender Formel berechnet wird:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

Der Median wird bei einer geraden Anzahl an Werten mit folgender Formel berechnet:

$$\tilde{x} = \frac{(x\frac{n}{2} + x\frac{n}{2} + 1)}{2}$$

Bei einer ungeraden Anzahl an Werten wird folgende Formel verwendet:

$$\tilde{x} = x\frac{n+1}{2}$$

Die Standardabweichung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})}{(n-1)}}$$

Sie zeigt die Abweichung zum Mittelwert bei den einzelnen Methoden der Probennahme. Die gegebenen Werte zeigen hier den durchschnittlichen Abstand der Ergebnisse zum Mittelwert an.

Für diese Arbeit wurde das 95%ige Konfidenzintervall berechnet, welches einen Bereich aufzeigt in dem mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit das wahre Mittel zu finden ist. Dies hilft insbesondere um von Stichproben auf eine Grundgesamtheit zu schließen. Die verwendete Formel lautet:

$$KI = \overline{x \pm z\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Da es sich um ein 95%iges Konfidenzintervall handelt wurde für z=1,96 verwendet (59).

In dieser Arbeit wurde der Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben angewendet. Hierzu benötigt man folgende Formeln:

Für die Hypothesen:

$$H_0: \mu_x - \mu_y = \omega_0$$

$$H_1: \mu_x - \mu_y \neq \omega_0$$

Für die Teststatistik:

$$T = \sqrt{n}\frac{\overline{D} - \omega_0}{S_D}$$

Für die Prüfwerte:

$$t = \sqrt{n}\frac{\bar{d}-\omega_0}{s_d} \text{ mit } d_i = x_i - y_i \text{ , } \bar{d} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} d_i \text{und } s_d = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(d_i - \bar{d})^2}$$

Der Ablehnungsbereich von H_0 wurde folgendermaßen definiert:

$$(-\infty, -t_{1-\frac{\propto}{2};n-1}] \cup [t_{1-\frac{\propto}{2};n-1}, \infty)$$

Der Zweistichproben-t-Test für abhängige Stichproben wurde verwendet um die Methoden der Probennahme miteinander zu vergleichen. Hierbei wurden jeweils zwei der Probennahmearten miteinander verglichen und die Werte auf ihre Vergleichbarkeit miteinander überprüft (59, 60).

Weiters wurde der t-Test angewandt um die Nullhypothese zu widerlegen.

Die Grafiken und Tabellen wurden ebenfalls mit Microsoft Excel erstellt. Für die Umrechnung von den GE/Reaktion zu GE/ml Virussuspension wurde der Umrechnungsfaktor=134 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Erste Probennahme

Am 21.07.2022 erfolgte die erste Untersuchung der betroffenen. Hierbei wurden bei allen Völker die Volkgröße notiert (Anzahl Zargen), die Volksstärke und der Totenfall vor dem Flugloch Völkern beurteilt. Anschließend wurden dreierlei Proben entnommen, lebende Bienen, Waben- und Fluglochtupfer.

Tabelle 5: Erste Kontrolle der Völker, es wurden Größe, Stärke und Totenfall notiert

Volk Nr.	Anzahl Zargen	Volksstärke*	Totenfall**
1	3	1-2	+++
2	3	1-2	+++
3	4	1-2	+++
4	4	1-2	+++
5	2	1	+++
6	1	1-2	+
7	4	2	++
8	5	2	++
9	4	2	+
10	4	2	+
11	4	2	+
12	4	2	++
13	4	2	+
14	4	2	+
19	4	2	+
20	4	2	+

* 1= sehr schwach, 2= normal, 3= sehr stark
** += geringgradig, ++= mittelgradig, +++= hochgradig

Es zeigte sich hier, dass der Totenfall bei den Völkern 1-5 am stärksten war. Der Bestand lebender Bienen war in diesen Völkern deutlich verringert. Volk 8 war am größten, wies jedoch trotzdem mittelgradigen Totenfall auf. Volk 6 war am kleinsten, hatte jedoch nur geringgradigen Totenfall. Nach der Probennahme wurden die Fluglochtupfer, Wabentupfer und Bienenproben im Labor ausgewertet. Hierbei zeigte sich ein positives Ergebnis auf CBPV in allen Proben bei sämtlichen Völkern. Die GE/ml Virussuspension lag bei allen Völkern zwischen 4,06E+01 und 7,61E+08. In Abb. 5 sind diese Ergebnisse in einer Grafik zusammengefasst. Diese zeigt die Viruslast in GE/ml Virussuspension der 3 getesteten Varianten der Probennahme pro Volk.

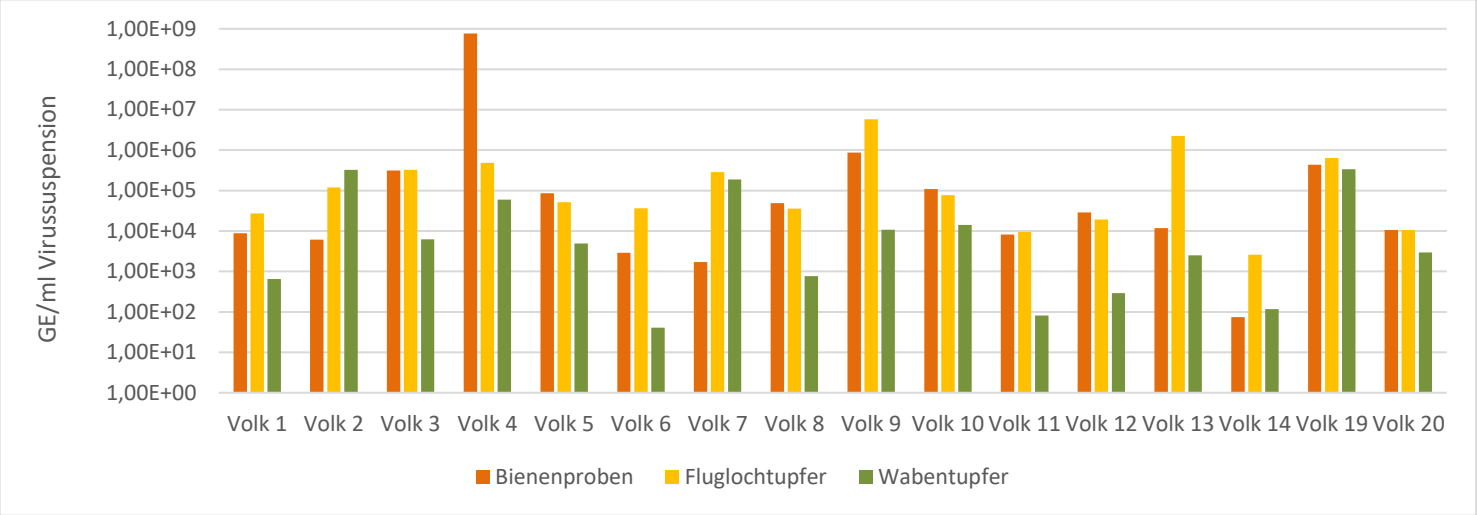


Abbildung 5:*Viruslast* in GE/ml Virussuspension der 3 getesteten Varianten der Probentnahme pro Volk vom 21.07.2022

Man kann hier bereits eine Korrelation der unterschiedlichen Probenarten erkennen. Diese wurde rechnerisch bestätigt. Tab. 6 zeigt den Korrelationskoeffizienten der ersten Probennahme.

Tabelle 6: Korrelationskoeffizienten der ersten Probennahme, n=16

Verglichene Probenarten	Korrelationskoeffizient
BP x FT	0,54
BP x WT	0,43
FT x WT	0,62

Der Korrelationskoeffizient der verschiedenen Varianten der Probennahme reicht von 0,43 bis 0,62. Hierbei stellte sich der Zusammenhang von Fluglochtupfer zu Wabentupfer als am stärksten heraus mit 0,62, was bedeutet, dass diese am stärksten korrelieren.

Ebenfalls wurden Mittelwert und Median der Virus- bzw. GE-Last in den Probenarten berechnet. Der Mittelwert der Bienenproben wies mit 3,56E+05 die höchsten Werte auf. Die Wabentupfer wiesen sowohl den niedrigsten Mittelwert als auch den niedrigsten Median auf.

Tabelle 7: Mittelwert der Völker, der ersten Probennahme, n=16

Probenart	Mittelwert in GE/ml Virussuspension
BP	3,56E+05
FT	4,74E+03
WT	4,44E+02

Tabelle 8: Median der Völker erste Probennahme, n=16

Probenart	Median in GE/ml Virussuspension
BP	1,50E+02
FT	4,77E+02
WT	2,92E+01

Die Standardabweichung gibt den durchschnittlichen Abstand der Werte zum Mittelwert an. Hier zeigten die Wabentupfer mit Abstand die geringste Abweichung. Sie zeigten mit 8,35E+02 GE/ml Virussuspension die geringste Standardabweichung, während Bienenproben mit 137E+06 GE/ml Virussuspension die größte Standardabweichung aufwiesen.

Tabelle 9: Standardabweichung ersten Probennahmen, n=16

Probenart	Standardabweichung in GE/ml Virussuspension
BP	1,37E+06
FT	1,07E+04
WT	8,35E+02

Beim Konfidenzintervall zeigten die Wabentupfer ebenfalls die niedrigsten Werte. Sie hatten das geringste Konfidenzintervall mit 4,45E+02.

Tabelle 10: Konfidenzintervalle der ersten Probennahme, n=16

Probenart	Konfidenzintervall in GE/ml Virussuspension
BP	7,33E+05
FT	5,72E+03
WT	4,45E+02

Der t-Test ergab bei dem Vergleich aller Probennahmen ein signifikantes Ergebnis. Bienenproben und Fluglochtupfer, als auch Bienenproben und Wabentupfer gaben hier ein Ergebnis von 0,17. Fluglochtupfer und Wabentupfer unterschieden sich etwas mehr, mit einem Ergebnis von 0,07. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% angesetzt, da alle Werte über den 5% liegen, sind diese nicht signifikant unterschiedlich, was auf ihre Vergleichbarkeit hinweist. Es handelt sich hierbei um ein Widerlegen der Nullhypothese, welche behauptet, dass die Ergebnisse der verschiedenen Tupferproben unterschiedlich seien.

Tabelle 11: t-Test erste Probennahme

Verglichene Probenarten	t-Test
BP x FT	0,17
BP x WT	0,17
WT x FT	0,07

4.2. Zweite Probennahme

Die zweite Probennahme fand am 11.08.2022 statt. Hier wurden erneut die Stärke des Volkes beurteilt. Weiters wurden hier die Ergebnisse des Umweiselns notiert und die Brut beurteilt. Die Völker 2 und 5 sind bereits zu diesem Zeitpunkt zusammengebrochen. Aufgrund der teils massiven Futtermängel, wurden die Völker mit Zuckerwasser gefüttert.

Tabelle 12: Zweite Kontrolle: es wurden Volksstärke, Totenfall, Umweiseln, Brut und Futter kontrolliert

Volk Nr.	Volksstärke*	Totenfall	Umgeweiselt**	Brut***	Futter****
1	1-2	wenig	u	+/-/-	m
2	-	-	-	-	-
3	1-2	wenig	u	+/+/+	m
4	1-2	wenig	u	+/+/+	m
5	-	-	-	-	-
6	1-2	wenig	nu	+/+/+	m
7	2	wenig	nu	+/+/+	+
8	2	wenig	u	+/+/+	+++
9	2	wenig	u	+/+/+	m
10	1-2	wenig	u	-/-/-	m
11	2	wenig	u	+/+/+	+++
12	2	wenig	u	+/+/+	++
13	2	wenig	u	-/-/-	m
14	2	wenig	nu	+/-/-	m
19	1-2	wenig	u	+/+/+	++
20	1-2	wenig	u	-/-/+	++

*1=sehr schwach, 2= normal, 3= sehr stark
** u= umgeweiselt, nu= nicht umgeweiselt
*** Ei/offen/verdeckelt, +=geringgradig, ++= mittelgradig, +++= hochgradig
**** m= Futtermangel, += unter 5kg, ++= 5-10kg, +++= über 10kg

Es wurde die Versuchsgruppe beprobt, bei der Kontrollgruppe wurde aufgrund der Schwäche der Völker auf die Probennahme verzichtet. Bei den Völkern der Versuchsgruppe wurde an diesem Tag die Bienen des Fluglings abgeschwefelt. Es wurden sowohl Bienenproben oberhalb des Zwischenbodens, als lebende Bienen entnommen, als auch jeweils eine Probe der abgeschwefelten Flugbienen aus dem unteren Teil des Zwischenbodens. Im Labor wurden

die lebend entnommenen Bienenproben mit den bereits abgeschwefelten Bienenproben verglichen. Es ergab sich folgendes Bild (Abb. 5). Hier zeigte sich nur bei Volk 19 und 20 ein deutlicher Unterschied zwischen Lebendproben und Totproben.

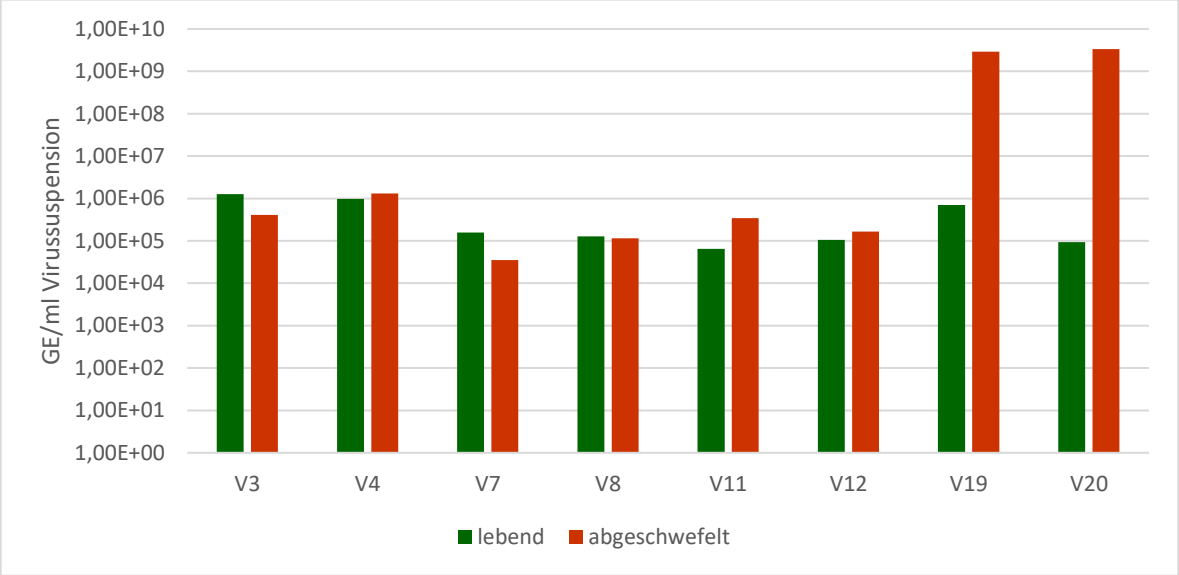


Abbildung 6: Vergleich der Viruslast der Lebendproben versus abgeschwefelte Bienenproben

Erneut wurden Korrelationskoeffizient, Mittelwert, Median, Standardabweichung und Konfidenzintervall berechnet, sowie ein T-Test durchgeführt (Tab. 11-13). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,15 und der T-Test ergab 0,10. Dies bestätigt erneut die Vergleichbarkeit der Proben. Die Lebendproben sind in den Tabellen mit L gekennzeichnet und die abgeschwefelten Proben mit S. Die Mittelwerte liegen hier weit auseinander. Der Wert der Lebendproben liegt eine Dreierpotenz niedriger als die Werte der abgeschwefelten Proben. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Flugbienen die Hauptträger des Virus sind. Da sich in den abgeschwefelten Proben nur Flugbienen befinden, erhält man hier eine höhere Konzentration des Virus.

Tabelle 13: Mittelwert zweite Probennahme

Probenart	Mittelwert in GE/ml Virussuspension
L	4,37E+05
S	7,86E+08

Trotz der deutlichen Unterschiede im Mittelwert, liegen die Mediane der Proben eng beieinander. Hier sind die abgeschwefelten Proben mit 3,78E+05 nur knapp höher als die Lebendproben mit 1,42E+05.

Tabelle 14: Median zweite Probennahme

Probenart	Median in GE/ml Virussuspension
Median L	1,42E+05
Median S	3,78E+05

Die Standardabweichung ist deutlich höher bei den getöteten Flugbienen. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Mediane der zwei Probenarten sehr nahe beieinander lagen, die Mittelwerte sich jedoch stark voneinander unterscheiden.

Tabelle 15: *Standardabweichung zweite Probennahme*

Probenart	Standardabweichung in GE/ml Virussuspension
L	4,45E+05
S	1,37E+09

4.3. Dritte Probennahme

Die dritte Probennahme erfolgte am 12.10.2022. Einen Monat vor diesem Besuch wurden die Völker erneut mit Zuckerwasser gefüttert, da sie durch den Verlust der Flugbienen und durch den Trachtmangel über zu wenig Vorräte verfügten. Als die Völker kontrolliert wurden, fiel auf, dass Volk 11 zusammengebrochen war. Bei der Kontrolle wurden wie zuvor Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter beurteilt. Es gab, trotz Zufütterung, bei 5 Völkern Futtermangel und 4 Völker hatten keine Eier und keine offene Brut. Es fiel auf, dass es bei fast keinen Völkern mehr Totenfall vor dem Volk gab.

Tabelle 16: Dritte Kontrolle: es wurden Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter kontrolliert

Volk Nr.	Volksstärke*	Totenfall	Brut**	Futter***
1	2	ggr	-/-/-	++
2	-	-	-	-
3	2	-	+/+/+	m
4	2	-	-/-/-	++
5	-	-	-	-
6	2	-	+/+/+	m
7	2	-	+/+/+	+
8	2	-	+/+/+	m
9	2	-	-/-/+	m
10	2	-	+/+/+	m
11	-	-	-	-
12	1	-	+/+/+	++
13	2	-	+/+/+	++
14	2	-	+/+/+	+++

19	2	ggr	+/+/+	+++
20	1	ggr	-/-/-	++

*1=sehr schwach, 2= normal, 3= sehr stark
** Ei/offen/verdeckelt, +=geringgradig, ++= mittelgradig, +++= hochgradig
*** m= Futtermangel, += unter 5kg, ++= 5-10kg, +++= über 10kg

Zur Schonung der geschwächten Völker wurde entschieden, hier auf die Wabentupfer zu verzichten. Bienenproben und Fluglochtupfer wurden dennoch wie bei den vorigen Probennahmeterminen entnommen. Es zeigten sich V6, V7, V8, V10 und V14 virusnegativ.

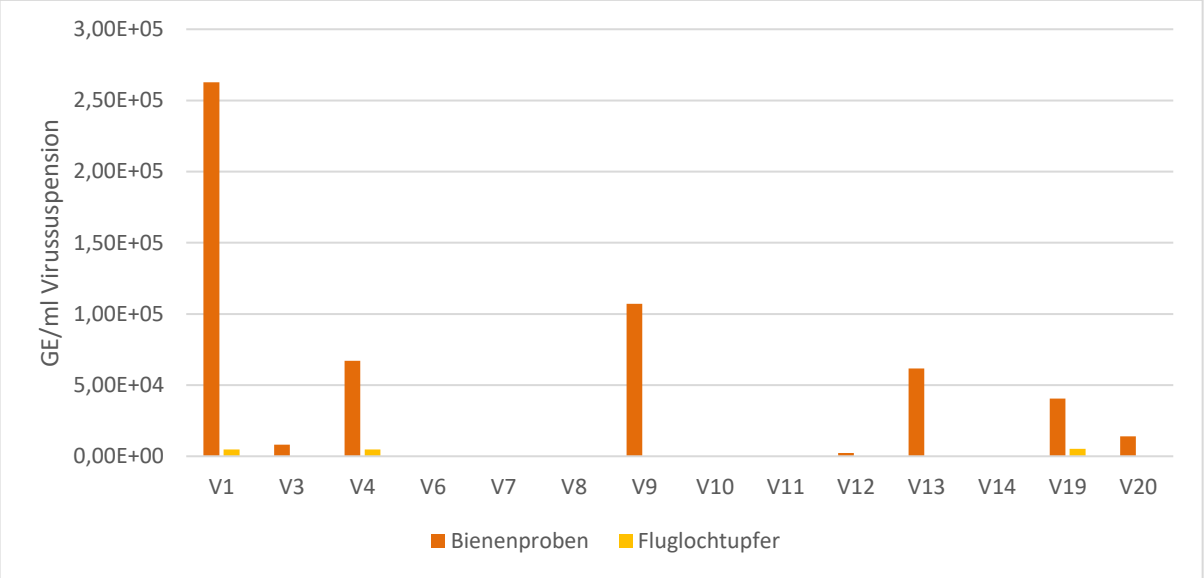


Abbildung 7: *Dritte Probennahme,* Viruslast der GE/ml Virussuspension von zwei Probenarten in logarithmischer Darstellung; die virusnegativen Völker wurden der Vollständigkeit in die Grafik eingefügt, V2 und V5 waren zu diesem Zeitpunkt bereits zusammengebrochen. V6, V7, V8, V10, V11 und V14 zeigten sich virusnegativ.

Auch hier wurden wieder Korrelationskoeffizient, Mittelwert, Median, Standardabweichung und Konfidenzintervall berechnet, sowie ein T-Test durchgeführt (Tab. 15-18). Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,40 und der T-Test beträgt 0,034. Die Anzahl der positiven Völker lautet bei den Bienenproben n=8. Dies kann einen Einfluss auf die Signifikanz der Werte haben. Dennoch waren die Mittelwerte der Probenarten nicht stark unterschiedlich. Sie befinden sich hier im gleichen Bereich wie die Mittelwerte der vorherigen Probennahmen. Die Bienenproben weisen mit 4,02E+04 einen etwas höheren Mittelwert auf als die Fluglochtupfer.

***Tabelle 17*:** Mittelwert dritte Probennahme, n=8

Probenart	Mittelwert in GE/ml Virussuspension
BP	4,02E+04
FT	3,55E+03

Die Mediane der zwei Probenarten befinden sich ebenfalls im selben Bereich wie die Mediane der vorherigen Probennahme.

Tabelle 18: Median dritte Probennahme, n=8

Probenart	Median in GE/ml Virussuspension
BP	5,22E+03
FT	4,84E+03

Die Standardabweichung der Bienenproben liegt mit 7,98E+04 GE/ml Virussuspension etwas über der Standardabweichung der Fluglochtupfer, die 9,33E+03 GE/ml Virussuspension beträgt.

Tabelle 19: Standardabweichung dritte Probennahme, n=8

Probenart	Standardabweichung in GE/ml Virussuspension
BP	7,98E+04
FT	9,33E+03

Beide Probenarten haben sehr ähnliche Konfidenzintervalle.

Tabelle 20: Konfidenzintervall dritte Probennahme, n=8

Probenart	Konfidenzintervall in GE/ml Virussuspension
BP	5,53E+04
FT	1,06E+04

4.4. Vierte Probennahme - Schlussrevision

Zuletzt wurde die Schlussrevision am 26.04.2023 durchgeführt. Es wurden erneut Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter beurteilt. Zu diesem Zeitpunkt waren Volk 1, 2, 3, 4, 5, 11, 12 und 20 zusammengebrochen. Die restlichen Völker waren großteils stark, jedoch war bei vielen Völkern ein massiver Futtermangel bemerkbar. Mit Ausnahme von Volk 19 gab es allerdings in jedem Volk Brut.

Tabelle 21*:* Vierte Kontrolle: Es wurden Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter Kontrolliert

Volk Nr.	Volksstärke*	Totenfall	Brut**	Futter***
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-

6	2	-	+/+/+	m
7	2	-	+/+/+	m
8	2	-	+/+/+	m
9	1-2	-	+/+/+	m
10	2	-	+/+/+	++
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	2	-	+/+/+	++
14	2	-	+/+/+	++
19	1	-	-/-/-	+
20	-	-	-	-

*1=sehr schwach, 2= normal, 3= sehr stark
** Ei/offen/verdeckelt, +=geringgradig, ++= mittelgradig, +++= hochgradig
*** m= Futtermangel, += unter 5kg, ++= 5-10kg, +++= über 10kg

Es wurden Bienenproben und Fluglochtupfer entnommen, auf die Wabentupfer wurde zur Schonung der Völker verzichtet. Es zeigte sich, dass die überlebenden Völker weiterhin mit CBPV infiziert waren. Volk 6 wurde hier als einziges Volk virusnegativ getestet. Ob es sich um eine bestehende Infektion oder eine Neuinfektion handelt, ist hierbei unklar.

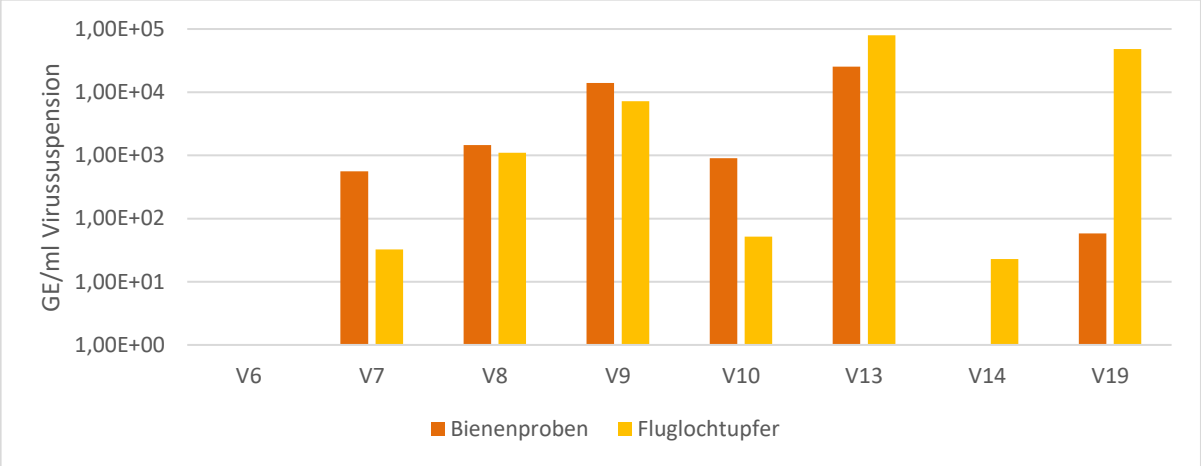


Abbildung 8: *Vierte Probennahme/*Schlussrevision: Viruslast von zwei Probenarten in GE/ml Virussuspension; Volk 6 wurde als einziges als virusnegatives Volk getestet

4.5. Verlauf der Viruslast der Völker

Die Viruslast der Völker pro Probennahme darstellt. Grün zeigt hier die erste Probennahme. Man kann erkennen, dass alle Völker positiv getestet wurden. Am Tag der zweiten Probennahme wurde zur Schonung der Völker nur die Versuchsgruppe beprobt, da diese ohnehin manipuliert werden musste. Alle Völker der Versuchsgruppe testeten positiv auf CBPV. Spannend ist, dass die Viruslast bei manchen Völkern niedriger erscheint als bei der

ersten Probennahme, bei anderen Völkern jedoch höher. Gelb markiert die dritte Probennahme. Volk 2, 5 und 11 sind hier bereits zusammengebrochen. Allerdings gab es hier 5 Völker, welche CBPV negativ testeten. Violett markiert die vierte Probennahme. Hier lebten noch Volk 6-10, 13, 14 und 19 – Wobei sich allein Volk 6 virusnegativ darstellte.

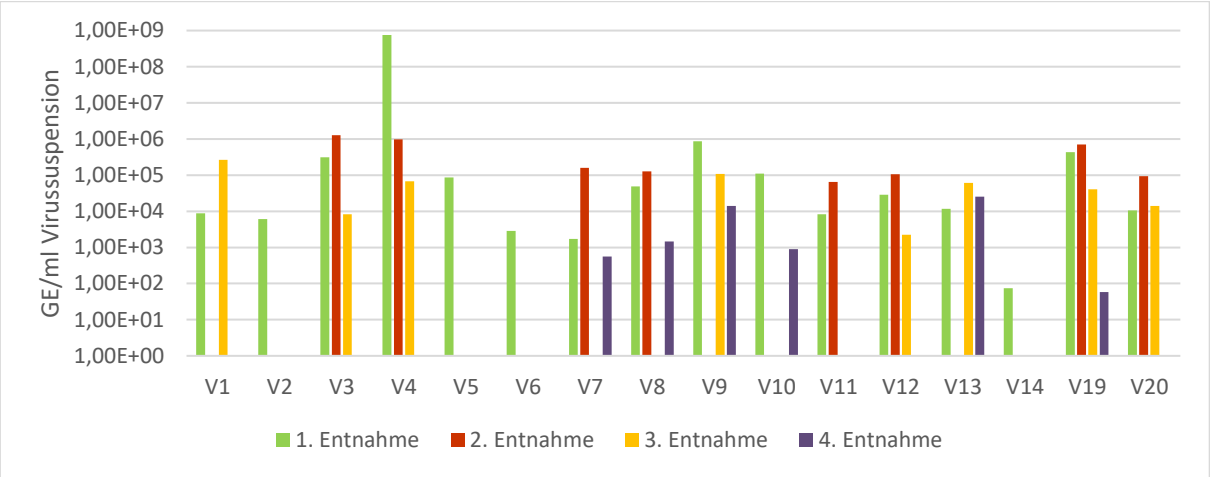


Abbildung 9: Darstellung der Viruslast der Bienenproben pro Volk pro Probennahme; Grün: erste Probennahme, Rot: zweite Probennahme, Gelb: dritte Probennahme, Violett: vierte Probennahme; Die Völker 2 & 5 sind zwischen zweiter und dritter Probennahme zusammengebrochen, bei der Schlussrevision lebten noch Volk 6-10, 13, 14 und 19 – wobei sich Volk 6 virusnegativ darstellte.

In den folgenden Abbildungen (9-12) ist der Verlauf der Viruslast der Bienenproben bei den Völkern pro Probennahmetermin dargestellt. Das Rote Kreuz symbolisiert hier den Verlust eines jeweiligen Volkes. Dies soll einen Überblick über die Schwankungen der Viruslast geben, als auch verdeutlichen, zu welchem Zeitpunkt welche Völker zusammengebrochen sind.

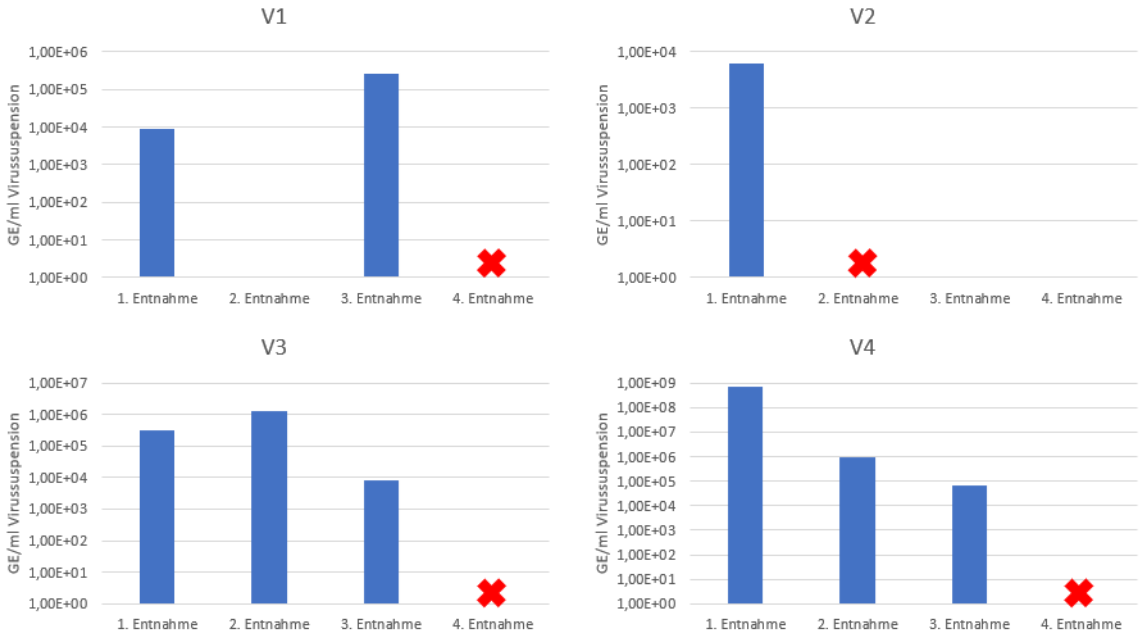


Abbildung 10: Verlauf der Viruslast der Bienenproben in den beprobten Völkern in logarithmischer Darstellung – Volk 1 bis 4; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes

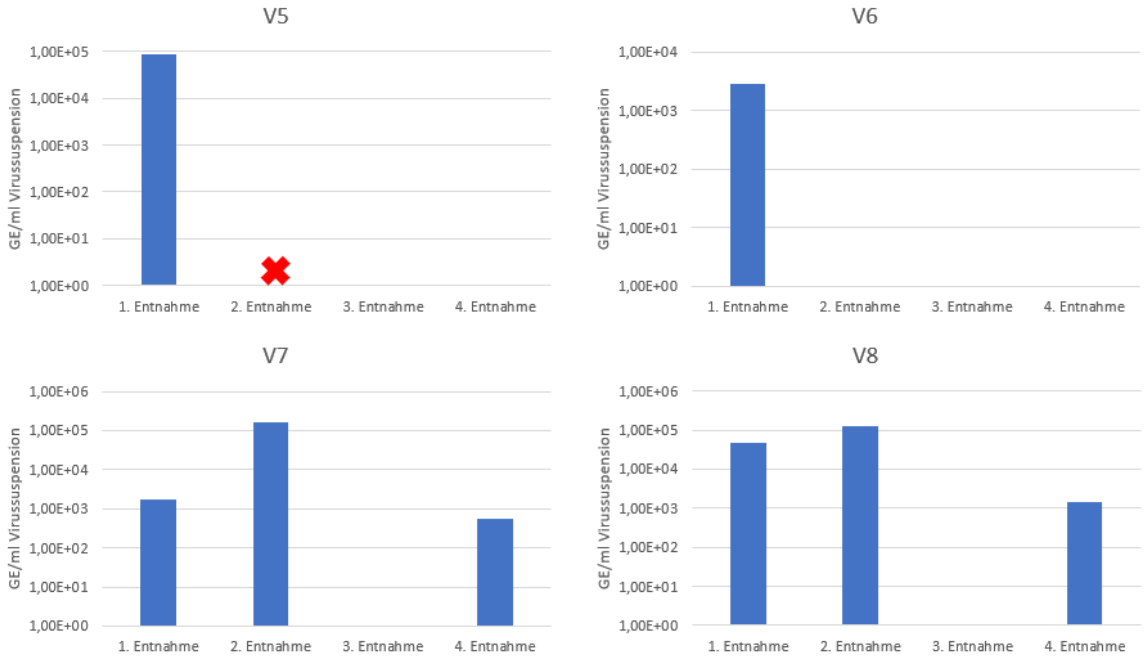


Abbildung 11: Verlauf der Viruslast der Bienenproben in den beprobten Völkern in logarithmischer Darstellung - Volk 5 bis 8; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes; Volk 6 stellt sich hier virusnegativ dar

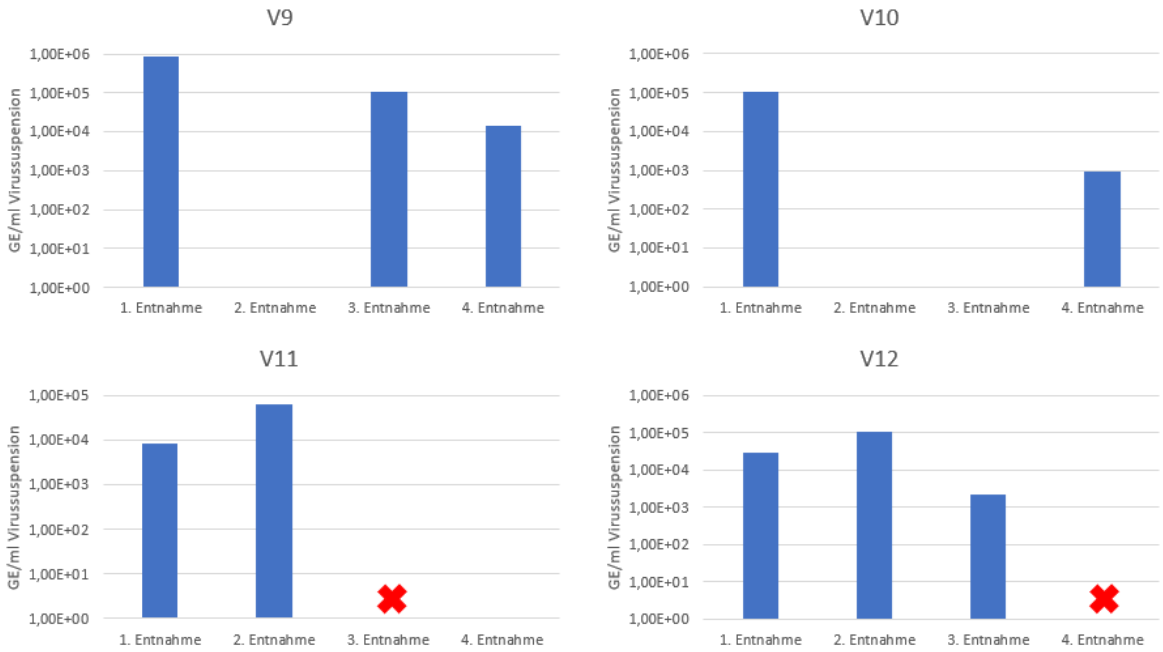


Abbildung 12: Verlauf der Viruslast der Bienenproben in den beprobten Völkern in logarithmischer Darstellung - Volk 9 bis 12; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes

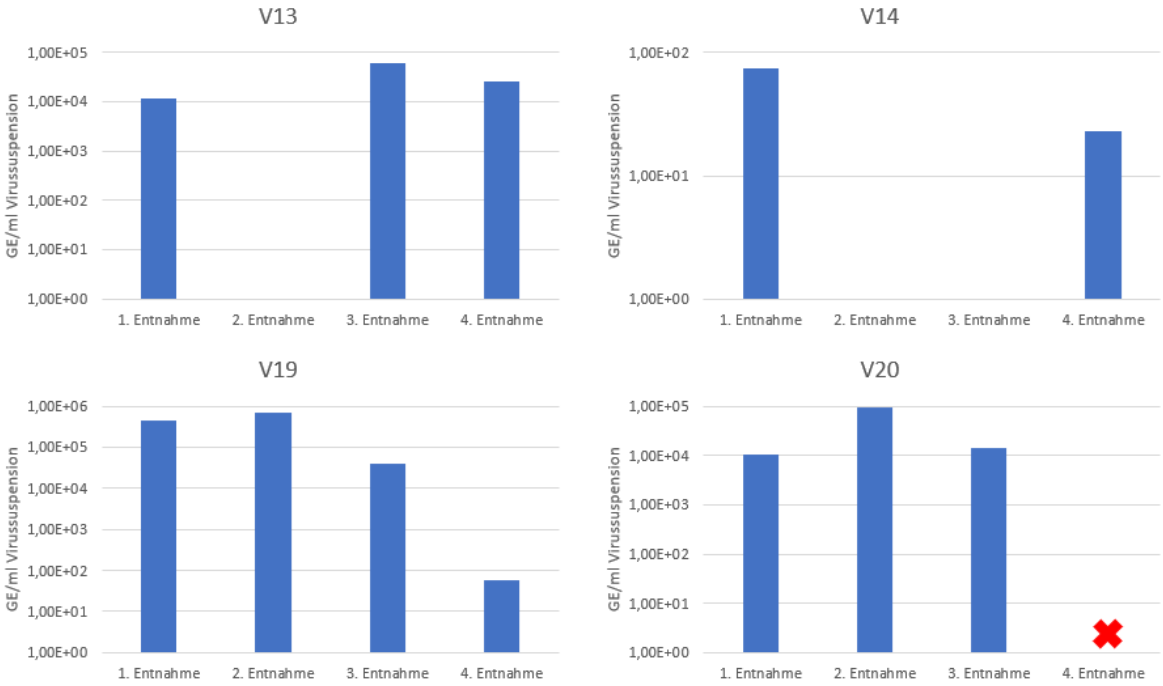


Abbildung 13: Verlauf der Viruslast der Bienenproben in den beprobten Völkern in logarithmischer Darstellung - *Volk 13, 14, 19, 20;* das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes

Zu Beginn des Versuches gab es 16 Völker. Zum Zeitpunkt der zweiten Probennahme waren Volk 2 und Volk 5 durch die hohe Viruslast und vermutlich durch schlechtes Wetter zusammengebrochen. Volk 11 brach unter ähnlichen Umständen kurz vor der dritten Probennahme zusammen. Die Völker 1, 2, 4, 12 und 20 brachen vor der vierten Probennahme – der Schlussrevision – zusammen. Der Zusammenbruch zeigte sich durch Weisellosigkeit, Verminderung der Anzahl an Bienen und das Fehlen von Weiselzellen. Da die Futtervorräte ebenfalls knapp waren, wurden die schwachen Völker abgeschwefelt. Bei der dritten Entnahme testeten die Völker 6,7,8,10 und 14 virusnegativ. Da Volk 6,10 und 14 außerdem zur Kontrollgruppe gehörten und bei der zweiten Probennahme nicht getestet wurden, sieht man hier eine virusnegative Periode. Das einzige dieser Völker, welches bei der Schlussrevision jedoch immer noch virusnegativ war, ist Volk 6.

4.6. Sequenzierung

Aus den zwei Völkern (V9 und V19), die bei der ersten Probennahme die schwerste Symptomatik zeigten, wurden spezielle Lebendproben entnommen. Hierbei wurden für die Lebendproben 20 Bienen mit typischer CBPV-Symptomatik pro Volk gesammelt. Für diese Proben ergab sich im Rahmen der RT-qPCR Untersuchung ein Wert von 2,24E+10/ml für Volk 9 und ein Wert von 4,86E+10/ml für Volk 19. Aus diesen Proben mit hoher Viruslast wurde das Gesamtgenom – RNA1 und RNA2 – von CBPV amplifiziert und sequenziert. Die sequenzierten Teilstücke wurden mithilfe der Website https://www.benchling.com zusammengefügt und die daraus resultierende vollständige Sequenz wurde in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) über das Tool „BLAST“ (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) mit bereits existierenden Sequenzen von CBPV verglichen. Die Unterschiede in den Gensequenzen sind in Abb. 14 mit roten Strichen markiert. In Abb. 14 sieht man mit A markiert, eine in Österreich isolierte CBPV-Gensequenz CBPV-Stamm AUT-17, NCBI Genbank Nr.: MK637523.1 – welche an der Veterinärmedizinischen Universität Wien sequenziert wurde, während B die in Slowenien isolierte CBPV-Gensequenz CBPV-Stamm SVN-20, NCIB Genbank Nr.: ON648750.1 zeigt. Die Übereinstimmung mit der österreichischen CBPV-Sequenz beträgt 98,45% und die Übereinstimmung mit der slowenischen CBPV-Sequenz beträgt 98,05%.

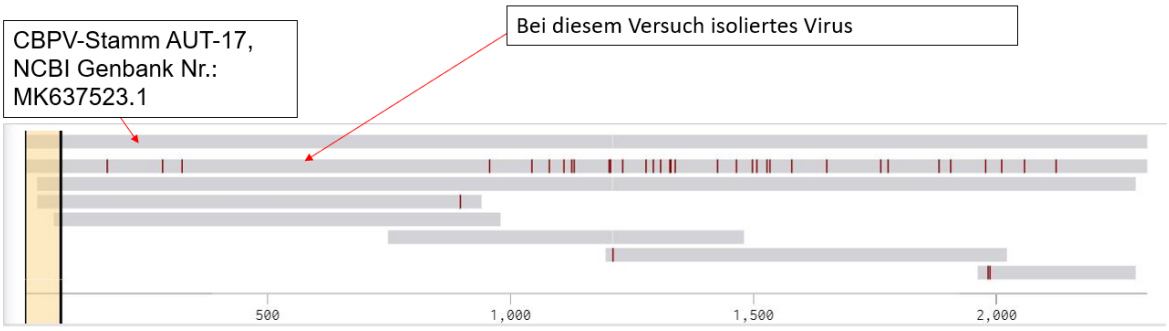


Abbildung 14: Benchling - Darstellung der Gensequenz der RNA 2 von CBPV im Vergleich zu der Kontrollsequenz CBPV-Stamm AUT-17, NCBI Genbank Nr.: MK637523.1; die roten Linien stellen die Unterschiede in der Sequenz dar

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all *62 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

	Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Chronic bee paralysis virus isolate AUT-17 segment RNA2, complete sequence	A	Chronic bee par…	3978	3978	100%	0.0	98.45%	2308	MK637523.1
☑	Chronic bee paralysis virus isolate CBPV RNA2 376/2020, complete sequence	B	Chronic bee par…	3927	3927	99%	0.0	98.05%	2272	ON648750.1
☑	Chronic bee paralysis virus segment RNA2, complete sequence		Chronic bee par…	3897	3897	100%	0.0	97.79%	2305	KY937972.1
☑	Chronic bee paralysis virus isolate CBPV RNA2 341/2019, complete sequence		Chronic bee par…	3877	3877	99%	0.0	97.65%	2272	ON648752.1
☑	Chronic bee paralysis virus isolate B-441 segment RNA 2, partial sequence		Chronic bee par…	3166	3166	100%	0.0	91.95%	2300	EU122232.2

Abbildung 15: BLAST - Einträge in der Gendatenbank, die am meisten Gemeinsamkeiten mit der isolierten Gensequenz aufweisen

Des Weiteren wurden bei der Sequenz der Proben von Volk 19, die ORFs auf RNA 2 bestimmt. Diese ORFs waren daher von Interesse, da es jene sind, welche die Strukturproteine von CBPV exprimieren (15, 32). Hier zeigte sich kein Unterschied der ORFs der im Versuch entnommenen Proben, zu denen von AUT-17.

5. Diskussion

Im Rahmen dieses Feldversuches wurden mehrere Punkte untersucht, nämlich den Einfluss der Probennahme auf die Diagnostik, sowie ein Behandlungskonzept, welches im selben Rahmen vergleichend untersucht wurde.

5.1. Vergleichbarkeit der Probennahme

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Arten der Probennahme miteinander zu vergleichen und infolge dessen zu etablieren, ob sich Tupferproben als aussagekräftige Alternative zu Bienenproben im Rahmen der CBPV-Diagnostik erweisen. Hierbei weisen die Resultate dieses Versuches auf vergleichbare Ergebnisse hin. Üblicherweise wird die Viruslast in Genomequivalenten (GE) pro Biene angegeben, das ist aber nur bei Bienenproben plausibel und Tupferproben nicht anzuwenden. Daher wurde das Probenvolumen von 1ml als Bezugsgröße genommen. So wiesen Bienenproben, Fluglochtupfer und Wabentupfer eine lineare Korrelation auf. Weiters zeigte sich im T-Test ein nicht-signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen der verschiedenen Probenarten, was stark auf eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse hinweist. Es ist zudem zu bemerken, dass der Fluglochtupfer von den drei getesteten Arten der CBPV-Diagnostik, die geringste Standardabweichung aufwies. Es folgt daraus, dass der Fluglochtupfer nicht nur vergleichbare Ergebnisse mit den Bienenproben aufweist, sondern zusätzlich auch weniger Stress für das Bienenvolk bedeutet. Jedes Öffnen der Beute und das Herausnehmen der Rähmchen und Waben führt zu einer Störung des Volkes und des Mikroklimas. Das Mikroklima im Volk ist für die Bienen sehr wichtig. Manche der ältesten Aufzeichnungen über das Mikroklima in Bienenstöcken reichen in das frühe 19. Jahrhundert zurück. So gab es 1806 eine Publikation, die aussagt, dass das optimale Klima zum Schlüpfen der Bienenlarven 35-36 Grad Celsius beträgt (61). Das Öffnen eines Bienenvolkes stört sowohl die Temperatur als auch die Luftfeuchtigkeit im Bienenstock (62). Durch die Probennahme mittels steriler Tupfer am Flugloch, erspart man sich das Öffnen des Volkes und stört somit weder die Bienen, noch ihr internes Klima. Zusätzlich ist das Risiko die Königin zu verletzen oder gar zu verlieren bei den Fluglochtupfern non-existent. Weiterhin ist auch für die Person, welche die Proben entnimmt, der Gesamtaufwand wesentlich geringer.

5.2. Verlauf

Trotz der relativen Nähe der Beutenstände war die Viruslast in den verschiedenen Völkern sehr unterschiedlich. So gab es Völker, deren Viruslast konstant hoch war, aber auch Völker die nach einem virusnegativen Ergebnis wieder positiv wurden. Es zeigte sich, dass mit der

Ausnahme von V3 und V12 die Völker vor ihrem Zusammenbruch eine Viruslast >1E+4 GE/ml Virussuspension aufwiesen. Jedoch gab es Völker, welche eine Viruslast >1E+4 GE/ml Virussuspension aufwiesen, der Viruslast aber besser standhielten und nicht zusammenbrachen. V9 und V19 stellten sich zu Beginn des Versuches als am stärksten betroffene Völker dar, beide Völker überlebten jedoch den Winter und waren zur Zeit der Schlussrevision im Frühjahr noch immer CBPV positiv. V6 war das einzige Volk welches zur Schlussrevision sowohl bei den Tupferproben, als auch bei den Bienenproben virusnegativ getestet wurde. Die restlichen überlebenden Völker wurden alle positiv getestet. Es bleibt hierbei ungeklärt, wie häufig sich die Bienenvölker gegenseitig reinfizierten.

Die Varroazählungen ergaben jeweils Werte in Bereichen zwischen 2 und 30 Milben pro Volk. Hier waren Volk 12 und Volk 20 mit jeweils 30 Milben pro Volk am stärksten betroffen. Es waren keine Zusammenhänge zwischen dem Zusammenbruch des Volkes und der Stärke des Varroabefalls erkennbar. So waren Volk 2 und Volk 5, welche als erstes zusammenbrachen, vergleichsweise schwach mit Varroa infiziert. Denn bei beiden Zählungen wurden <10 Milben pro Volk gefunden, während in anderen Völkern, welche später zusammenbrachen, die Anzahl der Milben im Bereich 10-30 Milben pro Volk lag. Es lässt sich nicht ausschließen, dass der Untergang der Völker durch andere Erkrankungen wie zum Beispiel Nosema, DWV oder SBV beeinflusst wurde. Jedoch konnten bei den Untersuchungen der Völker keine deformierte Brut festgestellt werden. Für weitere Versuche empfiehlt sich jedoch das Testen auf mehrere Erkrankungen mittels PCR.

5.3. Lebendproben versus Totproben

Im Rahmen dieser Tests wurde bestätigt, dass die Viruslast in den durch Abschwefeln getöteten Bienen signifikant höher war, als in den lebend entnommenen Proben. Das lässt sich darauf zurückzuführen, dass CBPV vorwiegend adulte Bienen befällt (15). Dies spiegelt sich in der Hypothese wider, dass durch ein Fluglingsverfahren die Viruslast zu reduzieren sei und somit das restliche Volk in seiner Heilung unterstützt wird. Es zeigte sich hier, dass das Fluglingsverfahren in diesem Versuch die Heilung der Völker nicht förderte, denn die Bienenstöcke waren bei der Schlussrevision immer noch CBPV-positiv. Sowohl die Versuchs- als auch die Kontrollgruppe hatten Verluste über den Winter zu verbuchen. Es ließ sich keine signifikante Verbesserung in der Versuchsgruppe erkennen, was die Sinnhaftigkeit des aufwendigen Eingriffs durch Abschwefeln in Frage stellt.

5.4. Sequenzierung

Deutlich klarere Ergebnisse lieferte das dritte Ziel dieser Arbeit – die Sequenzierung von CBPV und die Ermittlung der Herkunft der Infektion der Bienenvölker. Das Virus wurde hierbei erfolgreich als CBPV sequenziert und identifiziert. Das Genom der RNA1, welches wir sequenzieren konnten, war hier 3463bp, dies ist Vergleichbar mit den 3674bg von Olivier et al. 2008. Die Unterschiede lassen sich durch das Benutzen unterschiedlicher Primer erklären. Bei RNA2 zeigte sich in diesem Versuch eine Länge von 2309bp, welche ebenfalls mit den 2305bp von Olivier et al. 2008 vergleichbar sind (32). Die größte Ähnlichkeit der sequenzierten Proben bestand zu einem slowenischen Isolat von 2020 (98,45%), gefolgt von einem österreichischen Isolat von 2017 (98,05%) (Abb.11). Dies legt nahe, dass das für den beschriebenen Ausbruch verantwortliche CBPV-Isolat ebenfalls aus diesen Regionen stammt. Zusätzlich zur Sequenzierung von CBPV wurden hier die ORFs der RNA2 bestimmt, welche die Strukturproteine kodieren. Auch hier gibt es eine Übereinstimmung mit den ORFs, die von Olivier et al 2008 bestimmt wurden (32).

5.5. Ausblick

Erhebliche Völkerverluste durch die Infektion mit CBPV sind zunehmend zu beobachten, wobei die Begleitumstände häufig unklar bleiben. Im Feld findet man CBPV positive Völker die keine klinischen Krankheitssymptome aufweisen, was nahelegt, dass CBPV kein obligates Pathogen, sondern eine Faktorenkrankheit ist, die erst in Zusammenhang mit anderen Noxen eine Schadwirkung auslöst. Wie in dieser Studie gezeigt, reicht es daher nicht aus, z.B. durch einfache Reduktion der Viruslast - durch das Entfernen der Flugbienen - das Volk zu sanieren. Das impliziert, dass die „Heilung“ eines Volks stets auch die anderen Faktoren beachten muss. Neben äußeren Faktoren wie Standort (Lichtverhältnisse, Wind, Kälte) sind vor allem andere Virusinfektionen und die ubiquitäre Varroamilbe zu berücksichtigen, die als schädigende Faktoren CBPV Vorschub leisten können. Einen starken Einfluss hat sicher die Genetik des Bienenvolks, insbesondere der Königin. Da Bienen keine adaptive Immunität besitzen, wird die Resilienz gegenüber Pathogenen über die Königin bzw. die Drohnen genetisch bestimmt. Dies könnte erklären warum neben stark betroffenen Völkern auch gesunde existieren, die durch Verflug infektiöser Flugbienen angesteckt werden müssten. Zukünftige Forschung ist notwendig um diese komplizierte Wirts-Pathogen Interaktion zu klären und die Bienengesundheit zu steigern.

6. Literaturverzeichnis

1. Hung K-LJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. Proc Biol Sci 2018; 285(1870).

2. Gasim SM, Abdelmula AA. Impact of Bee Pollination on Yield of Faba Bean (Vicia faba L.) Grown under Semi-Arid Conditions. AS 2018; 09(06):729–40.

3. Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecological Economics 2009; 68(3):810–21. Available from: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0921800908002942.

4. Leonhardt SD, Gallai N, Garibaldi LA, Kuhlmann M, Klein A-M. Economic gain, stability of pollination and bee diversity decrease from southern to northern Europe. Basic and Applied Ecology 2013; 14(6):461–71. Available from: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1439179113000911.

5. van Engelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. PLoS ONE 2008; 3(12):e4071.

6. Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Zambrana-Torrelio CM, Mendiola L, Daszak P. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. Ecohealth 2013; 10(4):434–45.

7. European Parliament. Resolution of November 2008 on the situation in the beekeeping sector, P6_TA(2008)0567. Available from: URL: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-6-2008-0567_EN.html.

8. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol 2010; 25(6):345–53.

9. Aizen MA, Harder LD. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. Curr Biol 2009; 19(11):915–8.

10. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft. Rund 456.000 Bienenvölker in Österreich: 9 Bienenstöcke am Dach des Landwirtschaftsministeriums: Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft; 2024. Available from: URL:

https://info.bml.gv.at/themen/landwirtschaft/landwirtschaft-in-oesterreich/tierische-produktion/bienen/bienenvoelkerinoesterreich.html.

11. Federal Statistical Office. Bee colonies: Worldwide population on the rise; 2023 [cited 2024 Jul 18]. Available from: URL: https://www.destatis.de/EN/Themes/Countries-Regions/International-Statistics/Data-Topic/AgricultureForestryFisheries/Bees.html.

12. Brutscher LM, McMenamin AJ, Flenniken ML. The Buzz about Honey Bee Viruses. PLoS Pathog 2016; 12(8):e1005757.

13. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. TWO VIRUSES FROM ADULT HONEY BEES (APIS MELLIFERA LINNAEUS). Virology 1963; 21(3):390–5.

14. Ribière M, Ball B, Aubert M. Natural history and geographical distribution of honey bee viruses; 2008. Available from: URL: https://edepot.wur.nl/1862#page=17.

15. Ribière M, Olivier V, Blanchard P. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? Journal of Invertebrate Pathology 2010; 103 Suppl 1:S120-31.

16. Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon J-P et al. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. Virus Research 2008; 133(2):280–4.

17. Fries I. Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). Journal of Invertebrate Pathology 2010; 103 Suppl 1:S73-9.

18. Hges M, Martín-Hernández R, Meana A. Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 2010; 41(3):375–92.

19. Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees. Vet Parasitol 2010; 170(3-4):212–7.

20. Dittes J, Schäfer MO, Aupperle-Lellbach H, Mülling CKW, Emmerich IU. Overt Infection with Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) in Two Honey Bee Colonies. Veterinary Sciences 2020; 7(3):142. Available from: URL: https://www.mdpi.com/2306-7381/7/3/142.

21. Panjad P, Yongsawas R, Sinpoo C, Pakwan C, Subta P, Krongdang S et al. Impact of Nosema Disease and American Foulbrood on Gut Bacterial Communities of Honeybees Apis mellifera. Insects 2021; 12(6):525. Available from: URL: https://www.mdpi.com/2075-4450/12/6/525.

22. Zheng H-Q, Gong H-R, Huang S-K, Sohr A, Hu F-L, Chen YP. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens Nosema ceranae and Deformed wing virus. Veterinary Microbiology 2015; 177(1-2):1–6. Available from: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s0378113515000589.

23. Miranda JR de, Genersch E. Deformed wing virus. Journal of Invertebrate Pathology 2010; 103 Suppl 1:S48-61.

24. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. SACBROOD VIRUS OF THE LARVAL HONEY BEE (APIS MELLIFERA LINNAEUS). Virology 1964; 23(3):425–9.

25. Wei R, Cao L, Feng Y, Chen Y, Chen G, Zheng H. Sacbrood Virus: A Growing Threat to Honeybees and Wild Pollinators. Viruses 2022; 14(9).

26. Choe S-E, Nguyen TT-D, Hyun B-H, Noh J-H, Lee H-S, Lee C-H et al. Genetic and phylogenetic analysis of South Korean sacbrood virus isolates from infected honey bees (Apis cerana). Veterinary Microbiology 2012; 157(1-2):32–40.

27. Ellis JD, Munn PA. The worldwide health status of honey bees. Bee World 2005; 86(4):88–101.

28. Hitchcock JD. Transmission of Sacbrood Disease to Individual Honey Bee Larvae1. Journal of Economic Entomology 1966; 59(5):1154–6.

29. Chanpanitkitchote P, Chen Y, Evans JD, Li W, Li J, Hamilton M et al. Acute bee paralysis virus occurs in the Asian honey bee Apis cerana and parasitic mite Tropilaelaps mercedesae. Journal of Invertebrate Pathology 2018; 151:131–6. Available from: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201117301969.

30. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford) 2020; 2020.

31. Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. The purification and properties of chornic bee-paralysis virus. J Gen Virol 1968; 2(2):251–60.

32. Olivier V, Blanchard P, Chaouch S, Lallemand P, Schurr F, Celle O et al. Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus. Virus Research 2008; 132(1-2):59–68.

33. Chevin A, Schurr F, Blanchard P, Thiéry R, Ribière M. Experimental infection of the honeybee (Apis mellifera L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. Virus Research 2012; 167(2):173–8.

34. Chevin A, Coutard B, Blanchard P, Dabert-Gay A-S, Ribière-Chabert M, Thiéry R. Characterisation of Structural Proteins from Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) Using Mass Spectrometry. Viruses 2015; 7(6):3329–44.

35. Sieber P, Platzer M, Schuster S. The Definition of Open Reading Frame Revisited. Trends Genet 2018; 34(3):167–70.

36. Bailey L, Ball BV, editors. Honey bee pathology. 2. edition. London: Academic Press; 1991.

37. Rinderer and Rothenbuhler, 1975) - Google Search [cited 2023 Oct 14]. Available from: URL: https://www.google.com/search?q=Rinderer+and+Rothenbuhler%2C+1975)&oq=Rinderer+and+Rothenbuhler%2C+1975)&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzIyMGowajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-8.

38. Bailey L, Ball BV, Perry JN. Honeybee Paralysis: Its Natural Spread and its Diminished Incidence in England and Wales. Journal of Apicultural Research 1983; 22(3):191–5.

39. Blanchard P, Ribière M, Celle O, Lallemand P, Schurr F, Olivier V et al. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. Journal of Virological Methods 2007; 141(1):7–13.

40. Bailey L, Milne RG. The Multiplication Regions and Interaction of Acute and Chronic Bee-paralysis Viruses in Adult Honey Bees. Journal of General Virology 1969; 4(1):9–14.

41. Amiri E, Meixner M, Büchler R, Kryger P. Chronic bee paralysis virus in honeybee queens: evaluating susceptibility and infection routes. Viruses 2014; 6(3):1188–201.

42. Chen YP, Siede R. Honey bee viruses: Elsevier. Adv Virus Res; 2007. (Advances in Virus Research; vol 70).

43. Seitz K, Buczolich K, Dikunová A, Plevka P, Power K, Rümenapf T et al. A molecular clone of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) causes mortality in honey bee pupae (Apis mellifera). Sci Rep 2019; 9(1):16274. Available from: URL: https://www.nature.com/articles/s41598-019-52822-1.

44. Allen M, Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World 1996; 77(3):141–62.

45. Kulincevic JM, Rothenbuhler WC. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. Journal of Invertebrate Pathology 1975; 25(3):289–95.

46. Ribière M, Lallemand P, Iscache A-L, Schurr F, Celle O, Blanchard P et al. Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (Apis mellifera L.) feces. Applied and Environmental Microbiology 2007; 73(23):7711–6.

47. Bailey L. The incidence of virus diseases in the honey bee. Ann Appl Biol 1967; 60(1):43–8.

48. Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honeybee viruses in Uruguay. Journal of Invertebrate Pathology 2006; 93(1):67–70. Available from: URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/s002220110600108x.

49. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME et al. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. Applied and Environmental Microbiology 2004; 70(12):7185–91.

50. D'Alvise P, Seeburger V, Gihring K, Kieboom M, Hasselmann M. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. Ecol Evol 2019; 9(18):10241–52.

51. Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. Applied and Environmental Microbiology 2006; 72(4):2414–20.

52. Budge GE, Simcock NK, Holder PJ, Shirley MDF, Brown MA, van Weymers PSM et al. Chronic bee paralysis as a serious emerging threat to honey bees. Nature Communications 2020; 11(1):2164.

53. Porrini C, Mutinelli F, Bortolotti L, Granato A, Laurenson L, Roberts K et al. The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network. PLoS ONE 2016; 11(5):e0155411. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4868308/.

54. Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G et al. Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. Apidologie 2016; 47(3):325–47.

55. Li B, Deng S, Yang D, Hou C, Diao Q. Complete sequences of the RNA 1 and RNA 2 segments of chronic bee paralysis virus strain CBPV-BJ detected in China. Arch Virol 2017; 162(8):2451–6.

56. Dittes J, Schierling A, Aupperle-Lellbach H, Grassinger JM, Mülling CKW, Emmerich IU. Chronische-Bienenparalyse-Virus – quo vadis? Auftreten in Bayern und Betrachtung von Therapiemaßnahmen. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2021; 49(5):326–35.

57. Jansohn M, Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; Imprint: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.

58. Thiemann F, Cullen PM, Klein H-G. Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. 2. Auflage. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co; 2015.

59. Rumsey DJ. Statistics for dummies. Second edition. Hoboken, NJ: For Dummies; 2016. (U can). Available from: URL: https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=5211623.

60. Bortz J. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler: Mit 242 Tabellen. 6., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2005. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=1156268.

61. Huber F. New Observations on the Natural History of Bees. W. & C. Tait, and Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown, London; 1821.

62. Gil-Lebrero S, Navas González FJ, Gámiz López V, Quiles Latorre FJ, Flores Serrano JM. Regulation of Microclimatic Conditions inside Native Beehives and Its Relationship with Climate in Southern Spain. Sustainability 2020; 12(16):6431.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl Bienenvölker in Österreich im Zeitraum 2000-2021, Daten: Bienen Österreich 2

Abbildung 2: Anzahl BienenhalterInnen in Österreich im Zeitraum 2000-2021, Daten: Bienen Österreich 2

Abbildung 3: Aufstellung der Bienenvölker am betroffenen Bienenstand 9

Abbildung 4: Varroatasse, Quelle: https://www.wachs-hoedl.com/Varroatasse-Unterteil-Kunststoffwanne 11

Abbildung 5:Viruslast in GE/ml Virussuspension der 3 getesteten Varianten der Probentnahme pro Volk vom 21.07.2022 21

Abbildung 6: Vergleich der Viruslast der Lebendproben versus abgeschwefelte Bienenproben 24

Abbildung 7: Dritte Probennahme, Viruslast der GE/ml Virussuspension von zwei Probenarten in logarithmischer Darstellung; die virusnegativen Völker wurden der Vollständigkeit in die Grafik eingefügt, V2 und V5 waren zu diesem Zeitpunkt bereits zusammengebrochen. V6, V7, V8, V10, V11 und V14 zeigten sich virusnegativ. 26

Abbildung 8: Vierte Probennahme/Schlussrevision: Viruslast von zwei Probenarten in GE/ml Virussuspension; Volk 6 wurde als einziges als virusnegatives Volk getestet 28

Abbildung 9: Darstellung der Viruslast der Bienenproben pro Volk pro Probennahme; Grün: erste Probennahme, Rot: zweite Probennahme, Gelb: dritte Probennahme, Violett: vierte Probennahme; Die Völker 2 & 5 sind zwischen zweiter und dritter Probennahme zusammengebrochen, bei der Schlussrevision lebten noch Volk 6-10, 13, 14 und 19 – wobei sich Volk 6 virusnegativ darstellte. 29

Abbildung 10: Verlauf der Völker pro Probennahme einzeln in logarithmischer Darstellung – Volk 1 bis 4; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes..... 30

Abbildung 11: Verlauf der Völker pro Probennahme einzeln in logarithmischer Darstellung - Volk 5 bis 8; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes; Volk 6 stellt sich hier virusnegativ dar 30

Abbildung 12: Verlauf der Völker pro Probennahme einzeln in logarithmischer Darstellung - Volk 9 bis 12; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes..... 31

Abbildung 13: Verlauf der Völker pro Probennahme einzeln in logarithmischer Darstellung - Volk 13, 14, 19, 20; das Rote X markiert den Zeitpunkt des Zusammenbruchs des Volkes . 31

Abbildung 14: Benchling - Darstellung der Gensequenz der RNA 2 von CBPV im Vergleich zu der Kontrollsequenz CBPV-Stamm AUT-17, NCBI Genbank Nr.: MK637523.1; die roten Linien stellen die Unterschiede in der Sequenz dar 33

Abbildung 15: BLAST - Einträge in der Gendatenbank, die am meisten Gemeinsamkeiten mit der isolierten Gensequenz aufweisen 33

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenaufteilung der Bienenvölker 10

Tabelle 2: Zeitplan des Versuches in Tabellenform 13

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für den Virusnachweis 15

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung 15

Tabelle 5: Erste Kontrolle der Völker, es wurden Größe, Stärke und Totenfall notiert 20

Tabelle 6: Korrelationskoeffizienten der ersten Probennahme, n=16 21

Tabelle 7: Mittelwert der Völker, der ersten Probennahme, n=16 21

Tabelle 8: Median der Völker erste Probennahme, n=16 22

Tabelle 9: Standardabweichung ersten Probennahmen, n=16 22

Tabelle 10: Konfidenzintervalle der ersten Probennahme, n=16 22

Tabelle 11: t-Test erste Probennahme 23

Tabelle 12: Zweite Kontrolle: es wurden Volksstärke, Totenfall, Umweiseln, Brut und Futter kontrolliert 23

Tabelle 13: Mittelwert zweite Probennahme 24

Tabelle 14: Median zweite Probennahme 25

Tabelle 15: Standardabweichung zweite Probennahme 25

Tabelle 16: Dritte Kontrolle: es wurden Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter kontrolliert 25

Tabelle 17: Mittelwert dritte Probennahme, n=8 26

Tabelle 18: Median dritte Probennahme, n=8 27

Tabelle 19: Standardabweichung dritte Probennahme, n=8 27

Tabelle 20: Konfidenzintervall dritte Probennahme, n=8 27

Tabelle 21: Vierte Kontrolle: Es wurden Volksstärke, Totenfall, Brut und Futter Kontrolliert 27

9. Anhang

Danksagung

Danke an Alle, die mit großer Geduld geholfen haben, die Arbeit zu dem zu machen, was sie Heute ist. Für jene, die sich angesprochen fühlen, ein herzhaftes Mähh! Ansonsten ein Großes Danke für die Unterstützung.