

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Landwirtschaft, Ernährung
und Heimat

Projektträger



Bundesanstalt für
Landwirtschaft und Ernährung

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Teil I Kurzbericht

in der Fördermaßnahme

Förderung von Forschungsvorhaben
zum Schutz von Bienen und weiteren Bestäuberinsekten in der Agrarlandschaft

Modul A: Innovationsförderung des BMEL

Innovationsprojekt (Verbundprojekt) zur
vereinfachten Virusdiagnostik bei der Honigbiene:

LAFAS

Entwicklung eines *lateral flow assays* (LFA) für die simultane Detektion von vier
bienenpathogenen Viren

**Teilprojekt LIB: Rekombinante Herstellung von Virusproteinen, Bereitstellung
des Bienenmaterials, Testung des LFA**

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung,
Projektgruppe Innovationsförderung

BLE-Förderkennzeichen: 281C302A19

Projektkoordinator: Prof Dr. Elke Genersch
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V. (LIB)
Abt. für Mol. Mikrobiologie und Bienenkrankheiten
Friedrich-Engels-Str. 32
D – 16540 Hohen Neuendorf
Tel.: 03303 – 29 38 33; Fax: 03303 – 29 38 40
E-Mail: elke.genersch@rz.hu-berlin.de

Projektpartner: ASKA Biotech GmbH
Veltener Str. 12
16761 Hennigsdorf

beantragte Laufzeit des Vorhabens:	01.02.2021 bis 31.01.2024
Laufzeitverschiebung:	01.04.2021 bis 31.03.2024
Laufzeitverlängerung:	01.04.2024 bis 31.12.2024

I Kurzbericht

I.1 Aufgabenstellung und wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ziel des Innovationsprojektes war die Entwicklung eines *lateral flow assays* (LFA) zum simultanen Nachweis von vier bienenpathogenen Viren. Der immunologische Assay sollte für das Flügeldeformationsvirus (DWV), die Bienenparalyseviren ABPV (akute Bienenparalyse) und CBPV (chronische Bienenparalyse) und das Schwarze Königinnenzellen Virus (BQCV) entwickelt werden, da diese vier Viren in nationalen und internationalen Studien in den letzten Jahren in Zusammenhang mit erhöhten Völkerverlusten bei Honigbienen gefunden wurden und auch bei verschiedenen Wildbienen, vor allem Hummeln, als Pathogene nachgewiesen wurden [1-4]. Um sowohl die Honigbiene als auch die Wildbienen und weitere Bestäuberinsekten zu schützen, ist es daher unerlässlich, Strategien zu entwickeln, um der zunehmenden Bedrohung durch Virusinfektionen zu begegnen. Eine wesentliche Voraussetzung für die nachhaltige Lösung der komplexen Probleme mit der Bienengesundheit, ist die sichere und eindeutige Erkennung und Diagnostik infizierter Bienen und Bienenvölker. Hierfür haben sich in den letzten Jahrzehnten vor allem PCR oder RT-PCR-basierte Verfahren durchgesetzt. Die etablierten RT-PCR-Protokolle für den Einzel oder Sammel-Nachweis (MLPA, [5]) von Bienenviren sind i.d.R. sehr sensitiv, hochspezifisch und gut reproduzierbar. Allerdings existieren RNA-Viren, zu denen alle relevanten Bienenviren gehören, häufig als sogenannte Quasispezies, bilden also Mutantenwolken um sog. Mastersequenzen herum, da die an der Replikation der Viren beteiligten Enzyme keine proof-reading and repair-Funktion haben [6-8]. Mutationen in den für den RT-PCR-Nachweis gewählten Primerbereichen führen daher regelmäßig zu falsch negativen Ergebnissen beim RT-PCR-basierten Virusnachweis. Außerdem ist die molekulare Diagnostik mittels RT-PCR sehr arbeits- und kostenintensiv. Diese Probleme in der Virusdiagnostik könnten über einen hochsensitiven immunologischen Nachweis der Viren, bei dem konservierte Proteine als Antigene für die Antikörpergewinnung dienen, behoben werden. Immunologische Testsysteme zeichnen sich durch hohe Spezifität und Sensitivität aus und gewährleisten zudem eine schnelle und kostengünstige Detektion der viralen Erreger selbst bei hohem Probendurchsatz, wie er im Rahmen von Monitoringprogrammen oder beim Screening von großen (Berufs-) Imkereien anfallen kann.

I.2 Ablauf des Vorhabens und wesentliche Ergebnisse

Das Projekt begann nach kostenneutraler Verschiebung der ursprünglich geplanten Laufzeit (01.02.2021 bis 31.01.2024) am 01.04.2021 und endete nach bewilligter Verlängerung um 9 Monate am 31.12.2024. Trotz zeitlicher Verzögerungen im Projektablauf konnten fast alle inhaltlichen Ziele des Vorhabens erfolgreich erreicht werden. Es gab nur geringfügige Abweichungen. Es gelang bis zum Ende des Projektes nicht, geeignete Virussequenzen für CBPV zu identifizieren. Daher hatten wir, wie bereits im Antrag festgelegt, CBPV rechtzeitig durch das Sackbrutvirus (SBV) ersetzt. Für alle vier Viren wurde planmäßig mindestens ein rekombinantes Kapsidprotein (Antigen) hergestellt (DWV 2x, BQCV 1x, ABPV 1x und SBV 1x) und an den Projektpartner ASKA GmbH zur Antikörperherstellung übergeben. Bei der ASKA Biotech GmbH wurden die rekombinanten Kapsidproteine zur Immunisierung von Mäusen und anschließender Generierung von stabilen Hybridomzelllinien eingesetzt. Die ASKA GmbH konnte für alle vier Viren planmäßig jeweils zwei monoklonale Antikörper (DWV 2x, BQCV 2x, ABPV 2x und SBV 2x) herstellen, die anschließend von beiden Projektpartnern auf ihre Eignung für die Verwendung im LFA getestet wurden. Alle Antikörper erkannten ihr jeweils eigenes Antigen sehr gut, aber es gab deutliche Qualitätsunterschiede, wenn Realproben, wie infizierte Tiere oder Virusisolate für die Validierung verwendet wurden. Dies traf insbesondere für die SBV- und ABPV-Antikörper zu. Trotz wiederholter Optimierungsversuche gelang es bis zum Ende des Projektes nicht, für die Viren ABPV und SBV, geeignete LFAs herzustellen, da die Antikörper entweder keine Reaktion bei der Verwendung von Feldproben zeigten, oder nicht mehr zur Verfügung standen, da die Hybridomzellen ihre stabile Produktion unerwartet einstellten. Die Entwicklung der LFAs für DWV und BQCV war allerdings sehr erfolgreich. Für DWV konnte ein Antikörper validiert werden, der für den Schnelltest sowohl als Fänger als auch Detektor eingesetzt wird und bei BQCV konnte ein Antikörperpärchen verwendet werden. Beide LFAs wurden für die Anwendung in der Labordiagnostik (professional) optimiert und validiert. Die Spezifität lag für beide LFAs bei 100%. Die Sensitivität der LFAs lag je nach Test bei 64% bis 97%. Beide LFAs können vermarktet werden, wobei der BQCV-Test ein Alleinstellungsmerkmal aufweist und nach unserer Einschätzung das größere wirtschaftliche Potenzial besitzt.

Verwendete Fachliteratur

1. Genersch, E., et al., *The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies*. Apidologie, 2010. **41**: p. 332-352.
2. Fürst, M.A., et al., *Disease associations between honey bees and bumblebees as a threat to wild pollinators*. Nature, 2014. **506**: p. 364-366.
2. Genersch, E., et al., *Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities*. J. Invertebr. Pathol., 2006. **91**: p. 61-63.

3. Gisder, S. and E. Genersch, *Viruses of commercialized insect pollinators*. J. Invertebr. Pathol., 2017. **147**: p. 51-59.
5. De Smet, L., et al., *BeeDoctor, a versatile MLPA-based diagnostic tool for screening bee viruses*. PLoS ONE, 2012. **7**: p. e47953.
6. Domingo, E., *Quasispecies theory in virology*. J. Virol., 2002. **76**: p. 463-465.
7. Eigen, M., *Viral quasispecies*. Sci. Am., 1993. **269**: p. 42-49.
8. Holland, J.J., J.C. De la Torre, and D.A. Steinhauer, *RNA virus populations as quasispecies*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1992. **176**: p. 1-2

Teil II

Eingehende Darstellung

in der Fördermaßnahme

Förderung von Forschungsvorhaben
zum Schutz von Bienen und weiteren Bestäuberinsekten in der Agrarlandschaft

Modul A: Innovationsförderung des BMEL

Innovationsprojekt (Verbundprojekt) zur
vereinfachten Virusdiagnostik bei der Honigbiene:

LAFAS

Entwicklung eines *lateral flow assays* (LFA) für die simultane Detektion von vier
bienenpathogenen Viren

Teilprojekt LIB: Rekombinante Herstellung von Virusproteinen, Bereitstellung des Bienenmaterials, Testung des LFA

Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung,
Projektgruppe Innovationsförderung

BLE-Förderkennzeichen: 281C302A19

Projektkoordinator: Prof Dr. Elke Genersch
Länderinstitut für Bienenkunde Hohen Neuendorf e.V. (LIB)
Abt. für Mol. Mikrobiologie und Bienenkrankheiten
Friedrich-Engels-Str. 32
D – 16540 Hohen Neuendorf
Tel.: 03303 – 29 38 33; Fax: 03303 – 29 38 40
E-Mail: elke.genersch@rz.hu-berlin.de

Projektpartner: ASKA Biotech GmbH
Veltener Str. 12
16761 Hennigsdorf

beantragte Laufzeit des Vorhabens:	01.02.2021 bis 31.01.2024
Laufzeitverschiebung:	01.04.2021 bis 31.03.2024
Laufzeitverlängerung:	01.04.2024 bis 31.12.2024

II Eingehende Darstellung

II.1 Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten

Das Projekt LAFAS begann am 01.04.2021. Aufgrund von unvorhersehbaren Ereignissen wurde das Projekt um 9 Monate verlängert und somit wurde das Projektende auf den 31.12.2024 verlegt. Der realisierte zeitliche Ablauf des Projektes ist in Abbildung 1 dargestellt.

			ASKA Biotech	LIB	2021				2022				2023				2024			
					I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
AP1	Entwicklung innovativer Strategien zur Probenaufbereitung von Adultbienenmaterial	Entwicklung Lysepuffer, Röhrchen, Protokoll	X					M1.1												
		Bereitstellung des Bienenmaterials		X				M1.2												
AP2	Identifizierung geeigneter Antigene (1-2 pro Virus)	anhand der NCBI Sequenzdaten	X																	
		nach Sequenzierung von Feldisolaten	X					M2.1												
AP3	Herstellung der rekombinanten Antigene	Klonierung der bis zu 8 Gene	X						M3.1											
		Expression / Aufreinigung	X						M3.2											
AP4	Entwicklung monoklonaler Antikörper	Immunisierung, Zellfusion, Subklonierung, (Test-)Produktion	X						M4.1					M4.2						
AP5	Testung, Charakterisierung, Analyse und Auswahl geeigneter Biomoleküle	Testung etc. der Antikörper	X										M5.1	M5.2						
		Bereitstellung rekombinanter Antigene		X										M5.3				M5.4		
AP6	Entwicklung der Immunoassays zum Nachweis der Zielantigene	Entwicklung des LFA	X											M6.1			M6.2			M6.3
AP7	Prüfung der LFA-Prototypen	Sammeln der Feldproben		X																
		Experimentelle Infektion von Bienen		X																
		Testung, Optimierung, Validierung des LFA		X														M7.2		
		Optimierung nach Rückkopplung	X															M7.3		M7.4

Abbildung 1: Balkendiagramm zum realisierten Projektablauf. Durch die Bewilligung einer beantragten Projektverlängerung wurde das Projektende auf den 31.12.2024 verschoben. Die vom LIB bearbeiteten Teilprojekte „Rekombinante Herstellung von Virusproteinen, Bereitstellung des Bienenmaterials, Testung des LFA“, sind hellgrün dargestellt. Der bewilligte Verlängerungszeitraum ist hellblau hinterlegt.

Das Teilprojekt des LIB „Rekombinante Herstellung von Virusproteinen, Bereitstellung des Bienenmaterials, Testung des LFA“ war in insgesamt 5 Arbeitspakete aufgeteilt:

- Arbeitspaket 1: Bereitstellung von Bienenmaterial für die Entwicklung innovativer Strategien zur Probenaufbereitung
- Arbeitspaket 2: Identifizierung geeigneter Antigene (1-2 pro Virus)
- Arbeitspaket 3: Herstellung der rekombinanten Antigene
- Arbeitspaket 5: Testung, Charakterisierung, Analyse und Auswahl geeigneter Biomoleküle, Bereitstellung der rekombinant hergestellten Antigene
- Arbeitspaket 7: Sammeln von Feldproben und experimentelle Infektion von Bienen zur Testung, Validierung und Optimierung des LFA

Die wesentlichen Aufgaben des LIB waren zum einen die Identifizierung und Herstellung geeigneter Antigene. Dabei sollten die Antigene entweder über *in silico* Analysen von bereits veröffentlichten Virussequenzen oder durch Sequenzierungen von Feldisolaten identifiziert werden. Die rekombinante Herstellung der viralen Antigene sollte im *E. coli*-System erfolgen. Zum anderen gehörte zu den Aufgaben des LIB, Bienenmaterial (Feldproben) zu sammeln oder Bienen experimentell mit den vier Viren zu infizieren, damit ausreichend Material für die Testung, Validierung und Optimierung der LFA-Tests zur Verfügung stand. Trotz zeitlicher Verzögerungen im Projektablauf war das Projekt sehr erfolgreich. Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitspakete werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

Arbeitspaket 1: Bereitstellung von Bienenmaterial für die Entwicklung innovativer Strategien zur Probenaufbereitung

Das Arbeitspaket konnte planmäßig begonnen und abgeschlossen werden. Für die Entwicklung der innovativen Strategien zur Probenaufbereitung, wie z.B. Testung von Lysepuffern, Röhrchenvolumen oder Aufschlussmethode, sollten adulte Bienen verwendet werden. Diese Bienen wurden von Völkern abgesammelt, die zuvor mittels molekularbiologischer Nachweismethoden als DWV-, ABPV-, CBPV-, SBV- und BQCV-frei diagnostiziert worden waren. Insgesamt wurden etwa 400 adulte Bienen fristgerecht an den Projektpartner (damals 8sens.biognostic GmbH) übergeben. Der Meilenstein M1.2: „...infizierte und nicht infizierte Bienen wurden dem Projektpartner 8sens.biognostic GmbH zur Verfügung gestellt.“ wurde erreicht. Es gab keinen Unterschied zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung.

Arbeitspaket 2: Identifizierung geeigneter Antigene (1-2 pro Virus)

Das Arbeitspaket 2 wurde fristgerecht bearbeitet. Im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung wurde CBPV durch das Sackbrutvirus (SBV) ersetzt, da die Datenlage zu den Sequenzen der Kapsidproteine von CBPV nicht ausreichte, um geeignete Antigensequenzen für CBPV zu identifizieren. Allerdings hatten wir diese Strategie bereits im Antrag festgelegt, sodass es keine grundsätzliche inhaltliche Abweichung zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung gab.

Für die vier Viren DWV, SBV, BQCV und ABPV war bereits bekannt, welche Kapsidproteine (VP) in welcher Form auf der Virionoberfläche präsentiert werden (Abbildung 2).

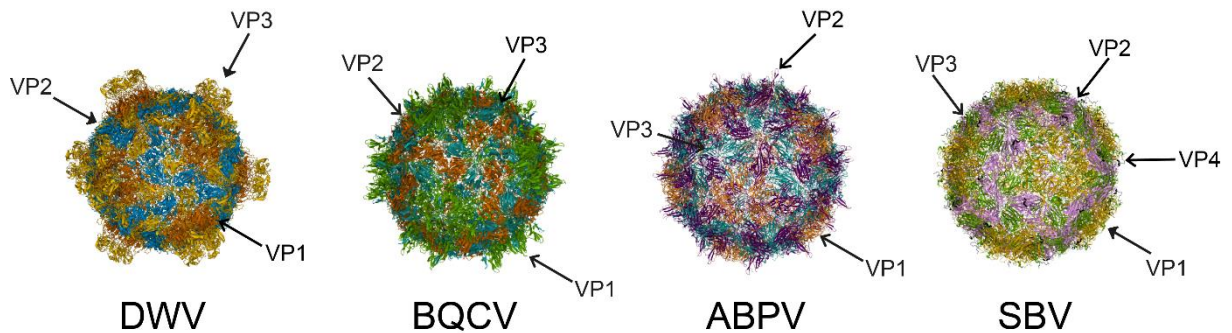


Abbildung 2: Struktur der Viruspartikel von DWV (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5MV6), BQCV (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5MQC), ABPV (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5LWG) und SBV (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/5LSF>). Farbkodierung bei DWV: VP1, braun; VP2, blau; VP3, gelb. Farbkodierung bei BQCV: VP1, grün, VP2, braun, VP3, blau. Farbkodierung bei ABPV: VP1, orange, VP2, lila, VP3, blau, Farbkodierung bei SBV: VP1, gelb, VP2, pink, VP3, grün, VP4, grau.

Für jedes der ausgewählten Kapsidproteine wurde ein Sequenzvergleich mit allen in der Gen-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) online verfügbaren Proteinsequenzen durchgeführt. Die ermittelten Proteinsequenzen haben wir über Strukturvorhersagen von Sequenzierungen regionaler Feldisolate abgesichert. Anschließend haben wir die Sequenzen (2 je Virus) ausgewählt, die am besten geeignet waren um virusspezifische Antigene herzustellen. Die entsprechenden Gene wurden im Juli 2021 bei der Firma Eurofinsgenomics (<https://eurofinsgenomics.eu/de/>) als StandardGene (DNA-Sequenzen) bestellt. Der Meilenstein M2.1: „...mindestens zwei Proteine/Proteinregionen je Virus sind über *in silico*-Analysen als geeignete Antigene für die Generierung monoklonaler Antikörper identifiziert.“, wurde fristgemäß erreicht.

Arbeitspaket 3: Herstellung und Bereitstellung der rekombinanten Antigene

Die Bearbeitung des Arbeitspaketes 3 erfolgte wie in der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung angegeben. Alle ausgewählten und von der Firma Eurofinsgenomics gelieferten Gensequenzen der Kapsidproteine wurden jeweils in einen Expressionsvektor kloniert. Somit konnte der Meilenstein 3.1: „...mindestens vier (je eins pro Virus) der als geeignet identifizierten Proteine/Proteinregionen sind in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert.“, erreicht werden. Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Vektoren aus den Bakterien isoliert und jeweils in einen Expressionsstamm transformiert. Alle ausgewählten Kapsidproteine wurden erfolgreich exprimiert. Nach der Expression wurden die Proteine jeweils über eine Affinitätschromatographie (Next Generation Chromatography-System (NGC), BioRad) aufgereinigt. Die am LIB erfolgreich exprimierten und aufgereinigten, rekombinanten viralen Kapsidproteine wurden an die ASKA Biotech GmbH übergeben. Der Meilenstein M3.2: „...mindestens vier (je eins pro Virus) Antigene sind aufgereinigt und in ausreichender Menge zur Generierung von monoklonalen Antikörpern an den Projektpartner ASKA Biotech GmbH übergeben worden.“, konnte

ebenfalls fristgerecht erreicht werden. Darüber hinaus wurden von jedem Antigen mehr als 2,0 mg am LIB eingelagert, um unmittelbar reagieren und die Antigene übergeben zu können, falls es zu Problemen mit einzelnen Antikörpern oder allgemein im Projektablauf kommen sollte.

Arbeitspaket 5: Testung, Charakterisierung, Analyse und Auswahl geeigneter Biomoleküle

Die hergestellten Antigene wurden über den gesamten Projektzeitraum bereitgestellt. Der Meilenstein 5.3: „Die für Testung, Charakterisierung, Analyse und Auswahl geeigneter Biomoleküle benötigten rekombinanten Antigene wurde durchgehend zur Verfügung gestellt.“, konnte somit fristgerecht erreicht werden. Beim Projektpartner ASKA Biotech GmbH wurden die zur Verfügung gestellten, rekombinanten Kapsidproteine zur Immunisierung von Mäusen und anschließenden Generierung von stabilen Hybridomzelllinien eingesetzt.

Die von den Zelllinien produzierten monoklonalen Antikörper (mAk) mussten anschließend auf ihre Spezifität und Sensitivität für das jeweilige Antigen getestet werden. In diese Testreihen, z.B. Immunoassays (ELISAs oder dip stick- / LF-assays), war auch das LIB im Rahmen des Arbeitspakets 5 eingebunden.

Die Spezifität der mAK haben wir im Dotblot-Verfahren getestet. Das Dotblotverfahren hat den Vorteil, dass native Proteine auf die Membran aufgebracht werden können. Die Ergebnisse der Dotblot-Testung aller acht mAk zeigen, dass die getesteten Antikörper ihr jeweiliges Antigen hoch sensitiv (bis zu 1 ng eingesetzte Antigenmenge) detektieren. Bei Verdünnung des Antigens in Bienenhomogenat sank die Sensitivität erwartungsgemäß, aber die jeweiligen Antigene konnten immer noch erfolgreich detektiert werden.

Der Meilenstein 5.4: „...Testung der generierten monoklonalen Antikörper ist abgeschlossen.“, konnte erfolgreich innerhalb der verlängerten Projektlaufzeit erfolgreich erreicht werden.

Arbeitspaket 7: Prüfung der LFA-Prototypen

Mit der Bearbeitung des Arbeitspakets AP7 (Prüfung der LFA-Prototypen) wurde am LIB planmäßig begonnen. Für die Prüfung der LFAs musste ausreichend Bienenmaterial (Feldproben, experimentell infizierte Bienen oder virusfreie Bienen) zur Verfügung stehen. Zur Identifizierung von Virus-positivem Adultbienenmaterial, wurden Bienenproben aus der Institutsimkerei des LIB und von Bienenvölkern, die am Deutschen Bienenmonitoring (DeBiMo) beteiligt sind, auf die vier Viren DWV, ABPV, BQCV und SBV untersucht. Virus-negative Proben, sowie Proben, die positiv für eines oder mehrere der Viren waren, wurden bei -20°C für die Langzeitlagerung eingefroren und bei Bedarf für die Validierung der LFAs aufgetaut. Um frisch infizierte Tiere zu generieren, wurden die Viren aus den Virus-positiven Feldisolaten angereichert und

in Virus-freie Bienen injiziert. Ein Teil der infizierten Tiere wurden dem Projektpartner ASKA Biotech GmbH übergeben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl experimentell infizierter Bienen und DWV-Viruspartikelsuspensionen, die an den Projektpartner ASKA Biotech GmbH übergeben wurden.

Virus	Anzahl infizierter Tiere
DWV	210
SBV	80
BQCV	180
ABPV	120

Außerdem wurden insgesamt 300 µl hochreiner DWV-Viruspartikelsuspension, sowie 60 Virus-freie, frisch geschlüpfte Arbeiterinnen (Grauchen) und 60 adulte Bienen übergeben. Somit stand ausreichend Bienenmaterial für die Testung, Optimierung und Validierung der LFAs zur Verfügung. Der Meilenstein M7.1: „...ausreichend Bienenmaterial (gesammelte und diagnostizierte Feldproben, experimentell infizierte Bienen) steht für die Testung, Optimierung und erste Validierung des LFA zur Verfügung.“, wurde fristgerecht erreicht.

Für die Viren SBV und ABPV konnte bis zum Projektende kein funktionierender LFA entwickelt werden. Die hergestellten Antikörper für SBV und ABPV zeigten zwar eine Reaktion mit ihrem jeweiligen Antigen (AP 5), allerdings funktionierten sie nicht mit Feldproben.

Für die Viren DWV und BQCV lagen die LFA-Prototypen allerdings bereits im zweiten Projektjahr vor. Die Testung dieser LFAs wurde überwiegend am LIB durchgeführt. Zuerst haben wir mit dem jeweiligen Antigen getestet, ob die Immunoassays grundsätzlich in der Lage sind, DWV oder BQCV nachzuweisen. Sowohl 10 µl Antigen (>10 µg) als auch 10 µl Viruspartikelsuspension wurden in 200 µl Probenpuffer gelöst und als Negativkontrolle wurden 200 µl Extraktionspuffer verwendet. Jeweils 100 µl der Suspensionen wurden auf die LFAs aufgetragen und nach 15 Minuten visuell ausgewertet. Nach Auftragen der Negativ-Kontrolle (Puffer) auf den Schnelltest war nur die Kontrollbande, aber keine Testbande sichtbar. Wurde das Antigen (Positiv-Kontrolle) aufgetragen, war die zweite Bande deutlich erkennbar. Auch experimentell infizierte Puppen zeigten ein positives Ergebnis im LFA. Die infizierten Bienen wurden einzeln mit 200 µl Extraktionspuffer und einer Metallkugel (Tungsten Carbid bead 3mm, Qiagen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben. Der Gewebeaufschluss erfolgte in einem Laborhomogenisator (Qiagen) für 2 min. bei 30 Hz. Aus dem Homogenat wurden 100 µl auf den LFA aufgetragen. Nach 15 Minuten war eine eindeutige Bande im LFA zu erkennen. Für eine objektive Auswertung der Banden wurde der Cube-Reader der Firma Biosynex verwendet, mit dem das Signal der Bandenstärke als Zahlenwert wiedergegeben werden kann (Abbildung 3).

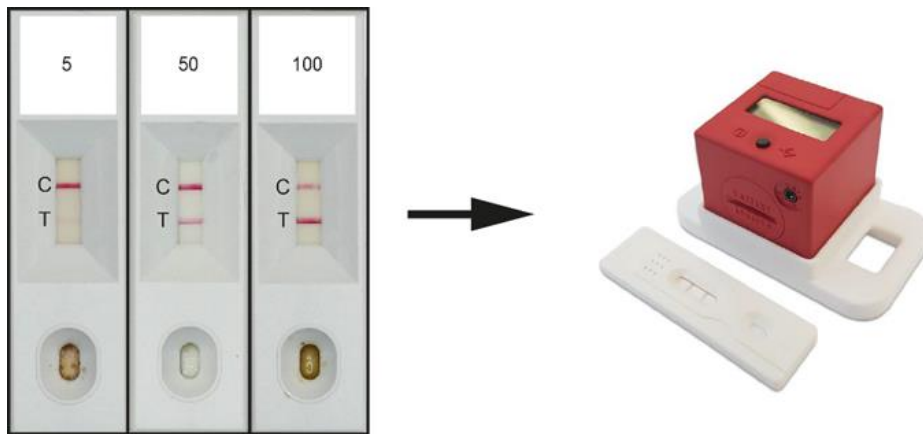


Abbildung 3: Quantifizierung der Bandenstärke mit Hilfe des Cube-Readers. Die Signalstärke der Bande wird mit Hilfe des Cube-Readers optisch quantifiziert und in arbiträren Einheiten angegeben. Beispielhaft sind LFAs mit Werten von 5, 50 und 100 arbiträren Einheiten dargestellt. Dadurch wird eine objektive Auswertung der Tests gewährleistet. Mit C ist jeweils die Kontrollbande und mit T die Bande für den virusspezifischen Nachweis gekennzeichnet.

Mit diesem Versuchsaufbau wurden anschließend, beginnend mit DWV, die beiden LFA Prototypen mit Feldisolaten geprüft. Es war geplant, die LFAs für den Eigenanwender (home use) und Laboranwender (professional) zu entwickeln. Dabei sollte der Eigenanwendertest möglichst einfach und kostengünstig sein. Für diese Methode wurden die Testtiere zusammen mit einem Extraktionspuffer in einen ZIP-Lock-Beutel gegeben. Anschließend wurde das Bienenmaterial mithilfe einer Glasflasche mechanisch zerkleinert und gut durchmischt, um eine gleichmäßige Probe (Homogenat) zu erhalten. Von dieser Mischung wurden dann 100 µl auf eine LFA-Testkassette aufgetragen. Bei der Durchführung zeigte sich jedoch ein unerwartetes Problem für die DWV-LFA: Auch die Proben von nicht infizierten Kontrolltieren lieferten ein positives Testergebnis im Schnelltest. Der Wert für die arbiträren Einheiten lag über der Nachweisgrenze von 1. Die Spezifität der Tests war also sehr gering. Dadurch erwies sich diese favorisierte Versuchsdurchführung für DWV als ungeeignet für die Eigenanwendung, da sie keine verlässliche Unterscheidung zwischen infizierten und gesunden Tieren ermöglichte. Dieses Problem konnte bis zum Ablauf der Regelbearbeitungszeit des Projektes nicht zufriedenstellend geklärt werden und soll im Projektnachgang gelöst werden.

Im Gegensatz dazu konnte die Methode für den Laboranwender sehr erfolgreich etabliert werden. Für die Methode „professional“ wurden die jeweiligen Proben (verkrüppelte Biene, oder Köpfe von 10 Versuchstieren) mit 200 µl Extraktionspuffer und einer 3mm Metallkugel in einem Laborhomogenisator bei 30Hz für 2 min. homogenisiert. Von dem Überstand wurden 100 µl auf den LFA gegeben. Von 30 verkrüppelten Bienen wurden 29 im LFA als DWV-positiv erkannt, d.h. die Sensitivität des DWV-LFA für verkrüppelte Bienen liegt bei 96,7% (

Abbildung 4). Es wurden auch 30 in der RT-PCR DWV-positive Poolproben aus 10 Köpfen von symptomlosen Bienen getestet; hier lag die Sensitivität des LFA bei 64%. Alle DWV-negativen Proben wurden als DWV-negativ erkannt, damit liegt die Spezifität des DWV-LFA bei 100%.

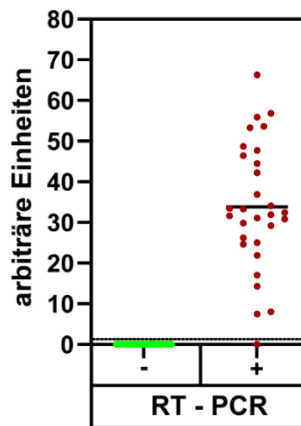


Abbildung 4: Nachweis von DWV über lateral flow assays (LFAs) in symptomlosen, DWV-negativ-getesteten (n=30) und verkrüppelten Bienen (n=30). Die DWV-freien (kein Amplifikationsprodukt bei der RT-PCR) Bienen zeigten kein Signal im Cube-Reader (grüne Punkte), während fast alle verkrüppelten Bienen (Amplifikationsprodukt bei der RT-PCR) als DWV-positiv (96,7%) erkannt wurden (rote Punkte).

Für den BQCV-LFA haben wir zunächst die Laboranwender-Methode validiert. Es wurden einzelne Larven, Bienenpuppen und adulte Bienen getestet, die mittels RT-PCR als BQCV-positiv getestet worden waren. Für den Probenaufschluss wurde dieselbe Methode wie für den DWV-LFA angewendet, um bei der späteren Vermarktung ein einheitliches Aufschlussprotokoll vorgeben zu können. Die Sensitivität der Tests lag für Larven, Puppen und adulte Bienen bei jeweils 78%, 97% und 70% (Tabelle 2). Bei der Testung BQCV-negativer Proben gab es keine falsch positiven Ergebnisse, d.h. die Spezifität des BQCV-LFA liegt bei 100%. Somit ist die Methode „professional“ sehr gut geeignet, um BQCV spezifisch und sensitiv in einzelnen Tieren nachzuweisen.

Tabelle 2: Anzahl der getesteten Larven, Bienen und adulten Bienen für den BQCV-LFA. Alle Tiere wurden mittels RT-PCR positiv auf BQCV getestet.

	Larven	Puppen	adulte Bienen
Anzahl getesteter Tiere	18	32	13
Sensitivität des BQCV LFAs	78%	97%	70%

Bei der Testung der Eigenanwendermethode zeigte sich auch, dass es keine falsch positiven Ergebnisse für BQCV-negative Kontrolltiere gab, wenn 10 adulte Bienen mit 2ml Extraktionspuffer in dem ZIP-Lock-Beutel homogenisiert wurden. Die Ergebnisse mit Larven und Puppen waren ebenfalls vielversprechend und zeigten, dass der BQCV-Test sehr gut für den

Eigenanwenderbereich geeignet ist. Eine abschließende Validierung konnte allerdings aufgrund von zeitlichen Verzögerungen nicht durchgeführt werden und wird im Projektnachgang angefertigt.

Somit konnte der Meilenstein M7.2: „Testung, Optimierung und erste Validierung des LFA an Feldproben und experimentell infizierten Bienen...“, erfolgreich abgeschlossen werden. Zum Projektende konnten die beiden LFAs für BQCV und DWV erfolgreich validiert werden, sodass seitens der ASKA Biotech GmbH eine Vermarktung angestrebt wird.

II.2 Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Für die Arbeiten zur Identifizierung und Herstellung geeigneter Antigene mussten keine Geräte angeschafft werden, sondern es sind ausschließlich Kosten für Verbrauchs- und Personalmittel angefallen, ohne die das Projekt nicht durchführbar gewesen wäre. Für Projekttreffen und den Besuch von Fachtagungen zur Akquisition von Know-how sowie zur Präsentation der Ergebnisse sind Reisekosten angefallen. Der für die Projektförderung aufgestellte Finanzierungsplan konnte genau eingehalten werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gegenüberstellung der geplanten mit den tatsächlich angefallenen Kosten für die Bearbeitung des Teilvorhabens inklusive Verlängerung

Kostenart	geplante Kosten	tatsächliche Kosten
Verbrauchsmittel	58.988,00 €	59.419,69 €
Personal	424.186,19 €	423.754,50 €
Reisen	6.270,00 €	6.270,00 €
Summe	489.444,19 €	489.444,19 €

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Zum Projektstart gab es keine vergleichbaren Schnelltests mit denen Imker oder Bienenzüchter ihre Völker vor Ort auf DWV oder BQCV testen konnten. Im Verlauf des Projekts kamen allerdings drei Dipstick-Tests der Fa. Megacor zur qualitativen (ja/nein) Diagnose von DWV, ABPV und SBV auf den Markt, d.h. für den Nachweis von DWV gibt es inzwischen ein Konkurrenzprodukt. Trotzdem ist der in diesem Projekt entwickelte und validierte LFA-Schnelltest für DWV, der im Kassettenformat als quantifizierbarer Test vorliegt, in dieser Form weiterhin einzigartig, da er im Gegensatz zum Konkurrenzprodukt dem Anwender eine Quantifizierung der Viruslast ermöglicht. Auch ist das Kassettenformat in Bezug auf die Anwenderfreundlichkeit dem Dipstick-Test überlegen. Für den ebenfalls in diesem Projekt entwickelten und validierten LFA-Schnelltest für BQCV gibt es bisher keine Alternative auf dem Markt. Auch dieser Test liegt als quantifizierbarer Test im Kassettenformat vor. Der BQCV-LFA ist damit ein einzigartiges Werkzeug für die Diagnostik von BQCV, welches insbesondere in der Königinnenzucht seine Anwendung finden wird. Die Erreichung des Projektziels durch die Entwicklung der beiden LFAs bedeutet eine wesentliche Vereinfachung und Verbesserung der

Virusdiagnostik bei Honigbienen, die zum Schutz von Bienen und weiteren Bestäuberinsekten in der Agrarlandschaft beitragen wird. Die vom Teilprojekt LIB geleisteten Arbeiten waren für die Erreichung des Projektziels notwendig. Ohne die rekombinanten Antigene hätten keine monoklonalen Antikörper hergestellt werden können. Und ohne das gesammelte Bienenmaterial und die Arbeiten zur Testung und Validierung der LFAs, hätten die Tests nicht entwickelt und validiert werden können. Damit waren die geleisteten Arbeiten für die Erreichung des Projektziels auch angemessen.

II.4 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Verbundprojekt *LAFAS* hatte die Entwicklung von immunologischen Schnelltests für den Virusnachweis zum Ziel. Angestrebt wurde ein lateral-flow Testsystem mit dessen Hilfe die Virusdiagnostik bei der Honigbiene vereinfacht wird. Für die Viren DWV und BQCV konnten LFA-Prototypen entwickelt werden, die von der ASKA Biotech GmbH zur Marktreife gebracht werden sollen. Der LFA für BQCV ist dabei besonders vielversprechend, da er ein Alleinstellungsmerkmal besitzt und bei Fachtagungen und Messen bereits großes Interesse fand. Die Vermarktung der LFAs wird von der ASKA Biotech GmbH übernommen.

II.5 Fortschritte bei anderen Stellen

Zum Zeitpunkt der Beantragung (20.09.2020) und Bewilligung (27.01.2021) des Projektes gab es keine Informationen zum Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen. Während der Durchführung des Projektes ist uns bekannt geworden, dass eine Arbeitsgruppe an der Universität Graz in Österreich ein Projekt zur „Virendiagnostik und -prophylaxe bei Honigbienen“ im Rahmen der Projektförderung „Zukunft Biene 2 – Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit“ durchgeführt hat, bei dem ebenfalls Schnelltests für Honigbienenroviren entwickelt wurden. Seit September 2023 ist ein entsprechender Schnelltest (*FASTest BEE 3T*) der Firma MEGACOR Diagnostik GmbH aus Österreich auf dem Markt. Dieser *FASTest* ermöglicht den qualitativen Nachweis von drei Bienenviren, dem Flügeldeformationsvirus (DWV), dem Akute Bienenparalyse Virus (ABPV) und dem Sackbrutvirus (SBV) mittels DipStick-Verfahren. In Bezug auf den immunologischen Nachweis von DWV gibt es also seit September 2023 ein Konkurrenzprodukt. Das DipStick-Verfahren des *FASTests* hat aber gegenüber dem im Projekt *LAFAS* gewählten Kassettenformat entscheidende Nachteile. (I) Der Virusnachweis erfolgt nur qualitativ, nicht quantitativ. (II) Es befinden sich 3 Teststreifen in einer Verpackung, sodass die nicht verwendeten Streifen verfallen. (III) Dipstick-Tests sind in der Handhabung weniger anwenderfreundlich als das von uns gewählte Kassettenformat. Das heißt, auch wenn der im Rahmen von *LAFAS* entwickelte DWV-LFA nicht mehr der einzige Schnelltest für DWV auf dem Markt ist, sollte er in der

Ausgestaltung als anwenderfreundlicher und quantifizierbarer Test ein gewisses Marktpotential haben. Der im Rahmen von LAFAS entwickelte BQCV-LFA ist weiterhin der einzige Schnelltest für BQCV auf dem Markt. Hier hat es seit Beantragung, Bewilligung und Beendigung des Projekts keine Fortschritte bei anderen Stellen gegeben.

II.6 Veröffentlichungen (erfolgte und geplante)

Bei Präsentationen auf mehreren Tagungen und Workshops konnten Teile der bisherigen Projektergebnisse vor Wissenschaftlern und in begrenztem Umfang auch vor potentiellen Anwendern dargestellt und in Fachkreisen diskutiert werden. Zu nennen sind hier:

- 71. Jahrestagung der AG der Institute für Bienenforschung, 19.- 21. März 2024, Münster
- 72. Jahrestagung der AG der Institute für Bienenforschung, 25.- 27. März 2025, Freiburg
- Beenovation Abschlussveranstaltung, 17.10.2024, Berlin
- Innovationstage der BLE, 05.11.2024, Berlin
- geplant: peer-reviewed Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften