

## Neuer Schnelltest zur Diagnose und Unterscheidung von EFB, AFB sowie der zwei Genotypen ERIC I und ERIC II von *Paenibacillus larvae*

Sandra Ehrenberg<sup>1</sup>, Marc O. Schäfer<sup>1</sup>, Friedrich Scholz<sup>2</sup>, Lukas Rüttinger<sup>2</sup>, Robert Kammerer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Friedrich-Loeffler Institut, Greifswald, Insel Riems; <sup>2</sup>Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, Weimar

### Abstract

Die Amerikanische und Europäische Faulbrut (AFB und EFB) sind verheerende bakterielle Brutkrankheiten der Honigbiene, die weltweit zu Kolonieverlusten und damit auch zu ökonomischen Einbußen führen können. Verursacher der AFB ist das Bakterium *Paenibacillus larvae*, welches sich in verschiedene ERIC-Genotypen einteilen lässt, von welchen die Typen ERIC I und ERIC II am häufigsten auftreten. Die EFB wird durch *Melissococcus plutonius* verursacht. Die Unterscheidung der beiden Faulbrutkrankheiten im Bienenvolk kann aufgrund der ähnlichen Symptomatik schwierig sein und die Differenzierung der beiden ERIC-Genotypen ist im Feld bislang nicht möglich. Da diese Genotypunterscheidung relevant für die Einschätzung der Virulenz des AFB-Erregers ist, wäre ein diagnostischer Schnelltest, welcher EFB und AFB detektiert und zusätzlich zwischen ERIC I und ERIC II unterscheiden kann, sehr von Vorteil. Um die Verbreitung dieser Brutkrankheiten möglichst schnell und gezielt eindämmen zu können, sollte ein entsprechender diagnostischer Test schnell, kostengünstig und zuverlässig sein.

Das Ziel dieser Studie war es einen Schnelltest für die Diagnose von EFB und AFB, sowie für die Unterscheidung der beiden relevanten *P. larvae* ERIC-Genotypen zu entwickeln. Hierzu wurden monoklonale Antikörper (mAKs) in Mäusen produziert. Die generierten mAKs wurden auf ihre Spezifität gegenüber dem Zielbakterium, sowie auf die Kreuzreaktivität mit Bienen-assoziierten Bakterien in einem ELISA getestet. Für die Detektion von *M. plutonius*, *P. larvae* und ERIC II wurden jeweils geeignete mAKs für die weitere Anwendung ausgewählt. Die anti-*P. larvae* und anti-ERIC II mAKs wurden zusammen für die Unterscheidung der Genotypen und zur Etablierung eines Sandwich ELISAs verwendet. Die entwickelten Schnelltests wurden erfolgreich auf Kreuzreaktivität mit Bienen-assoziierten Bakterien und verschiedenen Feldstämmen beider Erreger getestet.

### Europäische und Amerikanische Faulbrut

Die Europäische (EFB) und die Amerikanische Faulbrut (AFB) sind weltweit verbreitete Bienenbrutkrankheiten, wobei die AFB im Vergleich zur EFB aggressiver ist (1). In Deutschland sind keine Daten zu EFB-Ausbrüchen gemeldet, was vor allem damit zusammenhängt, dass die EFB nicht anzeigepflichtig ist und die zuständigen Ämter daher über EFB-Ausbrüche nicht in Kenntnis gesetzt werden müssen. In der Schweiz und in Großbritannien werden jedoch vermehrt EFB-Ausbrüche festgestellt und waren im Jahr 2006 im Vergleich zum Jahr 1999 sogar bis zu 6-fach erhöht (2, 3). Die AFB ist in Deutschland und der gesamten EU eine anzeigepflichtige Krankheit (1). In den letzten 25 Jahren wurden pro Jahr im Mittel 265 AFB-Ausbrüche in Deutschland gemeldet (4).

An Faulbrut erkrankte Kolonien zeigen lückige Brutwaben mit Brutzeldeckeln, welche bei erkrankten Puppen oft eingefallen und/oder löchrig sind. Stark befallene Kolonien verströmen in der Regel einen typisch fauligen Geruch (1, 5). Bei beiden Brutkrankheiten verändern infizierte Larven ihre Farbe von perlmuttweiß über gelbbraun zu grauschwarz (5, 6). Zusätzlich verändert sich die Gewebekonsistenz der verendeten Larven und eine schmierige, teils klebrige Masse bildet sich in den Brutzellen (7). Bei der AFB entwickeln sich häufig harte Rückstände aus dieser Masse, welche in den

Brutzellen zurückbleiben (1). Die Unterscheidung zwischen AFB und EFB im Bienenvolk ist möglich, jedoch vor allem bei untypischem Symptomverlauf schwierig.

Die Faulbrutkrankheiten werden durch verschiedene Bakterien verursacht. Die EFB wird durch die Aufnahme von vegetativen Zellen von *Melissococcus plutonius* ausgelöst und ist im Krankheitsverlauf mit weiteren Bakterien assoziiert (5). Die AFB hingegen wird ausschließlich durch die Aufnahme von Sporen des Bakteriums *Paenibacillus larvae* verursacht (6). Der AFB-Erreger wird in fünf ERIC-Genotypen unterteilt (8). Die Unterscheidung der beiden hauptsächlich vorkommenden Genotypen ERIC I und ERIC II (1) hat für das Verständnis der Pathogenese Relevanz, da sie sich in ihrer Virulenz unterscheiden (6, 9, 10).

Für eine erfolgreiche Eindämmung der Krankheitsausbreitung sind schnelle und zuverlässige diagnostische Verfahren notwendig. Bisher wird die Faulbrut zunächst visuell im Feld inspiziert und anschließend verdächtiges Probenmaterial ins Labor geschickt, um den Erreger nachzuweisen. Dieser Nachweis erfolgt mittels mikroskopischer, mikrobiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen (11), was aufgrund notwendiger Kultivierungsschritte mehrere Tage in Anspruch nehmen kann. Das Ziel dieser Studie war es, einen schnellen und zuverlässigen Test zu entwickeln, welcher direkt am Bienenvolk angewendet werden kann.

### **Antikörper Herstellung und Charakterisierung**

Der zu entwickelnde lateral flow assay (LFA) Schnelltest basiert auf der Antikörper-Detektion von Erreger-spezifischen Proteinen. Für die Entwicklung des Tests wurden daher monoklonale Antikörper (mAk) in Mäusen hergestellt und charakterisiert. Die mAks wurden auf Kreuzreaktivität mit verschiedenen Bienen- und EFB-assoziierten Erregern mittels ELISA untersucht. Weiterhin wurde die Erkennung verschiedener Feldisolate der jeweiligen Faulbruterreger getestet. Die mAks, welche keine oder nur eine geringe Kreuzreaktivität und eine hohe Erkennung verschiedener Feldisolate zeigten, wurden für weiterführende Testungen ausgewählt. Hierzu wurden zunächst Paare von mAks für die Detektion von *M. plutonius*, *P. larvae* und den Genotyp ERIC II in einem Sandwich ELISA getestet. Während für die Detektion im Sandwich ELISA von *P. larvae* und dessen Genotyp ERIC II ein monoklonales Antikörperpaar gefunden wurde, gelang dies für die Detektion von *M. plutonius* nicht. Daher wurde für die *M. plutonius*-Detektion auf eine Kombination eines anti-*M. plutonius* mAk mit einem polyklonalen Serum zurückgegriffen. Jeder der entwickelten Sandwich ELISAs wurde auf Kreuzreaktivität und Detektion von Feldisolaten getestet. Es wurden bei keinem Kreuzreaktivität entdeckt und die Detektion von *P. larvae* und ERIC II verlief bei 100 % der getesteten Feldisolate erfolgreich. Von den getesteten *M. plutonius*-Feldisolaten wurden 75 % erkannt.

### **Herstellung und Testung des lateral flow assays**

Die Schnelltests, welche von Senova (Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbHd, Weimar) produziert wurden, wurden zunächst separat für EFB und AFB hergestellt. Für die Herstellung des LFAs wurden die mAks, welche erfolgreich im Sandwich ELISA getestet wurden, verwendet. Die LFAs wurden mit verschiedenen Bakterienkonzentrationen getestet, um die Nachweisgrenze des Assays zu bestimmen. Die spezies-spezifischen LFAs wurden auf Kreuzreaktivität mit Bienen-assoziierten Bakterien und die Erkennung verschiedener Feldisolate untersucht. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Konzentrationen der Bienen-assoziierten Bakterien festgestellt und die LFAs erkannten alle getesteten Feldisolate auf Speziesebene, wobei die ERIC II Erkennung bisher nur mit dem Referenzstamm getestet wurde.

### **Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Es wurden erfolgreich spezifische monoklonale Antikörper gegen *M. plutonius*, *P. larvae* und den *P. larvae*-Genotyp ERIC II generiert und charakterisiert. Geeignete monoklonale Antikörper wurden für die Etablierung von Sandwich ELISAs zur Detektion von *M. plutonius*, *P. larvae* und ERIC II

verwendet. Im Anschluss wurden LFA-Prototypen hergestellt und ihre Anwendung wurde im Labor mit Bakterienisolaten erfolgreich getestet. Nach Optimierungen der Sensitivität des ERIC II-LFAs wird die Produktion eines LFAs mit EFB-, AFB- und ERIC II-Erkennung durchgeführt. Der „all-in-one“ LFA wird mit verschiedenen Feldproben getestet werden, um einen verlässlichen Schnelltest für die Diagnose im Feld bereitstellen zu können.

### Literatur

1. Forsgren E, Locke B, Sircoulomb F, Schäfer MO. Bacterial Diseases in Honeybees. Current Clinical Microbiology Reports. 2018.
2. Wilkins S, Brown MA, Cuthbertson AG. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. Pest Manag Sci. 2007;63(11):1062-8.
3. Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. Apidologie. 2008;38:362-71.
4. Tiergesundheitsjahresbericht. Tiergesundheitsjahresbericht. Friedrich-Loeffler-Institute. 2019:30-1.
5. Forsgren E. European foulbrood in honey bees. J Invertebr Pathol. 2010;103 Suppl 1:S5-9.
6. Genersch E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J Invertebr Pathol. 2010;103 Suppl 1:S10-9.
7. Alippi AM. Bacterial diseases of honey bees. In: W R, editor. Bee Health and Veterinarians: OIE; 2014. p. 117-24.
8. Beims H, Bunk B, Erler S, Mohr KI, Sproer C, Pradella S, et al. Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. Int J Med Microbiol. 2020;310(2):11.
9. Ashiralieva A, Genersch E. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees – a review. Apidologie. 2006(37):411-20.
10. Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. Appl Environ Microbiol. 2005;71(11):7551-5.
11. Fünfhaus A, Göbel J, Ebeling J, Knispel H, Genersch E. Questions, problems and solutions in the diagnosis of AFB - a German perspective. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2018:9.

### Kontakt

Sandra Ehrenberg; Friedrich-Loeffler Institut, Greifswald-Insel Riems  
sandra.ehrenberg@fli.de