

Aus dem Department für biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Till Rümenapf)

**Etablierung einer RT-qPCR zum quantitativen diagnostischen
Nachweis des Schwarze Königinnenzellenvirus (BQCV).**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Agnes Salbaba

Wien, im Dezember, 2024

BetreuerInnen:

Univ.-Prof. Dr.med.vet. Till Rümenapf

Unit für Virologie

Department für biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Interne Betreuerin:

Dr. med.vet Kerstin Seitz

Unit für Virologie, Department für biologische Wissenschaften und
Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Veterinärangelegenheiten und Tiergesundheit

Landwirtschaftskammer Österreich

Begutachter:

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

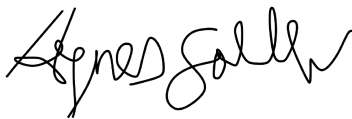
Eigenständigkeitserklärung

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.

Wien, den 05.12.2024

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Agnes Salbaba', written in a cursive style.

Agnes Salbaba

ZUSAMMENFASSUNG

Das *Schwarze Königinnenzellenvirus* (Black Queen Cell Virus, BQCV) gehört zu Familie der Dicistroviridae und befällt die Honigbiene *Apis mellifera*. Es kennzeichnet sich durch schwarze Verfärbung der Weiselzelle und kann im ungünstigsten Fall zum Tod der Bienenkönigin oder anderer Bienen im Stock führen. Frühere Untersuchungen im Rahmen vom Forschungsprojekt „Zukunft Biene 2“ haben gezeigt, dass BCQV in österreichischen Bienenvölkern weit verbreitet ist (Prävalenz > 90% (1)), aber die Krankheit eher selten in Erscheinung tritt und auch die nachgewiesene Virusbelastung relativ gering war. Wie auch bei anderen Viruserkrankungen der Biene ist davon auszugehen, dass die Stärke der Virusbelastung für die Krankheitsauslösung entscheidend ist. Um dies künftig am Institut für Virologie näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein RT-qPCR Assay zum quantitativen Nachweis des *Schwarzen Königinnenzellenvirus* validiert. Das Validierungsverfahren mit klonierter BCQV DNA sowie der Vergleich mit der konventionellen PCR ergab eine Spezifität von 100 % und ein Detektionsminimum von zwölf Genomäquivalenten pro Reaktion. Der validierte BCQV-Nachweis wurde für die Untersuchung von 43 steirischen Bienenproben angewendet. Dabei zeigte sich, dass alle Bienenproben aus der Steiermark positiv für BQCV ausfielen, jedoch überschritt nur ein Volk den Grenzbereich für die klinische Auswirkung.

Bei den untersuchten Völkern konnte keine eindeutige Korrelation zwischen dem BQCV-Nachweis und den Überwinterungsverlusten festgestellt werden, dies ist aufgrund der geringen Stichprobenanzahl allerdings nicht aussagekräftig.

ABSTRACT

The Black Queen Cell Virus (BQCV) belongs to the Dicistroviridae family and infects the honey bee *Apis mellifera*. It is characterized by black discoloration of the queen cell and, in the worst case, can lead to the death of the queen bee or other bees in the hive. Earlier investigations as part of the "Future Bee 2" research project have shown that BQCV is widespread in Austrian bee colonies (prevalence > 90% (1)), but that the disease is rather rare and the detected viral load was relatively low. As with other viral diseases of bees, it can be assumed that the severity of the viral load is decisive in triggering the disease. In order to investigate this in more detail at the Institute of Virology in the future, an RT-qPCR assay for the quantitative detection of black queen cell virus was validated in this study. The validation procedure with cloned BQCV DNA and the comparison with conventional PCR resulted in a specificity of 100 % and a detection minimum of twelve genome equivalents per reaction. The validated BQCV detection method was used to test 43 Styrian bee samples. It was found that all bee samples from Styria were positive for BQCV, but only one colony exceeded the threshold range for the clinical effect.

No clear correlation was found between BQCV detection and overwintering losses in the colonies tested, but this is not conclusive due to the small number of samples.

Inhalt

ZUSAMMENFASSUNG	4
ABSTRACT.....	5
1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 BEDEUTUNG UND BEDROHUNGEN DER WESTLICHEN HONIGBIENE <i>APIS MELLIFERA</i>	9
2.2. DIE FAMILIE <i>DICISTROVIRIDAE</i>	9
2.3. DAS GENUS <i>TRIAOVIRUS</i>	10
2.4. DIE SPEZIES <i>TRIAOVIRUS NIGEREGINACELLULAE</i> : DAS SCHWARZE <i>KÖNIGINNENZELLENVIRUS</i> (BQCV).....	10
2.5. BQCV KLINIK, ÜBERTRAGUNG UND EPIDEMIOLOGIE	11
2.6. THERAPIE UND PROPHYLAXE	13
2.7. ZIELE UND HYPOTHESEN	14
3. MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 MATERIALIEN	15
3.2 PCR	17
3.3 GELELEKTROPHORESE	19
3.4 GENERIERUNG DER POSITIVKONTROLLE - PCR	20
3.5 AUFREINIGUNG	21
3.6 T-VEKTOR KLONIERUNG	22
3.7 TRANSFORMATION IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	22
3.8 KOLONIE PCR (TEST PCR).....	23
3.9 PLASMIDPRÄPARATION	24
3.10 AFFINITÄTSREINIGUNG VON PLASMID DNA	24
3.11 RESTRIKTIONSVERDAU	26
3.12 SEQUENZIERUNG	26
3.13 REVERSE TRANSKRIPTASE QUANTITATIVE-PCR (RT-QPCR)	27

3.14	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT RT-QPCR.....	29
3.15	STEIRISCHE BIENENPROBEN.....	30
3.16	PROBENAUFARBEITUNG	30
3.17	SENSITIVITÄT KONVENTIONELLER RT-PCR.....	30
4.	ERGEBNISSE.....	31
4.1.	IDENTIFIZIERUNG EINER POSITIVEN PROBE	31
4.2.	IDENTIFIZIERUNG VON PLASMIDEN MIT BQCV-SEQUENZEN	32
4.3.	AFFINITÄTSREINIGUNG VON PLASMID DNA UND RESTRIKTIONSVERDAU	33
4.4.	ETABLIERUNG DER QUANTITATIVEN RT-QPCR.....	34
4.5.	POSITIVKONTROLLE PKS 225.....	35
4.6.	BESTIMMUNG DER SENSITIVITÄT DER QPCR	36
4.7.	DUPLEX REAKTION MIT GLEICHZEITIGEM QUANTITATIVEN NACHWEIS VON β -ACTIN DER HONIGBIENE	41
4.8.	VALIDIERUNG DER BQCV QPCR MIT KLINISCHEN BIENENPROBEN	41
4.9.	SENSITIVITÄTSVERGLEICH DER BQCV QPCR MIT DER KONVENTIONELLEN RT-PCR	44
5.	DISKUSSION.....	46
5.1.	BQCV-VIRUSLAST DER WINTERVERLUSTVÖLKER	46
5.2.	ZUSAMMENHANG VON BQCV UND DER VARROAMILBE	48
5.3.	SENSITIVITÄTSVERGLEICH	48
5.4.	NUTZEN DER ARBEIT	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	50
7.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	55
	DANKSAGUNG.....	1

1. Abkürzungsverzeichnis

BQCV.....	<i>Black Queen Cell Virus, Schwarzes Königinnenzellenvirus</i>
BP.....	Basenpaare
cDNA.....	Complementary DNA
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
GE.....	Genomäquivalent
HCL.....	Salzsäure
H ₂ O.....	Wasser
NaOH.....	Natriumhydroxid
NTC.....	Non Template control
ORF.....	offener Leserahmen, open reading frame
PBS.....	Phosphate-Buffered-Saline
pKO.....	Positivkontrolle
qPCR.....	Realtime quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rpm.....	Rounds per minute
RT PCR.....	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS.....	Sodium Dodecyl Sulfate
TM.....	Schmelztemperatur

2. Einleitung

2.1 Bedeutung und Bedrohungen der westlichen Honigbiene *Apis mellifera*

Die westliche Honigbiene (*Apis mellifera* sp. L.) bestäubt während des Pollen- und Nektarsammelns viele Blütenpflanzen. Sie trägt so zur Artenvielfalt der Pflanzen bei, hat aber auch eine zentrale Rolle in der Ernährungssicherung des Menschen durch die Bestäubung landwirtschaftlich genutzter Pflanzen (1). So wird ungefähr ein Drittel der Lebensmittel indirekt oder direkt von Insekten bestäubt (2). Krankheiten der westlichen Honigbiene sind Parasiten, wie die Milbe *Varroa destructor*, Infektionserreger (Viren, Pilze und Bakterien), und Faktoren, die der Honigbiene schaden. Zu diesen Faktoren zählen der Klimawandel, Vergiftungen durch Pestizide bzw. Umweltverschmutzungen, und industrialisierte Landwirtschaft in Verbindung mit der Verringerung der pflanzlichen Biodiversität (3,4). Die Honigbiene ist für über 20 unterschiedliche Viren empfänglich, eines davon ist das *Schwarze Königinnenzellenvirus* (*Black Queen Cell Virus*, BQCV) (5). BQCV wird in Bienenvölkern häufig nachgewiesen, ohne dass klinische Krankheitszeichen auffallen. Da die BQCV Diagnostik in der Regel nur qualitativ erfolgt, - ohne die Viruslast zu kennen -, wäre es wichtig zu wissen, ob klinisch apparente Klinik mit erhöhten Virusmengen einhergeht. Das EU Referenzlabor für Bienengesundheit hat den Grenzbereich für klinische Erscheinungen von BQCV mit 10^7 bis 10^8 RNA-Kopien pro Biene definiert, und Viruslasten unterhalb dieses Bereichs sind als subklinische Infektion zu zählen (1,6). Die viruskonzentrationsabhängige Krankheitsentstehung ist bei nicht obligat pathogenen Keimen ausschlaggebend, wenn andere Faktoren zusammenspielen (Faktorenkrankheiten). Daher ist es wichtig, die Viruslast in Bienenvölker zu bestimmen, um den kritischen Schwellenwert zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde ein duplex RT-qPCR Assay für die quantitative Erfassung des *Schwarzen Königinnenzellenvirus* entwickelt und validiert.

2.2. Die Familie *Dicistroviridae*

Die Familie der *Dicistroviridae* gehört gemeinsam mit den Familien *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Secoviridae* und *Picornaviridae* zur Ordnung der *Picornavirales*. Diese Familien zeichnen sich durch positive Einzelstrang RNA Genome (+ssRNA) mit einem polyA-Schwanz aus. Weiters kodieren sie vier Strukturproteine (VP1-4) und die Nicht-Strukturproteine Helikase, Vpg Proteinase und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp). (7)

Alle Virenspezies der Familie *Dicistroviridae* haben Arthropoden als Wirte und eine ungefähre Größe von 30 nm. Bei der Übertragung steht der Verdauungstrakt im Vordergrund. Die meisten

dieser Viren haben einen Tropismus zu bestimmten Teilen des Verdauungstraktes und die Replikation erfolgt nach Invasion ins Darmepithel in dessen Zytoplasma. (8) Die Familie *Dicistroviridae* umfasst 3 Genera: *Triatovirus*, *Cripavirus* und *Aparavirus* (7).

2.3. Das Genus *Triatovirus*

Das Genus *Triatovirus* wurde 2011 als zusätzliches Genus der Familie *Dicistroviridae* vorgeschlagen. Charakteristisch für dieses Genus ist das Fehlen der ikosaedrischen Anordnung der Untereinheit VP4 im Virion. (9,10)

2.4. Die Spezies *Triatovirus nigereginacellulae*: Das Schwarze Königinnenzellenvirus (BQCV)

Das *Schwarze Königinnenzellenvirus* (engl. *Black Queen Cell Virus*, BQCV, siehe Abb. 1) wurde zum ersten Mal im Jahr 1977 beschrieben (11). Im Jahr 2000 wurde das BQCV-Genom sequenziert. Es handelt sich um ein einzelsträngiges (+) RNA Virus der Ordnung der *Picornavirales*, Familie *Dicistroviridae*, Genus *Triatovirus* und Spezies *Triatovirus nigereginacellulae*. (12,13). Das Virus besitzt ein ikosaedrisches Kapsid, welches das polyadenylierte Genom, mit insgesamt 8550 schützt. Das Virion ist insgesamt 35,3 nm groß, größer als andere Viren der Familie *Dicistroviridae*. Das Genom beinhaltet zwei offene Leserahmen (ORF, engl. open reading frame), die sich nicht überlappen. Diese Bereiche codieren für Polyproteine. Zwischen den beiden offenen Leserahmen befindet sich ein RNA-Abschnitt, der 208 Nukleotide fasst

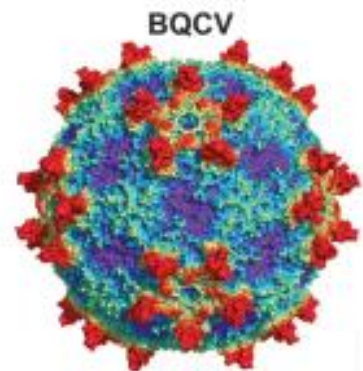


Abbildung 1: Das Kapsid von BQCV(13)

und zu den konzertiertesten Bereichen des Genoms zählt. Das 5' Ende des Genoms bildet nach dem Picornavirus typischen VPG eine untranslatierte (UTR) Region von 657 Nukleotiden und am 3' Ende befindet sich eine untranslatierte Region, die 155 Nukleotide umfasst. Der ORF1 umfasst 4968 Nukleotide und codiert die Nicht-Strukturproteine, wie Protease, Helikase und Polymerase-Enzyme. Der ORF2 umfasst 2562 Nukleotide und beinhaltet die genetische Information für das Kapsid Polyprotein, welches ko- bzw. posttranslational prozessiert wird. Das Kapsid von BQCV wird von drei Hauptstrukturproteinen gebildet. Sie wurden VP1, VP2

und VP3 benannt und formen das Kapsid mit jeweils 60 Kopien. VP1 bis VP3 haben eine β -Faltblatt Struktur, sind für die ikosaedrische Form der Hülle verantwortlich und formen große, fingerartige Vorwölbungen der viralen Kapsidoberflächen. (14)

Die VP4 Untereinheit ist im BQCV Kapsid nicht als strukturierte Anordnung enthalten, denn bislang konnten nur einzelne VP4 Peptide im Kapsid nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist dieses Protein für Dicistroviren wichtig, da es Zellmembranen zerstören kann und so diese das virale Genom in die Zelle bringen können. BQCV Virionen scheinen aber auch ohne diese strukturierte Anordnung der VP4 Untereinheiten infektiös zu sein, es ist aber wahrscheinlich, dass die Abspaltung von VP4 für die Bildung von BQCV Virionen entscheidend ist und daher zumindest kurz vor der Reifung des Viruspartikels das VP4 in geordneter Form im Kapsid vorliegt. (13)

Zusätzlich fehlt dem Strukturprotein VP1 die für die Picornaviren übliche hydrophobe Tasche, die eine Bindungsstelle für antivirale Therapien darstellt (13).

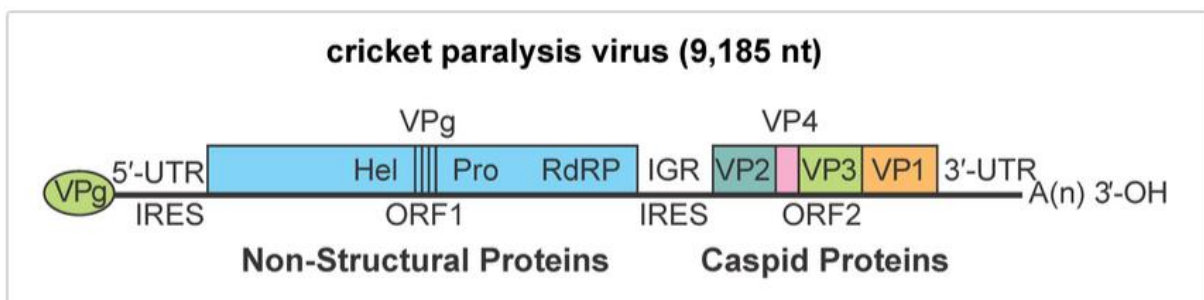


Abbildung 2: Darstellung des Aufbaus der Picornaviridae anhand des Grillen-Paralyse-Virus. Es gliedert sich in 2 offene Leseraster (ORF). Der ORF 1 codiert Nichts-Struktur-Proteine und ORF2 enthält die genetischen Informationen für das Kapsid Polyprotein.(7)

2.5. BQCV Klinik, Übertragung und Epidemiologie

Das *Schwarze Königinnenzellenvirus* ist ein in Österreich häufig nachgewiesenes Virus. Im Rahmen des Forschungsprojekts „Zukunft Biene“ zeigte sich eine über 90 %ige Prävalenz. Ein Befall eines Bienenvolkes mit BQCV ist nicht einfach zu erkennen. In Anfangsstadien der Erkrankung ist im Stock eine leichte Gelbfärbung der Puppen in den Weiselzellen zu erkennen. Infizierte Königinnenlarven sowie Arbeiterinnen- und Drohnenlarven und spätere Brutstadien (Puppen) können versterben und zerfallen. Daraufhin verfärbt sich die Weiselzelle dunkel (braun bis schwarz). Auch adulte Honigbienen sind für das Virus empfänglich, zeigen aber keine Pathologie. (11,14–16)

BQCV befindet sich im Verdauungstrakt der Honigbiene und in den die Ovarien der Königin, daher kann das Virus sowohl vertikal als auch horizontal übertragen werden. Die horizontale Übertragung erfolgt direkt durch Kontakt mit infizierten Bienen und indirekt über Kot, und verunreinigte Pollen oder Honig. (16,17) Die vertikale Übertragung erfolgt einerseits durch Eiablage der Königin. Andererseits wird das Virus auch durch die Fütterung von Gelee Royal an die unter drei Tage alten Larven durch asymptomatisch infizierte Ammenbienen vertikal übertragen. Das Virus infiziert das Gehirn der adulten Bienen und wird über Drüsensekretion bei der Fütterung ausgeschieden. (7,13)

Da BQCV häufig hohe Prävalenzen aber selten Klinik aufweist, wird diskutiert ob andere prädisponierende Faktoren die BCQV-Erkrankung der Bienen fördern, z.B. klimatische Bedingungen, Nahrungsmangel, Pestizide und Parasiten. Oft ist das Auftreten von BCQV mit dem Varroamilben Befall (*Varroa destructor*) oder der Microsporidie *Nosema apis* bzw. *ceranae* (auch *Vairimorpha apis* bzw. *ceranae*) assoziiert (16). Außerdem wurde eine erhöhte Viruslast des *Schwarze Königinnenzellenvirus* bei der 2007 in den USA beschriebenen „Colony collapse disorder“ gefunden. Die „Colony collapse disorder“ bezeichnet drastische Rückgänge der Arbeiterbienenpopulation über den Winter. (18,19)

Die Varroamilbe ist ein Vektor für zahlreiche Bienenviren, am häufigsten werden mitunter das Kaschmir-Bienen-Virus (KBV), Akute Bienenparalyse Virus (ABPV), Flügeldeformationsvirus (DWV), Sackbrutvirus (SBV) und das *Schwarze Königinnenzellenvirus* (BQCV) übertragen, wobei eine Milbe bis zu fünf unterschiedliche Viren gleichzeitig übertragen kann (20). Zum Teil können manche Bienenviren (z.B. DWV) auch in der Milbe replizieren, bei BQCV geht man allerdings davon aus, dass die Milbe maximal als mechanischer Vektor dient. Die Milbe gilt nicht nur als Vektor für virenbedingte Erkrankungen, sondern hat primär auch zahlreiche gesundheitsschädigende Wirkungen auf die Honigbiene und macht diese deshalb auch krankheitsempfindlicher und empfänglicher für Folgeerkrankungen (21). Erst kürzlich wurde festgestellt, dass die Varroamilbe primär nicht Hämolymphe saugt, sondern spezifisch den Fettkörper parasitiert, der nicht nur als Nahrungsreserve dient, sondern insbesondere für die Immunabwehr von großer Bedeutung ist (22).

Der zu den Mikrosporidien zählende Parasit *Vairimorpha apis* gilt als Wegbereiter für eine klinische BQCV-Erkrankung. Grund für diese Annahme ist, dass die Prävalenzwerte des Virus und der Nosemose, also der klinischen Erkrankung an *Vairimorpha apis*, zur gleichen Jahreszeit hohe Werte annehmen. Die Infektionszahlen der von BQCV betroffenen Bienenvölker beginnen am Anfang des Bienenjahres im März zu steigen, mit den

Höchstzahlen in der Schwarmzeit im Mai und Juni. Später fallen die Infektionszahlen im August bis inklusive November ab, aber beginnen in den Wintermonaten wieder anzusteigen. Sehr ähnlich verhält es sich mit dem Mikrosporidium *Vairimorpha apis*, das das Epithel des Mitteldarms der Honigbiene befällt und zu Dysenterie führen kann. Der Epithelschaden könnte die BQCV-Virenaufnahme erleichtern, da auch adulte Bienen infiziert sein können und das Virus dann beim Füttern an die Brut übertragen. Als typische Faktorenkrankheiten führt der gleichzeitige Viren- und Parasitenbefall zu einer erhöhten Schadwirkung am Bienenvolk. (23,24)

In den letzten Jahren wird bei der westlichen Honigbiene *Vairimorpha apis* in Europa zunehmend von der virulenteren Art *Nosema ceranae*, verdrängt. *N. ceranae* stammt von der asiatischen Honigbiene; *N.ceranae* benötigt höhere Aussentemperaturen und war daher bislang vor allem auf Südeuropa beschränkt. Aufgrund höherer Jahresdurchschnittstemperaturen hat *N.ceranae* auch in Österreich *Nosema apis* weitgehend verdrängt. (25,26)

2.6. Therapie und Prophylaxe

Infektionskrankheiten der Honigbiene werden allein durch deren angeborenes Immunsystem bekämpft, während ein adaptives Immunsystem weitgehend fehlt. Die Erregerabwehr basiert auf zellulären und humoralen Komponenten. Die zelluläre Immunität besteht aus Makrophagenartigen Hämocyten, die in der Hämolymphe zirkulieren. Sie richten sich vor allem gegen eingedrungene Bakterien und Einzeller. Die humorale Immunität umfasst eine Reihe von Proteinen (z.B. Vitellogenin) und antimikrobielle Peptide (Defensine).

Zur Bekämpfung von Virusinfektionen bedient sich die Honigbiene der RNA-Interferenz. Dabei wird die doppelsträngige RNA (dsRNA), die im Rahmen der Replikation des Virus entsteht, erkannt, in kleinere Teile gespalten und damit funktionslos gemacht. (27,28) Diese Mechanismen funktionieren offenbar effizient, denn Bienen existieren seit 100 Millionen Jahren und haben die Erreger trotz deren z.T. extrem schneller Evolution gut im Griff. Wie bei anderen Tieren auch, sollten zur Gesunderhaltung möglichst wenige Stressoren vorliegen, denn (Virus-) Krankheiten entstehen oft als Folge einer Summe von Faktoren. Für die Honigbiene bedeutet das z.B. die regelmäßige Überwachung und Bekämpfung des Milbenbefalls und die Überwachung des Bienenstocks auf andere Krankheitsanzeichen. Weiters ist die züchterische Auswahl von Bienenvölkern wichtig, wobei das Putz – und Hygieneverhalten ein Kriterium der Zuchtauswahl sein sollte (27)

Spezifische Immunprophylaxe im Sinne einer Impfung gegen Viruserkrankungen gibt es nicht und Therapien gegen virale Infektionen sind in weiter Ferne.

In einer Studie von Aurori et al. (16) wurden die Auswirkungen der antiviralen Eigenschaften von echten Lorbeerblättern (*Laurus nobilis*) auf mit BQCV infizierten Bienen gezeigt. Das Lorbeerblattextrakt verringerte die Viruslast in geringen Dosen, wohingegen es in hohen Dosen, über 5 mg, die Virusreplikation des *Schwarzen Königinzellenvirus* beeinträchtigte. Die in *Laurus nobilis* enthaltenen Polyphenole haben im Labor nachweislich antimikrobielle, antiparasitische als auch antivirale Eigenschaften auf Bienenpathogene. (16,29,30)

Ribavirin, ein Nukleosid-Analogon, ist ein Virostatikum und wurde mit vielversprechenden Ergebnissen im Labor gegen BQCV eingesetzt. Jedoch muss die Sicherheit des Ribavirins für Bienenvölker, Mensch und Umwelt in weiteren Studien geprüft werden. (31)

2.7. Ziele und Hypothesen

Bislang ist für den diagnostischen Nachweis des BQCV nur eine qualitative RT-PCR im Rahmen der virologischen Routinediagnostik in Gebrauch, die keine quantitative Aussage über die Viruslast erlaubt. Um das Risiko von BQCV als Faktorenkrankheit einschätzen zu können, ist es aber notwendig, das Vorliegen einer schädlichen Viruslast bestimmen zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Einführung und Validierung einer quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) im Duplexansatz zur Detektion von BQCV, wobei *Apis mellifera* β -Actin als interne Kontrolle verwendet wurde.

Das BQCV-Assay wurde mit unterschiedlichen Bienenproben validiert. Zusätzlich wurde die Sensitivität des Assays mithilfe der Plasmid-Positivkontrolle bestimmt und mit der konventionellen RT-PCR in Zusammenhang gebracht. Hierbei wurde vermutet, dass der quantitative Virusnachweis, verglichen mit der konventionellen RT-PCR, sensibler sei für den Virusnachweis.

Mithilfe des etablierten BQCV-Assays wurden 43 steirische Bienenproben von Winterverlustvölkern und lebendigen Völkern untersucht. Hierbei wurden Rückschlüsse auf die Virusprävalenz in der Steiermark gezogen und die Viruslast zwischen den Völkern verglichen. Weiters wurde in dieser Arbeit der Einfluss des *Schwarzen Königinzellenvirus* auf steirische Winterverlust- und Lebendvölker im Zusammenhang mit der Hypothese „Die Viruslast von BQCV ist in Winterverlustvölkern höher als in jenen, die den Winter überlebt haben“, untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 1 Materialien und Herstellerangaben

Kit/ Material	Hersteller
0,8 % Agarose-Gel	3,2g Agarose (FastGene Agarose, Nippon Genetics, Düren, Germany) + 400ml 0,5 x TAE (house made) + 16 µl Midori Advance (Nippon Genetics, Düren, Germany)
Bienenproben	Vetmeduni Vienna, Institut für Virologie Steiermark Tierärztin Dr. med. vet Anita Winkler
Blunt TA Mastermix	NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
DNA-Ladder	Roth, Karlsruhe, Deutschland
6x DNA Loading Dye	0,025 % Bromphenol blue (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) 0,2 % Orange G (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) 40 % Sucrose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 10mM Tris (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA)
LB- Medium	10g Trypton 5g Hefeextrakt 10g NaCl pH 7.0
Mix2Seq Kit	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

OptiPure Viral Auto Plate Kit	TANBead, Taiwan Advanced Nanotech, Taoyuan, Taiwan
OneTaq One-Step RT-PCR Kit	NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	NEB, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Plasmid Mini Kit	FAVORGEN, Ping Tung, Taiwan
Primer und Sonden	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Puffer 1 Plasmidpräparation	Für 500ml: 50mM Tris (3,03g) 10mM EDTA (1,86g) H ₂ O auf 400ml auffüllen HCl auf pH 8,0 einstellen H ₂ O auf 500ml auffüllen
Puffer 2 Plasmidpräparation	Für 500ml: 0,2M NaOH (4g) 1 % SDS (5g) H ₂ O auf 500ml auffüllen
Puffer 3 Plasmidpräparation	Für 1000ml: 3M Kaliumacetat H ₂ O auf 800ml auffüllen Essigsäure, auf pH 5,5 einstellen H ₂ O auf 1000ml auffüllen

0,5x TAE Elektrophorese-Puffer	20 mM Tris Base (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) 10 mM Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland) 50 µM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) In ddH ₂ O, pH 8,0
--------------------------------	---

3.2 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte, die damit nachgewiesen werden können. Für BQCV, das ein RNA Virus ist, muss jedoch zunächst die Reverse Transkription (RT) erfolgen. Dabei wird die RNA durch die Reverse Transkriptase bei 55° zu cDNA umgeschrieben, die weiters als Template für die PCR dient.

In der konventionellen PCR binden im Mastermix (siehe Tab. 2) befindliche Primer (siehe Tab. 3), also kurze Nukleotid Abschnitte, an den zu amplifizierenden Genabschnitt und mittels DNA-Polymerase und Nukleotiden wird dieses spezifische DNA-Stück vervielfältigt. Dieser Prozess geschieht innerhalb von bis zu 45 Zyklen. Diese Zyklen beginnen jeweils mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs durch Hitze (95 °C). Nun folgt die Phase des Annealings (Anlagerung), in der bei einer kühleren Temperatur (45-50 °C, abhängig vom GC-Gehalt der Primer) die Primer an ihre komplementäre Sequenz binden. Im letzten Schritt der Elongation verlängert die Polymerase bei 68 °C die DNA-Sequenz ab den gebundenen Primern. Die generierten DNA-Banden werden schließlich mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und können durch einen Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert, unter UV-Licht dargestellt werden.

Tabelle 2: Mastermix für Reverse Transkriptase PCR zum Nachweis von BQCV

MM for RT- PCR BQCV		
MM		1 Probe
One TaqOne- Step RT-PCR Kit NEB	Reaction Mix (2X)	12,5 µl
	Enzyme Mix (20X)	1 µl
BQCV-Primer	BV532 10 µmol	1 µl
	BV533 10 µmol	1 µl
	Nukleasefreies H ₂ O dd	8 µl
	RNA Template	1,5 µl
	total	25 µl

Für alle nötigen Auftauschritte wurde jeweils nach Herstellerangaben entweder bei Raumtemperatur, auf Eis oder mit dem Thermomixer 5436 (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgetaut.

Tabelle 3: Primer der konventionellen PCR aus Tentcheva et al.(32)

Primer		Sequenz	GC-Gehalt	TM	Nukleotid Positionen*
BV532	Forward Primer	GGACGAAAGGAAGCCTAAAC(32)	50 %	55 °C	4611-4631
BV533	Reverse Primer	ACTAGGAAGAGACTTGCACC(32)	50 %	55 °C	5015-5035

*Anm.: Die Nukleotid Positionen sind in der GenBank Datenbank unter AF183905 zu finden. (33)

Die beiden Primer wurden jeweils 1:10 mit nukleasefreiem H₂O_{dd} zu einer Konzentration von 10 pmol/ µl verdünnt.

Für die konventionelle PCR wurde der Thermo-Gradientencycler Ultra Cyclyer Gradient (FastGene®, NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Deutschland) verwendet.

Tabelle 4: PCR-Programm der konventionellen PCR für BQCV mit den Primern BV532 und BV533

PCR-Programm		
23,5 µl MM und 1,5 µl RNA		Zeit
reverse Transkription	55 °C	10'
Initiale Denaturierung	95 °C	1'
Cycle 40 repeats		
Denaturierung	95 °C	15"
Annealing	50 °C	30"
Elongation	68 °C	30"
Final extension	68 °C	5'
Hold	8 °C	infinite

3.3 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Nachweismethode für DNA-, oder RNA-Moleküle. Sie basiert auf der Grundlage, dass Moleküle unterschiedlicher Molekülmasse durch ein

großporiges Gel unter Spannung unterschiedlich schnell wandern. Die negativ geladenen Moleküle wandern zur Anode. Die entstandenen Banden werden dann unter UV-Licht durch fluoreszierende Farbstoffe, die in dsDNA interkalieren, sichtbar gemacht und für den Größenvergleich mit einer DNA-Leiter abgeglichen. (34)

Für die Verwendung musste das flüssige Gel zunächst in einen Gelträger mit Kamm gegossen werden. Bei Raumtemperatur wird das Gel nach ca. 20 min fest. Der Kamm wurde herausgenommen und das Gel wurde in die mit TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) gefüllte Laufkammer gelegt. In eine Tasche wurde nun 3 µl der 1 kbp Leiter (Fa. Roth) pipettiert, die als Größenstandard dient und in die restlichen Taschen wurden 2,5 µl der Proben, die zuvor mit Ladepuffer vermischt wurden, pipettiert. Die Proben sinken unter den weniger dichten Puffer ab. (35)

Für diese Arbeit wurde jeweils eine Spannung von 100 V für 30 min angelegt und hierfür die Mupid® One Elektrophoresekammer verwendet. Die Banden wurden mittels des Geräts UVP UV Transluminator und des BioSpectrum® Imaging Systems im Anschluss dargestellt.

3.4 Generierung der Positivkontrolle - PCR

Für die Erstellung der Plasmid-Positivkontrolle für die RT-qPCR wurden die Primer BV719 und BV720 verwendet. Diese haben folgende Sequenzen, siehe Tab. 5:

Tabelle 5: Primer zur Erstellung der Positivkontrolle

Primer		Sequenz	GC-Gehalt	TM	Nukleotid Positionen*
Forward Primer	BV719	AGTTCCAAATACCGTACTATG	38.10 %	58.1 °C	8048-8079
Reverse Primer	BV720	AGCTCACAACAAATCGCT	44.44 %	60.4 °C	8381-8399

*Anm: Die Nukleotid Positionen sind in der Gen-Datenbank unter der Nummer AF183905 (33).

Die PCR mit den Primern wurde in folgendem Schema, dargestellt in Tab. 6 durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Programm mit den Primern BV719 und BV720

PCR-Programm		
23,5 µl MM und 1,5 µl RNA		Zeit
reverse Transkription	55 °C	10'
Initiale Denaturierung	95 °C	1'
Cycle 40 repeats		
Denaturierung	95 °C	15"
Annealing	45 °C	30"
Elongation	68 °C	30"
Final extension	68 °C	5'
Hold	8 °C	infinite

3.5 Aufreinigung

Für die Aufreinigung wurde das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 13.000 rpm mithilfe der Zentrifuge MiniSpin® (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) statt. Dazu wurde 100 µl DNA-Bindungspuffer und 20µl Probe (im Verhältnis 5:1) in die Monarch Collection Tubes mit Cleanup Säulchen pipettiert. Dies wurde 1 min zentrifugiert und der Durchfluss weggeleert.

Danach wurde 200 µl DNA Waschpuffer mit Ethanol hinzugefügt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zum Schluss wurde 3 min trocken zentrifugiert und das Säulchen in ein frisches Eppendorf Reagiergefäß gestellt. Nun wurden für die Elution 12 µl H₂O_{dd} beigefügt und 1 min inkubiert. Danach wurde dies noch einmal 2 min lang zentrifugiert.

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde spektralphotometrisch mittels NanoVue Plus (Fa. GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich) gemessen.

3.6 T-Vektor Klonierung

Für die Herstellung der Positivkontrolle für die RT-qPCR sollte das PCR-Produkt in das Plasmid pGEM-T easy (Promega) kloniert werden (Ligation siehe Tab. 7). Durch die Taq-Polymerase wird in der PCR-Reaktion am 3'-Ende des Amplifikats ein zusätzliches Desoxyadenosin-Nukleotid angehängt. Die Ligase im Mastermix verbindet nun das überschüssige Adenosin des linearen Inserts und das überschüssige Desoxythymidin des linearen pGEM-T-Vektors zu einem Plasmid. (35)

Tabelle 7: Die Ligation für die T-Vektor Klonierung

Ligation	
Insert (Konzentration: 18ng/µl)	4 µl
Blunt TA Mastermix (Fa. NEB)	5 µl
pGEM- T-Easy Vektor (Fa. Promega, Walldorf, Deutschland)	1 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Die Ligation wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis gekühlt.

3.7 Transformation in *Escherichia coli*

Bei der Transformation sollen kompetente *E.coli* Zellen der HB101 Linie das mit Ligation generierte Plasmid aufnehmen. Dafür wurden die sensiblen Zellen 30 min auf Eis aufgetaut, 50 µl der Zellen auf die Ligation pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der sogenannte „Hitze Schock“ durchgeführt, indem die Ligations-Bakterien Mischung auf 37 °C für 1,5 min erhitzt wurde. Nach dem Hitzeschock wurde die Reaktion für 3 min auf Eis gelagert. Bei der Erhitzung und anschließender Kühlung nehmen die Bakterien das Plasmid auf und bauen es ein (35).

Zur Anzucht der Zellen wurde der Bakterien-Ansatz in 400 µl Ampicillin freies LB-Medium pipettiert und 30 min bei 37 °C im Thermomixer (incubator shaker Innova 4080, Fa. New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) geschüttelt.

Nach dieser halben Stunde wurden 100 µl des Ansatzes auf 100µg/ml Ampicillin haltige LB-Agarplatten mit sterilen Ösen verstrichen und 12 Stunden bei 37° im Trockenbrutschrank (Fa. EHRET GmbH Life Science Solutions, Freiburg, Deutschland) inkubiert.

Nach 12 Stunden wurden die Kolonien isoliert. Hierfür wurde mit sterilen Pipettenspitzen jeweils in eine *E.coli* Kolonie gestochen und die Spitze in ein Reagenzglas überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Satellitenkolonie verwendet werden, da diese das Insert nicht eingebaut haben. In die insgesamt 24 Reagenzgläser wurden je 0,5 ml LB-Ampicillin Medium vorgelegt.

3.8 Kolonie PCR (Test PCR)

Mithilfe der Kolonie-PCR können Klone direkt aus der Bakterienkolonie getestet werden. Zur Bestimmung, ob die gewünschte Sequenz in das Plasmid eingebaut wurde, wurde eine Test PCR nach folgendem Schema (siehe Tab. 8) durchgeführt.

Tabelle 8: Kolonie PCR Ansatz

Test-PCR Ansatz für eine Probe	
One Taq Quick Load 2x Mastermix	5 µl
H ₂ O	4,6 µl
Primer BV719* 10 µmol	0,2 µl
Primer BV720* 10 µmol	0,2 µl
Gesamt	10 µl

*Anm: Primer siehe Tabelle 5

Die Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze angestochen und etwa drei Mal in das PCR-Tube (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gestoßen. Die Spitze wurde dann in das

Glaskulturröhrchen (Glaseprouvette) mit 0,5 ml LB-Medium mit Ampicillin abgeworfen. In die PCR-Gefäße wurde jeweils 10 µl Mastermix pipettiert.

Die PCR-Bedingungen waren: Denaturierung bei 95 °C, Annealing bei 45 °C und einer Elongation bei 68 °C für jeweils 30 Sekunden für 30 Zyklen. Das Ergebnis wurde nach Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel unter UV-Licht visualisiert.

3.9 Plasmidpräparation

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde eine Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse durchgeführt, wie in Abb. 3 vereinfacht dargestellt. Zunächst wurden 2 ml einer Bakterienkultur bei 13000rpm/RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet mit 200 µl Resuspensionspuffer (pH 8) resuspendiert. Anschließend kam 200 µl Lysis-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) hinzu, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation. Danach wurde 200 µl Neutralisationspuffer (pH 5,5) zugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 500 µl Isopropanol pipettiert, um die DNA zu reinigen, mit anschließender Zentrifugation. Nach einem Waschschrift mit 100 µl 70 % Ethanol und Verdampfung des Ethanols im Thermomixer bei 37 °C wurde die DNA in 25 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Plasmidpräparation wurde anschließend für den Testverdau verwendet. (35)

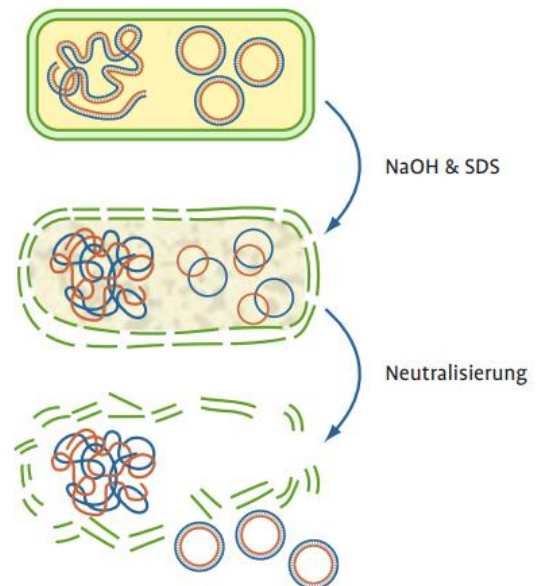


Abbildung 3: Plasmidpräparation (35)

3.10 Affinitätsreinigung von Plasmid DNA

Da die Reinheit, der mit der schnellen alkalischen Lysemethode erzeugten Plasmid DNA, nicht optimal ist, kann man Plasmide mit einer Affinitätsmatrix aufreinigen. Die Plasmidreinigungs-Präparation wurde zur Vervielfältigung und sauberen Präparation der Plasmid-DNA angefertigt. Die Präparation erfolgt in folgenden Schritten: Anzucht der Bakterienkultur über Nacht, alkalische Lyse der Bakterien und Neutralisierung des Lysats, Bindung der DNA,

zweimaliger Waschschrift, Trockenzentrifugieren der Säule und der Elution der DNA mit destilliertem Wasser. Hierfür wurde das FAVORGEN Plasmid Mini Kit verwendet.

Für die Herstellung der Plasmidreinigung wurde 1 µl der dichten Kultur der Plasmidpräparation verwendet um das frische Medium zu beimpfen dann über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Hierfür wurden zunächst 20 ml der Bakterienkultur für 10 min bei 4000g zentrifugiert, der Überstand weggeleert und das Pellet mit 400µl FAPD1 Puffer mit RNase A resuspendiert. Die im Puffer enthaltene RNase spaltet die RNA, um die Bindung an die Säule zu vermeiden. Danach wurde 400 µl FAPD2 Puffer hinzugefügt, invertiert und 3 min inkubiert. Anschließend wurde 600 µl des FAPD3 Puffers beigefügt, geschwenkt und für 5 min zentrifugiert. Mittels 2 Waschschriften wurden zelluläre Bestandteile und andere Kontaminationsquellen entfernt. Der erste Waschschrift wurde mit 400µl WF-Puffer durchgeführt, die Säule anschließend zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der zweite Waschschrift wurde danach mit 700 µl Waschpuffer mit EtOH durchgeführt.

Die Säule wurde im Anschluss bei 13000 rpm 3 min trocken zentrifugiert und anschließend mit 50 µl destilliertem Wasser benetzt und für 1 min inkubiert. Zum Schluss wurde sie noch einmal für 1 min zentrifugiert, um die DNA in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) zu eluieren.

Nach der Elution wurde die DNA-Konzentration der Plasmidreinigung mittels Quantus™ Fluorometer (Fa. Promega, Walldorf, Deutschland) gemessen. Hierfür wurden 199 µl QuantiFluor® ONE dsDNA Dye und 1 µl Probe in ein 0,5 ml PCR-Gefäß pipettiert. Das Gefäß wurde gevortext und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die DNA-Konzentration gemessen.

3.11 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zur Überprüfung der Plasmide durchgeführt. Hierfür wurde das Restriktionsenzym EcoRI HF (Fa. NEB) verwendet, das aus dem E. coli Stamm R hergestellt wurde und außerdem das Restriktionsenzym PVUI HF (Fa. NEB). Diese wurden gemeinsam mit dem Puffer Cutsmart verwendet. (Siehe Tab. 9, 10)

Tabelle 10: Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme

EcoRI HF	PVUI HF
5'G I AATT C3'	5'CGAT I CG 3'
3'C TTAA I G 5'.	3'GC I TAGC 5'.

Tabelle 9: Restriktionsverdau zur Überprüfung der Plasmide durchgeführt

Restriktionsverdau	
Puffer cutsmart	1 µl
Restriktionsenzym	0,2 µl
Plasmid DNA	2 µl
H ₂ O	6,8 µl
Gesamt	10 µl

3.12 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das Sequenzierungskit Mix2Seq (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion wurde anhand von Tab. 11 hergestellt.

Tabelle 11: Herstellung der Sequenzierungsreaktion

Sequenzierung	
Probe (Konzentration 18ng/µl)	5 µl
Primer 10 µM	2 µl
H ₂ O	10 µl
Gesamt	17 µl

3.13 Reverse Transkriptase quantitative-PCR (RT-qPCR)

Die quantitative RT-PCR ist dadurch charakterisiert, dass das Ergebnis in Echtzeit photometrisch dargestellt wird und, mithilfe von Standards, eine Quantifizierung der Zielsequenz erfolgen kann. Im Mastermix ist zusätzlich zu den Primern auch eine Sonde (engl. Probe) enthalten, die aus einer kurzen Gensequenz, die zwischen zwei nahe beisammen liegenden Molekülen, dem Reporter und einem Quencher besteht. Die Sonde bindet an ein DNA-Fragment zwischen den Bindungsstellen des Forward und Reverse Primers. Wenn der Reporter und Quencher im Ausgangszustand nahe beieinander sind, resorbiert der Quencher die Fluoreszenz des Reporters – damit wird kein Fluoreszenzsignal des Reporters gemessen. Befindet sich nun eine Zielsequenz in der zu untersuchenden Probe, lagern sich während des Annealing-Schrittes die Sonde und Primer an. In der anschließenden Elongationsphase werden die Primer durch die DNA-Polymerase verlängert und durch deren 5'-3' Exonukleaseaktivität wird die Sonde degradiert. Somit werden Reporter und Quencher voneinander getrennt und der Reporter emittiert nun Licht. Das Licht wird mittels Fluoreszenzphotometer nach jedem Zyklus gemessen. (36,37)

Die RT-qPCR wurde zuerst als Singleplex Assay, siehe Tab. 12, durchgeführt und erst nach erfolgreicher Durchführung als Duplex-Assay etabliert (Siehe Tab. 13; PCR Programm siehe Tab. 14; Primer siehe Tab. 15).

Tabelle 12: Mastermix für die Singleplex Reverse Transkriptase qPCR

MM for singleplex RT-qPCR BQCV		
MM		1 Probe
Luna® Probe RT-MM E3006	Reaction Mix (2X)	6,67 µl
	Enzyme Mix (20X)	0,67 µl
BQCV	BV716-FW BQCV (100 µM) (20)	0,05 µl
	BV717-RV BQCV (100 µM) (20)	0,05 µl
	BV718-probe BQCV (100 µM)(20)	0,02 µl
	H ₂ O	5,87 µl
	total	13,33 µl

Tabelle 13: Mastermix für die Duplex Reverse Transkriptase qPCR

MM for duplex RT-qPCR BQCV & <i>Apis mellifera</i> β -Actin		
MM		1 Probe
Luna® Probe RT-MM E3006	Reaction Mix (2X)	6,67 μ l
	Enzyme Mix (20X)	0,67 μ l
BQCV	BV716-FW BQCV (100 μ M) (20)	0,05 μ l
	BV717-RV BQCV (100 μ M) (20)	0,05 μ l
	BV718-probe BQCV (100 μ M) (20)	0,02 μ l
<i>Apis mellifera</i> β -Actin	BV655-FW β -Actin (100 μ M) (38)	0,04 μ l
	BV666 -RV β -Actin (100 μ M) (38)	0,04 μ l
	BV657-probe β -Actin (100 μ M) (38)	0,02 μ l
	H2O	5,77 μ l
	total	13,33 μ l

Tabelle 14: PCR-Programm für Duplex RT-qPCR BQCV und *Apis mellifera* β -Actin

PCR-Programm:			
13 μ l MM and 1 μ l sample			
Hold	55 °C	10`	
Hold	95 °C	1`	
Cycle 40 repeats	95 °C	10``	
	60 °C	30``	acquire Green, YELLOW

Zusätzlich zum BQCV-Nachweis wurde parallel auch ein Housekeeping Gen, das *Apis mellifera* β -Actin als interne Kontrolle mituntersucht. Dieses dient als Extraktionskontrolle der Bienenproben, denn es ist ein grundlegendes, in jeder Honigbiene (*Apis mellifera*) exprimiertes Gen. (39)

Tabelle 15: Primer und Sonden Sequenzen für RT-qPCR

Name		Sequenz	bp	GC
BV716	Forward primer Nucleotid Position: 8195-8215*	GGTGCGGGAGATGATATGGA (20)	20	55 %
BV717	Rev Primer Nucleotid Position: 8244-8266*	GCCGTCTGAGATGCATGAATAC (20)	22	50 %
BV718	Dual Labelled_probe*	FAM- TTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC- BHQ1 (20)	25	52 %
BV655	β-Actin-FW	AGGAATGGAAGCTTGCGGTA (38)	20	50%
BV666	β-Actin-RV	AATTTTCATGGTGGATGGTGC (38)	21	43%
BV657	β-Actin-am_probe	HEX-ATGCCAACACTGTCCTTTCTGGA GGTA-IOWA BLACK (38)	27	48%

* Die angegebene Nukleotid Position nimmt Bezug auf das BQCV-Genom mit Accession nr. NC_003784.1 in der NCBI Genbank Bezug.

3.14 Sensitivität und Spezifität RT-qPCR

Für die Bestimmung der Sensitivität der RT-q-PCR wurde von der Positivkontrolle (Plasmid „pKS 225“) eine serielle Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10 000 000 000 hergestellt. Die DNA-Konzentration der Positivkontrolle, 1:10er Verdünnung und 1:100er Verdünnung wurden anschließend mittels Quantus™ Fluorometer gemessen.

Die Spezifität wurde mit 3 Verdünnungen des BQCV-Plasmidstandards (1:100, 1:10 000, 1:1000 000), 5 Plasmiden, die jeweils das Gesamtgenom verschiedener Bienenviren in einem pBR322 Vektor enthalten, einer NTC und Wasser erhoben.

Die verwendeten Plasmide waren:

- Flügeldeformationsvirus- A (pL 427)
- Flügeldeformationsvirus- B (pKS 44)
- Chronisches Bienenparalysevirus RNA 1 (pKS 67)
- Chronisches Bienenparalysevirus RNA 2 (pKS 74)
- Akutes Bienenparalysevirus (pKS 109)

3.15 Steirische Bienenproben

Es wurden 43 Bienenvölker aus der Steiermark auf BQCV untersucht. Die Proben (ca. 50-100 Bienen) wurden von den jeweiligen ImkerInnen bei der Frühjahrsdurchsicht der Völker selbst entnommen. Die Völker wurden in zwei Gruppen unterteilt: Lebende und tote Völker. Tote Völker sind Bienenvölker, die den Winter nicht überlebt haben (Winterverlustvölker). Lebende Völker sind jene, die den Winter überlebt haben und die von ImkerInnen für die Beprobung entweder als Totenfallsbienen oder im Rahmen einer Bienenprobe entnommen wurden. Totenfallsbienen sind jene Bienen, die tot vor dem Stock aufgefunden wurden, denn Bienen verlassen aus hygienischen Gründen den Stock, um zu sterben und außerdem werden tote Bienen von anderen Bienen aus dem Stock getragen. (40)

Für diese Arbeit wurden neun Winterverlustvölker und 34 lebende Völker analysiert.

3.16 Probenaufarbeitung

Zunächst mussten die Bienenproben für die Extraktion und nachfolgende Analysen folgendermaßen aufgearbeitet werden: Pro Volk wurden jeweils 20 Bienen (Arbeiterinnen) in ein 50ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) mit zehn Stahlkugeln (Durchmesser 6 mm) (Fa. Kugelpompe, HSI-Solutions GmbH, Wien, Österreich) und 10 ml PBS durch kräftiges Schütteln für 2min homogenisiert. Danach wurden die Kugeln mittels Magnet aus den Proben entfernt und bei 4000 rpm (Zentrifuge Megafuge 2.0R, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) für 10 min abzentrifugiert. Etwa 2 ml des Überstands wurden in ein 2ml Röhrchen zur weiteren Lagerung bei - 80 °C abpipettiert, der Rest wurde verworfen. Davon wurden 300 µl Bienenhomogenat für die Extraktion der Nukleinsäuren verwendet. Die Extraktion wurde mit dem Gerät TANBead Maelstrom 4810 (Fa. TANBead) mit dem OptiPure Viral Auto Plate Kit und dem Programm Nr. 665 nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Eluat (80 µl) wurde in 2 ml Reagiergefäße (Fa. Sarstedt) überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.17 Sensitivität konventioneller RT-PCR

Für den Sensitivitätsvergleich der RT-qPCR und konventionellen RT-PCR wurde die Positivkontrolle der konventionellen PCR (pKS 125) verdünnt.

Es wurden 10 serielle Verdünnungen, 1:10 bis 1:10 000 000 000, hergestellt und alle Proben mittels RT-PCR analysiert. Der Mastermix wurde nach dem Schema für die konventionelle PCR angefertigt und dasselbe Zyklusschema angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. Identifizierung einer positiven Probe

Für die Erstellung einer Positivkontrolle für das BQCV Assay wurde zunächst eine positive Bienenprobe mit dem bereits etablierten konventionellen PCR-Assay gesucht. pKS125 war die alte Positivkontrolle des konventionellen Assays, da das neue Assay aber an anderen Stellen bindet, musste eine neue pKO erstellt werden.

In der konventionellen PCR wurden 23 Proben, die vom Institut für Virologie zur Verfügung gestellt wurden, auf BQCV untersucht. Es wurden die beiden Primer BV532 und BV533 verwendet.

Als Ergebnis dieser PCR wurden 4 Proben als positiv gewertet: Probe 109, 110, 114, 969/20 (siehe Abb. 4). Die korrekte Größe der Bande sollte bei 300 Basenpaaren liegen.

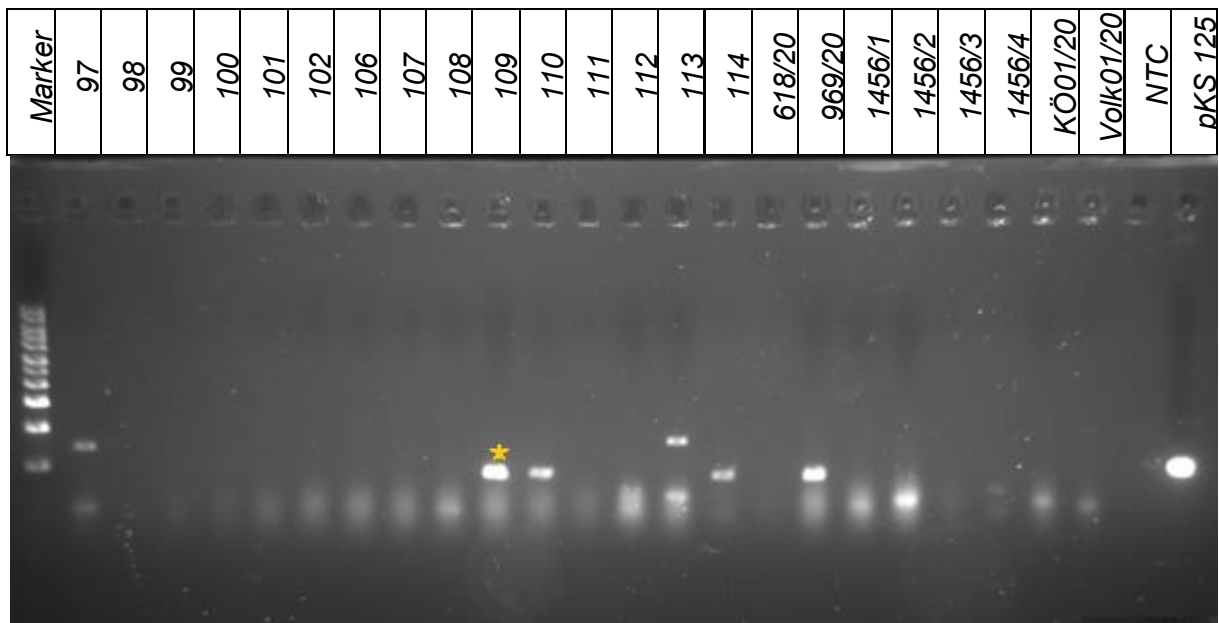


Abbildung 4 Gelelektrophorese der konventionellen BQCV PCR auf verschiedene Bienenproben.

In der rechten Spur befindet Positivkontrolle pKS 125 mit einer erwarteten Bandengröße von 300 Basenpaaren. Gleiche Produktgrößen sieht man bei den Probe 109, 110, 114 und 969/20, die als positiv gewertet wurden. Probe 109 (Stern) wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendet.

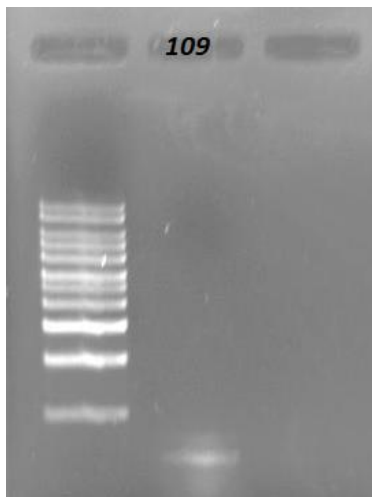


Abbildung 5: Probe 109 in der konventionellen PCR mit den Primern BV719 und BV720, Bande bei 300Bp

Für die weitere Arbeit wurde die positive Probe 109 weiterverwendet. Hierbei wurde zunächst eine weitere, in Abb. 5 dargestellte, PCR der Probe 109 mit den Primern BV719 und BV720 durchgeführt. Diese Primer produzieren ein größeres DNA Amplicon, als die später in der qPCR verwendeten Primer BV716 und BV717. Anschließend wurde das generierte Amplicon mittels PCR Reinigungskit aufgereinigt und die Konzentration gemessen. Diese betrug 18ng/ µl. Zur Plasmidherstellung wurde eine T-Vektor Klonierung und Transformation in *E.coli* laut Standardprotokoll durchgeführt. Das hierbei neu entstandene Plasmid wurde als pKS 225 bezeichnet.

4.2. Identifizierung von Plasmiden mit BQCV-Sequenzen

Nach der Transformation wurden insgesamt 24 Kolonien mittels Kolonie-PCR nach Standardprotokoll auf den Einbau des Inserts mit den Primern BV719 und BV720 getestet. Die erwartete Größe der Bande bei der Gelelektrophorese sollte bei erfolgreich eingebautem BQCV- Insert bei ca. 300bp liegen. Dies war bei Kolonie Nr. 5 und 23 der Fall, die anderen Banden wiesen nur den Vektor ohne Insert auf, siehe Abb. 6.

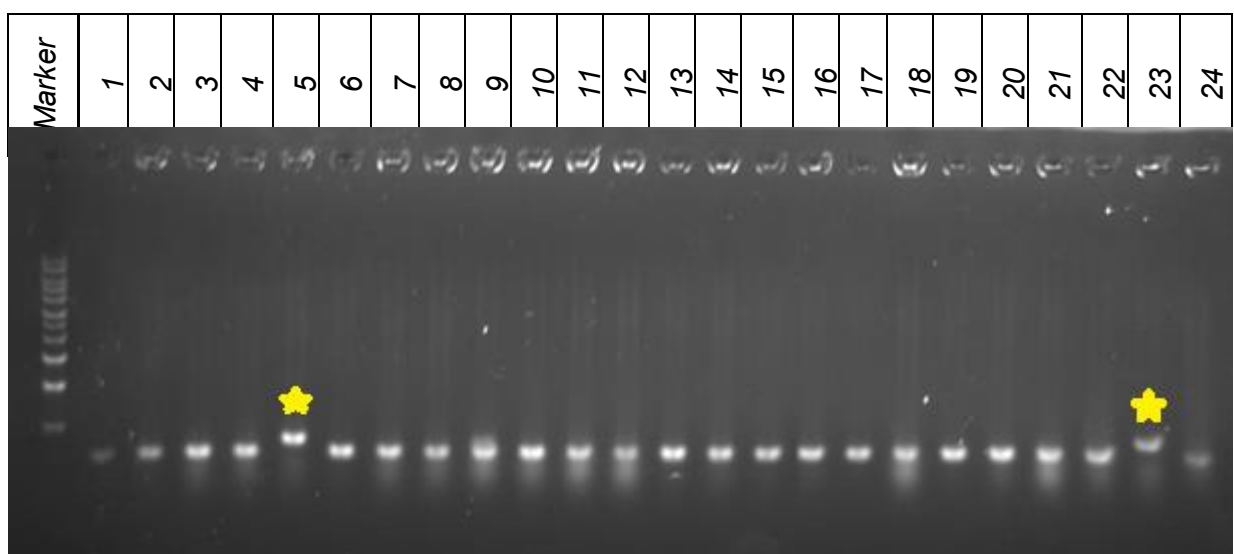


Abbildung 6 Kolonie PCR: 24 Kolonien wurden auf den Einbau der Plasmids DNA überprüft. Bei Kolonie der Plasmidpräparation 5 und 23 wurden das BQCV-Insert und der Vektor integriert, die anderen Proben enthielten nur den Vektor.

Der Rest der PCR-Aufreinigung der Probe 109 sowie die Plasmide der Kolonie 4 und 5 wurden zur Sequenzierung eingeschickt. Hierfür wurde der Primer BV719 verwendet.

Das Ergebnis der Sequenzierung der Kolonie Nr. 5 erbrachte folgendes Ergebnis:

Sequenz von 424 Bp:

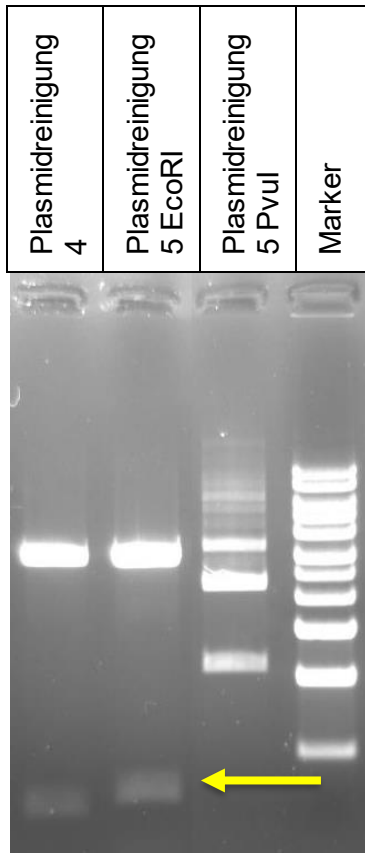
```
Ggacgaaaggaagcctaataaggctcataagctcgaatgtttctaaggaccaatagattatctgtttggagtaagatgta
tttaatccgatagtagcggtgtgtctgagcttaaaaatgtagaccatattccgtgggtccaatgtgtattctacggactgggacgtt
attgcaagggtacttgaagtcgaaatctaccatatggtggctggagacttcgagggcttgatgcttcggaacagtccgacatattgt
acgctgcgggagaggttctgcaagagttgagtaagaaaatcttaactcaactgaggatgagatgttgcaacagagggctatcat
ccactcgttggtcaattcacttcatatcaatgagaacgggattgttcttcaatggtgcaagtctctcctagt
```

Die Sequenz wurde mittels NCBI Blast analysiert und es konnte bestätigt werden, dass es sich um die Sequenz eines BQCV Isolats handelt, welches die größte Übereinstimmung (100 %) mit dem Isolat von Leat et al., 2000 mit NCBI accession number NC_003784.1 hat.(33)

Das Plasmid der Kolonie 4 enthielt eine Sequenz, die die größte Übereinstimmung zu einer ABPV-Sequenz aufwies, was für den Großteil der Proben bedeutet, dass diese kleinere Bande nicht den Vektor, sondern ein ABPV-Fragment enthielt, das unspezifisch amplifiziert wurde.

4.3. Affinitätsreinigung von Plasmid DNA und Restriktionsverdau

Von der Bakterienkultur der Plasmidpräparation 4 und 5 wurde ein größerer Ansatz für die Plasmidreinigungs- Präparation angesetzt, um saubere DNA für die weiteren Schritte zu gewinnen. Nachdem die Herstellung abgeschlossen war, wurde die DNA-Konzentration der Plasmidreinigung 4 und 5 mittels Quantus™ Fluorometer bestimmt. Die Konzentration der Plasmidreinigungs- Präparation 4 betrug 35,88ng/ µl und der Plasmidreinigung 5 39ng/ µl.



Für den Restriktionsverdau der Plasmidreinigung 4 und 5 wurde zunächst ein Ansatz für drei Proben gemacht, um Pipettierfehler auszugleichen. Zur Absicherung des Ergebnisses mit dem Enzym EcoRI-HF wurde für die Plasmidreinigung 5 ein zweiter Verdau mit PvuI-HF als Restriktionsenzym angesetzt. Die Banden mit PvuI-HF sollten sich bei 1100bp für das Insert und 2300bp für den Vektor befinden, um als positiv gewertet zu werden. Zusätzlich zu den Banden in der passenden Größe, ist noch ein Teil des unverdauten Plasmids bei etwa 3 kb zu sehen. Für EcoRI-HF sollten die Banden bei 300bp für das Insert und bei 3000bp für den Vektor liegen.

Wie in der Abbildung 7 ersichtlich sind in der Plasmidreinigung 5 mit beiden Restriktionsenzymen die passenden Banden erkennbar, bei der Plasmidreiniung 4 ist eine schwächere und kleinere Bande zu sehen. Durch Sequenzierung konnte bestätigt werden, dass es sich nur bei der Plasmidreinigung 5 um das Plasmid mit BQCV-Insert handelt. Die Plasmidreinigung 5 wurde als Positivkontrolle PKS225 verwendet.

*Abbildung 7:
Restriktionsverdau,
Plasmidreinigung 5 hatte mit
beiden
Restriktionsenzymen das
Plasmid mit BQCV-Insert
eingebaut*

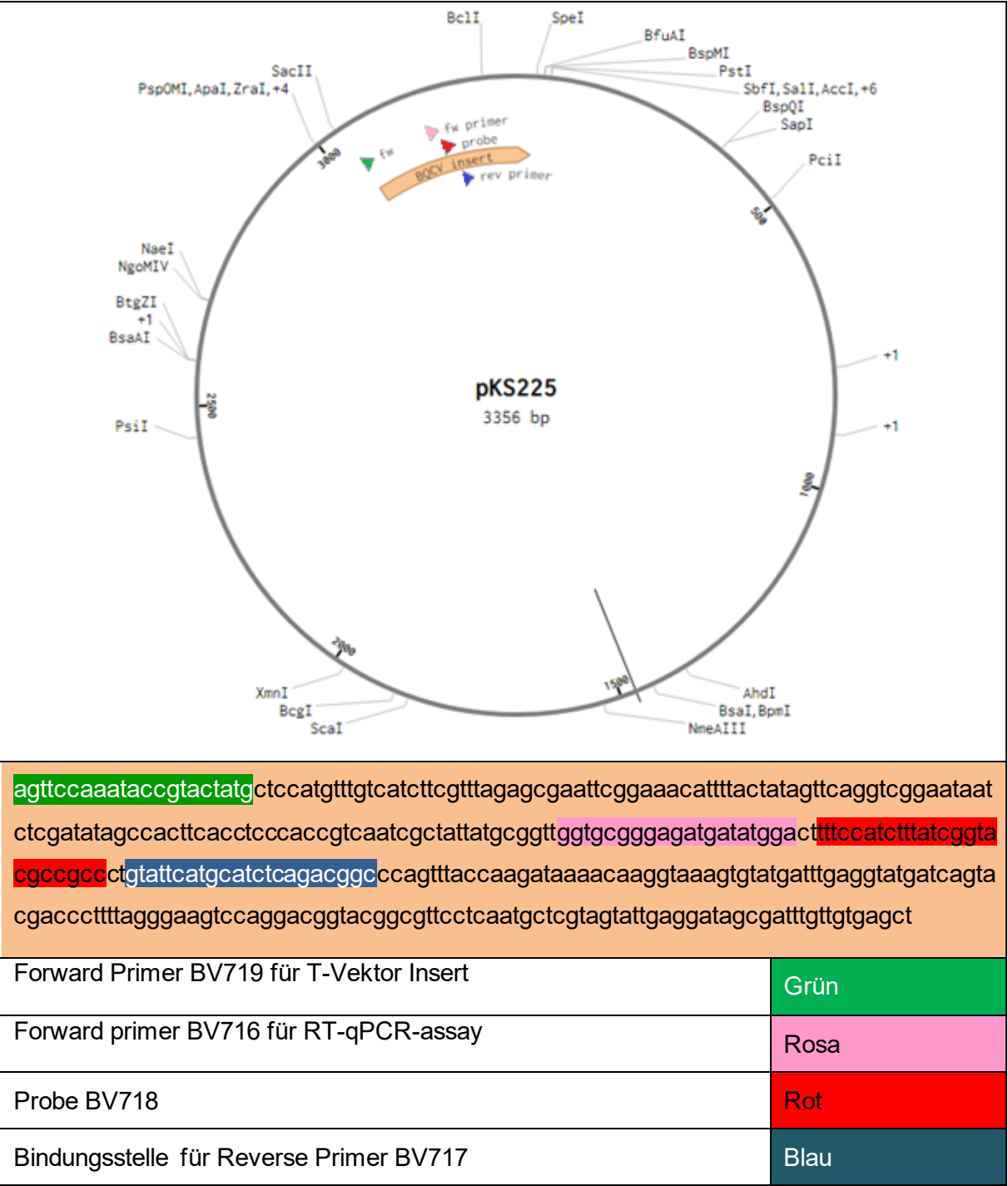
4.4. Etablierung der quantitativen RT-qPCR

Die Testung erfolgte mit Proben, die bereits in der ersten konventionellen PCR verwendet wurden: Probe 98, 109, 110, 113, 114, 969, 1456. Weiters wurde die DNA der Plasmide 1-6 und eine Negativkontrolle verwendet. Das Plasmid pKS 225 #5 diente als Positivkontrolle und war positiv. Zudem lieferten auch die klinischen Proben 109, 110, 114, 969 wie schon in der Konventionellen PCR ein positives Ergebnis.

4.5. **Positivkontrolle pKS 225**

Die Positivkontrolle der RT-qPCR für BQCV setzt sich aus dem T- Vektor pGEM-T easy und dem BQCV Insert zusammen, siehe Tab. 16.

Tabelle 16: Das im T-Vektor eingebaute BQCV-Insert (orange):



4.6. Bestimmung der Sensitivität der qPCR

Für die Bestimmung der Sensitivität der RT-qPCR wurde zuerst die Konzentration der Positivkontrolle pKS 225 mit dem Quantus™ Fluorometer gemessen. Diese ergab in der ersten Messung 39ng/ µl und 38 ng/µl in der zweiten Messung. Es wurde dann ein Mittelwert von 38,5 ng/ µl errechnet. Die erste Verdünnung (1:10) hatte eine Konzentration von 4,3 ng/µl (1.Messung) und 2,8 ng/µl (2.Messung). Daraus ergab sich 3,55 ng/µl im Mittelwert.

Die 1:100 Verdünnung belief sich in erster Messung auf 0,332 ng/µl, in 2. Messung auf 0,3 ng/µl und im Mittelwert auf 0,316 ng/µl.

Die seriellen Verdünnungen wurden jeweils im Duplikat angesetzt, um Fehlerquellen und Abweichungen zu minimieren.

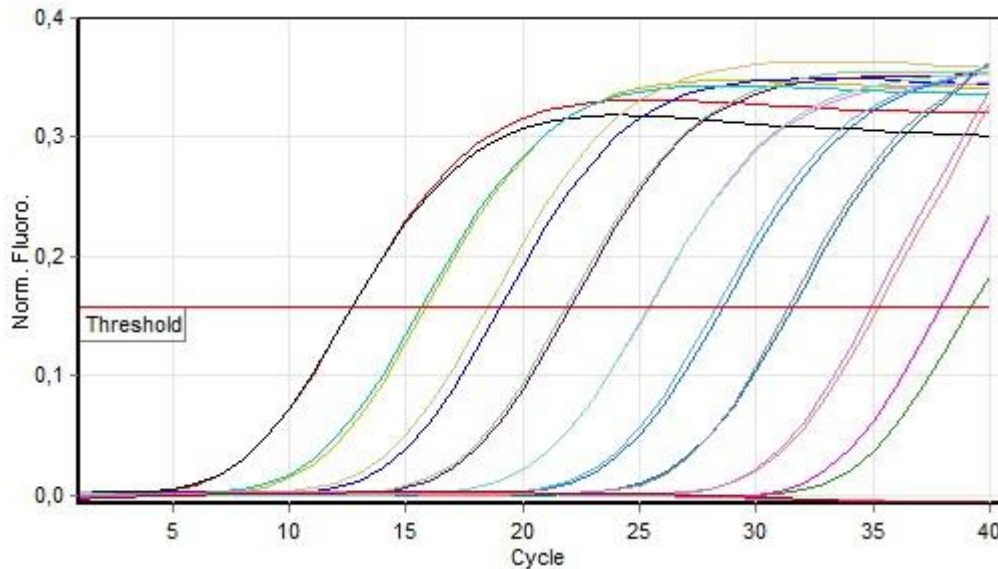


Abbildung 8 Sensitivität der RT qPCR, die Nachweisgrenze beträgt 10 Genomkopien pro µl.

Tabelle 17: Legende für Sensitivität RT-qPCR

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Konzentration Ge/ µl
1	■	pKS 225 BQCV pKO 1:10	Standard	12,73	1,10E+09
2	■	pKS 225 BQCV pKO 1:100	Standard	15,87	1,10E+08
3	■	pKS 225 BQCV pKO 1:1000	Standard	19,05	1,10E+07

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Konzentration Ge/ µl
4		pKS 225 BQCV pKO 1:10000	Standard	22,05	1,10E+06
5		pKS 225 BQCV pKO 1:100000	Standard	25,42	1,10E+05
6		pKS 225 BQCV pKO 1:1000 000	Standard	28,59	1,10E+04
7		pKS 225 BQCV pKO 1:10 000 000	Standard	31,58	1,10E+03
8		pKS 225 BQCV pKO 1:100 000 000	Standard	35,23	1,10E+02
9		pKS 225 BQCV pKO 1:1000 000 000	Standard	39,23	1,10E+01
10		pKS 225 BQCV pKO 1:10 000 000 000	Standard	37,89	1,10E+00
11		pKS 225 BQCV pKO 1:10	Standard	12,72	1,10E+09
12		pKS 225 BQCV pKO 1:100	Standard	15,68	1,10E+08
13		pKS 225 BQCV pKO 1:1000	Standard	18,52	1,10E+07
14		pKS 225 BQCV pKO 1:10000	Standard	21,87	1,10E+06
15		pKS 225 BQCV pKO 1:100000	Standard	25,40	1,10E+05
16		pKS 225 BQCV pKO 1:1000 000	Standard	28,28	1,10E+04
17		pKS 225 BQCV pKO 1:10 000 000	Standard	31,39	1,10E+03
18		pKS 225 BQCV pKO	Standard	34,94	1,10E+02

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Konzentration Ge/ µl
		1:100 000 000			
19		pKS 225 BQCV pKO 1:1000 000 000	Standard		1,10E+01
20		Ntc	NTC		

Die Anzahl an Kopien im Standard, also Genomäquivalente (GE), pro µl, wurden folgendermaßen berechnet:

$$\text{Genomkopien} / \mu\text{l} = \frac{38\text{ng} * 6,022 * 10^{23} \text{moleküle} / \text{mol}}{(3356 * 660\text{g} / \text{mol}) * 1 * 10^9 \text{ng} / \text{g}} \quad (41)$$

Tabelle 18: Genomkopien der Verdünnungsreihe der pKS 225

Verdünnung	Konzentration GE/ µl
1:10; 3,55 ng/µl	1,1*10 ⁹
1:10 ² ; 0,316 ng/µl	1,1*10 ⁸
1:10 ³	1,1*10 ⁷
1:10 ⁴	1,1*10 ⁶
1:10 ⁵	1,1*10 ⁵
1:10 ⁶	1,1*10 ⁴
1:10 ⁷	1,1*10 ³
1:10 ⁸	1,1*10 ²
1:10 ⁹	1,1*10
1:10 ¹⁰	1,1

Die Verdünnungsreihe war in der qPCR gut darstellbar, denn die Kurvenverläufe der verdünnten pKS 225 waren jeweils in regelmäßigem Abstand von ca. 3,3 Ct Werten (Siehe Abb. 8, Tab. 17). Die Duplikate der einzelnen Verdünnungen entsprachen einander, bis auf die 1:10⁹ Verdünnung, da in dieser die Konzentration der Positivkontrolle sehr gering war. Die 1:10¹⁰ Verdünnung konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Somit beträgt das Detektionslimit der RT-qPCR 11 Genomkopien/ µl (Siehe Tab. 18)

Ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Werte und dem statistischen Zusammenhang ist die Errechnung des Bestimmtheitsmaßes R². Hierfür wurde zunächst die Standardkurve in Tab. 9 erstellt, die den Zusammenhang zwischen Ct-Wert und Konzentration darstellt. Nun wird mittels dem R² Wert die Linearität dieser Geraden ermittelt. Der R² Wert betrug 0,990, dies sagt aus, dass der Zusammenhang nahezu linear ist und dementsprechend die Ergebnisse zuverlässig und replizierbar sind. Die Steigung der Standardkurve betrug -3,092 und dient der Berechnung der Effizienz der qPCR. Die Effizienz der PCR beschreibt den Idealzustand, dass mit jedem exponentiellen PCR-Zyklus die gesuchte DNA sich verdoppelt und liegt im Falle des BQCV Assays 105 % und wird mit der Formel $10^{(-1/-3,092)} - 1$ errechnet. (42)

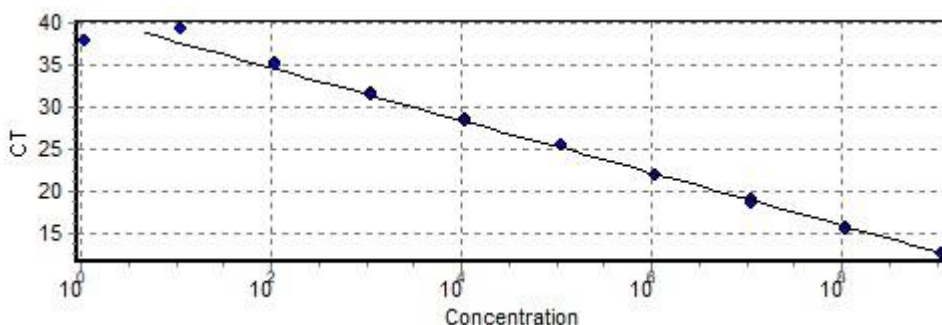


Abbildung 9: Standardkurve: Der R² Wert beträgt 0,990 und die Effizienz 105 %

4.7. Spezifität der RT-qPCR hinsichtlich anderer häufiger Bienenviren

Die Spezifität der RT-qPCR wurde mit drei BQCV-Verdünnungen, fünf anderen häufig vorkommenden Bienenviren-Plasmidstandards, einer Negativkontrolle (virusnegative Bienen) und Wasser (Non template control) durchgeführt. Da die Prävalenz vom Virus in Feldproben hoch ist, wurden zuerst mit den Plasmiden und den spezifischen Virussequenzen falsch positive Reaktionen ausgeschlossen.

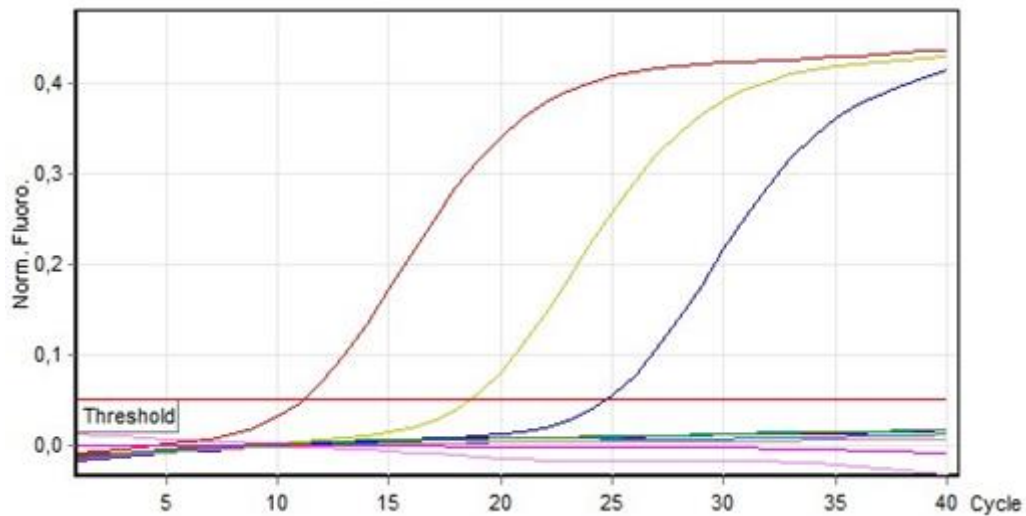


Abbildung 10: Die Spezifität der RTqPCR, nur die Standards für BQCV lieferten ein Ergebnis über dem Threshold

Tabelle 19: Legende für Spezifität RT-qPCR

Nr.	Farbe	Name	Typ	Ct	Genomkopien ge/ μ l
1		pKS 225, 1:100	Standard	11,13	1,100E+08
2		pKS 225, 1:10 000	Standard	18,66	1,100E+06
3		pKS 225, 1:1000 000	Standard	24,76	1,100E+04
4		Nko	NTC		
5		pKS 44 Flügeldeformationsvirus- B			
6		pKS 67 Chronisches Bienenparalyse Virus RNA 1			
7		pKS 74 Chronisches Bienenparalyse Virus RNA 2			
8		pKS 109 Akutes Bienenparalysevirus			
9		pKS 427 Flügeldeformationsvirus- A			
10		H2O			

Die Spezifität der RT-qPCR liegt bei den von uns untersuchten Kontrollen, bei 100 %, da nur die Standards für BQCV ein Ergebnis über dem, bei 0,05 angesetzten, Schwellenwert (engl. Threshold) liefern. Die Ergebnisse der Untersuchung des *Apis mellifera* β -Actin sind positiv. (Siehe Abb. 10, Tab. 19)

4.8. Duplex Reaktion mit gleichzeitigem quantitativen Nachweis von β -Actin der Honigbiene

Für den quantitativen Nachweis von Pathogenen zu diagnostischen Zwecken ist es notwendig eine interne Kontrolle mitzuführen, die Aussagen über die Qualität der Nukleinsäureextraktion und der PCR Reaktion zulässt. Als interne Kontrolle der RT-qPCR eignen sich vor allem Gene, die in allen Zellen regelmäßig exprimiert werden (sogenannte housekeeping genes) und dementsprechend mRNA nachweisbar ist. Weit verbreitet ist der Nachweis von β -Actin, das für das Zellskelett wichtig ist. β -Actin ist zwar gut konserviert, dennoch benötigt man für den Nachweis β -Actin von Bienen bienenspezifische Primer und Sonden. In der PCR-Reaktion der steirischen Bienenproben fiel das *Apis mellifera* β -Actin Ergebnis bei allen Bienenproben positiv aus, was auf korrekte Extraktionsschritte der Proben schließen lässt, siehe Abb. 12 und Tab. 20.

4.9. Validierung der BQCV qPCR mit klinischen Bienenproben

Hierfür wurden 43 sterische Bienenproben bestehend aus Völkern, die den Winter nicht überlebten und lebenden Völkern auf BQCV untersucht. Die Proben wurden zunächst homogenisiert, danach erfolgte die Extraktion der Nukleinsäuren und schließlich wurden sie in der qPCR untersucht.

Die Bienenproben wurden alle positiv auf BQCV getestet, wie in Abb. 11 und Tab. 20 dargestellt. Nur eine Probe (Nr. 556) überstieg den Grenzbereich für die Erkrankung, der mit 10^7 bis 10^8 RNA-Kopien pro Biene definiert ist (1). Alle anderen Proben waren schwach positiv.

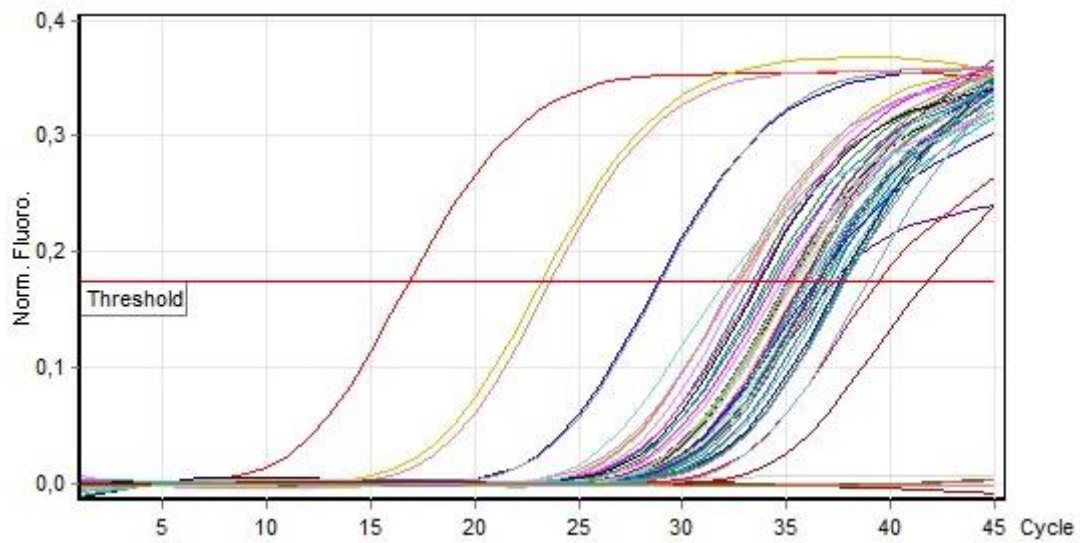


Abbildung 11: Die steirischen Bienenproben waren alle positiv in der RTqPCR

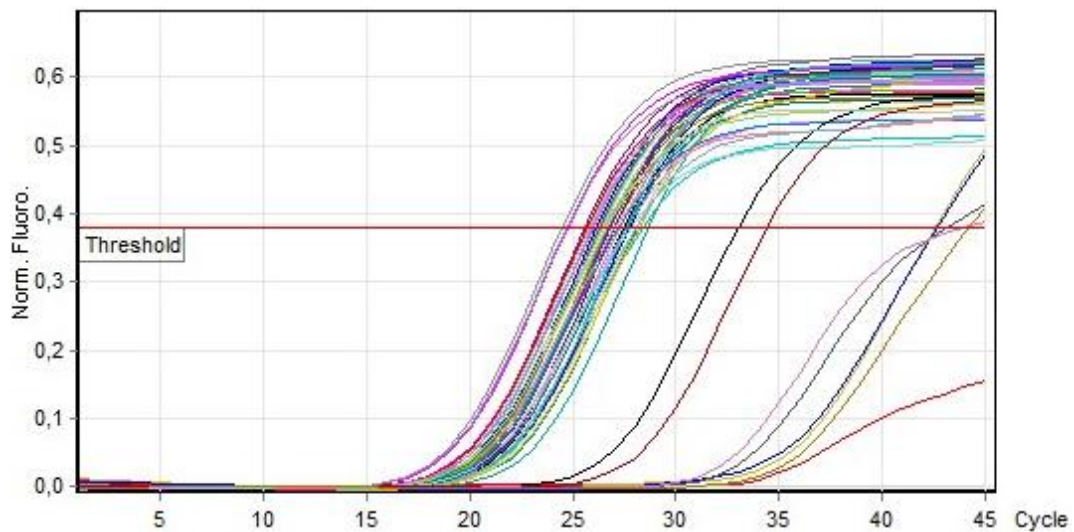


Abbildung 12: Die positiven Ergebnisse des β -Actins für die steirischen Bienenproben, einzig die Negativkontrolle (rot) bleibt unter dem Threshold.

Tabelle 20: Die Ergebnisse der PCR zusammen mit dem Zustand (Status Volk lebend/tot) und den Genomäquivalenten pro Biene

Farbe	Probe	Calc copies	GE/Biene		Farbe	Probe	Calc copies	GE/Biene	
	542	1,34E+03	1,79E+05	lebend		533	2,59E+02	3,45E+04	lebend
	554	1,27E+02	1,69E+04	lebend		534	2,10E+04	2,80E+06	lebend
	555	1,02E+03	1,36E+05	lebend		536	9,93E+01	1,32E+04	lebend
	556	8,22E+05	1,10E+08	lebend		537	1,56E+01	2,08E+03	lebend
	557	6,25E+02	8,33E+04	lebend		538	1,66E+03	2,21E+05	lebend
	558	4,77E+02	6,37E+04	lebend		539	1,22E+02	1,63E+04	lebend
	559	2,77E+02	3,70E+04	lebend		540	1,12E+02	1,49E+04	lebend
	560	9,35E+01	1,25E+04	lebend		576	3,75E+02	5,00E+04	lebend
	561	1,22E+02	1,63E+04	lebend		577	5,49E+02	7,32E+04	lebend
	562	2,62E+02	3,50E+04	lebend		578	1,18E+02	1,57E+04	lebend
	565	9,96E+01	1,33E+04	lebend		538	1,61E+03	2,15E+05	lebend
	566	6,44E+01	8,58E+03	lebend		544	4,71E+01	6,28E+03	lebend
	569	1,50E+02	2,00E+04	lebend		545	8,64E+02	1,15E+05	tot
	575	2,79E+02	3,72E+04	lebend		546	8,15E+02	1,09E+05	tot
	577	1,95E+02	2,60E+04	lebend		548	1,67E+02	2,23E+04	tot
	581	1,75E+02	2,33E+04	lebend		549	2,44E+02	3,25E+04	tot
	582	2,98E+02	3,98E+04	lebend		550	2,98E+02	3,97E+04	tot
	584	5,10E+01	6,80E+03	lebend		551	2,44E+03	3,25E+05	tot
	585	7,95E+01	1,06E+04	lebend		552	2,20E+01	2,94E+03	tot
	586	5,53E+01	7,37E+03	lebend		553	4,56E+01	6,08E+03	tot
	590	3,18E+02	4,24E+04	lebend		547	1,83E+03	2,44E+05	tot
	593	1,88E+02	2,51E+04	lebend					

Weiters wurden die Genomäquivalente pro Biene nach folgender Rechnung berechnet.

$1GE \triangleq 1 \mu\text{l Extrakt}$

$300 \mu\text{l} \triangleq 300GE$

$80 \mu\text{l} \triangleq 300GE$

in $1 \mu\text{l}$ für PCR

$\triangleq 3,75GE$

$1 \text{ Biene} = 500 \mu\text{l PBS}$

$$\frac{500}{3,75} = 133,34$$

In einem μl Extrakt ist ein Genomäquivalent, also sind in $300 \mu\text{l}$ für die Extraktion verwendeten Bienenhomogenats $300GE$. Durch die Extraktion entstanden daraus $80 \mu\text{l}$ Eluat. Dementsprechend sind in einem μl , der in der PCR eingesetzt wurde, $3,75GE$.

Eine Biene befindet sich in $500 \mu\text{l PBS}$. Es müssen also, um die Genomäquivalente pro Biene zu berechnen, die gezählten BQCV-Kopien jeder Bienenprobe durch den Faktor $133,34$ dividiert werden.

4.10. Sensitivitätsvergleich der BQCV qPCR mit der konventionellen RT-PCR

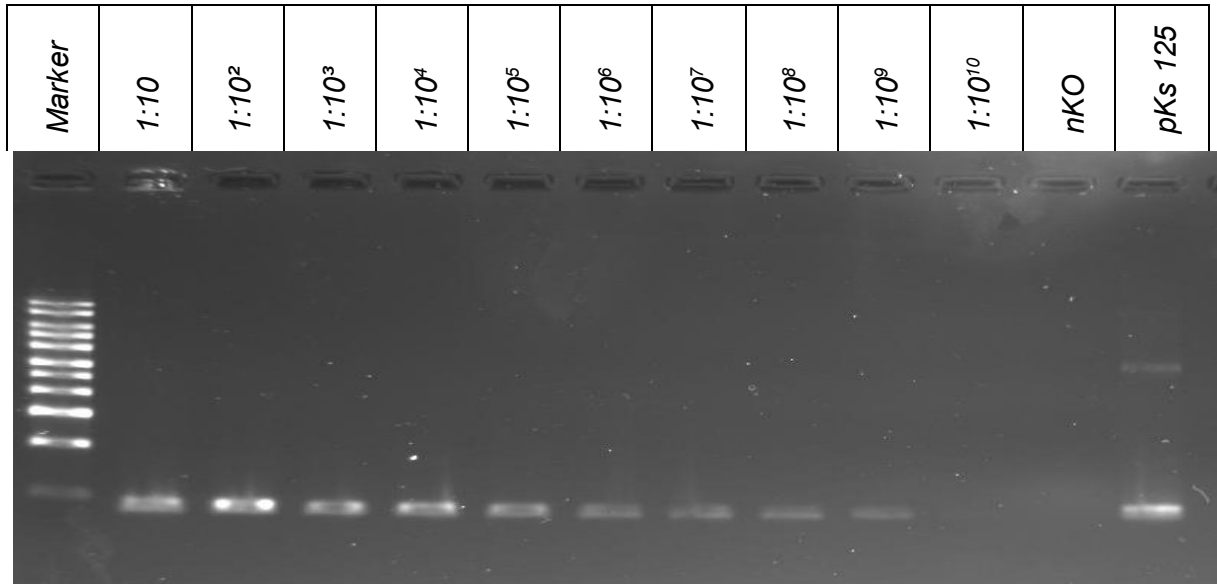


Abbildung 13: Die Sensitivität der konventionellen PCR mit einem Detektionslimit von 14 Genomkopien/ μ l

Im Verlauf der Arbeit wurde ein Vergleich zwischen der konventionellen PCR und der qPCR durchgeführt, da die Hypothese aufgestellt wurde, dass die qPCR sensitiver wäre, da zu Anfang der Arbeit nur sehr wenige Proben konventionell positiv auf BQCV getestet wurden (siehe Abb. 4). Die Positivkontrolle der konventionellen PCR pKS 125 beinhaltet 384 Basenpaare und die pKS 225 der qPCR beinhaltet 29 Basenpaare.

Für die RT-PCR der Verdünnungsreihe der pKS 125 wurde ein Ansatz für 12 Proben hergestellt. Die Untersuchung der Sensitivität der konventionellen RT-PCR ergab, dass in der konventionellen PCR das Insert bis inklusive der 1:10⁹ Verdünnung der Positivkontrolle 125 nachgewiesen werden kann.

Für die Verdünnungsreihe der pKS 125 wurde auch die Konzentration der Genomäquivalente pro μ l berechnet. Das unverdünnte Plasmid pKS 125 hatte eine Konzentration von 55 ng / μ l. Die Nachweisgrenze, siehe Abb. 13, lag bei der 1:10⁹ Verdünnung und das Detektionslimit der konventionellen PCR beträgt 14 Genomkopien / μ l (Siehe Tab. 21).

$$\text{Genomkopien/ } \mu\text{l} = \frac{55\text{ng} * 6,022 * 10^{23} \text{moleküle/mol}}{(3390 * 660\text{g/mol}) * 1 * 10^9 \text{ng/g}} \quad (41)$$

Tabelle 21: Genomkopien der Verdünnungsreihe der pKS 125

Verdünnung pKS 125	Konzentration ge/ μl
1:10	$1,48 * 10^9$
1:10 ²	$1,48 * 10^8$
1:10 ³	$1,48 * 10^7$
1:10 ⁴	$1,48 * 10^6$
1:10 ⁵	$1,48 * 10^5$
1:10 ⁶	$1,48 * 10^4$
1:10 ⁷	$1,48 * 10^3$
1:10 ⁸	$1,48 * 10^2$
1:10 ⁹	$1,48 * 10$
1:10 ¹⁰	1,48

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Validierung des RT-qPCR Duplex-Assays für das *Schwarze Königinnenzellenvirus*. Das Assay wurde mit *Apis mellifera* β -Actin als interne Kontrolle im Duplexansatz entwickelt und mittels Spezifitäts- und Sensitivitätsüberprüfung validiert. β -Actin diene als reine Extraktionskontrolle, es gab keine klonierte β -Actin Positivkontrolle.

Anschließend wurden mithilfe des etablierten BQCV-Assays⁴³ steirische Honigbienenproben, bestehend aus Winterverlust- und lebendigen Völkern untersucht. Winterverlustvölker sind Bienenvölker, die den Winter nicht überlebt haben und lebende Völker sind jene, die den Winter überlebt haben und die von ImkerInnen für die Beprobung entweder als Totenfallsbienen oder im Rahmen einer Bienenprobe entnommen wurden. Totenfallsbienen sind jene Bienen, die tot vor dem Stock aufgefunden wurden, denn Bienen verlassen aus hygienischen Gründen den Stock, um zu sterben und außerdem werden tote Bienen von anderen Bienen aus dem Stock getragen. (40)

Es wurden alle 43 Proben positiv auf BQCV getestet, wobei im Vorfeld kein Verdacht auf BQCV vorlag. Der Mittelwert der Viruslast der untersuchten steirischen Bienenvölker lag bei $2,67 \cdot 10^6$ Genomkopien pro Biene. Der für eine klinische Auswirkung festgesetzte Grenzwert beträgt 10^7 bis 10^8 RNA-Kopien pro Biene (1,6). Dieser Grenzwert wurde nur in einem einzigen Fall überschritten (Probe 556, $1,10 \cdot 10^8$). Hinsichtlich der Virus-Prävalenz konnte also bestätigt werden, dass BQCV eine hohe Prävalenz aber eine geringe Morbidität zeigt. Diese hohen Prävalenzen mit niedrigen Virustitern sind, unter anderem, im Einklang mit den Ergebnissen des Virenmonitorings der AGES im Rahmen des drittmittelfinanzierten Projekts Zukunft Biene 2(1). Aber auch in anderen Ländern konnte das durch Studien belegt werden. (43)

5.1. BQCV-Viruslast der Winterverlustvölker

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des *Schwarzen Königinnenzellenvirus* in steirischen Bienenvölkern im Hinblick auf die Hypothese „Die Viruslast von BQCV ist in Winterverlustvölkern höher als in jenen, die den Winter überlebt haben“ untersucht.

Der Winter ist für Honigbienen eine heikle Phase, denn sie sind auf Nahrungsvorräte angewiesen und müssen die Wärme des Bienenstocks aufrechterhalten. Die Größe des

Bienenvolkes ist im Winter entscheidend, denn beinhaltet es, beispielsweise durch eine Brutkrankheit, weniger als 5000 Bienen, ist die Gefahr des Versterbens im Winter sehr groß, auch wenn genügend Futter vorrätig ist. Außerdem müssen Winterbienen bis zu sechs Monate überleben und daher möglichst gesund und pathogenarm aufgezogen werden. Die Wintersterblichkeit der Honigbiene ist ein weltweites Problem und begünstigende Faktoren sind beispielsweise die Gesundheit, Genetik und die Verfassung der Königin, denn tendenziell überleben Völker mit jüngeren Königinnen den Winter öfter. Auch ein Verlust der Königin, durch Bekämpfung der Varroa mittels Ameisensäure führt zum Versterben des Bienenvolkes im Winter. (44,45)

Im Jahr 2020 waren in Österreich 31.923 ImkerInnen, mit insgesamt 426.121 Bienenvölkern gemeldet. In einer Winterverlustumfrage der Universität Graz, wurden 26.405 Bienenvölker im Winter 2020/2021 eingewintert. Davon war im Frühjahr 2021 ein Anteil von 8,9 % Winterverlustvölker. (1,46)

In einer Studie von Dainat et al. in der Schweiz ist im Jahr 2007 in Winterverlustvölkern gegenüber Lebendvölkern die BQCV-Prävalenz ca. 10 % höher gewesen, in dieser Studie wurden 29 Völker untersucht, davon waren 13 Winterverlustvölker. (23,47)

In der vorliegenden Arbeit wurden 43 Bienenproben unterschiedlicher ImkerInnen untersucht. Die Proben bestanden aus 9 Winterverlustvölkern, 34 lebenden Völkern. Probe 556, die als einzige mit $1,10 \cdot 10^8$ GE pro Biene über dem Grenzwert für eine klinische BQCV-Erkrankung lag, zählt zu den lebenden Völkern. Leider ist unbekannt, ob in diesem Bienenvolk die charakteristischen dunklen Weiselzellen und tote Larven im Brutnest zu sehen waren bzw. wie sich das Volk nach der Auswinterung weiterentwickelt hat. Als Brutkrankheit können auch Arbeiterinnen- und Drohnenlarven befallen sein, sterben und sich dunkel verfärben.

Zwischen den lebenden und toten Bienenvölkern zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Der Mittelwert der Genomäquivalente pro Biene der Winterverlustvölker war $9,96 \cdot 10^4$ und der von den lebenden Völkern $3,35 \cdot 10^6$. Beide Werten liegen unter dem Grenzbereich für klinische Anzeichen einer Viruserkrankung und zeigen eine ähnlich niedrige Viruslast. Die Viruslast der Winterverlustvölker ist sogar geringer als bei den lebenden Völkern, was wahrscheinlich an der einer zu geringen Probenzahl der Winterverlustvölker liegt. Somit ist es nicht möglich, die Hypothese über das vermehrte Vorkommen einer höheren BQCV-

Viruslast in Winterverlustvölkern zu bestätigen, jedoch ist im Projekt Zukunft Biene 2 eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Winterverlusts bei steigendem Virustiter im Random-Forest-Model dargestellt, siehe Abb. 14. Allerdings ist die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben auch relativ gering und unter Umständen nicht repräsentativ, um die Hypothese ausreichend zu überprüfen.

Insbesondere die Anzahl der Winterverlustvölker ist mit n=9 sehr gering. (1)

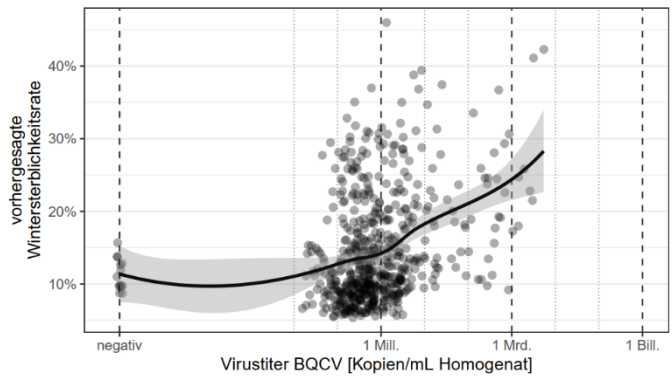


Abbildung 14 Die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes steigt stetig, aber flach mit wachsendem BQCV-Virustiter (1).

5.2. Zusammenhang von BQCV und der Varroamilbe

Die Prävalenz von BQCV steigt von Frühjahr bis Sommer an, fällt im Herbst stark ab und steigt in den Wintermonaten wieder an, wodurch die Relevanz der Varroa Übertragung zu hinterfragen ist. Im Zusammenhang mit der Varroamilbe wurde in einer Studie von Tentcheva et al. in Frankreich geforscht. Jedoch wurde in dieser Publikation in keiner Varroamilbe der 195 Proben BQCV nachgewiesen. (32)

Anders verhielt es sich in einer Thailändischen Studie, von Chantawannakul et al., in der BQCV als eines der Viren, die häufig in der Varroamilbe vorkommen (11/20 Proben), jedoch mit hohen CT Werten, und niedriger Viruslast eruiert wurde. (20)

5.3. Sensitivitätsvergleich

Für die Validierung des neu etablierten BQCV RT-qPCR Assays wurde ein Sensitivitätsvergleich zwischen der RT-qPCR und der konventionellen PCR durchgeführt.

In den Ergebnissen wurde die Sensitivität der RT-qPCR und der konventionellen PCR über Verdünnungen der jeweiligen Positivkontrolle eruiert. Für die RT-qPCR war dies die pKS 225 und im Falle der konventionellen die pKS 125. In beiden Fällen gelang der positive Nachweis bis 11 Genomkopien/ µl bzw. 14 Genomkopien/ µl.

Dieses Ergebnis muss allerdings kritisch hinterfragt werden, denn der Nachweis eines Plasmids mittels PCR ist der „Idealzustand“ und nur bedingt mit klinischen Proben vergleichbar, denn Plasmide müssen nicht wie Bienenproben Extraktionsschritte durchlaufen, in denen z.B. Nukleinsäuren verloren gehen können. Zusätzlich muss keine Reverse Transkription durchgeführt werden, da Plasmide DNA enthalten. In der Praxis könnte also bei Proben das Detektionsminimum unter dem des Plasmides liegen.

Ein Hinweis hierfür könnte sein, dass zu Beginn der Arbeit, als für die Generierung der Positivkontrolle des BQCV-Assays Bienenvölker der Diagnostik der Veterinärmedizinischen Universität mit der konventionellen PCR beprobt wurden, die konventionelle PCR mehrmals durchgeführt werden musste, da keine Proben positiv auf BQCV getestet wurden.

5.4. Nutzen der Arbeit

Die Rolle des *Schwarzen Königinnenzellenvirus* für die Zukunft bleibt ungewiss. Die hohen Prävalenzen von über 90 % in Österreich könnten bei Mutationen und Rekombination oder bei Veränderung im Zusammenhang mit der Varroamilben-Übertragung, zum Problem werden und die Virulenz beeinflussen. (1,14)

Gegenwärtig spielt das Virus eine Rolle in der Königinnenzucht, und in der erschwerten Nachzucht einer neuen Königin durch die Arbeiterbienen, wenn andere Pathogene und Stressfaktoren das Volk schwächen (48). Wissenschaftliche Untersuchungen über den Einfluss gibt es allerdings leider kaum.

Aus diesen Gründen ist es bedeutend, mehr über das *Schwarze Königinnenzellenvirus* zu forschen und die Entwicklung des Virus zu verfolgen. Seit diesem Jahr wird in diesem Sinne die RT-qPCR Untersuchung auf Black Queen Cell Virus mit EU-Mitteln im Rahmen der „Sonderrichtlinie Imkereiförderung 2023-2027“ gefördert.

Durch diese Arbeit kann die quantitative RT-PCR auch in der Diagnostik der Vetmeduni Vienna durchgeführt werden. Diese kann nun weitreichend angewendet werden, um den Gesundheitszustand von Bienenvölkern zu kontrollieren und damit die Ernährungssicherheit zu gewährleisten.

6. Literaturverzeichnis

1. Robert Brodschneider, Katharina Etter, Antonia Griesbacher, Hemma Köglberger, Benjamin Lamp, Rudolf Moosbeckhofer, et al. Zukunft Biene 2-Grundlagenforschungsprojekt zur Förderung des Bienenschutzes und der Bienengesundheit [Internet]. 2021 [cited 2024 Nov 25]. Available from: <http://www.zukunft-biene.at/>
2. Kearns C, Inouye D, Waser N. ENDANGERED MUTUALISMS: The Conservation of Plant-Pollinator Interactions. *Annu Rev Ecol Syst.* 1998;83–112.
3. Switanek M, Crailsheim K, Truhetz H, Brodschneider R. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Science of the Total Environment.* 2017 Feb 1;579:1581–7.
4. Neov B, Georgieva A, Shumkova R, Radoslavov G, Hristov P. Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity (Basel).* 2019;11(12):1–16.
5. Allen M, Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World.* 1996;77(3):141–62.
6. European Union Reference Laboratory for Bee Health EURL for BH, Sophia Antipolis Laboratory. Standard operating procedure: Detection and Quantification of the Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), the Black Queen Cell Virus (BQCV), the Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), the Deformed Wing Virus (DWV-A & DWV-B), and the Sacbrood Virus (SBV) by real-time RT-PCR [Internet]. 2022 [cited 2024 Aug 29]. Available from: https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/Protocol_Instructions_ABPV_BQCV_CBPV_DWV-A-B_SBV_RT-qPCR.pdf
7. Valles SM, Chen Y, Firth AE, Guérin DMA, Hashimoto Y, Herrero S, et al. ICTV virus taxonomy profile: Dicistroviridae. *Journal of General Virology.* 2017 Mar 1;98(3):355–6.
8. Procházková M, Škubník K, Füzik T, Mukhamedova L, Přidal A, Plevka P. Virion structures and genome delivery of honeybee viruses. *Curr Opin Virol.* 2020 Dec 1;45:17–24.

9. Agirre J, Aloria K, Arizmendi JM, Iloro I, Elortza F, Sánchez-Eugenia R, et al. Capsid protein identification and analysis of mature *Triatoma* virus (TrV) virions and naturally occurring empty particles. *Virology*. 2011 Jan 5;409(1):91–101.
10. Squires G, Pous J, Agirre J, Rozas-Dennis GS, Costabel MD, Marti GA, et al. Structure of the *Triatoma* virus capsid. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013 Jun;69(6):1026–37.
11. Bailey L, Woods RD. Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and Acute Bee-Paralysis Viruses. *J gen ViroL*. 1977;37.
12. Black queen cell virus Taxonomy - PubChem [Internet]. 2021 [cited 2023 Aug 14]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/92395>
13. Spurny R, Přidal A, Pálková L, Kiem HKT, de Miranda JR, Plevka P. Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honeybee Pathogen. *J Virol*. 2017 Mar 15;91(6).
14. Tapasztai Z, Forgách P, Kovágó C, Topolska G, Nowotny N, Rusvai M, et al. Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes. *Vet Microbiol*. 2009 Nov 18;139:227–34.
15. Bailey L, Ball BV. VIRUSES. In: *Honey Bee Pathology*. Elsevier; 1991. p. 10–34.
16. Aurori AC, Bobiş O, Dezmirean DS, Mărghițaș LA, Erler S. Bay laurel (*Laurus nobilis*) as potential antiviral treatment in naturally BQCV infected honeybees. *Virus Res*. 2016 Aug 15;222:29–33.
17. Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*. 2006 Jul;92:152–9.
18. Johnson RM, Evans JD, Robinson GE, Berenbaum MR. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *PNAS*. 2009;106:14790–5.
19. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One*. 2009 Aug 3;4(8).
20. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol*. 2006;91:69–73.

21. Amdam G V, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt SW. Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *J Econ Entomol.* 2004;97(3):741–7.
22. Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbronson C, Mowery JD, Cohen A, et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *PNAS.* 2019 Jan 29;116(5):1792–801.
23. Bailey L, Ball B V, Perry JN. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Association of Applied Biologists.* 1983;103:13–20.
24. Highfield AC, El Nagar A, Mackinder LCM, Noël LMLJ, Hall MJ, Martin SJ, et al. Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Nov 1;75(22):7212–20.
25. Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol.* 2010 Jan;103(SUPPL. 1):73–9.
26. Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RFA, Paxton RJ. Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol.* 2015 Apr 1;17(4):969–83.
27. Niu J, Meeus I, Cappelle K, Piot N, Smagghe G. The immune response of the small interfering RNA pathway in the defense against bee viruses. Vol. 6, *Current Opinion in Insect Science.* Elsevier Inc.; 2014. p. 22–7.
28. Klowden MJ. Circulatory Systems. In: *Physiological Systems in Insects.* Elsevier; 2013. p. 365–413.
29. Damiani N, Fernández NJ, Porrini MP, Gende LB, Álvarez E, Buffa F, et al. Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: Antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitol Res.* 2014 Feb;113:701–9.
30. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012 Apr;23:174–81.
31. Freiberg MAT. EXPLORING THE IMPACT OF THE ANTIVIRAL DRUG RIBAVIRIN ON RNA VIRUSES IN HONEY BEES AND THE PRESENCE OF RNA VIRUSES IN BEES IN BRAZIL. 2012.

32. 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. *Appl Environ Microbiol*. 2004 Dec;70(12):7185–91.
33. Leat N, Ball B, Govan V, Davison S. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cellvirus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*. 2000;81:2111–9.
34. Bayrhuber H, Hauber W, Kull U, Linder H, Knodel H. *Linder Biologie: Lehrbuch für die Oberstufe. Gesamtband*. 23rd ed. Westermann Gruppe; 2010.
35. Reinard T 1963, Uni-Taschenbücher GmbH. *Molekularbiologische Methoden 2.0*. 2018.
36. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. SURVEY AND SUMMARY SURVEY AND SUMMARY Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(6):1292–305.
37. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169–93.
38. Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol*. 2005 Jan;71(1):436–41.
39. Joshi CJ, Ke W, Drangowska-Way A, O'Rourke EJ, Lewis NE. What are housekeeping genes? *PLoS Comput Biol*. 2022 Jul 1;18(7):1–19.
40. Ritter W. *Bienen gesund erhalten : Krankheiten vorbeugen, erkennen und behandeln*. Eugen-Ulmer-Verlag; 2021.
41. Ellen Prediger PFSSWIDT. Calculations: Converting from nanograms to copy number [Internet]. 2013 [cited 2023 Jul 31]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/calculations-converting-from-nanograms-to-copy-number>
42. Thermo Fisher Scientific [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 2]. Real-time PCR handbook. Available from: <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

43. Šimenc L, Knific T, Toplak I. The comparison of honeybee viral loads for six honeybee viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in healthy and clinically affected honeybees with TaqMan quantitative real-time RT-PCR assays. *Viruses*. 2021 Jul 1;13:1–17.
44. Brodschneider R, Brus J, Danihlík J. Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agric Ecosyst Environ*. 2019 Mar 15;274:24–32.
45. Genersch E, Von Der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, et al. The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 2010 May;41:332–52.
46. Winterverluste 2021/22: Gesamtergebnis [Internet]. [cited 2024 Nov 27]. Available from: <https://bienenstand.at/uncategorized/winterverluste-202122-gesamtergebnis/>
47. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One*. 2012 Feb 23;7(2):1–9.
48. De Grandi-Hoffman G, Chen Y, Simonds R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects*. 2013;4:71–89.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Das Kapsid von BQCV(13).....	10
Abbildung 2: Darstellung des Aufbaus der Picornaviridae anhand des Grillen-Paralyse-Virus. Es gliedert sich in 2 offene Leserahmen (ORF). Der ORF 1 codiert Nichts-Struktur-Proteine und ORF2 enthält die genetischen Informationen für das Kapsid Polyprotein.(7).....	11
Abbildung 3: Plasmidpräparation (35)	24
Abbildung 4 Gelelektrophorese der konventionellen BQCV PCR auf verschiedene Bienenproben.	31
Abbildung 5: Probe 109 in der konventionellen PCR mit den Primern BV719 und BV720, Bande bei 300Bp.....	32
Abbildung 6 Kolonie PCR: 24 Kolonien wurden auf den Einbau der Plasmids DNA überprüft. Bei Kolonie der Plasmidpräparation 5 und 23 wurden das BQCV-Insert und der Vektor integriert, die anderen Proben enthielten nur den Vektor.	32
Abbildung 7: Restriktionsverdau, Plasmidreinigung 5 hatte mit beiden Restriktionsenzymen das Plasmid mit BQCV-Insert eingebaut	34
Abbildung 8 Sensitivität der RT qPCR, die Nachweisgrenze beträgt 10 Genomkopien pro µl. ...	36
Abbildung 9: Standardkurve: Der R2 Wert beträgt 0,990 und die Effizienz 105 %	39
Abbildung 10: Die Spezifität der RTqPCR, nur die Standards für BQCV lieferten ein Ergebnis über dem Threshold	40
Abbildung 11: Die steirischen Bienenproben waren alle positiv in der RTqPCR	42
Abbildung 12: Die positiven Ergebnisse des β -Actins für die steirischen Bienenproben, einzig die Negativkontrolle (rot) bleibt unter dem Threshold.	42

Abbildung 13: Die Sensitivität der konventionellen PCR mit einen Detektionslimit von 14 Genomkopien/ μ l	44
--	----

Abbildung 14 Die Wahrscheinlichkeit eines Winterverlustes steigt stetig, aber flach mit wachsendem BQCV-Virustiter (1).	48
---	----

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Materialien und Herstellerangaben	15
Tabelle 2: Mastermix für Reverse Transkriptase PCR zum Nachweis von BQCV	18
Tabelle 3: Primer der konventionellen PCR aus Tentcheva et al.(32)	18
Tabelle 4: PCR-Programm der konventionellen PCR für BQCV mit den Primern BV532 und BV533	19
Tabelle 5: Primer zur Erstellung der Positivkontrolle	20
Tabelle 6: PCR-Programm mit den Primern BV719 und BV720	21
Tabelle 7: Die Ligation für die T-Vektor Klonierung	22
Tabelle 8: Kolonie PCR Ansatz	23
Tabelle 9: Restriktionsverdau zur Überprüfung der Plasmide durchgeführt	26
Tabelle 10: Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme	26
Tabelle 11: Herstellung der Sequenzierungsreaktion	26
Tabelle 12: Mastermix für die Singleplex Reverse Transkriptase qPCR	27
Tabelle 13: Mastermix für die Duplex Reverse Transkriptase qPCR	28

Tabelle 14: PCR-Programm für Duplex RT-qPCR BQCV und <i>Apis mellifera</i> β-Actin.....	28
Tabelle 15: Primer und Sonden Sequenzen für RT-qPCR.....	29
Tabelle 16: Das im T-Vektor eingebaute BQCV-Insert (orange):	35
Tabelle 17: Legende für Sensitivität RT-qPCR.....	36
Tabelle 18: Genomkopien der Verdünnungsreihe der pKS 225	38
Tabelle 19: Legende für Spezifität RT-qPCR.....	40
Tabelle 20: Die Ergebnisse der PCR zusammen mit dem Zustand (Status Volk lebend/tot) und den Genomäquivalenten pro Biene	43
Tabelle 21: Genomkopien der Verdünnungsreihe der pKS 125	45

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst beim ganzen Team der Virologie und meinen BetreuerInnen, Dr. med. vet. Kerstin Seitz und Univ. Prof. Dr. vet. med. Till Rümenapf, und meinem Gutachter Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn Johannes Novak für ihr Engagement und große Hilfe bedanken. Für die Unterstützung der praktischen Arbeit möchte ich mich besonders bei Mag. Kati Szakmary-Brändle, die mir immer helfend zur Seite gestanden ist, bedanken.