Tierärztl. Umschau 62, 467 – 479 (2007)

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

BVD-Ringtest 2006 – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der BVD-Diagnostik

von H. Schirrmeier und J. P. Teifke

(2 Abbildungen, 8 Tabellen, 4 Literaturangaben)
Kurztitel: *BVD-Ringtest*
Stichworte: *BVD – Diagnostik – Ringtest – Referenzlabor*

Zusammenfassung
Im Herbst 2006 wurde vom Nationalen Referenzlabor für BVD/MD ein bundesweiter Ringversuch zur Labordiagnostik der BVD durchgeführt, an dem insgesamt 38 Laboratorien, darunter auch mehrere aus dem Ausland teilgenommen haben. Es wurden identische Probenpanel, bestehend aus 23 Serumproben, 4 Ohrstanzproben und 2 Kryostatschnitte, in codierter Form an alle Teilnehmer mit der Bitte versandt, diese in einem vorgegebenen Zeitraum mit den in der Routine angewandten Methoden zu untersuchen. Die Ergebnisse werden im Beitrag mitgeteilt und kommentiert. Der Ringtest bestätigt den guten Stand der BVD-Labordiagnostik und die Qualität der eingesetzten Testkits, aber auch ebenso die Notwendigkeit der »Pflege« klassischer virologischer Verfahren.

Abstract
BVD-inter-laboratory comparison trial 2006 – a contribution to quality assurance in BVD diagnosis
Key words: BVD – diagnosis – ring test – reference laboratory
Thirty-eight national and international laboratories, participated in an inter-laboratory comparison trial (ring test) organized by the German National Reference Laboratory for BVD/MD. Identical sets of 29 coded samples (23 sera, 4 ear not ches and 2 cryosections) were provided with a request for the laboratories for testing using antigen, antibody or genome detection methods as diagnostic techniques. The results indicated the high standard of BVD laboratory diagnosis, and the quality of the commercial test kits. However, it was evident, that »classical« virological methods such as virus isolation and neutralization assays need to be practiced.

1 Einleitung

Beteiligung an Ringtesten ist für Untersuchungslabore Teil des Qualitätsmanagementsystems und dient sowohl der Eigenkontrolle (wichtigstes Element) als auch dem Nachweis der Kompetenz des Labors bei der Beherrschung valider Testverfahren, was sich letztlich u. a. in der formalen Akkreditierung widerspiegelt. Somit ist ein Ringtest Teil eines externen und internen Programms zur Gewährleistung der Qualität in der Tierseuchendiagnostik. Darüber hinaus liefert er für das Nationale Referenzlabor (NRL) als Organisator wertvolle Informationen zur

Tabelle 1: Ringtestproben, Status und zu erwartende Resultate

A: Referenzen NRL

Probe	Charakteristik	Status	NT	AK-ELISA	AG-ELISA	PCR	Zellkultur
A1	NRL-ref3	AK+/AG-	64 (Typ2)	pos			
A2	NRL-ref2	AK+/AG-	64 (Typ1)	pos			
A3	NRL-ref1	AK+/AG-	>256 (typ1)	pos			

B: Verdünnungsreihen einer PI-Probe (NRL-Referenz) in Negativserum bzw. Immunserum zur Ermittlung des Detektionslimits (analytische Sensitivität)

Probe	Charakteristik	Status	NT	AK-ELISA	AG-ELISA	PCR	Zellkultur
A8	PI809	AK-/Ag+	neg	neg	pos	pos	pos
A9	PI809, 1:10	AK-/Ag+	neg	neg	pos	pos	pos
A10	PI809, 1:100	AK-/Ag+	neg	neg	Prüfung Detektionslimit		
A11	PI809, 1:1000	AK-/Ag+	neg	neg	Prüfung Detektionslimit		
A18	PI809, 1:10	AK+/Ag+	pos	pos	neg	pos	neg
A15	PI809, 1:100	AK+/Ag+	pos	pos	Prüfung Detektionslim		neg
A16	PI809, 1:1000	AK+/Ag+	pos	pos	Prüfung Detektionslim		neg

C: Feldseren

Probe	Charakteristik	Status	NT	AK-ELISA	AG-ELISA	PCR	Zellkultur
A4	Feldserum-neg	AK-/AG-	neg	neg			
A5	Feldserum-pos	AK+/AG-	>256 /(Typ1)	pos			
A6	BVDV2 -imm.	AK+/Ag-	64 (Typ2)	pos	neg	neg	neg
A7	BVDV1 imm.	AK+/Ag-	>256 (Typ1)	pos	neg	neg	neg
A12	(Plasma) PI-Tier	AK-/AG+	neg	neg	pos	pos	pos
A17	Alma, neg	AK-/Ag-	neg	neg	neg	neg	neg
A19	Berta, neg	AK-/Ag-	neg	neg	neg	neg	neg
A20	PI 1/1016, 3 Mon	AK±/AG+	pos	neg/pos	pos	pos	pos
A21	PI 27/61	AK-/Ag+	neg	neg	pos	pos	pos
A22	PI 3/1243/1	AK-/Ag+	neg	neg	pos	pos	pos

D: Fetal calf sera/newborn calf sera (FKS/NKS)

Probe	Charakteristik	Status	NT	AK-ELISA	AG-ELISA	PCR	Zellkultur
A13	FKS P57	AK-/Genom+	neg	neg	neg	pos/neg	neg
A14	FKS P64	AK+/Genom +	pos (schwach)	neg/pos	neg	pos/neg	neg
A23	NCS B00805	AK-/Ag-	neg	neg	neg	neg	neg

A9-A11: Verdünnung in NKS
A18, A15, A16: Verdünnung in HIS

Tabelle 2: BVD-Ringtest 2006, Einzelergebnisse Antikörper-ELISA

Antikörper-ELISA
Seite 1

Labor	NRL		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	15	16
Proben/Test	IDEXX	CEDI	Sero II (Bo)	Pourquier	IDEXX	IDEXX	IDEXX	IDEXX	IDEXX	IDEXX	Barvac	IDEXX	IDEXX	IDEXX	Barvac	Svanovir	Barvac	IDEXX	Pourquier
A1	neg	pos	POS	±	pos	pos	pos	±	pos	pos	pos	pos	±	pos	pos	pos	pos	pos	±
A2	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A3	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A4	neg	neg	POS ⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos ⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A5	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A6	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	±	pos	pos	pos	±	neg⊗	pos	pos	pos
A7	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A9	neg	neg	POS⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A10	neg	neg	POS ⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A11	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A12(Plasma)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A14	neg	pos	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg
A15	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A16	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A18	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A20	pos	pos	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos
A21	neg	neg	POS ⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A22	neg	neg	POS ⊗	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos ⊗	±	neg	neg
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Fortsetzung AK-ELISA Seite 2

Labor	17			18		19	20	21	22	24	25	26	27	28		29	30	31
Proben/Test	IDEXX	Cedi	Pourquier	IDEXX	Pourquier	IDEXX	IDEXX	IDEXX	IDEXX	Pourquier	IDEXX		Ceditest	IDEXX/Tag	IDEXX/Nacht	Symbiotics	Pourquier	
A1	pos	pos	pos	pos	pos	±	pos	pos	pos	±	pos	n.d.	pos	pos	pos	pos	±	n.d.
A2	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	
A3	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	
A4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	
A5	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	
A6	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A7	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A10	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A11	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A12(Plasma)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	n.d.	neg	
A13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A14	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	±		pos	neg	neg		pos	
A15	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A16	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	±	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A18	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A20	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos		pos	
A21	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A22	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg		neg	

Fortsetzung AK-ELISA Seite 3

Labor	32	33		34		35	36	38	39		40
Proben/Test	IDEXX	Barvac	Cedi	Pourquier	Svanovir	Pourquier	IDEXX	IDEXX	Barvac	Svanovir	IDEXX
A1	pos	±	pos	NEG ⊗	NEG ⊗	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A2	pos	pos	pos	±	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A3	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A4	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A5	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A6	pos	±	pos	POS	NEG ⊗	pos	pos	pos	±	pos	pos
A7	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A8	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A9	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A10	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A11	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A12(Plasma)	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A13	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A14	neg	neg	pos	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A15	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A16	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A17	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A18	pos	pos	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	pos
A19	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A20	pos	neg	pos	POS	NEG	pos	pos	pos	neg	neg	pos
A21	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A22	neg	±	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A23	neg	neg	neg	NEG	NEG	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Erklärungen zur Tabelle 2:
⊗ = abweichendes Ergebnis
± = fraglich bzw. schwach positiv (Svanova Test)
n.d. = nicht durchgeführt

Eignung der eingesetzten Tests und Protokolle, schafft Grundlagen für verbesserte Methodenauswahl und Empfehlungen und trägt somit zu einer permanenten Standardisierung und Validierung bei. Letztlich sind die Ergebnisse ein Spiegelbild der Labordiagnostik im Land.

2 Proben

Im Herbst 2006 wurde erstmals vom NRL für BVD/MD ein bundesweiter Ringversuch organisiert, an dem 25 Untersuchungslabore der Länder, 4 Universitätslabore, 3 ausländische Labore und 6 Industrielabore teilnahmen. Es wurden 23 Serum- bzw. Plasmaproben für den Antigen-, Antikörper- und Genomnachweis (jeweils lyophilisiert), 4 Ohrstanzproben und 2 Haut-Kryostatschnitte versandt. Abgefragte Methoden waren Antigen- und Antikörper-ELISAs, Serumneutralisationstest, Virusanzüchtung, RT-PCR und Im-

Tabelle 3: BVD-Ringtest 2006, Einzelergebnisse Antigen-ELISA

Antigen-ELISA
Seite 1

Labor	NRL		1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Proben/Test	*IDEXX*	*Pourquier*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*Checkit Virus III*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX Blut*
A6	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A7	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A8	pos	pos	POS	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A9	pos	pos	POS	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A10	pos	pos	POS	pos	pos	Neg	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A11	neg	neg	neg	neg	POS	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A12(Plasma)	pos	pos	POS	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A13	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A14	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A15	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A16	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A17	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A18	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A19	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg
A20	pos	pos	POS	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A21	pos	pos	POS	pos	POS	POS	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A22	pos	pos	POS	pos	POS	Neg ⊗	pos	pos	pos	pos	pos	Pos	pos	pos	pos	pos	pos
A23	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg

Fortsetzung Ag-ELISA, Seite 2

Labor	15	16	17	18		19	20	21	22	24	25	26	27	28		29
Proben/Test	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*Pourquier*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX Leuk.*			*IDEXX/Tag*	*IDEXX/Nacht*	*Synbiotics p80*
A6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.	neg	neg	neg
A7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A8	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos			pos	pos	pos
A9	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos			pos	pos	neg⊗
A10	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	±			pos	pos	neg
A11	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A12(Plasma)	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos			pos	pos	pos
A13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A14	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A16	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg
A20	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos			pos	pos	neg ⊗
A21	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos			pos	pos	pos
A22	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	±			pos	pos	neg ⊗
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg	neg	neg

Fortsetzung Ag-ELISA, Seite 3

Labor	30	31	32	33	34	35	36	38	39	40
Proben/Test	*Ag-mix - Pourq.*		*IDEXX*		*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*		*IDEXX*
A6	neg	n.d.	neg	n.d.	NEG	neg	neg	neg	n.d.	neg
A7	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A8	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A9	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A10	neg		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A11	neg		pos		NEG	neg	neg	neg		neg
A12(Plasma)	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A13	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A14	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A15	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A16	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A17	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A18	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A19	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg
A20	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A21	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A22	pos		pos		POS	pos	pos	pos		pos
A23	neg		neg		NEG	neg	neg	neg		neg

Erläuterungen zur Tabelle 3:
⊗ = abweichendes Ergebnis
± = fraglich bzw. nicht reproduzierbares Ergebnis
n.d. = nicht durchgeführt

munfluoreszenz, wobei (Ausnahme Ohrstanzproben) lediglich diejenigen Untersuchungsmethoden zum Einsatz gelangen sollten, die auch in der Routine angewendet werden. Das Probenpanel umfasste neben vom NRL für die Diagnostik zur Verfügung gestellten Referenzen für Antigennachweis und Serologie (A8, A1 - A3) sowohl solche mit einem gesicherten Status (pos/neg) als auch Verdünnungsreihen in neonatalem Kälberserum (NKS) bzw. BVDV-Hyperimmunserum (HIS) zur Ermittlung des Detektionslimits der eingesetzten Protokolle bzw. Testkits (Tab. 1). Die Proben A1 bis A5 waren ausschließlich serologisch zu untersuchen.

E: Ohrstanzproben:
Jeweils 2 positive (PI) und negative Ohrstanzproben in Caisley-Probenbehältern.

F: Kryostatschnitte:
Azetonfixierte Gefrierschnitte von der behaarten Haut jeweils eines positiven (PI) und negativen Kalbes für den Nachweis mittels Immunfluoreszenz.

3 Evaluierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden zunächst unkommentiert in anonymisierter Form unter Mitteilung der Labornummer und Kenntlichmachung wesentlicher Abweichungen (⊗) als tabellarische Gesamtübersicht den Teilnehmern mitgeteilt. Als wesentliche Abweichung wur-

Tabelle 4: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse Neutralisationstest

Neutralisationstest
Seite 1

Labor	NRL		1	2		3		4		5		6	7	
NT gegen	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*
Virusstamm	*NADL*	*CS8644*		*MDBK*		*Grub*		*NADL*	*München*	*Paplitz*	*München2*		*Paplitz*	*München2*
Zellkultur	*KOP-R*	*KOP-R*		*Hausisolat*		*MDBK*		*MDBK*	*MDBK*	*MDBK*	*MDBK*		*KOP*	*KOP*
Ablesung/Antikörper	*PLA/WB103/105*	*PLA/WB103/105*		*Immunfbg*		*PLA*		*PLA/103/105*	*PLA/103/105*	*CPE/PLA*	*PLA*		*CPE*	*Immunfbg.*
A1	8	240	n.d.	128	n.d.	1:8	n.d.	1:8	1:32	8	32 ¼	n.d.	8	64
A2	40	12		64		1:64		1:64	1:4	32	2		32	16
A3	160	48		384		1:192		1:256	1:64	256	8		128	32
A4	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A5	480	480		>10:24		1:1440		1:2048	1:4	2048	64		1024	128
A6	<5	60		192		1:8		1:8	1:32	2	32 ¼		neg	128
A7	>640	480		>10:24		1:768		1:1024	1:512	>4096	1024		2048	1024
A8	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A9	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A10	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A11	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A12(Plasma)	<5 (tox bis 1:20)	<5 (tox bis 1:20)		<2		<1:2		<1:2 (1:2 tox)	<1:2	negativ	negativ		<4 (tox)	neg
A13	5	<5		2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A14	5	5		4		1:4 (fragl)		1:4	<1:2	2	fraglich		2	neg
A15	>640	640		>10:24		1:1536		1:2048	1:256	>4096	1024		2048	1024
A16	>640	640		>10:24		1:1024		1:2048	1:128	4096	1024		4096	512
A17	5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A18	>640	320		>10:24		1:1024		1:2048	1:256	4096	512		2048	1024
A19	5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A20	5	<5		2		1:3 (fragl)		>10	<1:2	4	negativ		4	4
A21	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg
A22	<5	5		<2		<1:2		<1:2 (1:2 tox)	<1:2	2	negativ		neg	neg
A23	<5	<5		<2		<1:2		<1:2	<1:2	negativ	negativ		neg	neg

1) BVDV2

Fortsetzung SNT, Seite 2

Labor	8		9		10		11		12	13		14		15	
NT gegen	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*
Virusstamm	*Paplitz*	*CS8644*	*NADL*		*Grub*		*MDBK*			*MDBK*	*MDBK*	*Grub*	*New York*	*NADL*	
Zellkultur	*KH*	*KH*	*MDBK*		*MDBK*		*NADL*			*NADL*	*CS8644*	*cpe*	*??*	*MDBK*	
Ablesung/Antikörper	*CPE*	*Immunfbg*	*Immunfbg*		*CPE*		*PLA*			*PLA/103/105*	*PLA 103/105*			*PLA*	
A1	1:4	1:64	8	n.d.	24	n.d.	1:8	n.d.	n.d.	1:5-1:8	1:128	1:2	1:3 ⊗	1:8	n.d.
A2	1:32	1:4	32		80		1:32			1:16	1:16	1:32	1:3	1:40	
A3	1:128	1:32	>1:128		320		1:161			1:80	1:80	1:96	1:3 ⊗	1:160	
A4	<1:2	<1:2	<2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg		<1:5	
A5	1:4096	1:64	>1:128		1:810		1:1024			1:2560	1:480	>1:128	1:3 ⊗	1:2560	
A6	1:2	1:128	4		10		1:8			<1:5	1:80-1:80	neg	1:3	<1:5	
A7	1:2048	1:1024	>1:128		5041		1:2048			1:640	1:640	>1:128	1:3 ⊗	1:1280	
A8	<1:2	<1:2	2		0		<1:2			<1:5	<1:5	1:4	neg	n.d.	
A9	<1:2	<1:2	2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	n.d.	
A10	<1:2	<1:2	2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	n.d.	
A11	<1:2	<1:2	2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	<1:5	
A12(Plasma)	1:2; 1:2 tox	<1:4; 1:2 tox	2tox, <4		0		1:3			<1:5	<1:5	neg	neg	n.d.	
A13	<1:2	<1:2	<2		0		≤1:16 tox			<1:5	<1:5	neg	neg	<1:5	
A14	1:8	<1:2	2		5		1:3			<1:5	<1:5	1:3	1:3	<1:5	
A15	1:4096	1:1024	>1:128		3041		1:2048			1:2560	>1:1440	>1:1128	>1:1181	1:2560	
A16	1:4096	1:1024	>1:128		3041		1:1448			1:2560	>1:640	>1:128	>1:181	1:1280	
A17	<1:2	<1:2	<2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	<1:5	
A18	1:2048	1:1024	>1:128		2041		1:1448			1:1020	>1:640	>1:128	>1:181	1:1280	
A19	<1:2	<1:2	<2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	<1:5	
A20	1:4	<1:2	2		42		1:8			<1:5	<1:5	neg	neg	1:5	
A21	<1:2	<1:2	<2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	n.d.	
A22	<1:2	<1:2	<2		0		1:2			<1:5	<1:5	1:2	neg	n.d.	
A23	<1:2	<1:2	<2		0		<1:2			<1:5	<1:5	neg	neg	<1:5	

positiv bewertet
fraglich bewertet
negativ bewertet

Erklärungen zur Tabelle 4:
⊗ = abweichendes Ergebnis
Titerangaben wie jeweils vom Labor mitgeteilt (Verdünnung ND50/Reziprokwerte/log10 ND50(31)/qualitative Bewertung (24))
n.d. = nicht durchgeführt

de ausschließlich eine fehlerhafte Bewertung von Proben mit klar zugewiesenem Status kenntlich gemacht. Nichterkennung stark verdünnter Proben, und schwach positiver Proben (FKS) wurde nicht als wesentliche Abweichung gewertet, ebenso wie fraglich beurteilte Proben, bei denen davon ausgegangen wird, dass in praxi entsprechende Abklärungsuntersuchungen eingeleitet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Antikörper-ELISA

Es wurden insgesamt 47 Untersuchungsreihen durchgeführt, von denen 42 ohne wesentliche Abweichungen waren. Nur in einem Labor, das als einziger Teilnehmer den in der Anlage ausgewiesenen ELISA anwendete, wurde eine größere Anzahl Proben falsch positiv bewertet. Vereinzelt gab es Probleme mit schwach positiven BVDV-2-Antiseren (A1; A6). Insgesamt wurden 6 verschiedene ELISA-Testkits eingesetzt (Tab. 2).

4.2 Antigen-ELISA

36 der 38 Untersuchungsreihen waren ohne wesentliche Abweichungen. In einem Labor wurden drei sicher positive Proben nicht erkannt, allerdings wurde hier ein Test eingesetzt, der auf dem

Tabelle 4: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse Neutralisationstest (Fortsetzung)

Fortsetzung SNT, Seite 3

Labor	16		17		18	19		20		21		22	24		25		26	27	28	29
NT gegen	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*				
Virusstamm	*NADL*	*CS8644*	*Klu*	*Klu*		*NADL*		*MDBK*		*MDBK*			*Grub*		*NADL*					
Zellkultur	*MDBK*	*MDBK*	*NADL*	*München2*		*MDBK*		*NADL*		*Grub*			*KOP*		*MDBK*					
Ablesung/Antikörper	*PLA*	*PLA*	*CPE/Immunfbg*	*Immunfbg*		*PLA*		*cpe*		*CPE*			*CPE 1)*		*cpe/PLA*					
A1	4	32	4	32 (Typ2)	n.d.	4	n.d.	1:4	n.d.	16,32	n.d.	n.d.	pos	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A2	64	8	32	4 (Typ1)		32		1:16		64,5			pos		0/1:1					
A3	256	32	64	8 (Typ1)		128		1:64		16,128			pos		1:128					
A4	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0 / 1:4					
A5	4096	256	2048	64 (Typ2)		4096		1:512		2048,0/2			pos		1:4096					
A6	16	16 ⊗	4	16 (Typ2)		4		1:4		11,22			neg		1:4 (pos)					
A7	4096	4096	4 ⊗	128 ⊗ (Typ2)		4096		1:1024		2048,0			neg		1:1024					
A8	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A9	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A10	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A11	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A12(Plasma)	neg	neg	2	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A13	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A14	4	neg	4	0		4		1:2		2			neg		0					
A15	4096	1024	2048	64 (Typ1)		4096		1:1512		2048,0/2			pos		1:4024					
A16	4096	1024	2 4096	256 (Typ1)		4096		1:1512		4096,5			pos		1:512					
A17	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A18	4096	1024	8 4096	128 (Typ1)		4096		1:256		2048,0/2			pos		1:2048					
A19	neg	neg	2	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A20	2	neg	8	0		4		1:2		4,0/2			pos		1:4 (pos)					
A21	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					
A22	2	neg	2	0		4		1/2		<2			neg		1:4 (pos)					
A23	neg	neg	0	0		<2		<1/2		<2			neg		0					

ND100

1)nur Verdünnung 1:5

Fortsetzung SNT, Seite 4

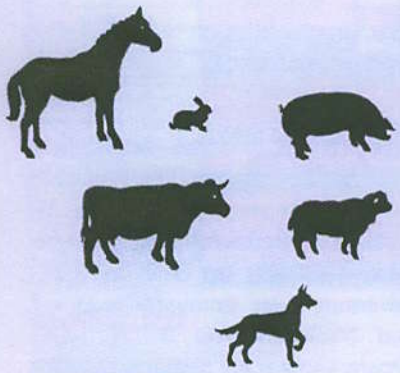
Labor	30	31		32		33	34		35	36	38			39	40
NT gegen		*BVDV1*	*BVDV2*	*BVDV1*	*BVDV2*		*BVDV1*	*BVDV2*			*BVDV1*	*BVDV1*	*BVDV2*		
Virusstamm		Osloss	Gie-2 cp	felKN			*MDBK*				*NADL*	*Paplitz*	*Münch*		
Zellkultur		*MDBK*	*MDBK*	*NADL*			*NADL*				*MDBK/PLA*	*MDBK*	*MDBK*		
Ablesung/Antikörper		*cpe*	*cpe*	*Immunfbg*			*cpe*				*PLA*	*cpe*	*PLA*		
A1	n.d.	0,34	0,34	4	n.d.	n.d.	1:1640	n.d.	n.d.	n.d.	1:4	negativ	1:128	n.d.	n.d.
A2		0,34	1,15	64			1:640				1:16	1:4	1:8		
A3		1,15	1,41	64			1:640				1:128	1:64	1:32		
A4		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A5		1,41	1,67	2048			1:2560				1:4096	1:1024	1:128		
A6		0,34	1,67	4			1:10				1:8	1:4	1:32		
A7		1,41	2,24	4096			1:13560				1:2048	1:512	1:512		
A8		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A9		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A10		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A11		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A12(Plasma)		≤0,72*	≤0,72*	<2			1:20 ⊗				negativ	negativ	negativ		
A13		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A14		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A15		1,96	2,65	640			1:5040				1:2048	1:1024	1:1024		
A16		1,96	2,65	640			1:5040				1:1024	1:1024	1:1024		
A17		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A18		1,96	1,67	640			1:5040				1:2048	1:1024	1:512		
A19		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A20		0,34	0,34	4			<1:10				1:4	1:4	negativ		
A21		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A22		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		
A23		0,34	0,34	<2			<1:10				negativ	negativ	negativ		

Titer in log 10 ND50

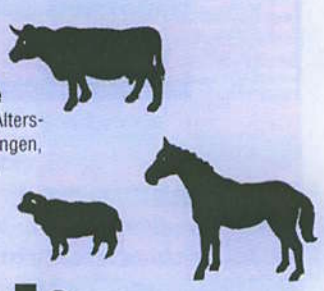
* 1:3 nicht auswertbar

positiv bewertet
fraglich bewertet
negativ bewertet

Erklärungen zur Tabelle 4:
⊗ = abweichendes Egebnis
Titerangaben wie jeweils vom Labor mitgeteilt (Verdünnung ND50/Reziprokwerte/log 10 ND50(31)/qualitative Bewertung (24))
n.d = nicht durchgeführt



Die Zeit ist reif:



Erweitern Sie die Grenzen Ihrer therapeutischen Möglichkeiten. Die Therapie mit Bio Response Mediatorsubstanzen (Hersteller: vitOrgan Arzneimittel GmbH) hat nach mehr als 50 Jahren unermüdlicher Forschung, Entwicklung und Erfahrung einen Stand erreicht, der für das veterinärmedizinische Handeln neue Dimensionen eröffnet, die die Grenzen bisheriger therapeutischer Möglichkeiten sprengen. Hauptindikationen: Chronische Organkrankheiten, endokrine Dysfunktionen, Immunopathien, Alterserkrankungen, Entwicklungsstörungen, Neoplasien, Verhaltensstörungen.

vitOrgan Arzneimittel GmbH
Postfach 42 40
73745 Ostfildern
Tel. (07 11) 4 48 12-0
Fax (07 11) 4 48 12-41
Internet: www.vitorgan.de
E-mail: info@vitorgan.de

50 Jahre vitOrgan.
Erfahrung hat Zukunft.

Tabelle 5: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse Virusisolierung

Virusisolierung

Seite 1

Labor	NRL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Zellkultur	*KOP-R*	*KOP-R*	*MDBK*	*MDBK*	*MDBK*	*MDBK/KOP-R*		*KOP-R*	*KHo*	*MDBK/FLK*	*KOP-R*			*KOP*
Detektion/	*IFT*	*SERELISA p80 Ag*	*DIFT*	*PLA*	*DIFT Gam*	*IIFT/POD*		*PLA*	*IFT*	*IFT*	*DIFT*			*DIFT/Ausstriche*
Antikörper	*WB103/103/WB160*	*Synb*	*BioX*	*WB103/105*	*IIFT/103/105*	*C16; WB103/105*		*C16*	*WB103/105*	*WB103/105*	*BioX*			*cc pro*
A6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.	neg
A7	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A8	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos			pos
A9	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos			pos
A10	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos			pos
A11	pos (1)	pos	neg	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos			pos
A12(Plasma)	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos			pos
A13	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A14	neg	neg	pos⊗	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A15	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A16	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A17	neg	neg	pos⊗	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A18	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg
A20	pos (1)	pos	neg⊗	pos	pos	neg⊗		neg⊗	pos	pos	pos			pos
A21	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		neg	pos	pos	pos			pos
A22	pos (1)	pos	pos	pos	pos	pos		fraglich	pos	pos	pos			pos
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg			neg

(1) = BVDV1

Fortsetzung Virusisolierung, Seite 2

Labor	14	15	16	17	18	19		20	21	22	24	25	26	27	28	29	30
Zellkultur	*KOP-R*	*MDBK*	*KOP-R*	*KLU*		*fet Klu*		*prim Klu*	*MDBK*	*FKN*	*KOP*	*MDBK*					
Detektion/	*PLA/ELISA(Synb)*	*DIFT*	*(ELISA Synb)*	*IFT und PCR*		*PLA*	*ELISA*	*IFT*	*PLA*	*DIFT*	*DIFT*	*PLA*					
Antikörper	*pan pesti*	*cc pro*		*C16*		*WB103/105*	*IDEXX plus*	*WB103/105*	*C16*	*BioX*	*BioX*	*WB103/105*					
A6	neg	neg	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A7	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg					
A8	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos					
A9	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	neg ⊗	pos					
A10	neg⊗	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg					
A11	pos	pos	pos	pos		neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg					
A12(Plasma)	pos⊗	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	neg ⊗	pos					
A13	neg	pos⊗1)	neg	neg		neg	pos ⊗1)	neg	neg	neg	neg	neg					
A14	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	pos⊗	neg	neg	neg					
A15	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	pos ⊗	neg					
A16	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	pos ⊗	neg					
A17	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg					
A18	neg	neg	neg	IFT neg/PCR pos		neg	neg	neg	pos⊗	neg	pos ⊗	neg					
A19	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg					
A20	neg⊗	pos	pos	pos		neg	pos	pos	pos	pos	neg ⊗	pos					
A21	pos	pos	pos	pos		pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos					
A22	neg⊗	pos	pos	pos		neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg ⊗					
A23	neg	neg	neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg					

1) evtl unspez. da PCR-neg

1) Sequenz identisch mit A12

Fortsetzung Virusisolierung, Seite 3

Labor	31	32	33	34	35	36	38	39	40
Zellkultur	*MDBK, SFT-R, BEL*	*fet KN*	*KOP-R*	*REB*			*MDBK*		
Detektion/	*IFT*	*PLA*	*Zytofluorometrie*	*p80 ELISA*			*IIFT*		
Antikörper	*a-NS3*	*polyklonal*	*WB103/105*	*Synb*			*C16*		
A6	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.	neg	n.d.	n.d.
A7	neg	neg	neg	neg			neg		
A8	pos	pos	pos	pos			pos		
A9	pos	pos	pos	pos			pos		
A10	pos	pos	pos	pos			pos		
A11	pos	pos	neg	pos			pos		
A12(Plasma)	pos	pos	pos	pos			pos		
A13	neg	neg	neg	neg			neg		
A14	neg	neg	neg	neg			neg		
A15	neg	neg	neg	neg			neg		
A16	neg	neg	neg	neg			neg		
A17	neg	neg	neg	neg			neg		
A18	neg	neg	neg	neg			neg		
A19	neg	neg	neg	neg			neg		
A20	pos (1)	pos	neg⊗	pos			pos		
A21	pos	pos	pos	pos			pos		
A22	pos	pos	neg⊗	pos			pos		
A23	neg	neg	neg	neg			neg		

1) pos auf SFT und BEL, nicht auf MDBK

⊗ = abweichendes Ergebnis

Nachweis des Nichtstrukturproteins NS2/3 basiert, und für die Untersuchung von Serumproben ungeeignet und auch nicht zugelassen ist. Zwei Labore haben einen Leukozytentest für die Untersuchung von Seren eingesetzt, die Ergebnisse sind allerdings korrekt bzw. nahezu korrekt. Insgesamt kamen 5 verschiedene ELISAs zum Einsatz (Tab. 3).

4.3 Serumneutralisationstest (SNT):

Von 24 Laboren wurde ein SNT durchgeführt, allerdings lediglich von 11 auch auf Antikörper gegen BVDV-2 (Tab. 4).

Insgesamt fällt eine beträchtliche Streuung der angewandten Protokolle hinsichtlich Auswahl von Zellen, Virusstamm, Titerberechnung und -bewertung sowie Art der Detektion (CPE-Bewertung oder Immunfärbung) auf. Zum Nachweis von BVDV-1-Antikörpern wurden die Stämme »NADL«

Tabelle 6: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse RT-PCR

RT-PCR

Seite 1

Labor	NRL		1	2	3	4	5	6	7
RNA-Isolierung	*QIAmp Viral RNA*			*High Pure, Roche*	*QIAamp Viral RNA*	*MagNAPure, Roche*	*QIAmp Viral RNA*		*durchgeführt in*
PCR-Protokoll/Primer/	*Hoffmann, 2006*	*Adiavet*		*Hyndman,1998*	*AVID XIV/2005*	*Adiavet*	*Vilcek / McGoldrick,*		*Labor 8*
Kit	*Superscript III*			*two step-PCR über cDNA-*	*QuantiTect*		*konv. n. RT-PCR*		
				Synthese mit Random Primer					
A6	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	n.d.	neg
A7	neg	neg		neg	neg	neg	neg		neg
A8	pos (28,71)	pos (26,04)		32,66 (pos)	pos (28)	pos (32)	pos		pos (25)
A9	pos 31,52)	pos (28,73)		36,48 (pos)	pos (30)	pos (36)	pos		pos (28)
A10	pos (30,21)	pos (32,93)		37,92 (pos)	pos (33)	pos (37,08)	pos		pos (31)
A11	neg	pos (36,13)		neg	fragl (38)	neg	pos		neg
A12(Plasma)	pos (27,76)	pos (26,37)		32,88 (pos)	pos (27)	pos (33)	pos		pos (27)
A13	pos (33,89)	neg		39,03 (pos)	fragl (39)	neg	fragl		pos (34)
A14	neg	fragl (40,60)		40,35 (pos)	neg	neg	fragl		pos (37)
A15	neg ⊗	pos (35,77)		41,84 (pos)	pos (33)	neg ⊗	pos		pos (31)
A16	neg	neg		neg	fragl (38)	fragl (40/41)	pos		pos (34)
A17	neg	neg		neg	neg	neg	neg		neg
A18	pos (36,98)	pos (31,83)		39,84 (pos)	pos (33)	pos (32,34,34)	pos		pos (30)
A19	neg	neg		neg	neg	neg	neg		neg
33)									pos (26)
A21	pos (25,58)	pos (30,45)		33,76 (pos)	pos (29)	pos (33)	pos		pos (26)
A22	pos (30,53)	pos (29,61)		34,14 (pos)	pos (30)	pos (35)	pos		pos (27)
A23	neg	neg		neg	neg	neg	neg		neg

Fortsetzung RT-PCR, Seite 2

Labor	8	9	10	11	12	13	14	15
RNA-Isolierung	*InviMag/ King Fisher*	*Qiagen Viral RNA*	*Qiagen Viral RNA*	*Qiamp Viral RNA*	*Qiagen Viral Kit*	*High Pure, Roche*	*QIAmp Viral RNA*	*QIAmp Viral RNA*
PCR-Protokoll/Primer/	*AVIDXIV/2005*	*AVIDXIV/2005*	*AVIDXIV/2005*	*ADIAVET*	*AVIDXIV/2005*	*AVIDXIV/2005*	*Hoffmann, 2006*	*nested (FLI) ??*
Kit	*QuantiTect*	*QuantiTect*	*Taqman-one-step,ABI*		*InvitrogenRealtime*	*QuantiTect*	*Superscript III*	*NTR51; 53*
A6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A8	pos (24,6)	pos (24,8,25,98)	pos (28,55)	27,15 (pos)	pos (25,92)	30,7 (pos)	23 (pos)	pos
A9	pos (27,1)	pos (35,6/33,85)	pos (30,27)	28,86 (pos)	pos (29,51)	32,1 (pos)	26 (pos)	pos
A10	pos (31,8)	pos (34,21/30,48)	pos (33,81)	32,52 (pos)	pos (35,25)	35,7 (pos)	30 (pos)	pos
A11	pos (36,4)	pos (neg/34,57)	pos (37,72)	35,97 (pos)	fragl (36,57)	37,9 (pos)	31 (pos)	pos
A12(Plasma)	pos (26,6)	pos (28,88/30,83)	pos (27,70)	24,02 (pos)	pos (26,8)	27,2 (pos)	23 (pos)	pos
A13	pos (33,8)	neg	pos (39,1)	neg	fragl (36,2)	neg	30 (pos)	neg
A14	pos (38,3)	neg	pos (39,02)	neg	fragl (39,1)	neg	32 (pos)	neg
A15	pos (32,8)	fragl 1)(37,86/neg)	pos (37,06)	33,07 (pos)	pos (34,7)	36,2 (pos)	32 (pos)	pos
A16	pos (33,7)	pos (36,45/31,25)	pos (40,20)	neg	fragl (36,66)	neg	33 (pos)	neg
A17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A18	pos (28,6)	pos (28,88/30,16)	pos (34,56)	31,30 (pos)	pos (31,73)	33 (pos)	28 (pos)	pos
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
A20	pos (24,5)	pos (28,73/27,91)	pos (30,72)	28,11 (pos)	pos (27,16)	29,2 (pos)	24 (pos)	pos
A21	pos (24,9)	pos (28,29/27,16)	pos (31,39)	29,32 (pos)	pos (28,11)	30,9 (pos)	25 (pos)	pos
A22	pos (33,6)	pos (28,28/27,11)	pos (30,78)	29,45 (pos)	pos (27,45)	30,8 (pos)	28 (pos)	pos
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

1) in Vilcek-PCR pos

Fortsetzung RT-PCR, Seite 3

Labor	16	17		18	19			20	21
RNA-Isolierung	*QIAamp Viral RNA*	*1.AGOWA auf Hamilton*		*QIAmp viral RNA*	*RNeasy Mini*			*Rneasy Mini*	*Qiamp Viral RNA*
PCR-Protokoll/Primer/	*AVIDXIV/2005 mod.*	*2. High Pure,Roche*		*Vilcek*	*Andiatec*	*AVIDXIV/2005*	*Hoffmann, 2006*	*1.Vilcek*	*4 versch. PCR*
Kit	*QuantiTect*	*AVIDXIV/2005*		*Primer NTR 51/53*		*QuantiTect*	*SuperScriptIII*	*2. Strebelow 1)*	
		QuantiTect							
A6	neg	neg	neg	neg	0	0	0	neg	neg
A7	neg	neg	neg	neg	0	0	0	neg	fragl(BVDV1)
A8	pos (27,99)	30,6	31,7	pos	27,19	33,73	27,08	pos	pos (BVDV1)
A9	pos (27,36)	33	31,9	pos	29,47	35,9	29,59	pos	pos(BVDV1)
A10	pos (30,34)	37,4	36,8	pos	30,45	40,43	34,48	pos	pos(BVDV1)
A11	pos (34,14)	39	neg	fraglich	37,44	38,51	36,69	neg	pos(BVDV1)
A12(Plasma)	pos (26,24)	31,4	32,4	pos	26,88	34,92	27,54	pos	pos(BVDV1)
A13	neg	39,7	neg	neg	31,39	0	31,89	neg	pos(BVDV1+2)
A14	neg	neg	neg	neg	32,44	0	34,82	neg	fragl(BVDV2)
A15	pos (31,34)	36,1	34,2	neg ⊗	32,52	40,64	33,15	pos	pos (BVDV1)
A16	pos (33,21)	37,8	38	neg	35,2	0 / (42,09)	35,88	neg	pos(BVDV1)
A17	neg	neg	neg	neg	0	0	0	neg	neg
A18	pos (29,57)	33,2	33	pos	29,39	38,19	30,71	pos	pos(BVDV1)
A19	neg	neg	neg	neg	0	0	0	neg	neg
A20	pos (25,81)	30,4	32,5	pos	26,71	34,21	27,75	pos	pos(BVDV1)
A21	pos (27,00)	31,9	32,6	pos	27,39	35,41	28,26	pos	pos(BVDV1)
A22	pos (29,91)	32,4	33,2	pos	29,08	35,69	29,11	pos	pos(BVDV1)
A23	neg	neg	neg	neg	0	0	0	neg	neg

1) für Differenzierung - alles BVDV1

qualitativ bewertet
fraglich bewertet
negativ bewertet

⊗ = abweichendes Ergebnis

Tabelle 6: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse RT-PCR (Fortsetzung)

Fortsetzung RT-PCR, Seite 4

Labor	22		24	25		26	27	28	29	30
RNA-Isolierung	QIAamp Viral RNA		Total RNA, Roche	AGOWA MS	QIAamp Viral RNA	QIAmp Viral RNA	Boom™ Silica			High pure, Roche
PCR-Protokoll/Primer/	AVIDXIV/2005	Vilcek 1994	Vilcek mod	Andiatec	Andiatec	Virotype				Q-PCR (Pourq)
Kit	Quantitect	OneStep,QIAGEN	OneStep,Qiagen				NASBA			
		1)	2×REDdy Mix, ABgene							
A6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	n.d.	neg
A7	34.62 (pos)⊗	pos⊗	neg	neg	neg	neg	neg			neg
A8	23.54 (pos)	pos	pos	pos (25.68)	pos (25.97)	22.58 (pos)	pos			pos (23,5)
A9	28.03 (pos)	pos	pos	pos (30.77)	pos (30.41)	26.17 (pos)	neg⊗			pos (26,6)
A10	31.10 (pos)	pos	pos	pos (34.4)	pos (32.27)	29.77 (pos)	pos			pos (30,1)
A11	33.31 (pos)	pos	pos	neg	neg	32.57 (pos)	pos			pos (33,1)
A12(Plasma)	25.68 (pos)	pos	pos	pos (28.55)	pos (27.29)	23.32 (pos)	pos			pos (27,9)
A13	31.66 (pos)	pos	neg	pos (32.47)	pos (31.9)	31.07 (pos)	pos			pos (30,5)
A14	38.00 (pos)	pos	neg	pos (36.95)	pos (32.84)	34.15 (pos)	pos			pos (33,35
A15	33.23 (pos)	pos	pos	pos (34.39)	pos (31.73)	30.59 (pos)	pos			pos (31,1)
A16	36.03 (pos)	pos	pos	fragl (41,83)	neg	34.35 (pos)	pos			pos (33,8)
A17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg
A18	30.32 (pos)	pos	pos	pos (30.86)	pos (32.10)	28.68 (pos)	pos			pos (27,4)
A19	neg	pos⊗	neg	neg	neg	neg	neg			neg
A20	28.20 (pos)	pos	pos	pos (28.87)	pos (27.27)	23.00 (pos)	pos			pos (25,7)
A21	28.22 (pos)	pos	pos	pos (30.65)	pos (28.85)	24.67 (pos)	pos			pos (25,3)
A22	27.18 (pos)	pos	pos	pos (29.96)	pos (28.73)	26.34 (pos)	pos			pos (26,6)
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg			neg

1) Differenzierung mit Ava I, Bgl I, Pst I, alles BVDV1

Fortsetzung RT-PCR, Seite 5

Labor	31		32	33	34	35	36	38	39	40
RNA-Isolierung	QIAamp Viral RNA		High Pure, Roche	High Pure, Roche	High Pure, Roche	High Pure,Roche		Magn.Beads; Innuscreen		
PCR-Protokoll/Primer/Kit	konv. RT-n-PCR,	real time	Vilcek, 1994	Hoffmann, 2006	Weinstock 2001	Weinstock,2001		AVIDXiV/2005		
	Becher, 1998	Cedillo Rosales, 2004	Thermo Start Abgene	QuantiTect	hot start Abgene			Quantitect		
				System 1.1.						
A6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	neg	n.d.	n.d.
A7	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg		
A8	pos	pos (28,46)	pos	26,85 (pos)	pos	pos		pos (30)		
A9	pos	pos (32,6)	pos	28,92 (pos)	pos	pos		pos (32,5)		
A10	pos	fragl (36,21)	pos	33,56 (pos)	pos	pos		pos (36,7)		
A11	pos	neg	pos	36,46 (pos)	neg	pos/neg		neg		
A12(Plasma)	pos	pos (28,16)	pos	29,57 (pos)	pos	pos		pos (31,1)		
A13	neg	neg	neg	31,9 (pos)	neg	neg		pos (37,8)		
A14	pos	neg	neg	37,93 (pos)	neg	neg		neg		
A15	pos	fragl (38,54)	neg ⊗	35,82 (pos)	fragl/pos	pos		pos (33,4)		
A16	pos	fragl (39,33)	neg	38,63 (pos)	neg	neg		neg		
A17	pos ⊗	fragl (38,19)	neg	neg	neg	neg		neg		
A18	pos	pos (35,1)	neg⊗	33,71 (pos)	pos	pos		pos (32,3)		
A19	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg		
A20	pos	pos (30,28)	pos	29,29 (pos)	pos	pos		pos (30,4)		
A21	pos	pos (30,89)	pos	30,44 (pos)	pos	pos		pos (30,6)		
A22	pos (BVDV2)	pos (30,30)	pos	29,44 (pos)	pos	pos		pos (31)		
A23	neg	neg	neg	neg	neg	neg		neg		

positiv bewertet
fraglich bewertet
negativ bewertet

⊗ = abweichendes Ergebnis

(14 x), »Paplitz« (5 x) und »Grub« (4 x) eingesetzt, je einmal kamen »Osloss« und ein Hausisolat zur Anwendung. »München2« (5 x) und »CS8644« (3 x) sind die bevorzugt eingesetzten BVDV-2-Stämme, jeweils einmal wurde »Gie-2« und »NY« verwendet, Letzterer allerdings mit unbefriedigenden Ergebnissen. In 17 Laboren wurden der SNT auf MDBK durchgeführt, je einmal auf KOP-R, KLu, KHo bzw. fetalen KN-Zellen. Unterschiedlich wurden niedrige Titer (1 : 2; 1 : 4) bewertet. In Anlehnung an das OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines wurde im vergangenen Jahr eine Anfangsverdünnung von 1 : 5 in der amtlichen Methodensammlung für die Diagnose anzeigepflichtiger Tierseuchen festgelegt. Die Verfahrensweise des Labors 24, ausschließlich in einer Verdünnung (1 : 5) zu arbeiten, sollte überdacht werden und entspricht nicht den Anforderungen an ein serologisches Testverfahren, welches dazu noch als Goldstandard anzusehen ist. Für die Detektion, sofern nicht über CPE abgelesen wird (auffallend war, dass bei Verwendung der Virusstämme »Paplitz« und »Grub« wegen der sehr guten CPE-Ausprägung i. d. R. nicht immungefärbt wurde) wurde mehrheitlich der monoklonale pan pesti Antikörper WB 103/105 (c.c.pro) im indirekten Immunfluoreszenz- oder Immunperoxydasetest eingesetzt, mehrfach kamen aber auch C16 oder FITC-markierte Antikörper (BioX) zur Anwendung.

4.4 Virusisolierung

In 26 Laboren wurde eine Virusisolierung durchgeführt; die Zahl abweichender Resultate ist mit insgesamt 22, verteilt auf 9 Labore, sehr hoch (Tab. 5).

In 13 Fällen wurden positive Proben nicht erkannt, 9-mal wurden falsch positive Ergebnisse übermittelt. MDBK und KOP-R Zellkulturen wurden zu gleichen Anteilen eingesetzt, die Detektion erfolgte auch hier i. d. R. über den Immunfluoreszenz- oder Immunperoxydasetest und hinsichtlich der Antikörper gilt das für den SNT Angeführte. In drei Fällen kamen ein p80 ELISA zur Anwendung und je einmal die Zytofluorometrie und die PCR. Letztere birgt die Gefahr der Detektion

Tabelle 7: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse Ohrstanzproben

Untersuchung von Ohrstanzproben

Seite 1

Labor	NRL				1	2		3	4		5
Test	*ELISA*	*ELISA)*	*real time RT-PCR*	*Virusisolierung (KOP-R)*		*ELISA*	*RT-PCR*	*ELISA*	*ELISA*	*RT-PCR, Restgewebe,*	*ELISA*
	IDEXX	*Pourquier (S/P)*	*tissue lyser, Hoffmann 2006*	*KOP-R, IFT*		*IDEXX*	*nach 2. Lyse*	*IDEXX*	*IDEXX*	*nach Lysis/Adiavet*	*IDEXX*
OS1	neg (-0,02)	neg (-0,11)	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	neg	neg
OS2	pos (3,11)	pos (1,64)	pos (4,96 (2,12 x 10⁴))	pos		pos	neg ☹	pos (2,646)	pos (1,16)	pos (1,0)	pos
OS3	pos (2,99)	pos (1,84)	pos (4,6 (2,84 x 10⁴))	pos		pos	neg ☹	pos (2,419)	pos (1,18)	pos (1,0)	pos
OS4	neg (-0,04)	neg (-0,01)	neg	neg		neg	neg		neg	neg	neg

Labor	6	7	8	9	10	11	12	13		14	15
Test		*ELISA*	*ELISA*		*ELISA*	*ELISA*	*ELISA*	*ELISA*	*RT-PCR*	*ELISA*	
		IDEXX	*IDEXX*		*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*Gewebereste*	*IDEXX*	
OS1	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.
OS2		pos	pos (2,9)		pos (2,5)	pos	pos	pos	neg☹	pos (>2,6)	
OS3		pos	pos (2,7)		pos (2,2)	pos	pos	pos	pos	pos (>2,6)	
OS4		neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	

versuchsweise

Labor	16	17		18	19	20	21	22	24	25	26
Test	*ELISA*	*ELISA*	*RT-PCR 1)*	*ELISA*	*ELISA*	*ELISA*	*ELISA*		*ELISA*	*RT-PCR*	*RT-PCR*
	IDEXX	*IDEXX*	*AVID*	*IDEXX u. Pourquier*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*		*IDEXX*	*tissue lyser, Andiatec*	*Virotype*
OS1	neg	Ø	Ø	neg (-0,1)	neg	neg	pos (0,32)☹	n.d.	neg (0,1)	neg	neg
OS2	pos	pos	pos (32,8)	positiv	pos (3,2)	pos	pos (2,4)		positiv (1,1)	pos (1,7 x)	pos (2,2 x)
OS3	n.d.	pos	pos (32,6)	positiv	pos (2,7)	pos	pos (1,3)		positiv (1,0)	pos (1,6 x)	pos (21,00)
OS4	neg	Ø	Ø	negativ	neg	neg	neg		negativ	neg	pos (36.73)☹

keine Routine — keine Routine

1) RNA Isolierung aus Restgewebe

Fortsetzung Ohrstanzproben, Seite 2

Labor	27		28	29	30	31	32	33	34	35	36	38	39	40
Test	*ELISA*	*NASBA*	*ELISA*		*ELISA*	*konv RT--n-PCR*		*RT-PCR*	*ELISA*	*ELISA*	*ELISA*	*RT-PCR*		*ELISA*
	Ceditest		*IDEXX*		*Ag-mix(P)*	*und real time*		*Hom./Hoffmann*	*IDEXX*	*IDEXX*	*IDEXX*	*AVID*		*IDEXX*
OS1	neg	neg	0,100	n.d.	neg	neg	n.d.	neg	neg	neg	neg	neg	n.d.	neg
OS2	pos	pos	2,9010 (pos)		pos	pos (10 (1,0 x 10⁴))		pos (25,13)	pos	pos (2,3)	pos (1,0)	pos (25,91)		pos
OS3	pos	pos	2,6243 (pos)		pos	pos (10 (1,0 x 10⁴))		pos (25,15)	pos	pos (1,9)	pos (2,9)	pos (24,3)		pos
OS4	neg	neg	0,010		neg	neg		neg	neg	neg	neg	neg		neg

☹ = abweichendes Ergebnis

Tabelle 8: BVD-Ringtest 2006; Einzelergebnisse Kryostatschnitte

BVDV-Antigennachweis im Gefrierschnitt

Labor	Pathologie FLI	1	2	3	4	5	6	7	8	9
verwendeter	cc-Pro	BioX	BioX	n.d.	VDV Gamakon	CC-Pro	n.d.	cc-Pro	cc-Pro	cc-Pro
Antikörper	WB103/105	anti-BVDV mAb	FBVD06F29		Lot. 79	anti-BVDV-FITC		WB103/105	WB103/105	WB103/105
Objektträger A	negativ	negativ	negativ		positiv☹	negativ		negativ	negativ	negativ
Objektträger B	positiv	positiv	positiv		negativ☹	positiv		positiv	positiv	positiv

Labor	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
verwendeter	BioX	n.d.	n.d.	cc-Pro	n.d.	cc-Pro	n.d.	o.A.	n.d.	n.d.
Antikörper	Bio 316			anti-BVDV-FITC		anti-BVDV-FITC		o.A.		
Objektträger A	negativ			negativ		positiv ☹		negativ		
Objektträger B	positiv			positiv		negativ ☹		positiv		

autolytisch

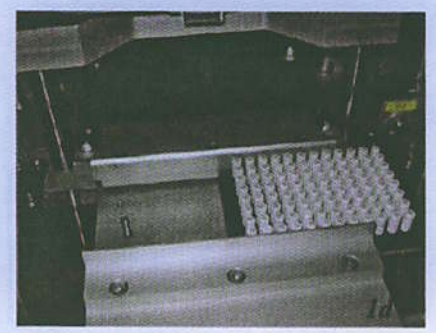
Labor	20	21	22	24	25	26	27	28	29	30
verwendeter	VDK Gamakon	n.d.	n.d.	BioX	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Antikörper	FITC			FBVD06G31						
Objektträger A	negativ			negativ						
Objektträger B	positiv			positiv						

keine Routine

Labor	31	32	33	34	35	36	38	39	40
verwendeter	mAb-Mix	n.d.	cc-Pro	n.d.	n.d.	n.d.	Bommeli	n.d.	n.d.
Antikörper	anti-NS3		WB103/105				C16		
Objektträger A	negativ		negativ				negativ		
Objektträger B	positiv		positiv				positiv		

☹ = abweichendes Ergebnis; n.d. = nicht teilgenommen; o.A. = ohne Angaben

von Genom aus dem Inokulum bei Proben mit hohem Antikörperspiegel, bei denen keine produktive Virusreplikation stattfindet, wohl aber die PCR positiv ist (s. Labor 17). Eine große Vielfalt war hinsichtlich verwendeter Probengefäße, Inokulationsregime und Passagierung zu verzeichnen, wobei deutlich wird, dass fortlaufende Passagen nicht zu einem zusätzlichen Sensitivitätsgewinn führen. Interessant ist, dass aus einer stark verdünnten PI-Probe (A11) in 6 Fällen Virus angezüchtet wurde, in denen die PCR negativ verlaufen war. Das umgekehrte Ergebnis (PCR positiv/Anzüchtung negativ) war in Bezug auf diese Probe lediglich einmal zu verzeichnen. Im Antigen-ELISA wurde diese Probe nur dreimal positiv detektiert. In diesem Zusammenhang ist die Schlussfolgerung eines Ringtestteilnehmers bezüglich des Untersuchungsergebnisses der Probe 13 (da die PCR negativ ist, ist das Ergebnis der Virusisolierung als falsch positiv zu bewerten) kritisch zu hinterfragen. Zu überdenken ist die Verfahrensweise der Anzüchtung in Röhrchen und IFT-Detektion nach Ausstrich der Zellen auf Objektträger, wie sie in einem Labor



(13) praktiziert wird. Insgesamt geben die Ergebnisse der Virusisolierung Anlass zur Sorge um die Beherrschung klassischer virologischer Standardtechniken durch einige Labore.

4.5 RT-PCR

In 31 Laboren wurden PCR-Tests durchgeführt, z. T. mit mehreren Protokollen, so dass insgesamt 35 Untersuchungsreihen zur Auswertung vorliegen (Tab. 6).

Elfmal wurden konventionelle RT-PCR (bevorzugt n. Vilcek) bzw. nested RT-PCR-Protokolle eingesetzt, 23-mal wurde eine real time RT-PCR durchgeführt, einmal kam ein NASBA *(nucleic acid sequence-based amplification)* zur Anwendung. Häufigste real time Protokolle waren die »AVID-Methode« *(Gaede et al.*, 2005, s. auch AVID-Methodensammlung) und das Protokoll nach *Hoffmann et al.* (2006). Zur Anwendung, wenn auch nur in wenigen Laboren, kamen auch 4 der 5 in Deutschland zugelassenen, bzw. sich zum Zeitpunkt des Ringtest in Zulassungsverfahren befindlichen PCR-Testkits (ADIAVET BVD REAL-TIME/AES-Laboratoire; BoVir-SL TaqMan RT-PCR-Kit/AnDiaTec; BVDV Q-PCR-HP/Inst. Pourquier und Virotype BVDV/LDL Leipzig), die im Ringtest ausnahmslos sehr gute Ergebnisse erbrachten.

Bei den insgesamt 630 Untersuchungen waren 9 abweichende Resultate (~ 1,4 %) zu verzeichnen, wobei 5 x positive Proben nicht erkannt wurden und 4-mal falsch positive Ergebnisse erzielt wurden. Unter Berücksichtigung dessen, dass 3 der 4 falsch positiven Ergebnisse auf ein Labor zurückzuführen waren und es sich bei 4 der 5 nicht erkannten Proben um ein 1 : 100 in Immunserum verdünntes Virämikerserum handelt, welches im Übrigen auch in einer der beiden am NRL durchgeführten Untersuchungsreihen negativ war, ist das Gesamtergebnis als sehr gut zu bezeichnen.

4.6 Ohrstanzproben

Die Untersuchung von Ohrstanzproben gehört bisher nur in sehr wenigen Untersuchungseinrichtungen zur diagnostischen Routine. Um jedoch erste Erfahrungen bei der vergleichenden Untersuchung identischen Proben durch verschiedene Labore und mit verschiedenen Methoden zu sammeln, wurden im Vorfeld des Ringtestes die Teilnehmer gebeten, unabhängig von ihren Erfahrungen, die Proben zu untersuchen, wobei die anzuwendenden Methoden (Ag-ELISA, RT-PCR, Virusisolierung) freigestellt waren. Dankenswerterweise haben 30 Labore die Ohrstanzproben untersucht, davon 20 im ELISA (IDEXX, Pourquier, Ceditest-EN), 5 mittels RT-PCR und 5 sowohl im ELISA als auch der RT-PCR bzw. dem NASBA (Tab. 7).

Die Ergebnisse waren insgesamt sehr gut. Dreimal waren positive Proben in der Nachuntersuchung mittels PCR aus Lysat oder Restgewebe negativ, einmal wurde eine negative Probe offensichtlich durch Kontamination (es waren jeweils eine positive und eine negative Probe im gleichen Versandbehälter verpackt um auch die Möglichkeit einer schwachen Kontamination im Vorfeld der eigentlichen Analytik zu imitieren) in der PCR positiv getestet, und einmal war eine negative Probe im IDEXX-ELISA schwach positiv, was für diesen Test bekannt ist. Die negativen Ergebnisse der PCR-Zweituntersuchung sind insofern sehr wertvoll, da sie zeigen, dass Abklärungsuntersuchungen von im ELISA fraglichen bzw. schwach positiven Ohrstanzproben mittels PCR, wie sie bei der Untersuchung von Seren durchaus üblich sind, an den verfügbaren Probenresten außerordentlich problematisch ist. Im NRL haben wir in einem entsprechenden Prüfansatz mit 17 Referenzproben mit und ohne Voruntersuchung im ELISA zwar bei nachfolgender PCR noch 16 positiv detektieren können, jedoch waren die ct-Werte zwischen 3,57 und 8,29 niedriger (Daten nicht gezeigt). Deutlich wurde auch, dass Ohrstanzproben für Massenuntersuchungen erst dann hoffähig sind, wenn durchaus noch vorhandene Probleme im Handling beseitigt sind und ein Automatisierungsfortschritt den erforderlichen Probendurchsatz

Abb. 1: Untersuchung von Ohrstanzproben: (a): Ringtestproben, (b): manuelle Probenentnahme, (c): Einhebelstanzöffner, Fa. Caisley, (d): automatisierte Probenbearbeitung *Foto: Fa. Caisley*

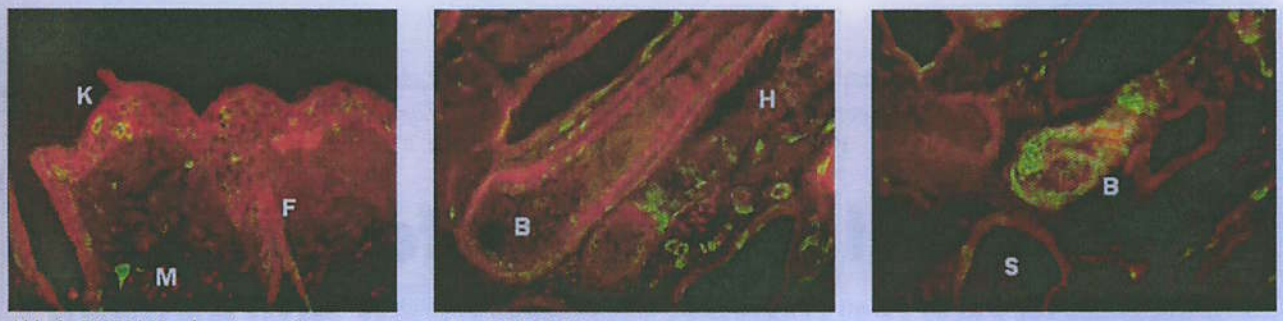


Abb. 2: BVDV-Nachweis an Kryostatschnitt B – BVDV-Ringtest

a) BVDV-Antigen in Keratinozyten (K) und Zellen des Follikelostiums (F) sowie einzelnen großen mononukleären Zellen (M) der Dermis

b) BVDV-Antigen in Zellen der inneren und äußeren Haarwurzelscheide (H) und in Bulbuszellen (B)

c) BVDV-Antigen in Zellen des Haarbulbus (B) und in Schweissdrüsenausführungsgängen (S)

gestattet. Dazu gibt es Erfolg versprechende gerätetechnische Ansätze (Abb. 1 d).

4.7 Kryostatschnitte

Die Kryostatschnitte wurden von 16 der 38 Ringtestteilnehmer untersucht und von 14 korrekt beurteilt (Tab. 8).

Die Proben wurden mittels direktem (verwendete Konjugate : BioX, VDV Gamakon; c.c. pro) bzw. indirektem (verwendete Antikörper: WB 103/105; C16) Immunfluoreszenztest untersucht. Die Anwendung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz ergibt ein kräftiges und brillantes Fluoreszenzsignal in zahlreichen Keratinozyten, Epithelzellen von Haarfollikeln und Anhängen sowie dermalen Makrophagen (Abb. 2).

Weiterführende Literatur: *(Njaa et al.*, 2000; *Cornish et. al.*, 2005)

5 Schlußfolgerungen

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse, von einzelnen Abweichungen abgesehen, eine verlässliche Qualität der eingesetzten Testkits und die Beherrschung der Untersuchungsverfahren durch die Labore. Weiterhin wird deutlich, dass der Einsatz amtlich zugelassener Testkits eine Vereinheitlichung der Diagnostik befördert und die Kongruenz der Ergebnisse insgesamt höher ist, als bei den »klassischen« virologischen Verfahren wie Virusisolierung oder SNT, bei denen sehr unterschiedliche Protokolle und Materialien zum Einsatz kommen. Positiv ist die Tatsache zu vermerken, dass jeweils Alternativtests verschiedener Anbieter zur Verfügung stehen, deren Koexistenz die weitere qualitative Entwicklung befördert. Es muss jedoch auch unterstrichen werden, dass es unbedingt notwendig ist, auch die »klassischen« Methoden zu pflegen, selbst wenn sie nicht mehr überall tägliche Routine sind. Eine Entwicklung hin zur Standardisierung scheint sich bei der Durchführung der PCR abzuzeichnen, wo im Ringversuch neben vornehmlich zwei Protokollen (AVID-Methode und Protokoll Riems) auch mehrere amtlich zugelassene kommerzielle Testkits eingesetzt wurden und ausnahmslos zu guten Ergebnissen geführt haben. Erfreulicherweise haben zahlreiche Labore auch die zugesandten Ohrstanzproben untersucht, auch wenn sie noch nicht überall zur diagnostischen Routine gehören.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen des Ringtestes ablesen, dass von der diagnostischen Seite her alle Voraussetzungen vorhanden sind, die BVD-Eradikation in Deutschland wirksam voranzutreiben. Somit wird das Fehlen bundeseinheitlicher Regelungen für ein durchgängiges und weitestgehend einheitliches Bekämpfungskonzept immer mehr zum limitierenden Faktor auf Bundesebene.

Danksagung:

Unser Dank gilt Birgit Meinke und Gabriele Czerwinski für die gewissenhafte Präparation, Konfektionierung und Testung der Ringtestproben und Ines Jakobi für die Organisation des Probenversands.

Literatur

1. Cornish, T. E., A. L. van Olphen, J. L. Cavender, J. M. Edwards, P. T. Jaeger, L. L. Vieyra, L. F. Woodard, D. R. Miller, D. O' Toole (2005): Comparison of ear notch immunochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J. Vet. Diagn. Invest. 17, 110-117.

2. Gaede, W., R. Reiting, H. Schirrmeier, K. R. Depner, M. Beer (2005): Nachweis und Speziesspezifische Differenzierung von Pestiviren mit der real-time RT-PCR. Berl. Münch. Tierärztl. Wchr. 118, 113-120.

3. Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier, M. Beer (2006): A universal heterologous control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Methods, 136, 200-209.

4. Njaa, B. L., E. G. Clark, E. Janzen, J. A. Ellis, D. M Haines (2000): Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimen. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 392-399.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Horst Schirrmeier, Institut für Virusdiagnostik, Prof. Dr. Jens Peter Teifke, Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut; Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems