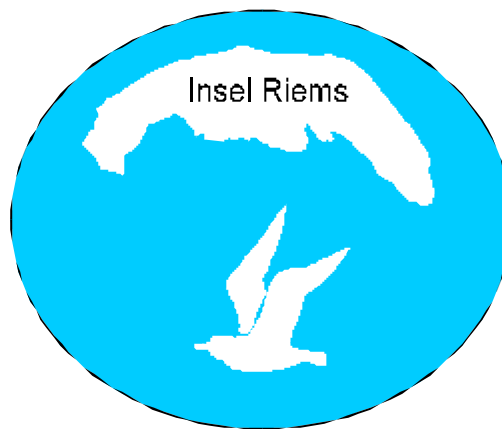


# Auswertung des 7. bundesdeutschen Ringtests zur KSP-Labordiagnostik

2001

Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere  
Nationales Referenzlabor für Klassische Schweinepest  
Insel Riems



**Bearbeiter:** Dr. Klaus R. Depner und PD Dr. Jens Teifke

## Einleitung

Der Ringtest zur Labordiagnose der Klassischen Schweinepest (KSP) hat das Ziel, den geforderten Standard der KSP-Diagnostik bundesweit zu erhalten und ihn gegebenenfalls zu verbessern. Er ist in erster Linie als Eigenkontrolle der eingesetzten Testverfahren gedacht. Fehler, die sich im Laufe der Zeit eingeschlichen haben, können rechtzeitig erkannt und behoben werden. Indirekt trägt der Ringtest auch zu einer besseren Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien bei. Er widerspiegelt den qualitativen Stand der routinemäßig durchgeführten KSP-Diagnostik in den einzelnen Untersuchungseinrichtungen.

Ende 2001 wurde an 36 Untersuchungseinrichtungen und an vier kommerzielle ELISA-Hersteller Referenzmaterial verschickt. Die Proben sollten dann bis Ende Februar 2002 untersucht werden. Außer einem Untersuchungslabor und einem ELISA-Hersteller haben sich alle Einrichtungen am Ringtest beteiligt.

Für den Antikörpernachweis sowie für den direkten Erregernachweis wurden vier Seren (je 2 ml) in lyophilisierter Form verschickt. Ein Serum wurde als Doppelprobe versandt, somit hat jede Untersuchungseinrichtung einen Satz von 5 Serumproben erhalten. Die Seren wurden für jede Untersuchungseinrichtung unterschiedlich kodiert. Aus Tabelle 1 ist die Entschlüsselung des Codes zu entnehmen. Alle fünf Seren stammen aus der Serumsammlung des Nationalen Referenzlabors. Eine Zusammenfassung aller serologischen und virologischen Ergebnisse, die zur Charakterisierung der Ringtestseren herangezogen wurden, ist in Tabelle 2 dargestellt.

Zusätzlich zu den Seren wurden auch fünf Sätze azetonfixierter Gefrierschnitte für den Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von KSP-Antigen versandt.

Die Seren sollten nach Möglichkeit in den folgenden Tests untersucht werden:

1. *Neutralisationstest (NT) zur differentialdiagnostischen Abklärung bezüglich Pestiviren*
2. *Antikörper-ELISA*
3. *Zellkulturelle Virusisolierung mit Bestimmung des Virustiters*
4. *RT-PCR (falls Test vorhanden)*
5. *Antigen-ELISA (falls Test vorhanden).*

Es gab seitens des Referenzlabors keine speziellen Vorschriften bezüglich der einzusetzenden Testverfahren oder Testprotokolle. Es sollten die in der jeweiligen Untersuchungseinrichtung üblichen Testverfahren nach den hausinternen Protokollen eingesetzt werden. Die Ringtestproben sollten in der Tagesroutine wie eine „normale“ Einsendung, die auf KSP zu untersuchen ist, betrachtet und behandelt werden. Diese Vorgehensweise gewährleistet, daß die erzielten Ergebnisse ein wahrheitsgetreues Bild der Qualität der KSP-Diagnostik darstellen.

Im ersten Teil dieses Berichtes werden die Ergebnisse der serologischen und virologischen Untersuchungen anhand jedes einzelnen Serums vorgestellt und kommentiert. Im zweiten Teil wird die Auswertung des IFT dargestellt.

## KSP-Ringtest 2001

### TEIL 1:

Antikörper- und Erregernachweis in den Referenzseren

***Bearbeiter: Dr. Klaus R. Depner***

## **Serum SH 470 (BD-Feldserum, WIEDERHOLUNGSPROBE)**

### *Charakterisierung des Serums*

Serum SH 470 wurde bereits im vergangenen Jahr im Ringtest eingesetzt (siehe auch KSP-Ringtest 2000). Es handelt sich um ein Feldserum, das die differentialdiagnostische Problematik in der KSP-Serologie widerspiegelt. Das Spendertier stammte aus einem Bestand in Schleswig-Holstein, der aufgrund von fraglichen und positiven Ergebnissen in verschiedenen Antikörper-ELISA in den Verdacht einer KSPV-Infektion geraten war. Da es sich um ein Feldserum handelt, ist nicht bekannt, wann und mit welchem Pestivirus das Tier Kontakt hatte. Umfangreiche serologische Untersuchungen haben ergeben, daß es sich um ein Border Disease oder Border Disease-ähnliches Virus gehandelt haben muß. Die konventionellen Antikörper-ELISA zeigen dieses Serum in der Regel als fraglich an. Der zellkulturelle Virusnachweis, der Antigennachweis mittels entsprechendem ELISA sowie die PCR sind negativ.

### *Ergebnisse*

Anhand dieses Serums, das zum zweiten Mal verschickt wurde, konnte die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen überprüft werden. Die meisten Labors konnten ihre Ergebnisse aus dem Vorjahr wiederholen. Mehr als dreifache Titerabweichungen in den Ergebnissen beider Jahre wurden in 7 Labors beim KSP-Neutralisationstest, in 3 Labors beim BVD-Neutralisationstest und in 6 Labors beim BD-Neutralisationstest festgestellt (Tabelle 3).

Es hat sich gezeigt, dass die richtige Gesamtinterpretation von der Etablierung des BD-Neutralisationstests maßgeblich beeinflusst wird. So haben 3 Untersuchungseinrichtungen (Labor: 13, 22, 27) die Ergebnisse offensichtlich durch das Fehlen des BD-Neutralisationstests falsch beurteilt. Im Vorjahresringtest hatten ebenfalls drei Einrichtungen (Labor: 1, 4, 33) das Serum falsch beurteilt. Erfreulicher Weise haben alle drei Labors im diesjährigen Vergleich den BD-Neutralisationstest durchgeführt und die Ergebnisse richtig interpretiert. Dieses Beispiel zeigt, dass die Einführung des BD-Neutralisationstests in die Pestivirus-Differentialdiagnostik zur Qualitätsverbesserung beigetragen hat. In weiteren 3 Labors wurde ein zu niedrige BD-Titer gemessen, allerdings hatte es keine Konsequenzen für die Beurteilung.

Erwartungsgemäß hat das Feldserum SH 470 den Antikörper-ELISA Probleme bereitet. Das lag nicht an den Untersuchungseinrichtungen, sondern an der sehr stark ausgeprägten Kreuzreaktivität, die bei diesem Serum zu beobachten war. Es gibt keine offensichtliche Erklärung dafür, daß das Serum SH 470 in verschiedenen Labors mal negativ, mal fraglich und mal positiv reagierte, obwohl ELISA-Kits des gleichen Herstellers zum Einsatz kamen.

Alle durchgeführten Untersuchungen zum direkten Nachweis des Erregers (Antigen-ELISA, Virusisolierung, PCR) waren fehlerfrei.

## **Serum 2197 (KSP-antikörperhaltiges Serum, DOPPELPROBE)**

### *Charakterisierung des Serums*

Das Serum 2197 stammt von einem Mastschwein, das experimentell mit  $\sim 10^{7,2}$  KID<sub>50</sub> des KSP- Virusstammes Eystrup (Genotyp 1.1, pathogen) i.m. infiziert wurde. Das Tier zeigte eine Woche nach der Inokulation vorübergehende Krankheitserscheinungen, von denen es sich bis zum Tag 21, dem Tag der Blutentnahme, völlig erholte.

Der KSP-Neutralisationstiter im Serum liegt in Abhängigkeit vom Testvirus zwischen 320 und 3840 ND<sub>50</sub>. Eine Kreuzreaktivität mit BD-Viren, insbesondere mit dem Stamm Gifhorn ( $\sim 120$  ND<sub>50</sub>), ist feststellbar. Die konventionellen Antikörper-ELISA sollten dieses Serum als positiv anzeigen. Der zellkulturelle Virusnachweis, der Antigennachweis mittels entsprechendem ELISA sowie die PCR führen zu negativen Ergebnissen.

### *Ergebnisse*

Das Serum 2197 wurde unter zwei verschiedenen Codenummern als Doppelprobe versandt. Die Erwartung war, dass die Ergebnisse der Doppelproben nicht mehr als eine Titerstufe voneinander abweichen. Diskrepanzen von mehr als einer Titerstufe traten in 5 Labors im KSP-Neutralisationstest und jeweils in einem Labor in den Neutralisationstests für BVD bzw. BD auf (Tabelle 4). Die unterschiedlichen Ergebnisse mit dem gleichen Serum führten nur in einem Fall (Labor 17) zu einer falschen Beurteilung. In den Labors 10 und 35 wurde ebenfalls falsch beurteilt, obwohl die Einzelergebnisse korrekt waren. In mehreren Untersuchungseinrichtungen wurde ein zu niedriger Neutralisationstiter ( $< 100$  ND<sub>50</sub>) gemessen, ohne dass sich das aber negativ auf die Beurteilung auswirkte.

Alle durchgeführten Untersuchungen mit den Antikörper-ELISA, den Antigen-ELISA, der PCR sowie die zellkulturelle Virusisolierung waren fehlerfrei.

## **Serum 1878/20**

### *Charakterisierung des Serums*

Dieses Serum stammt von einem Mastschwein, dem oronasal  $\sim 10^{6,2}$  KID<sub>50</sub> des KSP-Virusstammes Pader (Genotyp 2.1, pathogen) verabreicht wurden. Die KSP-Infektion, die das Tier durchlaufen hat, kann als mild bezeichnet werden. Die Besonderheit bei diesem Serum ist, dass am Tag 20, als das Serum gewonnen wurde, die Virämie im Abklingen war und gleichzeitig neutralisierende Antikörper nachweisbar waren. Vor dem Lyophilisieren des Serums konnte noch KSP-Virus zellkulturell reisoliert werden, nach dem Lyophilisieren war dies in den untersuchten Ampullen am Referenzlabor nicht mehr der Fall. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass noch eine gewisse Restinfektiösität vorhanden ist und aus einigen der lyophilisierten Portionen KSP-Virus isoliert werden kann. Der KSP-Neutralisationstiter liegt in Abhängigkeit vom Testvirus zwischen 30 und 150 ND<sub>50</sub>. Eine relativ starke Kreuzreaktivität mit BD-Viren ( $\sim 20-60$  ND<sub>50</sub>) und BVD-Viren ( $\sim 60$  ND<sub>50</sub>) ist ebenfalls feststellbar. Die konventionellen Antikörper-ELISA sollten dieses Serum als positiv bzw. fraglich anzeigen. Die PCR ist positiv und hat sich somit für dieses Serum als sensitivste Nachweismethode erwiesen.

### *Ergebnisse*

Insgesamt konnten mittels PCR in 15 von 20 Labors, die dieses Verfahren anwandten korrekte Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 5). Zellkulturell wurde das Virus nur in einem Labor (Nr. 35) reisoliert. Zu einer falschen Beurteilung des Serums kam es in 5 Fällen. Es lag hauptsächlich daran, dass entweder die gemessenen KSP-Titer zu niedrig oder die kreuzreagierenden BVD-Titer zu hoch waren. Es hat sich auch herausgestellt, dass die richtige Gesamtinterpretation außer von den Neutralisationsergebnissen auch von dem

korrekten PCR-Ergebnis abhängig war. Mit dem Antikörper-ELISA wurden in allen Labors korrekte Ergebnisse erzielt.

### **Serum 1857**

#### *Charakterisierung des Serums*

Dieses Serum stammt von einem Mastschwein, dem zwei mal BVD-Virus Typ 1 (Stamm NADL) verabreicht wurde. Das Tier zeigte keinerlei Krankheitserscheinungen nach der Virusverabreichung. Das Serum wurde am 70. Tag nach der Inokulation gewonnen. Der homologe Neutralisationstiter liegt bei ~20 ND<sub>50</sub>, ein Indiz dafür, dass die immunologische Reaktion schwach war. Das Serum zeigt keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Pestiviren (BVDV2, KSPV, BDV). Die konventionellen Antikörper-ELISA sollten dieses Serum als negativ anzeigen. Der zellkulturelle Virusnachweis, der Antigennachweis mittels entsprechendem ELISA sowie die PCR sind negativ.

#### *Ergebnisse*

Aus der Sicht der KSP-Diagnostik gab es mit diesem Serum in keinem Labor Probleme. Alle Untersuchungseinrichtungen beurteilten das Serum korrekt. In einigen Labors wurden entweder zu niedrige oder zu hohe BVD- und BD-Neutralisationstiter gemessen, die allerdings keine Auswirkung auf die Beurteilung hatten. In einem Fall (Labor 34) wurde ein falsches Ergebnis im Antikörper-ELISA erzielt. Alle Ergebnisse, die den direkten Erregernachweis betreffen, waren korrekt.

### **Diskussion**

In den meisten Einrichtungen wurden korrekte Ergebnisse erzielt, die zu richtigen Bewertungen der Seren bezüglich KSP geführt haben. Die Labors, die den BD-NT differentialdiagnostisch eingesetzt haben, waren in der Lage, z.B. im Falle des Serums SH470, eine klare Diagnose zu stellen. Allerdings ist durch die Integration des BD-NT in die serologische Differentialdiagnostik das System komplexer und aufwendiger geworden und dadurch auch viel anfälliger. Ein nicht völlig optimiertes Testsystem kann zu falschen Beurteilungen führen. Erschwerend kommt noch dazu, daß die serologische Diversität von BD-Viren viel ausgeprägter ist als erwartet. Dieses bedeutet, daß ein Serum in einem BD-NT mit einem bestimmten BD-Virusstamm (z.B. 137/4) einen sehr hohen Titer haben kann und in einem anderen BD-NT mit einem andern BD-Virusstamm einen viel niedrigeren. Dieses Phänomen ist auch anhand der Ringtestergebnisse zu beobachten. Aufgrund der Erfahrungen der letzten Jahre empfehlen wir zur Zeit, die BD-Virusstämme 137/4 und Moredun im NT einzusetzen. Diese Empfehlung kann je nach epidemiologischer Situation geändert werden. Im Ringtest wurde auch mit dem Stamm SF6/87 gearbeitet. Alle Labors führten den BD-Neutralisationstest mit der Zelllinie SFT-Ri durch.

In allen Untersuchungseinrichtungen wurde der KSP-Neutralisationstest mit dem Virusstamm Alfort, am häufigsten in Kombination mit der PK15 Zelllinie, eingesetzt. Vier Labors verwendeten die STE Zelle. Beim BVD-Neutralisationstest gab es die meisten Unterschiede zwischen den Einrichtungen. Die Mehrheit der Untersuchungseinrichtungen verwendete den Virusstamm NADL und die Zelllinie MDBK.

Anhand des Serums SH470, das im diesjährigen und im vergangenen Ringtest verschickt wurde, konnte die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen überprüft werden. Die meisten Labors konnten ihre Ergebnisse aus dem Vorjahr wiederholen. Anhand des Serums 2197, das doppelt verschickt wurde, konnte die Reproduzierbarkeit bzw. Genauigkeit, mit der die Tests

durchgeführt werden, getestet werden. Hier hat es sich gezeigt, dass in einigen Labors Ungenauigkeiten, vermutlich bei der Durchführung des Tests, auftreten.

Erfreulicherweise ist es im diesjährigen Ringtest zu keinen Verwechslungen von Proben gekommen. Die festgestellten Fehler sind primär der Methodik bzw. der Durchführung zuzuschreiben. Der von Jahr zu Jahr zunehmende Einsatz der PCR zeigt, daß diese Methode ergänzende Möglichkeiten für die KSP-Diagnostik bietet. Es erweist sich, dass der Ringtest eine gute Gelegenheit bietet, die Sensitivität der eigenen PCR zu überprüfen.

In einigen Labors, in denen suboptimale Serumtiter gemessen wurden, ist die Fehlerquelle nicht eindeutig erkennbar. Weder die eingesetzten Virusstämme noch deren Titer oder die verwendete Zellkultur können für die Streuung der gemessenen Serumtiter verantwortlich gemacht werden. Es wird offensichtlich, daß einerseits korrekte Ergebnisse auch mit unterschiedlichen Reagenzien (Virusstamm, Zelllinie) erzielt werden können und andererseits führt der Einsatz einheitlicher Virusstämme und Zelllinien nicht zwingend zu gleichen Ergebnissen. Daraus läßt sich folgern, daß die Qualität des Neutralisationstests nicht alleine von den eingesetzten Substanzen und Zelllinien abhängt, sondern vielmehr in der Durchführung (z.B. in der Art und Dauer der Neutralisationsreaktion) liegt. Eine Lösung dieses Problems könnte das regelmäßige Mitführen von bekannten Serumkontrollen (Referenzseren) sein. Solche Seren sind im Referenzlabor erhältlich und können jederzeit zur Verfügung gestellt werden. Des weiteren empfehlen wir, das Arbeitsprotokoll für den NT (die einzelnen Arbeitsschritte) kritisch zu überprüfen und mit der Referenzmethode (erhältlich im Referenzlabor, Methodensammlung der AVID) zu vergleichen.

Mit den in Deutschland zugelassenen ELISA zum Nachweis von KSP-Antikörpern wurden durchgehend korrekte Ergebnisse erzielt. Erwartungsgemäß hat das Feldserum SH 470 Schwierigkeiten bereitet. Die Problematik liegt eindeutig nicht bei den Untersuchungseinrichtungen, sondern in der naturgegebenen Kreuzreaktivität zwischen den KSP- und BD-Viren.

### **Schlußfolgerungen zu Teil 1 des KSP-Ringtests 2001**

- Im KSP-Ringtest 2001 wurden überwiegend zuverlässige Ergebnisse erzielt.
- Elf Untersuchungseinrichtungen beurteilten mindestens eine der 5 Ringtestproben falsch.
- Es sind Fortschritte in der serologischen Differentialdiagnostik erzielt worden. Die meisten Untersuchungseinrichtungen haben den BD-Neutralisationstest erfolgreich in die KSP-Differentialdiagnostik integriert.
- Die Standardisierung der KSP-Diagnostik hat sich im Vergleich zum Vorjahr verbessert.
- Das Augenmerk muß weiterhin auf handwerkliche Dinge und auf scheinbare Kleinigkeiten gerichtet werden, um z.B. Verwechslungen von Proben zu vermeiden.
- Referenzseren sollten regelmäßig im Neutralisationstest als interne Serumkontrollen mitgeführt werden.
- Die PCR-Ergebnisse zeigen, daß diese Methode ergänzende Möglichkeiten für die KSP-Diagnostik bietet.

Tab. 1: Code der Serumproben im Ringtest 2001

Labor	S E R U M				
	SH470	2197	1878	1857	2197
1	157	108	3	115	175
2	87	176	96	133	28
3	75	122	178	154	167
4	80	48	21	123	44
5	94	84	4	25	103
6	11	143	171	174	41
7	29	6	97	54	2
8	126	129	107	17	68
9	53	139	51	118	66
10	98	161	5	85	236
11	124	52	62	168	218
12	150	99	169	109	206
13	73	90	34	238	202
14	31	156	160	220	201
15	43	92	125	205	8
16	106	60	162	214	140
17	40	127	1	212	147
18	77	67	46	15	148
19	32	55	16	49	42
20	166	38	56	23	134
21	117	159	135	158	173
22	74	36	155	101	230
23	239	138	45	24	216
24	217	79	50	153	113
25	213	164	102	30	64
26	208	237	203	93	128
27	215	219	210	146	141
28	111	207	209	19	39
29	14	211	58	78	9
30	61	204	81	105	26
31	82	76	37	243	57
32	10	240	88	27	121
33	65	86	18	72	20
34	59	137	241	91	83
35	7	100	152	242	12
36	177	89	70	165	244
02*	180	110	145	114	172
03*	33	170	35	47	136
04*	132	179	63	13	71
05*	69	119	130	116	120

\* = ELISA-Hersteller



**Tab. 2:** Identität der Testseren charakterisiert durch Neutralisationstiter, zellkulturelle Virusisolierung und PCR

Test	Serum			
	SH470	2197/21	1878/20	1857/70
NT-KSP (Alfort/187)	35*	320	60	<5
NT-KSP (Diepholz)	60		240	<5
NT-KSP (C-Stamm)	7		40	<5
NT-KSP (Pader)	40	60	30	<5
NT-BVD1 (NADL)	<5	<5	<10	20
NT-BVD2 (CS8644)	<5		10	<5
NT-BD (Morehun)	60		20	<5
NT-BD (Chemnitz)	10		40	<5
NT-BD (SF6/87)	15		15	<5
NT-BD (137/4)	480	<10	40	<5
Virusisolierung (KID <sub>50</sub> )	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
PCR	Negativ	Negativ	<b>POSITIV</b>	Negativ

\* = Neutralisationstiter: ND<sub>50</sub>

#### Interpretation der Ergebnisse bezüglich KSP

- Serum 2197 sollte aufgrund der Serologie als **positiv** bewertet werden
- Serum SH470 sollte aufgrund der Serologie als **negativ/fraglich** bewertet werden
- Serum 1857 sollte aufgrund der Serologie als **negativ** bewertet werden
- Serum 1878 sollte aufgrund des Erregernachweises und der Serologie als **positiv/fraglich** bewertet werden

**Tab. 3:** Durchgeführte Untersuchungen mit dem Serum SH470  
In Klammern zum Vergleich die Vorjahresergebnisse

Lab	NT-KSP	NT-BVD	NT-BD	Ak-ELISA	Ag-ELISA	VI	PCR	Beurteilung
1	23 (64)	2 (N)	<b>128 (724)</b>	P (N)	N (N)	N (N)		O (X)
2	16 (16)	N (N)	128 (62)	N (N)	N (N)	N (N)	NN	O (O)
4	20 (25)	N (N)	601	NF (F)	N (N)	N (N)		O (X)
5	8 (16)	<b>126 (32)</b>	<b>1000 (126)</b>	NF (P)		N (N)	N	O (O)
6	11 (11)	6 (N)	<b>181 (32)</b>	FP (P)	N	N (N)		O (O)
7	32 (40)	N (N)	<b>8 (20)</b>	PF (NP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
8	10 (20)	N (N)	<b>320 (40)</b>	PF (N)	N (N)	N (N)		O (O)
9	32	4	1024	N (N)	(N)	N (N)	N	O (O)
10	15 (20)	<b>N (120)</b>		F (N)	(N)	N (N)	N (N)	O (O)
11	10 (10)	N (N)	320 (320)	N (N)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
12	40 (20)	N (N)	>640 (640)	PN (NP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
13	40 (25)	5 (N)		N (N)		N (N)		X (O)
14	<b>8 (32)</b>	2 (N)	256 (256)	NP (N)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
15				N (NF)	N (N)			
16	<b>20 (80)</b>	N (N)	<b>28 (80)</b>	N (N)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
17	15 (20)	70/5 (40)	575 (226)	N (N)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
18	<b>20 (70)</b>	10 (28)	316 (251)	F (N)	N	N (N)	N	O (O)
19	24 (32)	24 (16)	256 (256)	PN (N)	N (N)	N (N)	(N)	O (O)
20	23 (45)	11 (N)	91 (181)	PN (FP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
21	16 (11)	<b>8 (64)</b>		F (F)	N (N)	N (N)		O (O)
22	15	N		PF	N	N		X
23	20 (34)	N (16)	256 (550)	N (NF)	N (N)	N (N)		O (O)
24	<b>20 (N)</b>	N (N)	256 (128)	P (NF)	N (N)	N (N)		O (O)
25	<b>&lt;10 (16)</b>	16 (N)	256 (256)	F (NP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
26	20 (40)	N (N)	320 (891)	NN (NP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
27	<b>10 (N)</b>	N (N)	(N)	NF (NF)		N (N)	N (N)	X (O)
28	16 (32)	N (N)	<b>32 (32)</b>	F (NPF)	N (N)	N (N)		O (O)
29	48 (22)	8 (N)	<b>1024 (256)</b>	P (NPF)	N (N)	N (N)		O (O)
30	<b>16 (64)</b>	2 (N)	<b>2048 (128)</b>	N (N)		N (N)	N (N)	O (O)
31				FN (FN)				O
32	30	10	80	N	N	N	N	O
33	30 (20)	N (N)	120 (120)	N (N)		N (N)	N (N)	O (O)
34	23 (45)	8 (N)	725	F (NP)	N (N)	N (N)	N (N)	O (X)
35	<b>(N)</b>	(N)		N (N)	N (N)	N (N)	N (N)	O (O)
36				F (N)	N (N)			(O)
102				P (P)	N (N)			
103				N (F)	N (N)			O
104				PF (NP)				

N: Negativ (<10 ND<sub>50</sub>); P: Positiv; F: Fraglich; O: richtige Beurteilung; X: falsche Beurteilung  
Fette Schrift: auffällige Ergebnisse bzw. Ergebnispaaare

**Tab. 4:** Durchgeführte Untersuchungen mit dem **Serum 2197**  
Ergebnisse der Doppeluntersuchung (a/b)

Lab	NT-KSP	NT-BVD	NT-BD	Ak-ELISA	Ag-ELISA	VI	PCR	Beurteilung
1	<b>64/54</b>	N/N	4/3	P/P	N/N	N/N		O/O
2	<b>50/80</b>	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
4	160/160	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N		O/O
5	125/125	N/8	N/N	P/P		N/N	N/N	O/O
6	<b>181/2048</b>	3/3	N/N	P/P	N/N	N/N		O/O
7	256/128	4/N	16/16	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
8	320/160	F/N	N/N	P/P	N/N	N/N		O/O
9	<b>256/64</b>	N/N	4/2	P/P		N/N	N/N	O/O
10	120/120	N/N		P/P		N/N	N/N	X/X
11	160/160	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
12	160/160	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
13	190/240	5/N		P/P		N/N		O/O
14	<b>64/128</b>	4/4	2/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
15				P/P	N/N			
16	160/160	N/N	<b>14/6</b>	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
17	<b>11/176</b>	13/4	<b>56/79</b>	P/P	N/N	N/N	N/N	X/O
18	160/226	N/N	10/10	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
19	256/256	<b>8/48</b>	12/8	P/P	N/N	N/N		O/O
20	<b>128/362</b>	11/4	4/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
21	<b>91/128</b>	N/N		P/P	N/N	N/N		O/O
22	120/120	N/N		P/P	N/N	N/N		O/O
23	<b>80/80</b>	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N		O/O
24	<b>40/80</b>	2/4	N/N	P/P	N/N	N/N		O/O
25	<b>64/64</b>	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
26	<b>320/80</b>	N/10	<b>40/10</b>	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
27	<b>20/30</b>	N/N		P/P		N/N	N/N	O/O
28	128/256	N/N	4/8	P/P	N/N	N/N		O/O
29	512/384	4/6	12/24	P/P	N/N	N/N		O/O
30	128/256	N/N	2/4	P/P		N/N	N/N	O/O
31				P/P				O/O
32	320/320	10/10	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
33	160/120	N/N	10/5	P/P		N/N	N/N	O/O
34	<b>181/64</b>	N/N	N/N	P/P	N/N	N/N	N/N	O/O
35				P/P	N/N	N/N	N/N	X/X
36				P/P				
102				<b>N/N</b>	N/N			
103				P/P	N/N			O/O
104				P/P				

N: Negativ (<10 ND<sub>50</sub>); P: Positiv; O: richtige Beurteilung; X: falsche Beurteilung  
Fette Schrift: auffällige Ergebnisse (entweder zu niedrige/zu hohe Titer oder mehr als eine Titerstufe Unterschied zwischen den Doppelproben)

Tab. 5: Durchgeführte Untersuchungen mit dem Serum 1878

Lab	NT-KSP	NT-BVD	NT-BD	Ak-ELISA	Ag-ELISA	VI	PCR	Beurteilung
1	32	16	32	F	N	N		O
2	32	8	8	P	N	N	<b>N</b>	O
4	47	23	38	P	N	N		O
5	<b>N</b>	<b>125</b>	N	P		N	P	<b>X</b>
6	181	<b>2896/22</b>	22	F/P	N	N		<b>X</b>
7	64	<b>128</b>	<b>256</b>	P	N	N	P	O
8	<b>10</b>	80	20	P	N	N		<b>X</b>
9	<b>256</b>	32	<b>256</b>	P		N	P	O
10	20	30		P		N	P	O
11	30	20	40	P	N	N	P	O
12	80	80	20	P	N	N	P	O
13	60	50		P		N		O
14	<b>8</b>	64	32	P	N	N	<b>N</b>	<b>X</b>
15				P	N			
16	56	10	N	P	N	N	P	O
17	31	<b>100</b>	36	P	N	N	<b>N</b>	O
18	48	20	31	P	N	N	P	O
19	48	<b>128</b>	64	P	F	N		<b>X</b>
20	64	32	6	P	F	N	<b>N</b>	O
21	32	11		P	N	N		O
22	<b>10</b>	20		P	N	N		O
23	40	16	16	F	N	N		O
24	20	4	8	P	N	N		O
25	<b>16</b>	32	16	P	N	N	P	O
26	20	40	40	P	N	N	P	O
27	<b>640</b>	<b>640</b>		P		N	P	O
28	32	N	N	P	N	N		O
29	128	<b>128</b>	<b>128</b>	P	N	N		O
30	128	32	64	P		N	P	O
31				P				O
32	<b>320</b>	<b>320</b>	20	P	N	N	P	O
33	60	7	20	P		N	<b>F</b>	O
34	<b>16</b>	28	14	P	N	N	P	O
35				P	N	10	P	O
36				P	N			
102				<b>N</b>	N			
103				P	N			O
104				P				

N: Negativ (<10 ND<sub>50</sub>); P: Positiv; F: Fraglich; O: richtige Beurteilung; X: falsche Beurteilung  
 Fette Schrift: auffällige Ergebnisse

Tab. 6: Durchgeführte Untersuchungen mit dem Serum 1857

Lab	NT-KSP	NT-BVD	NT-BD	Ak-ELISA	Ag-ELISA	VI	PCR	Beurteilung
1	N	16	N	N	N	N		O
2	N	6	N	N	N	N	N	O
3								
4	N	20	N	N	N	N		O
5	N	16	N	N		N	N	O
6	N	16	N	N	N	N		O
7	N	16	N	N	N	N	N	O
8	N	<b>N</b>	N	N	N	N		O
9	2	16	N	N		N	N	O
10	N	20		N		N	N	O
11	N	20	N	N	N	N	N	O
12	N	<b>N</b>	N	N	N	N	N	O
13	N	20		N		N		O
14	2	16	N	N	N	N	N	O
15				N	N			
16	N	5	N	N	N	N		O
17	N	6	N	N	N	N	N	O
18	N	<b>N</b>	N	N	N	N	N	O
19	N	10	N	N	N	N		O
20	N	16	N	N	N	N	N	O
21	N	<b>N</b>		N	N	N		O
22	N	60	N	N	N	N		O
23	N	32	N	N	N	N		O
24	N	16	N	N	N	N		O
25	N	32	N	N	N	N	N	O
26	N	<b>N</b>	N	N	N	N	N	O
27	N	<b>480</b>		N		N	N	O
28	N	8	N	N	N	N		O
29	3	32	3	N	N	N		O
30	2	16	<b>32</b>	N		N	N	O
31				N				O
32	N	40	N	N	N	N	N	O
33	N	10	N	N		N	N	O
34	N	28	N	<b>P</b>	N	N	N	O
35				N	N	N	N	O
36				N	N			
102				N	N			
103				N	N			
104				N				

N: Negativ (<10 ND<sub>50</sub>); P: Positiv; O: richtige Beurteilung; X: falsche Beurteilung  
 Fette Schrift: abweichendes Ergebnis

## KSP-Ringtest 2001

### **Teil 2:**

### **Antigennachweis im Gefrierschnitt mittels Immunfluoreszenztest (IFT)**

Für den Nachweis von KSP-Virusantigen wurden azetonfixierte Kryo(stat)schnitte von 5 Organproben verschickt. Die Schnitte wurden für jede Untersuchungseinrichtung unterschiedlich numerisch kodiert. Aus der Tabelle 8 ist der Schlüssel zu entnehmen. Es wurden 2 komplette Schnittsets versendet, um parallel zum KSP-Virusantigennachweis einen Ansatz mit einem irrelevanten Konjugat bzw. Antikörper durchführen zu können.

### 1. Charakteristika der Gefrierschnitte

Die Kryoschnitte I und II stammen von einem 6 kg schweren, experimentell mit einem KSP-Feldvirusisolat infizierten weiblichen Wildschwein (S 332/01).

Die Schnitte III und IV stammen von einem KSPV-negativen, 45 kg schweren Hausschwein (E 9/98).

Der Schnitt V stammt von einem 17 kg schweren weiblichen, durch Trauma verendeten Wildschwein, bei dem weder KSP-Virusantigen, noch KSPV-Genom oder KSPV selbst nachgewiesen werden konnten (S 333/01).

#### **Kryoschnitt „I“**

Tonsille: Multifokal im Bereich einzelner Tonsillenkrypten und herdförmig vereinzelt im Tonsilloberflächenepithel findet sich sowohl nach direktem IFT unter Verwendung von *VMO Gamakon* (Ch.B. 78) als auch nach indirektem IFT mit *Anti-KSPV BIO 275* (Ch.B. aCSF01|26) eine kräftige zytoplasmatische brillante und homogene Grünfluoreszenz. An mehreren Stellen zeigen zahlreiche Zellen der Keimzentren von Lymphfollikeln sowie disseminiert im extrafollikulären lymphoretikulären Tonsillengewebe verteilte große ovale bis polygonale Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) eine gleichartige Fluoreszenz. Bei Verwendung eines *irrelevanten Antikörpers* bzw. Konjugates (Negativkontrolle) sind keine derartigen Fluoreszenzmuster nachweisbar. Unspezifische feingranuläre gelbgrüne Fluoreszenzen finden sich im Detritus der Tonsillenkrypten sowie mit schwacher dunkelgrüner Färbung im Zentrum einiger Keimzentren.

**Bewertung: positiv (+++)**

#### **Kryoschnitt „II“**

Milz: Eingestreut im extrafollikulären Gewebe sowie im Bereich der Sinus (peritrabekulär) finden sich im direkten oder indirekten IFT wenige zytoplasmatisch kräftig und brilliant grün fluoreszierende Makrophagen. Diese sind bei Verwendung des irrelevanten Antikörpers nicht nachweisbar. Geringgradige dunkelgrüne, aufgrund des Vorhandenseins auch im Kontrollansatz als unspezifisch zu wertende, Fluoreszenzen finden sich stellenweise in Keimzentren von Lymphfollikeln.

**Bewertung: positiv (+)**

#### **Kryoschnitt „III“**

Lymphknoten: Im direkten oder indirekten Test sind keine KSPV-Antigen-spezifischen Fluoreszenzen nachweisbar. Sehr geringgradige unspezifische Keimzentrumreaktionen sowie schwache Anfärbungen des Bindegewebes finden sich auch bei Verwendung des irrelevanten Konjugates (Antikörpers).

**Bewertung: negativ (-)**

**Kryoschnitt „IV“**

Tonsille: Im direkten oder indirekten Test sind keine KSPV-Antigen-spezifischen Fluoreszenzen nachweisbar. Geringgradige grobgranuläre gelbliche Fluoreszenz findet sich in Gebieten degenerierter und nekrotischer Epithelzellen. Diese Signale finden sich auch bei Verwendung des irrelevanten Konjugates (Antikörpers).

**Bewertung: negativ (-)**

**Kryoschnitt „V“**

Niere: Weder im Mesangium, periglomerulär noch im Interstitium sind KSPV-Antigen-spezifischen Fluoreszenzen nachweisbar. Geringgradige unspezifische dunkelgrüne bis gelbgrüne granuläre Fluoreszenz kann gelegentlich im Zytoplasma proximaler Tubulusepithelien beobachtet werden. Diese zeigt sich auch bei Verwendung des irrelevanten Konjugates (Antikörpers).

**Bewertung: negativ (-)**

2. Ergebnisse

Der KSPV-Antigennachweis am Kryoschnitt wurde in 30 Untersuchungseinrichtungen durchgeführt (Labor Nr. 34 = Ausrichter des Tests, im folgenden nicht gewertet). Die Ergebnisse gehen aus Tabelle 9 hervor. Im Labor von Teilnehmer „11“ wurde der Test an 2 Standorten durchgeführt.

9 der 30 Teilnehmer haben sämtliche 5 Schnitte korrekt bewertet. Hierfür fanden entweder der direkte Immunfluoreszenztest (DIFT) mittels polyklonalem anti-KSPV-FITC-Konjugat (VMO Gamakon) Anwendung, oder es wurde der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) unter Verwendung der monoklonalen Antikörper C-16 oder MAK-Mix Tü durchgeführt. Der Testausrichter hat VMO Gamakon im DIFT und die monoklonalen Antikörper a-18 Tübingen sowie BIO 275 mit gleichwertigem Ergebnis verwendet.

10 Ringtestteilnehmer haben einen der Kryoschnitte fehlerhaft interpretiert. Dabei zeigte es sich, dass davon 9 Untersuchungsstellen Probleme mit dem Schnittpräparat II hatten. Für den DIFT wurden VMO Gamakon oder CEDITEST-FITC bzw. ein polyklonales Konjugat in Eigenherstellung verwendet. Im IIFT kamen MAK a-18 oder BIO 275 zum Einsatz.

In 5 teilnehmenden Labors wurden jeweils zwei Schnitte fehlerhaft bewertet. Eine teilnehmende Untersuchungseinrichtung stellte 3 und eine 4 Fehldiagnosen. Hierbei kam es sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Schnitten zu Problemen. 3 Teilnehmer bemängelten die Auswertbarkeit sämtlicher Kryoschnitte, in einem Labor erfolgten 5 Fehleinschätzungen.

Auf die 5 Fälle bezogen, wurden

- der Kryoschnitt „I“ 22 mal richtig beurteilt,
- der Kryoschnitt „II“ 16 mal richtig beurteilt,
- der Kryoschnitt „III“ 23 mal richtig beurteilt,
- der Kryoschnitt „IV“ 24 mal richtig beurteilt und
- der Kryoschnitt „V“ 23 mal richtig beurteilt.

3. Diskussion



Fehler	0	1	2	3	4	5
Anzahl	10	9	5	1	1	4(1+3*)

Teilnehmer: 30

\* „nicht auswertbar“

### **1. Ein Drittel der Ringtestteilnehmer hatte keine Probleme bei der Auswertung des Immunfluoreszenztests am Kryoschnitt.**

In 21 Laboren kam es jedoch zum Auftreten falsch negativer, falsch positiver oder fraglicher bzw. verdächtiger Bewertungen. Dies belegt bestehende Unsicherheiten, die entweder in der Testdurchführung und damit methodisch begründet sind, oder aber ihre Ursache in einer fehlerhaften Auswertung und Beurteilung haben.

Etwa zwei Drittel der Teilnehmer hat in diesem Ringtest das polyklonale Konjugat VMO Gamakon im DIFT verwendet, allerdings ebenfalls nur 6 Teilnehmer fehlerfrei. Nur 3 Teilnehmer waren in der Lage, mittels IIFT eine fehlerfreie Beurteilung zu erzielen.

In 5 Laboren kam es zu Unsicherheiten in der Beurteilung von Kryoschnitt „I“. Dies läßt sich eigentlich nur durch methodische Probleme erklären, weil zahlreiche Antigen-positive Zellen in charakteristischer Verteilung vorliegen.

3 Labore bemängeln die Auswertbarkeit der versendeten Schnittpräparate. Nach Erfahrungen des Testausrichters können azetonfixierte Kryoschnitte durchaus mehrere Wochen im Kühlschrank sowie mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden, ohne dass es zu relevantem Antigenverlust kommen muss. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei längerer Aufbewahrung unter ungünstigen Bedingungen (Heizung, Labortisch, Sonnenlicht etc.) Einbußen an Reaktionsfähigkeit eintreten können. Es ist daher zu empfehlen, derartige Ringversuche zeitnah an der Aussendung der Präparate durchzuführen.

### **2. Probleme bereitete die Interpretation spezifischer Fluoreszenzen, wenn nur wenige Zellen reagieren.**

Der Kryoschnitt „II“, eine Gewebeprobe aus der Milz (gleiches Tier wie Kryoschnitt „I“), hatte erhebliche Schwierigkeiten in der Interpretation bereitet. 15 Teilnehmer entschieden sich für eine „negative“ Beurteilung. Das Erkennen des Gewebes in Verbindung mit der Kenntnis der Organtextur ist Grundvoraussetzung für eine richtige Interpretation. Typischerweise finden sich bei KSP in Lymphknoten oder Milz Fluoreszenzen in großen rundlichen oder ovalen bis polygonalen Zellen (Lymphozyten und Makrophagen). Diese liegen in Keimzentren vor und/oder sind – wie im Kryoschnitt „II“ - nur in das extrafollikuläre lymphatische Gewebe eingestreut sowie gelegentlich gehäuft im Bereich der peritrabekulären Milzsinus anzutreffen. Selbstverständlich kann, wenn nur ein solches Organ zur Verfügung steht, aufgrund einer „schwach positiven“ Immunfluoreszenz keine eindeutige Diagnose gestellt werden.

Bei Vorhandensein dieser Fluoreszenzen sollten diese – falls der Untersucher die durchaus zu akzeptierende Auffassung vertritt, daß der Befund für eine „positiv“- Beurteilung nicht ausreichend ist – als „fraglich“ bewertet werden und Anlaß für weitergehende Untersuchungen sein.

### **3. Falsch positive Ergebnisse sind besonders problematisch.**

Insgesamt in 22 Fällen wurden KSP-Virusantigen-negative Gewebeproben als „fraglich positiv“ bzw. „positiv“ eingestuft oder konnten nicht ausgewertet werden. Die Ursachen hierfür sind nicht eindeutig erkennbar. Durch Anwendung der notwendigen Kontrollen dürften diese Probleme nicht auftreten.

Möglicherweise hat die Aussendung von 2 kompletten Schnittserien Verwirrung bei einem Teil der Ringtestteilnehmer ausgelöst, die entweder 2 verschiedene relevante Antikörper oder sowohl den DIFT als auch den IIFT durchführten, oder aber das zweite Schnittset als Wiederholungsmöglichkeit für den Test aufgefasst hatten.

Wir empfehlen grundsätzlich in einem Prüfansatz zum Nachweis von KSP-Virusantigen folgende Präparate zu untersuchen:

#### **A. Anti-KSPV-monoklonaler Antikörper**

1. Schnitte von verdächtigen Organproben (Ringtest Set 1)
2. Schnitte von Organproben eines KSPV-freien Tieres (= negative Kontrollen)
3. Schnitte von KSPV-positiven Organproben (= positive Kontrollen)

#### **B. Irrelevanter monoklonaler Antikörper**

4. Schnitte von verdächtigen Organproben (Ringtest Set 2)
5. Schnitte von Organproben eines KSPV-freien Tieres (= negative Kontrollen)
6. Schnitte von KSPV-positiven Organproben (= positive Kontrollen)

#### **4. Das zugelassene Testsystem und methodische Empfehlungen.**

Unter Abwägung der Vor- und Nachteile polyklonaler KSP-Konjugate und den aus den Nachteilen (Kreuzreaktionen, markierte Antikörper gegen andere Erreger etc.) erwachsenden diagnostischen Unsicherheiten bietet sich für die Routinediagnostik zum jetzigen Zeitpunkt nur die Verwendung nichtmarkierter Anti-KSPV-mAk an. Der einzige bisher kommerziell verfügbare **und** in Deutschland behördlich zugelassene monoklonale Antikörper ist der **Anti-KSPV BIO 275** (Bio-X Diagnostics, Marche, Belgien). Aus diesem Grund ist der IIFT mit diesem Antikörper heute am Kryoschnitt das Diagnostikum der Wahl.

Auf die ausführlichen aktuellen methodischen Hinweise zu einer **standardisierten Methodik** des IIFT zum Nachweis von KSP-Virusantigen am Kryoschnitt im „IVD-Info“ (April 2002, S. 10-13) wird hingewiesen.

#### 4. Schlussfolgerungen

- Durchführung des KSP-Virusantigennachweises am Kryoschnitt in den Untersuchungseinrichtungen nur noch mittels IIFT und Verwendung des (der) behördlich zugelassenen Antikörper(s)
- Anwendung einer standardisierten Methodik unter Verwendung notwendiger Kontrollreaktionen
- Wiederholung dieses Ringversuchs im Jahr 2003 unter Verwendung des/der zugelassenen Antikörper(s) im IIFT

**Tab. 7:** Code der Gefrierschnitte

Labor Nr.	Gefrierschnitte				
	I	II	III	IV	V
1	383	401	423	312	398
2	434	303	432	413	314
3	451	327	450	421	315
4	321	361	466	431	317
5	325	424	459	440	316
6	366	336	479	460	319
7	387	408	360	415	344
8	417	463	474	426	347
9	300	465	301	436	349
10	455	404	306	433	348
11	476	393	323	304	346
11/2	484	497	504	480	508
12	358	334	343	309	345
13	331	333	382	305	353
14	310	357	370	364	359
15	308	406	350	368	369
16	430	453	330	378	373
17	470	320	302	390	374
18	439	318	384	392	386
19	389	354	395	422	385
20	402	396	363	427	414
21	362	407	376	437	416
22	410	429	379	452	449
23	375	446	338	461	448
24	337	411	341	464	447
25	403	371	311	471	445
26	444	351	412	473	443
27	328	335	420	475	441
28	329	326	472	477	442
29	380	307	457	313	454
30	340	356	438	322	456
31	355	397	428	342	458
32	367	409	418	352	469
33	394	400	419	365	462
34	405	332	399	372	467
35	425	324	391	377	468
36	435	339	381	388	478

**Tab. 8:** Ergebnisse des Antigennachweises in Gefrierschnitten

Labor Nr.	Bewertung der Gefrierschnitte					Verwendete Methode
	I	II	III	IV	V	
<b>Lösung</b>	+++ +++	+ +	- -	- -	- -	<b>DIFT: VMO Gamakon IIFT: BIO 275</b>
1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	Ohne Angaben
2	+ (schwach)	+	+	+	-	DIFT: VMO Gamakon
3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-
4	+	-	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
5	+ fraglich	-	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
6	+ +	- -	- -	- -	- -	DIFT: CEDITEST IIFT: a-18/Tüb
7	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-
8	+	+ fraglich	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon IIFT: C-16
9	+	+ (schwach)	-	-	-	IIFT: MAK Mix TÜ
10	+	-	-	-	-	DIFT: anti-ESPV-FITC
11	-	+	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
11/2	+ (stark)	+ (schwach)	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
12	+	- fraglich	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
13	+	+	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
14	-	-	+	fraglich	fraglich	DIFT: VMO Gamakon
15	+	+ fraglich	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
16	+ fraglich	-	+ fraglich	+ fraglich	-	DIFT: VMO Gamakon
17	+ +	- -	- -	- -	- -	DIFT: VMO Gamakon DIFT: CEDITEST
18	+	+ fraglich	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
19	+	-	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
20	+	-	-	-	-	IIFT: BIO 275
21	+	+	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
22	-	+	+ fraglich	-	+	IIFT: Chekit HC 34/37
23	X	X	X	X	X	DIFT: VMO Gamakon IIFT: MAK C46 (BFAV)
24	X	X	X	X	X	DIFT: VMO Gamakon
25	X	X	X	X	X	IIFT: MAK Mix BFAV TÜ IIFT: C16
26	-	+	-	-	+	DIFT: VMO Gamakon IIFT: a-18 Tübingen
27	+	+	-	-	-	IIFT: Weybridge 103/105
28	+	-	-	-	+	o.A. (ENVISION AP)
29	+	+	-	-	-	DIFT: VMO Gamakon
30	+	+ (schwach)	-	-	-	IIFT: MAK Mix BFAV TÜ
31	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-
32	-	+	-	-	+	IIFT: WH211, WH303
33	++	-	-	-	-	DIFT: polyklonal
34	+	+	-	-	-	IIFT: a-18 Tübingen
35	+	-	+	-	-	DIFT: VMO Gamakon
36	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	-

n.t. = nicht teilgenommen

+ = „positiv“

- = „negativ“

X = „nicht auswertbar“

DIFT = Direkter Immunfluoreszenztest

IIFT = Indirekter Immunfluoreszenztest