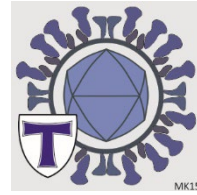


# CDV-Ringversuch 2023

DVG Konsiliarlabor für Hundestaubevirus



**Institut für Virologie**

**FB Veterinärmedizin**

**Justus-Liebig-Universität Gießen**

Schubertstr. 81

35392 Gießen

Tel. 0049 641 99 38363

Fax 0049 641 99 38359

E-Mail: diagnostik@vetmed.uni-giessen.de

## Teilnehmer:

21 Labore aus Deutschland und Österreich (L1 – L21)

## Proben:

### Proben für den Genomnachweis

Es handelte sich um aufgearbeitete Nukleinsäuren (Indispin Pathogen Kit). Als Aufarbeitungskontrolle wurde eine interne Kontroll-RNA zugesetzt (IK). Proben mit einem IK Ct Wert <33,5 zeigen eine korrekte Aufarbeitung/ fehlende Inhibition (s. Tabelle 1). Die Proben wurden aus einem Pool für jedes Labor aliquotiert und individuell kodiert. Die Proben wurden gefroren auf Trockeneis an die Prüflabore versandt.

Tabelle 1: Probenmaterialien und Ct Werte (IK – interne Kontrolle)

Probe	Material	IK	CDV <sup>2</sup>	
1	PBS aufgearbeitet	30,42	no ct	-ve
2	CDV Waschbär 525/12 / Kulturüberstand	30,9	23,7	+ve
3	CDV Onderstepoort / Zellkultur	29,9	18,8	+ve
4	CDV Wolf 124/20 / Organmaterial	30,9	26,3	+ve
5	VeroDST Zellen / Zellkultur	30,9	no ct	-ve
6	CDV Waschbär #4050/22 / Zellkultur / RNA 1:10.000	29,7 <sup>1</sup>	30,82	+ve
7	CDV Waschbär 525/12 / Zellkultur	30,1	16,5	+ve
8	CDV Rockborn / Zellkultur	30,7	14,9	+ve

<sup>1</sup> getestet vor Verdünnung / <sup>2</sup> Ergebnisse des Konsiliarlabors

Probe 1:

Aufgearbeitetes PBS. Bei dieser Probe lässt sich kein house keeping Gen als Kontrolle der Aufarbeitung / Inhibition nachweisen.

Probe 2:

Nukleinsäure aus Kulturüberstand von VerodST Zellen infiziert mit einem Staupevirus Feldisolat (Waschbär 525/12).

Probe 3:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit dem Impfstamm CDV- Onderstepoort.

Probe 4:

RNA aus Organmaterial Wolf 124/20 (ohne Anzucht).

Probe 5:

Nukleinsäure aus nicht infizierten Kulturzellen (VerodST).

Probe 6:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit dem Staupevirus Feldisolat Waschbär #4050/22. Die präparierte RNA wurde 1:10.000 in Elutionspuffer verdünnt. Ct Wert der unverdünnten Nukleinsäure 18,05.

Probe 7:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit einem Staupevirus Feldisolat (Waschbär 525/12) (selbe Infektion wie Probe 2).

Probe 8:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit dem Impfstamm CDV-Rockborn.

## Serumproben für den Antikörpernachweis

Es handelt sich um Pools aus Hundeseren, bei denen jeweils neutralisierende Antikörper gegen CDV nachgewiesen wurden. Die Seren wurden nach dem Poolen filtriert und teilweise verdünnt in 50% (v/v) foetalem bovines Serum (Tabelle 2). Die Proben wurden aus einem gemeinsamen Pool aliquotiert und individuell kodiert. Die Proben wurden gefroren auf Trockeneis an die Teilnehmer versandt.

Tabelle 2: Testseren, Verdünnungen und erwartete Titer im Serumneutralisationstest.

Probe	Material	Verdünnung <sup>1</sup>	Titer <sup>2</sup> [1:n]	Titer [Log ND50]
1	230811-CDV-RV	1:80	3	0,48
2	181212-CDV-MPS	unverdünnt	5	0,72
3	Naives Hundeserum	1:2	<=1,7	<=0,24
4	230811-CDV-RV	1:3	141	2,15
5	230811-CDV-RV	1:12	47	1,67
6	FBS/PBS	1:2	<=1,7	<=0,24
7	230811-CDV-RV	unverdünnt	417	2,62
8	230811-CDV-RV	1:12	47	1,67

<sup>1</sup> Verdünnung für Ringversuch; <sup>2</sup> 50% Neutralisation

### Probe 1

Serum Pool 230811-CDV-RV, Pool aus CDV-Ak positiven Hundeseren, verdünnt 1:80

### Probe 2

Serum Pool 181212-CDV-MPS, (schwach positives Kontrollserum; aus positivem Serumpool verdünnt 1:80).

### Probe 3

Naives Hundeserum, verdünnt 1:2

### Probe 4

Serum Pool 230811-CDV-RV, verdünnt 1:3

### Probe 5:

Serum Pool 230811-CDV-RV, verdünnt 1:12

### Probe 6:

FBS/PBS 1:2

### Probe 7:

Serum Pool 230811-CDV-RV, unverdünnt

### Probe 8:

Serum Pool 230811-CDV-RV, verdünnt 1:12 (identische Probe zu 5)

## Ergebnisse

### Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde von 6 Teilnehmern durchgeführt. Die Ergebnisse von 3/6 Laboren entsprachen vollständig den erwarteten Werten. Ein Labor bewertete die Probe 6 als negativ, ein weiteres als fraglich. Ein Labor bewertete die Proben 2, 3 und 6 als negativ und die Probe 5 als fraglich (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der konventionellen PCR (erwartete Ergebnisse grün)

L 06		L 12			L 16	
8773	-ve	7567	-ve	-ve	6763	-ve
8752	-ve	7546	+ve	+ve	6742	+ve
8731	-ve	7525	+ve	+ve	6721	+ve
8710	+ve	7504	+ve	+ve	6700	+ve
8689	?	7483	-ve	-ve	6679	-ve
8668	-ve	7462	+ve	+ve	6658	?
8647	+ve	7441	+ve	+ve	6637	+ve
8626	+ve	7420	+ve	+ve	6616	+ve

L 19			L 20			L 21	
6160	-ve	-ve	5959	-ve	-ve	5758	-ve
6139	+ve	+ve	5938	+ve	+ve	5737	+ve
6118	+ve	+ve	5917	+ve	+ve	5716	+ve
6097	+ve	+ve	5896	+ve	+ve	5695	+ve
6076	-ve	-ve	5875	-ve	-ve	5674	-ve
6055	-ve	-ve	5854	+ve	+ve	5653	+ve
6034	+ve	+ve	5833	+ve	+ve	5632	+ve
6013	+ve	+ve	5812	+ve	+ve	5611	+ve

#### Angaben zu Methoden:

- (6) Di Francesco et al. (2012), J Vet Diagn Invest 24, 107-115 (N-Gen)
- (12,16) Barrett, T., et al. (1993) Virology 193.2 (1993): 1010-1012 – (P-Gen)
- (19) Wertung 1. Frisk et al., (1999) J. Clin. Microbiol. 37, 3634-3643 (N-Gen); Wertung 2. Benetka et al., (2011) Veterinary Record 168, 377 (F/H Gen)
- (20) (Suxiang Tong; Journal of Clinical Microbiology; 2008): in house: (L-Gen)
- (21) In house Verfahren, (N-Gen)

## Echtzeit PCR (qPCR)

Die Echtzeit-PCR wurde von 19 Teilnehmern durchgeführt. Zwei Labors bewerteten die Probe 6 als fraglich alle anderen Teilnehmer lagen mit allen Beurteilungen im Bereich der erwarteten Werte (Tabelle 4).

Tabelle 4: Ergebnisse Echtzeit-PCR (Ct-Werte, Beurteilung)

L 01*							L 02					L 03**						
9778		-ve		-ve		-ve	9577	no ct	-ve	no ct	-ve	9376	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve
9757	24	+ve	21	+ve	21	+ve	9556	22,9	+ve	22,3	+ve	9355	21,8	-ve	21,0	+ve	22,1	+ve
9736	18	+ve	16	+ve	17	+ve	9535	21,3	+ve	21,7	+ve	9334	24,2	+ve	23,3	+ve	25,3	+ve
9715	24	+ve	26	+ve	22	+ve	9514	22,9	+ve	23,5	+ve	9313	27,4	+ve	26,3	+ve	25,8	+ve
9694		-ve		-ve		-ve	9493	no ct	-ve	no ct	-ve	9292	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve
9673	32	+ve	34	+ve	36	+ve	9472	30,4	+ve	31,1	+ve	9271	28,0	?	23,7	?	33,4	?
9652	18	+ve	21	+ve	18	+ve	9451	16,1	+ve	16,2	+ve	9250	15,9	+ve	14,6	+ve	15,0	+ve
9631	15	+ve	21	+ve	21	+ve	9430	13,9	+ve	13,9	+ve	9229	15,1	+ve	13,2	+ve	14,0	+ve

L 04					L 05			L 07					L 08#				L 09%			
9175	no ct	-ve	no ct	-ve	8974	noCt	-ve	8572	no ct	-ve	no ct	-ve	8371	no Ct	-ve	no Ct	-ve	8170	No Ct	-ve
9154	23,17	+ve	23,15	+ve	8953	22,6	+ve	8551	24,0	+ve	22,9	+ve	8350	19,8	+ve	19,3	+ve	8149	22,8	+ve
9133	26,93	+ve	27,15	+ve	8932	17,8	+ve	8530	24,4	+ve	22,7	+ve	8329	15,7	+ve	15,4	+ve	8128	17,8	+ve
9112	24,92	+ve	25,59	+ve	8911	22,6	+ve	8509	28,7	+ve	28,2	+ve	8308	23,0	+ve	23,4	+ve	8107	24,1	+ve
9091	no ct	-ve	no ct	-ve	8890	noCt	-ve	8488	no ct	-ve	no ct	-ve	8287	no Ct	-ve	no Ct	-ve	8086	No Ct	-ve
9070	31,75	+ve	31,29	+ve	8869	33,6	+ve	8467	33,3	+ve	33,3	+ve	8266	29,7	+ve	29,7	+ve	8065	31,6	+ve
9049	16,58	+ve	16,78	+ve	8848	15,5	+ve	8446	17,0	+ve	14,3	+ve	8245	13,3	+ve	13,6	+ve	8044	14,6	+ve
9028	14,71	+ve	15,15	+ve	8827	15	+ve	8425	14,8	+ve	15,1	+ve	8224	12,0	+ve	12,1	+ve	8023	14,0	+ve

L 10 <sup>##</sup>					L 11					L 12					L 13		
7969	no Cq	-ve	no Cq	-ve	7768	no ct	-ve	no ct	-ve	7567	n / a	-ve	n/a	-ve	7366		-ve
7948	21,8	+ve	22,0	+ve	7747	21,9	+ve	22,5	+ve	7546	23,7	+ve	24,5	+ve	7345	22,9	+ve
7927	16,9	+ve	16,7	+ve	7726	24,0	+ve	24,3	+ve	7525	19,0	+ve	19,6	+ve	7324	19,2	+ve
7906	22,9	+ve	22,2	+ve	7705	27,5	+ve	28,9	+ve	7504	28,9	+ve	30,1	+ve	7303	26,2	+ve
7885	no Cq	-ve	no Cq	-ve	7684	no ct	-ve	no ct	-ve	7483	n / a	-ve	n/a	-ve	7282		-ve
7864	31,4	+ve	31,4	+ve	7663	31,9	+ve	32,8	+ve	7462	34,2	+ve	34,5	+ve	7261	33,9	+ve
7843	15,2	+ve	15,1	+ve	7642	17,0	+ve	17,4	+ve	7441	17,6	+ve	17,9	+ve	7240	17,1	+ve
7822	14,3	+ve	14,2	+ve	7621	14,6	+ve	15,3	+ve	7420	17,3	+ve	19,1	+ve	7219	15,8	+ve

L 14 <sup>§</sup>									L 15				
7165	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	6964	no Ct	-ve	no Ct	-ve
7144	25,1	+ve	24,5	+ve	27,0	+ve	26,2	+ve	6943	21,5	+ve	22,1	+ve
7123	19,6	+ve	19,0	+ve	21,5	+ve	21,5	+ve	6922	25,3	+ve	25,8	+ve
7102	25,4	+ve	25,6	+ve	27,3	+ve	26,1	+ve	6901	24,5	+ve	23,9	+ve
7081	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	6880	no Ct	-ve	no Ct	-ve
7060	33,2	+ve	33,9	+ve	35,9	+ve	35,8	+ve	6859	31,0	+ve	31,1	+ve
7039	16,8	+ve	17,9	+ve	19,4	+ve	18,4	+ve	6838	16,3	+ve	16,3	+ve
7018	15,5	+ve	16,1	+ve	18,7	+ve	17,7	+ve	6817	14,6	+ve	13,4	+ve

L 16 <sup>§§</sup>			L 17				L 18				L 19						
6763	no ct	-ve	6562	no ct	-ve	no ct	-ve	6361	>40	-ve	>40	-ve	6160	no Ct	-ve	no Ct	-ve
6742	21,2	+ve	6541	21,6	+ve	21,8	+ve	6340	21,3	+ve	21,1	+ve	6139	24,6	+ve	n.t.	
6721	17,3	+ve	6520	25,8	+ve	25,3	+ve	6319	21,8	+ve	22,0	+ve	6118	32,0	+ve	32,1	+ve
6700	22,6	+ve	6499	24,9	+ve	24,0	+ve	6298	19,6	+ve	19,9	+ve	6097	21,0	+ve	21,3	+ve
6679	no ct	-ve	6478	no ct	-ve	no ct	-ve	6277	>40	-ve	>40	-ve	6076	no Ct	-ve	no Ct	-ve
6658	33,4	?	6457	30,2	+ve	30,2	+ve	6256	30,3	+ve	32,7	+ve	6055	31,8	+ve	31,8	+ve
6637	14,5	+ve	6436	15,2	+ve	15,2	+ve	6235	14,1	+ve	14,5	+ve	6034	17,0	+ve	16,7	+ve
6616	15,0	+ve	6415	13,8	+ve	13,8	+ve	6214	13,3	+ve	12,9	+ve	6013	16,2	+ve	15,8	+ve

L 21				
5758	no ct	-ve	no ct	-ve
5737	23,1	+ve	23,7	+ve
5716	19,3	+ve	18,8	+ve
5695	26,2	+ve	25,9	+ve
5674	no ct	-ve	no ct	-ve
5653	30,8	+ve	30,6	+ve
5632	17	+ve	16,5	+ve
5611	15,1	+ve	14,9	+ve

\* Probe 6 schwach aber reproduzierbar positiv  
 \*\*Probe 6 fraglich positiv  
 # Probe 1 ohne interne Kontrolle nicht auswertbar  
 %Probe 6 flacher Kurvenverlauf  
 ## Probe 1 Ausfall der internen Kontrolle  
 § Probe 1 nicht auswertbar (interne Kontrolle)  
 §§Probe 6 Kontamination bei Herstellung?

Einige Labors verwenden ein house keeping Gen als Extraktionskontrolle. In Zell- bzw. Nukleinsäure-armen Matrices ist eine solche Kontrolle weniger gut geeignet (s. Kommentare Tabelle 4). Als Alternative bietet sich die Verwendung von externen RNAs an, die den Proben vor Aufarbeitung zugesetzt werden.

Die Proben 2 und 7 stammen aus einer Infektion. Während in der Probe 7 die Kulturzellen im Zuge der Aufarbeitung lysiert wurden handelt es sich bei der Probe 2 um Nukleinsäure aus dem zugehörigen Kulturüberstand. Dementsprechend lag in Probe 7 deutlich mehr Ziel-Nukleinsäure vor. Der Unterschied zwischen den Proben lag im Mittel bei dem 83,5-fachen (6,4 Ct-Werte).

Die Probe 6 enthielt eine CDV +ve Nukleinsäurepräparation in der Verdünnung 1:10.000 und war als schwach positive Probe vorgesehen. Der Ct des unverdünnten Materials lag bei 18,06, der erwartete Ct-Wert der verdünnten Probe bei etwa Ct 31. Die entsprechende Probe wurde von 2 Labors als fraglich eingestuft.

## Wiederholbarkeit

Da die meisten Labors (n = 15) mehrere Testläufe übermittelten, lässt sich die Wiederholbarkeit der Ergebnisse beurteilen. Die Ct Werte der einzelnen Proben waren idR. gut reproduzierbar. Nur zwei Labors (1 & 3) zeigten deutliche Abweichungen bei der Wiederholung jeweils einer Probe (VK > 15%) (Tabelle 5).

Tabelle 5: Wiederholbarkeit der qPCR (MW Mittelwert, ST Standardabweichung, VK Variationskoeffizient; VK > 15%)

MW	ST	VK	MW	ST	VK	MW	ST	VK	MW	ST	VK	MW	ST	VK
L 1			L 2			L 3			L 4			L 7		
22,0	1,7	7,9	22,6	0,4	1,9	21,6	0,5	2,5	25,7	1,1	4,4	23,4	0,8	3,2
17,0	1,0	5,9	21,5	0,3	1,3	24,2	1,0	4,1	20,4	1,3	6,3	23,5	1,2	5,0
24,0	2,0	8,3	23,2	0,4	1,8	26,5	0,8	3,2	26,1	0,9	3,3	28,5	0,4	1,3
34,0	2,0	5,9	30,8	0,5	1,6	28,4	4,9	17,2	34,7	1,4	3,9	33,3	0,0	0,0
19,0	1,7	9,1	16,2	0,1	0,4	15,2	0,7	4,4	18,1	1,1	6,1	15,6	1,9	12,4
19,0	3,5	18,2	13,9	0,0	0,0	14,1	0,9	6,7	17,0	1,5	8,5	15,0	0,2	1,6
L 8			L 10			L 11			L 12			L 14		
19,6	0,3	1,5	21,9	0,1	0,6	22,2	0,4	1,8	24,1	0,6	2,5	25,7	1,0	3,8
15,6	0,2	1,2	16,8	0,1	0,8	24,2	0,2	0,9	19,3	0,4	2,2	20,4	1,1	5,5
23,2	0,3	1,2	22,6	0,5	2,2	28,2	1,0	3,4	29,5	0,8	2,8	26,1	0,8	2,9
29,7	0,0	0,0	31,4	0,0	0,0	32,3	0,7	2,0	34,3	0,2	0,6	34,7	1,2	3,4
13,5	0,2	1,7	15,2	0,1	0,5	17,2	0,3	1,9	17,8	0,2	1,2	18,1	1,0	5,4
12,0	0,0	0,3	14,3	0,1	0,5	14,9	0,5	3,5	18,2	1,3	7,1	17,0	1,3	7,4
L 15			L 17			L 18			L 19			L 21		
21,8	0,4	1,9	21,7	0,2	0,7	21,2	0,1	0,7				23,4	0,4	1,8
25,6	0,4	1,4	25,5	0,4	1,6	21,9	0,1	0,6	32,1	0,1	0,2	19,1	0,4	1,8
24,2	0,4	1,8	24,4	0,6	2,6	19,8	0,2	1,1	21,2	0,2	0,8	26,1	0,2	0,8
31,1	0,0	0,1	30,2	0,0	0,1	31,5	1,7	5,4	31,8	0,0	0,0	30,7	0,1	0,5
16,3	0,0	0,1	15,2	0,0	0,0	14,3	0,3	2,0	16,9	0,2	1,1	16,8	0,4	2,1
14,0	0,9	6,1	13,8	0,0	0,0	13,1	0,3	2,1	16,0	0,3	1,9	15,0	0,1	0,9



Da die Anzahl der übermittelten Testläufe nicht festgelegt war, ist die Wiederholbarkeit nicht Gegenstand des Ringversuchs und nur zur Information gedacht.

#### Angaben zur Methodik:

- (1,5,10) Scagliarini et al., 2007, Veterinary Research Communications, 31(Suppl. 1) – (P-Gen)
- (2,3,4,7,11,15,17,18,19) Elia et al., 2006, Journal of Virological Methods 136; 171-176. - (N-Gen)
- (8) Elia et al., 2006, Journal of Virological Methods 136;171-176. - (N-Gen, modifiziert)
- (9) in house
- (12,16) Barrett, et al. 1993, Virology 193; 1010-2 – (P-Gen)
- (13) in house (P-Gen)
- (14) Dr. B. Hoffmann, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, Version 1 vom 14.06.2018
- (16) Scagliarini et al., (2007), Vet Res Commun. 2007 Aug;31 Suppl 1:261-3 (modifiziert nach LLBB FFO)
- (20) Tong, et al., 2008, Journal of Clinical Microbiology; in house: target L-Gene (RNA dependent RNA polymerase)
- (21) in house (N-Gen)

## Serologie

An der Vergleichsuntersuchung zum Nachweis von Antikörpern gegen das Hundestaupavirus nahmen nur 3 Labors teil. Zwei Teilnehmer (13 & 21) führten einen Serumneutralisationstest (SNT) durch, der dritte Teilnehmer (19) einen Bindungstest (IIFT). Die Proben sollten in zwei unabhängigen Tests geprüft werden, um die Streuung der Untersuchungsergebnisse bewerten zu können.

### Spezifität:

Die beiden negativen Seren wurden von einem Labor als negativ bewertet. Ein Labor bewertete eines der Seren einmal negativ und einmal positiv, das andere negativ. Das dritte Labor bewertete ein Serum als positiv und das andere als negativ.

Das schwach positive Serum 1 wurde von einem Labor 2x +ve, von einem Labor +ve / -ve und vom dritten Labor als negativ bewertet (Tabelle 6).

Tabella 6: Ergebnisse der CDV-Serologie (Angaben der Einsender)

L 13					L 21					L 19		
3366	< 8,0	-ve	8,0	+ve	1758	0,71	+ve	0,71	+ve	2160	40,0	-ve
3345	< 8,0	-ve	8,0	+ve	1737	0,71	+ve	0,71	+ve	2139	320,0	+ve
3324	< 8,0	-ve	8,0	+ve	1716	0,24	-ve	0,24	-ve	2118	80,0	+ve
3303	96,0	+ve	128,0	+ve	1695	2,15	+ve	2,15	+ve	2097	1280,0	+ve
3282	16,0	+ve	32,0	+ve	1674	1,43	+ve	1,67	+ve	2076	320,0	+ve
3261	< 8,0	-ve	<8,0	-ve	1653	0,24	-ve	0,24	-ve	2055	< 20	-ve
3240	256,0	+ve	>512,0	+ve	1632	2,62	+ve	2,62	+ve	2034	5120,0	+ve
3219	24,0	+ve	48,0	+ve	1611	1,67	+ve	1,67	+ve	2013	1280,0	+ve

## Wiederholbarkeit

Zur besseren Vergleichbarkeit und Berechenbarkeit wurden die Titer der positiven Proben in LogND Werte umgewandelt und Titer < bzw. > zensiert (<1:8 = 1:4; <1:20 = 1:10 und >1:512 = 1:1024)

Tabella 7: Ergebnisse der Serologie (logND, Mittelwerte und VK (VK > 15% rot, zensierte Werte blau)

Labor Probe	L 13				L 21				L 19
	LogND	MW	VK	LogND	MW	VK	LogND		
1	0,6	0,9	0,75	28,28	0,71	0,71	0,71	0	1,6
2	0,6	0,9	0,75	28,28	0,71	0,71	0,71	0	2,51
4	1,98	2,11	2,04	4,32	2,15	2,15	2,15	0	3,11
5	1,20	1,51	1,35	15,71	1,43	1,67	1,55	10,95	2,51
7	2,41	3,01	2,71	15,71	2,62	2,62	2,62	0	3,71
8	1,38	1,68	1,53	13,91	1,67	1,67	1,67	0	3,11

Ein Variationskoeffizient von <15% wurde als ausreichend angesehen.

Die Proben 5 und 8 waren identisch und lassen eine gewisse Abschätzung der Wiederholbarkeit des Testverfahrens zu.

Tabella 8: Wiederholbarkeit der serologischen Testverfahren

Labor	L 13			L 21			L 19		
	MW	Stabw	VK	MW	Stabw	VK	MW	Stabw	VK
im Test	1,29	0,12	9,64	1,55	0,17	10,95	2,81	0,42	15,1
	1,89	0,12	6,57	1,67	0	0			
Tag zu Tag	1,44	0,20	13,96	1,61	0,12	7,45			

Labor 13 und 21 zeigten eine ausreichende Wiederholbarkeit. Labor 19 lag knapp über 15% relativer Standardabweichung.

## Linearität

Die Proben 1, 4 und 5 wurden durch Verdünnung der Probe 7 gewonnen. Durch Vergleich der gemessenen / berechneten Werte lässt sich die Linearität der Testverfahren abschätzen.

Abbildung 1: Ergebnisse Labor 13 (linearer Trend)

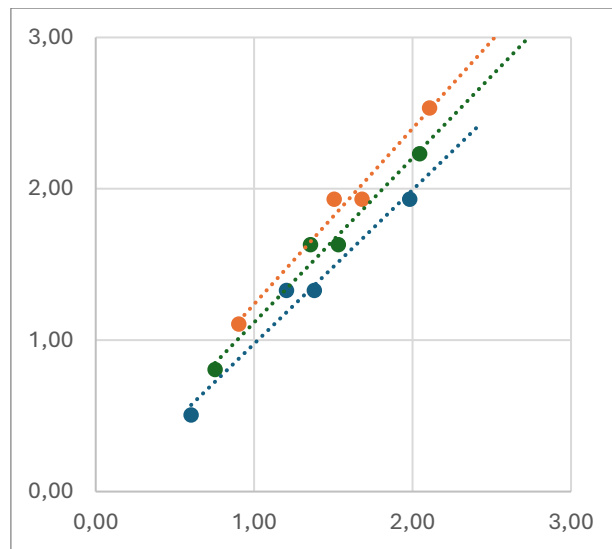


Tabelle 9: Ergebnisse Labor 13 (tabellarisch)

1:n	Test1		Test2		MW	
	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet
1	2,41		3,01		2,71	
3	1,98	1,93	2,11	2,53	2,04	2,23
12	1,20	1,33	1,51	1,93	1,35	1,63
12	1,38	1,33	1,68	1,93	1,53	1,63
80	0,60	0,51	0,90	1,11	0,75	0,81
Trend	m=0,96 a=-0,07 r2=0,97		m=0,84 a=-0,03 r2=0,98		m=0,90 a=-0,003 r2=0,98	

Abbildung 2: Ergebnisse Labor 21 (linearer Trend)

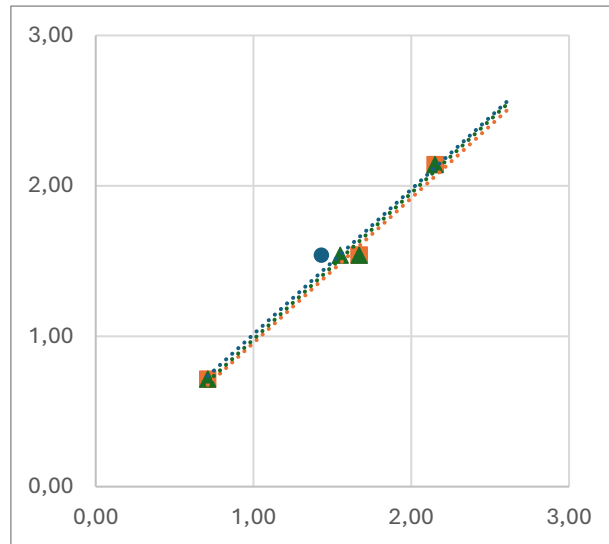


Tabelle 10: Ergebnisse Labor 21 (tabellarisch)

1:n	Test1		Test2		MW	
	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet
1	2,62		2,62		2,62	
3	2,15	2,14	2,15	2,14	2,15	2,14
12	1,43	1,54	1,67	1,54	1,55	1,54
12	1,67	1,54	1,67	1,54	1,67	1,54
80	0,71	0,72	0,71	0,72	0,71	0,72
Trend	m=1,01 a=-0,01 r2=0,97		m=1,02 a=0,03 r2=0,99		m=1,01 a=-0,01 r2=0,99	

Abbildung 3: Ergebnisse Labor 19 (linearer Trend)

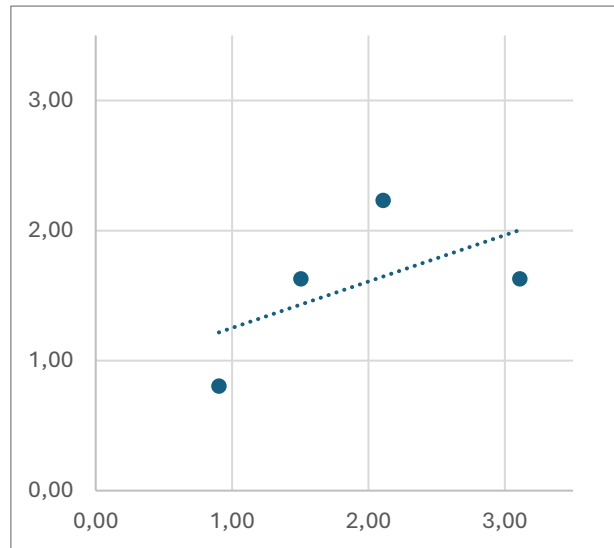


Tabelle 11: Ergebnisse Labor 19 (tabellarisch)

1:n	Test	
	gemessen	erwartet
1	2,71	
3	2,11	2,23
12	1,51	1,63
12	3,11	1,63
80	0,90	0,81
Trend	m=0,92 a=0,46 r2=0,32	

Akzeptanzkriterien für die Parameter der linearen Regression:

- $m = 0,8 - 1,2$
- $a = -0,2 - 0,2$
- $r^2 = >0,90$

Aufgrund der kleinen Probenzahl ( $n=4/8$ ) lassen sich nur eingeschränkt Aussagen über die Linearität der Tests machen.

## Diskussion und Zusammenfassung

Am Ringversuch Hundestaubevirus Diagnostik 2023 nahmen insgesamt 21 Labors aus Deutschland und Österreich teil. Alle 21 Teilnehmer führten den Genomnachweis mittels PCR / qPCR durch, während nur drei Labors Antikörperbestimmungen vornahmen.

### Genomnachweis

Das Probenpanel bestand aus 8 Nukleinsäurepräparationen. Die Aufarbeitung der Proben wurde mit Hilfe einer externen Kontroll-RNA überprüft. Die verwendeten Virusisolate gehörten alle zur Spezies *canine morbillivirus*; es handelte sich um Impfvirusstämme (Rockborn, Onderstepoort) und Feldvirusisolate von Waschbären und einem Wolf, deren Identität durch Teilsequenzierungen überprüft wurde. Eine Probe bestand aus einer verdünnten Nukleinsäure (1:10.000) und war als schwach positiv eingestuft. Die negativen Proben 1 und 5 bestanden aus aufgearbeitetem Puffer (1) bzw. negativen Kulturzellen (5).

Von den 21 Teilnehmern führten 2 nur einen qualitativen Nachweis (RT-PCR) durch, 19 nur den Nachweis mittels Echtzeit-PCR und 4 Labors beide Verfahren.

### Konventionelle PCR

3 von 6 Labors bewerteten alle 8 Nukleinsäureproben korrekt. Ein Labor bewertete Probe 6 mit zwei unterschiedlichen PCR-Verfahren als negativ. Da die identische Nukleinsäurepräparation von dem Labor in der qPCR als positiv bewertet wurde, liegt hier offenbar ein Problem mit der Sensitivität der konventionellen PCR vor. Ein weiteres Labor bewertete die Probe 6 als fraglich.

Ein Labor bewertete drei +ve Proben (2, 3, 6) als negativ und eine negative Probe (5) als fraglich. Bei der verwendeten Methode handelt es sich um eine semi-nested PCR, bei der zumindest ein Primer (FW1261) ein Nukleotid am 3' Ende aufweist, welches nur teilweise konserviert ist (u.a. nicht beim Impfstamm Onderstepoort). Vor diesem Hintergrund kann die Primer-Kombination nicht für eine diagnostische PCR empfohlen werden.

### Echtzeit PCR

Die eingesetzten Echtzeit PCR Verfahren zeigten durchweg eine gute Eignung für den diagnostischen Nachweis von CDV-RNA. Nur die schwach positive Probe (6) bereitet einigen Labors Schwierigkeiten: die Probe wurde von zwei Labors als fraglich beurteilt (Ct Wert 33,4). Allerdings lag der Cut off bei anderen Labors höher, sodass die Probe dort als +ve bewertet worden wäre. Grundsätzlich sollten Labors ihre Bestimmungsgrenzen experimentell validieren. Ein einheitlicher Grenzwert kann nicht empfohlen werden, allerdings ist es nicht unüblich CT-Werte von >35 als fraglich zu bewerten.

Die meisten Labors setzen Aufarbeitungs- bzw. Inhibitionskontrollen bei der PCR ein. Dieser Schritt ist für die Durchführung einer diagnostischen PCR unabdingbar. Da im vorliegenden Fall fertig präparierte Nukleinsäuren versandt wurden, war dieser Aspekt jedoch nicht Teil des Ringversuchs. Alle 8 Proben wurden von uns vor Aufarbeitung mit einer externen Kontroll-RNA versetzt. Eine Kontroll-PCR nach Aufarbeitung zeigte in allen Fällen eine valide Präparation (Tabelle 1). Bei Labors, die ein house keeping Gen als interne Kontrolle verwenden, ließ sich Probe 1 nicht überprüfen. Grundsätzlich sind house keeping Gene für Zell- bzw. Nukleinsäure- arme Matrices weniger geeignet.

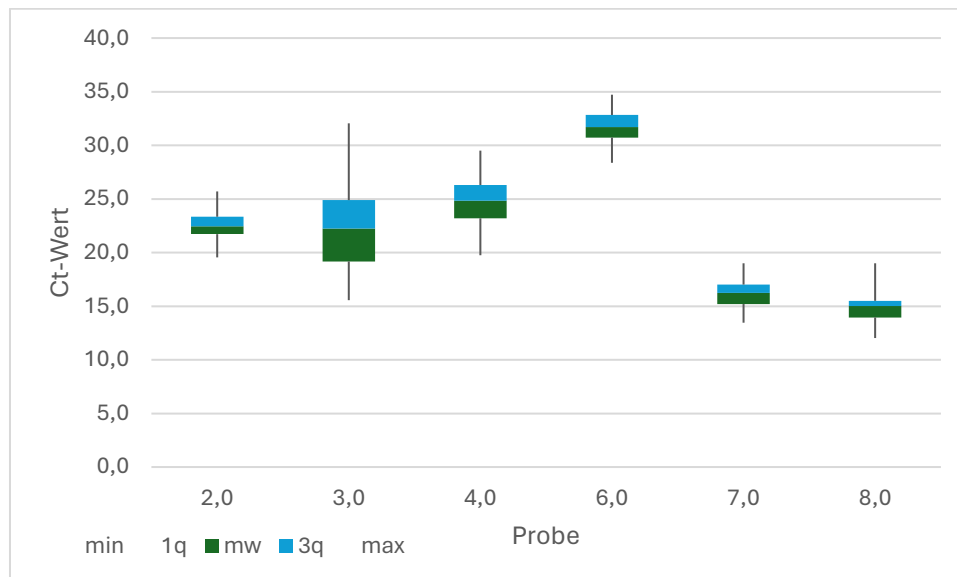
### Vergleichbarkeit der Ergebnisse

Die erwarteten Ct-Werte für die positiven Proben sind abhängig vom Prüfverfahren. Je nach Methode der reversen Transkription und Lage der Zielsequenz können virales Genom und virale CDV-Ringversuch 2023

mRNAs nachgewiesen werden. Die Proben 2 und 7 stammen aus Überstand bzw. Zellmaterial einer Infektion. Dementsprechend lag in Probe 7 deutlich mehr Ziel-Nukleinsäure (insbesondere mRNA) vor. Der Unterschied zwischen den Proben lag im Mittel aller Labors bei der 83,5-fachen Menge (6,4 Ct-Werte; Spanne 0 - 8,6 Ct Werte).

Trotz unterschiedlicher Methodik zeigte sich eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen den Labors (Abbildung 4).

Abbildung 4: Boxplot der Ct-Mittelwerte für die +ve Proben



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beteiligten Labors den Ringversuch überwiegend erfolgreich abgeschlossen haben. Der Nachweis von CDV mittels PCR-Verfahren ist auf einem guten Stand.

## Antikörpernachweis

Leider beteiligten sich nur 3 Teilnehmer am Ringtestteil Nachweis von Antikörpern gegen das Hundestaupavirus. Offenbar werden die entsprechenden Testverfahren kaum nachgefragt bzw. angeboten. Zwei der Teilnehmer führten einen Serumneutralisationstest durch, der dritte Teilnehmer einen Bindungstest (IIFT). Es sollten zwei unabhängige Testläufe durchgeführt und übermittelt werden. Aufgrund der geringen Zahl der Proben müssen die Ergebnisse des Ringversuchs mit Vorsicht interpretiert werden.

Die positiven Serumproben stammten aus unterschiedlichen Pools von positiv getesteten Hundeseren. Aus einem Serum wurden Verdünnungsstufen angelegt, um die Linearität des Tests bewerten zu können. Eine Probe wurde doppelt versandt. Die negativen Proben bestanden aus einem naiven Hundeserum (3) und verdünntem FBS (6; 1:2).

### Spezifität

Die negative Probe 6 wurde erwartungsgemäß von allen Teilnehmern richtig bewertet. Die Probe 3 nur von einem Labor in allen Testläufen und von einem Labor in einem von zwei Tests. Das Serum stammt laut Quelle von naiven Hunden und wurde von uns mehrfach negativ getestet.

### Sensitivität

Die 6 positiven Proben wurde mehrheitlich richtig als positiv bewertet. Probleme gab es bei der Probe 1 (1:80 Verdünnung) und 2 (schwach positives Kontrollserum), die beide nur von einem Labor konstant positiv befundet wurden.

## Linearität

Die Linearität wurde anhand der Ergebnisse der Probe 7 und der daraus verdünnten Proben sowie den anhand der Verdünnungsfaktoren ermittelten theoretischen Werte für jedes Labor bewertet. Diese Methode zeigt nur die Linearität des Tests im jeweiligen Labor und berücksichtigt nicht die Richtigkeit der Ergebnisse.

Die beiden Labore, die einen SNT durchführen, erfüllten in fast allen Fällen die Kriterien der linearen Regression. Für das Labor 19 konnte keine Linearität der Ergebnisse festgestellt werden. Dies lag vor allem an einer Probe (8). Allerdings hatte Labor 19 auch nur einen Testlauf übermittelt.

## Wiederholbarkeit

Durch Vergleich der positiven Proben in den zwei Testläufen und den Ergebnissen der identischen Proben 5 und 8 innerhalb eines Tests und von Tag zu Tag konnte die Wiederholbarkeit der Ergebnisse bewertet werden.

Beim Vergleich der beiden Testläufe zeigten die Ergebnisse von Labor 13 zum Teil hohe Variationskoeffizienten (>15%), was vor allem darauf zurückzuführen ist, dass die Ergebnisse für die Berechnung zensiert werden mussten. Labor 21 zeigte eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Beim Vergleich der Proben 5 und 8 zeigten beide Labore mit SNT-Ergebnissen eine ausreichende Wiederholbarkeit. Bei Labor 19 lag der VK innerhalb eines Tests knapp über 15%.

## Gesamtergebnis

Der erste Ringversuch (RV) zur Labordiagnostik der Hundestaupe fand im Dezember 2023 statt. Ziel des RV war es einen Überblick über Stand und Qualität der Prüfverfahren in Deutschland zu gewinnen. Die Teilnahme war mit 21 Prüflaboren sehr gut, was den molekularen Nachweis von CDV mittels PCR angeht. Die Ergebnisse des CDV-Genomnachweises zeigen eine gute Qualität und - mit Einschränkungen - Vergleichbarkeit der Resultate.

Für den Genomnachweis wurden nur Virusisolate der Spezies *canine morbillivirus* verwendet. Die Isolate entstammten den Genogruppen *Europe* und *America I* und *II*. Aus Gründen der Verfügbarkeit konnte nur ein kleiner Teil des Spektrums der kaninen Morbilliviren einbezogen werden. Allerdings stammen die in Deutschland nachgewiesenen CDV-Isolate überwiegend aus der Gruppe *Europe*.

Die Resultate der CDV-Serologie lassen aufgrund der geringen Teilnehmerzahl keine Aussage über den Stand der entsprechenden Diagnostik zu.

## Danksagungen

Für die Unterstützung bei der Beschaffung von Probenmaterial für diesen Ringversuch bedanken wir uns herzlich bei Deborah Basso (CVUA Westfalen), Claudia Szentiks (IZW-Berlin), Gudrun Wibbelt (IZW-Berlin), Zaida Renterio Solis (Uni-Leipzig) und der Viro Vet Diagnostik GmbH Gießen.

Gießen, den 24.01.24



Dr. M. König