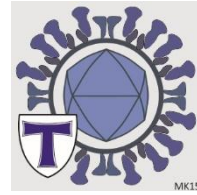


CDV-Ringversuch 2024/25

DVG Konsiliarlabor für Hundestaupavirus



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:

20 Labors aus Deutschland (L1 – L20)

Proben:

Probenkodierung und Versand

Alle Proben wurden ausgehend von Pools für die Labors aliquotiert und individuell und randomisiert kodiert; Dabei wurde die Reihenfolge der Proben für jedes Labor verändert (s. Anhang 1). Aliquotieren und Etikettieren der Proben wurde von unterschiedlichen Mitarbeitern durchgeführt. Das Etikettieren wurde gleichzeitig von zwei Personen durchgeführt. Die Proben wurden auf $<-70^{\circ}\text{C}$ eingefroren und im gefrorenen Zustand auf Trockeneis an die Labors verschickt.

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).

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

Probe	Material	IK ¹	CDV ^{1,2}	CDV ³
1	CDV 1287/23 Darm Fuchs (D10)	30,58	19,87	20,36
2	CDV Rockborn VerodST	30,84	25,59	32,52
3	CDV 4068/22 ZNS Waschbär (D6)	30,86	18,79	19,96
4	VerodST Mock 130225	30,13	noCt	noCt
5	CDV Rockborn VerodST (identisch zu #2)	s. 2	s. 2	s. 2
6	CDV 1219/23 Lunge Waschbär (D8)	30,72	19,9	21,31
7	CDV 2544 2. 271218	30,67	22,18	23,53
8	Pi-3 4. 261015	30,73	noCt	noCt
9	PDV 2588	30,49	noCt	noCt
10	CDV Onderstepoort VerodST	30,62	16,12	29,65

¹ getestet vor Verdünnung / ² Ergebnisse Originalmaterial / ³ Proben aus dem Ringtest

Probe 1:

Nukleinsäure aus Organmaterial (Darm) Fuchs 1287/23, Feldisolat.

Probe 2:

Nukleinsäure aus Kulturüberstand (VerodST) infiziert mit dem CDV-Impfstamm Rockborn, 1:100 verdünnt in PBS (rechnerischer Ct-Wert 32,23)

Probe 3:

Nukleinsäure aus Organmaterial (Gehirn) Waschbär 4068/22, Feldisolat.

Probe 4:

Nukleinsäure aus nicht infizierten Kulturzellen (VerodST).

Probe 5:

Identische Probe zu #2.

Probe 6:

Nukleinsäure aus Organmaterial (Lunge) Waschbär 1219/23, Feldisolat.

Probe 7:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit einem Staupevirus Feldisolat 2544/han95 (4.P 070225)

Probe 8:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (BEL-26) infiziert mit bovinem Parainfluenzavirus (PI-3 Stamm A1632 2.P 221102).

Probe 9:

Nukleinsäure aus Kulturzellen (VerodST) infiziert mit einem phocinen Staupevirus (PDV), Feldisolat PDV 2588/han (11.P 070225)

Probe 10:

Nukleinsäure aus Kulturüberstand (VeroDST) infiziert mit dem Impfstamm Onderstepoort (6.P 070225), 1:10000 verdünnt in PBS (rechnerischer Ct-Wert 29,41)

Serumproben für den Antikörpernachweis

Bei den Serumproben handelte es sich um Pools aus Hundeseren, die zuvor im Serumneutralisationstest auf Antikörper gegen CDV untersucht 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 (dadurch ändert sich die Reihenfolge der Seren s. Anlage 2). Die Proben wurden gefroren auf Trockeneis an die Teilnehmer versandt.

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

Probe	Material	Verdünnung ¹	Titer ² [1:n]	Titer [Log ND50]
1	230811-CDV-RV	-	243	2,4
2	FBS/PBS	-	≤1,7	≤0,2
3	NES RV 200131	1:2	140,3	2,1
4	230811-CDV-RV	1:3	140,3	2,1
5	230811-CDV-RV	1:12	46,8	1,7
6	230811-CDV-RV	1:80	9,0	1
7	181212-CDV-MPS	-	5,2	0,7
8	230811-CDV-RV	1:12	46,8	1,7

¹ Verdünnung für Ringversuch; ² 50% Neutralisation

Probe 1

Serum Pool 230811-CDV-RV, Pool aus CDV-Ak positiven Hundeseren

Probe 2

Foetales bovines Serum (1:2 verdünnt mit PBS) als negative Kontrolle

Probe 3

Serum Pool NES RV -CDV-RV 200131, Pool aus Hundeseren CDV Ak-positiv 1:2 verdünnt

Probe 4

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

Probe 5:

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

Probe 6:

Serum Pool 230811-CDV-RV, verdünnt 1:80

Probe 7:

Serum Pool 181212-CDV-MPS, verdünnt als minimal positives Kontrollserum

Probe 8:

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

Ergebnisse

Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wurde von 5 Teilnehmern durchgeführt. Die Ergebnisse von 3/5 Labors entsprachen vollständig den erwarteten Werten. Ein Labor bewertete die Probe 6 als negativ, ein weiteres als fraglich. Ein Labor bewertete die Proben 8 und 9 als positiv und die Probe 5 als fraglich (Tabelle 3).

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

Labor		02		10		14
Probe						
1	?	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
2	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve	-ve
3	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
4	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
5	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve	-ve
6	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
7	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
8	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
9	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
10	+ve	+ve	+ve	+ve	-ve	-ve

Labor		16		20
Probe				
1	+ve	+ve	+ve	+ve
2	+ve	+ve	+ve	+ve
3	+ve	+ve	+ve	+ve
4	-ve	-ve	-ve	-ve
5	+ve	+ve	+ve	+ve
6	+ve	+ve	+ve	+ve
7	+ve	+ve	+ve	+ve
8	+ve	-ve	-ve	-ve
9	+ve	-ve	-ve	-ve
10	+ve	+ve	+ve	+ve

Anmerkungen:

L 20 PCR 1 Proben 2 und 5 +ve nach WDH

Angaben zu Methoden:

(2) o. Angabe

(10) in house Verfahren, (P-gen)

(14,20) In house Verfahren, (N-Gen)

(16) Suxiang Tong; Journal of Clinical Microbiology; 2008: in house: target L-Gene

Echtzeit PCR (qPCR)

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

Labor Probe	01						03				05						06			
1	18	+ve	18	+ve	18	+ve	28,00	+ve	34,00	+ve	18,27	+ve	18,56	+ve			17,19	+ve	17,62	+ve
2	32	+ve	32	+ve	30	+ve	29,00	+ve	33,00	+ve	39,37	?	38,75	?	38		32,08	+ve	31,80	+ve
3	17	+ve	18	+ve	17	+ve	16,00	+ve	19,00	+ve	18,31	+ve	18,28	+ve			17,56	+ve	17,41	+ve
4		-ve		-ve		-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve			No Ct	-ve	No Ct	-ve
5	32	+ve	31	+ve	31	+ve	16,00	+ve	20,00	+ve	41,01	?	39,08	?	38	?	31,83	+ve	32,04	+ve
6	19	+ve	19	+ve	19	+ve	17,64	+ve	20,90	+ve	19,33	+ve	20,19	+ve			18,14	+ve	18,59	+ve
7	20	+ve	20	+ve	20	+ve	18,80	+ve	22,00	+ve	21,64	+ve	21,38	+ve			19,68	+ve	20,50	+ve
8		-ve		-ve		-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve			No Ct	-ve	No Ct	-ve
9		-ve		-ve		-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve			No Ct	-ve	No Ct	-ve
10	28	+ve	28	+ve	28	+ve	27,43	+ve	32,12	+ve	29,31	+ve	29,24	+ve			28,83	+ve	29,26	+ve
Labor Probe	07						08				09		11							
1	19,90	+ve	20,88	+ve	20,38	+ve	17,4	+ve	18,0	+ve	17,00	+ve	17,2	+ve	17,44	+ve	17,61	+ve	17,74	+ve
2	32,00	+ve	31,27	+ve	33,64	+ve	38,4	?	40,9	?	39,00	?	31,1	+ve	34,54	+ve	35,97	?	36,26	?
3	19,68	+ve	18,74	+ve	19,68	+ve	16,5	+ve	18,2	+ve	17,00	+ve	16,5	+ve	17,29	+ve	17,40	+ve	17,53	+ve
4	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no Cq	-ve	No ct	-ve	No ct	-ve	No ct	-ve
5	31,54	+ve	31,57	+ve	32,63	+ve	37,9	+ve	40,6	?	39,00	?	31,0	+ve	35,92	?	35,12	?	34,64	?
6	19,76	+ve	19,94	+ve	20,88	+ve	17,4	+ve	17,3	+ve	17,00	+ve	17,8	+ve	17,32	+ve	18,85	+ve	18,81	+ve
7	22,89	+ve	22,20	+ve	22,85	+ve	19,3	+ve	20,4	+ve	19,00	+ve	19,1	+ve	20,53	+ve	20,30	+ve	20,76	+ve
8	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no Cq	-ve	No ct	-ve	No ct	-ve	No ct	-ve
9	no ct	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no cq	-ve	no Cq	-ve	27,26	+ve	26,85	+ve	26,48	+ve
10	27,94	+ve	28,05	+ve	29,31	+ve	27,8	+ve	28,6	+ve	28,00	+ve	27,9	+ve	28,36	+ve	28,22	+ve	28,53	+ve

Labor Probe	12				13						14		15				17			
1	18,30	+ve	18,80	+ve	18,10	+ve	17,14	+ve	15,70	+ve	19,9	+ve	18,40	+ve			18,00	+ve	18,09	+ve
2	38,50	?	40,60	?	37,88	?	39,07	?	36,94	?	32,7	+ve	31,10	+ve	31,70	+ve	no ct	-ve	no ct	-ve
3	17,40	+ve	17,60	+ve	17,22	+ve	16,16	+ve	15,58	+ve	16,7	+ve	18,10	+ve			17,36	+ve	18,25	+ve
4	0,00	-ve	0,00	-ve	40,56	-ve	N/A	-ve	N/A	-ve	no Ct	-ve	noCt	-ve			no ct	-ve	no ct	-ve
5	39,20	?	41,10	?	39,63	-ve	38,31	-ve	38,03	-ve	no Ct	-ve	31,30	+ve	31,60	+ve	no ct	-ve	no ct	-ve
6	18,80	+ve	19,80	+ve	19,05	+ve	17,45	+ve	17,10	+ve	19,1	+ve	19,10	+ve			18,89	+ve	19,26	+ve
7	20,80	+ve	20,30	+ve	21,00	+ve	19,59	+ve	19,26	+ve	20,0	+ve	20,20	+ve			19,94	+ve	20,86	+ve
8	0,00	-ve	0,00	-ve	N/A	-ve	N/A	-ve	N/A	-ve	no Ct	-ve	noCt	-ve	noCt	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve
9	0,00	-ve	0,00	-ve	N/A	-ve	N/A	-ve	N/A	-ve	no Ct	-ve	noCt	-ve	noCt	-ve	no ct	-ve	no ct	-ve
10	28,60	+ve	28,00	+ve	28,65	+ve	28,57	+ve	28,18	+ve	28,0	+ve	28,50	+ve	28,80	+ve	28,03	+ve	29,35	+ve

Labor Probe	18		19				20			
1	15,60	+ve	17,00	+ve	17,8	+ve	22,69	+ve	19,90	+ve
2	>40	-ve	0,00	-ve	0	-ve	35,06	+ve	32,90	+ve
3	15,30	+ve	17,5	+ve	17,8	+ve	21,70	+ve	19,62	+ve
4	32,50	+ve	0,00	-ve	0	-ve	nd	-ve	nd	-ve
5	33,10	+ve	0	-ve	0	-ve	35,00	+ve	32,50	+ve
6	16,60	+ve	18,6	+ve	19,2	+ve	22,75	+ve	21,15	+ve
7	17,80	+ve	20,3	+ve	20,9	+ve	25,00	+ve	23,25	+ve
8	>40	-ve	0	-ve	0	-ve	nd	-ve	nd	-ve
9	>40	-ve	25,7	+ve	26,3	+ve	nd	-ve	nd	-ve
10	26,80	+ve	29,00	+ve	29,4	+ve	31,74	+ve	30,29	+ve

Anmerkungen
L03: Wertung 2 Verdünnung 1:10
L7: "Ct 1" und "2" entsprechen einem PCR-Lauf (Doppelansatz);
Gerät: AriaMx"Ct 3": Einfachansatz; Gerät: Mx3005P

Grün – erwartete Ergebnisse
Orange - Abweichungen
Rot – Fehler

Die Echtzeit-PCR wurde von 15 Teilnehmern durchgeführt. Die meisten Ergebnisse erfüllten die Erwartungen.

Ein Labor befundete die negative Probe #4 (Mock) als positiv. Da gleichzeitig die schwach positive Probe #2 negativ bewertet wurde und die zu #2 identische Probe #5 mit einem zu #4 vergleichbaren Ct-Wert, könnte hier eine Verwechslung der Proben vorliegen.

Die beiden identischen schwach positiven Proben #2 und #5 wurden von einigen Labors als fraglich oder negativ eingestuft.

Zwei Labors befundeten Probe #9 (PDV) als positiv.

Wiederholbarkeit

Wiederholbarkeit (Testlauf)

Da eine der Proben doppelt versendet wurde, kann die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testlaufes beurteilt werden:

Tabelle 5: Wiederholbarkeit der qPCR innerhalb eines Testlaufs (Vergleich der Proben #2 und #5; $\Delta Ct > 1$)

<i>Labor</i>		<i>01</i>		<i>03</i>	
ΔCt	0	1	1	13	13
<i>Labor</i>		<i>05</i>		<i>06</i>	
ΔCt	1,64	0,33	0,26	0,25	0,24
<i>Labor</i>		<i>07</i>		<i>08</i>	
ΔCt	0,46	0,3	1,01	0,5	0,3
<i>Labor</i>		<i>08</i>		<i>09</i>	
ΔCt	0	0,1	1,38	0,85	1,62
<i>Labor</i>		<i>12</i>		<i>13</i>	
ΔCt	0,7	0,5	1,75	0,76	1,09
<i>Labor</i>		<i>15</i>		<i>17</i>	
ΔCt	0,2	0,1	-	-	>7
<i>Labor</i>		<i>19</i>		<i>20</i>	
ΔCt	0	0	0,06	0,4	

Bei einigen Teilnehmern lagen die Ct-Werte der Proben #2 und #5 mehr als einen Ct-Wert auseinander. Bei zwei Labors sogar um mehr als 7 Ct-Werte (mögliche Probenverwechslungen). Für Labors L14 und L17 konnte die Wiederholbarkeit nicht bewertet werden.

Wiederholbarkeit (Tag zu Tag)

Da die meisten Labors (n = 12) mehrere Testläufe übermittelten, lässt sich die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zwischen zwei Testläufen beurteilen. Die Ct Werte der einzelnen Proben waren gut reproduzierbar (VK < 15%) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Wiederholbarkeit der qPCR ($\Delta Ct > 1$, Variationskoeffizient; $VK > 15\%$)

ΔCt	VK	ΔCt	VK	ΔCt	VK	ΔCt	VK	ΔCt	VK	ΔCt	VK
01		03†		05		06		07		08	
0,00	0,0	2,68	6,4	0,29	1,1	0,43	1,7	0,98	2,4	1,00	2,9
2,00	4,6	0,68	1,6	1,53	2,0	0,28	0,6	2,37	3,8	2,50	3,3
1,00	0,0	0,32	1,5	0,03	0,1	0,15	0,6	0,94	2,8	1,70	5,1
1,00	2,3	0,68	2,9	3,43	4,4	0,21	0,5	1,09	1,9	2,70	3,5
0,00	0,0	0,06	0,2	0,86	3,1	0,45	1,7	1,12	3,0	0,40	1,2
0,00	0,0	0,12	0,5	0,26	0,8	0,82	2,9	0,69	1,7	1,40	3,8
0,00	0,0	1,37	3,5	0,07	0,2	0,43	1,0	1,37	2,7	0,80	1,5

11		12		13		17		19		20	
0,30	0,9	0,50	1,9	2,40	7,1	0,09	0,3	0,80	3,3	2,79	9,3
1,72	2,6	2,10	3,7	2,13	2,8					2,16	4,5
0,24	0,7	0,20	0,8	1,64	5,1	0,89	3,5	0,30	1,2	2,08	7,1
1,28	1,9	1,90	3,3	1,60	2,2					2,50	5,2
1,53	4,8	1,00	3,7	1,95	5,8	0,37	1,4	0,60	2,2	1,60	5,2
0,46	1,1	0,50	1,7	1,74	4,6	0,92	3,2	0,60	2,0	1,75	5,1
0,31	0,6	0,60	1,5	0,47	0,9	1,32	3,2	0,40	1,0	1,45	3,3

† für Labor 03 wurde der zweite Wert korrigiert 1:10 Verdünnung -> Ct-1/log(2)

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;3,9,15) Scagliarini et al., 2007, Veterinary Research Communications, 31(Suppl. 1) – (P-Gen)
- (5,8,11,12,13,17,18,19) Elia et al., 2006, Journal of Virological Methods 136;171-176. - (N-Gen)
- (6) real-time RT-PCR Assay des Nationalen Konsiliarlabors für das Canine Staupevirus am
Research Center for Emerging Infections and Zoonoses, Tierärztliche Hochschule Hannover, 2017
- (7) Halecker et al. 2021. Viruses 2021 Aug 18;13(8):1632. - (P-Gen)
- (16) Tong, et al., 2008, Journal of Clinical Microbiology; in house: target L-
Gene (RNA dependent RNA polymerase)
- (14,20) in house (N-Gen)

Serologie

An der Vergleichsuntersuchung zum Nachweis von Antikörpern gegen das Hundestaupevirus nahmen nur 2 Labors teil. Beide Teilnehmer (L04 & L20) führten einen Serumneutralisationstest (SNT) durch. Die Proben sollten in zwei unabhängigen Tests geprüft werden, um die Streuung der Untersuchungsergebnisse bewerten zu können.

Spezifität:

Die negative Probe (# 2) wurde von beiden Labors als negativ bewertet.

Das schwach positive Serum #7 wurde von einem Labor +ve und von einem Labor -ve bewertet.

Tabelle 7: Ergebnisse der CDV-Serologie (Angaben der Einsender; L04 1:n, L20 logND50)

Probe	L04						L20			
	Labor									
1	>512	+ve	256,0	+ve			2,9	+ve	2,4	+ve
2	<8	-ve	<8	-ve			0,2	-ve	0,2	-ve
3	64,0	+ve	48,0	+ve			1,9	+ve	1,7	+ve
4	256,0	+ve	128,0	+ve			2,1	+ve	2,1	+ve
5	48,0	+ve	32,0	+ve			1,7	+ve	1,4	+ve
6	<8	-ve	8,0	+ve	8,0	+ve	1,0	+ve	0,7	+ve
7	<8	-ve	<8	-ve			1,2	+ve	1,0	+ve
8	32,0	+ve	16,0	+ve			1,4	+ve	1,7	+ve

Wiederholbarkeit

Zur besseren Vergleichbarkeit und Berechenbarkeit wurden die Titer der positiven Proben in LogND Werte umgewandelt und ggf. zensiert (<1:8 = 1:4).

Tabelle 8: Ergebnisse der Serologie (logND, Mittelwerte und VK (VK > 15% rot, zensierte Werte blau))

Labor	L04				L20			
	Probe							
	LogND	MW	VK	LogND	MW	VK		
1	2,71	2,41	2,56	8,32	2,86	2,39	2,62	12,86
3	1,81	1,68	1,74	5,07	1,91	1,67	1,79	9,43
4	2,41	2,11	2,26	9,43	2,15	2,15	2,15	0,00
5	1,68	1,51	1,59	7,82	1,67	1,43	1,55	10,88
6	0,75	0,90	0,85	10,37	0,95	0,72	0,83	20,20
7	0,75	0,75	0,60	0,00	1,19	0,95	1,07	15,71
8	1,51	1,20	1,35	15,71	1,43	1,67	1,55	10,88

Ein Variationskoeffizient von <15% wurde als ausreichend angesehen.

Beide Labors zeigten bei einzelnen schwach positiven Proben mehr als 15% relative Standardabweichung. Die absoluten Unterschiede in den Messungen liegen bei diesen Proben aber unterhalb von 2 Verdünnungsstufen und sind für die praktische Diagnostik i.d.R. nicht kritisch.

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

Tabelle 9: Wiederholbarkeit der serologischen Testverfahren

Labor	L04			L20		
	MW	Stabw	VK	MW	Stabw	VK
im Test	1,59	0,12	7,82	1,55	0,17	10,88
	1,66	0,21	12,86	1,55	0,17	10,88
Tag zu Tag	1,47	0,20	13,44	1,55	0,14	8,88

Die Variationskoeffizienten beider Labors lagen für alle Proben unter 15%:

Linearität

Die Proben 4, 5/8 und 6 wurden durch Verdünnung der Probe 1 gewonnen. Durch Vergleich der gemessenen / berechneten Werte lässt sich die Linearität der Testverfahren abschätzen.

Abbildung 1: Ergebnisse Labor 04 (linearer Trend)

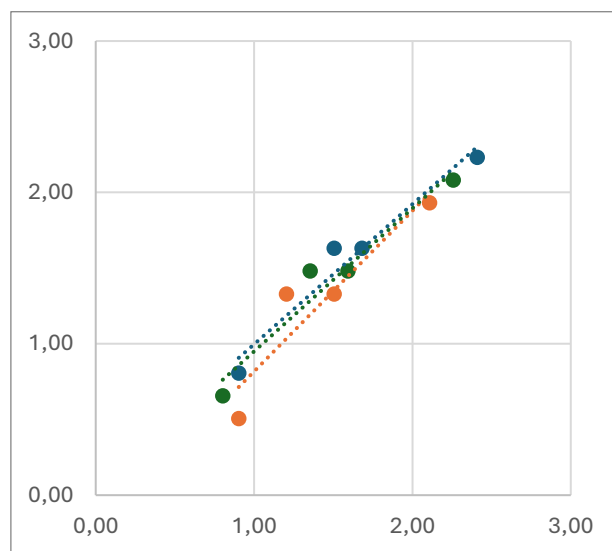


Tabelle 10: Ergebnisse Labor 04 (tabellarisch)

1:n	Test1		Test2		MW	
	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet
1	2,71		2,41		2,56	
3	2,41	2,23	2,11	1,93	2,26	2,08
12	1,68	1,63	1,51	1,33	1,59	1,48
12	1,51	1,63	1,20	1,33	1,35	1,48
80	0,90	0,81	0,90	0,51	0,80	0,66
Trend	m=1,03 a=-0,01 r2=0,96		m=0,82 a=-0,38 r2=0,87		m=1 a=0,07 r2=0,95	

Abbildung 2: Ergebnisse Labor 20 (linearer Trend)

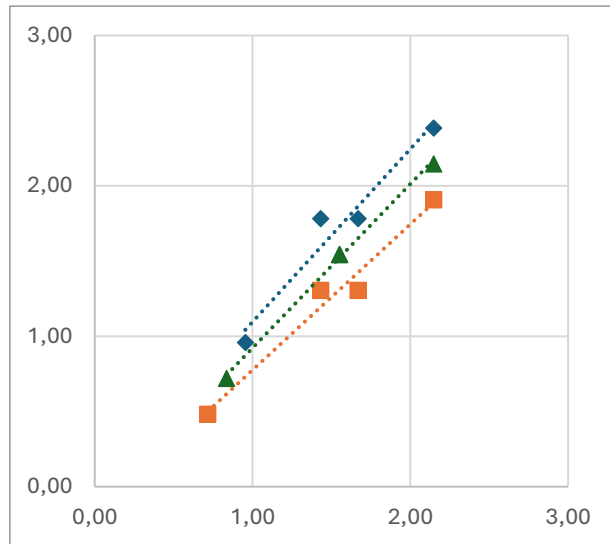


Tabelle 11: Ergebnisse Labor 20 (tabellarisch)

1:n	Test1		Test2		MW	
	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet	gemessen	erwartet
1	2,86		2,39		2,62	
3	2,15	2,39	2,15	1,91	2,15	2,15
12	1,67	1,78	1,43	1,31	1,55	1,54
12	1,43	1,78	1,67	1,31	1,55	1,54
80	0,95	0,96	0,72	0,48	0,83	0,72
Trend	m=0,83 a=0,12 r2=0,95		m=1,0 a=0,23 r2=0,97		m=1,01 a=-0,13 r2=0,99	

Akzeptanzkriterien für die Parameter der linearen Regression finden sich in Tabelle 14.

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

Diskussion und Zusammenfassung

Am Ringversuch Hundestaupevirus Diagnostik 2024/25 nahmen insgesamt 20 Labors aus Deutschland teil. Alle 20 Teilnehmer führten den Genomnachweis mittels PCR / qPCR durch, während nur zwei Labors Antikörperbestimmungen vornahmen.

Alle Proben wurden mit randomisierten Nummern kodiert. Die Kodierung wurde von zwei Personen durchgeführt, um eine Verwechslung der Proben im Konsiliarlabor auszuschließen.

Genomnachweis

Das Probenpanel bestand aus 10 Nukleinsäurepräparationen (Tabelle 1). Die Aufarbeitung der Proben wurde mit Hilfe einer externen Kontroll-RNA überprüft. Die verwendeten Virusisolate gehörten zur Spezies *morbillivirus canis*, *morbillivirus phocae* und *respirovirus bovis*. Es handelte sich um Impfvirusstämme und Feldvirusisolate, deren Identität durch Teilsequenzierungen überprüft wurde. Drei Proben #2, #5 und #10 bestanden aus verdünnten Nukleinsäuren und waren als schwach positiv eingestuft. Die negative Probe #2 bestand aus aufgearbeiteten negativen Kulturzellen.

Von den 20 Teilnehmern führten 3 nur einen qualitativen Nachweis (RT-PCR) durch, 14 nur den Nachweis mittels Echtzeit-PCR und 2 Labors beide Verfahren.

Konventionelle PCR

2 / 5 Labors bewerteten alle 10 Nukleinsäureproben korrekt. Ein Labor bewertete Probe 1 in einem von drei Läufen als fraglich, in den anderen Läufen als positiv. Es liegen keine Angaben zu den Bewertungskriterien vor. Die Abweichung kann als minimal eingeschätzt werden.

Ein Labor bewertete alle drei verdünnten Proben als negativ. Während die Spezifität der PCR in diesem Labor gut war, bestehen offenbar Probleme mit der Sensitivität der konventionellen RT-PCR.

Ein Labor bewertete die Proben #8 und #9 positiv. Die eingesetzte RT-PCR aus dem L-Gen zeigt ein besonders breites Nachweisspektrum im Hinblick auf Paramyxoviren. Insofern sind die Ergebnisse, insbesondere der Nachweis von PI-3 (Probe #8), nicht als falsch zu bewerten, entsprechen aber nicht den Erwartungen, da der Nachweis von Hundestaupevirus bzw. Morbilliviren erwartet wurde.

Echtzeit PCR

Die eingesetzten Echtzeit PCR Verfahren zeigten durchweg eine gute Eignung für den diagnostischen Nachweis von CDV-RNA. Auch hier bereiteten die schwach positiven Proben (besonders #2 und #5) Schwierigkeiten: die Proben wurden nur von sieben Labors in allen Fällen als positiv beurteilt, von den anderen entweder fraglich oder negativ (Ct 34,6 – 41,0). 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. Der Median der Ct-Werte aller Labors für die beiden Proben lag unter 35 (34,6 bzw. 33,5; s. Abbildung 3). Beide Proben sollten nicht als negativ bewertet werden.

Ein Teilnehmer befundete die negative Probe #4 als positiv (Ct – 32,5). Unter Berücksichtigung der übermittelten Werte dieses Labors ist hier eine Vertauschung zweier Proben wahrscheinlich.

Zwei Proben (#8 und #9) der Aussendung enthielten Paramyxoviren, die nicht dem caninen Staupevirus zuzuordnen sind. In Probe 9 befand sich das mit dem CDV verwandte phocine Staupevirus (PDV). Ein Vergleich der Sequenzen von caninen und phocinen Morbilliviren zeigt,

dass ein Nachweis beider Erreger mit einem Teil der eingesetzten PCR Methoden möglich sein sollte. Da das Auftreten von PDV beim Hund unwahrscheinlich ist, spielt dieses Szenario in der praktischen Diagnostik von CDV beim Hund keine Rolle.

Warum trotz weitgehend identischer Verfahren nur ein Labor ein positives Ergebnis für Probe #9 kommunizierte, ist unklar.

Das bovine Parainfluenzavirus aus Probe #8 gehört zu den Pneumoviren und ist nur weitläufig mit dem CDV verwandt. Die entsprechende Probe wurde wie erwartet von allen Teilnehmern als negativ bewertet.

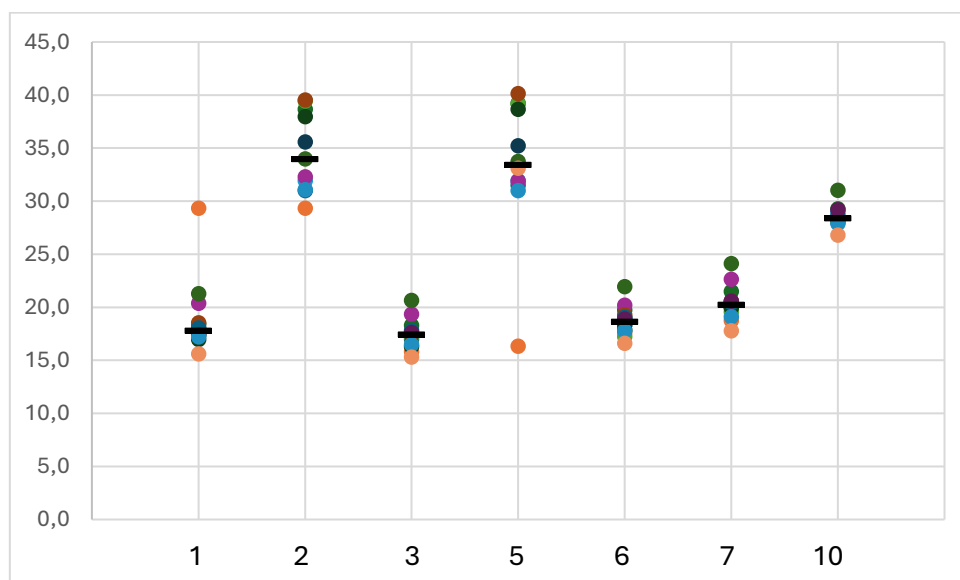
Die meisten Labors setzen Aufarbeitungs- bzw. Inhibitionskontrollen bei der PCR ein. Dieser Schritt ist für die Durchführung einer diagnostischen PCR unabdingbar. Da im Ringversuch fertig präparierte Nukleinsäuren versandt wurden, war dieser Aspekt nicht Teil der Auswertung. Alle 8 Proben wurden von uns vor Aufarbeitung mit einer externen Kontroll-RNA versetzt. Eine Kontroll-PCR nach Aufarbeitung zeigte in allen Fällen eine valide Präparation (Tabelle 1).

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 mRNAs nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen den Proben lag im Mittel der Labors¹ bei 6,6 Ct-Werten (Spanne 4,2 – 10,3).

Trotz unterschiedlicher Methodik zeigte sich eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse auch zwischen den Labors (Abbildung 3).

Abbildung 3: Ct-Werte für die +ve Proben (- Mittelwert)



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 2 Teilnehmer am Ringtestteil Nachweis von Antikörpern gegen das Hundestaupavirus. Offenbar werden die entsprechenden Testverfahren kaum nachgefragt bzw.

¹ Die Proben #1 und 5 von Labor 18 wurden nicht berücksichtigt
CDV-Ringversuch 2024/25

angeboten. Beide Teilnehmer führten einen Serumneutralisationstest durch. 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 positiv getesteter Hundeseren. Aus einem Serum wurden Verdünnungsstufen angelegt, um die Linearität des Tests bewerten zu können. Eine Probe wurde doppelt versandt. Die negative Probe bestand aus verdünntem FBS.

Spezifität

Die negative Probe 2 wurde erwartungsgemäß von beiden Teilnehmern richtig bewertet. Leider konnte in dem Test kein definiert negatives Hundeserum versendet werden, da eine solche Probe in entsprechender Menge nicht vorlag.

Sensitivität

Die 6 positiven Proben wurde mehrheitlich richtig als positiv bewertet. Probleme gab es bei den Proben 6 (1:80 Verdünnung) und 7 (schwach positives Kontrollserum), die beide nur von einem Labor konstant positiv befundet wurden.

Linearität

Die Linearität wurde anhand der Ergebnisse der Probe 1 und der daraus verdünnten Proben sowie den anhand der Verdünnungsfaktoren ermittelten theoretischen Werte für jedes Labor und jeden Testlauf 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 nur in jeweils einem Lauf nicht alle Kriterien der linearen Regression (Tabelle 10 und Tabelle 11).

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 beider Labors zum Teil Variationskoeffizienten >15% bei den schwach positiven Proben. Bei den Proben mit höheren Titern lagen alle Vk-Werte unter 15%.

Gesamtergebnis

Die Labors **2, 10** und **20** erfüllten alle Parameter des Ringversuchsteils **CDV Genomnachweis mit konventioneller PCR**. Die Labors **14** und **16** erfüllten nicht alle Parameter (nicht kritische Abweichung).

Die Labors **1, 3, 6, 7, 9, 15** und **20** erfüllten alle Parameter des Ringversuchsteils **CDV Genomnachweis mit Echtzeit-PCR**. Die Labors **5, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 19** erfüllten nicht alle Parameter (nicht kritische Abweichung). Labor **18** hat den Ringversuch nicht erfolgreich bestanden (kritische Abweichung).

Die Labors **4** und **20** erfüllten nicht alle Parameter des **Ringversuchsteils CDV Antikörpernachweis mittels SNT**.

Den Labors , die nicht alle Parameter erfolgreich erfüllt haben, wird eine Überprüfung ihrer Testmethodik empfohlen.

Zusammenfassung

Der zweite Ringversuch (RV) zur Labordiagnostik der Hundestaupe fand im Februar 2025 statt. Ziel des RV war es einen Überblick über Stand, Qualität und die Entwicklung der Prüfverfahren in Deutschland zu gewinnen. Die Teilnahme war für den molekularen Nachweis von CDV mittels PCR mit 20 Prüflaboren sehr gut. Beim ersten Ringversuch hatten 21 Labors teilgenommen. Die Ergebnisse des CDV-Genomnachweises zeigen in den allermeisten Fällen eine gute Qualität und Vergleichbarkeit der Resultate.

Die Resultate der CDV-Serologie lassen aufgrund der geringen Teilnehmerzahl keine Aussage über den Stand der entsprechenden Diagnostik zu. Die beiden beteiligten Labors erfüllten die meisten Kriterien des Ringversuchs.

Danksagungen

Für die Unterstützung bei der Beschaffung von Probenmaterial für diesen Ringversuch bedanken wir uns herzlich bei Paul Becher (TiHo-Hannover), 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 11.04.25



Dr. M. König

Korrekturhinweis:

Der zensierte Wert für SNT Ergebnisse $<1:8$ wurde von $\log(2^2) = 0,6$ auf $\log(2^{2,5}) = 0,75$ geändert. Dadurch verändern sich die Werte in Tabelle 8.

25.04.25 M.König

Anhang 1: Probennummern Genomnachweis

Tabelle 12: Codierung der Nukleinsäureproben

Labor	Probe									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
01	01-649	01-190	01-160	01-322	01-778	01-498	01-821	01-635	01-063	01-095
02	02-246	02-925	02-661	02-686	02-628	02-651	02-522	02-298	02-802	02-443
03	03-722	03-757	03-524	03-020	03-673	03-044	03-321	03-527	03-886	03-653
05	05-331	05-710	05-935	05-861	05-921	05-354	05-591	05-080	05-247	05-049
06	06-620	06-892	06-215	06-544	06-264	06-845	06-358	06-213	06-203	06-285
07	07-496	07-511	07-508	07-645	07-947	07-101	07-499	07-269	07-216	07-395
08	08-960	08-043	08-628	08-714	08-346	08-679	08-917	08-533	08-122	08-129
09	09-631	09-866	09-476	09-191	09-330	09-871	09-737	09-496	09-501	09-221
10	10-479	10-946	10-052	10-485	10-109	10-403	10-763	10-900	10-657	10-782
11	11-518	11-220	11-411	11-658	11-131	11-919	11-159	11-806	11-016	11-565
12	12-016	12-699	12-776	12-068	12-833	12-830	12-612	12-956	12-268	12-618
13	13-468	13-951	13-001	13-283	13-759	13-945	13-579	13-019	13-502	13-118
14	14-366	14-479	14-787	14-730	14-236	14-028	14-809	14-395	14-536	14-742
15	15-513	15-503	15-001	15-845	15-798	15-251	15-497	15-101	15-151	15-622
16	16-780	16-572	16-918	16-892	16-672	16-244	16-565	16-280	16-414	16-497
17	17-360	17-402	17-227	17-591	17-071	17-740	17-544	17-700	17-027	17-054
18	18-271	18-734	18-931	18-534	18-614	18-327	18-473	18-722	18-861	18-047
19	19-866	19-111	19-219	19-207	19-366	19-168	19-552	19-220	19-775	19-064
20	20-088	20-555	20-863	20-016	20-262	20-550	20-162	20-102	20-491	20-199

Anhang 2: Probennummern Antikörpernachweis

Tabelle 13: Codierung der Serumproben

Labor	Probe							
	1	2	3	4	5	6	7	8
04	04-514	04-427	04-546	04-525	04-511	04-267	04-443	04-501
20	20-746	20-208	20-110	20-254	20-615	20-808	20-395	20-574

Anhang 3: Kriterien für die erfolgreiche Teilnahme

Tabelle 14: Kriterien für die erfolgreiche Teilnahme (fail – Ringversuch nicht bestanden)

PCR	Erfüllt	Nicht kritische Abweichung	Kritische Abweichung
Spezifität	negative Probe -ve	PI-3 +ve	negative Probe +ve
Sensitivität	positive Proben +ve	schwach positive Proben ? oder -ve	positive Proben -ve
qPCR			
Spezifität	negative Probe -ve	PI-3 +ve	negative Probe +ve
Sensitivität	positive Proben als +ve	schwach positive Proben ? oder -ve	positive Proben -ve
Ak-Nachweis			
Spezifität	Negative Probe -ve		negative Probe +ve
Sensitivität	Positive Proben +ve	schwach positive Proben als? oder -ve	positive Proben -ve
Wiederholbarkeit	VK \leq 15%	VK $>$ 15%	
Linearität	Parameter des linearen Trends: m = 0,8 – 1,2 a = -0,2 – 0,2 r ² = $>$ 0,90	Parameter des linearen Trends: m = $<$ 0,8 oder $>$ 1,2 a = $<$ -0,2 oder $>$ - 0,2 r ² = $<$ 0,90	