

Aus der I. Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Innere Krankheiten, Dermatologie und Neurologie
der kleinen Haustiere sowie für klinische Labordiagnostik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Wilfried Kraft

Arbeit angefertigt unter der wissenschaftlichen Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Katrin Hartmann

**Vergleich verschiedener neuer Testsysteme für die feline
Immunschwäche- und die feline Leukämievirusinfektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Pascale Christine Grießmayr
aus Gummersbach

München 2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referentin: Priv.-Doz. Dr. K. Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
II. Literaturübersicht.....	2
1. Feline Leukämievirusinfektion.....	2
1.1. Direkter Erregernachweis	3
1.1.1. Virusisolierung.....	5
1.1.2. Antigennachweis.....	6
1.1.2.1. Freies Antigen	8
1.1.2.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	8
1.1.2.1.2. Immunochromatographie-Schnelltests	12
1.1.2.2. Intrazelluläres Antigen	13
1.1.2.2.1. Immunofluoreszenztest.....	13
1.1.2.2.2. Immunhistochemie	15
1.1.3. Nachweis des Genoms	15
1.2. Indirekter Erregernachweis.....	19
1.2.1. Virusneutralisierende Antikörper.....	20
1.2.1.1. Virusneutralisationstest	20
1.2.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	21
1.2.2. Anti-FOCMA-Antikörper	21
2. Feline Immunschwächevirusinfektion	22
2.1. Direkter Erregernachweis	24
2.1.1. Virusisolierung.....	25
2.1.2. Nachweis des Genoms	26
2.2. Indirekter Erregernachweis.....	28
2.2.1. Radioimmunpräzipitationstest	29
2.2.2. Western Blot	29
2.2.3. Immunofluoreszenztest	31
2.2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay	31
2.2.5. Hämagglutinationstest.....	34
2.2.6. Immunochromatographie-Schnelltests.....	35
III. Material und Methodik	37
1. Material.....	37
1.1. Proben	37

1.2. Untersuchte Testsysteme	37
2. Methodik.....	39
2.1. Testprinzipien	39
2.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent assay	40
2.1.2. Immunochromatographie-Schnelltests.....	40
2.2. Durchführung der Tests	42
2.2.1. Feline Leukämievirusinfektion	42
2.2.1.1. Witness [®] FeLV.....	42
2.2.1.2. Snap [®] Combo Plus	43
2.2.1.3. One-Step [®] FeLV.....	45
2.2.1.4. Mopic [®] FeLV.....	46
2.2.1.5. FASTest [®] FeLV.....	48
2.2.1.6. DUO Speed [®] FeLV	49
2.2.1.7. Virachek [®] FeLV	50
2.2.1.8. PetChek [®] FeLV	52
2.2.2. Feline Immunschwächevirusinfektion	54
2.2.2.1. Witness [®] FIV	54
2.2.2.2. Snap [®] Combo Plus	55
2.2.2.3. Mopic [®] FIV	57
2.2.2.4. FASTest [®] FIV	58
2.2.2.5. DUO Speed [®] FIV	59
2.2.2.6. Virachek [®] FIV.....	60
2.2.2.7. PetChek Plus [®] Anti-FIV.....	61
2.3. Durchführung der Bestätigungstests	63
2.3.1. Western Blot	63
2.3.1.1. Herstellung der Gele.....	64
2.3.1.2. Herstellung der Blotstreifen	67
2.3.1.3. Inkubation der Blotstreifen.....	68
2.3.2. Virusisolierung.....	70
2.4. Verdünnungsreihe.....	71
2.5. Auswertung.....	71
2.5.1. Kriterien	71
2.5.1.1. Auswertbarkeit	71
2.5.1.2. Ablesbarkeit.....	72
2.5.1.3. Positives Testergebnis	72
2.5.1.4. Negatives Testergebnis.....	73
2.5.1.5. Falschpositives Testergebnis	73

2.5.1.6.	Falschnegatives Testergebnis	73
2.5.1.7.	Sensitivität	73
2.5.1.8.	Spezifität	74
2.5.1.9.	Positiver prädiktiver Wert	75
2.5.1.10.	Negativer prädiktiver Wert	76
2.5.1.11.	Konjunktive Auswertung	76
2.5.1.12.	Disjunktive Auswertung	76
2.5.2.	Statistische Auswertung	76
IV.	Ergebnisse	78
1.	Feline Leukämievirusinfektion	78
1.1.	Durchführbarkeit der Tests	78
1.2.	Diagnostische Qualität der Tests	80
1.3.	Statistischer Vergleich	84
1.4.	Testkombinationen	86
1.4.1.	Konjunktive Auswertung	87
1.4.2.	Disjunktive Auswertung	89
1.5.	Abhängigkeit der positiven prädiktiven Werte von der Prävalenz ..	90
1.6.	Verdünnungsreihe	92
2.	Feline Immunschwächevirusinfektion	93
2.1.	Durchführbarkeit der Tests	93
2.2.	Diagnostische Qualität der Tests	95
2.3.	Statistischer Vergleich	98
2.4.	Testkombinationen	98
2.4.1.	Konjunktive Auswertung	99
2.4.2.	Disjunktive Auswertung	100
2.5.	Abhängigkeit der positiven prädiktiven Werte von der Prävalenz	101
2.6.	Verdünnungsreihe	102
V.	Diskussion	103
1.	Aufbau der Studie	103
1.1.	Probenauswahl	103
1.2.	Bestätigungsverfahren	104
1.2.1.	Virusisolierung	104
1.2.2.	Western Blot	106

2. Beurteilung der Testsysteme	107
2.1. Feline Leukämievirus-Tests.....	107
2.1.1. Auswertbarkeit und Ablesbarkeit.....	107
2.1.2. Spezifität und Sensitivität	109
2.1.3. Positive und negative prädiktive Werte	115
2.2. Feline Immunschwächevirus-Tests.....	117
2.2.1. Auswertbarkeit und Ablesbarkeit.....	117
2.2.2. Spezifität und Sensitivität	119
2.2.3. Positiver und negativer prädiktiver Wert	122
3. Schlussfolgerung	124
VI. Zusammenfassung	127
VII. Summary	130

Anhang

A	Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben
B	Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben
C	Tabellenverzeichnis
D	Abbildungsverzeichnis
E	Literaturverzeichnis
F	Danksagung
G	Curriculum vitae

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Abb.	Abbildung
C	Celsius
ca.	circa
CA	Kapsidprotein
CrFK-Zellen	Crandell-Feline-Kidney-Zellen
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>env</i>	envelope
Fa	Firma
FeLV	felines Leukämievirus
FeSV	felines Sarkomvirus
FIV	felines Immunschwächevirus
FOCMA	feline oncornavirus cell membran-associated antigen
g	Gramm
<i>gag</i>	group specific antigen
GEDELISA	gel electrophoresis-derived enzyme-linked immunosorbent assay
gp	Glykoprotein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRPO	horseradish peroxidase
HIV	humanes Immunschwächevirus
IFT	Immunofluoreszenztest
IN	Integrase
IU	international unit
kDa	Kilodalton
l	Liter
<i>LTR</i>	long terminal repeats
M	molar
Ma	Matrixprotein
MG	Molekulargewicht
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MuLV	murines Leukämievirus
NC	Nukleokapsid
ng	Nanogramm
PAC-TRA	poly A-linked colorimetric reverse transcriptase assay
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

<i>pol</i>	polymerase
PR	Protease
RIPA	Radioimmunopräzipitationstest
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SU	surface protein
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethyldiamin
TM	Transmembranprotein
V	variable Regionen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

I. Einleitung

Infektionen mit dem feline Leukämievirus (FeLV) und dem feline Immunschwächevirus (FIV) treten weltweit in der Katzenpopulation auf. Beide Infektionen haben unterschiedliche, mit unspezifischen Symptomen einhergehende Verlaufsformen, die keine sichere Diagnose anhand des klinischen Bildes ermöglichen. Auch gesunde Katzen können Infektionserreger beherbergen und übertragen, und stellen ein Risiko für ihre Artgenossen dar. Nur mit Hilfe von labordiagnostischen Verfahren ist es möglich, bestehende Infektionen zu erkennen. In den letzten Jahren wurden einige neue FeLV- und FIV-Schnelltestsysteme entwickelt, die dem praktischen Tierarzt die Möglichkeit bieten sollen, die Diagnose schnell und einfach zu stellen. Durch den vermehrten Einsatz dieser Testsysteme werden Fragen nach der Qualität, Genauigkeit und Sicherheit der einzelnen Schnelltest gestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 535 Serumproben von gesunden und kranken Katzen mit elf verschiedenen kommerziell erhältlichen FeLV- und FIV-Testsystemen zu untersuchen. Zur Bestätigung positiver und 81 negativer FeLV-Ergebnisse wurde eine Virusisolierung durchgeführt. FIV-positive Proben und 100 negative Proben wurden im Western Blot verifiziert. Die Testsysteme sollten in ihrer Sensitivität, Spezifität, im positiven und negativen prädiktiven Wert sowie anhand ihrer Auswertbarkeit und Ablesbarkeit statistisch verglichen werden.

II. Literaturübersicht

Bei dem feline Leukämievirus (FeLV) und dem feline Immunschwächevirus (FIV) handelt es sich um zwei pathogene Retroviren, die in der Katzenpopulation weltweit auftreten und nach wie vor zu den wichtigsten Todesursachen bei Hauskatzen gehören (O'CONNOR et al., 1991). Sie besitzen als gemeinsame Eigenschaft das Enzym Reverse Transkriptase (RT) und werden daher der Familie der *Retroviridae* zugeordnet (TEICH, 1982; PEDERSEN et al., 1987). Beide Infektionen können über einen längeren Zeitraum asymptomatisch bleiben oder aber mit unspezifischen Symptomen einhergehen. Eine klinische Diagnose ist daher nicht möglich. Zuverlässige labordiagnostische Nachweisverfahren sind notwendig, um eine Infektion zu diagnostizieren. In der tierärztlichen Praxis werden zur Diagnostik von FeLV- und FIV-Infektionen heutzutage hauptsächlich Schnelltestsysteme verwendet, die entweder auf dem Prinzip des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder auf einem ELISA-ähnlichen Immunochromatographie-Prinzip beruhen (PEDERSEN, 1988; O'CONNOR et al., 1991).

1. Feline Leukämievirusinfektion

Das feline Leukämievirus (FeLV) wurde 1964 von JARRETT und Mitarbeitern entdeckt und dem Typ C der Unterfamilie der *Oncornavirinae* zugeordnet. Es kann von Katze zu Katze übertragen werden und bei persistierender Infektion zu verschiedenen Krankheiten führen (HARDY et al., 1969, 1973). Das Genom besitzt eine Länge von ca. 9000 Basenpaaren und setzt sich aus den drei Hauptgenen *gag*, *env* und *pol* und den *LTR*-Sequenzen (Long Terminal Repeat) zusammen (NEIL & ONIONS, 1985). Die Innenkörperproteine p15, p12, p27 und p10 werden durch das ***gag*-Gen** (group specific antigen) kodiert (STEPHENSON et al., 1977). Diese werden während des Replikationszyklus in großen Mengen im Zytoplasma der infizierten Zellen produziert (HARDY et al., 1969) und teilweise ins Plasma der Katze abgegeben (HARDY, 1981). Das ***pol*-Gen** (polymerase) kodiert das virale Enzym RT, dessen Funktion die Umschreibung der viralen RNA in eine einsträngige komplementäre DNA ist (HARDY, 1981). Das ***env*-Gen** ist für die Bildung der beiden Proteine gp70 und p15(E) der Virushülle verantwortlich (PINTER et al., 1977). Aufgrund von Sequenzvariationen des *env*-

Gens können strukturelle Unterschiede des gp70-Proteins entstehen, die zu einer unterschiedlichen Antigenität und Wirtsspezifität führen (ESSEX, 1975; SARMA et al., 1975). Mit Hilfe eines Interferenz- und Neutralisationstests können diese unterschiedlichen Eigenschaften differenziert und das FeLV in drei Subtypen (A, B und C) unterteilt werden (SARMA & LOG, 1971; RUSSEL & JARRETT, 1978). Subtyp A wird als „stabiler“ Prototyp bezeichnet, da nur in seiner Anwesenheit eine Infektion möglich ist. Subtypen B und C werden daher immer nur in Kombination mit dem Subtyp A gefunden (JARRETT et al., 1973; SARMA & LOG, 1973).

Der Nachweis einer FeLV-Infektion wurde im Laufe der letzten Jahre deutlich vereinfacht. Aufwendige Verfahren wie Elektronenmikroskopie (LAIRD et al., 1968), Immundiffusion (GEERING et al., 1968; HARDY et al., 1969), Komplementfixierung (SARMA et al., 1971), passive Hämagglutination (SIBAL et al., 1970) und Radioimmuntest (SCOLNICK et al., 1972) wurden durch die Einführung des indirekten Immunofluoreszenztestes (IFT) durch HARDY und Mitarbeiter (1973a) abgelöst. Heutzutage erfolgt der Nachweis einer FeLV-Infektion meist mit Hilfe immunologischer Verfahren, welche unter der Bezeichnung ELISA bekannt sind. Eine Aufstellung aller vermarkteten FeLV-Testsysteme ist in Tabelle 1 aufgelistet.

1.1. Direkter Erregernachweis

Beim direkten Erregernachweis können mit der Virusisolierung FeLV-Partikel in Serum, Plasma, Speichel, Urin oder Gewebeflüssigkeiten nachgewiesen werden. Heutzutage wird jedoch der einfachere Antigennachweis der Virusisolierung vorgezogen.

Tabelle 1: Diagnostische FeLV-Testsysteme seit 1979

(B: Vollblut; P: Plasma; S: Serum; Sp: Speichel; Tr: Tränenflüssigkeit; fett: in Deutschland zur Zeit kommerziell erhältlich)

Handelsname	Lizenz	zugelassen	Nachweis	verwendbar mit
Leukassay	Pitmann-Moore	1979	FeLV	B, P, S
Leukotest	Cambridge Bioscience	1985	FeLV	B, P, S
Diasystems Flex II	Fermenta	1987	FeLV	B, P, S, Sp, Tr
Diasystems-FeLV	Fermenta	1987	FeLV	B, P, S
Virachek	Synbiotics	1985	FeLV	B, P, S
Assure	Synbiotics	1986	FeLV	B, P, S, Sp
UNI-TEC	Synbiotics	1988	FeLV	B, P, S
QED FeLV	Synbiotics	1989	FeLV	B, P, S
Witness	Synbiotics	1995	FeLV	B, P, S
Witness	Synbiotics	1995	FeLV FIV	B, P, S
CITE StacPak	IDEXX	1986	FeLV	B, P, S, Sp, Tr
PetChek	IDEXX	1987	FeLV	P, S
CITE Combo	IDEXX	1989	FeLV FIV	B, P, S
CITE PROBE	IDEXX	1990	FeLV	B, P, S
CITE PROBE Combo	IDEXX	1992	FeLV FIV	B, P, S
CITE SNAP	IDEXX	1993	FeLV	B, P, S
Snap Combo	IDEXX	1994	FeLV FIV	B, P, S
Snap FeLV	IDEXX	1998	FeLV	B, P, S
Snap Combo Plus	IDEXX	1998	FeLV FIV	B, P, S
DUO Speed	Bio Veto Test (BVT)	1995	FeLV FIV	B, P, S
Speed FeLV	Bio Veto Test (BVT)	1995	FeLV	B, P, S
FASTest	MegaCor	1996	FeLV	B, P, S
OnSite	Biotech/NVI Hoechst	1999	FeLV	B, P, S
Mapic	Sinovus Biotech Inc.	2000	FeLV	B, P, S
Rapid	Sinovus Biotech Inc.	2001	FeLV	B, P, S
Rapid Combo	Sinovus Biotech Inc.	2001	FeLV FIV	B, P, S
One-Step	European Veterinary Laboratory (EVL)	1998	FeLV	P, S

1.1.1. Virusisolierung

Bereits 1968 beschrieben JARRETT und Mitarbeiter die Replikation von Viren in Zellkulturen, die aus Tumorgewebe gewonnen wurden. Die erste für die FeLV-Diagnostik verwendbare Virusisolierung wurde im Jahre 1977 von DeNORONHA und Mitarbeitern entwickelt. Mit Hilfe der Virusisolierung kann die infektiöse Anzahl von replizierenden FeLV-Partikeln, die in Plasma, Serum, Speichel, Urin oder Gewebeflüssigkeit vorhanden ist, erfasst werden (DeNORONHA et al., 1977).

Bei der Durchführung der Virusisolierung werden Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Katzenfibroblasten, die ein defektes murines Sarkomvirus (m-MuSV) in ihrem Genom enthalten, verwendet (FISCHINGER et al., 1974; JARRETT, 1981). Kommt es in Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Katzenfibroblasten zu einer Replikation von feline Leukämieviren, so fungiert das FeLV als Helfervirus, das die Replikation und Expression des m-MuSV ermöglicht. Es entstehen Virushybride mit Strukturproteinen und DNA-Anteilen des murinen Sarkomvirus, die in der Hülle des FeLV eingeschlossen sind. Diese Virushybride infizieren nun neue Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Zellen und führen zu einer Transformation der Zellen. Es kommt zu einer schnellen Proliferation der transformierten Zellen, die sich abrunden und aus dem Zellverband lösen. Die Durchführung einer Virusisolierung dauert zehn bis 14 Tage. Proben, bei denen es nach 14 Tagen zu keinen typischen Transformationsstellen kommt, werden in der Regel noch einmal mit Wachstumsmedium versetzt und durchlaufen eine weitere Virusisolierung. Dieses Verfahren wird als Subkultivierung bezeichnet. Mit Hilfe der Subkultivierung ist es möglich, bereits eine sehr kleine Virusmenge zu isolieren, die anderen Verfahren entgehen (DeNORONHA et al., 1977).

Bei der Virusisolierung handelt es sich um eine sehr sensitive Methode. Sie ist jedoch ein sehr zeit-, arbeits- und kostenintensives Verfahren. Die Ausrüstung eines Zellkulturlabors und geschultes Personal werden für die Durchführung benötigt (DeNORONHA et al., 1977; JARRETT et al., 1982b). Die Blutproben sollten möglichst frisch und steril sein, um Verlust an vermehrungsfähigem Virus und Kontaminationen der Zellkultur zu vermeiden. Bei mangelhafter Probenqualität durch zu lange Lagerung kann es zu falschnegativen Ergebnissen kommen (JARRETT et al., 1982b). Die Virusisolierung wird in der heutigen FeLV-Diagnostik nicht mehr als Routinetest eingesetzt, sondern nur als

Bestätigungstest bei positiven Immunochromatographietest- oder ELISA-Ergebnissen herangezogen (BARR, 1996).

1.1.2. Antigennachweis

Für die Routinediagnostik einer FeLV-Infektion wird heutzutage hauptsächlich der p27-Antigennachweis herangezogen. Beim p27-Antigen handelt es sich um ein Antigen, das in Serum, Plasma, Speichel, Knochenmark, Tränenflüssigkeit und in allen infizierten Geweben einer FeLV-infizierten Katze nachgewiesen werden kann (HARDY, 1991). Es wurde als das zu bestimmende Antigen gewählt, da es mit 25 bis 50 % der Teilchenmasse des Virus das vorherrschende Protein ist (LUTZ et al., 1980a). Das p27-Antigen kann, abhängig von der Verlaufsform der FeLV-Infektion, extrazellulär (freies Antigen) oder intrazellulär nachgewiesen werden. Der Nachweis von freiem p27-Antigen kann mit Hilfe eines ELISA oder eines ELISA-ähnlichen Immunochromatographie-Prinzips erfolgen. Der IFT findet seinen Einsatz beim Nachweis von intrazellulärem p27-Antigen in neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten (HARDY et al., 1973a). Die Verlaufsformen einer FeLV-Infektion sind in Abbildung 1 dargestellt.

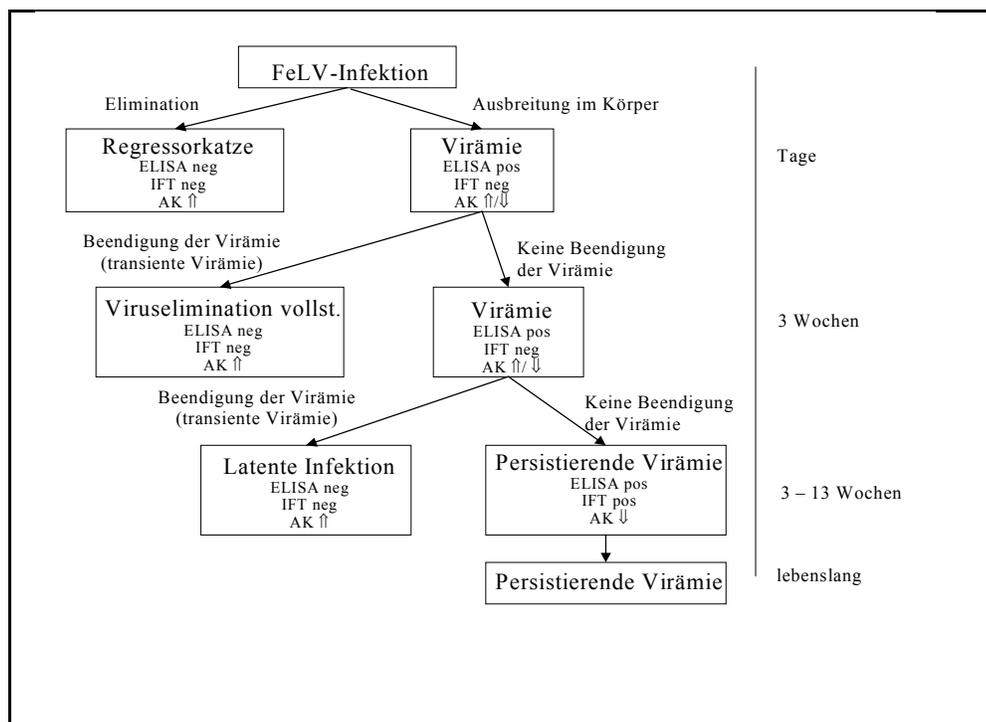


Abb. 1: Verlaufsformen der FeLV-Infektion (nach HARTMANN & HEIN, 2002)

Der Verlauf einer FeLV-Infektion hängt entscheidend vom Immunstatus und Alter des infizierten Tiers, aber auch von Infektionsdosis und Virulenz des Virus ab (HARDY et al., 1976a; HARDY, 1980a). Nach einer Infektion, die meist oronasal erfolgt, findet zunächst nur eine lokale Virusvermehrung statt (ROJKO et al., 1979; HOOVER et al., 1980). Katzen, die das Virus in diesem Stadium, also vor Auftreten einer Virämie eliminieren, werden als **Regressorkatzen** bezeichnet. Diese Tiere besitzen große Mengen virusneutralisierender Antikörper und sind vor einer Neuinfektion geschützt. Die Infektion kann bei diesen Katzen mit Routine-Antigentests nicht nachgewiesen werden. Gelingt es dem Organismus nicht, das Virus zu eliminieren, kommt es zu einer **transienten Virämie**, in der das Virus mit Lymphozyten und Monozyten in die Blutbahn gelangt. Eine transiente Virämie dauert meist nur drei bis sechs (bis maximal 16) Wochen. Gelingt es den Katzen, in der Zeit eine effektive Immunantwort aufzubauen, können sie die Virämie beenden und das Virus vollständig aus dem Körper eliminieren. Transient virämische Katzen können durch Routinediagnostik nicht von persistierend virämischen Katzen unterschieden werden (HARTMANN & HEIN, 2002). Wird das Knochenmark (nach etwa drei Wochen) von den Viren erreicht, kommt es zum Befall von Knochenmarkszellen. Die rasche Virusreplikation in den sich schnell teilenden Zellen resultiert in einer großen Menge an freien und zellgebundenen Viren im Blut (ROJKO et al., 1982). Durch die Mechanismen der humoralen und zellulären Immunabwehr ist es möglich, die Virämie zu beenden (ROJKO et al., 1982). Obwohl das Virus aus dem Blut verschwindet, bleibt integriertes Provirus im Genom von Zellen des Knochenmarks zurück. Es kommt zu einer **latenten Infektion**, die weder durch ELISA noch durch IFT im Blut nachweisbar ist (PEDERSEN et al., 1984a; PACITTI, 1987). Nur mittels PCR oder durch Anzüchtung von Knochenmarkszellen, kann eine latente Infektion nachgewiesen werden (JACKSON et al., 1993; MIYAZAWA & JARRETT, 1998). Bei latent infizierten Katzen kann es in den ersten Jahren *post infectionem* durch Immunsuppression oder Stresssituationen zu einer erneuten Virusreplikation kommen, die eine erneute Virämie zur Folge hat (ROJKO et al., 1982; PEDERSEN et al., 1984a; NEIL & ONIONS, 1985). Bei den meisten der latent infizierten Tiere geht die virale Information jedoch in einem Zeitraum von bis zu zwei Jahren verloren, wenn alle Virus-DNA-haltigen Zellen abgestorben oder durch Abschreibefehler bei der Zellteilung replikationsunfähige Proviren entstanden sind (PACITTI &

JARRETT, 1985; PACITTI, 1987). Nach diesem Zeitpunkt ist keine Gefahr der Reaktivierung mehr gegeben. Schafft es das Immunsystem der infizierten Katze nicht, die Virämie während der ersten Wochen zu beenden, kommt es zu einer meist lebenslangen **persistierenden Virämie**. Diese Katzen scheiden das Virus lebenslang über ihren Speichel aus und sterben meist innerhalb von drei bis fünf Jahren an FeLV-assoziierten Krankheiten. Die persistierende Virämie kann durch Virusisolierung und durch unterschiedliche Antigen-Nachweisverfahren diagnostiziert werden (HARDY, 1981; PEDERSEN, 1991). Bei wenigen (bis zu 10 % der) Katzen tritt ein **atypischer Verlauf** der Infektion auf. Es handelt sich um eine „sequestrierte Infektion“, in der es zur lokalen Vermehrung des Virus z. B. in der Blase, Milchdrüse oder im Auge, ohne Beteiligung des Knochenmarks kommt. Bei diesen Tieren kann es zu einer intermittierenden oder geringen Produktion von p27-Antigen kommen. Diese Katzen reagieren daher nur manchmal und/oder grenzwertig im Antigentest positiv (HOOVER & MULLINS, 1991).

1.1.2.1. Freies Antigen

Freies Antigen (p27-Antigen) kann durch ELISA oder ein ELISA-ähnliches Immunochromatographie-Prinzip nachgewiesen werden. Diese FeLV-Antigen-Schnelltests spielen heutzutage die wesentliche Rolle in der FeLV-Diagnostik (PEDERSEN, 1988; O'CONNOR et al., 1991).

1.1.2.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist ein spezifischer Test, der 1971 von ENGVALL und PERLMANN sowie von VanWEEMEN und SCHUURS entwickelt wurde. Im Jahre 1979 wurde von der Firma Pitman-Moore (Washington Crossing, New Jersey, USA) der erste kommerzielle ELISA (Leukassay F[®]) vorgestellt und durch Feldstudien hinsichtlich seiner Praxistauglichkeit geprüft (KAHN & MIA, 1980). Bis heute ist der ELISA das verbreitetste und gebräuchlichste Verfahren, um eine FeLV-Infektion zu diagnostizieren (TONELLI, 1991). Er ist eine sehr sensitive Nachweismethode, da bereits Antigenkonzentrationen zwischen 14 und 28 ng/ml Serum zu einem positiven Ergebnis führen (LOPEZ et al., 1989).

Der ELISA weist mit Hilfe von poly- oder monoklonalen FeLV-Antikörpern freies p27-Antigen nach (TONELLI, 1991). Bei den polyklonalen Antikörpern

handelt es sich um eine Mischung von Immunglobulinen, die als Folge der Stimulierung von Lymphozyten, durch unterschiedliche antigene Determinanten desselben Antigenmoleküls, *in vivo* synthetisiert werden. Bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpern kann es zu unspezifischen Reaktionen kommen, die eine genaue Interpretation der Ergebnisse nicht ermöglichen. Bei den heutigen ELISA werden hauptsächlich monoklonale Antikörper verwendet, die *in vitro* durch Manipulation einzelner Lymphozyten erzeugt werden. LUTZ und Mitarbeiter (1983) entwickelten einen ELISA mit monoklonalen Antikörpern gegen drei verschiedene Epitope des p27-Antigens, die nicht mit dem p27-Antigen anderer Retroviren kreuzreagierten. SETTELE (1989) ermittelte, bei einem Vergleich dieses ELISA mit anderen ELISA-Systemen, eine niedrigere Nachweisgrenze für p27 und dadurch eine höhere Sensitivität bei dem von LUTZ entwickelten ELISA.

Beschichtete Mikroplattenvertiefungen werden mit Testserum und Konjugat inkubiert. Im Konjugat befinden sich Antikörper, die an ein Enzym gekoppelt sind. Ist im Testserum p27-Antigen enthalten, wird es sowohl von den Antikörpern der soliden Phase als auch von den Antikörpern des Konjugats gebunden. Nicht gebundene Antikörper werden im darauf folgenden Waschvorgang entfernt. Durch die Zugabe von Substrat und Chromogen kommt es zu einer Enzymreaktion, die eine Farbveränderung bewirkt. Die Farbintensität der Reaktion korreliert mit der Höhe der p27-Serumkonzentration und kann mit bloßem Auge oder mit einem ELISA-Reader beurteilt werden (LUTZ, 1984).

Seit Einführung des ersten kommerziellen ELISA in der FeLV-Diagnostik wurden zahlreiche Vergleichsstudien mit anderen Nachweismethoden (IFT, Virusisolierung) durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl Diskrepanzen zwischen den Resultaten des ELISA und des IFT (KAHN et al., 1980; LUTZ et al., 1980a; HARDY, 1981; HIRSCH et al., 1982; JARRETT et al., 1982b; WAITS et al., 1982) als auch zwischen den Ergebnissen des ELISA und der Virusisolation bestehen (JARRETT, 1980; JARRETT et al., 1982b). Die Diskrepanz zwischen positiven ELISA- und negativen IFT-Ergebnissen liegt zwischen 10 % und mehr als 50 % (JARRETT, 1980; JARRETT et al., 1982, 1991; HARDY & ZUCKERMAN, 1991a). Die Gründe für diese Diskrepanz können auf die Verlaufsform einer FeLV-Infektion, auf Qualitätsmängel der Testsysteme und auf Handhabungsfehler bei der Durchführung der Testsysteme zurückgeführt werden

(LOAR, 1991). Bei der FeLV-Infektion kann es vor allem zu Beginn der Virämie zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Das feline Leukämievirus vermehrt sich im lymphatischen Gewebe des Nasen- und Rachenraumes und kleinere Mengen an freiem Virusantigen treten ins Serum über. Die Knochenmarkszellen sind noch nicht von den Viren infiziert und kein intrazelluläres Antigen befindet sich in den Blutzellen. Der ELISA reagiert in dieser Phase bereits positiv. Der IFT hingegen fällt negativ aus (JARRETT et al., 1964; HARDY, 1981; JARRETT et al., 1982b). Auch die atypische Verlaufsform einer FeLV-Infektion ist für einen Teil der diskrepanten Testergebnisse verantwortlich, da es hier zu einer intermittierenden Antigenämie kommen kann, die durch den ELISA gelegentlich entdeckt wird (LUTZ et al., 1980a, 1983; JARRETT et al., 1982b). Der IFT fällt negativ aus, da keine Virusvermehrung im Knochenmark stattfindet und so kein nachweisbares intrazelluläres Antigen in den Blutzellen auftritt (HIRSCH et al., 1982; JARRETT et al., 1982b; McCAW, 1994). Falschpositive Ergebnisse können auch durch eine Farbentwicklung durch anti-Maus-Antikörper entstehen. In einer von LOPEZ und JACOBSEN (1989) durchgeführten Studie wurde nachgewiesen, dass zwischen 0,14 und 0,57 % der Katzen anti-Maus-Antikörper im Serum besitzen, die mit den monoklonalen Antikörpern des ELISA reagieren. Es kommt zu einer Farbentwicklung, die fälschlicherweise als positives Ergebnis abgelesen wird (JACOBSEN & LOPEZ, 1991). Der Grund für die Entstehung der Antikörper ist nicht eindeutig geklärt. Man nimmt aber an, dass einige Katzen durch intensiven Kontakt zu Mäusen, Antikörper gegen Mäuse-IgG bilden (HORZINEK, 1990). In den letzten Jahren lösten die meisten Hersteller das Problem der durch anti-Maus-Antikörper verursachten falschpositiven Testergebnissen durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern, die gegen die anti-Maus-Antikörper gerichtet sind (LOPEZ et al., 1989). Bei der Handhabung der Testsysteme können zu dem technische Fehler, wie ungenügendes Waschen zwischen den einzelnen ELISA-Schritten oder das nicht Einhalten der vorgegebenen Durchführungszeiten, zu falschpositiven Ergebnissen führen (PEDERSEN, 1986).

Da es in der FeLV-Routinediagnostik zum vermehrten Einsatz von ELISA-Systemen kommt, wurden in den letzten Jahren mehrere Studien zum Vergleich der kommerziell erhältlichen ELISA-Tests durchgeführt. Die Mehrzahl der Studien ergab eine gute Korrelation zwischen den Resultaten der einzelnen

Testsysteme. Sensitivität und Spezifität der Testsysteme lagen zwischen 95 % und 100 % (HAWKS et al., 1991; JACOBSON & LOPEZ, 1991; SWANGO, 1991; HARTMANN et al., 2001).

Der Speichel einer infizierten Katze gilt als Hauptübertragungsweg einer FeLV-Infektion, da das Virus im Speichel in großen Mengen (bis zu eine Million Viruspartikel pro Milliliter Speichel) ausgeschieden wird (HARDY, 1981). Einige, kommerziell erhältliche ELISA, wie z. B. der Assure[®] FeLV (Synbiotics, USA) oder der Cite StacPak[®] (IDEXX, USA), sind auch mit einer Speichelprobe ("Speichel-ELISA") durchführbar (LEWIS et al., 1987; LUTZ & JARRETT, 1987; LOPEZ et al., 1990; HAWKINS, 1991). Der Assure[®] FeLV ist im Gegensatz zum Cite StacPak[®] noch kommerziell erhältlich. Der Antigennachweis im Speichel einer infizierten Katze ist frühestens vier bis acht Wochen nach einer FeLV-Exposition möglich, da sich erst nach Infektion des Knochenmarks und nachfolgender Ausschwemmung von Virusmaterial in die Blutzirkulation eine hohe Viruskonzentrationen im Speicheldrüsengewebe bildet (ROJKO et al., 1979). Frühere Infektionsstadien bleiben im "Speichel-ELISA" so häufig unentdeckt (LEWIS et al., 1987). Bei länger bestehenden FeLV-Infektionen zeigten Speichel- und Serum-ELISA eine Übereinstimmung von 97,7 % (LEWIS et al., 1987). Da das Virus bei einer bestehenden Infektion aber nicht konstant, sondern nur intermittierend ausgeschieden wird, wird empfohlen, Speichelprobenuntersuchung nur bei Bestandskontrollen heranzuziehen (BABYAK et al., 1996).

In einer von Hawkins (1991) durchgeführten Studie wurde die Verwendung von Tränenflüssigkeit untersucht und mit den Ergebnissen eines ELISA, der mit Serum durchgeführt wurde, verglichen. Der ELISA besaß bei der Benutzung von Tränenflüssigkeit eine niedrigere Sensitivität als bei der Verwendung von Serum. Die Spezifität hingegen war für beide Probenmaterialien gleich gut (LUTZ & JARRETT, 1987; HAWKINS, 1991). Die niedrige Sensitivität ist durch die unterschiedlichen Verlaufsformen einer FeLV-Infektion zu erklären. Das Virus wird erst dann mit der Tränenflüssigkeit ausgeschieden, wenn das Knochenmark infiziert ist und sich Virus in zirkulierenden Blutzellen befindet. Ein positives Tränen-ELISA-Ergebnis ist daher erst vier bis acht Wochen nach einer FeLV-Exposition zu erwarten (ROJKO et al., 1979). Als weiterer Grund für die niedrige Sensitivität wird das geringe Volumen der Tränenflüssigkeit, das bei der

Entnahme mittels Tränenstreifen (Schirmer Tränentest-Streifen) gewonnen wurde, angegeben. Meist wurden weniger als 20 µl Tränensekret gewonnen (HAWKINS et al., 1986), so dass der Anteil der enthaltenen Viruspartikel unter der Nachweisgrenze des ELISA liegen kann (HAWKINS, 1991). In der Literatur werden ELISA zum Antigennachweis in der Tränenflüssigkeit generell nicht empfohlen, da virales Antigen nicht konstant ausgeschieden wird (FeLV/FIV Panel Report, 1991; HARTMANN & HEIN, 2002).

1.1.2.1.2. Immunochromatographie-Schnelltests

Die Immunochromatographie-Schnelltests basieren auf einem ELISA-ähnlichen Prinzip und haben in den letzten Jahren in der Tiermedizin sehr an Bedeutung gewonnen. In der tierärztlichen Praxis ist ihr Einsatz von großen Vorteil, da die Anwendung keinerlei Ansprüche an Laborausrüstung und Personal stellt und die Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit vorliegen (UCHIO et al., 1997).

Die Immunochromatographie-Schnelltests bestehen aus einem aus Spezialpapier hergestellten Streifen, der sich in einem Kunststoffgehäuse befindet. Die Probenflüssigkeit (Vollblut, Plasma oder Serum) wird in ein vorgesehene Probenfenster getropft und wandert dann aufgrund der Saugwirkung des Papiers von einem Ende zum anderen. Dabei spült die Flüssigkeit kleinste, mit Antikörper beschichtete Latex- oder Goldkügelchen mit. Falls Antigene in der Flüssigkeit vorhanden sind, kommt es zur Bildung von Immunkomplexen. Diese werden durch eine aus membranfixierten Antikörpern bestehenden Phase auf der Matrix fixiert. Die fixierten Antigen-Antikörperkomplexe werden entweder durch eine Enzymwirkung oder durch eine Akkumulation von Gold- oder Latexpartikeln sichtbar (Gebrauchsinformation FASTest[®] FeLV, MegaCor, Österreich).

In einer von ROBINSON und Mitarbeitern durchgeführten Studie (1998) wurde eine gute Übereinstimmung der Resultate von einem Immunochromatographietest (Witness[®], Merial, Frankreich) und einem ELISA (PetChek[®], IDEXX, USA) festgestellt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der falschen Ergebnisse (ROBINSON et al., 1998). HARTMANN und Mitarbeiter (2001) untersuchten die Stärken und Schwächen von sechs in Europa kommerziell erhältlich Schnelltests (Snap[®], IDEXX, USA; DUO Speed[®] FeLV, BIO VETO TEST, Frankreich; FASTest[®] FeLV, MegaCor, Österreich; Witness[®] FeLV, Synbiotics, USA; OnSite[®] FeLV, Biotech, Schweden; ONE-Step[®], EVL,

Niederlande). Der OnSite[®] erreichte eine geringe Sensitivität und Spezifität und wurde somit nicht für die FeLV-Diagnostik empfohlen. Sowohl der Witness[®] als auch der Snap[®]-Test wiesen einen hohen Anteil an schwer oder nicht auswertbaren Testergebnissen auf. Der DUO Speed[®] und der FASTest[®] wiesen eine hohe Sensitivität und Spezifität auf und wurden als geeignete Screeningtests für die tierärztliche Praxis empfohlen (HARTMANN et al., 2001).

1.1.2.2. Intrazelluläres Antigen

Intrazelluläres Antigen kann frühestens drei Wochen nach Beginn einer FeLV-Infektion, wenn die Viren das Knochenmark infiziert haben, in Granulozyten, Thrombozyten und zum Teil auch in Monozyten und Lymphozyten im Blut nachgewiesen werden. Die rasche Virusreplikation in den sich schnell teilenden Zellen des Knochenmarks resultiert in einer großen Menge an zellgebundenen Viren im Blut (HARDY et al., 1973b; HOOVER et al., 1977a; ROJKO et al., 1978; HARDY, 1981).

Der erste Test, der auf der Entdeckung von intrazellulären viralem Antigen basierte, war der Immundiffusionstest (1969), der jedoch aufgrund seiner schwierigen und zeitintensiven Durchführung für die Routinediagnostik nicht geeignet war (HARDY, 1971). Als erster für die Routinediagnostik relevanter Test folgte der indirekte IFT (HARDY et al., 1973a). Die Immunhistochemie, ein Verfahren, das zum Nachweis von FeLV-Antigenen in Gewebeproben *post mortem* angewendet wird, spielt für die Routinediagnostik *intra vitam* keine große Rolle.

1.1.2.2.1. Immunofluoreszenztest

Der indirekte Immunofluoreszenztest (IFT) wurde von HARDY und seinen Mitarbeitern im Jahre 1973 entwickelt und als erster praktikabler Routinetest für die FeLV-Diagnostik eingesetzt. Es handelt sich um einen sehr spezifischen und akkuraten Test. Er wird auch heute noch, neben der Virusisolierung, in der FeLV-Diagnostik als eine der Referenzmethoden angesehen und bei positiven ELISA- oder Immunochromatographietests als Bestätigungstest eingesetzt (HARDY & ZUCKERMAN, 1991a). Der IFT und die Virusisolierung stimmen in 97,5 % bis 98,3 % ihrer Ergebnisse überein (HARDY, 1981; JARRETT et al., 1982b).

Der IFT weist gruppenspezifische Innenkörperproteine (p15, p12, p27 und p10) des feline Leukämievirus mittels spezifischer Antiseren und einer Immunofluoreszenzreaktion nach. Das Antiserum enthält polyklonale Antikörper und wird durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem FeLV gewonnen (HARDY & ZUCKERMAN, 1991a). Für die Durchführung des IFA werden dünne Blut- oder Knochenmarksausstriche verwendet, die getrocknet und anschließend in Alkohol oder Aceton fixiert werden. Die Fixierung bewirkt eine Zerstörung der äußeren Zellmembran und ermöglicht, dass sich hinzugegebenes Kaninchen-Anti-FeLV-Serum an eventuell vorhandene Virusbestandteile im Zytoplasma der infizierten Blutzellen haftet. Kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, werden diese anschließend mit Fluorescein-Isothiocyanat-konjugierten-anti-Spezies-Antikörpern sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Antigen-Antikörper-Komplexe als apfelgrüne Granula. Unspezifische Hintergrundfärbungen können mit Hilfe der Evans-Blaufärbung differenziert werden. Sie erscheinen dann im ultravioletten Licht rot (HARDY & ZUCKERMAN, 1991a).

Der IFT kann frühestens nach einer etwa dreiwöchigen Virämie positiv werden (HARDY et al., 1973; HOOVER et al., 1977a; ROJKO et al., 1978; HARDY, 1981). Bei experimentell infizierten Katzen reagiert der IFT frühestens ab dem 18. Tag *post infectionem* positiv (JARRETT et al., 1982b). Tritt bei einer FeLV-infizierten Katze eine positive IFT-Reaktion auf, so besteht eine 91 % bis 97 % Wahrscheinlichkeit, dass die Virämie bestehen bleibt (HARDY, 1981, 1991). Diese persistierend virämischen Tiere scheiden das Virus lebenslang über ihren Speichel aus und sterben meist innerhalb von drei bis fünf Jahren an FeLV-assoziierten Krankheiten (HARDY, 1981). In nur 3 % bis 9% der positiven IFT-Reaktionen handelt es sich um eine transiente Virämie (HARDY, 1981; JARRETT et al., 1982a; LUTZ et al., 1983; HARDY & ZUCKERMAN, 1991a, JARRETT et al., 1991a), die beendet und damit zu einer latenten Infektion wird (POST & WARREN, 1980; ROJKO et al., 1982; MADEWELL & JARRETT, 1983; PEDERSEN, 1984; PEDERSEN et al., 1984a; PACITTI & JARRETT, 1985, 1986).

Falschnegative Ergebnisse entstehen bei „schlechten“, leukozytenarmen oder beschädigten Blut- oder Knochenmarksausstrichen (HARDY & ZUCKERMAN, 1991a) und bei der Benutzung von heparinisierten Proben, da es hier zu einer

verminderten Intensität der fluoreszierenden positiven Zellen kommen kann (JARRETT, 1995). Andererseits treten durch Bindungen des Fluoreszinfarbstoffes an eosinophile Granulozyten unspezifische Anfärbungen auf, die ein falsch-positives Testergebnis vortäuschen können (GWALTER, 1981; FLOYD et al., 1983).

Für die Durchführung und Auswertung des IFT müssen geschultes Personal und ein Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund bleibt er Speziallabors vorbehalten (HARDY & ZUCKERMAN, 1991a).

1.1.2.2.2. Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie können Gewebeproben *post mortem* auf FeLV-Antigen untersucht werden. Dazu werden methanol- oder formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte nach Entparaffinisierung auf das Vorliegen von p27- oder p70-Antigenen untersucht (REINACHER & THEILEN, 1987; KOVACEVIC et al., 1997).

1.1.3. Nachweis des Genoms

Der Nachweis des Genoms erfolgt mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die PCR ist eine Technik, die 1985 von MULLIS und Mitarbeitern entwickelt wurde und die zur *in vitro* Vermehrung (Amplifikation) von bestimmten DNA-Abschnitten dient. Es handelt sich um eine hoch spezifische und sensible Methode (MULLIS et al., 1986, 1987). Um die PCR auch für die Diagnostik von RNA-Viren zu nützen, muss die RNA zuerst mittels der RT in eine DNA umgewandelt werden. Ein solcher Vorgang wird als Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet (MURPHY et al., 1999).

Die PCR basiert auf einer sich ständig wiederholenden Synthese einer bestimmten DNA-Sequenz durch die Polymerase des hitzestabilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Die Synthese des DNA-Stranges beginnt an einem kurzen, zu einem bestimmten Abschnitt der DNA-Matrix komplementären Oligonukleotid, dem sogenannten Primer. In der Regel werden zwei Primer eingesetzt, die jeweils komplementär zu den gegenüberliegenden Strängen einer DNA-Region sind. Die PCR-Produkte (amplifizierte DNA-Sequenzen) werden im Anschluss über eine Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und z. B. durch UV-Licht als fluoreszierende Banden

sichtbar gemacht (MULLIS et al., 1986). Die Sensitivität der PCR kann durch das Prinzip der “nested“ PCR noch gesteigert werden (KEMP et al., 1989; ALBERT & FENYÖ, 1990; RIMSTAD et al., 1990). Hierbei handelt es sich um zwei hintereinandergeschaltete PCR-Runden mit zwei verschiedenen Primerpaaren. Die erste PCR enthält ein externes Primerpaar, während die zweite PCR ein internes “nested“ Primerpaar, enthält. Das größere DNA-Fragment der ersten PCR dient als Vorlage für die zweite Reaktion, bei der nur selektive Fragmente mit gewünschten Abschnitt amplifiziert werden (RIMSTAD & UELAND, 1992; MOMOI et al., 1993).

Neben der “herkömmlichen“ PCR hat sich in den letzten Jahren die quantitative “real-time“-Taqman-PCR etabliert, die auch in der FeLV-Diagnostik eine zunehmende Rolle spielt (LIVAK et al., 1995; GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996). Das Prinzip der “real-time“ PCR ist in Abbildung 2 dargestellt. Zusätzlich zu zwei Primern befindet sich im Reaktionsgefäß eine Probe, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Reporter-(R)-Farbstoff und Quencher-(Q)-Farbstoff) markiert ist und sich an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe liegen zu Beginn einer PCR nah zusammen, so dass nach Anregung durch einen Argon-Laser die Energie des R-Farbstoffes auf den Q-Farbstoff übertragen wird und dieser Licht emittiert. Während der PCR werden beide Primer durch die Taq-DNA-Polymerase verlängert, bis sie auf die Probe treffen (HOLLAND et al., 1991). Die Probe wird vom DNA-Strang gelöst und mit Hilfe der 5`Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Durch den Abbau der Probe werden die Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Beide Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nun Licht. Die Stärke der Fluoreszenz des R-Farbstoffes ist proportional zur gebildeten DNA-Menge sein. Diese Reporterfluoreszenz wird alle sieben Sekunden gemessen, ohne dass das Reaktionsgefäß geöffnet werden muss. Es entsteht eine PCR-Kurve, in der das Fluoreszenzsignal des R-Farbstoffes in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus dargestellt ist. In den ersten Zyklen liegt das Fluoreszenzsignal unterhalb der Nachweisgrenze. Danach steigt es kontinuierlich an. Es wird ein möglichst früher Punkt innerhalb der PCR-Reaktion gewählt, um die Virus-Ausgangsmenge zu bestimmen. Dieser Punkt wird als sogenannter “Threshold“ gekennzeichnet. Der PCR-Zyklus, bei dem die PCR-Kurve diesen “Threshold“ schneidet, wird “Threshold-Cycle“ genannt. Der

“Threshold-Cycle“ korreliert gut mit der eingesetzten Virusmenge und erlaubt daher eine genaue Quantifizierung der Virusmenge, die für die PCR eingesetzt wurde (LEUTENEGGER, 2001).

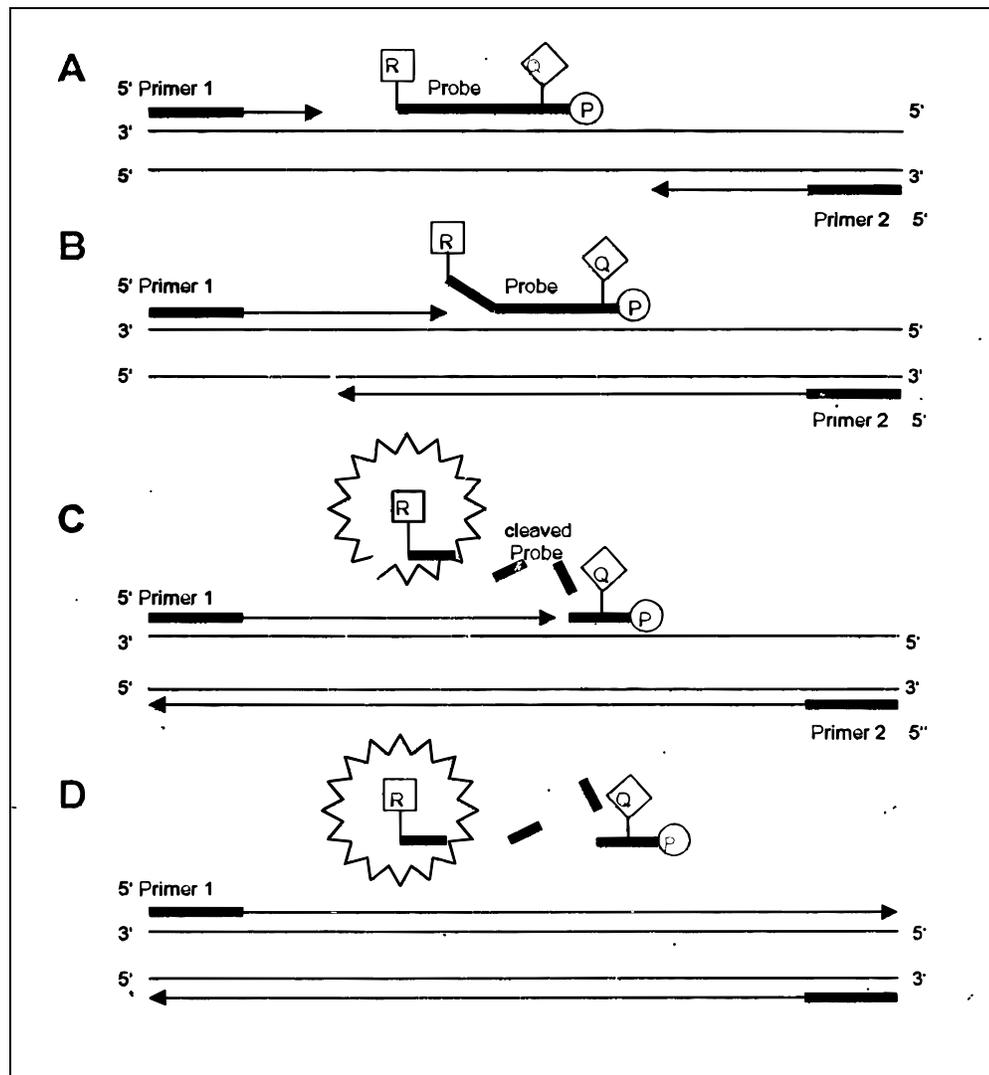


Abb. 2: Prinzip der “real-time“-Taqman-PCR (nach LEUTENEGGER et al., 1999)

(Q = Quencherfarbstoff; R = Rezeptorfarbstoff; P = Phosphatgruppe)

Die “real-time“-Taqman-PCR weist gegenüber der konventionellen PCR wesentliche Vorteile auf. Zum einem ist der Arbeitsaufwand deutlich geringer, da nach der PCR-Reaktion die aufwendigen Arbeitsschritte wie die Gelaufftrennung und Sichtbarmachung der PCR-Produkte entfallen. Zum anderen ist das Kontaminationsrisiko sehr gering, da die Reaktionsgefäße nach der PCR nicht mehr geöffnet werden. Die Fluoreszenz, die während der PCR bei positiven Proben entsteht, wird bei jedem PCR-Zyklus automatisch durch das Reaktionsgefäß hindurch gemessen. Auch die Spezifität ist gegenüber der

konventionellen PCR deutlich höher, da sich nicht nur die beiden Primer sondern auch die Probe an eine bekannte Gensequenz binden müssen. Somit besteht jedoch auch die Gefahr, dass nicht alle Stämme eines Virus mit der “real-time“-Taqman-PCR nachgewiesen werden können (HEID et al., 1996; LEUTENEGGER, 2000)

In der FeLV-Diagnostik erweist sich die PCR vor allem zur Diagnose einer latenten FeLV-Infektion als hilfreich, da es bei dieser Verlaufsform zu keiner Virusreplikation kommt. Nur die im Wirtszellgenom integrierte virale DNA ist vorhanden, aber kein freies Virus. Latent infizierte Katzen sind daher im Antigen-nachweis negativ und somit in der Routinediagnostik nicht zu erfassen (HARTMANN & HEIN, 2001). Mit der PCR wurde es möglich, im Genom von infizierten Katzen integriertes FeLV auch ohne aufwendige Reaktivierung des Virus nachzuweisen. Es waren JACKSON und Mitarbeitern (1993), denen es gelang FeLV-Provirus im Tumorgewebe von antigen-negativen Katzen nachzuweisen. Einige Jahre später wurde auch FeLV-Provirus im Genom peripherer Blutlymphozyten (PBL) entdeckt (MIYAZAWA & JARRETT, 1998). HERRING und Mitarbeitern (2001) gelang es, FeLV-Provirus im Korneagewebe, antigen-negativer Katzen nachzuweisen.

In der DNA von Katzen befinden sich verschiedene endogene Sequenzen, die teilweise mit Sequenzen des FeLV-A-Provirus übereinstimmen (SOE et al., 1983, 1985). Sie werden als „endogenes FeLV“ (enFeLV) bezeichnet. Ein Teil des exogenen, infektiösen FeLV-A-Genoms fehlt jedoch beim enFeLV (OKABE et al., 1978). Signifikante Unterschiede findet man in der U3-Region des *LTR*, die nur bei exogenem FeLV, nicht aber bei enFeLV gefunden werden kann (CASEY et al., 1981). Die Primer, die für die FeLV-PCR eingesetzt werden, sind daher meist komplementär zur bestimmten U3 Region der *LTR*-Sequenz des FeLV-A Genoms (CASEY et al., 1981; BERRY et al., 1988; McDOUGALL et al., 1994). Durch die Einführung der quantitativen “real-time“-Taqman-PCR kann, neben dem Nachweis von proviraler FeLV-DNA, auch der quantitative Provirus-Load einer FeLV-infizierten Katze gemessen werden (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Anhand der Provirus-Load Messungen wurden die unterschiedlichen Verlaufformen einer FeLV-Infektion bei experimentell oder natürlich infizierten Tieren genauer als bei Verwendung des Antigentests charakterisiert (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Der Einsatz der quantitativen “real-time“-Taqman-PCR

ist bei Impfstoffstudien, aber auch bei der Überprüfung der Wirksamkeit von antiviralen Therapien notwendig, da hier eine präzise Quantifizierung der Virusmenge erfolgen muss. Für die FeLV-Routinediagnostik steht diese Methode noch nicht zur Verfügung, da noch kein standardisiertes Protokoll vorliegt (ZENGER, 2000).

1.2. Indirekter Erregernachweis

Infizierte Katzen können gegen viele Komponenten des FeLV Antikörper bilden (ESSEX et al., 1977; STEPHENSON et al., 1977b; DeNORONHA et al., 1978; JACQUEMIN et al., 1978; LUTZ et al., 1980b). Kommt es im Laufe der Infektion zu einer Immunität, sind dafür virusneutralisierende Antikörper, vor allem gegen verschiedene Epitope des Hüllglykoprotein (gp70), verantwortlich (SCHALLER & OLSEN 1975; HARDY et al., 1976b; ESSEX et al., 1977; STEPHENSON et al., 1977b; DeNORONHA et al., 1978; RUSSEL & JARRETT 1978; GRANT et al., 1980; LUTZ et al., 1980b). Die Infektiosität des Virus wird durch Antikörper neutralisiert, die sich an die spezifischen Antigene der Virusoberfläche binden und die Virusadsorption an die Zellmembran verhindern. Einige virusneutralisierende Antikörper können an Epitope binden, die allen drei Subtypen gemeinsam sind, und daher alle drei Subtypen neutralisieren (CHARREYRE & PEDERSEN, 1991). Antikörper, die gegen Innenkörperproteine (z. B. p27, p15, p12 und p10) des FeLV gebildet werden, haben keinen virusneutralisierenden Effekt. Es gibt jedoch Hinweise, dass sie eine Lyse infizierter Zellen unter Mitbeteiligung des Komplementsystems verursachen können, indem sie sich an die FeLV-Vorläuferproteine binden, die an der Zelloberfläche exprimiert werden (GRANT & ESSEX, 1981; LUTZ, 1984). Durch die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen kann es zur Entstehung von Immunkomplexkrankheiten kommen (LOAR, 1993).

Etwa 2 % der Katzen, die eine Infektion eliminieren, besitzen keine nachweisbaren, virusneutralisierenden Antikörper, sondern bekämpfen die Infektion allein durch zelluläre Immunmechanismen (HOOVER et al., 1977a; LUTZ, 1984; CHARREYRE & PEDERSEN, 1991). Die zelluläre Immunität richtet sich gegen das Innenkörperprotein p15(E), das auf der Oberfläche von FeLV-infizierten Zellen exprimiert wird (LEDBETTER et al., 1978; SLISKI & ESSEX, 1979; LUTZ, 1984). FLYNN und Mitarbeiter (2000) zeigten, dass bei Katzen im

Anfangsstadium der Infektion das Virus, bereits vor dem Erscheinen von virusneutralisierenden Antikörpern, durch die Aktivität von FeLV-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten eliminiert werden kann.

1.2.1. Virusneutralisierende Antikörper

Der Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern kann mittels Virusneutralisationstest (SCHALLER & OLSEN, 1975) oder ELISA (LUTZ et al., 1980b) erfolgen. Diese Methoden werden hauptsächlich zu Forschungszwecken angewendet und finden in der Routinediagnostik noch keine Verwendung. Es wäre jedoch eventuell sinnvoll, vor der FeLV-Impfung einer Katze nicht nur einen Antigennachweis, sondern auch einen Nachweis von Antikörpern durchzuführen, um Auskunft über eine vorhandene Immunität zu erhalten und so gegebenenfalls auf die Impfung verzichten zu können. Ein Test zum Nachweis von Antikörpern ist jedoch noch nicht kommerziell erhältlich, da es noch keinen wissenschaftlichen Nachweis gibt, wie aussagekräftig eine Antikörperbestimmung einen Schutz gegen FeLV vorhersagen würde, welche Antikörper am besten zu testen wären und in welcher Höhe sie vorhanden sein müssten (HARTMANN et al., 2002).

1.2.1.1. Virusneutralisationstest

Mit dem Virusneutralisationstest kann, durch die Beurteilung des zytopathischen Effekts einer standardisierten, infizierten Zellkultur, nachgewiesen werden, ob eine Katze virusneutralisierende Antikörper besitzt (SARMA & LOG, 1975; SCHALLER & OLSEN, 1975). Für die Durchführung wird eine standardisierte Menge an infektiösen FeLV-Partikeln mit verschiedenen Verdünnungsreihen des Testserums versetzt. Anschließend werden Indikatorzellen (Clone-81-Katzenzellen oder QN10-Katzenfibroblasten) mit den behandelten Viruspartikeln infiziert. Der Virusneutralisationstest ist negativ, wenn bei der Untersuchung der Indikatorzellen keine oder eine reduzierte Zelltransformation sichtbar ist. SCHALLER und OLSEN entwickelten 1975 einen Virusneutralisationstest, mit dem es möglich wurde, anhand von neutralisierenden Antikörpern zwischen den drei bekannten Subgruppen (A, B und C) des feline Leukämievirus zu unterscheiden. In der FeLV-Routinediagnostik findet der Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern keine Verwendung, da kein standardisierter

Test vorhanden ist. Der Virusneutralisationstest wird heutzutage hauptsächlich zur Impfstofftestung eingesetzt (WEIJER et al., 1993).

1.2.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Durch die Kombination einer Gelelektrophorese mit einem anschließenden ELISA (GEDELISA - gel electrophoresis-derived enzyme-linked immunosorbent assay) gelang es LUTZ und Mitarbeitern 1980 eine qualitative und quantitative Bestimmung verschiedener Antikörper gegen FeLV vorzunehmen. Bei dieser Methode wird zunächst mit Hilfe der Gelelektrophorese gereinigtes FeLV in seine Proteinfractionen aufgetrennt und anschließend in einzelne Mikroplattenvertiefungen des ELISA-Systems pipettiert. Mit der zu untersuchenden Serumprobe wird anschließend ein ELISA durchgeführt. Mit den Absorptionswerten, die für die einzelnen Proteinfractionen im ELISA gemessen werden, kann nun die quantitative Berechnung der verschiedenen FeLV-Antikörper vorgenommen werden. Den Testergebnissen zu Folge produzieren natürlich infizierte Katzen, die das Virus innerhalb der ersten beiden Wochen erfolgreich eliminieren, gegen alle viralen Komponenten Antikörper (LUTZ et al., 1980b).

Da nur Antikörper gegen Hüllproteine (gp70) virusneutralisierende Eigenschaften besitzen, entwickelten WEIJER und Mitarbeiter (1993) einen ELISA, dessen Vertiefungen entweder mit vollständigem FeLV, mit FeLV-gp70-Protein oder mit gp70-Untereinheiten beschichtet waren. Sie entdeckten auf diese Weise, dass nur bestimmte Epitope des gp70 die Produktion neutralisierender Antikörper anregen (WEIJER et al., 1993).

1.2.2. Anti-FOCMA-Antikörper

ESSEX und Mitarbeiter (1971a) vermuteten, dass eine Resistenz gegen die Entwicklung maligner Tumoren, die durch das feline Sarkomvirus (FeSV) und FeLV induziert werden, mit dem Auftreten von Antikörpern korreliert. Diese Antikörper, so vermuteten die Autoren, sind gegen virusassoziierte Zelloberflächenantigene (feline oncornavirus cell membran-associated antigen, **FOCMA**) gerichtet (ESSEX et al., 1971a).

Ursprünglich nahm man an, das FOCMA ein zelluläres Antigen sei, das bei einer Transformation in eine Tumorzelle demaskiert wird (ESSEX et al., 1977;

SNYDER et al., 1983). Man dachte, dass hohe anti-FOCMA-Antikörperkonzentrationen eine tumorprotektive Wirkung besitzen (ESSEX et al., 1975a; HARDY et al., 1976a; GRANT et al., 1980; SWENSON et al., 1990). Dann wurde diskutiert, dass FOCMA ein virales Antigen sei, das von FeLV-C kodiert wird. Man fand aber, dass zwar eine große Ähnlichkeit, aber keine vollständige Identität zwischen FOCMA und FeLV-C-gp70 besteht (SNYDER et al., 1983).

Es ist nicht eindeutig geklärt, wieso FOCMA-Antikörper im Zusammenhang mit einer FeLV-Infektion auftreten können (HARDY, 1980b; SNYDER et al., 1983; VEDBRAT et al., 1983). FOCMA-Antikörper kommen unter anderem bei persistierend virämischen Katzen vor (ESSEX et al., 1975b; HARDY et al., 1976b). Die heutigen Meinungen über die Identität und Bedeutung von FOCMA sind sehr widersprüchlich. So hält LUTZ (persönliche Meinung) FOCMA für eine uneinheitliche Gruppe viraler Antigene, die sich bei FeLV-infizierten Katzen auf den Zelloberflächen befinden können (aber nicht immer vorhanden sind), damit nur eine FeLV-Exposition anzeigen und keinerlei weitere Bedeutung haben. Dagegen ist für JARRETT (persönliche Meinung) eine gewisse Schutzwirkung gegen die Ausbildung von Tumoren durch die anti-FOCMA-Antikörper weiter in Betracht zu ziehen.

FOCMA-Antikörper wurden früher mit einem indirekten Membranfluoreszenztest gemessen (ESSEX et al., 1971a, b; ESSEX & SNYDER, 1973). Heute wird ein IFT durchgeführt, bei dem FL74-Zellen (feline Lymphomzellen) auf einem Objektträger fixiert werden. Diese werden mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Testserums überschichtet. Sind im Serum FOCMA-Antikörper enthalten, so binden sich diese an die Oberflächenmembran von FL74-Zellen und werden durch die Zugabe von Fluoreszein-markierten-Antikörpern gegen Katzen IgG markiert (ESSEX et al., 1971a,b; ESSEX & SNYDER, 1973; ESSEX, 1974, 1975).

2. Feline Immunschwächevirusinfektion

Das feline erworbene Immunschwächesyndrom ("feline acquired immunodeficiency syndrome", F-AIDS) wird durch eine Infektion mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) hervorgerufen (PEDERSEN et al., 1987; YAMAMOTO et al., 1988a, 1988b, 1989). FIV verursacht bei Katzen eine chronisch persistierende Infektion, die durch eine progressive Immunschwäche,

neurologische Veränderungen und opportunistische Infektionen charakterisiert ist (BENDINELLI et al., 1995). Das Gen des felines Immunschwächevirus besteht aus 9,000 bis 10,000 Basenpaaren und wird von beiden Seiten durch sogenannte „Long Terminal Repeats“ (*LTR*) begrenzt (ELDER & PHILLIPS, 1995). Zwischen diesen *LTR* liegen die drei Strukturgene *gag*, *pol* und *env*, die die genetischen Informationen enthalten. Die Proteine, die durch die drei Strukturgene kodiert werden, werden zunächst als große Vorläuferproteine synthetisiert, die durch die virale Protease gespalten werden (OLMSTED et al., 1989; TALBOTT et al., 1989; MIYAZAWA et al., 1991; MAKI et al., 1992). Das ***gag*-Gen** kodiert für die Strukturproteine. Zunächst wird das Vorläuferprotein p55 synthetisiert, das sich in das Kapsidprotein (CA) p24, das Matrixprotein (MA) p15 und das Nukleokapsidprotein (NC) p10 aufspaltet (EGBERINK et al., 1990; STEINMANN et al., 1990; SUMMERS et al., 1992; ELDER et al., 1993). Die Enzyme Protease (PR), RT und Integrase (IN) werden durch das ***pol*-Gen** kodiert (SPARGER et al., 1989; TALBOTT et al., 1989). Das ***env*-Gen** ist für die Bildung der beiden glykosilierten Hüllproteine, das Oberflächenantigen (SU) gp120 und das Transmembranprotein (TM) gp40, verantwortlich (EGBERINK et al., 1990; VERSCHOOR et al., 1993b). Variationen in der *env*-Gensequenz bilden die Grundlage für die Einteilung von FIV in die Subtypen A, B, C, D und E (GREENE et al., 1993; RIGBY et al., 1993).

Die Diagnose einer FIV-Infektion kann nicht anhand von klinischen Symptomen erfolgen (HOSIE et al., 1989; HARTMANN, 1996), sondern beruht entweder auf einem direkten Erregernachweis oder auf dem Nachweis von spezifischen, gegen das FIV gerichteten Antikörpern. Da es sich um eine lebenslang persistierende Infektion handelt, die fast immer mit einer hohen Antikörperkonzentration einhergeht, besitzt der einfachere Antikörpernachweis eine größere Bedeutung in der Routinediagnostik der FIV-Infektion als der direkte Erregernachweis (JARRETT et al., 1991). Der Antikörpernachweis erfolgt hauptsächlich mit einfach durchzuführenden ELISA-Systemen (REID et al., 1992) oder mit Immunochromatographie-Schnelltests. Eine Aufstellung aller seit 1988 verfügbaren FIV-Testsystemen ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Diagnostische FIV-Testsysteme seit 1988

(B: Vollblut; P: Plasma; S: Serum; fett: in Deutschland zur Zeit kommerziell erhältlich)

Handelsname	Lizenz	zugelassen	Nachweis	verwendbar mit
PetChek	IDEXX	1988	FIV	P, S
CITE	IDEXX	1988	FIV	B, P, S
CITE	IDEXX	1989	FeLV FIV	B, P, S
Probe COMBO	IDEXX	1992	FeLV FIV	B, P, S
PetChek	IDEXX	1992	FIV	P, S
Snap COMBO	IDEXX	1994	FeLV FIV	B, P, S
Snap COMBO Plus	IDEXX	1998	FeLV FIV	B, P, S
PetChek Plus Anti-FIV	IDEXX	1998	FIV	P, S
DUO Speed	Bio Veto Test (BVT)	1995	FeLV FIV	B, P, S
Speed FIV	Bio Veto Test (BVT)	1995	FIV	B, P, S
FASTest FIV	MegaCor	1996	FIV	B, P, S
Witness	Synbiotics	1995	FIV	B, P, S
Witness	Synbiotics	1995	FeLV FIV	B, P, S
Virachek	Synbiotics	1992	FIV	B, P, S
OnSite	Biotech/NVI	1999	FIV	B, P, S
Mapic	Sinovus Biotech Inc.	2000	FIV	B, P, S
Rapid	Sinovus Biotech Inc.	2001	FIV	B, P, S
Rapid Combo	Sinovus Biotech Inc.	2001	FIV FeLV	B, P, S
One-Step	European Veterinary Laboratory (EVL)	1998	FIV	B, P, S
VetRED FIV	AGEN Biomedical Ltd.	1995	FIV	B, P

2.1. Direkter Erregernachweis

Der direkte Erregernachweis kann durch Virusisolierung oder mittels PCR erfolgen und wird in Zukunft mit Einführung der ersten Impfstoffe gegen FIV noch an Bedeutung gewinnen, da nur ein direkter Erregernachweis eine immunisierte Katze von einer infizierten unterscheiden kann (LUTZ, 1999).

2.1.1. Virusisolierung

Das feline Immunschwächevirus persistiert lebenslang im Körper eines infizierten Tieres und kann mit Hilfe der Virusisolierung in peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen werden (HOPPER et al., 1989; ISHIDA et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989). Die Isolierung gelingt in der frühen oder terminalen Phase einer FIV-Infektion einfacher als im asymptomatischen Stadium, da hier die Viruskonzentration im Blut durch die niedrige Replikationsrate geringer ist (HAASE, 1986; NARAYAN & CLEMENTS, 1989; PEDERSEN et al., 1989; SPARGER, 1993). Auch bei einigen FIV-Antikörper-negativen Katzen wurde Virus isoliert (HARBOUR et al., 1988; HOPPER et al., 1989; LUTZ et al., 1990; UELAND & NESSE, 1991; DANDEKAR et al., 1992).

Für den Virusnachweis in der Zellkultur werden periphere Blutlymphozyten mit Lymphozyten einer gesunden Katze kokultiviert. Ist Virus vorhanden, kann es *in vitro* zu einem zytopathischen Effekt in den Zellen und zum anschließenden Zelltod kommen (MACY, 1994). Bei den meisten FIV-Stämmen wird jedoch kein zytopathischer Effekt in den Zellen erzeugt. Das Vorhandensein von FIV im Zellkulturüberstand kann in diesem Fall durch Messung der RT-Aktivität (PEDERSEN et al., 1987), durch Nachweis von p24-Antigen im ELISA (TILTON et al., 1990), durch intrazellulären Nachweis von p24 im Immunofluoreszenztest, durch Nachweis von Viruspartikeln im Elektronenmikroskop oder durch PCR nachgewiesen werden (TORTEN et al., 1991; HOHDATSU et al., 1992; RIMSTAD & UELAND, 1992; MOMOI et al., 1993; VAHLENKAMP, 1993).

Die Messung der RT-Aktivität war früher die übliche Methode, um eine Vermehrung von Retroviren in der Zellkultur nachzuweisen (PEDERSEN et al., 1987). Das Prinzip basiert auf dem Einbau einer radioaktiv markierten Nukleinsäure in die von der RT hergestellte Nukleotidkette, unter zusätzlicher Verwendung von Magnesiumionen und Oligonukleotid-Primern. Mit einem Szintillationszähler wird im Reaktionsgemisch die Radioaktivität gemessen. Diese ist direkt proportional zur RT-Aktivität und somit zur Virusvermehrung. In den letzten Jahren wurden alternative Methoden zur RT-Aktivitätsmessung ohne die Verwendung von radioaktiven Isotopen entwickelt (PORSTMANN et al., 1991; URABE et al., 1992; SUZUKI et al., 1993). SUZUKI und Mitarbeiter (1993) entwickelten für die HIV-Diagnostik einen "poly-a-linked colorimetric reverse transcriptase assay" (PAC-RTA), der sensitiver als die konventionelle Methode ist

und keine radioaktiven Isotope benötigt. Seit 1997 wird diese neue Methode auch in der FIV-Diagnostik angewendet (SAITO et al., 1997). Der qualitative und quantitative Nachweis des p24-Antigen von FIV kann im Zellkulturüberstand mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope des p24 im ELISA erfolgen (TILTON et al., 1990; FEVEREIRO et al., 1991; LOMBARDI et al., 1993). In einer von SIEBELINK und Mitarbeitern (1990) durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass der Antigen-ELISA eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität besitzt wie die Methode zur Messung der RT-Aktivität. Bereits vier Tage nach Infektion einer Zellkultur wurde p24-Antigen mit dem ELISA nachgewiesen (SIEBELINK et al., 1990).

2.1.2. Nachweis des Genoms

Die PCR ist eine sehr sensitive und spezifische Methode, die seit ihrem Einsatz in der FIV-Diagnostik zunehmend an Bedeutung gewinnt (TORTEN et al., 1991; HOHDATSU et al., 1992; RIMSTAD & UELAND, 1992; MOMOI et al., 1993; VAHLENKAMP, 1993). So kann bei FIV-infizierten Katzen, bei denen aufgrund einer massiven Immunsuppression, z. B. bei Koinfektionen mit FeLV, keine Antikörper nachweisbar sind, die PCR zum Nachweis der Infektion eingesetzt werden. Von besonderer Bedeutung wird die PCR für die FIV-Diagnostik nach Einführung der neuen Impfstoffe gegen FIV werden, da die Immunisierung der Katze mit Vollvirusvakzinen zur Bildung von Antikörpern gegen sämtliche Virusproteine führt. Eine geimpfte Katze kann so nicht von einer Katze mit natürlicher FIV-Infektion unterschieden werden. Eine Unterscheidung kann nur durch den direkten Erregernachweis erfolgen (LUTZ, 1999). Die FIV-PCR kommt auch in der Forschung in zunehmenden Maße zum Einsatz (BENDINELLI et al., 1993; BACHMANN et al., 1997). Hier ist vor allem die quantitative PCR zur Beurteilung der Effektivität von neuen Medikamenten oder Impfstoffen von Bedeutung (LEUTENEGGER et al., 1999, 2000).

Die PCR hat sich als eine nützliche Methode erwiesen, um provirale DNA in peripheren Blutlymphozyten und in Knochenmarkszellen nachzuweisen (DANDEKAR et al., 1992; HOHDATSU et al., 1992; MAKI et al., 1992). Die Methode wurde in den letzten Jahren kontinuierlich modifiziert und verbessert. Zunächst wurde eine einfache PCR (single PCR) verwendet (TORTEN et al., 1990; HOHDATSU et al., 1992). Durch die Verwendung eines zweiten

Primerpaares, das innerhalb des ersten Amplifikates ansetzt (“nested“-PCR), wurde die Sensitivität der Methode noch gesteigert (RIMSTAD & UELAND, 1992; MOMOI et al., 1993). Die erste Quantifizierung von proviraler FIV-DNA wurde durch die Entwicklung einer kompetitiven PCR ermöglicht (PISTELLO et al., 1994; DIEHL et al., 1995; VAHLENKAMP et al., 1995; ALLENSPACH et al., 1996; CAMMAROTA et al., 1996; TOMONAGA & MIKAMI, 1996). Bei dieser Methode wurde der zu quantifizierende Abschnitt des FIV-Genoms zusammen mit einem sogenannten Kompetitor in einem PCR-Röhrchen amplifiziert. Beim Kompetitor handelte es sich um ein DNA-Stück, das dem zu quantifizierenden Abschnitt entsprach, jedoch *in vitro* etwas verkürzt wurde. Durch Änderung des Verhältnisses der Menge der aus Katzenlymphozyten gewonnenen DNA zum Kompetitor kommt es zu unterschiedlicher Amplifizierung der beiden Sequenzen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die beiden Banden anhand ihrer unterschiedlichen Größe erkannt. Durch eine densitometrische Analyse der Bandenintensität wurde die ursprünglich in der genomischen DNA vorhandene Menge der FIV-DNA berechnet. Die kompetitive PCR bestand aus vielen, einzelnen Reaktionsschritten, die zum einen sehr arbeits- und kostenintensiv waren und zum anderen eine hohe Gefahr der Kontamination und Ungenauigkeit mit sich brachten (CLEMENTI et al., 1993). Viele dieser Nachteile konnten durch die Einführung der quantitativen “real-time“ Taqman-PCR beseitigt werden (LEUTENEGGER et al., 1999). Zwei verschiedene Taqman-Sonden wurden für die Entdeckung von FIV-Provirus im DNA-Genom von peripheren Lymphozyten und infiziertem Gewebe entwickelt. Mit diesen Sonden ist es möglich, Stücke des FIV-*gag*-Gens in den FIV-Subtypen A und B zu erkennen und zu quantifizieren. Andere Subtypen werden jedoch aufgrund von Unterschieden in der Gensequenz, die von den Taqman-Sonden nicht erkannt werden, unentdeckt bleiben und somit zu falschnegativen Ergebnissen führen (LEUTENEGGER et al., 1999).

Der Nachweis und die Quantifizierung des freien Virus (Virusload) kann mit Hilfe der “real-time RT-PCR“ erfasst werden. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation eines bereits für die Humanmedizin verfügbaren Systems (MILLER & STORTS, 1995), das die RNA-Extraktion mit anschließender Transkription und Amplifikation in einer Reaktion verbindet (BISSET et al., 2001). Obwohl die Durchführung der RT-PCR im Laufe der Jahre vereinfacht wurde, bleibt sie doch

Speziallabors vorbehalten und spielt für die FIV-Routinediagnostik nur eine geringe Rolle. Die RT-PCR findet ihren Einsatz vor allem in Impf- und Therapiestudien (VAHLENKAMP et al., 1997; KLEIN et al., 1998).

2.2. Indirekter Erregernachweis

Bei 95 % der Katzen, die mit dem feline Immunschwächevirus infiziert sind, kommt es nach zwei bis vier Wochen zur Antikörperbildung (YAMAMOTO et al., 1988a). Zuerst kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen das Oberflächenantigen gp120 und das Innenkörperprotein p24 (YAMAMOTO et al., 1988a; O'CONNOR et al., 1989; HOSIE & JARRETT, 1990). Antikörper gegen das Transmembranprotein gp40 können nach vier bis acht Wochen im Serum nachgewiesen werden (O'CONNOR et al., 1989). In einigen Fällen ist der Antikörpernachweis zur Diagnose einer Infektion nicht aussagekräftig, da manche Katzen erst später im Infektionsverlauf Antikörper bilden oder im Endstadium, aufgrund des Zusammenbruchs des Immunsystems, nur noch geringe Mengen an Antikörpern besitzen (PEDERSEN et al., 1989). Werden Katzen im Alter von unter sechs Monaten getestet, kann es aufgrund von maternalen Antikörpern zu positiven Ergebnissen kommen, ohne dass die Welpen infiziert sind. Die von infizierten Katzenmüttern auf die Welpen übertragenden Antikörper können bis zu sechs Monaten bestehen bleiben (O'NEIL et al., 1995).

Als Nachweismethoden stehen verschiedene Tests wie der IFT unter Verwendung FIV-infizierter Lymphozyten, der ELISA, der Western Blot und der Radioimmunpräzipitationstest (RIPA) zur Verfügung (LUTZ et al., 1988a; YAMAMOTO et al., 1988a; O'CONNOR et al., 1989; HOSIE & JARRETT, 1990; BARR et al., 1991; REID et al., 1992). Der RIPA und der Western Blot werden in der FIV-Diagnostik als Bestätigungstests verwendet (YAMAMOTO et al., 1988; HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1991). Letzterer gilt als anerkannter „Goldstandard“ (EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMANN, 1991b).

Für die Routinediagnostik wird heutzutage der einfach durchzuführende ELISA (REID et al., 1992) oder auf einem ähnlichen Prinzip basierende Immuno-chromatographie-Tests herangezogen. Letztere sind als „Schnelltests“ kommerziell erhältlich und finden weiten Einsatz in der tierärztlichen Praxis (HARTMANN et al., 2001).

2.2.1. Radioimmunpräzipitationstest

Im Radioimmunpräzipitationstest (RIPA) werden Antikörper gegen FIV mittels nichtgereinigten, nichtdenaturierten, radioaktiv markierten FIV-Proteinen aus Zelllysaten nachgewiesen. Durch dieses Verfahren bleiben im Gegensatz zum Western Blot konformationsbedingte und fragile Epitope erhalten, die Antikörper gegen glykosilierte Hüllproteine (z. B. gp120, gp40) nachweisen können (O'CONNOR et al., 1989; EGBERINK et al., 1991).

Die verwendete Zellkultur besteht aus FIV-infizierten Lymphozyten und Thrombozyten, die zunächst mit einem methioninarmen Nährmedium versehen werden. Anschließend erfolgt die radioaktive Markierung mit L-[³⁵S]-Methionin und [³H]-Glykosaminhydrochlorid. Die lysierten und radioaktiv markierten Zellen werden mit dem zu testenden Serum für ca. zwölf Stunden inkubiert. Anschließend werden die entstandenen Immunkomplexe mit Hilfe von Proteinen aus formalinfixierten *Staphylococcus-aureus*-Zellen präzipitiert, die die Eigenschaft besitzen, sich an den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden. Durch Waschen und Resuspendieren werden die Präzipitate gereinigt und die einzelnen Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Page-Gel (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) mit Hilfe der Fluorographie analysiert (O'CONNOR et al., 1989; EGBERINK et al., 1991). Hierbei wird in einer Filmkassette das Gel auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Durch die Beta-Strahlung des L-[³⁵S]-Methionin, das an den Immunkomplexen gebunden ist, kommt es zur Entstehung von Banden, die nach Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilms sichtbar werden. Die Lage und Anzahl von Banden zeigt an, gegen welche FIV-Proteine die untersuchte Katze Antikörper besitzt (STEINMAN et al., 1990).

2.2.2. Western Blot

Beim Western Blot handelt sich um ein Verfahren, das von TOWBIN und Mitarbeitern (1979) zum erstenmal beschrieben wurde und das in der HIV-Diagnostik bereits seit 1986 routinemäßig eingesetzt wird (SCHÜPBACH et al., 1986). Das Prinzip beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel und anschließendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (TOWBIN et al., 1979). Diese Membran enthält nach ihrem Molekular-

gewicht aufgetrennte Proteine, die immunogen sind und spezifische, im Testserum enthaltene Antikörper binden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Inkubation mit anti-Spezies-Konjugat (Ziegen-IgG-anti-Katze-IgG) und nachfolgendem Zufügen von Substrat (4-Chloro-1-Naphtol-Lösung) in Form von violett-schwarzen Banden sichtbar gemacht. Die Lage und Anzahl der erkennbaren Banden zeigt an, gegen welche FIV-Proteine die untersuchte Katze Antikörper besitzt. Obwohl der Western Blot dem ELISA in seiner Sensitivität und Spezifität überlegen ist (KAWAGUCHI et al., 1990; EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMANN, 1991b), wird er aufgrund der arbeits- und kostenintensiven Durchführung hauptsächlich als Bestätigungstest verwendet (YAMAMOTO et al., 1988a; HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1992).

Zum Nachweis von anti-FIV-Antikörpern werden gereinigte, denaturierte Proteine des FIV verwendet, die aus Zellkulturüberständen gewonnen werden. Durch die Aufreinigung werden die Hüllproteine zerstört und können anschließend nicht vollständig auf die Nitrozellulose übertragen werden (PEDERSEN, 1990a; EGBERINK et al., 1991). Antikörper gegen höhermolekulare Hüllproteine (gp95, gp120, gp135) können somit meist nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Dies führt bei infizierten Katzen, die keine Antikörper gegen Innenkörperproteine aufbauen, zu falschnegativen Ergebnissen (BARR et al., 1991). Werden statt der Zellkulturüberstände Lysate aus FIV-infizierten Zellen als Antigen verwendet, wird eine bessere Übertragung der Hüllproteine erreicht (HOSIE & JARRETT, 1990; EGBERINK et al., 1991).

Für die Interpretation der Western-Blot-Streifen gibt es in der Literatur keine einheitliche Angabe. Als minimale Anforderung für ein positives Ergebnis empfehlen HOSIE und JARRETT (1990) entweder das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hüllprotein gp120 oder Antikörper gegen mindestens drei Innenkörperproteine (p24, p55 und p17). Andere Autoren (BARR et al., 1991; REID et al., 1992) hingegen gehen davon aus, dass das Erscheinen von zwei oder mehreren virusspezifischen Banden für ein positives Ergebnis ausreichend ist.

Mit dem herkömmlichen Western Blot ist es nicht möglich, eine quantitative Aussage über die nachgewiesenen FIV-Antikörper zu machen. CALANDRELLA und Mitarbeiter (2001) entwickelten eine kombinierte Methodik, in dem der Western Blot mit einem computergesteuerten Densitometer verbunden ist. Durch

eine densitometrische Analyse der Bandenintensität kann die Menge der Antikörper, die gegen einzelne Innenkörper- oder Hüllproteine des FIV gebildet werden, geschätzt werden. Diese Methodik kann in Impf- und Therapiestudien ein wichtiges Hilfsmittel sein (CALANDRELLA et al., 2001).

2.2.3. Immunofluoreszenztest

Der IFT besitzt wie der RIPA und der Western Blot eine hohe Spezifität zur Diagnose von FIV-Infektionen (Lutz et al., 1988b; HOSIE & JARRETT, 1990; BARR et al., 1991; EGBERINK et al., 1991; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c; REID et al. 1992; HARTMANN et al., 2001). In einer von REID und Mitarbeitern (1992) durchgeführten Studie wurde für den IFT im Vergleich mit einem ELISA eine Sensitivität von 97,4 % und eine Spezifität von 100 % angegeben.

Der Nachweis von anti-FIV-Antikörpern erfolgt entweder mit infizierten T-Lymphozyten oder mit infizierten CrFK-Zellen, die in den Vertiefungen von Spezialobjektträgern fixiert sind. Diese werden mit Test- und Kontrollseren inkubiert. Anschließend werden Fluoreszein-Isocyanat-konjugierte-anti-Spezies-Antikörper hinzugefügt, die sich an die Antikörper, die an intrazellulären FIV-Antigenen haften, binden. Nach einigen Waschschritten bleiben nur noch die fluoreszeinmarkierten Antikörper übrig, die über anti-FIV-Antikörper am intrazellulären FIV-Antigen haften. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops können Antikörper-positive Seren anhand der leuchtenden zytoplasmatischen Färbung erkannt werden. Bei bis zu 10 % der Katzenserum kann es zu unspezifischen Reaktionen kommen, die positive Ergebnisse vortäuschen (BARR et al., 1991; REID et al., 1992). Diese Reaktionen werden durch zerstörte Zellen oder durch das Anfärben von Zellkernen ausgelöst (REID et al., 1992). Der IFT wird nicht zur Routinediagnostik einer FIV-Infektion angewendet, da seine Durchführung sehr arbeitsintensiv und die Interpretation der Ergebnisse geschultem Personal vorbehalten ist (BARR, 1993, 1996; HARTMANN et al., 2001).

2.2.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die ersten kommerziellen Testsysteme zum Nachweis einer FIV-Infektion wurden 1988 von der Firma IDEXX (Portland, Maine, USA) entwickelt. Es handelte sich

hierbei um den PetChek[®] und den CITE[®] Combo, die beide auf dem Prinzip des ELISA beruhten und mit Hilfe von hoch gereinigten FIV-Antigenen Antikörper gegen FIV nachwiesen (O'CONNOR et al., 1989). Der CITE[®] Combo war der erste Kombinationstest der Firma IDEXX, der auch zum Nachweis des p27-Antigens des feline Leukämievirus eingesetzt werden konnte. Dieser Test besitzt zusätzlich noch einen Filter, der nicht lösliches Material aus dem Plasma bindet (HOSIE & JARRETT, 1990). Da IDEXX für lange Zeit ein Monopol für die Herstellung von FIV-ELISA-Testsystemen nicht nur in USA, sondern auch in Europa besaß, wurden anfangs ausschließlich der PetChek[®] und der CITE[®] Combo in Deutschland zum Nachweis von p24-Antikörpern eingesetzt und von HARTMANN und LUTZ bereits 1989 für epidemiologische Studien in Deutschland genutzt. Es stellte sich jedoch in einer Reihe von Untersuchungen heraus, dass eine große Anzahl sowohl von falschpositiven als auch falschnegativen Ergebnissen auftraten, und dieser ELISA im Vergleich zu anderen Testverfahren (z. B. Immunofluoreszenztest und Western Blot) eine geringere Sensitivität und Spezifität besaß (HOSIE & JARRETT, 1990; PEDERSEN & BARLOUGH, 1991; REID et al., 1991; BARR et al., 1993; HARTMANN et al., 1994). Der Grund für das häufige Auftreten von falschpositiven Ergebnissen und der damit verbundenen niedrigen Spezifität, wurde zum Teil dadurch erklärt, dass die ELISA auf der Basis von in Zellkulturen produzierten FIV-Antigenen hergestellt wurden. Diese mittels Dichtegradient gereinigten Viren wurden oft kontaminiert mit Bestandteilen der Zellkultur (z. B. CrFK-Zellen), in der das Virus gezüchtet wurde, oder mit Komponenten des fetalen Kälberserums, das für ein optimales Wachstum der Zellen zugesetzt wurde (PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Viele Katzenimpfstoffe wurden auch auf CrFK-Zellen oder anderen Zelllinien hergestellt, die fetales Kälberserum benötigen. Geimpfte Katzen können Antikörper gegen dieses, in Impfstoffen enthaltene Kälberserum bilden, welche dann mit dem schlecht gereinigten Antigen in den FIV-ELISA-Platten einen Antigen-Antikörperkomplex bilden (CALZOLARI et al., 1995). Mangelhafte Handhabung der Testsysteme waren weitere Gründe für die Entstehung von falschpositiven Ergebnissen. Die häufigsten Fehlerquellen sind ungenügendes oder falsches Waschen, Nichteinhalten vorgegebener Reaktionszeiten, ungenaues Pipetieren von Reagenzien und Seren sowie die Verwendung zu kalter Substanzen (HARTMANN et al., 1994). In einer von HOLZNAGEL und Mitarbeitern (1997) durchgeführten Studie zeigte sich, dass bei der Verwendung von Vollblut oder

hämolytischem Serum das Risiko eines falschpositiven Resultates steigt, da durch Hämolyse der Erythrozyten Hämoglobin freigesetzt wird, dessen Häm-Anteil eine Pseudoperoxidase-Wirkung besitzt und damit eine positive Reaktion vortäuschen kann.

Falschnegative Resultate kommen zustande, weil einige FIV-infizierte Katzen keine p24-Antikörper, sondern nur Antikörper gegen die Hüllproteine bilden. Testsysteme, die nur auf einem p24-Antikörpernachweis beruhen, können die *env*-spezifischen Antikörper nicht erkennen und liefern ein negatives Ergebnis (EGBERINK et al., 1992; FURUYA et al., 1992; AVRAMEAS et al., 1993; VERSHOOR et al., 1993a). Es ist ebenfalls möglich, dass die Konzentration *gag*-spezifischer Antikörper bei FIV-infizierten Katzen, die sich im Endstadium der Infektion befinden, unter die Nachweisgrenze der Testsysteme fällt und somit eine FIV-Infektion nicht erkannt wird (HOPPER et al., 1989).

Aufgrund der hohen Anzahl von falschen Resultaten wurden in den letzten Jahren spezifischere und sensitivere ELISA entwickelt. Die Firma IDEXX (Portland, Maine, USA), die in den USA nach wie vor das Monopol für die Herstellung von FIV-ELISA-Testsystemen besitzt, brachte 1992 einen verbesserten PetChek[®] FIV auf den Markt, dessen Mikrovertiefungen nur noch mit rekombinanten p24-Antigen beschichtet sind (MERMER et al., 1992). Durch die Verwendung von rekombinanten Antigenen wurde die Spezifität deutlich erhöht. In nachfolgenden Studien wiesen die Ergebnisse des ELISA mit den Ergebnissen des IFT und des Western Blots eine bessere Übereinstimmung auf (REID et al., 1991; FURUYA et al., 1992). In einer 1999 durchgeführten Studie konnte für den PetChek[®] FIV (IDEXX, Portland, Maine) im Vergleich zu anderen ELISA-Systemen eine Spezifität von 97,7 % und eine Sensitivität von 100 % errechnet werden. Der auch auf dem Prinzip des ELISA beruhende Snap[®] FIV (IDEXX, Portland, Maine) wies in einer von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie eine Spezifität von 98,6 % und eine Sensitivität von 86,1 % auf.

REID und Mitarbeiter (1991) entwickelten einen ELISA, der neben rekombinanten p24- auch p17-Antigen enthält. Ein solcher ELISA mit rekombinanten, in *Escherichia coli* exprimierten *gag*-Proteinen, übertraf den herkömmlichen, nur gegen das p24 gerichteten ELISA in Spezifität und Sensitivität (REID et al., 1991).

Für den Nachweis einer FIV-Infektion sind neben den *gag*-spezifischen Antikörpern auch Antikörper gegen die Hüllproteine, v. a. gegen das Transmembranprotein gp40, von Bedeutung, da einige Katzen keine p24-Antikörper, sondern nur Antikörper gegen Hüllproteine bilden (EGBERINK et al., 1992; FURUYA et al., 1992). Das Transmembranprotein weist an der Spitze ein immundominantes Epitop auf, das bei Lentiviren eine hohe diagnostische Aussagekraft besitzt. Bei FIV-infizierten Tieren werden spezifische Antikörper gegen die Peptide des TM aufgebaut, die über Monate bis Jahre bestehen bleiben können (YAMAMOTO et al., 1988a; O'CONNOR et al., 1989; HOSIE & JARRETT, 1990; FONTENOT et al., 1992). Diese Antikörper können im Gegensatz zu *gag*-spezifischen Antikörpern häufiger auch noch im Endstadium einer FIV-Infektion gemessen werden (RIMMELZWAAN et al., 1994). In einer von CALZOLARI und Mitarbeitern (1995) durchgeführten Studie wurden drei ELISA mit jeweils einem unterschiedlichen, rekombinanten Antigen des FIV (TM, SU und CA) beschichtet und getestet. Der mit dem Transmembranprotein beschichtete ELISA hatte im Vergleich zu den anderen beiden ELISA die höchste diagnostische Sensitivität (98 %) und Spezifität (97 %) (CALZOLARI et al., 1995). Es wurden einzelne Peptide (P237 und P253) des TM synthetisch hergestellt und im ELISA zum Nachweis von FIV-Antikörpern verwendet (AVRAMEAS et al., 1993; VERSCHOOR et al., 1993b).

2.2.5. Hämagglutinationstest

In Anlehnung an die HIV-Diagnostik wurde ein weiteres diagnostisches Verfahren zum Nachweis von FIV-Antikörpern von WILSON und Mitarbeitern (1994) entwickelt. Es handelt sich hierbei um einen autologen Hämagglutinationstest, der FIV-Antikörper gegen das Transmembranprotein gp40 nachweist. Der Hämagglutinationstest enthält Antikörper gegen feline Erythrozyten, die mit einem der immundominanten Stelle des gp40 entsprechenden synthetischen Peptid konjugiert werden. Sind im zu testenden Vollblut anti-gp40-Antikörper vorhanden, so kommt es zu einer sichtbaren Agglutination. Wird der Test mit Plasma durchgeführt, müssen dem Plasma Erythrozyten von einer FIV-Antikörper-negativen Katze mit passender Blutgruppe zugefügt werden (WILSON et al., 1994). Nicht spezifische Agglutinationen können ein falschpositives Resultat vortäuschen. Sie treten auf, wenn die Zeit zwischen der Probenentnahme

und der Durchführung des Tests zu lang ist (DeLFIERRO et al., 1995). Ein kommerziell erhältlicher Hämagglutinationstest ist der VetRED FIV[®], der von der Firma AGEN Biomedical Ltd. (Queensland, Australien) hergestellt wird. In einer Vergleichsstudie zwischen dem VetRED FIV[®] und dem ELISA PetChek[®] FIV (IDEXX, Portland, Maine, USA) wurde eine annähernd gleiche Sensitivität und Spezifität festgestellt (DeLFIERRO et al., 1995).

2.2.6. Immunochromatographie-Schnelltests

Die Immunochromatographie-Schnelltests basieren auf einem ELISA-ähnlichen Prinzip und können in der Praxis schnell und einfach durchgeführt werden (MALLIN et al., 1990; UCHIO et al., 1997). Eine Reihe von neuen FIV-Schnelltests, die in den letzten Jahren für die Routinediagnostik konzipiert wurden, beruhen auf einem immunochromatographischen „Sandwich“-Prinzip. Bei den meisten Testsystemen wird ein synthetisches Peptid verwendet, das dem immundominanten Epitop des TM-Proteins entspricht und dadurch Antikörper gegen das gp40-Protein anzeigen kann. Sind Antikörper gegen das FIV in der Probe vorhanden, so bildet sich ein spezifischer Antigen-Antikörper-Komplex, der auf der Membran weiterwandert und von einem membranfixierten Antikörper im Ergebnisfenster abgefangen wird. Sichtbar werden die auf einer Bande fixierten Antigen-Antikörper-Komplexe entweder durch eine Enzymwirkung oder durch eine Akkumulation von Gold- oder Latexpartikeln. Freies, nicht gebundenes Peptid wandert weiter, wird in der Kontrollzone abgefangen und sichtbar (Gebrauchsinformation FASTest[®] FIV, MegaCor, Österreich).

HARTMANN und Mitarbeiter (2001) verglichen sechs verschiedene Schnelltest-Systeme (Snap[®], IDEXX, USA; DUO Speed[®] FIV, BIO VETO TEST, Frankreich; FASTest[®] FIV, MegaCor, Österreich; Witness[®] FIV, Merial GmbH, Deutschland; OnSite[®] FIV, Biotech, Schweden; ONE-Step[®], EVL, Niederlande). Der OnSite[®] zeigte eine sehr niedrige Sensitivität und Spezifität und somit niedrige positive und negative prädiktive Werte. Er wurde daher nicht zum Einsatz in der Praxis empfohlen. Der FASTest[®], der DUO Speed[®] und der One-Step[®] zeigten eine sehr gute Sensitivität und Spezifität sowie einen hohen Anteil an auswertbaren und gut interpretierbaren Ergebnissen. Durch Testkombinationen lies sich die Aussagekraft der Ergebnisse noch wesentlich verbessern. Als

optimale Kombinationen wurde der DUO Speed[®] oder FASTest[®] mit dem One-Step[®] empfohlen (HARTMANN et al., 2001).

III. Material und Methodik

1. Material

1.1. Proben

Die Studie wurde am Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, durchgeführt. Es wurden Serumproben von nicht selektierten Katzen aus Deutschland und den USA verwendet.

Die 396 in Deutschland gesammelten Blutproben stammten von Patienten der I. Medizinischen Tierklinik München, von einsendenden Tierärzten und von verschiedenen Tierheimen in Deutschland. Sie wurden innerhalb von vier Stunden nach Entnahme zentrifugiert. Das Serum wurde abpipetiert, in eine kleinere Portion (200 µl) und in eine größere Portion (1 - 1,5 ml) unterteilt und anschließend bei -70 °C tiefgefroren. Die Proben wurden auf Trockeneis an das Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, geschickt. Die Proben wurden unmittelbar vor der Weiterverarbeitung wieder aufgetaut.

Die aus den USA gesammelten 114 Blutproben stammten von Patienten des Veterinary Teaching Hospital, University of Georgia, Athens, USA, von einsendenden Tierärzten und von Tierheimen der näheren Umgebung. Auch diese Proben wurden zentrifugiert und das abpipetierte Serum in zwei Portionen aufgeteilt. Sie wurden bei -70 °C tiefgefroren.

25 Serumproben wurden von der Firma IDEXX, Portland, Maine, USA, zur Verfügung gestellt. Sie wurden im tiefgefrorenen Zustand auf Trockeneis an das Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, geschickt.

1.2. Untersuchte Testsysteme

Insgesamt wurden 13 verschiedene Testsysteme von sechs Herstellern untersucht und verglichen. Der überwiegende Teil bestand aus Schnelltestsystemen (Witness[®] FeLV, Witness[®] FIV, One-Step[®] FeLV, Maptic[®] FeLV, Maptic[®] FIV, FASTest[®] FeLV, FASTest[®] FIV, DUO Speed[®] FeLV/FIV), die auf dem

Testprinzip der Immunochematographie beruhen. Eines der benutzten Schnelltestsysteme (Snap[®] Combo Plus FeLV/FIV) und die vier konventionellen mit Mikrotiterplatten arbeitenden Systeme beruhen (PetChek[®] FeLV, PetChek[®] Plus Anti-FIV, Virachek[®] FeLV, Virachek[®] FIV) auf dem Prinzip des ELISA. Systeme mit Mikrotiterplatten sind empfindlicher und zeitaufwendiger in der Handhabung und werden hauptsächlich in größeren Kliniken und Untersuchungslabors benutzt. Schnelltestsysteme kommen hingegen vor allem in Tierarztpraxen zur Anwendung, da sie einfach und schnell durchzuführen sind. Die in der Studie verglichenen FeLV- und FIV-Testsysteme sind in den Tabellen 3 und 4 dargestellt.

Tabelle 3: *Verwendete FeLV-Testsysteme*

(B: Vollblut; P: Plasma; S: Serum; P: Protein; Inc.: Incorporation)

Produkt	Lizenz	Land	Testprinzip	Nachweis	verwendbar mit
Witness [®]	Synbiotics Corporation	USA	Immunochematographie	Antigen-p27	B, P, S
Snap [®] Combo Plus	IDEXX, Laboratories Inc.	USA	ELISA	Antigen-p27	B, P, S
One-Step [®]	European Veterinary Laboratories (EVL)	Niederlande	Immunochematographie	Antigen-p27 (mehrere Epitope)	P, S
Mapic [®]	Sinovus Biotech Inc.	USA	Immunochematographie	Antigen-p27	B, P, S
FASTest [®]	MegaCor	Österreich	Immunochematographie	Antigen-p27 (mehrere Epitope)	B, P, S
DUO Speed [®]	BIO VETO TEST (BVT)	Frankreich	Immunochematographie	Antigen-p27	B, P, S
Virachek [®]	Synbiotics Corporation	USA	ELISA	Antigen-p27	B, P, S
PetChek [®]	IDEXX, Laboratories Inc.	USA	ELISA	Antigen-p27	B, P, S

Tabelle 4: *Verwendete FIV-Testsysteme*

(B: Vollblut; P: Plasma; S: Serum; p: Protein; gp: Glykoprotein; Inc.: Incorporation)

Produkt	Lizenz	Land	Testprinzip	Nachweis	verwendbar mit
Snap [®] Combo Plus	IDEXX Laboratories Inc.	USA	ELISA	Antikörper gegen gp40 und p24	B, P, S
Mapic [®]	Sinovus Biotech Inc.	USA	Immunochromatographie	Antikörper gegen gp40	B, P, S
FASTest [®]	MegaCor	Österreich	Immunochromatographie	Antikörper gegen gp40	B, P, S
DUO Speed [®]	BIO VET TEST (BVT)	Frankreich	Immunochromatographie	Antikörper gegen gp40	B, P, S
Virachek [®]	Synbiotics Corporation	USA	ELISA	Antikörper gegen gp40	B, P, S
PetChek [®] Plus Anti-FIV	IDEXX Laboratories Inc.	USA	ELISA	Antikörper gegen gp40 und p24	P, S
Witness [®]	Synbiotics Corporation	USA	Immunochromatographie	Antikörper gegen gp40	B, P, S

2. Methodik

2.1. Testprinzipien

Die Studie wurde am Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, durchgeführt. Jede Probe wurde kurz vor der Bearbeitung langsam aufgetaut und anschließend mit den jeweiligen Testsystemen auf das Vorhandensein von FIV-Antikörpern und FeLV-Antigen untersucht. Die Durchführung und Auswertung der einzelnen Testsysteme erfolgten genau nach Angaben der jeweiligen Gebrauchsanweisung. Die Anzahl der Proben lag beim Vergleich von FIV-Testsystemen mit einer Ausnahme bei 535. Der Mapic[®] (Firma Sinovus Biotech Inc., Medford, USA) wurde nur mit 402 Proben getestet. Beim Vergleich von verschiedenen FeLV-Testsystemen lag die Anzahl der Proben bei 528. Eine Ausnahme bildeten hier die Testsysteme One-Step[®] (Firma EVL, Woerden, Niederlande) mit einer Anzahl von 517 Proben und Mapic[®] (Firma Sinovus Biotech Inc., Medford, USA) mit 378 Proben. Die beiden Mapic[®]-Testsysteme waren zu Beginn der Studie nicht lieferbar und wurden zu einem späterem Zeitpunkt in die Studie integriert. Beim One-Step[®] standen nicht genügend Testkits zur Verfügung

2.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist eine hochspezifische serologische Reaktion zum Nachweis und zur Identifizierung von Virus und Virusproteinen einerseits sowie zum Nachweis und zur Quantifizierung von Antikörpern andererseits. Seine hohe Spezifität beruht auf dem Einsatz hochreiner Antigene (zum Antikörpernachweis) und gereinigter hochspezifischer polyklonaler oder monoklonaler Antikörper (zur Antigen-Identifizierung). Als Indikator für die stattgefundene Bindung zwischen Antigen und Antikörper fungieren mit Enzymen (in der Regel Peroxidase) gekoppelte Immunglobuline. Sie sind gegen das gesuchte Virus oder gegen die Spezies der antiviralen Antikörper gerichtet, binden sich an diese und ergeben nach Zugabe eines Substrates eine sicht- und messbare Farbreaktion (ROLLE & MAYR, 1993). Beim ELISA für die FeLV-Diagnostik wird das gruppenspezifische p27-Antigen mit Hilfe von poly- oder monoklonalen FeLV-Antikörpern, die in den Mikroplattenvertiefungen des ELISA haften, nachgewiesen. Zur FIV-Diagnostik werden im ELISA hoch gereinigte FIV-Antigene, die Antikörper gegen FIV nachweisen, verwendet (Abbildung 3).

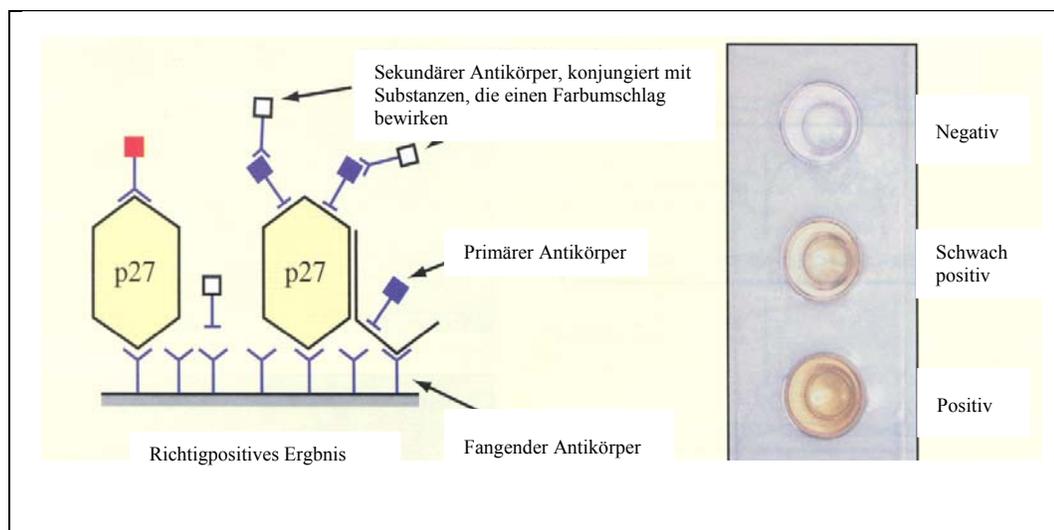


Abb. 3: *Enzyme-linked immunosorbent assay (nach RAMSEY & TENNANT, 2001)*

2.1.2. Immunochromatographie-Schnelltests

Die Immunochromatographie-Schnelltests bestehen aus einem aus Spezialpapier hergestellten Streifen, der sich in einem Kunststoffgehäuse befindet. Die Probenflüssigkeit (Vollblut, Plasma oder Serum) wird in ein vorgesehenes Probenfenster getropft und wandert aufgrund der Saugwirkung des Papiers von einem Ende zum anderen. Dabei spült die Flüssigkeit kleinste, mit Antikörper (FeLV-Diagnostik) oder dem Virusprotein (FIV-Diagnostik) beschichtete Latex- oder Goldkugelchen mit. Falls Antigene (FeLV) oder Antikörper (gegen FIV) in der Flüssigkeit vorhanden sind, kommt es zur Bildung von Immunkomplexen. Diese werden durch eine aus membranfixierten Antikörpern bestehende Phase auf der Matrix fixiert. Die fixierten Antigen-Antikörperkomplexe werden entweder durch eine Enzymwirkung oder durch eine Akkumulation von Gold- oder Latexpartikeln sichtbar (Gebrauchsinformation FASTest[®], MegaCor, Österreich). Zur FeLV-Diagnostik werden poly- oder monoklonale Antikörper gegen das FeLV-p27-Antigen verwendet. Zur FIV-Diagnostik wird das FIV-Antigen-gp40 zum Nachweis von FIV-Antikörpern verwendet (Abbildung 4).

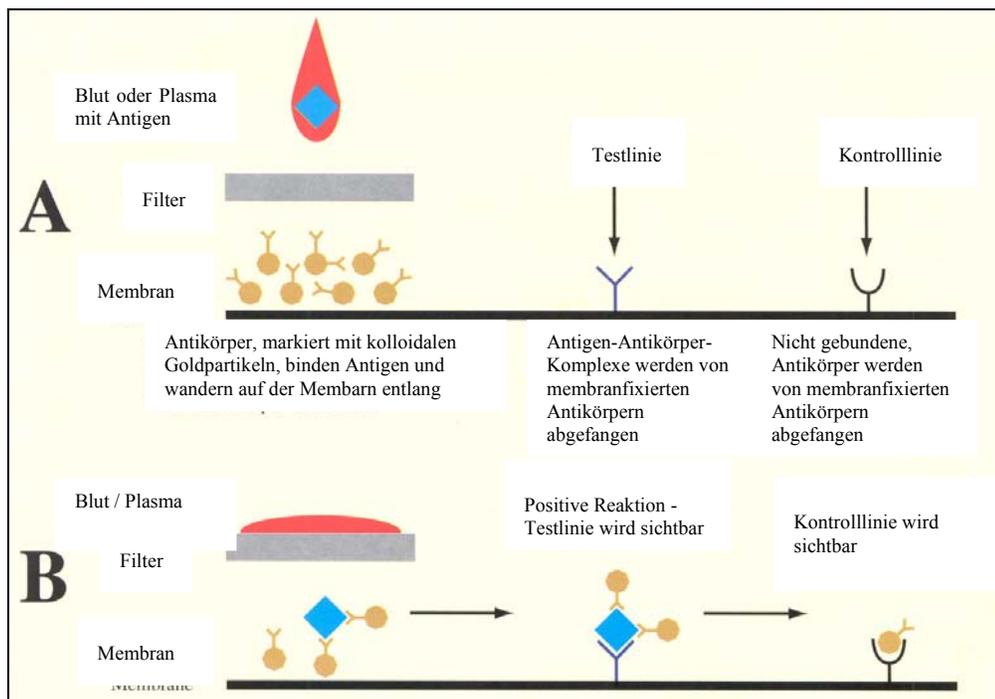


Abb. 4: Prinzip der Immunochromatographie (nach RAMSEY & TENNANT, 2001)

2.2. Durchführung der Tests

2.2.1. Feline Leukämievirusinfektion

In dieser Studie wurden insgesamt acht verschiedene FeLV-Testsysteme miteinander verglichen. Von diesen Systemen beruhen drei auf dem Prinzip des ELISA (PetChek[®] FeLV, Virachek[®] FeLV, Snap[®] Combo Plus) und fünf auf dem Prinzip der Immunochromatographie (Witness[®] FeLV, One-Step[®] FeLV, MapiC[®] FeLV, FASTest[®] FeLV, DUO Speed[®] FeLV) (Tabelle 3).

2.2.1.1. Witness[®] FeLV

Das Einzeltestsystem Witness[®] FeLV ist ein Immunochromatographietest, der von der Firma AGEN Biomedical Limited (Brisbane, Australia) hergestellt und in Europa und USA von der Firma Synbiotics Corporation (San Diego, Kalifornien, USA) vertrieben wird. Die Durchführungszeit beträgt ca. zehn Minuten. Als Probenmaterial eignet sich Vollblut (mit EDTA oder Heparin vorbehandelt), Serum oder Plasma. Die Testsysteme sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Es sind Packungseinheiten mit je 25 oder zehn Einzelteststreifen erhältlich.

Beim Witness[®] FeLV werden monoklonale Antikörper gegen das p27-Antigen verwendet. Diese sind mit kolloidalem Gold markiert und binden im Probenfenster vorhandenes p27-Antigen. Diese Komplexe diffundieren zu Zone 2 des Ergebnisfensters und werden hier von anti-Spezies-Antikörpern abgefangen. Die Akkumulation verursacht eine deutlich rosafarbene Bande. Nicht gebundene mit Goldpartikeln markierte Antikörper wandern weiter und werden in Zone 3 des Ergebnisfensters von einem membranfixierten Antikörper abgefangen. Es entsteht eine farbige Kontrollbande, die der Überprüfung der korrekten Ausführung dient.

Zur Anwendung des Testsystems wurde in die Probenvertiefung mit Hilfe einer Pipette ein Tropfen der Serumprobe pipettiert. Anschließend wurde zwei Tropfen der Pufferlösung in die Probenvertiefung getropft. Nach fünf Minuten wurde der Test ausgewertet. Der Test war nur gültig, sofern eine Kontrollbande in Zone 3 des Ergebnisfensters erkennbar war. War zusätzlich zur Kontrollbande eine Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters erkennbar, so war der Test positiv. Ein negatives Ergebnis lag vor, wenn nur die Kontrollbande sichtbar war (Abbildung 5).



Abb. 5: Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des Witness[®] FeLV

2.2.1.2. Snap[®] Combo Plus

Beim Snap[®] Combo Plus handelt es sich um ein kombiniertes Testsystem, das auf dem Prinzip des ELISA beruht. Es ermöglicht den parallelen Nachweis von FeLV-Antigenen und FIV-Antikörpern im Serum, Plasma oder Vollblut. Das Testsystem wird von der Firma IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, USA) hergestellt und in Europa und USA vertrieben. Der Test ist seit 1998 kommerziell in Europa erhältlich. Es sind Packungen mit 15 oder 30 Testeinheiten erhältlich. Diese müssen gekühlt gelagert werden (2 °C bis 7 °C), sollten jedoch vor Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht werden.

Die beim Test auf FeLV-Antigenen verwendete Konjugatmischung enthält mit Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase = HRPO) konjugierte monoklonale Antikörper gegen FeLV-p27. Beim Mischen von Konjugat und Probe in einem separaten Röhrchen binden die konjugierten Antikörper an die p27-Antigene. Anschließend wird die Mischung von Probe und Konjugat in die Testkammer des Snap-Testers gegeben (Abbildung 6), die durch das Ergebnisfenster zum Aktivierungsaugen des Testers diffundiert. Die in der Flüssigkeit enthaltenen p27-Antigen-konjugierten-Antikörperkomplexe werden von p27-

Antikörpern, die an der Matrix des Testers haften, gebunden. Erscheint die Flüssigkeit im Aktivierungsauge, wird der Auslöser des Testes gedrückt (Abbildung 7) und die im Tester enthaltenen Wasch- und Enzymsubstrat-/Chromogen-Lösungen werden freigesetzt. Eine Farbentwicklung des FeLV-p27-Antigen-Testpunktes auf der rechten Seite des Ergebnisfeldes weist auf das Vorhandensein von FeLV-Antigen hin. Seine Farbintensität ist proportional zur Konzentration von FeLV-Antigen in der Probe. Bei jedem Tester ist eine Positiv- und Negativkontrolle integriert.

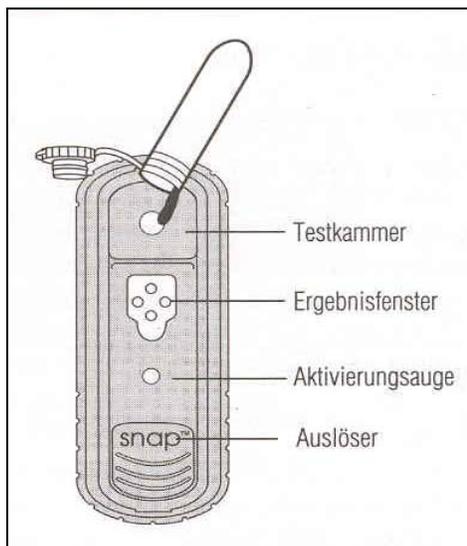


Abb. 6: Darstellung des Snap®-Testers
(Gebrauchsansweisung Snap® Combo Plus, IDEXX, USA)

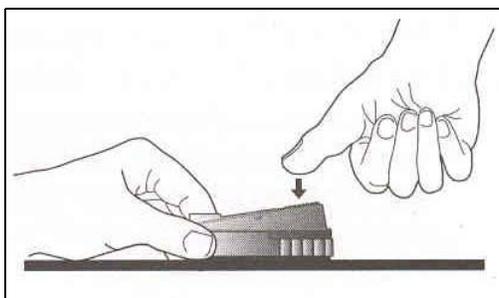


Abb. 7: Auslösen des Snap®-Testers
(Gebrauchsansweisung Snap® Combo Plus, IDEXX, USA)

Zur Durchführung des Snap® Combo Plus wurden bei senkrecht gehaltener Flasche erst vier Tropfen Konjugat und später drei Tropfen der Probe in das Teströhrchen gegeben. Die Flüssigkeiten wurden gründlich miteinander vermischt und anschließend in die Testkammer des Snap-Testers gegossen. Die Flüssigkeit diffundierte von der Testkammer zum Aktivierungsauge des Testers. Sobald im Aktivierungsauge eine bläuliche Verfärbung sichtbar war, wurde fest auf dem

Auslöser des Testers gedrückt. Nach zehn Minuten konnte das Ergebnis abgelesen werden. Den fehlerfreien Ablauf des Tests zeigte ein hellblauer Kontrollpunkt im Ergebnisfenster an. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn das Indikatorfeld für FeLV-Antigen und das positive Kontrollfeld verfärbt waren. Das Ergebnis war negativ, wenn nur das positive Kontrollfeld verfärbt war (Abbildung 8). Der Test war ungültig, wenn kein Kontrollpunkt nach Ablauf der Durchführungszeit erschien oder wenn das negative Kontrollfeld gleichdunkel oder dunkler als das FeLV-Indikatorfeld verfärbt war.



Abb. 8: Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des Snap[®] Combo Plus

2.2.1.3. One-Step[®] FeLV

Der One-Step[®] FeLV ist ein Testsystem der Firma EVL (European Veterinary Laboratory, Woerden, Niederlande) zum immunochromatographischen Nachweis des FeLV-p27-Antigen. Das Testsystem wird derzeit von keiner deutschen Firma vertrieben. Der Test eignet sich für Serum- oder Plasmaproben und die Durchführungszeit beträgt ca. 20 Minuten. Die Testsysteme können bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Beim One-Step[®] FeLV werden sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope des p27-Antigens verwendet. Die mobilen polyklonalen Antikörper sind mit kolloidalen Goldpartikeln markiert und binden vorhandenes p27-Antigen in der Serum- oder Plasmaprobe. Die dabei entstehenden Komplexe wandern durch Kapillarkräfte zur stationären Phase. Dort werden die Komplexe durch monoklonale Antikörper (anti-Spezies-Antikörper), die an der stationären Phase des Teststreifens gebunden sind, abgefangen und bilden eine sichtbare Positivbande. Freie, markierte, Antikörper wandern weiter, werden im Kontrollfenster ebenfalls von membrangebundenen Antikörpern gebunden und bilden den Kontrollstreifen.

Zur Durchführung des One-Step[®] wurde ein Tropfen der Probe und anschließend zwei Tropfen Pufferlösung in das Probenfenster gegeben. Wurde nach 20 Minuten eine Kontrollbande in der Kontrollzone gesehen, so war der Test als gültig zu werten. Der Test war positiv, wenn zusätzlich zur Kontrollbande eine Positivbande in der T-Zone erkennbar war. Ein negatives Ergebnis lag vor, wenn nur die Kontrollbande erkennbar war. Der Test war ungültig, wenn keine Kontrollbande sichtbar war (Abbildung 9).

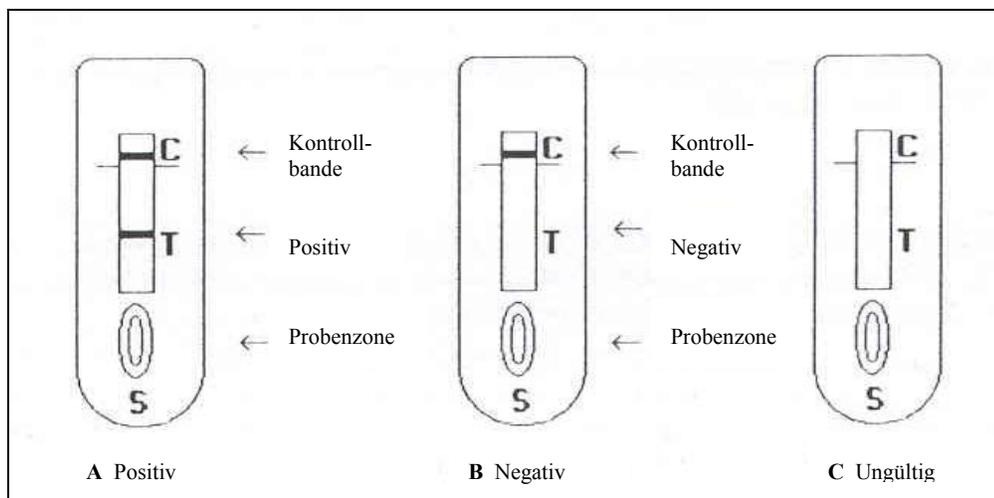


Abb. 9: Auswertung des One-Step[®] FeLV
(C = Kontrollzone; T = T-Zone)
(Gebrauchsanweisung One-Step[®] FeLV, EVL, Niederlande)

2.2.1.4. Mopic[®] FeLV

Der Mopic[®] FeLV ist ein Schnelltestsysteme, das von der Firma Sinovus Biotech Inc. (Medford, New York, USA) hergestellt wird. Bis Ende 1997 wurde dieses

Testsystem unter dem Namen OnSite[®] FeLV geführt und von der Firma OnSite Biotech/NVI (Uppsala, Schweden) produziert. In Deutschland war der OnSite[®] FeLV bis 1997 über die Firma Hoechst (Wiesbaden, Deutschland) käuflich zu erwerben. Das Testsystem beruht auf dem Prinzip der Immunochemie und kann sowohl mit Vollblut als auch mit Plasma oder Serum durchgeführt werden. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern wird das FeLV-p27-Antigen in der Probe nachgewiesen. Die Testdurchführung dauert zwischen zehn und 15 Minuten. Die Testsysteme können bei Raumtemperatur gelagert werden. Es sind Packungen mit zehn Einzelteststreifen erhältlich.

Beim Mopic[®] FeLV sind die monoklonalen Antikörper an Latexpartikel gebunden. Kommt es zur Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen, so wandern diese im Transportmedium zum Ergebnisfenster und werden hier von stationär gebundenen Antikörpern abgefangen. Es kommt zur Bildung einer blau gefärbten Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters. Die blaue Kontrollbande ist im Kontrollfenster erkennbar und entsteht durch die Komplexbildung von freien FeLV-Antikörpern und anti-Spezies-Antikörpern (Kaninchen-Anti-Maus-IgG), die in der Testmembran verankert sind. Sind in der Probe Anti-Maus-Antikörper enthalten, so werden diese von den spezifischen anti-Spezies-Antikörpern gebunden und es entsteht eine blaue Bande in Zone 1 des Ergebnisfensters. Die Probe ist in diesem Fall als nicht auswertbar anzusehen.

Zur Durchführung des Mopic[®] FeLV wurden je zwei Tropfen der Probe und zwei Tropfen der Pufferlösung in das Probenfenster gegeben. Nach ca. zehn Minuten wurde das Ergebnis abgelesen. War eine Kontrollbande im Kontrollfenster erkennbar, so war der Test gültig. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn eine bläuliche Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters und die Kontrollbande im Kontrollfenster erkennbar waren. Der Test war negativ, wenn nur die Kontrollbande erschien. Als ungültig galt ein Test, wenn entweder keine Kontrollbande oder wenn eine blaue Bande in Zone 1 des Ergebnisfensters erschien (Abbildung 10).



Abb. 10: Darstellung eines ungültigen FeLV-Ergebnis des Mapic[®] FeLV

2.2.1.5. FASTest[®] FeLV

Der FASTest[®] FeLV ist ein Immunochromatographie-Schnelltest, der das p27-Antigen nachweist. Das Testsystem wird von der Firma MegaCor (Hörbranz, Österreich) hergestellt. Zur Durchführung kann Vollblut, Plasma oder Serum verwendet werden, und die Durchführung beträgt ca. zehn Minuten. Die Teststreifen sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Die Packungen sind zu zehn und zu 25 Stück erhältlich.

Beim FASTest[®] FeLV werden Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope des p27-Antigens eingesetzt. Diese sind mit kolloidalen Goldpartikeln markiert. Ist Virusmaterial in der Vollblut-, Serum- oder Plasmaprobe vorhanden, so bildet sich ein spezifischer Antigen-Antikörper-Komplex, welcher auf der Fliessmembran weiterwandert und von dem membranfixierten Antikörpern abgefangen wird. Durch die starke Verdichtung der kolloidalen Goldkomplexe entsteht im Ergebnisfenster ein violett-purpurfarbener Streifen. Nicht gebundene mit Goldpartikeln markierte Antikörper wandern weiter und werden in der Kontrollzone von einem membranfixierten Antikörper abgefangen. In der Kontrollzone entsteht eine farbige Kontrollbande.

Zur Durchführung wurde ein Tropfen der Probe und anschließend fünf Tropfen Pufferlösung in das Probenfenster gegeben. Der Test war gültig, wenn nach zehn

Minuten eine Kontrollbande im Kontrollfenster erschien. Bei positiven Proben wurde ein zusätzlicher Streifen im Ergebnisfenster sichtbar.

2.2.1.6. DUO Speed[®] FeLV

Bei diesem Testsystem sind der DUO Speed[®] FeLV und der DUO Speed[®] FIV in einer Testeinheit zusammengefasst und dient zum parallelen Nachweis des FeLV-Antigen-p27 und der anti-FIV-Antikörper gegen das Transmembranprotein gp40. Der Test wird von der Firma BVT (BIO VETO TEST, La Seyene-Sur-Mer, Frankreich) hergestellt und in Deutschland von der Firma Albrecht[®] vertrieben. Der Test beruht auf dem Prinzip der Immunochromatographie. Zur Durchführung kann Vollblut, Serum oder Plasma verwendet werden. Die Teststreifen sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Es sind Packungen mit sechs, zwölf oder 16 Einzelteststreifen erhältlich.

Beim DUO Speed[®] FeLV wird im Probenmaterial befindliches p27-Antigen durch monoklonale, mit kolloidalem Gold markierten Antikörper, gebunden. Die Komplexe wandern im Transportmedium zum Ergebnisfenster, wo sie von stationären Antikörpern abgefangen werden. Durch die Verdichtung der Goldpartikel entsteht eine rosarote Bande. Nicht gebundene, markierte Antikörper werden im Kontrollfenster abgefangen und bilden ebenfalls eine rosarote Bande. Es entsteht eine farbige Kontrollbande, die der Überprüfung der korrekten Ausführung dient.

Zur Durchführung des DUO Speed[®] FeLV wurde erst ein Tropfen der Probe und anschließend fünf Tropfen der Pufferlösung in die Probenvertiefung gegeben. Ein negatives Ergebnis lag nach zehn bis 15 Minuten vor, wenn nur eine Kontrollbande im Kontrollfenster sichtbar war. War zusätzlich zur Kontrollbande eine Bande im Ergebnisfenster erkennbar, so war der Test positiv (Abbildung 11). Der Test war ungültig, wenn keine Kontrollbande erschien.

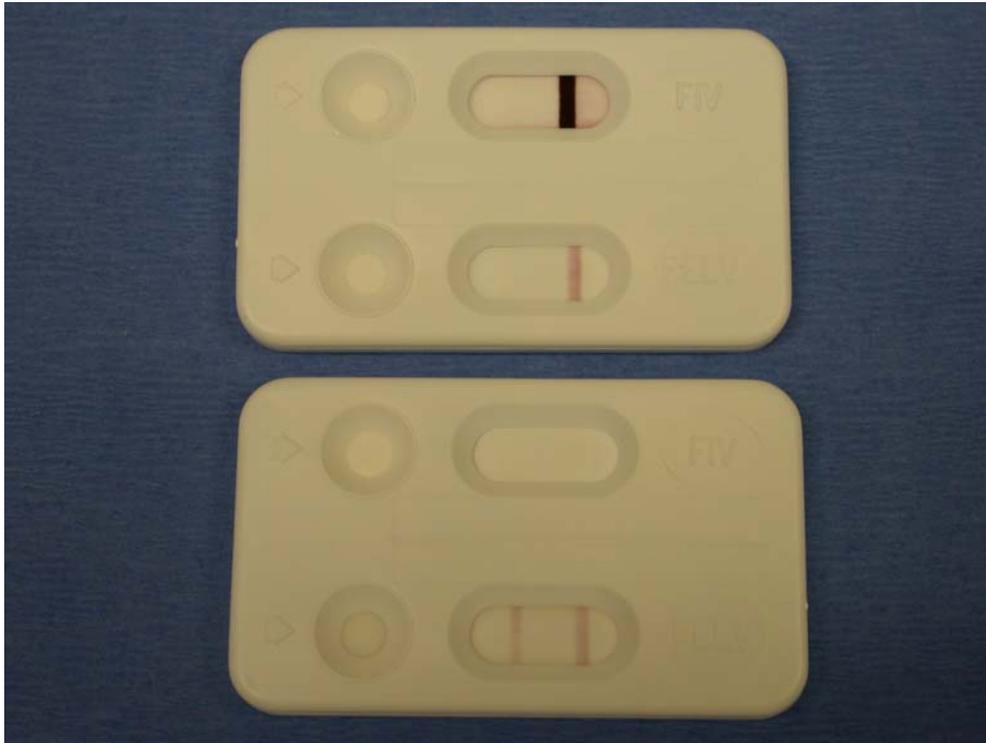


Abb. 11: Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des DUO Speed[®]

2.2.1.7. Virachek[®] FeLV

Der Virachek[®] FeLV ist ein Mikrotitersystem, das auf dem Prinzip des ELISA beruht und von der Firma Synbiotics Corporation (San Diego, Kalifornien, USA) vertrieben wird. Beim Virachek[®] FeLV wird mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, das p27-Antigen nachgewiesen. Der Test kann mit Vollblut, Serum oder Plasma durchgeführt werden. Die Durchführungszeit beträgt ca. zehn Minuten. Der Mikrotitertest muss kühl gelagert und vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Der Packungsinhalt Virachek[®] FeLV enthält eine Platte mit 48 Mikrotitervertiefungen, die mit Antikörpern gegen das p27-Antigen beschichtet sind. Zugehörige Flüssigreagenzien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Reagenzien des Virachek® FeLV

Menge	Beschreibung
2,5 ml	Anti-FeLV-HRP monoklonales Antikörperkonjugat (Meerrettichperoxidase)
1,0 ml	Positivkontrolle (felines antigenpositives Serum)
1,0 ml	Negativkontrolle (felines Serum, nicht reagierend mit FeLV)
2,5 ml	Chromogen
2,5 ml	Substratpuffer

Zur Durchführung des Virachek® FeLV wurden die Mikrotitervertiefungen mit 50 µl Serum und einem Tropfen anti-FeLV-HRP-Konjugat für fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Eine Mikrotitervertiefung wurde mit einem Tropfen Positivkontrolle und eine Vertiefung mit der gleichen Menge Negativkontrolle bestückt. In der Inkubationszeit erfolgte die Bindung des p27-Antigen an die in den Mikrovertiefungen haftenden Antikörper und an die freien markierten Antikörper. Nach fünf Minuten wurde die Flüssigkeit abgekippt und die nicht gebundenen Reagenzien durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Anschließend wurde in jede Mikrotitervertiefung je ein Tropfen Chromogen und ein Tropfen Substratpuffer einpipettiert, die bei Vorhandensein von Antigen-Antikörper-Komplexen eine Blaufärbung hervorriefen. Nach weiteren fünf Minuten wurde das Ergebnis abgelesen. Der Test war gültig, wenn die Positivkontrolle eine Blaufärbung und die Negativkontrolle keine Färbung aufwies. Positive Proben zeigten eine intensive Blaufärbung (Abbildung 12). Negative Proben färbten sich, ebenso wie die Negativkontrolle, nicht an.



Abb. 12: Darstellung eines positiven ELISA-Ergebnis des Virachek® (v. l. n. r. Positivkontrolle, Negativkontrolle, positives Ergebnis)

2.2.1.8. PetChek[®] FeLV

Der PetChek[®] FeLV ist ein ELISA, der das Vorliegen von FeLV-Antigen in feline Serum-, Plasma- oder Vollblutproben überprüft. In jeder Testeinheit ist ein Bestätigungstest enthalten, der falschpositive Ergebnisse aufdecken soll, die aufgrund von FeLV-fremden Material (wie z. B. Anti-Maus-Antikörper) in der Probe auftreten können. Für den Bestätigungstest kann nur Serum oder Plasma verwendet werden. Der Test sollte bei 2 °C bis 7 °C gekühlt gelagert werden und vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Der PetChek[®] FeLV ist in 25 Minuten durchführbar. Dieses Mikrotitersystem wird von der Firma IDEXX, Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, USA; Vertrieb Wörrstadt, Deutschland) hergestellt. Der Packungsinhalt des PetChek[®] FeLV besteht aus fünf Platten mit je 96 ELISA-Vertiefungen. Diese sind mit monoklonalen Antikörpern gegen das p27-Antigen beschichtet. Die Flüssigkeitsreagenzien, die in der Testpackung mitenthalten sind, sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die letzten beiden Flüssigreagenzien werden für den Bestätigungstest benötigt.

Tabelle 6: Reagenzien des PetChek[®] FeLV
(* = für Bestätigungstest)

Menge	Beschreibung
2 x 25,0 ml	TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidine)
25,0 ml	Stopplösung
100,0 ml	Waschkonzentrat (1 : 10 mit <i>Aqua destillata</i> verdünnen); Konservierungsmittel: Gentamicin
0,5 ml	Lösung A - Probenverdünnungslösung (Konservierungsmittel: Gentamicin)*
0,5 ml	Lösung B - Neutralisationsreagenz (Konservierungsmittel: Gentamicin)*
25,0 ml	Anti-FeLV-HRPO-Konjugat (Meerrettichperoxidase)
2,0 ml	Positivkontrolle (Konservierungsmittel: Gentamicin)
2,0 ml	Negativkontrolle (Konservierungsmittel: Gentamicin)

Zur Durchführung des PetChek[®] FeLV wurde jeweils 50 µl Probenmaterial und ein Tropfen HRPO-Konjugat in einer Mikrotitervertiefung inkubiert. Eine Positiv- und eine Negativkontrolle wurde ebenfalls mit Konjugat versetzt. In der Probe vorliegendes FeLV-Antigen wurde sowohl an die stationären Antikörper als auch an das Antikörper-HRPO-Konjugat gebunden. Nach Ablauf der fünfminütigen Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit aus den Vertiefungen ausgegossen, und die Vertiefungen anschließend mit der verdünnten Waschlösung fünfmal gewaschen. Im folgenden Schritt wurde in jede Vertiefung zwei Tropfen TMB-

Substratlösung, mit Substrat und Chromogen, gegeben und nochmals fünf Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. War FeLV-p27-Antigen in der Probe vorhanden, so wurde durch das hinzugegebene Chromogen eine Blaufärbung der Probe verursacht. Das Ergebnis wurde nach Angaben des Herstellers visuell abgelesen. Der Test war gültig, wenn die Vertiefung mit der Positivkontrolle deutlich blau und die Negativkontrolle farblos oder nur sehr leicht verfärbt war. War die Farbentwicklung der Probe weniger oder gleich intensiv wie die der Negativkontrolle, wurde die Probe als negativ eingestuft. War die Farbintensität in der Probe höher als in der Negativkontrolle, so wurde die Probe als positiv eingestuft. Positive Proben wurden laut Beschreibung des Herstellers mit dem Bestätigungstest auf Genauigkeit überprüft. Für den Bestätigungstest waren spezielle Probenvorbehandlungsröhrchen und zwei weitere Reagenzien (Tabelle 5) notwendig. Vor Durchführung des eigentlichen Bestätigungstests, musste die Probe vorbehandelt werden. Hierbei wurden die Proben mit einer Neutralisationslösung (Lösung B) und mit einer Probenverdünnungslösung (Lösung A) versetzt. Die Neutralisationslösung enthielt polyklonale Antikörper, die mit dem in der Serumprobe vorliegenden Antigenen eine Bindung einging und so die freien Bindungsstellen der Antigene dezimierte. Anschließend wurde mit den vorbehandelten Proben ein weiterer Durchgang des PetChek[®] FeLV durchgeführt. Durch die dezimierten Bindungsstellen der Antigene wurden weniger Antigene an die plattengebundenen Antikörper gebunden und es ergab sich für die Probe eine geringere Blaufärbung. War die mit Neutralisationslösung B vorbehandelte Probe im Bestätigungstest weniger als halb so farbintensiv wie die mit Probenverdünnungslösung A vorbehandelte Probe, galt die Probe als positiv für FeLV. Im Falle einer falschpositiven Probe entsprach die Farbintensität der mit der Neutralisationslösung vorbehandelten Probe in etwa der Farbintensität der mit Probenverdünnungslösung A vorbehandelten Probe. Dies war darauf zurückzuführen, dass p27-fremdes Antigenmaterial keine Verbindung mit den polyklonalen neutralisierenden Antikörpern einging, und somit die Anheftung an die monoklonalen, plattengebundenen Antikörpern im stärkeren Ausmaß stattfand. Als Ergebnis erhielt man eine deutlichere Farbentwicklung.

2.2.2. Feline Immunschwächevirusinfektion

In der Studie wurden insgesamt sieben verschiedene FIV-Testsysteme untereinander verglichen. Von diesen Systemen beruhen drei auf dem Prinzip des ELISA (PetChek[®] Plus Anti-FIV, Virachek[®] FIV, Snap[®] Combo Plus) und vier auf dem Prinzip der Immunochromatographie (Witness[®] FIV, Mapic[®] FIV, FASTest[®] FIV, DUO Speed[®] FIV) (Tabelle 4).

2.2.2.1. Witness[®] FIV

Der Witness[®] FIV ist ein Immunochromatographietest, der von der Firma AGEN Biomedical Limited (Brisbane, Australien) hergestellt wird. In Deutschland wird das Einzeltestsystem von der Firma Merial GmbH (Hallbergmoos, Deutschland) vertrieben. Er dient zum Nachweis von Antikörpern, die gegen das Transmembranprotein gp40 des FIV gerichtet sind. Die Durchführungszeit beträgt zehn Minuten, und als Probenmaterial eignet sich Serum, Plasma oder Vollblut (mit EDTA oder Heparin). Die Testsysteme sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Er kann in Packungen mit zehn Einzelteststreifen erworben werden.

Beim Witness[®] FIV wird ein synthetisches gp40-Peptid des FIV, das mit kolloidalem Gold markiert ist, verwendet. Dieses bindet sich im Probenfenster an anti-gp40-Antikörper, die sich in der Probe befinden, und diffundiert als Komplex zur Zone 2 des Ergebnisfensters. Dieser Komplex wird an einer sensibilisierten Reaktionslinie, die fixierte anti-Spezies-Antikörper enthält, gebunden. Die Akkumulation der mit kolloidalem Gold markierten Komplexe stellt sich in einer deutlich rosafarbenen Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters dar. Nicht gebundene mit Goldpartikeln markierte Antigene wandern weiter und werden in der Zone 3 des Ergebnisfensters von einem membranfixierten Antikörper abgefangen. In der Zone 3 entsteht eine farbige Kontrollbande und zeigt die korrekte Ausführung an.

Zur Anwendung des Tests wurde ein Tropfen der Serumprobe mit Hilfe einer Pipette in die Probenvertiefung pipettiert. Anschließend wurden drei Tropfen der Pufferlösung in die Probenvertiefung getropft. Nach fünf Minuten wurde der Test ausgewertet. Der Test war nur gültig, sofern eine rosafarbene Kontrollbande in Zone 3 des Ergebnisfensters erkennbar war. War zusätzlich zur Kontrollbande eine Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters erkennbar, so war der Test positiv. Ein

negatives Ergebnis lag vor, wenn nur die Kontrollbande sichtbar war (Abbildung 13).



Abb. 13: Darstellung eines negativen und positiven FIV-Ergebnis des Witness[®] FIV

2.2.2.2. Snap[®] Combo Plus

Der Snap[®] Combo Plus ist ein ELISA zum parallelen Nachweis von FIV-Antikörpern und FeLV-Antigen im Serum, Plasma oder Vollblut der Katze. Der Test wird von der Firma IDEXX Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, USA) hergestellt und ist in Europa seit 1998 kommerziell erhältlich. Der Snap[®] Combo Plus stellt das Nachfolgemodel des alten Snap[®] Combo dar. Die Snap-Tester müssen gekühlt gelagert werden (2 °C bis 7 °C) und sollten vor der Durchführung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Insgesamt beträgt der Zeitaufwand für die Testdurchführung 15 Minuten. Es sind Packungen mit 15 oder 30 Testeinheiten erhältlich.

Für die FIV-Diagnosestellung werden, im Unterschied zum Vorgängermodell Snap[®] Combo, nicht nur *gag*- sondern auch *env*- (gp40) FIV-Antigene verwendet. Dadurch ist es möglich sowohl p24- als auch gp40-Antikörper in der Probe nachzuweisen. In jedem Snap-Tester ist eine Positiv- und Negativkontrolle integriert. Die beim Test verwendete Konjugatmischung enthält mit

Meerrettichperoxidase konjugierte FIV-Antigene. Beim Mischen von Konjugat und Probe im einem separaten Röhrchen binden die konjugierten FIV-Antigene an die FIV-Antikörper. Die Mischung von Probe und Konjugat wird anschließend in die Testkammer des Snap-Tester gegeben. Die in der Flüssigkeit enthaltenen FIV-Antikörper-konjugierten-Antikörperkomplex werden von FIV-Antigenen, die an der Matrix des Testers haften, gebunden. Erscheint die Flüssigkeit im Aktivierungsaug, wird der Auslöser des Testes gedrückt und die im Tester enthaltenen Wasch- und Enzymsubstrat-/Chromogen-Lösungen werden freigesetzt. Eine Farbentwicklung des FIV-Antikörper-Testpunkts auf der linken Seite des Ergebnisfeldes weist auf das Vorhandensein von FIV-Antikörpern hin. Seine Farbintensität ist proportional zur Konzentration von FIV-Antikörpern in der Probe.

Zur Durchführung des Snap[®] Combo Plus wurden bei senkrecht gehaltener Flasche erst vier Tropfen Konjugat und später drei Tropfen der Probe in das Teströhrchen gegeben. Die Flüssigkeiten wurden gründlich miteinander vermischt und anschließend in die Testkammer des Snap-Testers gegossen. Die Flüssigkeit diffundierte von der Testkammer zum Aktivierungsaug des Testers. Sobald im Aktivierungsaug eine bläuliche Verfärbung sichtbar war, wurde fest auf dem Auslöser des Testers gedrückt. Nach zehn Minuten konnte das Ergebnis abgelesen werden. Den fehlerfreien Ablauf des Tests zeigte ein hellblauer Kontrollpunkt im Ergebnisfenster an. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn das Indikatorfeld für FIV-Antikörper und das positive Kontrollfeld verfärbt waren. Das Ergebnis war negativ, wenn nur das positive Kontrollfeld verfärbt war (Abbildung 14). Der Test war ungültig, wenn kein Kontrollpunkt nach Ablauf der Durchführungszeit erschien oder wenn das negative Kontrollfeld gleichdunkel oder dunkler als das FeLV-Indikatorfeld verfärbt war.



Abb. 14: Darstellung eines positiven und negativen FIV-Ergebnis des Snap[®] Combo Plus

2.2.2.3. Mopic[®] FIV

Der Mopic[®] FIV ist ein Schnelltestsystem, das von der Firma Sinovus Biotech Inc. (Medford, New York, USA) hergestellt wird. Bis Ende 1997 wurde dieses Testsystem unter dem Namen OnSite[®] FIV geführt und von der Firma OnSite Biotech/NVI (Uppsala, Schweden) hergestellt. In Deutschland war der OnSite[®] FIV bis 1997 über die Firma Hoechst (Wiesbaden, Deutschland) käuflich zu erwerben. Der Mopic[®] FIV beruht auf dem Prinzip der Immunochromatographie und kann sowohl mit Vollblut als auch mit Plasma oder Serum betrieben werden. Die Testsysteme werden bei Zimmertemperatur gelagert. Die Durchführungszeit beträgt zwischen zehn und 15 Minuten. Es sind Packungen mit zehn Einzelteststreifen erhältlich.

Beim Mopic[®] FIV wird das an Latexpartikel gebundene, synthetische Transmembranantigen gp40 des FIV verwendet. Das Transmembranantigen bindet spezifische FIV-Antikörper in der Probe und diffundiert als Komplex zum Ergebnisfenster. Der Komplex wird an einer sensibilisierten Reaktionslinie, die fixierte anti-Spezies-Antikörper enthält, gebunden. Es entsteht eine blaue Bande.

Freies FIV-Antigen wird durch anti-Spezies-Antikörper (Ziegen-IgG-anti-Katze) abgefangen, und es erscheint eine blaue Kontrollbande im Kontrollfenster.

Zur Durchführung des Mapic[®] FIV wurden je zwei Tropfen der Probe und zwei Tropfen der Pufferlösung in das Probenfenster gegeben. Nach ca. zehn Minuten wurde das Ergebnis abgelesen. War eine Kontrollbande im Kontrollfenster erkennbar, so war der Test gültig. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn eine blaue Bande in Zone 2 des Ergebnisfensters und die Kontrollbande im Kontrollfenster erkennbar waren. Der Test war negativ, wenn nur die Kontrollbande erschien. Als ungültig galt ein Test, wenn keine Kontrollbande erschien.

2.2.2.4. FASTest[®] FIV

Der FASTest[®] FIV ist ein Testsystem, das auf einem immunochromatographischen "Sandwich-Prinzip" basiert und FIV-Antikörper gegen das Transmembranprotein gp40 nachweist. Er wird von der Firma MegaCor (Hörbranz, Österreich) hergestellt und vertrieben. Zur Durchführung kann Vollblut, Plasma oder Serum verwendet werden. Die Durchführung dauert zehn Minuten. Die Testsysteme sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Es sind Packungen mit zehn oder 25 Teststreifen erhältlich.

Beim FASTest[®] FIV wandert das Probenmaterial auf einer mit synthetischen Peptiden beschichteten Fliessmembran. Bei diesen Peptiden handelt es sich um, mit kolloidalen Goldpartikeln markiertem Transmembranprotein gp40 des FIV. Sind Antikörper gegen gp40 in der Probe vorhanden, so bilden sich spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe, die auf der Membran weiterwandern und von membranfixierten Peptiden im Ergebnisfenster abgefangen werden. Die verdichteten kolloidalen Goldpartikeln lassen einen violett-purpurfarbenen Streifen im Ergebnisfenster sichtbar werden. Freie, nicht gebundene Peptide wandern weiter und werden im Kontrollfenster abgefangen. Es entsteht eine Kontrollbande.

Zur Durchführung des FASTest[®] FIV wurde ein Tropfen der Probe und anschließend fünf Tropfen Pufferlösung in das Probenfenster gegeben. Der Test war gültig, wenn nach zehn Minuten eine Kontrollbande im Kontrollfenster erschien. Bei positiven Proben wurde ein zusätzlicher Streifen im Ergebnisfenster sichtbar. Ein negatives Ergebnis lag vor, wenn nur die Kontrollbande in der

Kontrollzone erschien. Testsysteme, bei denen keine Kontrollbanden erschienen, wurden als ungültig bewertet.

2.2.2.5. DUO Speed[®] FIV

Bei diesem Testsystem sind der DUO Speed[®] FIV und der DUO Speed[®] FeLV in einer Testeinheit zusammengefasst und dienen dem parallelen Nachweis von FIV-Antikörpern gegen das Transmembranprotein gp40 und dem FeLV-p27-Antigen. Der Test wird von der Firma BVT (BIO VETO TEST, La Seyene-Sur-Mer, Frankreich) hergestellt und in Deutschland von der Firma Albrecht[®] vertrieben. Auch dieser Test beruht auf dem Prinzip der Immunochromatographie. Zur Durchführung kann Vollblut, Serum oder Plasma verwendet werden. Teststreifen sind bei Zimmertemperatur zu lagern. Es sind Packungen mit sechs, zwölf oder 16 Einzelteststreifen erhältlich.

Beim DUO Speed[®] FIV binden sich spezifische mit kolloidalem Gold markierte Proteine, die der immundeterminanten Stelle des gp40-Transmembranproteins entsprechen, an FIV-Antikörper im Probenmaterial. Diese Komplexe werden durch matrixgebundene anti-Spezies-Antikörper auf einer Linie im Ergebnisfenster fixiert und erzeugen durch die Goldpartikel eine rosarote Bande. Die rosarote Kontrollbande im Kontrollfenster entsteht beim DUO Speed[®] FIV durch nicht gebundene markierte Proteine.

Zur Durchführung des DUO Speed[®] FIV wurde erst ein Tropfen der Probe und anschließend fünf Tropfen der Pufferlösung in die Probenvertiefung gegeben. Ein negatives Ergebnis lag nach zehn bis 15 Minuten vor, wenn nur eine Kontrollbande im Kontrollfenster sichtbar war. War zusätzlich zur Kontrollbande eine Bande im Ergebnisfenster erkennbar, so war der Test positiv (Abbildung 15). Der Test war ungültig, wenn keine Kontrollbande erschien.

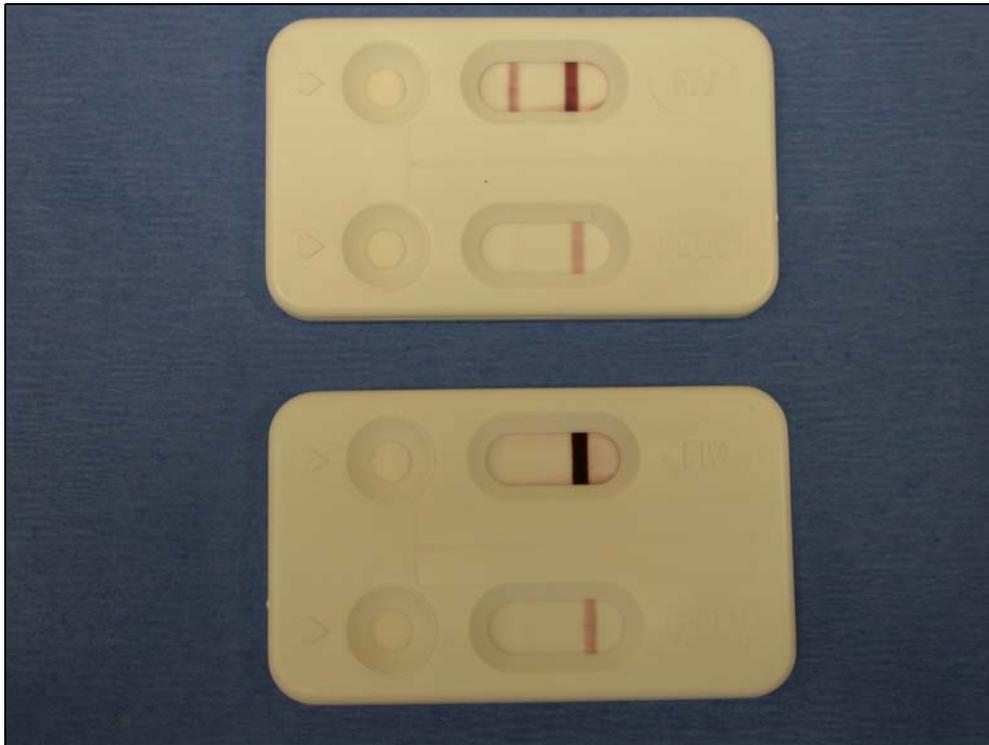


Abb. 15: Darstellung eines negativen und positiven FIV-Ergebnis des DUO Speed[®]

2.2.2.6. Virachek[®] FIV

Der Virachek[®] FIV ist ein Mikrotitersystem, das auf dem Prinzip des ELISA beruht und von der Firma Synbiotics Corporation (San Diego, Kalifornien, USA) vertrieben wird. Es werden spezifische FIV-Peptide verwendet, um Antikörper gegen FIV zu entdecken. Der Test kann mit Vollblut, Serum oder Plasma durchgeführt werden. Die Durchführungszeit beträgt ca. 15 Minuten. Der Test muss gekühlt (2 °C bis 7 °C) gelagert und vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht werden.

Die Packungseinheit Virachek[®] FIV enthält eine Platte mit 48 Vertiefungen, die jeweils mit Protein A beschichtet sind. Das Protein A führt zur Immobilisation der FIV-Antikörper in den Mikroplattenvertiefungen. In Tabelle 7 werden die für die Durchführung benötigten Flüssigreagenzien aufgelistet. Diese sind in der Packungseinheit mit enthalten.

Tabelle 7: Reagenzien des Virachek® FIV

Menge	Beschreibung
7,0 ml	FIV-Ag-HRP-Konjugat (Meerrettichperoxidase)
1,0 ml	Positivkontrolle (felines antikörperpositives Serum)
1,0 ml	Negativkontrolle (felines Serum, nicht reagierend mit FIV)
2,5 ml	Chromogen
2,5 ml	Substratpuffer
100 ml	Waschkonzentrat (1 : 10 mit <i>Aqua destillata</i> verdünnt)

Zu Beginn der Durchführung des Virachek® FIV wurden drei Tropfen FIV-Ag-HRP-Konjugat in alle Mikrotitervertiefungen pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines kleinen Plastiklöffels je 0,001 ml der Serumprobe in je eine Vertiefung gebracht. Je eine Mikrotitervertiefung wurde mit einem Tropfen Positiv- oder Negativkontrolle inkubiert. Während der zehnminütigen Inkubationszeit banden sich in der Probe befindliche FIV-Antikörper sowohl an das FIV-Antigen-HRP-Konjugat als auch an das Antikörper fangende Protein A. Nach zehn Minuten wurde die Flüssigkeit abgekippt und die nicht gebundenen Reagenzien durch mehrmaliges Waschen mit verdünnter Waschlösung entfernt. Anschließend wurde in jede Mikrotitervertiefung je ein Tropfen Chromogen und ein Tropfen Substratpuffer einpipettiert, die bei Vorhandensein von Antigen-Antikörper-Komplexen eine Blaufärbung hervorriefen. Nach weiteren fünf Minuten wurde das Ergebnis abgelesen. Der Test war gültig, wenn die Positivkontrolle eine Blaufärbung und die Negativkontrolle keine Färbung aufwies. Positive Proben zeigten eine intensive Blaufärbung. Negative Proben färbten sich, ebenso wie die Negativkontrolle, nicht an.

2.2.2.7. PetChek Plus® Anti-FIV

Beim PetChek Plus® Anti-FIV handelt es sich um ein mit Mikrotiterplatten arbeitendes System, das auf dem Prinzip des ELISA beruht. Es dient zum Nachweis von FIV-Antikörpern gegen das Transmembranprotein gp40 und das Kapsidprotein p24. Es können Plasma- und Serumproben verwendet werden. Die Durchführungszeit beträgt ca. eine Stunde. Vor Gebrauch müssen die bei 2 °C bis 7 °C gekühlt aufbewahrten Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht werden. Dieses Testsystem wird von der Firma IDEXX, Laboratories, Inc. (Westbrook, Maine, USA, Vertrieb Wörrstadt, Deutschland) hergestellt. Der Packungsinhalt des PetChek Plus® Anti-FIV enthält zwei Platten mit je 96 beschichteten Vertiefungen. In Tabelle 8 werden die für die Durchführung benötigten

Flüssigreagenzien aufgelistet. Die Reagenzien sind im Packungsinhalt mit enthalten.

Tabelle 8: Reagenzien des PetChek[®] Plus Anti-FIV

Menge	Beschreibung
10,0 ml	FIV-Ag-HRPO (Meerrettichperoxidase) Konjugat in Puffer mit Proteinstabilisatoren, konserviert mit Gentamicin
1,0 ml	Positivkontrolle (felines antikörperpositives Serum in Puffer mit Proteinstabilisatoren), konserviert mit Natriumazid
1,0 ml	Negativkontrolle (felines Serum, nicht reagierend mit FIV, in Puffer mit Proteinstabilisatoren)
25,0 ml	TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidine)
25,0 ml	Stopplösung (0,125 % Flusssäure)
100 ml	Waschkonzentrat (1 : 10 mit <i>Aqua destillata</i> verdünnen)

Zur Durchführung des PetChek Plus[®] Anti-FIV wurden die Mikrotitervertiefungen mit 50 µl Serum und je einen Tropfen Konjugat, das aus FIV-Antigen und daran konjugierter Meerrettichperoxidase bestand, inkubiert. Zwei Vertiefungen wurden mit je 50 µl Positivkontrolle und zwei mit je 50 µl Negativkontrolle bestückt. Während einer Inkubationszeit von 30 Minuten banden sich in der Probe befindliche FIV-Antikörper sowohl an die FIV-Antigen-Beschichtung der Mikrotitervertiefungen sowie an das mit Meerrettichperoxidase konjugierte FIV-Antigen und bildeten so spezifische Immunkomplexe. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus allen Vertiefungen geschüttet und die Vertiefungen nachfolgend mit dem verdünnten Waschkonzentrat fünfmal gewaschen. Durch die Zugabe von zwei Tropfen TMB-Konzentrat, das als Substrat und Chromogen fungierte, wurde bei Vorhandensein von Antigen-Antikörperkomplexen eine Blaufärbung hervorgerufen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Farbreaktion mit Hilfe der Stopplösung abgebrochen. Die Extinktionswerte in den einzelnen Vertiefungen wurden mit dem ELISA-Reader photometrisch bei 650 nm gemessen. Der relative Antikörpergehalt in der Probe wurde ermittelt, indem man das Verhältnis Probe zu positiv Kontrolle berechnete. War dieses Verhältnis kleiner als 0,5, dann galt die Probe als negativ. War das Verhältnis größer als 0,5, zeigte es das Vorhandensein von Antikörpern gegen das FIV an.

2.3. Durchführung der Bestätigungstests

Alle Proben, die in einem oder mehreren Testsystemen positiv reagierten, wurden im Bestätigungstest verifiziert. Zusätzlich wurden 100 willkürlich ausgewählte, negative FIV-Proben und 81 negative FeLV-Proben bestätigt.

FIV-positive Proben und 100 negative Proben wurden mit dem Western Blot nachgetestet. Der Western Blot wurde im Labor des Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, durchgeführt. FeLV-positive Ergebnisse und 81 negative Proben wurden mit der Virusisolierung bestätigt. Die Virusisolierung wurde am Institut of Veterinary Pathology, Glasgow, UK, durchgeführt.

2.3.1. Western Blot

Alle Proben, die in einem Test ein positives FIV-Ergebnis zeigten und 100 negative Proben, wurden im Western Blot bestätigt. Die Blotstreifen wurden freundlicherweise von Dr. H. Egberink und Mitarbeitern, Institut für Virologie der Universität Utrecht, Niederlande, hergestellt, und auf Trockeneis an das Department of Small Animal Medicine, University of Georgia, Athens, USA, geschickt.

Das Prinzip des Western Blot beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel und dem anschließenden Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Diese Membran enthält nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennte Proteine, die immunogen sind und spezifische, im Testserum enthaltene Antikörper binden. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Inkubation mit anti-Spezies-Konjugat (Ziegen-IgG-anti-Katze-IgG) und nachfolgendem Zufügen von Substrat (4-Chloro-1-Naphtol-Lösung) in Form von violett-schwarzen Banden sichtbar gemacht (Abbildung 16). Die Lage und Anzahl der erkennbaren Banden zeigt an, gegen welche FIV-Proteine die untersuchte Katze Antikörper produziert (TOWBIN et al., 1979).

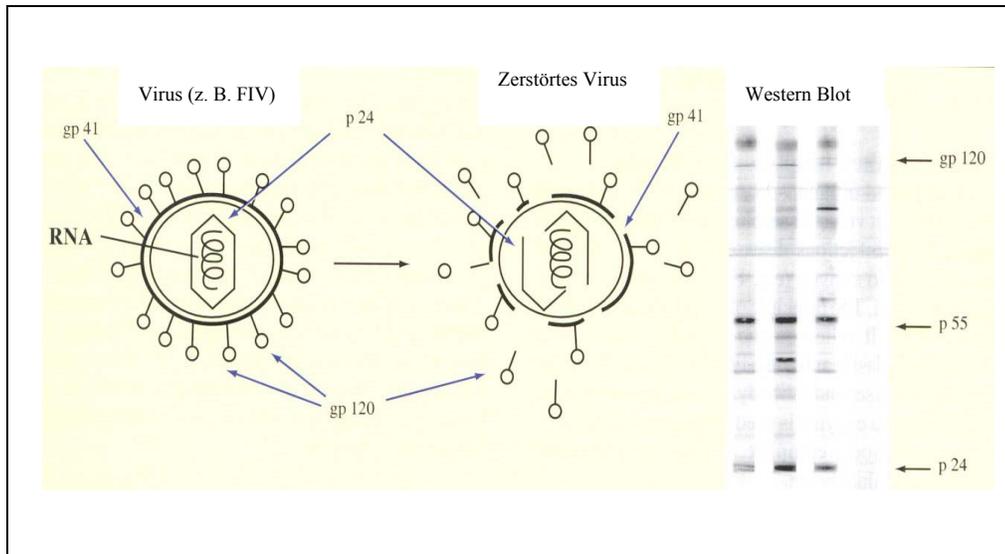


Abb. 16: Western Blot (nach RAMSEY & TENNANT, 2001)

2.3.1.1. Herstellung der Gele

Für die Herstellung der Gele wurde die Elektrophoresekammer Mini Protean II Cell der Firma Bio Rad® (Hercules, Kalifornien, USA) verwendet (Tabelle 9). Verschiedene technische Hilfsmittel (Tabelle 10) und Reagenzien (Tabelle 11) wurden für die Herstellung benötigt.

Tabelle 9: Ausstattung der Elektrophoresekammer Mini Protean II Cell (Bio Rad, Hercules, Richmond, Kalifornien, USA)

Anzahl	Beschreibung
1	Netzgerät, Model 200/2,0 Power Supply
1	Durchsichtiges Kunststoffbecken mit Deckel und zwei Elektroden
2	Elektrophoreseständer zum Einhängen der beiden Glasplatten-Klammern
2	Plastikgießständer mit zwei Gummikissen und einer Tariervertiefung
2	Plastikkammern für die Glaslattensandwichs
2	Große Glasplatten
2	Kleine Glasplatten
4	Teflonkämme mit jeweils einem großen und einen kleinem Zahn
2	1,5 mm Spacer (Abstandhalter zwischen den Glasplatten)

Tabelle 10: Technische Hilfsmittel

Produkt	Firma
Analysenwaage Typ 1702004	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav Typ 24	Melag, Apparate GmbH, Deutschland
pH-Meter pH 510	Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Magnetrührer, IKAMAG®	Janke & Kunzel, Staufen, Deutschland
Schüttler Type REAX 3	Heidolph, Deutschland

Tabelle 11: Erforderliche Reagenzien

Reagenz	Firma
Acylamidlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio Rad [®] , Richmond, Kalifornien, USA
<i>Aqua bidest.</i>	Spicker, Baiersbrunn, Deutschland
Bromphenolblau	Merk, Darmstadt, Deutschland
4-Chloro-1-Naphtol-Lösung	Sigma, St. Louis, USA
Bisacrylamidlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Isobutanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Konjugat (Ziegen-IgG-anti-Katze-IgG)	ICN/Cappel, Aurora, Ohio, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merk, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA
Natriumphosphat (monobasisch)	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA
Natriumphosphat	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA
Vorgefärbte Proteinmarker	Bio Rad [®] , Richmond, Kalifornien, USA
Schweinegelantine	Sigma, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylenediamin (Temed)	Bio Rad [®] , Richmond, Kalifornien, USA
Hydroxymethyl-Aminomethan-HCl (TRIS-Cl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X100	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Wasserstoffperoxid 30 %	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, USA

Bei jedem Arbeitsdurchgang wurden zwei Trenn- und Laufgele hergestellt. Als erstes wurde die Apparatur sorgfältig gewaschen und getrocknet, um eine Kontamination mit Fremdproteinen zu vermeiden. Nach dem Aufbau wurden in die beiden Plastikkammern des Gießständers je ein Glasplattensandwich eingesetzt. Diese wurden in zwei Klammern eingeschnallt und mit Zugschrauben befestigt. Die Zutaten für die Laufgele (Tabelle 12) wurden in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Zuletzt wurden die Substanzen, die zu einer raschen Polymerisation führen (z. B. TEMED), hinzugefügt. Die Gele wurden zwischen die beiden Glasplatten des Glasplattensandwichs gegossen und mit gesättigten Isobutanol überschichtet. Da Isobutanol leichter als Wasser ist, schwimmt es zunächst auf dem Gel und diffundiert dann langsam zu Boden. Zum einem wurde dadurch die Bildung von Gasblasen verhindert, zum anderen bildete sich eine glatte Geloberfläche. Nach ca. einer halben Stunde wurde die Oberfläche des ausgehärteten Gels gespült und mit Whatman-Papier (Chromatographiepapier) getrocknet. Die Trenngele (Tabelle 13) wurden auf die Oberfläche der Laufgele aufgebracht und anschließend die Teflonkämme zwischen die beiden Glasplatten

geschoben. Nach ausreichender Aushärtung des Trenn-Gels wurden die beiden Plastikklammern mit den Gelen aus dem Gießständer genommen und in den Elektrophoreseständer eingehängt. Der Elektrophoreseständer bildete mit den seitlichen Klammern die innere, das Kunststoffbecken, in das der Ständer eingehängt wurde, die äußere Pufferkammer. Die innere Pufferkammer wurde bis oben mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 14) gefüllt, so dass auch die Kämme mit Flüssigkeit bedeckt waren. Das äußere Becken wurde bis zur Hälfte mit Puffer aufgefüllt. Danach wurden die Gele beladen. Dazu wurde der Laemmli-Puffer (Tabelle 15) mit den FIV-Antigen-Komponenten fünf Minuten auf 95 °C erhitzt, um eine ausreichende Denaturierung der Proteine zu erreichen. Nachdem die Teflonkämme vorsichtig aus den beiden Glasplattensandwichs entfernt worden waren, wurde der antigenhaltige Laemmli-Puffer jeweils in die große Kavität der Gele eingefüllt. Da der Laemmli-Puffer durch das Glycerol wesentlich schwerer ist als der Elektrophoresepuffer, sank er auf den Boden der Gellücke ab. In die kleine Kavität wurden 5 bis 10 µl Marker (prestained protein low molecular weight marker) mit einer Hamiltonpipette vorsichtig eingefüllt. Vor Beginn der Elektrophorese wurden sämtliche Luftblasen, die sich am unteren Ende des Gels befanden, entfernt, da sie das elektrische Feld stören und das Abwärtswandern der Proteine beeinträchtigen. Danach wurde der Kammerdeckel mit den beiden Elektroden auf das Becken gesetzt und so der Stromkreis geschlossen. Das Netzgerät wurde eingeschaltet und auf 50 Volt eingestellt. Durch Aufsteigen kleiner Luftblasen wurde die zwischen beiden Pufferkammern entstandene Spannung angezeigt. Das dadurch erzeugte elektrische Feld ermöglichte die Wanderung der negativ geladenen Proteine im Gel. Nach ca. einer halben Stunde hatte die Lauffront des Laemmli-Puffers das Trenngel durchwandert und war im Laufgel angekommen. Die Spannung wurde auf 70 Volt erhöht. Nach ca. vier Stunden war die Lauffront am unteren Gelrand angekommen und die Elektrophorese abgeschlossen. Die Gele wurden aus den Glasplatten genommen. Dazu wurden die Plastikklammern aus dem Elektrophoreseständer entfernt, die Schrauben der Klammern gelockert und das Glasplattensandwich vorsichtig herausgeschoben. Mit Hilfe von Spacern wurden die Glasplatten voneinander getrennt, die oberen Laufgele abgeschnitten und die festeren Trenngele herausgenommen.

Tabelle 12: Rezept für zwei Laufgele

Menge	Reagenz
10,00 ml	30%-ige Acrylamidlösung
1,70 ml	1%-ige Bisacrylamidlösung
5,00 ml	1,5 M TRIS-Cl Puffer, pH 8,8
2,90 ml	Aqua bidest.
200 µl	10%-ige SDS-Lösung
200 µl	10%-ige APS-Lösung
6,70 µl	Temed

Tabelle 13: Rezept für zwei Trenngele

Menge	Reagenz
1,33 ml	30%-ige Acrylamidlösung
1,00 ml	1%-ige Bisacrylamidlösung
2,50 ml	0,5-M TRIS-Cl Puffer, pH 6,8
4,75 ml	Aqua bidest.
100 µl	10%-ige SDS-Lösung
300 µl	10%-ige APS-Lösung
10 µl	Temed

Tabelle 14: Reagenzien für Elektrophoresepuffer

Menge	Reagenz
30,30 g	Tris-Cl (0,05 M)
142,70 g	Glycin (0,38 M)
5,0 g	SDS (0,1 %)
in 5 l	Aqua bidest.

Tabelle 15: Rezeptur für Antigen-Laemmli-Puffer

Menge	Reagenz
1,88 ml	TRIS-Cl
300 mg	SDS
0,87 ml	Aqua bidest.
1,50 ml	Glycerol
0,75 ml	2-Mercaptoethanol
30 µl	Bromphenolblau
600 µl	FIV-Antigene: KSU ₃ (17 kD) GTM ₂ (36 kD) F ₄ sucrose material (24 kD)
in 5 ml	LSB (3-fach konzentrierter Laemmli-Puffer)

2.3.1.2. Herstellung der Blotstreifen

Die für die Herstellung der Blotstreifen benötigten Reagenzien und technischen Hilfsmittel sind in den Tabellen 10 und 11 aufgelistet. In einer mit Blotpuffer (Tabelle 16) befüllten Plastikwanne befanden sich zwei aufgeklappte Gelhalterungen mit jeweils darauf liegenden nassen Schaumstoff, nassem

Wattmannpapier und feuchter Nitrozellulose. Die beiden Trenngele wurden auf die Nitrozellulosemembran gelegt und die Laufrichtung der Proteine mit einem Pfeil markiert. Mit Hilfe einer 10 ml-Pipette wurde die Gele mit Blotpuffer übergossen und unter leichtem Druck ausgerollt, um alle Luftblasen zwischen Gel und Nitrozellulose zu entfernen. Anschließend wurde die zweite Schicht von nassem Wattmannpapier und Schaumstoff aufgelegt, die Halterung unter Druck verschlossen und in die Trans-Blot-Elektrode eingeschoben. Die mit beiden Gelen bestückte Trans-Blot-Elektrode wurde so in den Puffertank eingehängt, dass sich die Gele auf der Seite der Kathode und die Nitrozellulose auf der Seite der Anode befanden. Dadurch konnten die negativ geladenen Proteine auf die Nitrozellulosemembran zuwandern. Der Tank wurde bis oben mit Blotpuffer aufgefüllt und mit einem Magnetrührer bestückt. Mit Aufsetzen des Tankdeckels wurden die Elektroden miteinander verbunden. Bei einer Spannung von 30 Volt wurden über Nacht die Proteine von Trenngel auf die Nitrozellulose übertragen (blotten). Am nächsten Morgen wurden die Nitrozellulosemembrane aus der Halterung genommen, auf eine Plexiglasunterlage gelegt und in ca. 30 gleichbreite (2 - 3 mm) Streifen geschnitten, die mit einer fortlaufenden Nummer versehen wurden. Die äußersten Streifen wurden verworfen, die übrigen zusammen mit einem Markerstreifen in ein verschließbares Plastikröhrchen gegeben, das mit Blotpuffer gefüllt war.

Tabelle 16: Rezeptur für Blotpuffer

Anteil	Reagenz
3l	Elektrophoresepuffer
1,8 ml	<i>Aqua bidest.</i>
1,2 ml	Methanol

2.3.1.3. Inkubation der Blotstreifen

Zunächst wurden die Blotstreifen, die in PBS bei – 20 °C aufbewahrt wurden, im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Jeder Blotstreifen wurde in eine Vertiefung der vorher gründlich mit Spülmittel gereinigten Inkubierschalen gelegt und mit einem nach Anleitung hergestelltem Gelatinepuffer (Tabellen 17 und 18) für 30 Minuten inkubiert. Durch die Gelatine und die waschaktiven Substanzen des Puffers wurden unspezifische Bindungen abgesättigt, die durch Proteinverunreinigungen auf der Nitrozellulose zustande kommen. Nach 30 Minuten wurde der Puffer abgesaugt. Auf jeden Blotstreifen bzw. in jede Vertiefung wurden 490 µl

Gelatinepuffer und 10 µl Testserum pipettiert. Als Positivkontrolle wurde auf einem Blotstreifen Gelatinepuffer und 10 µl Serum einer experimentell infizierten, im Western Blot positiven Katze, gegeben. Die Inkubierschalen wurden für eine Stunde auf einen Schüttler gestellt.

Nach Absaugen des Puffers und des Testserums wurden die Streifen in den Vertiefungen dreimal für je zehn Minuten mit Gelatinepuffer gewaschen. Anschließend folgte die Zugabe von jeweils 500 µl 1:500 mit Gelatinepuffer verdünntem Konjugat (Peroxidase-konjugiertes-anti-Katzen-IgG aus der Ziege), pro Vertiefung, und eine weitere einstündige Inkubation. Nach einer Stunde wurde das Konjugat aus den Vertiefungen entfernt und die Streifen erneut in den Vertiefungen dreimal für je zehn Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde jeder Streifen mit 500 µl Substrat inkubiert. Das Erscheinen der Banden konnte in den folgenden Minuten beobachtet werden. Um die Reaktion zu beenden, wurde das Substrat nach ca. fünf bis acht Minuten aus den Vertiefungen entfernt und die Streifen mit PBS und *Aqua dest.* gespült. Nach weiteren zehn Minuten wurden die Streifen aus den Vertiefungen genommen und auf Filterpapier getrocknet. Zur Dokumentation wurden die einzelnen Streifen aufgeklebt. Die Seren galten als positiv für FIV, wenn auf dem Streifen mindestens zwei Banden im Bereich des TM2-/SU3-Proteins und/oder im Bereich des p24-/p15-Proteins zu erkennen waren.

Tabelle 17: Rezeptur für PBS Lösung (pH 7,2)

Menge	Reagenz
85,00 g	Natriumchlorid
21,75 g	Natriumphosphat (bibasisch)
3,50 g	Natriumphosphat (monobasisch)
in 10 l	<i>Aqua bidest.</i>

Tabelle 18: Rezeptur für Gelatine Puffer

Menge	Reagenz
5,00 g	Schweinegelatine
in 1 ml	Triton-X-100
in 1 l	PBS

Tabelle 19: Rezeptur für Substrat

Menge	Reagenz
500,0 µl	4-Chloro-1-Naphthol-Lösung
0,5 µl	30 % Wasserstoffperoxid

2.3.2. Virusisolierung

Alle FeLV-positiv reagierenden Proben und 81 FeLV-negative Proben, die willkürlich ausgewählt wurden, wurden auf Trockeneis zu Prof. Dr. Jarrett, Institut of Veterinary Pathology, Glasgow, UK, geschickt.

Am Tag 1 wurden 5×10^4 QN10-Zellen in jede der 22 mm großen Vertiefungen der Platten eingesetzt und mit 1 ml Wachstumsmedium (Tabelle 20) sowie 4 µg/ml Polybrene[®] (Hexadimethrine Bromid, Abbott Laboratories, USA) versetzt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C in einem Brutschrank mit einer 5%-igen CO₂-Konzentration inkubiert.

Am Tag 2 wurden 0,2 ml der Testseren in jede Vertiefung pipettiert und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde ebenfalls mit angesetzt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um eine zehnfache Verdünnungsreihe eines FeLV-A-Stocks. Nach der Inkubation wurde das Serum von der Zellschicht entfernt, mit 1,5 ml Wachstumsmedium ersetzt und die Inkubation fortgesetzt.

Am Tag fünf bis Tag sieben wurden die Platten nach spezifischen Transformationsstellen, die auf ein positives Ergebnis deuten, untersucht. Die Proben, bei denen keine Veränderung der Zellen sichtbar waren, wurden nochmals subkultiviert. Bei der Subkultivierung wurde das Wachstumsmedium aus den Vertiefungen entfernt und mit 250 µl Trypsin-Versen-Mischung, die eine Loslösung der Zellen untereinander verursacht, ersetzt. Sobald sich die Zellen voneinander lösten, wurden sie in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert, auf die nummerierten Petrischalen (5 cm Durchmesser) aufgebracht und mit weiteren 4 ml Wachstumsmedium versetzt. Auch bei der Subkultivierung wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mit angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Petrischalen erneut nach Transformationsstellen untersucht. Kam es zu keinen spezifischen Transformationen in den Schalen, so wurde die Virusisolierung als negativ bewertet. Waren spezifischen Transformationen erkennbar, so war die Virusisolierung positiv.

Tabelle 20: Komponenten des Wachstumsmedium

% Anteil	Reagenz
	HEPES-Puffer mit Dulbecco's MEM (GiboBRL cat. No 42430-025)
10 %	fetales Kälberserum
1 %	100mM Natrium Pyruvat (Gibo cat. No 11360-039)
1 %	200mM L-Glutamin (Gibo cat. No 25030-024)
4 %	10000 IU/ml Penicillin Streptomycin (Gibo cat. No 15140-114)

2.4. Verdünnungsreihe

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Serum einer FIV-positiven Katze (Western Blot bestätigt) und einer FeLV-positiven Katze (Virusisolierung positiv) angelegt. Die Sera wurden exponentiell in neun Verdünnungsstufen mit den Seren FIV- bzw. FeLV-negativer Katzen verdünnt. Die letzte Stufe betrug die Verdünnung 1: 256. Von jedem Testsystem wurde je ein Test mit dem unverdünnten Serum einer positiven Katze sowie je ein Test mit jeder angelegten Verdünnungsstufe durchgeführt. Das Testsystem One-Step® FeLV fehlt bei diesem Experiment, da nicht genügend Testkits zur Verfügung standen. Anhand der noch ablesbaren Positivbande und der Farbintensität der ELISA-Vertiefungen konnte die Sensitivität der Tests bei den einzelnen Verdünnungsstufen erfasst werden. Die Verdünnungsreihe gibt Auskunft über die Sensitivität der einzelnen Testsysteme bezüglich der Antigen- und Antikörperkonzentrationen.

2.5. Auswertung

Die einzelnen Testergebnisse wurden nach den nachfolgend beschriebenen Kriterien ausgewertet.

2.5.1. Kriterien

Jedes einzelne Testsystem wurde nach den Kriterien der Auswertbarkeit, der Ablesbarkeit, der positiven, negativen, falschpositiven und falschnegativen Testergebnisse, der Sensitivität, der Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Wertes beurteilt.

2.5.1.1. Auswertbarkeit

Der Test galt als „auswertbar“, wenn er innerhalb der vorgegebenen Reaktionszeit und einer Verzögerungszeit von fünf Minuten eine sichtbare Kontrollbande

erkennen ließ, und wenn das Ergebnisfeld trotz Verwaschungen und Verfärbungen noch zu beurteilen war. Er wurde in die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem prädiktiven Wert mit einbezogen. Testsysteme, die im genannten Zeitraum keine Kontrollbande anzeigten oder das Ergebnisfeld derart verändert war, dass die Beurteilung einer eventuellen Positivbande nicht möglich war, wurden als „nicht auswertbar“ beurteilt und in keine Berechnung mit einbezogen. Der prozentuale Anteil aller auswertbaren Testergebnisse an der Gesamtzahl aller durchgeführten Tests eines Testsystems ergab die Auswertbarkeit dieses Testsystems.

2.5.1.2. Ablesbarkeit

Alle Testergebnisse, die als „auswertbar“ galten, wurden zusätzlich noch nach ihrer Ablesbarkeit beurteilt. Zeigten sich während der angegebenen Reaktionszeit auf dem Teststreifen Verfärbungen oder war das Sichtfeld durch unregelmäßig verlaufende Reaktionsflüssigkeiten verlaufen, so dass das Ablesen der Banden deutlich beeinträchtigt, aber noch möglich war, galt der Test als „schlecht ablesbar“. Auch das Erscheinen von verzögerten oder schwach sichtbaren Reaktionsbanden oder von Banden, die zwar gut sichtbar waren, aber nicht über die gesamte Breite des Teststreifens erschien, führte zur Bewertung schlecht ablesbar. Testergebnisse, die durch keine der genannten Störfaktoren beeinträchtigt wurden, galten als „gut ablesbar“. Die Ablesbarkeit eines Testsystems errechnete sich aus dem prozentualen Anteil aller gut ablesbarer Testergebnisse an der Gesamtzahl aller auswertbaren Testergebnisse dieses Testsystems.

2.5.1.3. Positives Testergebnis

Ein Test wurde als „positiv“ beurteilt, wenn er auswertbar war und zusätzlich zur Kontrollbande eine Positivbande im Ergebnisfenster erschien. Alle positiven Testergebnisse wurden den jeweiligen Bestätigungsverfahren unterzogen. Wurde die Probe im Verfahren, das als der „goldene Standard“ festgelegt worden war, als positiv bestätigt, ging das Testergebnis als „richtigpositiv“ in die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert des Testsystems ein. War das Resultat des Bestätigungsverfahrens negativ, so wurde das Testergebnis als „falschpositiv“ bewertet.

2.5.1.4. Negatives Testergebnis

Ein Test wurde als „negativ“ beurteilt, wenn er auswertbar war und im Ergebnisfeld keine Positivbande erschien. Nicht alle negativen Ergebnisse wurden den jeweiligen Bestätigungsverfahren unterzogen. Bei FIV wurden 100 negative Proben und bei FeLV 81 negative Proben, die zufällig ausgewählt wurden, bestätigt. Wurde bei einem negativen Testergebnis ein positives Bestätigungsergebnis erreicht, so ging das negative Testergebnis bei der Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen prädiktiven Wert für das Testsystem als „falschnegatives“ Testergebnis ein.

2.5.1.5. Falschpositives Testergebnis

Ein Testergebnis wurde als „falschpositiv“ bewertet, wenn die Probe, die im Test als positiv beurteilt wurde, im Bestätigungstest ein negatives Ergebnis zeigte. Falschpositive Ergebnisse wurden in die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem prädiktiven Wert des Testsystems mit einbezogen.

2.5.1.6. Falschnegatives Testergebnis

Ein Testergebnis wurde als „falschnegativ“ bewertet, wenn die Probe, die im Test als negativ beurteilt wurde, im Bestätigungstest ein positives Ergebnis zeigte. Falschnegative Ergebnisse wurden in die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positivem und negativem prädiktiven Wert des Testsystems mit einbezogen.

2.5.1.7. Sensitivität

Die Sensitivität drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der ein Testergebnis positiv sein wird, wenn in der Probe Antigene oder Antikörper vorhanden sind (Abbildung 18). Die Berechnung der Sensitivität kann mit Hilfe der Vierfeldertafel erfolgen (Abbildung 17). Die Anzahl der infizierten Proben ($a + c$) sowie die Anzahl aller richtigpositiven (a) und falschnegativen (c) Testergebnisse müssen für die Berechnung bekannt sein. Die Anzahl aller im Bestätigungstest positiven Ergebnisse stellt die Anzahl aller infizierten Katzen des gesamten Probenumfangs dar. Die Infiziertenanzahl muss für jedes einzelne Testsystem errechnet werden, und hängt von der Zahl der auswertbaren Testergebnisse ab.

		Western Blot / Virusisolierung		Gesamt
		FIV-Status	FeLV-Status	
FIV-/FeLV- Testergebnis		Positiv	Negativ	
		Positiv	a	b
Negativ	c	d	c + d	
Gesamt	a + c	b + d		
Sensitivität:		$\frac{a}{a + c}$	Spezifität:	$\frac{d}{b + d}$
PPW:		$\frac{a}{a + b}$	NPW:	$\frac{d}{c + d}$

Abb. 17: Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Werts eines Testsystems (PPW = positiver prädiktiver Wert; NPW = negativer prädiktiver Wert)

$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtigpositive Testergebnisse}}{\text{Anzahl der Infizierten}} \times 100$
--

Abb. 18: Berechnung der Sensitivität

2.5.1.8. Spezifität

Die Spezifität drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der ein Testergebnis negativ sein wird, wenn in der Probe kein Antigen oder keine Antikörper enthalten sind (Abbildung 19). Für die Berechnung der Spezifität mit Hilfe der Vierfeldertafel (Abbildung 17) muss die Anzahl der nichtinfizierten Proben (b + d) sowie die Anzahl aller falschpositiven (b) und richtignegativen (d) Testergebnisse bekannt sein. Die Anzahl der Nichtinfizierten des gesamten Probenumfangs stellt die

Differenz zwischen der Gesamtzahl der Proben und der Zahl der infizierten Katzen dar. Die Anzahl der nichtinfizierten Katzen eines einzelnen Testsystems ergibt sich aus der Anzahl aller auswertbaren Testergebnisse abzüglich der Anzahl der Infizierten dieses Testsystems.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtignegative Testergebnisse}}{\text{Anzahl der Nichtinfizierten}} \times 100$$

Abb. 19: Berechnung der Spezifität

2.5.1.9. Positiver prädiktiver Wert

Er drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der bei einem positiven Testergebnis tatsächlich Antigene oder Antikörper in der Probe vorhanden sind (Abbildung 20). Für die Berechnung des positiven prädiktiven Wert mit Hilfe der Vierfeldertafel (Abbildung 19) muss die Anzahl der richtigpositiven (a) und falschpositiven (d) Testergebnisse bekannt sein. Die positiven prädiktiven Werte der einzelnen FeLV- und FIV-Testsysteme wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Prävalenzen mit Hilfe der Bayes Formel (Abbildung 21) berechnet und graphisch dargestellt. Es wurden die Prävalenzen 1 % bis 10 % gewählt.

$$\text{positiver prädiktiver Wert} = \frac{\text{richtigpositive Ergebnisse}}{\text{alle positiven Ergebnisse}} \times 100$$

Abb. 20: Berechnung des positiven prädiktiven Werts

$$\text{PPW} = P \times \text{Se} / [P \times \text{Se} + (1 - P) \times (1 - \text{Sp})]$$

Abb. 21: Bayes Formel
(PPW = positiver prädiktiver Wert; P = Prävalenz; Se = Sensitivität; Sp = Spezifität)

2.5.1.10. Negativer prädiktiver Wert

Er drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der bei einem negativen Testergebnis tatsächlich keine Antigene oder Antikörper in der Probe vorhanden sind (Abbildung 22). Für die Berechnung des negativen prädiktiven Wert mit Hilfe der Vierfeldertafel (Abbildung 17) muss die Anzahl der richtignegativen (d) und der falschnegativen Testergebnisse (c) bekannt sein.

$$\text{negativer prädiktiver Wert} = \frac{\text{richtignegative Ergebnisse}}{\text{alle negativen Ergebnisse}} \times 100$$

Abb. 22: Berechnung des negativen prädiktiven Werts

2.5.1.11. Konjunktive Auswertung

Bei der konjunktiven Auswertung wurde der positiv prädiktive Wert bei Kombination zweier FeLV- oder FIV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests positiv reagierende Probe wurde in diesem Fall als positiv gewertet. Anhand der berechneten positiv prädiktiven Werte war ein Vergleich der verschiedenen Testkombinationen möglich.

2.5.1.12. Disjunktive Auswertung

Bei der disjunktiven Auswertung wurde der negativ prädiktive Wert bei Kombination zweier FeLV- oder FIV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests negativ reagierende Probe wurde in diesem Fall als negativ gewertet. Anhand der berechneten negativ prädiktiven Werte war ein Vergleich der verschiedenen Testkombinationen möglich.

2.5.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung umfasste die Berechnungen statistisch signifikanter Unterschiede zwischen jeweils zwei Testsystemen im Bezug auf einzelne spezifische Parameter. Die Berechnungen wurden mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag vor, wenn $p < 0,05$ war.

Anhand der errechneten Signifikanzen war ein statistischer Vergleich der untersuchten FeLV- und FIV-Testsysteme möglich.

IV. Ergebnisse

1. Feline Leukämievirusinfektion

Für den Nachweis einer feline Leukämievirusinfektion wurden in der vorliegenden Studie acht verschiedene FeLV-Testsysteme untersucht und miteinander verglichen.

1.1. Durchführbarkeit der Tests

Der **Witness[®] FeLV** war in seiner Handhabung und Durchführung einfach und praktikabel zu bedienen. Das Ablesen der Ergebnisse war bei insgesamt 68 Proben aufgrund von schwachen oder verwaschenen Kontrollbanden erschwert. Nach einer zwei- bis fünfminütigen Verlängerung der Durchführungszeit wurden die Banden in der Regel klarer und besser ablesbar. Bei vier Proben waren die Positivbanden im Ergebnisfeld schwach angefärbt und erschwerten das Ablesen des Ergebnisses

Beim **Snap[®] Combo Plus** handelte es sich um ein Kombinationssystem, der auf dem Prinzip des ELISA beruhte. Seine Handhabung war einfach, erforderte aber einen zusätzlichen Arbeitsschritt, da die Proben in Vorverdünnungsröhrchen mit Konjugat vermischt wurden. Sowohl die Kontrollpunkte als auch die Testpunkte waren deutlich erkennbar und gut ablesbar. Bei zwei Proben waren die Testpunkte nach Ablauf der Durchführungszeit nur schwach angefärbt und erschwerten das Ablesen der Ergebnisse. Der **Snap[®] Combo Plus** musste gekühlt (2 °C – 7 °C) gelagert werden.

Der **One-Step[®] FeLV** war in seiner Handhabung mit einem minimalen Arbeitsaufwand verbunden und einfach durchzuführen. Bei diesem Testsystem waren insgesamt 69 Proben, zum einem durch das nicht Erscheinen von Kontrollbanden und zum anderen durch rosa Verfärbungen der Ergebnisfenster nicht auswertbar. In anderen Fällen wurde die Serumprobe mit der zugegebenen Pufferlösung vom Teststreifen nicht vollständig absorbiert und nach Ablauf der Durchführungszeit stand die Flüssigkeit noch im Ergebnisfenster und verhinderte die Auswertung. Das Ablesen der Ergebnisse war bei insgesamt 20 Proben aufgrund von schwachen oder verwaschenen Kontrollbanden erschwert. Bei 17

Proben waren die Ergebnisbanden undeutlich angefärbt, so dass das Ablesen ebenfalls behindert wurde.

Die Testdurchführung war beim **Mapic[®] FeLV** einfach und unkompliziert. Es fielen das häufige Nichterscheinen der Kontrollbande und die bläuliche Verfärbung und Verwaschung des gesamten Ergebnisfeldes auf. Insgesamt 115 Proben waren aus diesen Gründen nicht auswertbar und wurden in die anschließende Bewertung nicht mit einbezogen. Das Ablesen der Ergebnisse war bei 18 Proben aufgrund von schwachen oder verwaschenen Kontrollbanden und bei einer Probe aufgrund einer schwach angefärbten Ergebnisbande erschwert.

Die Handhabung und Testdurchführung des **FASTest[®] FeLV** war unkompliziert und mit einem minimalen Arbeitsaufwand verbunden. Die Banden wiesen insgesamt eine gute Breite und eine deutliche Farbintensität auf. Eine Probe war durch das Fehlen der Kontrollbande nicht auswertbar. Bei sieben Proben waren die Ergebnisbanden nur leicht angefärbt, so dass das Ablesen der Ergebnisse erschwert war.

Beim **DUO Speed[®] FeLV** handelte es sich um ein kombiniertes Testsystem, das den parallelen Nachweis von FeLV-Antigen und FIV-Antikörpern ermöglichte. Die Testdurchführung war einfach und die Ergebnisse für den Untersuchenden leicht abzulesen. Bei insgesamt zehn Proben waren nach Ablauf der Durchführungszeit keine Kontrollbanden erkennbar und somit nicht auswertbar. Das Ablesen der Ergebnisse war bei acht Proben aufgrund von schwach angefärbten Ergebnisbanden erschwert.

Der **Virachek[®] FeLV** war ein auf Mikrotiterplatten arbeitendes ELISA-System, dessen Handhabung Erfahrung im Bereich der Labortechnik erforderte. Das Testsystem wurde gekühlt (2 °C – 7 °C) gelagert und wurde vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht. Für die Durchführung waren insgesamt sechs Arbeitsschritte notwendig und bei jedem Testdurchgang wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Das visuelle Ablesen der Ergebnisse war bei acht Proben erschwert, da sie eine schwächere Blaufärbung als die Positivkontrolle zeigten.

Beim **PetChek[®] FeLV** handelte es sich ebenfalls um ein auf Mikrotiterplatten arbeitendes ELISA-System. Für die Handhabung und Durchführung waren labor-technische Kenntnisse erforderlich und die gekühlten Reagenzien mussten vor

Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Für die Durchführung waren sechs Arbeitsschritte notwendig. Die Testergebnisse wurden beim PetChek[®] FeLV visuell abgelesen und es war bei insgesamt sechs Proben schwierig, visuell zu entscheiden, ob die Farbintensität einer Probe mehr oder weniger als 50 % der Farbintensität der Positivkontrolle betrug. Die Gebrauchsanweisung des Herstellers erschien in diesem Punkt sehr vage und ungenau.

1.2. Diagnostische Qualität der Tests

Die diagnostische Qualität der einzelnen Testsysteme wurde nach den Kriterien der Auswertbarkeit, der Ablesbarkeit, der positiven, negativen, falschpositiven und falschnegativen Testergebnisse, der Sensitivität, der Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Wertes beurteilt. Bei der Beurteilung der acht verschiedenen FeLV-Testsysteme wurden zwei unterschiedliche Auswertungen vorgenommen (Tabelle 22 und 23), da es beim Testen der FeLV-Proben bei insgesamt 17 Proben zu "nicht bestätigbaren Ergebnissen" kam (Tabelle 24). Diese zeigten in allen ELISA-Systemen und Immunochromatographie-Schnelltests positive Ergebnisse an, die in der Virusisolierung jedoch nicht bestätigt wurden. In der ersten Auswertung wurden nur die 22 Proben als Richtigpositive beurteilt, die in der Virusisolierung bestätigt wurden (Tabelle 25). Bei der zweiten Auswertung wurden die 17 Proben mit "nicht bestätigbaren Ergebnissen" zusätzlich als Richtigpositive gewertet. Bei fünf Proben fielen die Ergebnisse der einzelnen Testsysteme unterschiedlich aus (Tabelle 26). In der Virusisolierung waren sie negativ und wurden in der Bewertung als negative Proben gewertet.

Tabelle 22: Auswertung von acht verschiedenen FeLV-Testsystemen ohne Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

(Anz. = Anzahl; pos. = positiv; neg. = negativ; Testergeb. = Testergebnisse; VI = Virusisolierung; präd. = prädiktiv)

	Wit- ness®	Snap®	FASTest®	DUO Speed®	Vira- chek®	Pet- Chek®	Mapic®	One- Step®
Anzahl (n)	528	528	528	528	528	528	378	517
ungültig	7 1,3 %	3 0,6 %	1 0,2 %	10 1,9 %	1 0,2 %	2 0,4 %	115 30,4 %	69 13,3 %
berechnetes n	521	525	527	518	527	526	263	448
schlecht auswertbar	72 13,8 %	2 0,4 %	7 1,3 %	8 1,5 %	8 1,5 %	6 1,4 %	19 7,2 %	37 8,4 %
Anz. pos. bestätigter Proben (VI)	22	22	22	21	22	22	6	18
Prävalenz	4,2 %	4,2 %	4,2 %	4,1 %	4,2 %	4,2 %	2,3 %	4,0 %
Anz. pos. Testergeb.	47 9,1 %	49 9,3 %	42 8,0 %	40 7,7 %	45 8,5 %	41 7,8 %	9 3,4 %	50 11,2 %
Anz. neg. Testergeb.	474 90,9 %	476 90,7 %	485 92,0 %	478 92,3 %	482 91,5 %	485 92,2 %	254 96,6 %	398 88,8 %
Anz. richtigpos.	19 40,4 %	19 38,8 %	20 47,6 %	19 47,5 %	20 44,4 %	19 46,3 %	5 55,6 %	17 34,0 %
Anz. falschpos.	28 59,6 %	30 61,2 %	22 52,4 %	21 52,5 %	25 55,6 %	22 53,7 %	4 44,4 %	33 66,0 %
Anz. richtigneg.	471 99,4 %	473 99,4 %	483 99,6 %	476 99,6 %	480 99,6 %	482 99,4 %	253 99,6 %	397 99,7 %
Anz. falschneg.	3 0,6 %	3 0,6 %	2 0,4 %	2 0,4 %	2 0,4 %	3 0,6 %	1 0,4 %	1 0,3 %
Sensitivität	86,4 %	86,4 %	91,0 %	90,5 %	91,0 %	86,4 %	83,3 %	94,4 %
Spezifität	94,4 %	94,0 %	95,6 %	96,8 %	95,0 %	95,6 %	98,4 %	92,3 %
pos. präd. Wert	40,4 %	38,8 %	47,6 %	47,5 %	44,5 %	46,3 %	55,6 %	34,0 %
neg. präd. Wert	99,4 %	99,4 %	99,6 %	99,6 %	99,6 %	99,4 %	99,6 %	99,7 %

Tabelle 23: Auswertung von acht verschiedenen FeLV-Testsystemen mit Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

(Anz. = Anzahl; pos. = positiv; neg. = negativ; Testergeb. = Testergebnisse; VI = Virusisolierung)

	Wit- ness®	Snap®	FASTest®	DUO Speed®	Vira- Chek®	Pet- Chek®	Mapic®	One- Step®
Anzahl (n)	528	528	528	528	528	528	378	517
ungültig	7 1,3 %	3 0,6 %	1 0,2 %	10 1,9 %	1 0,2 %	2 0,4 %	115 30,4 %	69 13,3 %
berechnetes n	521	525	527	518	527	526	263	448
schlecht auswertbar	72 13,8 %	2 0,4 %	7 1,3 %	8 1,5 %	8 1,5 %	6 1,4 %	19 7,2 %	37 8,4 %
Anz. pos. bestätigter Proben (VI)	22	22	22	21	22	22	5	18
Anz. der darüber hinaus in allen Tests pos. Proben	16	17	16	17	17	16	3	14
Prävalenz	7,3	7,4	7,2	7,3	7,4	7,2	3,0	7,1
Anz. pos. Testergeb.	47 9,0 %	49 9,3 %	42 8,0 %	40 7,7 %	45 8,5 %	41 7,8 %	9 3,4 %	50 11,2 %
Anzahl neg. Testergeb.	474 91,0 %	476 90,7 %	485 92,0 %	478 92,3 %	482 91,5 %	485 92,2 %	254 96,6 %	398 8,8 %
Anz. richtigpos.	35 74,5 %	36 73,5 %	36 85,8 %	36 90,0 %	37 82,2 %	35 85,4 %	7 77,8 %	31 62,0 %
Anz. falschpos.	12 25,5 %	13 26,5 %	6 14,2 %	4 10,0 %	8 17,8 %	6 14,6 %	2 22,2 %	19 38,0 %
Anz. richtig negativer	471 99,4 %	473 99,4 %	483 99,6 %	476 99,6 %	480 99,6 %	482 99,4 %	253 99,6 %	397 99,7 %
Anz. falschneg.	3 0,6 %	3 0,6 %	2 0,4 %	2 0,4 %	2 0,4 %	3 0,6 %	1 0,4 %	1 0,3 %
Sensitivität	92,1 %	92,3 %	94,7 %	94,7 %	94,9 %	92,1 %	87,5 %	96,8 %
Spezifität	97,5 %	97,3 %	98,8 %	99,2 %	98,4 %	99,4 %	99,2 %	95,4 %
pos. präd. Wert	74,5 %	73,5 %	85,7 %	90,0 %	82,2 %	85,4 %	77,8 %	62,0 %
neg. präd. Wert	99,4 %	99,4 %	99,6 %	99,6 %	99,6 %	99,4 %	99,6 %	99,7 %

Tabelle 26: Darstellung der Proben mit unterschiedlichen FeLV-Testergebnissen

(pos. = positiv; neg. = negativ; (pos.) = schwach positiv; n.a. = nicht auswertbar; n.g. = nicht getestet)

Probe	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Vira- chek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]	One Step [®]
13	pos.	pos.	neg.	n.a.	(pos.)	(pos.)	n.g.	pos.
269	(pos.)	pos.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	n.a.	neg.
337	pos.	pos.	neg.	neg.	(pos.)	(pos.)	neg.	neg.
524	pos.	pos.	(pos.)	n.a.	(pos.)	neg.	neg.	n.a.
530	pos.	pos.	pos.	neg.	(pos.)	(pos.)	n.g.	neg.

1.3. Statistischer Vergleich

Der statistische Vergleich umfasste die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen jeweils zwei Testsystemen im Bezug auf einzelne spezifische Parameter. Die Berechnungen wurden mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag vor, wenn $p < 0,05$ war. Bei jedem Parameter wurden für die FeLV-Testsysteme zwei Berechnungen vorgenommen. In der ersten Berechnung wurden nur die Proben als Richtigpositive gewertet, die in der Virusisolierung bestätigt wurden. In der zweiten Berechnung wurden zusätzlich die 17 Proben als Richtigpositive gezählt, die in allen ELISA-Systemen positiv, aber in der Virusisolierung negativ waren.

Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus p in Bezug auf die Anzahl richtiger Ergebnisse unterschieden sich die beiden schlechteren Testsysteme One-Step[®] und Snap[®] Combo Plus statistisch signifikant von den besseren Testsystemen FASTest[®], DUO Speed[®], Virachek[®] und PetChek[®]. Ein statistischer Unterschied wurde ebenfalls zwischen dem Witness[®] (schlechterer Test) und den besseren Testsystemen FASTest[®], DUO Speed[®] und PetChek[®] berechnet (Tabelle 27). Dieselben Ergebnisse wurden auch bei der zweiten Berechnung, bei der die 17 “nicht bestätigbaren“ Proben zusätzlich als Richtigpositive gewertet wurden, berechnet (nicht dargestellt).

Tabelle 27: Statistischer Vergleich von jeweils zwei FeLV-Testsystemen unter Berücksichtigung der Anzahl richtiger Ergebnisse

(* = statistisch signifikanter Unterschied)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]	One-Step [®]
Witness [®]		1,0000	0,0114*	0,0339*	0,0253*	0,1025	0,5637	0,0881
Snap [®]			0,0114*	0,0196*	0,0253*	0,0455*	0,3173	0,1615
FASTest [®]				1,0000	0,4795	0,2568	0,5637	0,0028*
DUO Speed [®]					0,6547	0,1797	0,3173	0,0016*
Virachek [®]						0,5637	1,0000	0,0046*
PetChek [®]							0,5637	0,0164*
Mapic [®]								1,0000
One-Step [®]								

Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus p im Bezug auf den positiven prädiktiven Wert unterschied sich der Test Snap[®] Combo Plus statistisch signifikant von den besseren Testsystemen FASTest[®], DUO Speed[®], Virachek[®] und PetChek[®]. Statistisch signifikante Unterschiede wurden ebenfalls zwischen den beiden schlechteren Testsystemen One-Step und Witness und den Testsystemen FASTest[®], DUO Speed[®], Virachek[®] und PetChek[®] aufgewiesen (Tabelle 28). Bei der zweiten Berechnung mit Berücksichtigung der diskrepanten Proben wurden mit einer Ausnahme dieselben Ergebnisse ermittelt. Im Gegensatz zur ersten Berechnung wurde zwischen dem One-Step[®] (als schlechterer Test) und dem Witness[®] (als besserer Test) ein statistisch signifikanter Unterschied berechnet (nicht dargestellt).

Tabelle 28: Statistischer Vergleich von jeweils zwei FeLV-Testsystemen unter Berücksichtigung des positiven prädiktiven Werts

(* = statistisch signifikanter Unterschied)

	Witness [®]	Snap [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]	One-Step [®]
Witness [®]		1,000	0,0128*	0,0341*	0,0289*	0,1026	0,5639	0,1702
Snap [®]			0,0128*	0,0198*	0,0304*	0,0456*	0,3181	0,3080
FASTest [®]				1,000	0,4963	0,2511	0,5639	0,0043*
DUO Speed [®]					0,7029	0,1798	0,3176	0,0029*
Virachek [®]						0,5152	0,9237	0,0118*
PetChek [®]							0,5639	0,0388
Mapic [®]								1,000
One-Step [®]								

1.4. Testkombinationen

Zwischen den Ergebnissen des One-Step[®] und den anderen Testsystemen, mit Ausnahme des Mapic[®], wurden zwischen 17 und 25 diskrepante Ergebnisse errechnet. Die Ergebnisse des DUO Speed[®] und des FASTest[®] stimmten bis auf ein diskrepantes Ergebnis überein. Beim Vergleich der anderen Testsysteme lag die Anzahl von diskrepanten Ergebnissen im Durchschnitt zwischen fünf und sechs Proben (Tabelle 29).

Tabelle 29: Diskrepante FeLV-Ergebnisse

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]	One-Step [®]
Witness [®]		8	10	8	5	6	3	22
Snap [®]			10	9	5	4	4	25
FASTest [®]				4	8	7	3	22
DUO Speed [®]					5	5	1	17
Virachek [®]						3	4	21
PetChek [®]							3	21
Mapic [®]								3
One-Step [®]								

1.4.1. Konjunktive Auswertung

Bei der konjunktiven Auswertung wurde der positive prädiktive Wert bei Kombination zweier FeLV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests positiv reagierende Probe wurde in diesem Fall als positiv gewertet. Bei der Auswertung der positiven prädiktiven Werte bei Kombination zweier FeLV-Testsysteme wurden zwei unterschiedliche Berechnungen vorgenommen. In der ersten Berechnung galten nur die Proben als FeLV-positiv, die in der Virusisolierung bestätigt wurden. Die höchsten Werte wurden beim Mapic[®] in Kombination mit den anderen Testsystemen errechnet. Hier ergaben sich Werte zwischen 62,5 % und 71,4 %. Für die anderen Testkombinationen wurden positive prädiktive Werte zwischen 44,2 % und 53,3 % berechnet (Tabelle 30).

Tabelle 30: Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme ohne Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

	Witness[®]	Snap[®]	FASTest[®]	DUO Speed[®]	Virachek[®]	Petchek[®]	Mapic[®]	One-Step[®]
Witness[®]		44,2	50,0	51,4	45,2	48,7	71,4	48,3
Snap[®]			47,5	48,7	43,2	46,3	62,5	46,9
FASTest[®]				51,4	48,7	51,4	62,5	53,3
DUO Speed[®]					49,0	50,0	66,6	48,4
Virachek[®]						46,3	62,5	46,9
PetChek[®]							62,5	48,4
Mapic[®]								62,5
One-Step[®]								

In der zweiten Berechnung wurden nicht nur Proben als FeLV-positiv gewertet, die in der Virusisolierung bestätigt wurden, sondern auch die 17 Proben, die in allen ELISA-Systemen positiv, aber in der Virusisolierung negativ waren. Für die Testkombination DUO Speed[®] mit Mapic[®] wurde ein positiver prädiktiver Wert von 100 % errechnet. Der niedrigste Wert wurde für die Testkombination Witness[®] mit Snap[®] errechnet. Hier ergab sich ein positiver prädiktiver Wert von 81,4 %. Für die anderen Testkombinationen wurden Werte zwischen 81,8 % und 94,6 % errechnet (Tabelle 31).

Tabelle 31: Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme mit Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	Mapic [®]	One-Step [®]
Witness [®]		81,4	91,9	94,6	83,3	87,2	85,7	93,5
Snap [®]			87,5	92,3	81,8	85,0	87,5	90,6
FASTest [®]				94,6	89,7	91,9	87,5	96,7
DUO Speed [®]					92,3	92,1	100	94,0
Virachek [®]						85,4	87,5	90,6
PetChek [®]							87,5	90,3
Mapic [®]								87,5
One-Step [®]								

1.4.2. Disjunktive Auswertung

Bei der disjunktiven Auswertung wurde der negative prädiktive Wert bei Kombination zweier FeLV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests negativ reagierende Probe wurde als negativ gewertet. Bei der Auswertung wurde für die Testkombinationen Virachek[®] mit Mapic[®] und Virachek[®] mit One-Step[®] jeweils ein negativ prädiktiver Wert von 100 % errechnet. Bei den anderen Testkombinationen lagen die errechneten Wahrscheinlichkeiten zwischen 99,4 % und 99,8 % (Tabelle 32).

Tabelle 32: Negativ prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]	One-Step [®]
Witness [®]		99,4	99,6	99,6	99,6	99,4	99,6	99,7
Snap [®]			99,6	99,6	99,6	99,4	99,6	99,7
FASTest [®]				99,6	99,8	99,6	99,6	99,7
DUO Speed [®]					99,8	99,6	99,6	99,7
Virachek [®]						99,6	100	100
PetChek [®]							99,6	99,7
Mapic [®]								99,5
One-Step [®]								

1.5. Abhängigkeit der positiven prädiktiven Werte von der Prävalenz

Bei der Berechnung der positiven prädiktiven Werte in Abhängigkeit von der Prävalenz wurden für FeLV zwei Auswertungen vorgenommen. Die Auswertungen unterschieden sich in der Anzahl richtigpositiver Ergebnisse. Bei der ersten Auswertung wurden nur die Proben als richtigpositive gewertet, die in der Virusisolierung bestätigt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. In der zweiten Auswertung wurden zusätzlich die 17 Proben, die in allen ELISA-Systemen positiv, aber in der Virusisolierung negativ waren, als richtigpositive gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. Die Prävalenzen 1 % bis 10 % wurden gewählt.

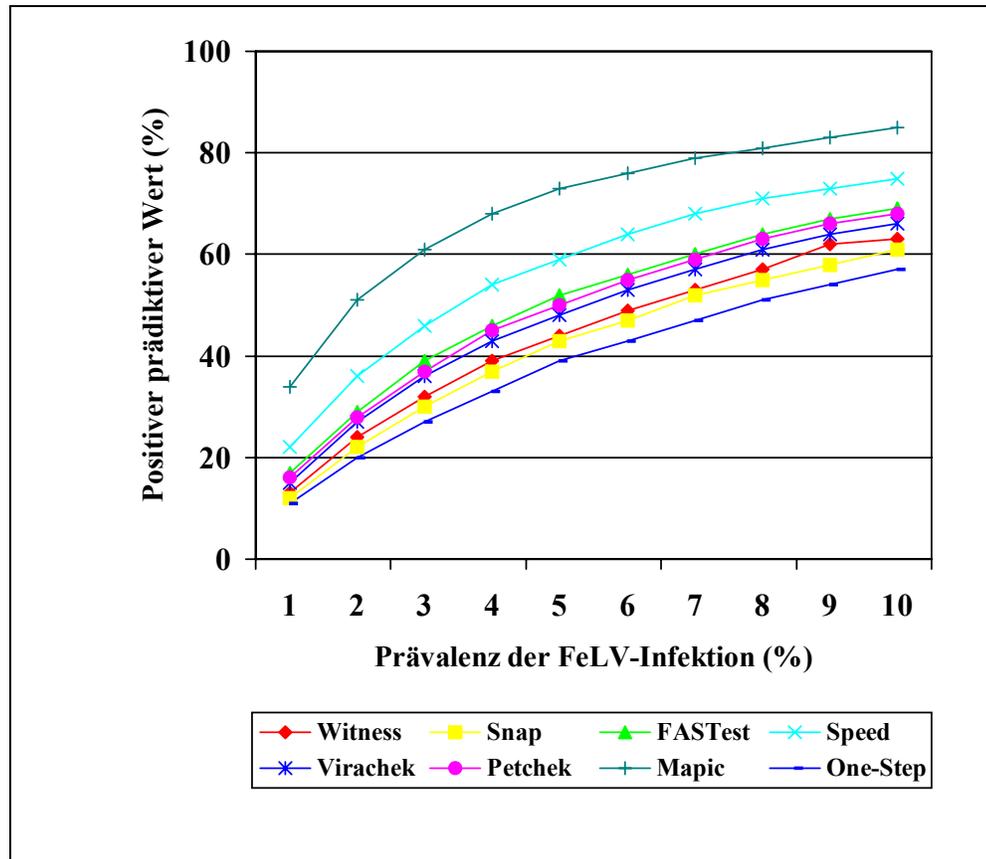


Abb. 23: Positive prädiktive Werte der geprüften FeLV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz ohne Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

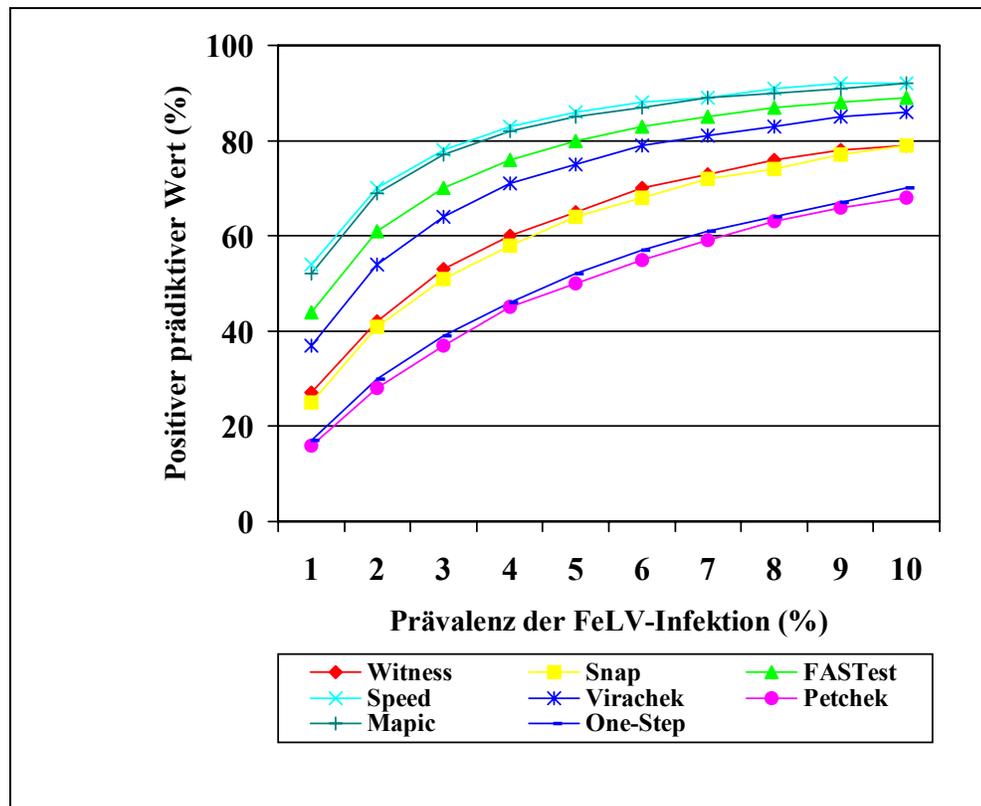


Abb. 24: Positive prädiktive Werte der geprüften FeLV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz mit Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"

1.6. Verdünnungsreihe

Um die Sensitivität der Testsysteme zu vergleichen, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Das Serum wurde exponentiell in neun Verdünnungsstufen mit Serum FeLV-negativer Katzen verdünnt. Das Testsystem Virachek[®] wies bis zur höchsten Verdünnungsstufe (1:256) FeLV-Antigen in der Probe nach (Tabelle 33). Beim Mopic[®] waren vier Ergebnisse aufgrund von Verfärbungen des Sichtfensters nicht auswertbar. Dieser Test zeigte nur in der unverdünnten und ersten Verdünnungsstufe ein positives Testergebnis an.

Tabelle 33: Ergebnisse der FeLV-Verdünnungsreihe

(n.a. = nicht auswertbar; (+) = schwach positiv; + = positiv; - = negativ)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	Duo Speed [®]	Vira-chek [®]	Pet-Chek [®]	Mapic [®]
unverdünnt	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:1	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:2	+	+	+	+	+	+	-
Verdünnung 1:4	+	+	(+)	n.a.	+	+	-
Verdünnung 1:8	-	+	n.a.	n.a.	+	+	n.a.
Verdünnung 1:16	-	+	-	-	+	+	-
Verdünnung 1:32	-	(+)	-	-	+	+	n.a.
Verdünnung 1:64	-	n.a.	-	-	+	-	-
Verdünnung 1:128	-	-	-	-	+	-	n.a.
Verdünnung 1:256	-	-	-	-	+	-	n.a.

2. Feline Immunschwächevirusinfektion

Für den Nachweis der feline Immunschwächevirusinfektion wurden in der vorliegenden Studie sieben verschiedene FIV-Testsysteme untersucht und miteinander verglichen.

2.1. Durchführbarkeit der Tests

Der **Witness[®] FIV** war in seiner Handhabung und Durchführung einfach und praktikabel zu bedienen. Die Banden waren nach Ablauf der Durchführungszeit deutlich sichtbar und gut ablesbar. Zwei Proben waren durch das Fehlen der Kontrollbanden nicht auswertbar. Bei vier Proben waren die Ergebnisbanden nach Ablauf der Durchführungszeit nur schwach angefärbt und erschwerten das Ablesen.

Beim **Snap[®] Combo Plus** handelte sich um ein kombiniertes Testsystem, das den parallelen Nachweis von FeLV-Antigen und FIV-Antikörpern ermöglichte. Seine Handhabung war einfach, erforderte aber einen zusätzlichen Arbeitsschritt, da die Proben in Vorverdünnungsröhrchen mit Konjugat vermischt wurden. Sowohl die Kontrollpunkte als auch die Testpunkte waren deutlich erkennbar und gut ablesbar. Bei drei Proben waren die Testpunkte nach Ablauf der Durchführungszeit nur schwach angefärbt und erschwerten das Ablesen des Ergebnisses. Durch das Fehlen der Kontrollbande waren sechs Proben nicht auswertbar. Der **Snap[®] Combo Plus** musste gekühlt (2 °C – 7 °C) gelagert werden.

Die Testdurchführung war beim **Mapic[®] FIV** einfach und unkompliziert. Es fiel das häufige Nichterscheinen der Kontrollbande und die bläuliche Verfärbung und Verwaschung des gesamten Ergebnisfeldes auf. Insgesamt 93 Proben waren aus diesen Gründen nicht auswertbar und wurden in die anschließende Bewertung nicht mit einbezogen. Das Ablesen der Ergebnisse war bei 24 Proben aufgrund von schwachen oder verwaschenen Kontrollbanden und bei zehn Proben aufgrund von schwach angefärbten Ergebnisbanden erschwert.

Die Handhabung und Testdurchführung des **FASTest[®] FIV** war unkompliziert und mit einem minimalen Arbeitsaufwand verbunden. Die Banden wiesen insgesamt eine gute Breite und eine deutliche Farbintensität auf. Drei Proben waren durch das Fehlen der Kontrollbanden nicht auswertbar. Bei drei Proben waren die Ergebnisbanden nur leicht angefärbt, so dass das Ablesen der Ergebnisse erschwert war.

Beim **DUO Speed[®] FIV** handelte es sich um ein kombiniertes Testsystem, das den gleichzeitigen Nachweis von FeLV-Antigen und FIV-Antikörpern ermöglichte. Die Testdurchführung war einfach und die Ergebnisse für den Untersuchenden leicht abzulesen. Bei insgesamt sechs Proben war nach Ablauf der Durchführungszeit keine Kontrollbande erkennbar und somit eine Auswertung nicht möglich. Das Ablesen der Ergebnisse war bei vier Proben aufgrund von schwach angefärbten Ergebnisbanden erschwert.

Der **Virachek[®] FIV** war ein auf Mikrotiterplatten arbeitendes ELISA-System, dessen Handhabung Erfahrung im Bereich der Labortechnik erforderte. Das Testsystem wurde gekühlt (2 °C – 7 °C) gelagert und wurde vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht. Für die Durchführung waren insgesamt sechs Arbeitsschritte notwendig und bei jedem Testdurchgang wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Das visuelle Ablesen der Ergebnisse war bei acht Proben erschwert, da die eine schwächere Blaufärbung als die Positivkontrolle zeigten. Bei insgesamt drei Proben kam es nach Ablauf der Durchführungszeit zu keiner Verfärbung der Positivkontrolle und die Proben wurden als nicht auswertbar gewertet.

Beim **PetChek[®] Plus Anti-FIV** handelte es sich ebenfalls um ein auf Mikrotiterplatten arbeitendes ELISA-System. Für die Handhabung und Durchführung waren labortechnische Kenntnisse erforderlich und die gekühlten

Reagenzien mussten vor Benutzung auf Zimmertemperatur gebracht werden. Für die Durchführung waren sechs Arbeitsschritte notwendig und die Durchführungszeit betrug 45 Minuten. Die Testergebnisse des PetChek[®] Plus Anti-FIV wurden laut der Auswertungskriterien des Herstellers mit dem ELISA-Reader abgelesen. Alle Ergebnisse waren gut ablesbar. Bei einer Probe war nach Ablauf der Durchführungszeit keine Verfärbung der Positivkontrolle erkennbar, so dass diese Probe als ungültig bewertet wurde.

2.2. Diagnostische Qualität der Tests

Die diagnostische Qualität der einzelnen Testsysteme wurde nach den Kriterien der Auswertbarkeit, der Ablesbarkeit, der positiven, negativen, falschpositiven und falschnegativen Testergebnisse, der Sensitivität, der Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Wertes beurteilt. Anhand der errechneten Werte sind die Testsysteme miteinander vergleichbar (Tabelle 34). In der nachfolgenden Tabelle 35 sind die Ergebnisse der einzelnen Testsysteme für die 55 positiv bestätigten FIV-Proben dargestellt.

Tabelle 34: Vergleich von sieben verschiedenen FIV-Testsystemen

(Anz. = Anzahl; pos. = positiv; neg. = negativ; Testergeb. = Testergebnisse;
WB = Western Blot; präd. = prädiktiv)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]
Anzahl (n)	535	535	535	535	535	535	402
ungültig	2 0,4 %	6 1,1 %	3 0,6%	6 1,1%	3 0,6 %	1 0,2 %	93 23,1 %
berechnetes n	533	529	532	529	532	534	309
schlecht auswertbar	4 0,8 %	3 0,6 %	3 0,6%	4 0,8 %	8 1,5 %	0	34 11 %
Anz. pos. bestätigter Proben (WB)	55	52	55	54	53	55	30
Prävalenz	10,3 %	9,8 %	10,3 %	10,2 %	10,0 %	10,3 %	9,7 %
Anz. pos. Testergeb.	55 10,3 %	55 10,4 %	57 10,7 %	57 10,8 %	51 9,6 %	52 9,7 %	30 9,7 %
Anz. neg. Testergeb.	478 89,7 %	474 89,6 %	475 89,3 %	472 89,2 %	481 90,4 %	482 90,3 %	279 90,3 %
Anz. richtigpos.	52 94,5 %	52 94,5 %	53 93,0 %	52 91,2 %	50 98,0 %	52 100 %	30 100 %
Anz. falschpos.	3 5,5 %	3 5,5 %	4 7,0 %	5 8,8 %	1 2 %	0	0
Anz. richtigneg.	475 99,4 %	474 100 %	473 99,6 %	470 99,6 %	477 99,2 %	479 99,4 %	268 96,0 %
Anz. falschneg.	3 0,6 %	0	2 0,4 %	2 0,4 %	4 0,8 %	3 0,6 %	11 4 %
Spezifität	99,4 %	99,4 %	99,2 %	99,0 %	99,8 %	100 %	100 %
Sensitivität	94,5 %	100 %	96,4 %	96,3 %	92,6 %	94,5 %	73,2 %
pos. präd. Wert	94,5 %	94,5 %	93,0 %	91,2 %	96,1 %	100 %	100 %
neg. präd. Wert	99,4 %	100 %	99,6 %	99,6 %	99,2 %	99,4 %	96,1 %

2.3. Statistischer Vergleich

Der statistische Vergleich umfasste die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen jeweils zwei Testsystemen im Bezug auf einzelne spezifische Parameter. Die Berechnungen wurden mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag vor, wenn $p < 0,05$ war. Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus p im Bezug auf die Anzahl richtiger Testergebnisse wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem besseren Testsystem Maptic[®] und den Testsystemen Snap[®] Combo Plus, Virachek[®] und PetChek[®] Plus Anti-FIV berechnet (Tabelle 36).

Tabelle 36: Statistischer Vergleich von jeweils zwei FIV-Testsystemen unter Berücksichtigung der Anzahl richtiger Ergebnisse

(* = statistisch signifikanter Unterschied)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	Maptic [®]
Witness [®]		0,2568	0,6547	0,7055	1,0000	0,4142	0,0522
Snap [®]			0,2568	0,1573	0,2568	0,6547	0,0209*
FASTest [®]				0,3173	1,0000	0,4142	0,0522
DUO Speed [®]					0,7055	0,2568	0,1655
Virachek [®]						0,4142	0,0114*
PetChek [®]							0,0039*
Maptic [®]							

Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus p in Bezug auf den positiven prädiktiven Wert von jeweils zwei FIV-Testsystemen wurde zwischen den einzelnen Testsystemen kein signifikanter Unterschied berechnet (nicht dargestellt).

2.4. Testkombinationen

Zwischen den Ergebnissen des Maptic[®] und der anderen Testsysteme wurden zwischen zehn und 13 diskrepante Ergebnisse errechnet. Die Ergebnisse des DUO Speed[®] und des FASTest[®] stimmten bis auf ein diskrepantes Ergebnis überein. Beim Vergleich der anderen Testsysteme lag die Anzahl von diskrepanten Ergebnissen im Durchschnitt zwischen fünf und sechs Proben (Tabelle 37).

Tabelle 37: Diskrepante FIV-Ergebnisse

	Witness[®]	Snap[®]	FASTest[®]	DUO Speed[®]	Virachek[®]	PetChek[®]	Mapic[®]
Witness[®]		5	5	6	6	6	13
Snap[®]			7	8	7	5	12
FASTest[®]				1	6	6	13
DUO Speed[®]					7	7	13
Virachek[®]						6	10
PetChek[®]							12
Mapic[®]							

2.4.1. Konjunktive Auswertung

Bei der konjunktiven Auswertung wurde der positive prädiktive Wert bei Kombination zweier FIV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests positiv reagierende Probe wurde als positiv gewertet. Die höchsten Werte wurden für PetChek[®] Plus Anti-FIV und Mapic[®] in der Kombination mit den anderen Testsystemen errechnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass Antikörper gegen FIV vorhanden waren, lag bei jeder dieser Kombinationen bei 100 %. Der niedrigste positive prädiktive Wert lag bei 92,9 % und wurde für die Testkombination DUO Speed[®] mit FASTest[®] errechnet (Tabelle 38).

Tabelle 38: Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme
 (* = statistisch signifikanter Unterschied)

	Witness[®]	Snap[®]	FASTest[®]	DUO Speed[®]	Vira- chek[®]	PetChek[®]	Mapic[®]
Witness[®]		98,0	98,1	98,1	98,0	100*	100*
Snap[®]			98,0	98,0	97,8	100*	100*
FASTest[®]				92,9	98,0	100*	100*
DUO Speed[®]					98,0	100*	100*
Virachek[®]						100*	100*
PetChek[®]							100*
Mapic[®]							

2.4.2. Disjunktive Auswertung

Bei der disjunktiven Auswertung wurde der negative prädiktive Wert bei Kombination zweier FIV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests negativ reagierende Probe wurde als negativ gewertet. Bei der Auswertung wurde für die Testkombination PetChek[®] Plus Anti-FIV mit Mapic[®] und für die Testkombinationen Snap[®] Combo Plus mit den anderen Testsystemen jeweils ein negativ prädiktiver Wert von 100 % errechnet. Bei den anderen Testkombinationen lagen die negativ prädiktiven Werte zwischen 99,6 % und 99,8 % (Tabelle 39).

Tabelle 39: Negativ prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme

(* = statistisch signifikanter Unterschied)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	PetChek [®]	Mapic [®]
Witness [®]		100	99,6	99,6	99,6	99,8	99,6
Snap [®]			100*	100*	100*	100*	100*
FASTest [®]				99,6	99,6	99,8	99,6
DUO Speed [®]					99,6	99,8	99,6
Virachek [®]						99,8	99,6
PetChek [®]							100
Mapic [®]							

2.5. Abhängigkeit der positiven prädiktiven Werte von der Prävalenz

Abbildung 25 zeigt die Abhängigkeit der positiven prädiktiven Werte von der Prävalenz einer FIV-Infektion. Die Prävalenzen 1 % bis 10 % wurden gewählt.

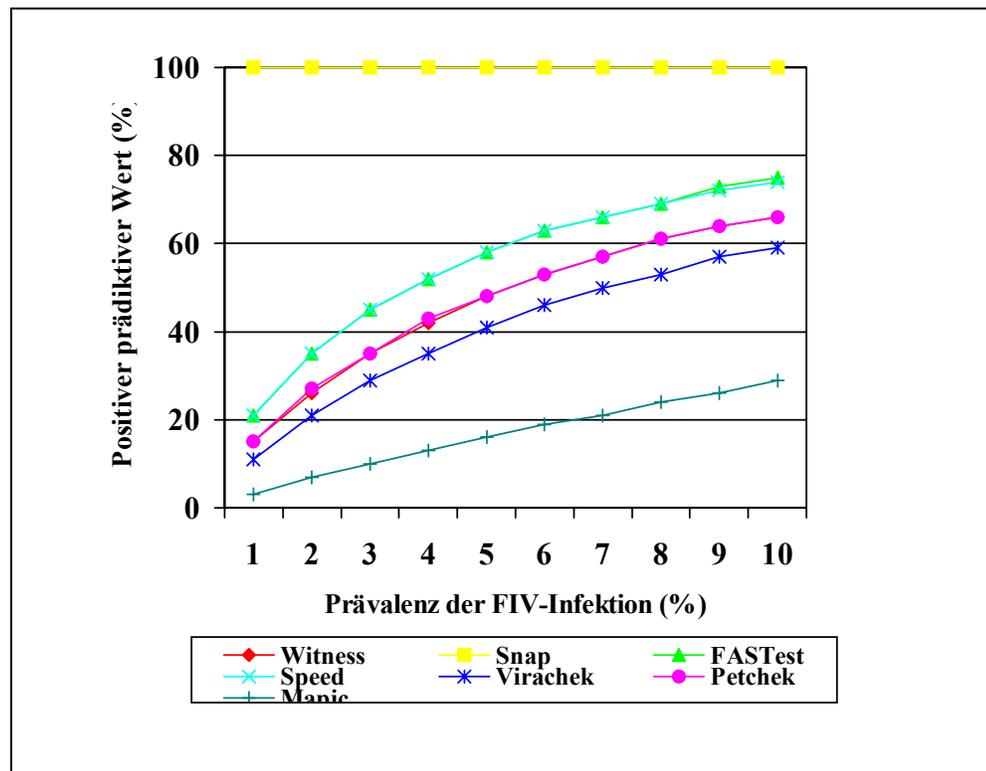


Abb. 25: Positive prädiktive Werte der geprüften FIV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz

2.6. Verdünnungsreihe

Um die Sensitivität der Testsysteme zu vergleichen, wurden Verdünnungsreihen angelegt. Die Sera wurden exponentiell in neun Verdünnungsstufen mit Seren FIV-negativer Katzen verdünnt. Virachek[®] und Witness[®] reagierten in der unverdünnten Probe schwach positiv. In den nachfolgenden Verdünnungen waren die Ergebnisse jedoch positiv und gut ablesbar. Der Virachek[®] wies FIV-Antikörper bis zur Verdünnungsstufe 1:16 nach. Alle anderen Testsysteme zeigten bis zur letzten Verdünnungsstufe deutlich positive oder, wie der Snap[®] Combo Plus und Witness[®], schwach positive Ergebnisse an (Tabelle 40).

Tabelle 40: Ergebnisse der FIV-Verdünnungsreihe

(n.a. = nicht auswertbar; (+) = schwach positiv; + = positiv; - = negativ)

	Witness [®]	Snap [®]	FASTest [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	Mapic [®]
unverdünnt	(+)	+	+	+	(+)	(+)	+
Verdünnung 1:1	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:2	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:4	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:8	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:16	+	+	+	+	+	+	+
Verdünnung 1:32	+	+	+	+	-	+	+
Verdünnung 1:64	+	+	+	+	-	+	n.a.
Verdünnung 1:128	+	(+)	+	+	-	+	+
Verdünnung 1:256	(+)	(+)	+	+	-	+	+

V. Diskussion

1. Aufbau der Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich von neuen verschiedenen Testsystemen zur Diagnose einer FeLV- und FIV-Infektion. Insgesamt wurden 535 Serumproben von gesunden und kranken Katzen mit 11 verschiedenen Testsystemen untersucht. Alle FeLV- und FIV-positiven Ergebnisse wurden mit einem spezifischeren Verfahren verifiziert. Eine Bestätigung der negativen Proben wurde mit einer partiellen willkürlich ausgewählten Anzahl von negativen Proben durchgeführt. Eine „partielle Verifikation“ wird als zuverlässige und effektive Möglichkeit angesehen, wenn die Prävalenz einer Infektion in der untersuchten Population niedrig ist und die Bestätigung aller Proben zu teuer und zu zeitaufwendig wäre (GREINER, 1999). Mit der gewählten Probenanzahl war es möglich repräsentative Werte für die Sensitivität, Spezifität und für die positiven und negativen prädiktiven Werte der einzelnen Testsysteme zu ermitteln.

Probleme ergaben sich vor allem bei der Virusisolierung, die als Bestätigungsverfahren für FeLV-positive und insgesamt 81 negative Proben ausgewählt wurde. Bei insgesamt 17 Proben kam es zu „nicht bestätigbaren Ergebnissen“. Diese zeigten in allen verwendeten ELISA- und Immunochromatographie-Testsystemen positive Ergebnisse an, die in der Virusisolierung jedoch nicht bestätigt wurden. Somit ergaben sich für alle FeLV-Testsysteme sehr niedrige positiv prädiktive Werte, die deutlich unter früheren publizierten Daten lagen. Um eine bessere Aussage über die Qualität der Testsysteme machen zu können, wurden für die unterschiedlichen FeLV-Auswertungen jeweils zwei Berechnungen vorgenommen.

1.1. Probenauswahl

Da laut Gebrauchsanweisung der Testsysteme keine negative Beeinträchtigung der Ergebnisse durch hämolytische, tiefgefrorene oder bis zu drei Tagen gekühlt gelagerte Proben zu erwarten war, mussten die verwendeten Proben keine bestimmten Qualitätskriterien erfüllen. Für die gewählten Bestätigungsverfahren (Western Blot und Virusisolierung) mussten ausschließlich Serumproben, die bei -70°C gelagert wurden, verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurden

für die Durchführung der Testsysteme ausschließlich Serumproben verwendet, die nach der Entnahme bei -70°C gelagert wurden. Die Proben wurden von Katzen aus verschiedenen Bereichen Deutschlands und der USA gewonnen. Bei den Proben aus den USA wurde ein großer Anteil aus dem Labor für infektiöse Krankheiten der University of Georgia, Athens, USA, verwendet, bei denen bereits eine FIV- oder FeLV-Infektion nachgewiesen wurde. Da bewusst Probenmaterial von verdächtigen und erkrankten Tieren untersucht wurde, war ein großer Anteil kranker Katzen vorhanden. Dies erklärt die ungewöhnlich hohen Prävalenzen für FeLV (4,3 %) und FIV (10,2 %) in dieser Studie. Da es sich um keine epidemiologische Studie handelte, sind die ermittelten Prävalenzen als nicht repräsentativ anzusehen.

In Deutschland wird für FIV eine Prävalenz zwischen 2 % und 8 % angegeben, wobei die Infektion in Norddeutschland häufiger als in Süddeutschland beobachtet wird (HARTMANN & LUTZ, 1989; NEU et al., 1989; HARTMANN et al., 1992; FUCHS et al., 1994). Die Unterschiede in der Prävalenz können durch unterschiedliche Bestandsdichten und Haltungsweisen von Katzen erklärt werden (HARTMANN & HINZE, 1991). Die Prävalenz für FeLV liegt in Deutschland zwischen 2 % und 3 %. Dies deutet auf eine Abnahme der Infektion über die letzten Jahre hin, die vor allem durch den konstanten Einsatz von „Screening and Removal“-Programmen, durch präventive Maßnahmen (z. B. Impfung, regelmäßige Durchführung von FeLV-Tests) und durch ein besseres Verständnis der FeLV-Infektion bei Tierärzten und Besitzern, erklärt werden kann (HARTMANN et al., 1999).

1.2. Bestätigungsverfahren

Als Bestätigungsverfahren wurde für FeLV-positive und 81 negative Proben die Virusisolierung und für FIV-positive und 100 negative Proben der Western Blot gewählt.

1.2.1. Virusisolierung

In der FeLV-Diagnostik gibt es als Bestätigungstest für FeLV-positive Proben keinen einheitlichen „Goldenen Standard“. Neben der Virusisolierung wird von manchen Autoren auch der Immunofluoreszenztest (IFT) oder die FeLV-PCR als

Bestätigungstest favorisiert. Mit der Virusisolierung können bei einer bestehenden Virämie bereits kleine Mengen an Virusmaterial nachgewiesen werden. Problematisch wird die Virusisolierung bei Katzen, die eine Antigenämie, aber keine Virämie aufweisen. Dies ist bei der atypischen Verlaufsform einer FeLV-Infektion möglich. Es handelt sich um eine sequestrierte Infektion, in der es zur lokalen Vermehrung des Virus z. B. in der Blase, Milchdrüse oder im Auge, ohne Beteiligung des Knochenmarks, kommt. Durch die intermittierende oder geringe Produktion von p27-Antigen, kann es zu positiven ELISA-Ergebnissen kommen, die jedoch in der Virusisolierung nicht verifiziert werden können (HOOVER & MULLINS, 1991). Diese diskrepanten Ergebnisse kommen jedoch nicht durch mangelnde Spezifität der Testsysteme zustande, sondern sind auf biologische Besonderheiten der Virusinfektion oder unterschiedliche Immunantworten der Katze zurückzuführen.

Bei der Virusisolierung kann durch mangelhafte Lagerungs- und Transportbedingungen der Proben und durch technische Fehler in der Handhabung intaktes Virusmaterial verloren gehen (JARRETT et al., 1982). Dies führt zu falsch-negativen Ergebnissen in der Virusisolierung und hat zur Folge, dass die an sich richtigpositiven ELISA-Proben in der Auswertung der Testsysteme als falschpositive gewertet werden. Auch bakteriell kontaminierte positive Proben können wegen ihrer toxischen Wirkung auf die Zellkultur nicht durch eine Virusisolierung bestätigt werden. Die Problematik von antigenpositiven virusnegativen Proben existiert jedoch auch unabhängig von der Qualität der Proben, da das Auftreten divergenter Testergebnisse durch den Immunstatus der Katze bedingt sein kann (JARRETT et al., 1991). In der vorliegenden Studie kam es bei insgesamt 17 Serumproben zu "nicht bestätigbaren Ergebnissen" (s. Tabelle 24). Die Proben zeigten in allen ELISA-Systemen und Immunochromatographie-Schnelltests positive Ergebnisse an, die in der Virusisolierung jedoch nicht bestätigt wurden. Zur Bewertung der Testsysteme wurden daher zwei unterschiedliche Berechnungen vorgenommen. In der ersten Berechnung wurden nur die Proben als Richtigpositive gewertet, die in der Virusisolierung verifiziert wurden. Für alle Testsysteme wurde daher eine hohe Anzahl von falschpositiven Proben ermittelt, die zu einer niedrigen Spezifität und einem schlechten positiven prädiktiven Wert der Testsysteme führte. Alle Testsysteme wurden in diesem Fall aber in gleichem Maße benachteiligt und der Vergleich wurde dadurch nicht

beeinflusst. In der zweiten Berechnung wurden die 17 Proben mit "nicht bestätigbaren Ergebnissen", die in der ersten Berechnung als falschpositive gewertet wurden, zu den richtigpositiven Proben gezählt. Bei der Berechnung der Spezifität und des positiven prädiktiven Werts wurden für jedes Testsystem deutlich höhere Werte ermittelt, die mit früheren publizierten Studien vergleichbar sind.

1.2.2. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot ist es möglich, spezifische FIV-Antikörper gegen Hauptinnenkörperproteine und gegen das Transmembranprotein gp40 nachzuweisen (O'CONNOR et al., 1989; CALZOLARI et al., 1995). Da diese Nachweismethode in der FIV-Diagnostik als „Goldener Standard“ angesehen wird, wurde er auch in dieser Studie zur Bestätigung FIV-positiver Proben und 100 negativer Proben herangezogen. Technisch ist der Western Blot relativ aufwendig und Bedarf einer speziellen Ausstattung. Die Interpretation der Banden gestaltet sich nicht immer als eindeutig und einfach (BARR et al., 1991; REID et al., 1992).

Es wurde das Western Blot Protokoll, dass von EGBERINK und Mitarbeitern (1991) beschrieben wurde, durchgeführt. Eine Probe wurde als positiv bestätigt, wenn eine deutliche Bande auf der Höhe der beiden FIV-Proteine F₄ (p24) und KSU₃ (p17) oder auf Höhe des GTM₂-Proteins sichtbar war. Beim Western Blot ist es oft nicht möglich, Antikörper gegen höhermolekulare Hüllproteine (gp95, gp120, gp135) nachzuweisen. Diese werden bei der Aufreinigung und Denaturierung der FIV-Proteinfraktionen beschädigt und können anschließend nicht vollständig auf die Nitrozellulose übertragen werden (PEDERSEN, 1990a; EGBERINK et al., 1991). Dies kann bei FIV-infizierten Katzen, die ausschließlich Antikörper gegen höhermolekulare Hüllproteine bilden, im Western Blot zu falschnegativen Ergebnissen führen (BARR et al., 1991). Der Nachweis dieser Antikörper kann nur mittels RIPA erfolgen. Der RIPA wurde in dieser Studie als Bestätigungsmethode nicht in Betracht gezogen, da er weniger zuverlässig ist als der Western Blot (EGBERINK et al., 1991). Die PCR wurde in der vorliegenden Arbeit als Bestätigungstest nicht in Betracht gezogen, da sie im Gegensatz zu den untersuchten Testsystemen auf dem direkten Erregernachweis beruht. Es muss auch berücksichtigt werden, dass durch die große Varianz der

Virusstämme einige FIV-Subtypen der Diagnose mittels PCR entgehen können (HARTMANN et al., 2001).

Die Auswahl des Western Blot zur Bestätigung FIV-positiv reagierender Proben und einer Anzahl FIV-negativ reagierender Proben erwies sich für diesen Testvergleich als geeignet. Die Banden auf dem Western Blotstreifen waren deutlich zu erkennen und die Ergebnisse stimmten mit den Resultaten der untersuchten Testsysteme gut überein.

2. Beurteilung der Testsysteme

Die Testsysteme wurden nach den Kriterien der Auswertbarkeit, Ablesbarkeit, Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Werts beurteilt.

2.1. Feline Leukämievirus-Tests

Die FeLV-Testsysteme wurden nach ihrer Auswertbarkeit, Ablesbarkeit, Sensitivität, Spezifität und nach dem positiven und negativen prädiktiven Wert beurteilt und miteinander verglichen.

2.1.1. Auswertbarkeit und Ablesbarkeit

Die Beurteilung der Auswertbarkeit war einfach, da ein Test entweder **auswertbar** oder **nicht auswertbar** war. Ein Test galt als nicht auswertbar, wenn in der angegebenen Reaktionszeit keine Kontrollbande erkennbar und/oder im Ergebnisfeld aufgrund von Verwaschungen oder Verfärbungen eine Interpretation des Ergebnisses nicht möglich war. Besonders auffällig war der sehr hohe Anzahl an nicht auswertbaren Ergebnissen beim Mapiic[®] FeLV. Es mussten 30,4 % der Teststreifen verworfen werden, da entweder das Ergebnisfeld bläulich verfärbt war oder keine Kontrollbande in der angegebenen Reaktionszeit erschien. Auch bei einer Verlängerung der Reaktionszeit um einige Minuten wurde das Ergebnisfeld nicht klarer und die Teststreifen wurden als nichtauswertbar beurteilt. In einer von HARTMANN und Mitarbeitern durchgeführten Studie (2001) wurden für den Mapiic[®] FeLV, der damals unter dem alten Namen OnSite[®] FeLV erhältlich war, eine Auswertbarkeit von 99,0 % errechnet. Der Grund für die deutliche Verschlechterung der Auswertbarkeit ist unklar.

Auch beim One-Step[®] FeLV war eine hohe Anzahl (13,3 %) von Teststreifen nicht auswertbar, da bei den meisten dieser Teststreifen nach Ablauf der Testdurchführungszeit keine Kontrollbande erschien oder das Ergebnisfeld pinkfarben verwaschen war. Bei anderen Proben wurde die Pufferlösung vom Teststreifen nicht vollständig absorbiert und verhinderte somit das Ablesen des Ergebnis. Bei einer früheren Studie wurde für den One-Step[®] eine Auswertbarkeit von 99,0 % errechnet (HARTMANN et al., 2001). Die Ursache für diesen deutlichen Unterschied ist unklar.

Alle Testergebnisse, die als "auswertbar" galten, wurden zusätzlich noch nach ihrer Ablesbarkeit beurteilt. Zeigten sich auf dem Teststreifen während der angegebenen Reaktionszeit Verfärbungen oder war das Sichtfeld durch unregelmäßig absorbierte Reaktionsflüssigkeiten verlaufen, so dass das Ablesen der Banden deutlich beeinträchtigt, aber noch möglich war, galt der Test als "**schlecht ablesbar**". Auch das verzögerte Erscheinen von schwach sichtbaren Reaktionsbanden oder von Banden, die zwar gut sichtbar waren, aber nicht über die gesamte Breite des Teststreifens erschien, führte zur Bewertung "schlecht ablesbar". Schwach gefärbte Positivbanden stellten bei der Auswertung der Ergebnisse ein großes Problem dar, da die Gebrauchsanweisung der Hersteller keine Angaben zu der mindestens erforderlichen Farbintensität einer Positivbande enthielten. Die höchste Anzahl (4 %) von schwach positiven Banden fiel beim One-Step[®] FeLV auf. Die Mehrzahl der schwach positiven Proben wurden in der Virusisolierung nicht bestätigt und stellten sich somit als falschpositiv heraus. In einer von HARTMANN und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde für den One-Step[®] eine noch höhere Anzahl (11 %) von schwach positiven Ergebnisbanden ermittelt. Die Gründe für das Auftreten von schwach positiven Kontrollbanden sind vielfältig und können an der Qualität der Testsysteme und an der Probenqualität liegen. Vor allem aber wird dem Untersucher durch das visuelle Ablesen der Testergebnisse eine große Breite an Interpretationsmöglichkeiten gegeben, die zu einer starken Subjektivität bei der Auswertung führt.

Ein hoher Anteil schwer interpretierbarer Ergebnisse ergab sich beim Witness[®] FeLV. 18 % der Teststreifen wurden als schlecht ablesbar beurteilt, da in den meisten Fällen die Kontrollbande nach Ablauf der Reaktionszeit nur schwach zu erkennen war. Nach Verlängerung der Durchführungszeit um wenige Minuten

wurden die Kontrollbanden in der Regel deutlicher und gut erkennbar. Die Proben wurden entweder als “schwach negativ“ oder, wenn eine zusätzliche Bande im Ergebnisfenster erkennbar war, als “schwach positiv“ bewertet. Die Ursache für die schlechte Ablesbarkeit des Witness[®] FeLV ist unklar. Eine Erklärung könnte die Menge an Pufferlösung sein, die bei jedem Testgang mit in das Probenfeld pipettiert werden muss. Beim Witness[®] FeLV werden im Gegensatz zum Witness[®] FIV, bei dem drei Tropfen benötigt werden, nur zwei Tropfen hinzugegeben. Dieser Unterschied könnte eine Auswirkung auf die Fließgeschwindigkeit des Probenmaterials haben und somit eine Verlangsamung der Reaktion beim Witness[®] FeLV herbeiführen. In einer von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie wurden ähnliche Probleme mit dem Witness[®] FeLV festgestellt. ROBINSON und Mitarbeiter (1997) hingegen erwähnten dieses Problem nicht in ihrer Studie, in der sie 480 Serumproben mit dem Witness[®] FeLV untersuchten.

Für die Ablesbarkeit des Snap[®] Combo Plus wurde in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu einer von HARTMANN und Mitarbeitern durchgeführten Studie (2001) ein deutlich höherer Wert von 99,0 % ermittelt. HARTMANN und Mitarbeiter errechneten für den Snap[®] Combo nur eine Ablesbarkeit von 87,3 %. Der Grund für die Verbesserung der Ablesbarkeit könnte in der Benutzung des neueren und überarbeiteten Snap[®] Combo Plus Testsystem liegen. Dieser neue Test ist seit 1998 in Europa kommerziell erhältlich.

2.1.2. Spezifität und Sensitivität

Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Testsysteme wurde die Spezifität und die Sensitivität berechnet.

Mit der **Spezifität** wird der prozentuale Anteil der nichtinfizierten Tiere, die negativ reagieren, definiert. Je geringer die Anzahl falschpositiver Ergebnisse ist, desto höher ist die Spezifität eines Testsystems.

Ein Test wurde als **positiv** beurteilt, wenn er auswertbar war und eine Kontroll- und Positivbande bzw. Kontroll- und Positivpunkt im Ergebnisfenster erschien. Bei den mit Mikrotiterplatten arbeitenden ELISA galt ein Test als positiv, wenn die Vertiefung mit der Positivkontrolle und die Probenvertiefung bläulich verfärbt waren. Wurde dieses Ergebnis im Bestätigungstest bestätigt, so wurde es als

richtigpositives Testergebnis bewertet und spiegelt somit den tatsächlichen Infektionsstatus des untersuchten Tieres wieder. Ein **falschpositives** Ergebnis lag vor, wenn das positive Ergebnis im Bestätigungstest nicht verifiziert wurde.

Zum Auftreten von falschpositiven Testergebnissen kommt es vor allem durch unspezifische Reaktionen, mäßige Probenqualität und Handhabungsfehler. Letztere sind vor allem bei mit Mikrotiterplatten arbeitenden ELISA-Systemen (PetChek[®] FeLV, Virachek[®] FeLV) in Betracht zu ziehen, da es sich um temperaturempfindliche Systeme handelt, deren Durchführung Sorgfalt und Laborerfahrung erfordert. Durch ungenügendes Waschen können ungebundene enzymkonjugierte Antikörper in den ELISA-Vertiefungen zurückbleiben und eine unspezifische Farbentwicklung verursachen (LOPEZ, 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c). Bei der Verwendung von hämolytischen Seren kann durch die Hämolyse der Erythrozyten Hämoglobin freigesetzt werden, dessen Häm-Anteil eine Pseudoperoxidase-Wirkung besitzt und damit eine positive Reaktion vortäuschen kann (HOLZNAGEL et al., 1997). Immuno-chromatographie-Schnelltests hingegen besitzen den Vorteil, das sie sehr einfach in der Handhabung sind und ihre Durchführung kaum Fehlerquellen beinhaltet. Sie sind weder temperaturempfindlich noch sind aufwendige und genaue Pipetierschritte nötig. Die Farbentwicklung der Positivbande/punkte kommt durch die Verdichtung von kolloidalen Gold- oder Latexpartikeln zustande, so dass eine sekundäre enzym-katalysierte Farbreaktion, die bei mit Mikrotiterplatten arbeitenden ELISA-Systemen notwendig ist, wegfällt (ROBINSON, 1997).

Falschpositive FeLV-Testergebnisse können abgesehen von Handhabungsfehlern und Qualitätsmängeln des Probenmaterials oder der Testsysteme auch durch das Vorhandensein von heterophilen Antikörpern im Katzenserum entstehen (LOPEZ & JACOBSEN, 1989). Bei den Antikörpern handelt es sich um anti-Maus-Antikörper, die bei bis zu 0,6 % der Katzen im Serum vorkommen, und die mit den monoklonalen Antikörpern des ELISA reagieren können (JACOBSEN & LOPEZ, 1991). Der Grund für die Entstehung der Antikörper ist nicht eindeutig geklärt. Man nimmt aber an, dass diese Katzen durch intensiven Kontakt zu Mäusen (z. B. beim Fressen von Mäusen), Antikörper gegen Mäuse-IgG bilden (HORZINEK, 1990). In den letzten Jahren lösten einige Hersteller das Problem durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern, die gegen die anti-Maus-Antikörper gerichtet sind (LOPEZ et al., 1989). Der auf dem Prinzip des ELISA

beruhende PetChek[®] FeLV enthält in seiner Packungseinheit einen integrierten Bestätigungstest, der diese, von anti-Maus-Antikörpern hervorgerufenen falsch-positiven Testergebnisse identifizieren kann. In der vorliegenden Studie war die Durchführung und visuelle Interpretation des Bestätigungstests problemlos. Bei keiner Probe wurde aufgrund von anti-Maus-Antikörpern ein falschpositives Testergebnis hervorgerufen. Auch der auf dem Prinzip des ELISA basierende Snap[®] Combo Plus kann falschpositive Testergebnisse, die durch anti-Maus-Antikörper in der Probe hervorgerufen werden, identifizieren. Beim Vorhandensein von anti-Maus-Antikörpern wird ein bläulicher Kontrollpunkt im unteren Drittel des Ergebnisfensters erkennbar und der Test wird ungültig. Der Maptic[®] FeLV enthält als einziger Immunochromatographie-Schnelltest eine integrierte Kontrollbande, die falschpositive Reaktionen mit anti-Maus-Antikörpern anzeigen kann. Sowohl beim Snap[®] Combo Plus als auch beim Maptic[®] FeLV war es nicht möglich, eine Aussage über die Effektivität der integrierten Kontrollschritte zu treffen, da es bei keiner der getesteten Proben zum Erscheinen des Kontrollpunktes bzw. der Kontrollbande kam.

In der vorliegenden Studie wurden für die untersuchten FeLV-Testsysteme zwei Auswertungen vorgenommen, da es beim Testen der Serumproben bei insgesamt 17 Proben zu "nicht bestätigbaren Ergebnissen" kam. Diese zeigten in allen ELISA-Systemen und Immunochromatographie-Schnelltests positive Ergebnisse an, die in der Virusisolierung jedoch nicht bestätigt wurden. Bei der ersten Auswertung wurden nur die Proben als Richtigpositive gewertet, die in der Virusisolierung bestätigt wurden. Die errechneten Spezifitäten lagen für die einzelnen Testsysteme zwischen 92,3 % und 96,8 % und waren im Vergleich zu früheren publizierten Studien niedriger (KAHN et al., 1980; JARRETT et al., 1982b; LOPEZ & JACOBSON, 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c; HAWKS et al., 1991; SWANGO, 1991; ROBINSON et al., 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Als mögliche Ursache wurden die falsch-negativen Ergebnisse der Virusisolierung diskutiert. Besonders deutlich wird der Unterschied der Ergebnisse im Vergleich zu einer neueren Studie, die von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführt wurde. Die Spezifität der einzelnen Testsysteme lag bei dieser Studie im Durchschnitt bei 97,7 %. Ausnahmen bildeten sowohl der One-Step[®] FeLV mit einer Spezifität von 91,8 % als auch der OnSite[®] FeLV mit einer Spezifität von 95,8 %. In der vorliegenden

Arbeit wurden im Bezug zur Spezifität keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen berechnet. Die besten Werte wurden für den Mopic[®] FeLV (98,4 %) und den DUO Speed[®] (96,8 %) ermittelt.

Bei der zweiten Auswertung wurden die Proben, die in der Virusisolierung bestätigt wurden und die 17 Proben mit “nicht bestätigbaren Ergebnissen“ als Richtigpositive gewertet. Die bei der Berechnung der Spezifität ermittelten Werte lagen zwischen 95,4 % und 99,4 %. und zeigten somit eine bessere Übereinstimmung mit den von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) errechneten Spezifitäten.

Beim Vergleich der einzelnen Testsysteme fiel vor allem der One-Step[®] FeLV mit einer sehr hohen Anzahl von falschpositiven Ergebnissen auf. Dies wurde bereits in der von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie beobachtet. Als Ursache für die hohe Anzahl von falschpositiven Ergebnissen wird die Verwendung sowohl von polyklonalen als auch von monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von p27-Antigen angesehen. Es wird vermutet, dass die polyklonalen Antikörper einerseits die Sensitivität dieser Systeme steigern, andererseits aber das Auftreten von unspezifischen Reaktionen erhöhen. In der vorliegenden Studie erkannte der One-Step[®] FeLV auch p27-Antigen in zwei Proben, die in allen anderen Testsystemen negativ reagierten, in der Virusisolierung jedoch positiv waren. Daher eignet sich der One-Step[®] FeLV vor allem zum Ausschluss eines falschnegativen Resultates bei einer Katze, bei der vorberichtlich und klinisch der Verdacht einer FeLV-Infektion besteht.

Eine deutliche Verbesserung der Spezifität wurde für den Mopic[®] FeLV im Gegensatz zu einer von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie gezeigt. Das Testsystem, das früher unter dem Namen OnSite[®] FeLV bekannt war, wurde in der Studie aufgrund der niedrigen Spezifität nicht für die tierärztliche Praxis empfohlen. Die Ursache für die höhere Spezifität in der vorliegenden Studie ist unklar. Bei der Bewertung des Mopic[®] FeLV muss jedoch beachtet werden, dass ein sehr großer Anteil der Teststreifen nicht auswertbar oder schlecht ablesbar war und daher nur eine kleine Anzahl an gültigen Ergebnissen in die Endwertung eingegangen ist. Die Qualität des Mopic[®] FeLV ist daher nur sehr schwer mit den anderen untersuchten Testsystemen vergleichbar.

FeLV-Testergebnisse können vermeintlich falschpositiv sein, wenn das Bestätigungsverfahren einen unterschiedlichen Infektionsstatus nachweist. JARRETT und Mitarbeiter (1991) wiesen darauf hin, dass bei ca. 10 % der FeLV-infizierten Katzen diskrepante Testergebnisse auftreten können. Bei diesen Katzen lässt sich das p27-Antigen im ELISA nachweisen, während weder eine Virusisolierung noch der intrazelluläre Antigennachweis in den Leukozyten mittels IFT gelingt. Die Ursachen für das Entstehen von diskrepanten Ergebnissen liegen in den unterschiedlichen Verlaufsformen einer FeLV-Infektion und sind weder auf mangelnde Sensitivität der Virusisolierung oder des IFT noch auf eine ungenügende Spezifität des ELISA zurückzuführen. So kann z. B. eine transiente Virämie durch eine effektive Immunantwort der Katze, bevor das Virus das Knochenmark infiziert, beendet werden. Mit Hilfe eines FeLV-Antigen-Schnelltests kann dieser Infektionsstatus, der mit dem IFT nicht erkannt wird, nachgewiesen werden. Auch die atypische Verlaufsform einer FeLV-Infektion kann für die Entstehung von diskrepanten Ergebnissen verantwortlich sein, da es hier nur zur lokalen Vermehrung des Virus z. B. in der Blase, Milchdrüse oder im Auge ohne Beteiligung des Knochenmarks kommt. Bei diesen Tieren kann es zu einer intermittierenden oder geringen Produktion von p27-Antigen kommen. Diese Katzen reagieren daher nur manchmal und/oder grenzwertig im Antigentest positiv (HOOVER & MULLINS, 1991) und sind in der Virusisolierung und im IFT nicht zu erfassen (HIRSCH et al., 1982, JARRETT et al., 1982b; MCCAWE, 1994). Es wurde in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen, dass ein Teil der "nicht bestätigbaren Ergebnisse" durch die biologischen Besonderheiten der FeLV-Infektion zustande kamen. Dies kann jedoch nur vermutet werden, da bei diesen Katzen kein späterer Testdurchgang durchgeführt wurde.

Mit der **Sensitivität** wird der prozentuale Anteil der infizierten Tiere, die positiv reagieren, definiert. Je geringer die Anzahl von falschnegativen Ergebnissen ist, desto höher ist die Sensitivität eines Testsystems.

In der vorliegenden Studie wurde ein Test als **negativ** beurteilt, wenn er auswertbar war und im Ergebnisfeld keine Positivbande/punkt erschien oder die Vertiefungen der Mikrotiterplatten nicht verfärbt waren. Es wurden 81 zufällig ausgewählte, negative FeLV-Proben mit der Virusisolierung verifiziert. Diese ergab für alle 81 Proben ein negatives Ergebnis.

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Prozentzahlen für das Auftreten falschnegativer FeLV-Testergebnisse angegeben. So wurden sowohl von ROMATOWSKI (1989) als auch von SWANGO (1991) 0,1 % an falschnegativen ELISA-Ergebnissen ermittelt, wohingegen HARDY und ZUCKERMAN (1991) in einer Studie von 13 % falschnegativer ELISA-Ergebnissen berichteten. Auch KERR und SMITH (1995) wiesen in einer Vergleichsstudie von IFT und zwei unterschiedlichen ELISA auf das Problem falschnegativer FeLV-ELISA-Ergebnisse hin. Sie stellten vor allem bei Katzen, die klinische und hämatologische Veränderungen zeigten, die häufig mit FeLV-assoziiert sind, eine hohe Anzahl von falschnegativen ELISA-Ergebnissen fest. Der Grund dafür ist unklar, da der ELISA eine äußerst sensitive Untersuchungsmethode darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität der einzelnen Testsysteme mit Hilfe einer Verdünnungsreihe überprüft. Insgesamt wiesen die ELISA-Systeme (PetChek[®], Virachek[®], Snap[®] Combo Plus) eine höhere Sensitivität auf als die untersuchten Immunochromatographie-Schnelltests. Der Virachek[®] wies bis zur letzten Verdünnungsstufe (1: 256) p27-Antigen in der Probe nach. Die immunochromatographischen Schnelltests reagierten hingegen mit unterschiedlicher, etwas schlechterer diagnostischer Empfindlichkeit. Der Witness[®] und FASTest[®] wiesen im Gegensatz zu den anderen Schnelltests nur bis zur dritten Verdünnungsstufe (1: 4) p27-Antigen nach. Eine Aussage über die Sensitivität des Mopic[®] wurde nicht getroffen, da fast die Hälfte der verwendeten Teststreifen nicht auswertbar war.

Material-, Handhabungsfehler sowie qualitative Mängel beim Probenmaterial, zum Beispiel durch denaturiertes Antigen, sind zwar selten für falschnegative FeLV-Testergebnisse verantwortlich, müssen jedoch in Betracht gezogen werden. KERR und SMITH (1995) sind der Ansicht, dass im Serum von einigen Katzen Substanzen vorhanden sein können, die eine Verbindung zwischen p27-Antigen und den Antikörpern kompetitiv verhindern können.

In der vorliegenden Teststudie fielen zwei Proben auf, die in allen Testsystemen mit Ausnahme des One-Step[®] FeLV negativ reagierten. Im One-Step[®] Test gelang in diesen Proben der p27-Antigennachweis und die FeLV-Infektion ließ sich durch die Virusisolierung bestätigen. Die ausschließliche Verwendung monoklonaler Antikörper könnte eine verminderte Sensitivität der anderen Testsysteme zur Folge haben, da der One-Step[®] Test durch den kombinierten

Einsatz von poly- und monoklonalen Antikörpern FeLV-positive Proben entdecken konnte, die anderen Testsystemen entgingen. Andererseits begünstigt die Verwendung von polyklonalen Antikörpern das Auftreten von unspezifischen Reaktionen, die zu einer hohen Anzahl von falschpositiven Ergebnissen und somit zu einer niedrigen Spezifität für das Testsystem führen können. In der vorliegenden Studie lag die ermittelte Sensitivität des One-Step[®] (96,8 %) etwas höher als für die anderen untersuchten Testsysteme. Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch nicht festgestellt.

Insgesamt stimmten die ermittelten Sensitivitäten der einzelnen Testsysteme gut mit früheren publizierten Werten überein (KAHN et al., 1980; JARRETT et al., 1982b; LOPEZ et al., 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c; HAWKS et al., 1991; SWANGO, 1991; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Eine Ausnahme bildete der Mopic[®] FeLV, für den im Gegensatz zu einer von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie, eine höhere Sensitivität ermittelt wurde. Das Testsystem, das damals unter dem Namen OnSite[®] bekannt war, wird seit einem Jahr von einem neuen Hersteller vertrieben. Die beste Sensitivität wurde für den One-Step[®] FeLV mit einem Wert von 96,8 % ermittelt. Es muss jedoch beachtet werden, dass auch beim One-Step[®] eine hohe Rate von Testsystemen nicht auswertbar oder schwer ablesbar waren und somit nur schwer eine Aussage über die Qualität getroffen werden kann. Gute Werte für die Sensitivität wurde ebenfalls für den FASTest[®], DUO Speed[®] und Virachek[®] ermittelt. Sie lagen bei 95 %.

2.1.3. Positive und negative prädiktive Werte

Der **positive prädiktive Wert** drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der bei einem positiven FeLV-Testergebnis tatsächlich Antigene in der Probe vorhanden sind. In der vorliegenden Studie wurde auch für die Berechnung des positiven prädiktiven Werts der einzelnen Testsysteme zwei Auswertungen vorgenommen. Diese unterschieden sich in der Anzahl der richtigpositiven Ergebnisse. Bei der ersten Berechnung wurden nur die in der Virusisolierung bestätigten Proben als Richtigpositive gewertet. Dadurch ergab sich für jedes Testsystem eine hohe Anzahl von falschpositiven Ergebnissen, die zu niedrigen positiven prädiktiven Werten führten. Die Werte lagen zwischen 34,0 % und 55,6 % und lagen somit deutlich unter den früheren publizierten Daten (KAHN et al., 1980; JARRETT et

al., 1982b; LOPEZ & JACOBSON, 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c; HAWKS et al., 1991; SWANGO, 1991; ROBINSON et al., 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Als Ursache für die sehr niedrigen positiven prädiktiven Werte kann die hohe Anzahl von Proben mit “nicht bestätigbaren Ergebnissen“ angesehen werden, die in allen untersuchten Testsystemen positiv waren, aber in der Virusisolierung nicht bestätigt wurden. Um die schlechten Werte des positiven prädiktiven Werts in der ersten Auswertung zu relativieren, wurden in der zweiten Auswertung die 17 Proben mit “nicht bestätigbaren Ergebnissen“ als Richtigpositive gezählt. Die ermittelten positiven prädiktiven Werte lagen für die einzelnen Testsysteme zwischen 62,0 % und 90,0 % und waren mit den Daten in einer von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie vergleichbar. Der beste Test war mit einem positiven prädiktiven Wert von 90,0 % der DUO Speed[®]. Statistisch Signifikant unterschied sich der DUO Speed[®] von den schlechteren Testsystemen One-Step[®] FeLV, Witness[®] FeLV und Snap[®] Combo Plus. Ebenfalls statistisch Signifikant unterschieden sich sowohl die beiden schlechteren Testsysteme Snap[®] Combo Plus und Witness[®] von den Systemen FASTest[®], Virachek[®] und PetChek[®] als auch der One-Step[®] (als schlechterer Test) von den besseren Tests PetChek[®], FASTest[®] und Virachek[®].

Der **negative prädiktive Wert** drückt die Wahrscheinlichkeit aus, mit der bei einem negativen FeLV-Testergebnis tatsächlich keine Antigene in der Probe vorhanden sind. Für die untersuchten Testsysteme ergaben sich in der vorliegenden Studie negative prädiktive Werte zwischen 99,4 % und 99,7 %. Die Werte sind mit frühen publizierten Daten vergleichbar (KAHN et al., 1980; JARRETT et al., 1982b; LOPEZ et al., 1989; HARDY & ZUCKERMAN, 1991c; HAWKS et al., 1991; SWANGO, 1991; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Für den One-Step[®] wurde der beste Wert von 99,7 % berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden zwischen den einzelnen Testsystemen nicht.

Die prädiktiven Werte hängen von der Prävalenz der FeLV-Infektion ab (siehe Abb. 24) Wegen der niedrigen Prävalenz der FeLV-Infektion in Deutschland und in vielen anderen Ländern liegen die negativen prädiktiven Werte immer höher als die positiven prädiktiven Werte. Auch wenn ein Test eine diagnostische Spezifität von 90 % hat, kann der prädiktive Wert eines positiven Ergebnisses in einer Population mit niedrigerer Prävalenz deutlich unter 50 % liegen. Wegen der

niedrigen Prävalenz und weil ein positives Testergebnis meist schwerwiegende Konsequenzen nach sich zieht, spielen falschpositive Testergebnisse eine weitaus größere Rolle als falschnegative (GRINER et al., 1981; TYLER et al., 1989). Mögliche Testkombinationen wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Dadurch sollte geklärt werden, welche Tests sich am besten zur Kombination eignen und wie die Aussagekraft ist, wenn ein Serum in zwei Tests positiv oder in zwei Tests negativ reagiert.

Bei der **konjunktiven Auswertung** wurde der positive prädiktive Wert bei der Kombination zweier Testsysteme errechnet. Als die beste Testkombination wurde der DUO Speed[®] mit dem Maptic[®] ermittelt. Reagieren in diesem Fall beide Tests positiv, betrug die Wahrscheinlichkeit, dass die Katze tatsächlich infiziert ist, 100 %. Bei der Beurteilung des Maptic[®] muss jedoch beachtet werden, dass durch die sehr schlechte Auswertbarkeit eine geringere Anzahl von Proben in die Berechnung eingegangen ist als bei den anderen Testsystemen und somit keine zuverlässige Aussage über die Qualität des Maptic[®] getroffen werden konnte. Daher müssen auch Testkombinationen mit dem Maptic[®] mit Vorbehalt interpretiert werden. Als gute Testkombinationen eignen sich der One-Step[®] FeLV mit dem DUO Speed[®] oder dem FASTest[®]. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Katze tatsächlich infiziert ist, lag zwischen 94 % und 96,7 %.

Bei der **disjunktiven Auswertung** wurde der negative prädiktive Wert bei der Kombination zweier Testsysteme errechnet. Die Aussagekraft bei einem doppelt negativen Ergebnis lag bei allen Testkombinationen über 99 %.

2.2. Feline Immunschwächevirus-Tests

2.2.1. Auswertbarkeit und Ablesbarkeit

Auch bei den FIV-Testsystemen fiel die sehr hohe Anzahl von nicht auswertbaren Ergebnissen beim Maptic[®] FIV auf. Es mussten insgesamt 23,1 % der Teststreifen verworfen werden, da entweder das Ergebnisfeld bläulich verfärbt war oder keine Kontrollbande in der vorgegebenen Reaktionszeit erschien. In einer von HARTMANN und Mitarbeitern durchgeführten Studie (2001) wurde für den Maptic[®], der unter dem alten Namen OnSite[®] FIV erhältlich war, eine Auswertbarkeit von 99,0 % ermittelt. Der Grund für die deutliche Verschlechterung ist unklar. Da bei den meisten dieser Tests die Kontrollbande nicht

erschien oder das Ergebnisfeld verwaschen war, kann davon ausgegangen werden, dass fehlerhafte Testkits die Ursache für das gehäufte Auftreten dieser ungültigen Ergebnisse waren. Eine Verbesserung der Auswertbarkeit wurde in der vorliegenden Studie für den Witness[®] FIV beobachtet. Die Auswertbarkeit lag bei 99,6 %. In einer von HARTMANN und Mitarbeitern durchgeführten Studie mussten etwa 13 % aller Testkits verworfen werden, da meist nach Ablauf der Reaktionszeit keine Kontrollbande erkennbar war. Es wurde jedoch diskutiert, dass es sich eventuell um eine fehlerhafte Charge des Witness[®] FIV gehandelt haben könnte. Dies wäre eine möglich Erklärung für die unterschiedlichen Werte für die Auswertbarkeit des Witness[®] FIV.

Beim Ablesen der Ergebnisse stellten vor allem schwach angefärbte Positivbanden ein Problem dar, da die Gebrauchsanweisung der meisten Hersteller keine Angaben zu der erforderlichen Farbintensität einer Positivbande enthielten. Nur beim PetChek[®] Plus Anti-FIV (IDEXX, USA) wurden die Ergebnisse mit dem ELISA-Reader ermittelt und anschließend mit einer vorgegebenen Formel errechnet. Dadurch war eine objektivere Auswertung möglich. Bei den anderen Testsystemen wurden schwach angefärbte Kontrollbanden oder Kontrollpunkte als positives Ergebnis gewertet. Die Gründe für das Auftreten von schwach positiven Kontrollbanden sind vielfältig und können an der Qualität der Testsysteme, an der Probenqualität und an der Subjektivität der Beurteiler liegen. In der vorliegenden Arbeit fiel die schlechte Ablesbarkeit vor allem beim MapiC[®] FIV auf. Insgesamt 11 % der Testergebnisse waren aufgrund von schwachen Positiv- oder Negativbanden schwer zu beurteilen. HARTMANN und Mitarbeiter (2001) erwähnten diese Probleme nicht in ihrer Studie, in der sie 756 Serumproben mit dem MapiC[®] FIV (OnSite[®] FIV) untersuchten. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Ablesbarkeit ist unklar. Die Ablesbarkeit beim Snap[®] Combo Plus lag bei 99 % und erzielte damit ein deutlich besseres Ergebnis als bei der von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie. Sie ermittelten nur eine Ablesbarkeit von 85,6 %. Der Grund für die Verbesserung könnte mit der Einführung der neueren Version des Snap[®] Combo Plus zusammenhängen. Dieser Test ist seit 1998 in Europa kommerziell erhältlich und wurde in der vorhergehenden Studien noch nicht berücksichtigt.

2.2.2. Spezifität und Sensitivität

Als Ursachen für das Auftreten von falschpositiven FIV-Testergebnissen werden neben Handhabungs- und Waschfehlern auch Qualitätsmängel vor allem bei den älteren ELISA-Systemen (z. B. PetChek[®] FIV, PetChek[®] Anti-FIV) diskutiert. Die älteren ELISA wurden auf der Basis von in Zellkulturen produzierten FIV-Antigenen hergestellt. Diese mittels Dichtegradient gereinigten Viren sind oft kontaminiert mit Bestandteilen der Zellkultur (z. B. CrFK-Zellen), in der das Virus gezüchtet wurde, oder mit Komponenten des fetalen Kälberserums, das für ein optimales Wachstum der Zellen zugesetzt wurde (PEDERSEN & BARLOUGH, 1991). Viele Katzenimpfstoffe werden auch auf CrFK-Zellen oder anderen Zelllinien hergestellt, die fetales Kälberserum benötigen. Geimpfte Katzen können Antikörper gegen dieses, in Impfstoffen enthaltene, Kälberserum bilden, welche dann mit dem schlecht gereinigten Antigen in den FIV-ELISA-Platten einen Antigen-Antikörperkomplex bilden (CALZOLARI et al., 1995). Es kann zu einer hohen Zahl falschpositiver Ergebnisse kommen, die in einer niedrigen Spezifität für das jeweilige Testsystem resultiert. Der PetChek[®] FIV (IDEXX, USA) war 1992 der erste kommerziell erhältliche FIV-ELISA, beim dem rekombinantes aufgereinigtes p24-Protein aus Bakterien als FIV-Antigen verwendet wurde. Dadurch wurden durch Verunreinigungen verursachte falschpositive Reaktionen verhindert (MERMER et al., 1992). Durch die Verwendung von rekombinanten aufgereinigten FIV-Antigenen wurde die Spezifität des ELISA deutlich erhöht und eine bessere Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des ELISA und denen des Western Blot erreicht (REID et al., 1991; FURUYA et al., 1992). Auch das Nachfolgemodel PetChek[®] Plus Anti-FIV basiert auf dem rekombinanten aufgereinigten p24-Protein. Zusätzlich wird in diesem ELISA noch ein weiteres Antigen, das Antikörper gegen das Transmembranprotein gp40 des FIV nachweist, verwendet. Die Peptide des Transmembranproteins werden synthetisch hergestellt, so dass die Gefahr von Verunreinigungen nicht besteht. Das Auftreten von falschpositiven Testergebnissen könnte weiterhin darin begründet sein, dass manche Katzen unabhängig von einer FIV-Infektion Antikörper gegen das p24-Protein besitzen. So weiß man beispielsweise aus humanmedizinischen Studien, dass etwa 1 % aller Menschen anti-p24- oder anti-p18-Antikörper haben, die mit dem p24-Antigen, auch mit dem des FIV, kreuzreagieren können (MATSUO, 1992).

In der vorliegenden Studie trat bei allen verwendeten Testsystemen nur eine geringe Anzahl von falschpositiven FIV-Ergebnissen auf. Somit wurden für die einzelnen Testsysteme Werte für die Spezifität zwischen 99 % und 100 % errechnet. Die Ergebnisse sind mit den Resultaten von älteren Studien gut vergleichbar (BARR et al., 1991; REID et al., 1991; HARTMANN et al., 1994; LUTZ & WINKLER, 1995; ROBINSON et al., 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Eine Ausnahme bildete der Mapic[®] FIV, bei dem in dieser Studie eine Spezifität von 100 % errechnet wurde. In der von HARTMANN und Mitarbeitern (2001) durchgeführten Studie, in der dieser Test als OnSite[®] FIV bezeichnet wurde, wurde nur eine Spezifität von 97,1 % errechnet. Der OnSite[®] FIV war der schlechteste Test in der Auswertung dieser Studie und wurde für den Gebrauch in der tierärztlichen Praxis nicht empfohlen. Aus diesen Gründen wurde dieser Test, der eine kurze Zeit von Hoechst (Wiesbaden, Deutschland) vertrieben wurde, in Deutschland wieder vom Markt genommen. Es muss bei der Interpretation der Auswertung jedoch berücksichtigt werden, dass die getestete Probenanzahl beim Mapic[®] geringer war als bei den anderen untersuchten Testsystemen. Sehr viele verwendete Teststreifen mussten verworfen werden, da eine Auswertung der Ergebnisse aufgrund von Verfärbungen des Ergebnisfensters oder durch das Nichterscheinen von Kontrollbanden nicht möglich war. Die Berechnung der Spezifität beruhte daher auf einer deutlich geringeren Anzahl von Proben als bei den anderen untersuchten Testsystemen und ist somit nur bedingt aussagekräftig.

Neben dem Mapic[®] wurde auch für den PetChek[®] Plus Anti-FIV eine Spezifität von 100 % berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den einzelnen Testsystemen nicht ermittelt.

Eine Bestätigung der negativen FIV-Proben wurde mit einer partiellen willkürlich ausgewählten Anzahl von negativen Proben durchgeführt. Es wurden 100 zufällig ausgewählte, negative FIV-Proben mit dem Western Blot verifiziert. Diese ergab für alle 100 Proben ein negatives Ergebnis.

Falschnegative FIV-Testergebnisse können dadurch zustande kommen, dass manche FIV-infizierten Katzen ausschließlich Antikörper gegen die Hüllproteine bilden. Testsysteme, die nur auf dem p24-Antikörpernachweis beruhen, können die *env*-spezifischen Antikörper nicht erkennen und führen zu einem falschnegativen Ergebnis (EGBERINK et al., 1992; FURUYA et al., 1992;

AVRAMÈAS et al., 1993; VERSHOOR et al., 1993b). Die in der Studie untersuchten Immunochromatographie-Schnelltests beruhen alle auf dem Nachweis von Antikörpern gegen das Hüllprotein gp40. Für den FASTest[®], DUO Speed[®] und Witness[®] wurden hohe Sensitivitäten zwischen 94,0 % und 96,0 % berechnet. Die Werte stimmen mit früheren publizierten Studien gut überein (ROBINSON, 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Eine deutliche Ausnahme bildete der Maptic[®], da nur eine Sensitivität von 73,2 % ermittelt wurde. Auch HARTMANN und Mitarbeiter (2001) erwähnten dieses Problem in ihrer Studie, in der sie 756 Serumproben mit dem Maptic[®] (OnSite[®] FIV) untersuchten. Sie ermittelten für dieses Testsystem beim Testen der Serumproben eine Sensitivität von nur 43,2 %. HARTMANN und Mitarbeiter (2001) diskutierten, dass die Ursache am Aufbau des Testsystems liegen könnte. Der OnSite[®] und auch der jetzige Maptic[®] arbeiten im Vergleich zu den anderen Immunochromatographie-Schnelltests mit gefärbten Latexpartikeln, an die synthetisches Peptid des FIV gebunden ist. Es wäre denkbar, dass zu hohe Antikörperkonzentrationen in der Probe die Komplexbildung mit den Latexpartikeln negativ beeinflussen und für das gehäufte Auftreten von falschnegativen Testergebnissen bei nicht verdünnten Proben verantwortlich sind.

Für den auf dem Prinzip des ELISA beruhenden Snap[®] Combo Plus ergab sich in der vorliegenden Studie eine Sensitivität von 100 %. Das gleiche Resultat wurde von GROAT und Mitarbeitern(2000) berichtet, wohingegen HARTMANN und Mitarbeiter in ihrer Studie (2001) nur eine Sensitivität von 86,3 % ermittelten. Eine mögliche Begründung könnte in der Verwendung von unterschiedlichen Testversionen des Snap-Tests liegen. So wurden sowohl in der vorliegenden Studie als auch von GROAT und Mitarbeitern (2000) die neuste Testversion (Snap[®] Combo Plus) untersucht. Der Snap[®] Combo Plus ist seit 1998 in Europa kommerziell erhältlich und weist im Gegensatz zu seiner älteren Testversion sowohl gp40- als auch p24-Antikörper nach.

Für den PetChek[®] Plus Anti-FIV, der ebenfalls auf dem Prinzip des ELISA beruht, wurde in der vorliegenden Studie eine Sensitivität von 94,5 % errechnet. In der Literatur werden für die Sensitivität dieses Testsystem Werte zwischen 86 % und 100 % angegeben (LUTZ et al., 1988a; BARR et al., 1991; JACOBSEN, 1991; REID et al., 1992; HARTMANN et al., 1994; FIERRO et al., 1995; ROBINSON et al., 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001). Die

Ursache für die starke Varianz der Sensitivität des PetChek[®] FIV könnte in der Interpretation der Testergebnisse liegen. Laut Hersteller sollen mit Hilfe des ELISA-Readers die Extinktionswerte in den einzelnen Vertiefungen des PetChek[®] gemessen und das Verhältnis der Werte von Probe zu Positivkontrolle errechnet werden. Ist dieses Verhältnis größer als 0,5, so wird die Probe als ein positives Testergebnis gewertet. Das Problem dieser Auswertung liegt bei den Proben, die knapp unterhalb der angegebenen 0,5 Grenze liegen. Hier haben bereits kleine technische Fehler in der Handhabung der Testsysteme eine Auswirkung auf die anschließende Auswertung der Ergebnisse, und es besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von falschnegativen Resultaten (BARR, 1996). In der vorliegenden Studie wurde dieses Problem bei vier Proben beobachtet. Nach Ablauf der Reaktionszeit zeigten die Proben eine deutliche Blaufärbung in den Vertiefungen des PetChek[®]. Die anschließende Messung und Berechnung ergab für die Proben jedoch Werte knapp unterhalb der 0,5 Grenze. Im Bestätigungstest (Western Blot) waren diese Proben positiv.

Das ebenfalls auf dem Prinzip des ELISA beruhende Testsystem Virachek[®] FIV zeigte im Vergleich zu den anderen Testsystemen eine recht hohe Anzahl von falschnegativen Ergebnissen. Somit wurde nur eine Sensitivität von 92,6 % berechnet. Im Vergleich zu früher publizierten Studien ist dieses Ergebnis jedoch übereinstimmend (SIBILLE et al., 1995; GROAT et al., 2000). Als Ursache für die relativ schlechte Sensitivität kann die visuelle und somit subjektive Auswertung der Ergebnisse angesehen werden. Das Problem stellt sich vor allem bei schwach positiven Proben, die eine geringere Blaufärbung anzeigen als die Positivkontrolle. Hier ist es von der Interpretation des Ablesers abhängig, ob die Proben als positiv oder negativ gewertet werden. Durch die Subjektivität des Ablesens kann eine hohe Anzahl von falschnegativen Ergebnissen entstehen.

Im Vergleich zu allen untersuchten Testsystemen wurde für den Snap[®] Combo Plus die höchste Sensitivität berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede traten zwischen den einzelnen Testsystemen jedoch nicht auf.

2.2.3. Positiver und negativer prädiktiver Wert

Die positiven prädiktiven Werte lagen bei den untersuchten FIV-Testsystemen zwischen 91,2 % und 100 % und für die negativen prädiktiven Werte zwischen

96,1 % und 100 %. Die prädiktiven Werte sind mit den Resultaten von früheren Studien gut vergleichbar (BARR et al., 1991; REID et al., 1991; HARTMANN et al., 1994; LUTZ & WINKLER, 1995; ROBINSON et al., 1998; GROAT et al., 2000; HARTMANN et al., 2001).

Als anerkanntes Bestätigungsverfahren gilt der Western Blot. Dieser ist in Deutschland nicht in kommerziellen Labors verfügbar und wird nur an wenigen Universitäten zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt. Die Aussagekraft eines positiven Ergebnis kann jedoch durch die Kombination von zwei auf dem gleichen Prinzip beruhenden Testsystemen erhöht werden (BARR, 1996; HARTMANN et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurden mögliche Testkombinationen untersucht. Dadurch sollte geklärt werden, welche Tests sich am besten zur Kombination eignen und wie die Aussagekraft ist, wenn ein Serum in zwei Tests positiv oder negativ reagiert.

Bei der konjunktiven Auswertung wurde der positive prädiktive Wert bei Kombination zweier FIV-Testsysteme berechnet (s. Tabelle 38). Nur eine in beiden Tests reagierende Probe wurde als positiv gewertet. Die besten Testkombinationen waren der PetChek[®] Plus Anti-FIV und der MapiC[®] FIV in Kombination mit den anderen Testsystemen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Katze tatsächlich infiziert ist, betrug bei diesen Kombinationen 100 %. Die Anwendung der Testkombinationen mit dem MapiC[®] sind jedoch nicht zu empfehlen, da in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Zahl von auswertbaren Proben keine zuverlässige Aussage über die Qualität getroffen wurde. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Proben sind notwendig, um das Testsystem MapiC[®] zu beurteilen. Der PetChek[®] Plus Anti-FIV kann als Bestätigungstest für positive FIV-Proben empfohlen werden, da er hohe prädiktive Wert besitzt und bei der Testdurchführung andere Reagenzien als bei den Immunochromatographie-Schnelltests verwendet werden. Der Nachteil liegt in der Handhabung des mit Mikrotiterplatten arbeitenden ELISA, da grundlegende Erfahrungen im Bereich der Labortätigkeit erforderlich sind. Die Testsysteme müssen gekühlt gelagert werden und die Durchführung ist mit einem größeren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Aus den genannten Gründen ist der Einsatz des PetChek[®] Plus Anti-FIV in größeren Kliniken und in Untersuchungslabors zu empfehlen.

Bei der disjunktiven Auswertung wurde der negative prädiktive Wert bei Kombination zweier FIV-Testsysteme berechnet. Nur eine in beiden Tests negativ reagierende Probe wurde als negativ berechnet. Besteht bei einer Katze mit einem negativen Ergebnis aufgrund der klinischen Symptome und des Vorberichts trotzdem Verdacht auf eine FIV-Infektion, lässt sich durch Kombination zweier Tests bei einem doppelt negativen Ergebnis eine Aussagekraft von nahezu 100 % erreichen (s. Tabelle 39). Die beste Aussagekraft kann durch die Kombination mit dem Snap[®] Combo Plus erreicht werden. Sind die Ergebnisse der zwei durchgeführten Tests jedoch diskrepant, muss die Katze als potentiell infiziert angesehen werden und eine erneute Testung nach etwa vier Wochen ist zu empfehlen.

3. Schlussfolgerung

Beim Vergleich von sieben verschiedenen FIV- und acht verschiedenen FeLV-Testsystemen wurden Unterschiede sowohl in der Auswertbarkeit und Ablesbarkeit der Testsysteme als auch in der statistischen Auswertung ermittelt.

Die Auswertbarkeit und Ablesbarkeit der FIV-Testsysteme waren mit Ausnahme des Maptic[®] zufriedenstellend. Beim Maptic[®] mussten 23,1 % der verwendeten Testsysteme aufgrund von Verfärbungen des Ergebnisfeldes oder durch das Nichterscheinen der Kontrollbande verworfen werden. Bei den FeLV-Testsystemen fiel die schlechte Auswertbarkeit und Ablesbarkeit sowohl beim One-Step[®] als auch beim Maptic[®] auf. 13,3 % der untersuchten One-Step[®]- und 30,4 % der Maptic[®]-Teststreifen konnten nicht ausgewertet werden. Beim Witness[®] waren 13,8 % der Teststreifen aufgrund von schwachen Kontrollbanden nur schwer interpretierbar. Aus den genannten Gründen sind sowohl die beiden Maptic[®] Testsysteme als auch der One-Step[®] und der Witness[®] für die tierärztliche Praxis nicht zu empfehlen.

Bei der Berechnung der positiv prädiktiven Werte ergaben sich für die FIV-Testsysteme Werte zwischen 91,2 % und 100 %. Für den auf dem Prinzip des ELISA beruhenden PetChek[®] Plus Anti-FIV und für den Maptic[®] wurden die besten Werte ermittelt. Beim Maptic[®] muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass wegen der niedrigen Anzahl von letztendlich auswertbaren Proben nur eine bedingte Aussage möglich ist und ein qualitativer Vergleich zu den anderen

Testsystemen schwer fällt. Für den negativ prädiktiven Wert wurden Werte zwischen 96,1 % und 100 % berechnet. Als bester Test wurde der Snap[®] Combo Plus ermittelt. Sowohl bei den positiv als auch bei den negativ prädiktiven Werten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede berechnet.

Bei der Berechnung der positiv und negativ prädiktiven Werte der FeLV-Testsysteme wurden aufgrund der "nicht bestätigbaren" Ergebnisse zwei Auswertungen vorgenommen. Für die positiv prädiktiven Werte mit Berücksichtigung der "nicht bestätigbaren" Ergebnisse wurden Werte zwischen 62 % und 90 % berechnet. Als bester Test wurde der DUO Speed[®] erwähnt. Für den FASTest[®] und für die beiden auf dem Prinzip des ELISA beruhenden Testsysteme PetChek[®] und Virachek[®] wurden positiv prädiktive Werte von ca. 85 % ermittelt. Statistisch signifikant unterschieden sich die besseren Testsysteme DUO Speed[®], PetChek[®], Virachek[®] und FASTest[®] von den Testsystemen Witness[®], Snap[®] Combo Plus und One-Step[®]. Für diese drei Testsysteme wurden positiv prädiktive Werte unter 77 % berechnet. Die Ergebnisse müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da es zwischen den Resultaten der Testsysteme und der Virusisolierung zu einer hohen Zahl von nicht übereinstimmenden Ergebnissen kam. Obwohl für die FeLV-Auswertung eine zweite Berechnung vorgenommen wurde, in der der Anteil von "nicht bestätigbaren" Ergebnissen berücksichtigt wurde, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass eine Anzahl von FeLV-positiven Proben in der Virusisolierung nicht erkannt wurde und somit als Falschnegative in die Auswertung eingingen. Für die negativ prädiktiven Werte wurden Werte zwischen 99,7 % und 99,4 % ermittelt. Als bester Test galt der One-Step[®]. Dieser erkannte FeLV-positive Proben, die allen anderen Testsystemen entgingen und verdient daher zum Ausschluss von falschnegativen Ergebnissen Beachtung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen den einzelnen negativ prädiktiven Werten der Testsysteme nicht berechnet.

Zum Nachweis einer FIV-Infektion können die Immunochromatographie-Schnelltests DUO Speed[®], FASTest[®] und Witness[®] und der auf dem Prinzip des ELISA beruhende Snap[®] Combo Plus für die tierärztliche Praxis empfohlen werden. Ein Nachteil beim Snap[®] Combo Plus ist, dass der Test bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt werden muss. Die mit Mikrotiterplatten arbeitenden ELISA PetChek[®] Plus Anti-FIV und Virachek[®] sind im Vergleich zu den immunochromatographischen Schnelltests mit einem größeren Arbeits- und

Zeitaufwand verbunden. Ihr Einsatz wird hauptsächlich in Untersuchungslabors und in größeren Kliniken empfohlen.

Für die FeLV-Diagnostik kann der DUO Speed[®], für den der beste positiv prädiktive Wert ermittelt wurde, empfohlen werden. Da jedoch zu den Ergebnissen des FASTest[®], Virachek[®] und PetChek[®] kein statistisch signifikanter Unterschied berechnet wurde, können auch diese Testsysteme zum Nachweis einer FeLV-Infektion eingesetzt werden. Der Einsatz des PetChek[®] und des Virachek[®] wird vor allem in Untersuchungslabors und in größeren Kliniken empfohlen.

Da die Prävalenz der FeLV- und FIV-Infektion in Deutschland sehr niedrig ist, und ein positives Ergebnis weitreichende Folgen hat, sollte eine Bestätigung durch ein spezifischeres Testverfahren (z. B. Western Blot oder Virusisolierung) durchgeführt werden. Da diese Methoden meist sehr aufwendig sind und nur an wenigen Universitäten zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt werden, kann auch eine Kombination von zwei auf dem gleichen Prinzip beruhenden Testsystemen verwendet werden (BARR, 1996; HARTMANN et al., 2001). Mögliche Testkombinationen wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Bei der FIV-Diagnostik kann der PetChek[®] Plus Anti-FIV als Bestätigungstest eines positiven Ergebnisses eingesetzt werden. Für die Bestätigung eines positiven FeLV-Ergebnisses kann der One-Step[®] empfohlen werden. Negative Ergebnisse können dagegen aufgrund der guten Sensitivität der Mehrzahl der untersuchten Testsysteme mit hoher Wahrscheinlichkeit als korrekt angesehen werden.

VI. Zusammenfassung

„Vergleich neuer verschiedener Testsysteme für die feline Immunodefizienz- und die feline Leukämievirusinfektion“

In der vorliegenden Studie wurden elf verschiedene kommerziell erhältliche Testsysteme zur Diagnostik der felines Immunschwäche- (FIV) und der felines Leukämievirusinfektion (FeLV) anhand von 535 Serumproben untersucht und miteinander verglichen. Die Testsysteme beruhten entweder auf dem Prinzip des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder auf einem ELISA-ähnlichen Prinzip der Immunochromatographie. Bei den FIV-Testsystemen wurden der Snap[®] Combo Plus (IDEXX Laboratories Inc., USA), der PetChek[®] Plus Anti-FIV (IDEXX Laboratories Inc., USA), der Virachek[®] (Synbiotics Corporation, USA), der Witness[®] (Synbiotics Corporation, USA), der FASTest[®] (MegaCor, Österreich), der DUO Speed[®] (BIO VETO TEST, Frankreich) und der Maptic[®] (Sinovus Biotech Inc., USA) untersucht. Für den Nachweis einer FeLV-Infektion wurden die Testsysteme Snap[®] Combo Plus (IDEXX Laboratories Inc., USA), PetChek[®] (IDEXX Laboratories Inc., USA), Virachek[®] (Synbiotics Corporation, USA), Witness[®] (Synbiotics Corporation, USA), FASTest[®] (MegaCor, Österreich), DUO Speed[®] (BIO VETO TEST, Frankreich), Maptic[®] (Sinovus Biotech Inc., USA) und One-Step[®] (European Veterinary Laboratory, Niederlande) verwendet. Zur Bestätigung positiver und 81 negativer FeLV-Ergebnisse wurde eine Virusisolierung durchgeführt. FIV-positive Proben und 100 negative Proben wurden im Western Blot verifiziert. Mögliche Testkombinationen wurden verglichen und für den Einsatz in der tierärztlichen Praxis untersucht.

Die Ablesbarkeit und Auswertbarkeit der Testergebnisse war bei den untersuchten FIV-Testsystemen mit Ausnahme des Maptic[®] zufriedenstellend. Beim Maptic[®] waren 23,1 % der verwendeten Teststreifen nicht auswertbar und 11 % nur schwer ablesbar. Bei den FeLV-Testsystemen fielen die schlechte Auswertbarkeit und Ablesbarkeit des One-Step[®] und des Maptic[®] auf. 13,3 % der untersuchten One-Step[®] und 30,4 % der Maptic[®] Teststreifen mussten verworfen werden. Beim

Witness[®] FeLV waren 13,8 % der verwendeten Teststreifen nur schwer ablesbar. Aufgrund der Resultate sind der Mopic[®] FIV und FeLV, der One-Step[®] FeLV und der Witness[®] FeLV für den Gebrauch in der tierärztliche Praxis nicht zu empfehlen.

Für die FIV-Testsysteme wurden positiv prädiktive Werte zwischen 91,2 % und 100 % ermittelt. Die besten Werte wurden für den PetChek[®] Plus Anti-FIV und den Mopic[®] FIV berechnet. Die Werte für den negativ prädiktiven Wert lagen zwischen 96,1 % und 100 %. Als bester Test schnitt der Snap[®] Combo Plus ab. Sowohl bei den positiv als auch bei den negativ prädiktiven Werten lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testsystemen vor.

Bei der Berechnung der positiv und negativ prädiktiven Werte der FeLV-Testsysteme wurden aufgrund der "nicht bestätigbaren" Ergebnisse zwei Auswertungen vorgenommen. Die positiv prädiktiven Werte, die unter Berücksichtigung der "nicht bestätigbaren" Ergebnisse, ermittelt wurden, lagen zwischen 62,0 % und 90,0 %. Als bester Test schnitt der DUO Speed[®] ab. Für die drei Testsysteme Virachek[®], PetChek[®] und FASTest[®] wurden positiv prädiktive Werte um die 85 % berechnet. Statistisch Signifikant unterschieden sich die besseren Testsysteme DUO Speed[®], FASTest[®], Virachek[®] und PetChek[®] von den Testsystemen Witness[®], Snap[®] Combo Plus und One-Step[®], für die deutlich niedrigere positive prädiktive Werte (< 77 %) berechnet wurden. Die negativ prädiktiven Werte lagen mit Berücksichtigung der "nicht bestätigbaren" Ergebnisse zwischen 99,4 % und 99,7%. Bester Test war der One-Step[®] FeLV.

Als FIV-Screeningtest können für die tierärztliche Praxis die Immunochromatographie-Schnelltests DUO Speed[®], FASTest[®] und Witness[®] und der auf dem Prinzip des ELISA beruhende Snap[®] Combo Plus empfohlen werden. Die mit Mikroplatten arbeitenden ELISA PetChek[®] Plus Anti-FIV und Virachek[®] können vor allem in Untersuchungslabors und in Kliniken zum Einsatz kommen. Der Mopic[®] kann aufgrund seiner hohen Anzahl von nicht auswertbaren oder schlecht ablesbaren Testergebnissen nicht empfohlen werden. Für den Nachweis einer FeLV-Infektion kann als Screeningtest der DUO Speed[®] und der FASTest[®] für die tierärztliche Praxis empfohlen werden.

Aufgrund der niedrigen Prävalenz der FeLV- und FIV-Infektionen in Deutschland, sollte ein positives Ergebnis immer durch ein spezifischeres

Verfahren oder durch ein zweites Testsystem bestätigt werden. Als Bestätigungstest kann bei der FIV-Diagnostik der PetChek[®] Plus Anti-FIV und bei der FeLV-Diagnostik der One-Step[®] FeLV empfohlen werden.

VII. Summary

“Comparison of different new tests for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection”

In this study, 11 different commercially available test systems for the detection of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) were evaluated using 535 serum samples. The test systems were either enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or based on an immunochromatographic principle that is similar to ELISA. Seven different FIV test systems including Snap[®] Combo Plus (IDEXX Laboratories Inc., USA), PetChek Plus[®] Anti-FIV (IDEXX Laboratories Inc., USA), DUO Speed[®] (BIO VETO TEST, France), FASTest[®] (MegaCor, Austria), Witness[®] (Synbiotics Corporation, USA), Virachek[®] (Synbiotics Corporation, USA), and Mapic[®] (Sinovus Biotech Inc., USA) were used. For testing of FeLV antigen 8 tests including Snap[®] Combo Plus (IDEXX Laboratories Inc., USA), PetChek[®] (IDEXX Laboratories Inc., USA), DUO Speed[®] (BIO VETO TEST, France), FASTest[®] (MegaCor, Austria), Witness[®] (Synbiotics Corporation, USA), Virachek[®] (Synbiotics Corporation, USA), Mapic[®] (Sinovus Biotech Inc., USA), and ONE-Step[®] (EVL, The Netherlands) were used. Samples reacting FIV-positive in at least one of the tests were confirmed by Western blot. Samples reacting FeLV-positive were confirmed by virus isolation. In addition, 100 negative samples were tested with Western Blot and 81 negative samples by virus isolation. Possible test combinations were compared and evaluated for the use in veterinary practice.

Results of each FIV test system, with the exception of Mapic[®], were easy to interpret and the percentages of invalid results were low. About 23 % of the Mapic[®] tests had to be discharged and 11 % of the remaining tests were difficult to interpret. The FeLV test systems Mapic[®] and One-Step[®] showed a high percentage of invalid test results. About 13 % of the One-Step[®] and 30 % of the Mapic[®] tests had to be discharged. These two test system and the Witness[®] FeLV had also a high percentage of results that were difficult to interpret. For these

reasons, the Mapic[®] FIV and FeLV, the One-Step[®] FeLV and Witness[®] FeLV cannot be recommended for use in veterinary practice.

The positive predictive values of all the FIV tests were between 91 % and 100 %. The best values were assessed for PetChek[®] Plus Anti-FIV and Mapic[®] FIV. The negative predictive values were between 96,1 % and 100 %. Snap[®] Combo Plus was the test with the best negative predictive value. No significant differences were found between the positive and negative predictive values of each test system.

The positive predictive values of all the FeLV tests were between 62 % and 90 %. The best value was achieved by the test system DUO Speed[®]. The positive predictive values for the 3 test systems Virachek[®], PetChek[®], and FASTest[®] were about 85 %. Significant differences were found between the better test systems DUO Speed[®], Virachek[®], PetChek[®], FASTest[®] and the test systems Witness[®], Snap[®] Combo Plus and One-Step[®]. These systems had a positive predictive value lower than 77 %. The negative predictive values were between 99,4 % and 99,7 %. One-Step[®] FeLV was the test with the best negative predictive value. No significant differences were found between each test system.

The FIV test systems DUO Speed[®], FASTest[®], Witness[®] and Snap[®] Combo Plus can all be recommended for use in veterinary practice. The PetChek[®] Plus Anti-FIV and Virachek[®] are recommended for the use in laboratories and veterinary hospitals. Due to the high percentage of invalid test results, the Mapic[®] FIV is not a reliable test system and cannot be recommended. The DUO Speed[®] FeLV and FASTest[®] FeLV are reliable FeLV test systems and can be used as diagnostic tools in veterinary practice.

Due to the low prevalence of both infections, positive results always have to be interpreted carefully, and a second testing should be performed in every positive sample. The PetChek[®] Plus Anti-FIV is the best test system to confirm a positive FIV test result. The One-Step[®] FeLV can be chosen for confirming a positive FeLV result.

Anhang

- A Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben**
- B Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben**
- C Tabellenverzeichnis**
- D Abbildungsverzeichnis**
- E Literaturverzeichnis**
- F Danksagung**
- G Curriculum vitae**

A Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Zeichenerklärung:

nicht auswertbar:	n.a.
kein Test	k.T.
positiv:	pos.
negativ:	neg.
schwach positiv	(pos.)
schwach negativ	(neg.)
Virusisolierung	VI

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Wit- ness [®]	Snap [®]	One- Step [®]	Mapic [®]	FAS- Test [®]	DUO Speed [®]	Vir- chek	Pet- Chek	VI
1	9	(neg.)	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
2	13	pos.	pos.	pos.	k.T.	neg.	n.a.	(pos.)	(pos.)	neg.
3	20	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
4	21	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
5	22	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
6	23	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
7	24	n.a.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
8	25	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
9	26	pos.	pos.	k.T.	n.a.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
10	27	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
11	28	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
12	29	pos.	pos.	k.T.	(pos.)	(pos.)	(pos.)	(pos.)	(pos.)	pos.
13	30	neg.	neg.	k.T.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
14	31	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
15	32	(neg.)	neg.	(pos.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
16	33	pos.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
17	35	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
18	37	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
19	38	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
20	39	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
21	41	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
22	42	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
23	43	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
24	44	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
25	45	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
26	46	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
27	47	(neg.)	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
28	48	(neg.)	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
29	49	neg.	neg.	(neg.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
30	50	(neg.)	neg.	(neg.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
31	51	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
32	52	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
33	53	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
34	54	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
35	55	(neg.)	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
36	56	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
37	57	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
38	61	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
39	62	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
40	63	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
41	64	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
42	65	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
43	66	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
44	67	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
45	68	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
46	69	(neg.)	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
47	70	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
48	71	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
49	72	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
50	73	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Witness [®]	Snap [®]	One-Step [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	VI
51	76	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
52	78	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
53	80	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
54	83	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
55	84	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
56	85	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
57	86	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
58	87	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
59	88	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
60	89	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
61	90	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
62	91	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
63	92	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
64	93	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
65	94	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
66	95	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
67	96	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
68	97	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
69	98	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
70	99	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
71	100	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
72	101	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
73	102	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
74	103	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
75	104	neg.	neg.	(neg.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
76	105	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
77	106	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
78	107	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
79	108	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
80	109	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
81	110	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
82	111	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
83	112	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
84	113	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
85	114	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
86	115	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
87	116	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
88	118	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
89	119	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
90	120	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
91	121	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
92	122	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
93	123	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
94	125	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
95	126	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
96	127	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
97	128	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
98	129	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
99	130	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
100	131	(pos.)	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Wit- ness [®]	Snap [®]	One- Step [®]	Mapic [®]	FAS- Test [®]	DUO Speed	Vira- chek [®]	Pet- Chek [®]	VI
101	132	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
102	133	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
103	134	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
104	135	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
105	136	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
106	137	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
107	138	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
108	139	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
109	140	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
110	141	pos.	neg.	neg.	n.a.	(pos.)	n.a.	neg.	neg.	neg.
111	142	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
112	143	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
113	144	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
114	146	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
115	147	neg.	neg.	n.a.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
116	148	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
117	149	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
118	150	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
119	151	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
120	152	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
121	153	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
122	154	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
123	155	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
124	156	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
125	157	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
126	158	neg.	neg.	n.a.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
127	159	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	neg.
128	160	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
129	161	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
130	162	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
131	163	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
132	164	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
133	165	neg.	neg.	pos.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
134	166	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
135	167	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
136	168	neg.	neg.	(pos.)	n.a.	(pos.)	n.a.	neg.	neg.	pos.
137	169	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
138	170	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
139	171	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
140	172	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
141	173	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
142	174	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
143	175	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
144	176	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
145	177	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
146	178	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
147	179	n.a.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
148	180	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
149	181	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
150	182	(neg.)	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Witness [®]	Snap [®]	One-Step [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed	Virachek [®]	Pet-Chek	VI
151	183	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
152	184	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
153	185	(neg.)	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
154	186	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
155	187	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
156	188	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
157	189	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
158	190	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
159	191	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
160	192	(neg.)	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
161	193	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
162	194	neg.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
163	195	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
164	196	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
165	197	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
166	199	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
167	200	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
168	201	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
169	202	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
170	203	(neg.)	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
171	205	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
172	206	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
173	207	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
174	208	neg.	neg.	(pos.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
175	210	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
176	211	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
177	212	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
178	213	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
179	214	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
180	215	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
181	216	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
182	217	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
183	218	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
184	219	(neg.)	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
185	220	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
186	221	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
187	222	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
188	224	neg.	neg.	(pos.)	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.
189	225	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
190	226	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
191	227	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
92	229	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
193	230	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
194	231	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
195	232	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
196	233	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
197	234	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
198	235	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
199	236	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
200	238	neg.	neg.	(neg.)	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Witness [®]	Snap [®]	One-Step [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	VI
201	239	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
202	240	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
203	241	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
204	242	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
205	243	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
206	244	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
207	245	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
208	246	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
209	247	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
210	248	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
211	249	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
212	250	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
213	251	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
214	253	(neg.)	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
215	254	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
216	255	(neg.)	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
217	256	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
218	257	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
219	258	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
220	259	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
221	260	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
222	261	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
223	262	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
224	263	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
225	265	neg.	neg.	n.a.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
226	267	pos.	pos.	n.a.	n.a.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	neg.
227	268	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
228	269	(pos.)	pos.	neg.	n.a.	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.
229	270	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
230	271	pos.	pos.	(pos.)	n.a.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
231	272	neg.	(pos.)	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
232	273	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
233	274	neg.	neg.	(neg.)	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
234	275	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
235	276	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
236	277	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
237	278	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
238	279	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
239	281	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
240	282	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
241	284	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
242	285	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
243	286	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
244	287	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
245	288	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
246	289	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
247	290	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
248	291	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
249	292	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
250	293	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Wit- ess [®]	Snap [®]	One- Step [®]	Mapic [®]	FAS- Test [®]	DUO Speed	Vira- chek [®]	Pet- Chek [®]	VI
251	294	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
252	295	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
253	296	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
254	297	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
255	298	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
256	299	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
257	301	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
258	302	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
259	303	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
260	304	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
261	305	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
262	306	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
263	307	(neg.)	neg.	pos.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
264	308	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
265	309	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
266	310	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
267	311	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
268	312	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
269	313	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
270	314	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
271	315	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
272	316	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
273	317	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
274	318	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
275	319	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
276	320	neg.	neg.	(pos.)	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
277	321	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
278	322	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
279	323	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
280	324	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
281	326	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
282	327	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
283	328	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
284	330	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
285	331	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
286	332	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
287	333	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
288	334	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
289	335	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
290	336	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
291	337	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	(pos.)	(pos.)	neg.
292	338	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
293	339	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
294	340	n.a.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
295	341	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
296	342	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
297	343	neg.	neg.	(pos.)	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
298	344	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
299	345	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
300	346	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Wit- ness [®]	Snap [®]	One- Step [®]	Mapic [®]	FAS- Test [®]	DUO Speed [®]	Vir- chek	Pet- Chek	VI
351	398	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
352	399	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
353	400	pos.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
354	401	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
355	402	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
356	403	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
357	404	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
358	405	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
359	406	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
360	407	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
361	408	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
362	409	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
363	411	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
364	412	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
365	413	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
366	416	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
367	417	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
368	418	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
369	419	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
370	420	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
371	421	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
372	423	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
373	424	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
374	425	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
375	426	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
376	427	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
377	428	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
378	430	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
379	431	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
380	432	neg.	pos.	neg.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	(pos.)	neg.
381	433	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
382	434	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
383	435	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
384	436	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
385	437	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
386	438	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
387	439	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
388	440	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
389	441	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
390	442	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
391	443	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
392	444	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
393	445	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
394	446	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
395	447	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
396	448	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
397	449	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
398	450	neg.	neg.	pos.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
399	451	neg.	neg.	pos.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
400	452	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Witness [®]	Snap [®]	One-Step [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek	Pet-Chek	VI
451	515	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
452	516	pos.	pos.	(pos.)	k.T.	(pos.)	(pos.)	pos.	n.a.	neg.
453	517	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
454	518	(pos.)	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
455	519	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
456	521	neg.	neg.	(pos.)	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
457	523	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
458	524	pos.	pos.	n.a.	neg.	(pos.)	n.a.	(pos.)	neg.	neg.
459	525	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
460	526	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
461	527	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
462	528	(neg.)	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
463	529	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
464	530	pos.	pos.	neg.	k.T.	pos.	neg.	(pos.)	(pos.)	neg.
465	531	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
466	532	(neg.)	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
467	533	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
468	534	n.a.	neg.	pos.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
469	535	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
470	536	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
471	537	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
472	538	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
473	539	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
474	540	(neg.)	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
475	541	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
476	542	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
477	543	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
478	544	(neg.)	neg.	(pos.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
479	545	neg.	neg.	(pos.)	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
480	546	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
481	548	neg.	neg.	n.a.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
482	549	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
483	551	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
484	553	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
485	554	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
486	555	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
487	556	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
488	557	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
489	558	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
490	559	neg.	(pos.)	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
491	560	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
492	561	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
493	562	pos.	pos.	(pos.)	k.T.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.
494	563	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
495	564	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
496	565	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
497	566	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	(pos.)	neg.	pos.
498	567	n.a.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
499	568	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
500	569	neg.	neg.	n.a.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang A: Ergebnisse der FeLV-Testsysteme bei 528 Serumproben

Nr.	Probe	Wit-ness [®]	Snap [®]	One-Step [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Vira-chek [®]	Pet-Chek	VI
501	570	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
502	571	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
503	572	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
504	572b	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
505	573	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
506	574	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
507	575	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
508	576	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
509	577	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
510	578	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
511	579	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
512	580	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	pos.
513	581	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
514	582	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
515	583	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
516	584	neg.	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
517	585	pos.	pos.	pos.	k.T.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	pos.
518	586	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
519	587	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
520	588	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
521	589	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
522	590	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
523	591	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
524	592	pos.	pos.	pos.	n.a.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
525	593	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
526	594	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
527	595	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
528	596	(neg.)	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	

B Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Zeichenerklärung:

nicht auswertbar:	n.a.
kein Test	k.T.
positiv:	pos.
negativ:	neg.
schwach positiv:	(pos.)
schwach negativ	(neg.)
Western Blot	WB

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Proben	Wit- ness®	Snap®	Mapic®	FAS- Test®	DUO Speed®	Vira- chek®	Pet- Chek	WB
1	9	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
2	13	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
3	20	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
4	21	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
5	22	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
6	23	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
7	24	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
8	25	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
9	26	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
10	27	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
11	28	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
12	29	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
13	30	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
14	31	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
15	32	neg.	neg.	(neg)	neg.	neg.	neg.	neg.	
16	33	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
17	35	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
18	37	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
19	38	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
20	39	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
21	41	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
22	42	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
23	43	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
24	44	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
25	45	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
26	46	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
27	47	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
28	48	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
29	49	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
30	50	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
31	51	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
32	52	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
33	53	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
34	54	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
35	55	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
36	56	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
37	57	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
38	61	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
39	62	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
40	63	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
41	64	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
42	65	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
43	66	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
44	67	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
45	68	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
46	69	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
47	70	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
48	71	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
49	72	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.
50	73	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Proben	Wit- ness®	Snap®	Mapic®	FAS- Test®	DUO Speed®	Vira- chek®	Pet- Chek®	WB
51	76	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
52	77	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
53	78	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
54	79	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
55	80	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
56	83	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
57	84	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
58	85	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
59	86	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
60	87	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
61	88	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
62	89	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
63	90	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
64	91	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
65	92	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
66	93	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
67	94	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
68	95	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
69	96	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
70	97	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
71	98	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
72	99	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
73	100	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
74	101	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
75	102	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
76	103	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
77	104	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
78	105	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
79	106	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
80	107	pos.	(pos.)	neg.	pos.	pos.	pos.	n.V.	neg.
81	108	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
82	109	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
83	110	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
84	111	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
85	112	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
86	113	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
87	114	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
88	115	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
89	116	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
90	118	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
91	119	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
92	120	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	(pos.)	pos.	pos.
93	121	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
94	122	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
95	123	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
96	125	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
97	126	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
98	127	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
99	128	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
100	129	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Probe	Wit-ness [®]	Snap [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	WB
101	130	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
102	131	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
103	132	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
104	133	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
105	134	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
106	135	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
107	136	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
108	137	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
109	138	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
110	139	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
111	140	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
112	141	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
113	142	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
114	143	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
115	144	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
116	146	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
117	147	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
118	148	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
119	149	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
120	150	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
121	151	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
122	152	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
123	153	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
124	154	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
125	155	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
126	156	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
127	157	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
128	158	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
129	159	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
130	160	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
131	161	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
132	162	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
133	163	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
134	164	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
135	165	neg.	neg.	k.T.	neg.	pos.	neg.	neg.	
136	166	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
137	167	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
138	168	neg.	neg.	neg.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
139	169	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
140	170	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
141	171	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
142	172	neg.	neg.	n.a.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
143	173	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
144	174	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
145	175	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
146	176	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
147	177	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
148	178	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
149	179	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
150	180	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	n.a.	neg.	

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Probe	Wit-ness [®]	Snap [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	WB
151	181	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
152	182	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
153	183	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
154	184	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
155	185	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
156	186	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
157	187	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
158	188	(pos.)	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
159	189	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
160	190	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
161	191	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
162	192	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
163	193	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
164	194	neg.	neg.	n.a.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
165	195	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
166	196	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
167	197	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
168	199	neg.	neg.	n.a.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	
169	200	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
170	201	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
171	202	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
172	203	pos.	n.a.	(pos.)	pos.	n.a.	pos.	pos.	pos.
173	205	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
174	206	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
175	207	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
176	208	neg.	neg.	n.a.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
177	210	neg.	neg.	n.a.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
178	211	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
179	212	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
180	213	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
181	214	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
182	215	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
183	216	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
184	217	neg.	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.
185	218	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
186	219	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
187	220	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
188	221	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
189	222	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
190	224	neg.	neg.	k.T.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
191	225	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
192	226	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
193	227	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
194	229	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
195	230	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
196	231	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
197	232	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
198	233	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
199	234	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
200	235	neg.	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Probe	Witness [®]	Snap [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	WB
301	343	neg.	neg.	k.T.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
302	344	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
303	345	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
304	346	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
305	347	neg.	neg.	n.a.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.
306	348	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
307	349	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
308	350	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
309	351	neg.	(pos.)	n.a.	neg.	n.a.	neg.	neg.	pos.
310	352	neg.	neg.	k.T.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
311	353	neg.	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	
312	354	neg.	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	
313	355	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
314	356	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
315	357	neg.	neg.	k.T.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	
316	358	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
317	359	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
318	360	neg.	neg.	k.T.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	
319	361	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
320	362	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
321	363	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
322	364	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
323	365	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
324	366	pos.	pos.	(pos.)	(pos.)	neg.	pos.	pos.	pos.
325	367	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
326	368	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
327	369	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
328	370	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
329	371	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.
330	372	neg.	neg.	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	
331	373	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
332	374	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
333	375	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
334	376	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
335	377	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
336	378	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
337	379	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
338	380	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
339	381	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
340	382	pos.	n.a.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
341	383	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
342	384	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
343	385	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
344	386	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
345	388	neg.	neg.	k.T.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
346	389	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
347	390	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
348	391	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
349	392	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
350	393	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Probe	Wit-ness [®]	Snap [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	WB
351	394	pos.	pos.	n.a.	pos.	neg.	(pos.)	pos.	pos.
352	395	pos.	pos.	k.T.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
353	396	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
354	397	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
355	398	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
356	399	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
357	400	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
358	401	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
359	402	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
360	403	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
361	404	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
362	405	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
363	406	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
364	407	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
365	408	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
366	409	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
367	411	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
368	412	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
369	413	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
370	416	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
371	417	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
372	418	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
373	419	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
374	420	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
375	421	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
376	423	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
377	424	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
378	425	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
379	426	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
380	427	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
381	428	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
382	429	n.a.	neg.	k.T.	pos.	(pos.)	neg.	neg.	neg.
383	430	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
384	431	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	
385	432	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
386	433	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
387	434	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
388	435	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
389	436	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
390	437	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
391	438	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
392	439	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
393	440	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
394	441	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
395	442	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
396	443	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
397	444	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
398	445	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
399	446	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
400	447	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	

Anhang B: Ergebnisse der FIV-Testsysteme bei 535 Serumproben

Nr.	Proben	Witness [®]	Snap [®]	Mapic [®]	FAS-Test [®]	DUO Speed [®]	Virachek [®]	Pet-Chek [®]	WB
501	563	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	
502	564	neg.	neg.	k.T.	neg.	pos.	neg.	neg.	
503	565	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
504	566	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
505	567	neg.	neg.	k.T.	neg.	pos.	neg.	neg.	
506	568	neg.	neg.	k.T.	neg.	neg.	neg.	neg.	
507	569	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
508	570	neg.	neg.	k.T.	neg.	pos.	neg.	neg.	
509	571	neg.	(pos.)	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
510	572	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	
511	572b	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	
512	573	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
513	574	neg.	neg.	(neg.)	neg.	neg.	neg.	neg.	
514	575	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
515	576	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
516	577	neg.	neg.	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.
517	578	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
518	579	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
519	580	pos.	pos.	neg.	pos.	(pos.)	pos.	pos.	pos.
520	581	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
521	582	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
522	583	pos.	pos.	(pos.)	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
523	584	pos.	pos.	(pos.)	pos.	neg.	(pos.)	pos.	pos.
524	585	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	
525	586	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
526	587	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
527	588	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
528	589	neg.	neg.	neg.	(pos.)	neg.	neg.	neg.	neg.
529	590	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
530	591	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
531	592	neg.	neg.	k.T.	neg.	pos.	neg.	neg.	
532	593	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.
533	594	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	
534	595	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	
535	596	neg.	neg.	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnostische FeLV-Testsysteme seit 1979	4
Tabelle 2:	Diagnostische FIV-Testsysteme seit 1988	24
Tabelle 3:	Verwendete FeLV-Testsysteme	38
Tabelle 4:	Verwendete FIV-Testsysteme	39
Tabelle 5:	Reagenzien des Virachek [®] FeLV	51
Tabelle 6:	Reagenzien des PetChek [®] FeLV	52
Tabelle 7:	Reagenzien des Virachek [®] FIV	61
Tabelle 8:	Reagenzien des PetChek [®] Plus Anti-FIV	62
Tabelle 9:	Ausstattung der Elektrophoresekammer Mini Protean II Cell (Bio Rad, Hercules, Richmond, Kalifornien, USA).....	64
Tabelle 10:	Technische Hilfsmittel	64
Tabelle 11:	Erforderliche Reagenzien	65
Tabelle 12:	Rezept für zwei Laufgele	67
Tabelle 13:	Rezept für zwei Trenngele	67
Tabelle 14:	Reagenzien für Elektrophoresepuffer	67
Tabelle 15:	Rezeptur für Antigen-Laemmli-Puffer.....	67
Tabelle 16:	Rezeptur für Blotpuffer	68
Tabelle 17:	Rezeptur für PBS Lösung (pH 7,2).....	69
Tabelle 18:	Rezeptur für Gelatine Puffer	69
Tabelle 19:	Rezeptur für Substrat	69
Tabelle 20:	Komponenten des Wachstumsmedium	71
Tabelle 22:	Auswertung von acht verschiedenen FeLV-Testsystemen ohne Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"	81
Tabelle 23:	Auswertung von acht verschiedenen FeLV-Testsystemen mit Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"	82
Tabelle 24:	Darstellung der 17 Proben mit "nicht bestätigbaren Ergebnissen"	83
Tabelle 25:	Darstellung der positiv bestätigten FeLV-Ergebnisse.....	83
Tabelle 26:	Darstellung der Proben mit unterschiedlichen FeLV- Testergebnissen	84
Tabelle 27:	Statistischer Vergleich von jeweils zwei FeLV-Testsystemen unter Berücksichtigung der Anzahl richtiger Ergebnisse.....	85
Tabelle 28:	Statistischer Vergleich von jeweils zwei FeLV-Testsystemen unter Berücksichtigung des positiven prädiktiven Werts.....	86
Tabelle 29:	Diskrepante FeLV-Ergebnisse	87
Tabelle 30:	Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme ohne Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"	88
Tabelle 31:	Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme mit Berücksichtigung der 17 "nicht bestätigbaren Ergebnisse"	89

Tabelle 32: Negativ prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme	90
Tabelle 33: Ergebnisse der FeLV-Verdünnungsreihe	93
Tabelle 34: Vergleich von sieben verschiedenen FIV-Testsystemen	96
Tabelle 35: Darstellung der positiv bestätigten FIV-Ergebnisse	97
Tabelle 36: Statistischer Vergleich von jeweils zwei FIV-Testsystemen unter Berücksichtigung der Anzahl richtiger Ergebnisse.....	98
Tabelle 37: Diskrepante FIV-Ergebnisse	99
Tabelle 38: Positiv prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme	100
Tabelle 39: Negativ prädiktive Werte (%) bei Kombination zweier Testsysteme	101
Tabelle 40: Ergebnisse der FIV-Verdünnungsreihe.....	102

D Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Verlaufsformen der FeLV-Infektion (nach HARTMANN & HEIN, 2002).....	6
Abb. 2:	Prinzip der “real-time“-Taqman-PCR (nach LEUTENEGGER et al., 1999).....	17
Abb. 3:	Enzyme-linked immunosorbent assay (nach RAMSEY & TENNANT, 2001)	40
Abb. 4:	Prinzip der Immunochromatographie (nach RAMSEY & TENNANT, 2001)	41
Abb. 5:	Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des Witness [®] FeLV	43
Abb. 6:	Darstellung des Snap [®] -Testers.....	44
Abb. 7:	Auslösen des Snap [®] -Testers.....	44
Abb. 8:	Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des Snap [®] Combo Plus	45
Abb. 9:	Auswertung des One-Step [®] FeLV	46
Abb. 10:	Darstellung eines ungültigen FeLV-Ergebnis des MapiC [®] FeLV	48
Abb. 11:	Darstellung eines negativen und positiven FeLV-Ergebnis des DUO Speed [®]	50
Abb. 12:	Darstellung eines positiven ELISA-Ergebnis des Virachek [®]	51
Abb. 13:	Darstellung eines negativen und positiven FIV-Ergebnis des Witness [®] FIV	55
Abb. 14:	Darstellung eines positiven und negativen FIV-Ergebnis des Snap [®] Combo Plus	57
Abb. 15:	Darstellung eines negativen und positiven FIV-Ergebnis des DUO Speed [®]	60
Abb. 16:	Western Blot (nach RAMSEY & TENNANT, 2001).....	64
Abb. 17:	Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiven und negativen prädiktiven Werts eines Testsystems	74
Abb. 18:	Berechnung der Sensitivität	74
Abb. 19:	Berechnung der Spezifität	75
Abb. 20:	Berechnung des positiven prädiktiven Werts.....	75
Abb. 21:	Bayes Formel	75
Abb. 22:	Berechnung des negativen prädiktiven Werts.....	76
Abb. 23:	Positive prädiktive Werte der geprüften FeLV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz ohne Berücksichtigung der 17 “nicht bestätigbaren Ergebnisse“	91
Abb. 24:	Positive prädiktive Werte der geprüften FeLV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz mit Berücksichtigung der 17 “nicht bestätigbaren Ergebnisse“	92
Abb. 25:	Positive prädiktive Werte der geprüften FIV-Testsysteme in Abhängigkeit von der Prävalenz	101

E Literaturverzeichnis

1. Addie D, Ramsey I. The laboratory diagnosis of infectious diseases. In: Manual of Canine and Feline infectious diseases. Ramsey I, Tennant B, eds. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2001: 15-17.
2. Albert J, Fenyő EM. Simple, sensitive and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. J Clin Microbiol 1990; 28: 1560-1564.
3. Allenspach K, Amacher M, Leutenegger C, Hottiger M, Hofmann-Lehmann R, Hubscher U, Pistello M, Lutz H. Quantification of proviral FIV DNA using competitive PCR. SAT 1996; 138: 87-92.
4. Avraméas A, Strosberg AD, Moraillon A, Sonigo P, Pancino G. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from *env* glycoproteins. Res Virol 1993; 144: 209-18.
5. Babyak SD, Groves MG, Dimski DS, Taboada J. Evaluation of a saliva test kit for feline leukemia virus antigen. J Am Anim Hosp Assoc 1996; 32: 397-400.
6. Bachmann MH, Mathiason-Dubard C, Learn GH, Rodrigo AG, Sodora DL, Mazzetti P, Hoover EA, Mullins JI. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. J Virol 1997; 71: 4241-53.
7. Barr MC. FIV, FeLV, and FIPV : Interpretation and Misinterpretation of Serological Test Results. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 1996; 11: 144-53.
8. Barr MC, Pough MB, Jacobson RH, Scott FW. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. J Am Vet Med Assoc 1991; 199: 1377-91.
9. Bendinelli M, Pistello M, Matteucci D, Lombardi S, Baldinotti F, Bandecchi P, Ghilarducci R, Ceccherini-Nelli L, Garzelli C, Poli A, and et al. Small animal model of AIDS and the feline immunodeficiency virus. Ad Exp Med Biol 1993; 98: 145-54.

10. Bendinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvaldi G, Tozzini F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 87-112.
11. Berry BT, Ghosh AK, Kumar DV, Spodick DA, Roy-Burman P. Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. *J Virol* 1988; 62: 3631-41.
12. Calandrella M, Matteucci D, Mazzetti P, Poli A. Densitometric analysis of Western blot assays for feline immunodeficiency virus antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 79: 261-71.
13. Calzolari M, Young E, Cox D, Davis D, Lutz H. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 83-92.
14. Cammarota G, Da Prato L, Nicoletti E, Matteucci D, Bendinelli M, Pistello M. Quantitation of feline immunodeficiency proviruses in doubly infected cats using competitive PCR and a fluorescence-based RFLP. *J Virol Methods* 1996; 62: 21-31.
15. Casey JW, Roach A, Mullins JI, Burck KB, Nicolson MO, Gardner MB, Davidson N. The U3 portion of feline leukemia virus DNA identifies horizontally acquired proviruses in leukemic cats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7778-82.
16. Charreyre C, Pedersen NC. Study of feline leukemia virus immunity. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1316-24.
17. Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A, Varaldo PE. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl.* 1993; 2: 191-96.
18. Dandekar S, Beebe AM, Barlough J, Phillips T, Elder J, Torten M, Pedersen NC. Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *J Virol* 1992; 66: 4040-9.
19. DelFierro GM, Bundesen P, Martin S, Jones S, Beetson S, Robinson WF. Evaluation of an autologous red cell agglutination test, VetRED FIVTM for

- the presence of FIV antibody in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 46: 93-101.
20. DeNoronha F, Poco A, Post JE, Rickard CG. Virus isolation test for feline leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 129-31.
 21. DeNoronha F, Schäfer W, Essex M and others. Influence of antisera to oncornavirus glycoprotein (gp71) on infections of cats with feline leukemia virus. *Virol* 1978; 85(2): 617-21.
 22. Egberink HF, Ederveen J, Montelaro RC, Pedersen NC, Horzinek MC, Koolen MJM. Intracellular proteins of the feline immunodeficiency virus and their antigenetic relationship with equine infectious anaemia virus proteins. *J Gen Virol* 1990; 71: 739-43.
 23. Egberink HF, Lutz H, Horzinek MC. Use of western blot and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1339-42.
 24. Egberink HF, Keldermans CEJM, Koolen MJM, Horzinek MC. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am J Vet Res* 1992; 53: 1133-8.
 25. Elder JH, Phillips TR. Molecular properties of feline immunodeficiency virus (FIV). *Infect Agents Dis* 1993; 2: 361-74.
 26. Elder JH, Phillips TR. The genomic organization of feline immunodeficiency virus. In: *Feline immunology and immunodeficiency*. Willett BJ, Jarrett O, eds. New York: Oxford University Press, 1995: 220-42.
 27. Essex M. The immune response to oncornavirus infection. In: *Viruses, Evolution, and Cancer*. Kurstak E, Maramorosch K, eds. New York: Academic Press, Inc., 1974: 513-541.
 28. Essex M. Horizontally and vertically transmitted oncornaviruses of cats. *Adv Cancer Res* 1975; 21: 175-248.
 29. Essex M, Klein G, Snyder SP, Harrold JB. Antibody to feline coronavirus-associated cell membrane antigen in neonatal cats. *J Natl Cancer* 1971a; 8: 384-90.

30. Essex M, Klein G, Snyder SP, Harrold JB. Correlation between humoral antibody and regression of tumors by feline sarcoma virus. *Nature* 1971b; 233: 195-96.
31. Essex M, Snyder SP. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. 1. Serologic studies with kittens exposed to cell-free materials from various feline fibrosarcomas. *J Nat Cancer Inst* 1973; 51: 1007-12.
32. Essex M, Cotter SM, Carpenter JL, Hardy WD Jr, Hess P, Jarrett W, Yohn DS. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. II. Antibody titers in healthy cats from household and laboratory colony environments. *J Natl Cancer* 1975a; 54(3): 631-35.
33. Essex M, Sliski A, Cotter SM, Jakowski RM, Hardy WD JR. Immunosurveillance of naturally occurring feline leukemia. *Science* 1975b; 190: 790-92.
34. Essex M, Cotter SM, Sliski AH, et al. Horizontal transmission of feline leukemia virus under natural conditions in a feline leukemia cluster household. *Int J Cancer* 1977; 19: 90-96.
35. Fevereiro M, Roneker C, Laufs A, Tavares L, DeNoronha, F. Characterization of two monoclonal antibodies against feline immunodeficiency virus gag gene products and their application in an assay to evaluate neutralizing antibody activity. *J Gen Virol* 1991; 72: 617-622.
36. Fischinger PJ, Schafer W, Bolognesi DP. Neutralization of homologous and heterologous oncornaviruses by antisera against the p15 (E) and gp71 polypeptides of Friend murine leukemia virus. *Virology* 1974; 71: 169-84.
37. Floyd K, Suter PF, Lutz H. Granules of blood eosinophils are stained directly by antiimmunoglobulin fluorescein isothiocyanate. *Am J Vet Res* 1983; 44: 2060-3.
38. Flynn JN, Hanlon L, Jarrett O. Feline leukemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 2000; 101: 120-25.
39. Fontenot JD, Hoover EA, Elder J, Montelaro RC. Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1885-90.

40. Franchini M, Dittmer A, Kottwitz B, Lehmann R, Lutz H. Clinical symptoms and humoral antibody response in cats experimentally infected with FIV and FeLV. In: Animal models for AIDS. Schellekens H, Horzinek M, eds. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1990; 201-7.
41. Furuya T, Hasegawa A, Miyazawa T, Miki K, Mikami T. Detection of antibodies of feline immunodeficiency virus in a cat sera by enzyme-linked immunosorbent assay. Arch Virol 1992; 124: 355-61.
42. Geering G, Hardy WD, Old LJ, DeHarven E, Brodey RS. Shared group-specific antigen of murine and feline leukemia viruses. Virol 1968; 36: 678-80.
43. Gibson UEM, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. Gen Res 1996; 6: 995-1001.
44. Grant CK, Essex M, Gardner MB, Hardy WD. Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. Cancer Res 1980; 40: 823-9.
45. Grant CK, Essex M. In: Mechanisms of immunology to virus-induced tumors. Blasecki, J.W. ed. New York/Basel: Marcel Dekker Inc., 1981: 119-80.
46. Greene WK, Meers J, DelFierro G, Carnegie PR, Robinson WF. Extensive sequence variation of feline immunodeficiency virus *env* genes in isolates from naturally infected cats. Arch Virol 1993; 133: 51-62.
47. Greiner M. Current concepts in test validation and interpretation. Proceeding of the 9th Annual Congress of the European Society of Veterinary Internal Medicine (ESVIM), Perugia, 1999; 67-72.
48. Grindem CB, Corbett WT, Ammermann BE, Tomkins MT. Seroepidemiologic survey of feline immunodeficiency virus infection of cats of Wake County, North Carolina. J Am Vet Med Assoc. 1989; 194: 226-28.
49. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AL, et al. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Ann Intern Med 1981; 194: 553-92.
50. Groat R, Madsen G, Bartol B, Skvorak P, Serlemitsos K, Monn M. Upgraded IDEXX Diagnostic Products for Simultaneous Detection of Antibodies to Feline Immunodeficiency Virus (FIV) gag and env Proteins in Feline Blood

- Samples. 25th World Small Animal Veterinary Association/ 6th Federation of European Companion Animal Veterinary Association/ Voorjaarsdagen Congress, Amsterdam, The Netherlands, April 26-29, 2000.
51. Gwalter HR. FeLV-Testmethoden: IF oder ELISA. *Kleintierprax* 1981; 27: 241-6.
 52. Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 1986; 322: 130-6.
 53. Harbour DA, Williams PD, Gruffydd-Jones TJ, Burbridge J, Pearson GR. Isolation of a T-lymphotropic lentivirus from a persistently leukopenic domestic cat. *Vet Rec* 1988; 122: 84-6.
 54. Hardy WD Jr. Immundiffusion studies of feline leukemia and sarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 158: 1060-9.
 55. Hardy WD Jr, Hirshaut Y, Hess P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. In : *Bibl. haemat.* 1973; 39: 778-99.
 56. Hardy WD Jr. Feline leukemia virus disease, In: *Feline leukemia virus.* Hardy WD Jr, Essex M, McClelland AJ, eds. New York: Elsevier Scientific Publishing Co: 1980a; 3-31.
 57. Hardy WD Jr. The virology, immunology and epidemiology of the feline leukemia virus. In: *Feline leukemia virus.* Hardy WD Jr, Essex M, McClelland AJ, eds. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier: 1980b: 33-79.
 58. Hardy WD Jr. The feline leukemia virus. *J Am Anim Assoc* 1981; 17: 951-80.
 59. Hardy WD Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 10: 1282-6.
 60. Hardy WD Jr, Geering G, Old LJ, DeHarven E, Brodey RS, McDonough S. Feline leukemia virus: occurrence of viral antigen in the tissues of cats with lymphosarcoma and other diseases. *Science* 1969; 166: 1019-21.
 61. Hardy WD Jr, Hirschaut EE, Hess P. Detection of feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. In: *Unifying concepts of leukemia.* Dutcher RM, Cheico-Branchi L, eds. Basel, Switzerland: Karger: 1973a; 778-99.

62. Hardy WD Jr, Old LJ, Hess P, et al. Horizontal transmission of feline leukemia virus. *Nature* 1973b; 244: 266-69.
63. Hardy WD Jr, McClelland AJ, Zuckerman EE, et al. Prevention of the contagious spread of feline leukemia virus and the development of leukemia in pet cats. *Nature* 1976a; 263: 326-72.
64. Hardy WD Jr, Hess PW, McEveb EG, McClelland AJ, Zuckerman EE, Essex M, Cotter SM, Jarrett O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res* 1976b; 36(2): 582-8.
65. Hardy WD Jr, McClelland AJ. Feline leukemia virus: Its related diseases and control. *Vet Clin N Am* 1977a; 7: 93-103.
66. Hardy WD Jr, McClelland AJ, MacEwen EG, et al. The epidemiology of the feline leukaemia virus (FeLV). *Cancer Res* 1977b; 39: 1850-5.
67. Hardy WD Jr, Zuckerman E. Development of the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991a; 199: 1365-73.
68. Hardy WD Jr, Zuckermann EE. Comparison of ELISA, IFA and immunoblot tests for detection of feline immunodeficiency virus infection. Proceeding of the 1st World Congress of Feline Immunodeficiency Virus Researchers, Davis 1991b.
69. Hardy WD Jr, Zuckermann EE. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assays with the immunofluorescent antibody test for detection of Feline leukemia virus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991c; 199: 1365-73.
70. Hartmann K. Die Infektion durch das feline Immunschwäche Virus (FIV). In: Katzenkrankheiten. Kraft W, Dürr U, eds. Hannover Deutschland: Scharper, 1996: 182-91.
71. Hartmann K, Lutz H. Vorkommen von FIV-Infektionen im Einzugsbereich der Münchner Tierklinik. *Tieraerztl Prax* 1989; 5: 81-3.
72. Hartmann K, Kuffer M, Egberink H, Lutz H, Kraft W. Diagnostik der FIV-Infektion. *Tieraerztl Prax* 1994; 22: 268-72.

73. Hartmann K, Werner RM, Egberink H, Jarrett O. Comparison of different in-house tests for rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet Rec* 2001; 149(11): 317-20.
74. Hartmann K, Werner RM, Egberink H. Diagnose der feline Immunschwächeinfektion in der Praxis. *Tierärztl Prax* 2001; 29: 332-8.
75. Hartmann K, Hein J. Feline Leukämievirusinfektion. *Tierärztliche Praxis* 2002; 30: 78 – 84.
76. Hawkins EC. Saliva and tears tests for feline leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1382-5.
77. Hawkins EC, Johnson L, Pedersen NC, Winston S. Use of tears for diagnosis of feline leukemia virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 188: 1031-34.
78. Hawks DM, Legendre AM, Rohrbach BW. Comparison of four test kits for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1373-7.
79. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Gen Res* 1996; 6: 986-94.
80. Herring LP, Troy GC, Toth TE, Champagne ES, Pickett JP, Haines DM. Feline leukemia virus detection in corneal tissue of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Vet Ophthalmology* 2001; 4: 119-26.
81. Hirsch VM, Searcy GP, Bellamy JEC. Comparison of ELISA and immunofluorescence assay for detection of FeLV antigens in blood of cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18: 933-8.
82. Hofmann-Lehmann R, Huder JB, Gruber S, Boretti F, Sigrist B, Lutz H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *J Gen Virol* 2001; 82: 1589-96.
83. Hohdatsu T, Yamada M, Okada M, Fukasaba M, Watanabe K, Ogasabara T, Takagi M, Aizawa C, Hayami M, Koyama H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1992; 30: 113-23.
84. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity

- of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Science, USA. 1991; 88: 7276-80.
85. Holznagel E, Lutz H, Steinhauer D, Reinacher M. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats at necropsy: a serological study. *J Com Path* 1997; 116: 339-52.
86. Hoover EA, Olsen RG, Hardy WD Jr, et al. Horizontal transmission of feline leukemia virus under experimental conditions. *J Natl Cancer Inst* 1977a; 58: 443-44.
87. Hoover EA, Olsen RG, Mathes LE, Schaller JP. Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bone marrow, and saliva of cats. *Canc Res* 1977b 37: 3707-10.
88. Hoover EA, Rojko JL, Olsen RG. Host-virus interactions in progressive versus regressive feline leukemia virus infection in cats. In: *Viruses in Naturally Occuring Cancer*. Essex M, Todaro G, zur Hausen H, eds., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1980: 635.
89. Hoover EA, Mullins JI. Feline leukemia virus infections and diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1287-97.
90. Hopper CD, Sparkes AH, Gruffyd-Jones TJ, Crispin SM, Muir P, Harbour DA, Stokes CR. Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Vet Rec* 1989; 125: 341-6.
91. Horzinek MC. Leukämie. In: *Virusinfektionen bei Katzen*. Horzinek MC, ed. Stuttgart, Deutschland: Ferdinand Enke Verlag, 1990: 26-37.
92. Horzinek MC, Everdeen J, Egberink H, Lutz H. Das Feline T-Lymphotrope Lentivirus (FTLV): Verursacher von AIDS bei der Katze. 34. Jahrestagung der Fachgruppe Kleintierkrankheiten der DVG, Nürnberg, Deutschland, 1988.
93. Hosie MJ, Robertson C, Jarrett O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 1989; 125: 293-7.
94. Hosie MJ, Jarrett O. Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. *AIDS* 1990; 4: 263-78.

95. Ishida T, Washizu T, Toriyabe K, Motoyoshi S, Tomoda I, Pedersen NC. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 221-5.
96. Jackson ML, Haines DM, Meric SM, Misra V. Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 1993; 57: 269-76.
97. Jacobson RH. How well do serodiagnostic tests predict the infection or disease status of cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1343-47.
98. Jacobson RH, Lopez NA. Comparative study of diagnosis testing for feline leukemia virus infection. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1389-91.
99. Jacquemin PC, Saxinger C, Gallo RC and others. Antibody response in cats to feline leukemia virus reverse transkriptase under natural conditions of exposure to the virus. *Virology* 1978; 91(2): 472-6.
100. Jarrett O. Feline leukaemia virus diagnosis. *Vet Rec* 1980; 108: 513.
101. Jarrett O. Overview of feline leukemia virus research. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1279-81.
102. Jarrett O. National FeLV/FIV awareness project. *Vet Rec* 1991; 128 : 311.
103. Jarrett O. Detection of FeLV antigen. *Vet Record* 1995; 137: 127.
104. Jarrett O, Laird HM, Hay D, Crichton GW. Replication of cat leukaemia virus in cell cultures. *Nature* 1968; 219: 521-2.
105. Jarrett O, Golder MC, Stewart MF. Detection of transient and persistent feline leukemia virus infections. *Vet Rec* 1982a; 110: 225-8.
106. Jarrett O, Golder MC, Weijer K. A comparison of three methods of feline leukaemia virus diagnosis. *Vet Rec* 1982b; 110: 325-28.
107. Jarrett O, Pacitti AM, Hosie MJ, Reid G. Comparison of diagnostic methods for feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J Am Med Assoc* 1991; 199: 1362-4.
108. Jarrett WFH, Crawford EM, Martin WB, Davie F. Leukemia in cat: a virus-like partic Jarrett WFH, Martin WB, Crichton GW, Dalton RG, Steward MF,

- Crawford EM, Martin WB, Davie F. Leukemia in the cat: transmission experiments with leukemia (lymphosarcoma). *Nature* 1964; 202: 566-8.
109. Jarrett WFH, Jarrett O, Mackey L, et al. Horizontal transmission of leukemia virus and leukemia in the cat. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 833-41.
110. Kahn DE, Mia AS, Tierney MM. Field evaluation of Leukassay F, a FeLV detection test kit. *Feline Pract* 1980; 10: 44-5.
111. Kawaguchi Y, Miyazawa T, Tohja Y, Takahashi E, Mikami T. Quantification of feline immunodeficiency virus in a newly established feline T-lymphoblastoid cell line (MYA-1 cells). *Arch Virol* 1990; 111: 269-73.
112. Kemp DJ, Smith DB, Foote SJ, Samaras N, Peterson MG. Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2423-27.
113. Kerr MG, Smith JD. Detection of FeLV antigen by indirect immunofluorescence in ELISA/CITE negative cats. *Vet Rec* 1995; 136: 516-18.
114. Klein D, Leutenegger C, Salmons B, Lutz H, Günzburg WH. Real-time PCR: a powerful tool to quantify "viral loads". In: Abstracts Fourth International Feline Retrovirus Research Symposium, Glasgow, United Kingdom 1998: 42.
115. Kovacevic S, Kipar A, Kremendahl J, Teebken-Schuler D, Grant CK, Reinacher M. Immunohistochemical diagnosis of a feline leukemia virus infection in formalin-fixed tissue. *Europ J Vet Pathol* 1997; 3(1): 13-9.
116. Laird HM, Jarrett O, Crighton GW, et al. An electron microscopic study of virus particles in spontaneous leukemia in the cat. *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 867-78.
117. Ledbetter JA, Nowinski RC, Eisenmann RN. Biosynthesis and metabolism of viral proteins expressed on the surface of murine leukemia virus-infected cells. *Virol* 1978; 91(1): 116-29.
118. Leutenegger CM, Klein D, Hofmann-Lehmann R, Mislin C, Hummel U, Böni J, Boretti F, Guenzburg WH, Lutz H. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. *J Virol Methods* 1999; 78: 105-16.

119. Leutenegger CM, Boretti F, Mislin C, Flynn JN, Schroff M, Habel A, Junghans C, Koenig-Merediz SA, Sigrist B, Aubert A, Pedersen NC, Wittig B, Lutz H. Immunization of cats against feline immunodeficiency virus infection using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing FIV-gp40 alone or with feline IL-12, IL-16 or CpG. *J Virol* 2000a; in press.
120. Lewis MG, Wright KA, Lafrado LJ, et al. Saliva as a source of feline leukemia virus antigen for diagnosis of disease. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1320-2.
121. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 1995; 4: 357-62.
122. Loar AS. Feline leukemia virus tests: Evaluation and Interpretation. In: Consultations in feline internal medicine. August JR, ed. New York: W.B. Saunders Company, 1991: 535-41.
123. Loar AS. Feline leukemia virus. Immunization and prevention. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1993; 23: 193-211.
124. Lombardi S, Garzelli C, La Rosa C, Zaccaro L, Specter S, Malvaldi G, Tozzini F, Esposito F, Bendinelli M. Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the feline immunodeficiency virus envelope. *J Virol* 1993; 46: 4742-9.
125. Lopez NA, Jacobson RH. False-positive reactions associated with anti-mouse activity in serotests for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 741-6.
126. Lopez NA, Jacobson RH, Scarlett JM, Center SA, Randolph JF, Scott FW. Sensitivity and specificity of blood test kits for feline leukemia virus antigen. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 747-51
127. Lopez NA, Scarlett JM, Pollock RV, et al. Sensitivity, specificity, and predictive values of Clinease-Virastat saliva test for feline leukemia virus infection. *Cornell Vet* 1990; 80: 75-84.

128. Lutz H. Die Infektion mit dem feline Leukämievirus: Immunologie und Serodiagnostik als Grundlage der Infektionsbekämpfung. Schweiz Arch Tierheilk 1984; 126: 1-22.
129. Lutz H. Das Immunschwächevirus der Katze. Zeitschrift der Universität Zürich 1999; 2: 1-6.
130. Lutz H, Pedersen N, Harris CW, Higgins J, Theilen GH. Detection of feline leukemia virus infection. Feline Pract 1980a; 10: 13-23.
131. Lutz H, Pedersen N, Higgins J, Hübscher U, Troy FA, Theilen GH. Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. Canc Res 1980b; 40: 3642-51.
132. Lutz H, Jarrett O, Suter PF. A one step ELISA for the rapid detection of feline leukemia virus infection using monoclonal antibodies, further investigations. In: Immunoenzymatic techniques. Avrameas S, Feldman B, eds. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1983: 363-8.
133. Lutz H, Jarret O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. J Clin Microbiol 1987; 25: 827-31.
134. Lutz H, Arnold P, Hübscher U, Egberink HF, Pedersen NC, Horzinek MC. Specificity assessment of feline T-lymphotropic lentivirus serology. Zentralbl Veterinärmed (B) 1988a; 35: 773-8.
135. Lutz H, Egberink, H Arnold P, Winkler G, Wolfensberger C, Jarrett O, Parodi AL, Pedersen NC, Horzinek MC. Felines T-lymphotropes Lentivirus (FTLV): Experimentelle Infektion und Vorkommen in einigen Ländern Europas. Kleintierprax 1988b; 33: 445-92.
136. Lutz H, Lehmann R, Winkler G, Kottwitz B, Dittmer A, Wolfensberger C, Arnold P. Das feline Immunschwächevirus in der Schweiz: Klinik und Epidemiologie im Vergleich mit dem Leukämie- und dem Coronavirus. Schweiz Arch Tierheilk 1990; 132: 217-25.
137. Lutz H, Winkler GC. Über die diagnostische Spezifität und Sensitivität und die Bedeutung der Krankheitshäufigkeit. Schweiz Arch Tierheilk 1995; 137: 237-42.

138. Macy DW. Feline immunodeficiency virus. In: The cats diseases and clinical management. Scherding RG, ed. New York, USA: Churchill Livingstone, 1994: 433-48.
139. Madewell BR, Jarrett O. Recovery of feline leukaemia virus from non-viraemic cats. *Vet Rec* 1983; 112: 339.
140. Maki N, Miyazawa T, Fukasawa M, Hasegawa A, Hayami M, Miki M, Mikami T. Molecular characterization and heterogeneity of feline immunodeficiency virus isolates. *Arch Virol* 1992; 123: 29-45.
141. Mallin W, Eber E, Semmelrock HJ, Zach M. Theophyllin-Serumspiegelbestimmung. Vergleich zwischen Schnelltest (EIC) und konventionellem Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay. *Pneumologie* 1990; 44: 967-9.
142. Matsuo K. Highly Conserved Epitope Domain in Major Core Protein p24 is Structurally Similar in HIV, SIV, and FIV. *J Gen Virol* 1992; 73: 2445-92.
143. McCaw D. Diagnosis of retroviral diseases in cats. *Feline Practice* 1994; 137: 19-21.
144. McDougall A, Terry A, Tzavaras T, Cheney C, Rojko J, Neil JC. Defective endogenous proviruses are expressed in feline lymphoid cells: evidence for a role in natural resistance to subgroup B feline leukemia viruses. *J Virol* 1994; 68: 2151-60.
145. Mermer B, Hillman P, Harris R, Krogmann T, Tonelli Q, Palin W, Andersen P. A recombinant-based feline immunodeficiency virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Immunol and Immunopath* 1992; 35: 133-41.
146. Miller K, Storts D. PCR access! A sensitive single-tube two-enzyme system for RT-PCR. *Promega Notes* 1995; 53: 2-6.
147. Miyazawa T, Fukasawa M, Hasegawa A, Maki N, Ikuta K, Takahashi E, Hayami M, Mikami T. Molecular cloning of a novel isolate of feline immunodeficiency virus biologically and genetically different from the original US isolate. *J Virol* 1991; 65: 1572-7.
148. Miyazawa T, Jarrett O. Feline leukemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ("discordant") cats. *Arch Virol* 1998; 142 : 323-32.

149. Momoi Y, Matsumoto Y, Watari T, Goitsuka R, Miyazawa T, Mikami T, Tsujimoto H, Hasegawa A. Detection of feline immunodeficiency virus proviral DNA in feline peripheral blood mononuclear cells by the nested two-step polymerase chain reaction. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 279: 274-82.
150. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-73.
151. Mullis KB und Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
152. Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ. Direct Identification of Viral Antigens. In: *Veterinary Virology Third Edition*. Murphy FA, Gibbs EP, Horzinek MC, Studdert MJ, eds. Academic Press 1999; 209.
153. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70: 1617-39.
154. Neil JC, Onions DE. Feline leukemia viruses: molecular biology and pathogenesis. *Canc Res* 1985; 5: 49-63.
155. O'Neill LL, Burkhard MJ, Diehl LJ. Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Res Human Retroviruses* 1995; 11: 171-82.
156. O'Connor TP Jr, Tanguay S, Steinman R, Smith R, Barr MC, Yamamoto JK, Pedersen NC, Andersen PR, Tonelli QJ. Development and evaluation of an immunoassay for detection of antibodies to the feline T-lymphotropic lentivirus (feline immunodeficiency virus). *J Clin Microbiol* 1989; 27: 474-9.
157. O'Connor TP Jr., Quentin J., Tonelli, Scarlett JM. Report of the National FeLV/FIV Awareness Project. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1348-53.
158. Okabe H., DuBuy J, Gilden RV, et al. A portion of the feline leukaemia virus genome is not endogenous in cat cells. *Int J Cancer* 1978; 22: 70-8.
159. Olmsted RA, Barnes AK, Yamamoto JK, Hirsch VM, Purcell RH, Johnson PR. Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2448-52.

160. Pacitti AM. Latent feline leukemia virus infection: a review. *J Small Animal Pract* 1987; 28: 1153-9.
161. Pacitti AM, Jarrett O. Duration of the latent state in feline leukemia virus infections. *Vet Rec* 1985; 117: 472-474.
162. Panel report on the colloquium on feline leukemia virus/feline immunodeficiency virus: tests and vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1273-77.
163. Panel report. Feline Retrovirus Testing and Management. *Small Animal / Exotics Compendium* July 2001; 652-57.
164. Pedersen NC. Immunodiagnosis of feline leukemia virus infection. In: *Current Veterinary Therapy*. Vol. IX. Kirk RW, ed. Philadelphia, USA: WB Saunders Co, 1986; 448-52.
165. Pedersen NC. Feline infectious diseases. *Am Vet Pub*, Goleta, CA, 1988; 115.
166. Pedersen NC. Feline immunodeficiency virus infection. In: *Animal models in AIDS*. Schellekens H, Horzinek MC, eds. Amsterdam, Niederlande: Elsevier, 1990a: 165-83.
167. Pedersen NC. Feline leukemia virus infection. In: *Feline Husbandry, Diseases and Management in the Multiple Cat Environment*. Pedersen, NC, ed. Goleta, USA: American Veterinary Publications, 1991.
168. Pedersen NC, Meric SM, Johnson L, Plucker S, Theiler GH. The clinical significance of latent feline leukemia virus infection in cats. *Feline Pract* 1984a; 14: 32-48.
169. Pedersen NC, Johnson L, Theilen GH. Biological behavior of tumors and associated retroviremia in cats inoculated with Snyder-Theilen fibrosarcoma virus and the phenomenon of tumor recurrence after primary regression. *Infect Immun* 1984b; 43: 631.
170. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 235: 790-3.

171. Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, Hansen H. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 21: 111-29.
172. Pedersen NC, Barlough JE. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1298-305.
173. Pinter A, Fleissner E. The presence of disulfide-linked gp70 – p15(E) complexes in AKR murine leukemia virus. *Virology* 1977; 83: 417-22.
174. Pistello M, Mendo S, Giogi M, Da Prato L, Cammarota G, Clementi M, Bendinelli M. Competitive polymerase chain reaction for quantitating feline immunodeficiency virus load in infected cat tissues. *Mol Cell Probes* 1994; 8: 229-34.
175. Post J, Warren L. Reactivation of latent feline leukemia virus. *Dev Cancer Res* 1980; 4 : 151.
176. Porstmann T, Meissner K, Glaser R, Doppel SH, Sydow G. A sensitive non-radioisotopic assay specific for HIV-1 associated reverse transcriptase. *J Virol Methods* 1991; 31: 181-88.
177. Ramsey I, Tennant B. Feline Infectious Diseases. In: *Manual of Canine and Feline Infectious Diseases*. Ramsey I, Tennant B, eds. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association 2001: 16 – 18.
178. Reid G, Rigby MA, McDonald M, Hosie MJ, Neil JC, Jarrett O. Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. *AIDS* 1991; 5: 1477-83.
179. Reid RW, Barr MC, Scott FW. Retrospective serological survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELSA and IFA techniques. *Cornell Vet* 1992; 82: 359-69.
180. Reinacher M, Theilen G. Frequency and significance of feline leukemia virus infection in necropsied cats. *Am J Vet Res* 1987; 48: 939-45.
181. Rigby MA, Holmes EC, Pistello M, Mackay A, Leigh Brown AJ, Neil JC. Evolution of structural proteins of feline immunodeficiency virus: molecular epidemiology and evidence of selection for change. *J Gen Virol* 1993; 74: 425-36.

182. Rimmelzwaan GF, Siebelink KHJ, Broos H, Drost GA, Weijer K, Van Herwijnen R, Osterhaus ADME. *gag*- and *env*-specific antibodies in cats after natural and experimental infection with feline immunodeficiency virus. *Vet Microbiol* 1994; 39: 153-65.
183. Rimstad E, Homes E, Olsvik O, Hyllseth B. Identification of a double stranded RNA virus by using polymerase chain reaction and magnetic separation of the synthesized DNA segments. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2275-78.
184. Rimstad E, Ueland K. Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992; 36: 239-48.
185. Robinson A. Detection of FIV antibodies. *Vet Rec* 1997; 140: 240.
186. Robinson A, DeCann K, Aitken E, Gruffydd-Jones TJ, Sparkes AH, Werret G, Harbour DA. Comparison of a rapid immunomigration test and ELISA for FIV antibody and FeLV antigen testing in cats. *Vet Rec* 1998; 148: 491-2.
187. Rojko JL, Hoover EA, Mathes LE, Hause WR, Schaller JP, Olsen RG. Detection of feline leukemia virus in tissue of cats by a paraffin embedding immunofluorescence procedure. *J Natl Canc Inst* 1978; 61: 1315-9.
188. Rojko JL, Hoover EA, Mathes LE, Olsen RG, Schaller JP. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1979; 63: 759-68.
189. Rojko JL, Hoover EA, Quackenbush SL, Olsen RG. Reactivation of latent feline leukemia virus infection. *Nature* 1982; 298: 385-8.
190. Rolle M, Mayr A. Serologische Nachweisverfahren. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Gedek B, Kaaden OR, Mahnel H, Mayr A, eds. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag 1993; 6: 220-221.
191. Romatowski J. Interpreting feline leukemia test results. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 928-30.
192. Russel PH, Jarrett O. The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses. *Int J Cancer* 1978; 21(6): 768-78.
193. Russel PH, Jarrett O. The occurrence of feline leukemia virus neutralizing antibodies in cats. *Int J Cancer* 1978; 22: 351-7.

194. Saito T, Suzuki K, Imai M, Inaba Y. Measurement of reverse transcriptase of feline immunodeficiency virus by poly A- linked colorimetric assay. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 425-9.
195. Sarma PS, Log T. Viral interference in feline leukemia-sarcoma complex. *Virology* 1971; 44: 352-8.
196. Sarma PS, Log T, Jain D, Hill PR, Huebner RJ. Differential host range of viruses of feline leukemia-sarcoma complex. *Virology* 1975; 2: 438-46.
197. Schaller JP, Olsen RG. Determination of subgroup-specific feline oncornavirus-neutralizing antibody. *Infect Immun* 1975; 12(6): 1405-10.
198. Schüpbach J, Di Marzo Veronese F, Gallo RC. Human Retroviruses. In: *Clinical Virology Manual*. Specter S, Lancz GJ, eds. Amsterdam, Niederlande: Elsevier, 1986: 451-90.
199. Scolnick EM, Parks WP, Livingston DM. Radioimmunoassay of mammalian type C viral proteins. I. Species specific reaction of murine and feline viruses. *J Immunol* 1972; 109: 570-7.
200. Settele J. Vergleichende Untersuchungen mit kommerziellen ELISA-Testkits zur Diagnose der FeLV-Infektion aus Vollblut, Plasma und Speichel. *Diss med vet*, Wien, 1989.
201. Sibal L, Fink MA, Plata EJ. Methods of the detection of viral antigen and antibody to a feline leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45: 607-12.
202. Sibille P, Avraméas A, Moraillon A, Richardson J, Sonigo P, Pancino G, Strosberg AD. Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats. *Vet Micro* 1995; 45: 259-67.
203. Siebelink KH, Chu IH, Rimmelzwaan GF, Weijer K, van Herwijnen R, Knell P, Egberink HF, Bosch ML, Osterhaus ADME. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in the cat as a model for HIV infection in man: FIV-induced impairment of immune function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6: 1373-8.
204. Sliski AH, Essex M. Sarcoma virus-induced transformation specific antigen: presence of antibodies in cats that were naturally exposed to leukemia virus. *Virology* 1979; 95(2): 581-6.

205. Snyder HW, Singhal MC, Zuckerman EE, Jones FR, Hardy WD. The feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) is related to, but distinguishable from FeLV-C gp70. *Virology* 1983; 131: 315-27.
206. Soe LH, Devi BG, Mullins JI, Roy-Burmann P. Molecular cloning and characterization of endogenous feline leukemia virus sequences from a cat genomic library. *J Virol* 1983; 46(3): 829-40.
207. Soe LH, Shimizu RW, Landolph JR, Roy-Burmann P. Molecular analysis of several classes of endogenous feline leukemia virus elements. *J Virol* 1985; 56: 701-10.
208. Sparger E. Current thoughts on feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Clinician* 1993; 23: 173-1.
209. Sparger EE, Luciw PA, Elder JH, Yamamoto JK, Lowenstine LJ, Pedersen NC. Feline immunodeficiency virus is a lentivirus associated with an AIDS-like disease in cat. *AIDS* 1989; 3: 43-9.
210. Steinman R, Dombrowski J, O'Connor T, Montelaro RC, Tonelli Q, Lawrence K, Seymour C, Goodness J, Pedersen NC, Andersen PR. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of feline immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 1990; 71: 701-6.
211. Stephenson JR, Essex M, Hino S. Feline oncornavirus-associated cell-membrane antigen (FOCMA): distinction between FOCMA and the major virion glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(3): 1219-23.
212. Stephenson JR, Khan AS, Sliski AH, Essex M. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: evidence for an immunologically crossreactive feline sarcoma virus-coded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12): 5608-12.
213. Summers MF, Henderson LE, Chance MR, Bess JW Jr, South TL, Blake PR. Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Science* 1992; 1: 563-74.
214. Suzuki K, Craddock BP, Okamoto N, Kano T, Steigbiger RT. Poly A-linked colorimetric microtiter plate assay for HIV reverse transcriptase. *J Virol Methods* 1993; 44: 189-98.

215. Swango LJ. Evaluation of feline leukemia virus diagnostic tests available for in-office use by veterinarians. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1386-89.
216. Swenson CL, Kociba GJ, Mathes LE, Hand PJ, Ner CA, Hayes K, Olsen AK, Olsen RG. Prevalence of disease in nonviremic cats previously exposed to feline leukemia virus. *J Vet Med Ass* 1990; 196: 1049-63.
217. Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, Pedersen NC, Luciw PA, Elder JH. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5743-7.
218. Teich N. Taxonomy of retroviruses. In: RNA tumor viruses. Weiss R, Teich N, Varmus H, et al., eds. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 25-207.
219. Tilton GK, O'Connor TP Jr, Seymour CL, Lawrence KI, Cohen ND, Andersen PR, Tonelli QJ. Immunoassay for detection of feline immunodeficiency virus core antigen. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 898-904.
220. Tomonaga K, Mikami T. Detection of feline immunodeficiency virus transcripts by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1996; 48: 337-44.
221. Tonelli QJ. Enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 10: 1336-39.
222. Torten M, Franchini M, Barlough JE, George JW, Mozes E, Lutz H, Pedersen NC. Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1991; 65: 2225-30.
223. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from poly-acrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
224. Tyler JW, Cullor JS. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 53: 1271-1558.
225. Uchio E, Aoki K, Saitoh J, Hoh T, Onno S. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctival swabs by 10-minute immunochromatography. *Ophthalmology* 1997; 104: 1294-99.

226. Ueland KL, Nesse L. No evidence of vertical transmission of naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. First World Congress of Feline Immunodeficiency Researchers, Davis, USA 4.-7.9.1991.
227. Urabe T, Sano K, Tanno M, Mizoguchi J, Otani M, Lee MH, Takasaki T, Kusakabe H, Imagawa DT, Nakai M. A non-radioisotopic reverse transcriptase assay using biotin-11-deoxyuridine triphosphate on primer-immobilized microtiter plates. *J Virol Methods* 1992; 40: 145-54.
228. Vahlenkamp TW. Untersuchungen zur Wirksamkeit antiviraler Mittel gegenüber der feline Immunschwächevirus (FIV)-Infektion in *in-vitro*-Testsystemen und an experimentell FIV-infizierten Katzen. Diss med vet, München, 1993.
229. Vahlenkamp TW, Egberink HF, van Eijk MJ, Slotboom-Kamphorst AM, Verschoor EJ, Horzinek MC, De Ronde A. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for quantification of feline immunodeficiency virus. *J Virol Methods* 1995; 52: 335-46.
230. Vahlenkamp TW, Verschoor EJ, Schuurman NN, Horzinek MC, Egberink HF, DeRonde A, VanVliet AL. A single amino acid substitution in the transmembrane envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus alters cellular tropism. *J Virol* 1997; 71: 7132-35.
231. Vedbrat SS, Rasheed S, Lutz H, Gonda MA, Ruscetti S, Gardner MB, Prenskey W. Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen: a viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology* 1983; 124: 445-61.
232. Verschoor EJ, Hulskotte EG, Ederveen J, Koolen MJ, Horzinek MC, Rottier PJ. Post-translational processing of the feline immunodeficiency virus envelope precursor protein. *Virology* 1993a;193:433-8.
233. Verschoor EJ, Van Vliet AW, Egberink HF, Hesselink W, Horzinek MC, De Ronde A. Expression of feline immunodeficiency virus *gag* and *env* precursors in *Sporoptera Frugiperda* cells and their use in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993b; 31: 2350-5.
234. Waits MR, Reggiardo C, Meininger AC. Comparison of the ELISA and FA test for the detection of FeLV. *Southwest Vet* 1982; 34: 208-9.

235. Weijer K, Pfauth A, van Herwijnen R, Jarrett O, Meloen RH, Tomee C, Osterhaus ADME. Induction of feline leukemia virus-neutralisation antibodies by immunization with synthetic peptides derived from the FeLV env gene. *Vaccine* 1993; 11: 947-56.
236. Wilson KM, Robinson WF, Mitchelhill KI, Bundesen PG, Kemp BE. Autologous red cell agglutination test for antibodies to feline immunodeficiency virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; 42: 253-63.
237. Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O'Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am J Vet Res* 1988a; 49: 1246-58.
238. Yamamoto JK, Pedersen NC, Ho EW, Okuda T, Theilen GH. Feline immunodeficiency syndrome - a comparison between feline T-lymphotropic lentivirus and feline leukemia virus. *Leukemia* 1988b; 2: 204-15.
239. Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM, Pedersen NC. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 213-20.
240. Zenger E. FIP, FeLV, FIV: making a diagnosis. *Feline Prac* 2000; 28: 16-18.

F Danksagung

Diese Arbeit ist durch die Initiative und die Unterstützung meiner Betreuerin und Doktormutter Priv. Doz. Dr. Katrin Hartmann möglich geworden. Auch an der raschen Fertigstellung war sie maßgeblich mit beteiligt. Ihr gilt mein aufrichtiger herzlicher Dank.

Ebenso bedanken möchte ich mich beim Klinikvorstand Prof. Dr. Wilfried Kraft für die Erlaubnis meine Dissertation an der I. Medizinischen Tierklinik durchführen zu dürfen. Für die in dieser Zeit gewonnenen fachlichen Erfahrungen und Anregungen möchte ich mich bei allen Tierärztinnen und Tierärzten der I. Medizinischen Tierklinik bedanken.

Den Hauptteil meiner Arbeit habe ich am Department of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, USA, fertiggestellt. Ich möchte mich ganz herzlich beim Klinikvorstand Prof. Dr. Jeanne Barsanti, für die Erlaubnis einen Teil meiner Dissertation am Department of Small Animal Medicine durchführen zu dürfen, bedanken. Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Tierärztinnen, Tierärzten, Laborassistenten, Pflegern und Studenten, die mir bei der Organisation und Durchführung der Arbeit geholfen haben.

Ein wichtiger wissenschaftlicher Teil meiner Dissertation entstand durch die gute Zusammenarbeit mit Prof. Os Jarrett vom Institut für Veterinärpathologie in Glasgow, dessen Arbeitsgruppe die FeLV-Virusisolierung meiner Proben vorgenommen hat. Bei Ihm und seinem Team möchte ich mich herzlich bedanken. Besondere Erwähnung verdient Matt Golder, der den Hauptanteil der praktischen Arbeiten erledigt hat.

Für die großartige Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung des Western Blot möchte ich mich bei Dr. Herman Egberink vom Institut für Virologie der Fakultät für Tiermedizin in Utrecht und bei seiner hilfsbereiten Laborassistentin Nancy Schuurman ganz herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei der Firma IDEXX (Portland, Maine, USA) für die gute Zusammenarbeit und die finanzielle Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt ebenso den anderen Testherstellern, die mir ihre Testkits günstig zur Verfügung gestellt haben.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium und die Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Ebenfalls danken möchte ich meinen Geschwistern Dominique und Peter und Freunden Fabienne Müller, Anita Schwartz und Michaela Austel für die vielen aufmunternden Gespräche und für die vielen kleinen mir erwiesenen Dienste. Für die computertechnische Unterstützung möchte ich mich besonders bei Markus Färber bedanken.

G Curriculum vitae

Name: Pascale Christine Griebmayr
Geburtsdatum: 24.6.1974
Geburtsort: Regensburg
Eltern: Peter M. Griebmayr, Dipl. rer. pol. (techn.)
Christine M. Griebmayr, geb. Mattenheimer

Schulbildung:

Aug. 1980 – Juli 1982 Grundschole Elsen, Paderborn
Aug. 1982 – Juli 1984 Grundschole Bingen
Aug. 1984 – Juli 1986 Stefan George Gymnasium, Bingen
Aug. 1986 – Juni 1993 Gymnasium MoltkestraÙe, Gummersbach
Juni 1993 Abitur

Auslandsaufenthalt:

Juni 1990 – Juni 1991 11. Klasse “The Asheville School”, Asheville, North Carolina, USA

Berufsausbildung:

Sept. 1993 – Juli 1999 Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Aug. 1999 Approbation zur Tierärztin
Okt. 1999 – Sept. 2000 Internship an der Chirurgischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians Universität, München
Vorstand: Prof. Dr. Ulrike Matis
Okt. 2000 – Apr. 2001 Beginn der Dissertation an der I. Medizinischen Tierklinik, Lehrstuhl für Innere Krankheiten, Dermatologie und Neurologie der kleinen Haustiere sowie für klinische Labordiagnostik der Ludwig-Maximilians Universität München, unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. vet. Katrin Hartmann
Seit Mai 2001 Fortsetzung der Dissertation am Department of Small Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, USA