

# BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay<sup>1</sup>, E. Di Labio<sup>1</sup>, D. L. Glauser<sup>2</sup>, H. Schwermer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Health, Federal Food Safety and Veterinary Office FSVO, Bern, Switzerland

<sup>2</sup>Suisselab AG, Zollikofen, Switzerland

## Zusammenfassung

Die Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) ist eine wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung des Rindes. Die Schweiz begann 2008 ein Ausrottungsprogramm. Nach der initialen virologischen Untersuchung aller Rinder gefolgt von der Untersuchung aller neugeborenen Kälber war die BVD-Prävalenz 2012 tief genug, um eine serologische Überwachung zu beginnen. Im Herbst 2019 wurden im Rahmen dieser serologischen Überwachung bei den Tankmilchuntersuchungen ungewöhnlich viele hohe Werte beobachtet. Bei den weiterführenden Abklärungsuntersuchungen mit Rindergruppen wurden bei vielen Betrieben keine seropositiven Tiere gefunden. Um die BVD-Situation in einem Bestand nach einem serologischen Tankmilchergebnis oberhalb des Cut-off-Werts besser einschätzen zu können, wurde die vorliegende Studie, in Form eines multiplen Fallberichts, durchgeführt.

Die Tankmilch aus 13 Betrieben, welche im Herbst 2019 serologische Werte oberhalb des Cut-off-Werts aufwiesen, wurden in Frühling 2020 erneut mit zwei verschiedenen ELISA-Tests untersucht. Zudem wurden gleichzeitig Blutproben entnommen, um serologische Werte aller adulten Rinder auf dem Betrieb zu erhalten.

Die Ergebnisse der beiden Tests, die zur Untersuchung der Tankmilchproben eingesetzt worden sind, korrelierten gut miteinander. Die Ergebnisse der Tankmilchserologie zeigten eine geringe Korrelation mit der Seroprävalenz bei den laktierenden Kühen, aber keine Korrelation mit der Seroprävalenz aller adulten Tiere des Bestandes. In einigen Beständen hatte ein einzelnes seropositives Tier grossen Einfluss auf die Ergebnisse der Tankmilchserologie. Zudem muss bei Tankmilchproben unbedingt auf eine korrekte Probenahme geachtet werden, da die Repräsentativität der Probe für die Tankmilch eines

## BVD situation on farms with high serological values in the tank milk – individual animals have a greater influence than previously known

Bovine virus diarrhea (BVD) is an economically important disease in cattle. Switzerland started an eradication program in 2008. After the initial virological examination of all cattle followed by the examination of all newborn calves, the BVD prevalence in 2012 was low enough to start serological monitoring. An unusually high number of increased tank milk values were observed during this serological monitoring in autumn 2019. No seropositive animals were found on most farms in the follow-up cattle group testing. The present study was designed in the form of a multiple case report to better assess the BVD situation in a herd after a serological tank milk result above the cut-off value.

The tank milk of 13 farms with serological values above the cut-off value from the analyses in autumn 2019 was examined again with two different ELISA tests in spring 2020. In addition, at the same time blood samples were taken to obtain serological values of all adult cattle on the farm.

The results of the two tests that were used to examine the tank milk samples correlated well with each another. The results of the tank milk serology showed a low correlation with the seroprevalence in the lactating cows, but no correlation with the seroprevalence of all adult animals in the herd. A single seropositive animal had a major influence on the results of the tank milk serology in some herds. In addition, correct tank milk sampling must be ensured because the representativeness of the tank milk sample is decisive for a meaningful result for the investigated farm. If the result of the tank milk test is above the cut-off value, the examination of

<https://doi.org/10.17236/sat00318>

Eingereicht: 14.12.2020  
Angenommen: 16.07.2021

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

Betriebes entscheidend für ein aussagekräftiges Ergebnis ist. Bei einem Ergebnis des Tankmilchtests oberhalb des Cut-off-Werts ist die Untersuchung einer Rindergruppe nach wie vor das beste Vorgehen, um ein aktuelles Infektionsgeschehen in einem Bestand zu erkennen.

**Schlüsselwörter:** BVD, Switzerland, Surveillance, Bulk tank milk

a group of cattle is still the best way to identify a current infection in a herd.

**Keywords:** BVD, Switzerland, Surveillance, Bulk tank milk

## Einleitung

### Die Bovine Virus-Diarrhoe und das Programm zur Ausrottung dieser Tierseuche in der Schweiz

Die Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) ist eine Erkrankung des Rindes, die von besonderer wirtschaftlicher Relevanz ist.<sup>1-6</sup> Am Wichtigsten für die Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens und die Übertragung der Krankheit sind sogenannte persistent infizierte (PI) Tiere.<sup>7</sup> PI-Tiere können entstehen, wenn eine zwischen dem 40. und 125. Tag tragende Kuh mit dem Virus infiziert wird. Dann kann auch ihr Fötus infiziert und dadurch immuntolerant gegen das Virus werden. Dies führt zu einer lebenslangen Infektion ohne die Bildung von Antikörpern.<sup>8</sup> PI-Tiere scheiden lebenslang grosse Mengen Virus aus – im Gegensatz zu transient infizierten (TI) Tieren, die geringe Mengen Virus und nur für eine begrenzte Zeit ausscheiden – und sind damit hauptverantwortlich für die Übertragung der Krankheit.<sup>9</sup>

Mehrere skandinavische Länder haben die BVD Anfang des Jahrtausends erfolgreich ausgerottet.<sup>10,11</sup> 2008 startete auch die Schweiz mit einem Ausrottungsprogramm.<sup>12</sup> Mittels initialer Volluntersuchung der Rinderpopulation und anschliessendem Testen aller neugeborenen Kälber auf das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) und Elimination der positiven Kälber konnte die Prävalenz von PI-Tieren bezogen auf Geburten innerhalb von vier Jahren von 1.4% auf weniger als 0.02% reduziert werden.<sup>13,14</sup> Aufgrund der dadurch abnehmenden Seroprävalenz bei Kühen erfolgte ein Wechsel der Strategie zur serologischen Überwachung mit Tankmilchproben bei milchliefernden Betrieben und Blutuntersuchungen von Rindergruppen (sogenanntes «Jungtierfenster» oder «spot test») bei nicht-milchliefernden Betrieben. Die Impfung war seit 2008 verboten und wurde vorher praktisch nie durchgeführt. Seit 2012 werden Tankmilchproben aller milchliefernden Betriebe mit einem indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) -Verfahren auf Antikörper getestet.<sup>2,14</sup>

Für die Überwachung werden Tankmilchproben genutzt, die durch die Süsselab AG für die Qualitätskontrolle der Verkehrsmilch (Milchprüfung) zwei Mal pro Monat von allen milchabliefernden Betrieben gesamt

melt werden. Während je einer Sammelperiode im Frühjahr und im Herbst werden alle Proben der Milchprüfung mit dem SVANOVIR® BVDV-Ab von SVANOVA untersucht. Ergebnisse, die dabei «percentage positivity values» (PP-Werte) oberhalb des festgelegten Cut-off-Wertes von 14% aufweisen, werden durch eine zweite Untersuchung derselben Probe verifiziert. Ist das zweite Untersuchungsergebnis unter 14%, so erfolgt eine dritte Untersuchung, deren Resultat über das endgültige Ergebnis entscheidet. Der Cut-off-Wert von 14% wurde entsprechend der vom Hersteller angegebenen Einteilung zwischen den Klassen 1 und 2 festgelegt.

Anhand ihrer PP-Werte werden Betriebe einer von vier Klassen zugeordnet (Tabelle 1 und Abbildung 1 der Beilage), die vom Testhersteller in Anlehnung an das Schwedische Landesprogramm<sup>15</sup> definiert worden sind. Im Rahmen des BVD-Überwachungsprogramms wird in der Schweiz bei Betrieben mit einem Ergebnis über dem Cut-off-Wert von einer Rindergruppe Blut entnommen und mittels ELISA auf Antikörper getestet. Nur im Falle von positiven Ergebnissen in der Rindergruppe besteht der Verdacht auf ein akutes Infektionsgeschehen und es erfolgen je nach Ergebnis weitere Untersuchungen oder Bekämpfungsmassnahmen auf dem Betrieb.

In der Tankmilchuntersuchungsrunde im Herbst 2019 war der Anteil von Betrieben oberhalb des Cut-off-Werts deutlich grösser als im Frühjahr 2019 und den vorherigen Untersuchungsrunden. Zudem waren bei vielen der Tankmilchproben die PP-Werte so hoch, wie dies in den vorherigen Untersuchungsrunden nur vereinzelt aufgetreten ist (Abbildung 1). Nach Niskanen (1993)<sup>15</sup> sind in Betrieben der Klasse 3 über 14% der laktierenden Kühe, deren Milch in die Tankmilch gemolken wurde, seropositiv. Beobachtungen aus dem Feld deuten darauf hin, dass dies nicht unbedingt so ist. Insbesondere gibt es Betriebe, deren Tankmilch schon länger über dem Cut-off war, in denen es bekanntermassen nur sehr wenige seropositive Kühe gab und in denen im Herbst 2019 die PP-Werte auch deutlich gestiegen sind.

### Interpretation der Ergebnisse von Tankmilchproben

Bei der Interpretation der Ergebnisse eines Tankmilch-ELISAs muss berücksichtigt werden, dass der Test

den Antikörpergehalt in einer natürlichen Poolprobe bestimmt. Dieser ist abhängig vom Antikörpergehalt in der Milch der einzelnen Kühe und vom Anteil der Milch dieser Einzeltiere am Pool. Der Antikörpergehalt einer Kuh in Blut und Milch korreliert, letzterer ist aber auch stark abhängig vom Laktationsstadium, vor allem in den ersten Tagen der Laktation.<sup>16,17</sup> Bei BVD ist zudem bekannt, dass Kühe, die mit einem PI-Tier tragend sind, im letzten Drittel der Trächtigkeit sehr hohe Blutantikörperspiegel aufweisen.<sup>18</sup>

Die Untersuchung einer Tankmilchprobe mit dem ELISA-Verfahren stellt die Anwesenheit von nicht gebundenen Antikörpern fest. Einerseits bedeutet dies, dass an Antigen gebundene Antikörper nicht detektiert werden, und deswegen laktierende PI-Tiere aufgrund von Virusausschei-

dung in der Milch zu falsch negativen Resultaten in der Tankmilch führen können.<sup>19</sup> Ob dies auch für TI-Tiere gilt ist nach unserer Kenntnis bisher nicht untersucht worden. Andererseits bedeutet ein positives Resultat nicht, dass eine Exposition kürzlich stattgefunden hat, da in der Schweizer Kuhpopulation seropositive Kühe noch immer vorhanden sind und im Rahmen von BVD-Fällen Serokonversionen stattfinden. Da viele Betriebe noch seropositive Kühe im Bestand haben, wurde für die Untersuchung der Tankmilchproben ein Cut-off-Wert definiert, um zu bestimmen, ob Massnahmen nötig sind oder nicht.

Neben diesen BVD spezifischen Aspekten gibt es auch allgemeine Ursachen, die zur Verfälschung der Laborergebnisse bei Tankmilchproben führen können, z. B. die Fassung einer nicht repräsentativen Probe.

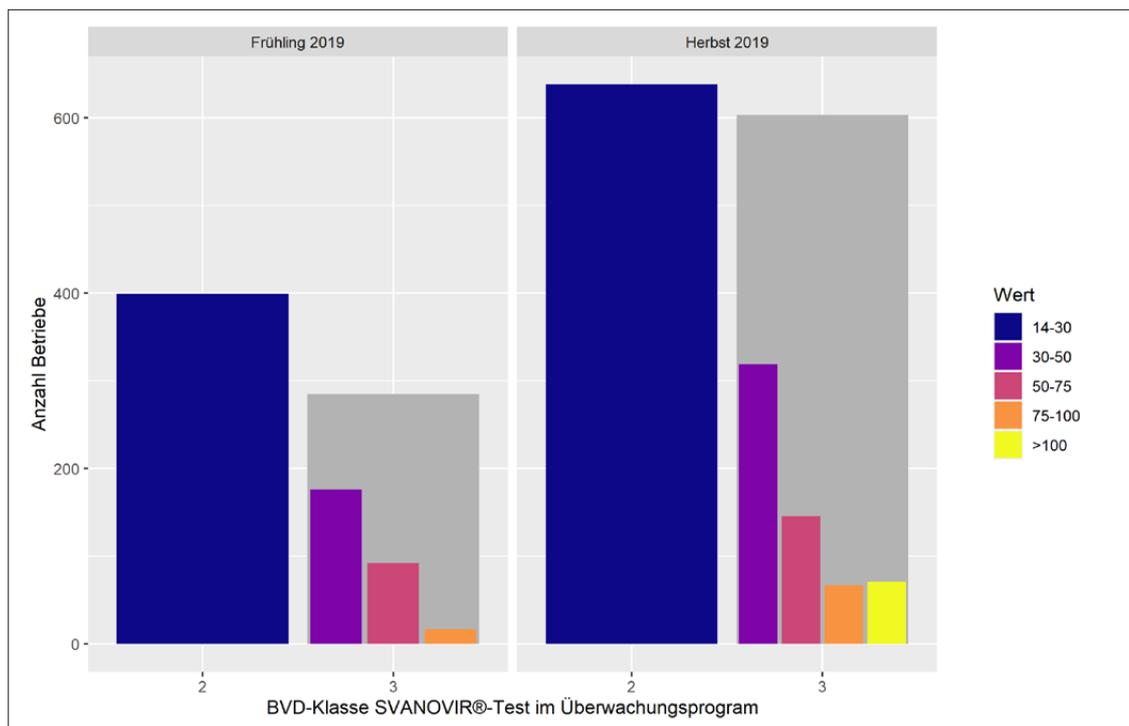
BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch-Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

**Tabelle 1:** Interpretation des SVANOVIR® BVDV-Ab Tests (Svanova) für den Nachweis von Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) Antikörpern in Tankmilchproben

PP-Werte (percentage positivity value)	Klasse	Interpretation	Erwartete Seroprävalenz†
<3%	0	Undetektierbarer / geringer Antikörperspiegel	≤ 13%
≥ 3 und <14%	1	Geringer Antikörperspiegel	≤ 27%
≥ 14 und <30%	2	Mittlerer bis hoher Antikörperspiegel	5–30%
≥ 30%	3	Mittlerer bis hoher Antikörperspiegel	≥ 14%

† nach Niskanen R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. Vet. Rec. 1993; 133(14) 341–344. doi:10.1136/vr.133.14.341; eigene Auswertung der publizierten Angaben.



**Abbildung 1:** Vergleich der Anzahl Betriebe in den Klassen 2 (Prozentualer Positivitäts-Wert (PP): ≥ 14 und <30%) und 3 (≥ 30%) für die Tankmilchuntersuchung mittels SVANOVIR® BVDV-Ab Test zur Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch von Frühling und Herbst 2019.

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

## Ziele der Studie

Diese Studie in Form eines multiplen Fallberichts soll den kantonalen Vollzugsorganen und der Tierärzteschaft helfen, die Situation in einem Bestand nach einem serologischen Tankmilchergebnis oberhalb des Cut-off-Werts besser einschätzen zu können. Zudem sollen die Einschränkungen der Aussagekraft eines isolierten serologischen Tankmilchergebnisses oberhalb des Cut-off-Werts dargelegt und die Notwendigkeit der Einbeziehung weiterer Informationen aufgezeigt werden.

## Material und Methoden

### Auswahl der Betriebe

Für diese Studie hatte das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV) 18 Betriebe aufgrund ihrer PP-Werte der letzten Tankmilchuntersuchungsrunden als besonders geeignet für diese Studie ausgewählt. Neun von diesen 18 Betrieben hatten langsam steigende PP-Werte und neun Betriebe wiesen bei der Tankmilchuntersuchungsrunde im Herbst 2019 hohe Werte auf und waren vorher mehrere Jahre negativ. Die Auswahl der Betriebe folgte den von Moennig et al. (2005)<sup>11</sup> aufgestellten Prinzipien zur BVD-Überwachung, nach denen wiederholt negative Tankmilchergebnisse eines Kuhbestandes eine Infektion in dem zurückliegenden Zeitraum mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausschliessen und ein Anstieg des Tankmilchwerts auf neue seropositive Kühe zurückzuführen ist. Es wurden nur Betriebe ausgewählt, bei de-

nen es keinen Hinweis darauf gab, dass in den letzten Jahren ein PI-Tier im Bestand war. Nach Abklärungen durch die teilnehmenden Veterinärämter waren neun dieser 18 Betriebe geeignet und bereit in der Studie mitzuwirken. Betriebe wurden von kantonalen Veterinärämtern als ungeeignet definiert, wenn seit dem Erhalt der Tankmilchergebnisse zusätzliche Untersuchungen durchgeführt worden waren oder zwischenzeitlich zusätzliche epidemiologische Daten vorlagen, welche diese Ergebnisse erklären konnten. Vier andere Betriebe wurden nach Prüfung auf ihre Eignung auf Empfehlung des zuständigen Amtes im Austausch für zuvor ausgewählte Betriebe zur Studie hinzugefügt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die insgesamt 13 Betriebe in der Studie.

### Probenahmen

Die Probenahmen auf den Studienbetrieben erfolgten zwischen den 26. Februar 2020 und den 14. April 2020 im Rahmen erweiterter BVD-Abklärungen durch die kantonalen Veterinärämter. Auf den Betrieben wurden durch einen bzw. eine vom Veterinäramt beauftragten Tierarzt oder Tierärztin von allen Rindern älter als sechs Monate Blut- und Serumproben entnommen, sofern die Tiere nicht schon ein seropositives Ergebnis aus der BVD-Überwachung hatten. Die Altersbeschränkung erfolgte wegen des möglichen Vorhandenseins von maternalen Antikörpern.<sup>20</sup> Gleichzeitig wurde jeweils eine Tankmilchprobe für die serologische Untersuchung entnommen. War betriebsbedingt die gleichzeitige Probenahme von Blut- und Tankmilchprobe nicht möglich,

**Tabelle 2:** Übersicht über die Studienbetriebe zur Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) Situation mit zeitgleicher Blut- und Tankmilch (TM)-Probenahme auf dem Betrieb.

Die Spalte Auswahl beschreibt, ob der Betrieb in der ursprünglichen Stichprobe des BLV enthalten war, oder ob er vom Kanton vorgeschlagen worden ist. Die Gruppen 1 bis 3 wurden wie folgt definiert: Gruppe 1 = progressiver Anstieg der PP-Werte während mehrerer Jahre. Gruppe 2 = plötzlich hohe Werte nach vorherigen stabil tiefen Werten. Gruppe 3 = plötzlich sehr hohe Werte nach vorherigen tieferen Werten, welche aber schon oberhalb des Cut-off-Werts waren. Abkürzungen: TM = Tankmilchprobe, FXX/HXX = Frühling bzw. Herbst des Jahres 20XX

Kurzbezeichnung	Kanton	Probenahmedatum	Auswahl	Gruppe
AR-M	AR	08.04.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit H17; H19 plötzlich hoch)
BE-G	BE	03.03.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit H18; H19 plötzlich hoch)
BE-W	BE	04.03.2020	Kanton	Gruppe 2 (TM vorher negativ, H19 hoch positiv)
FR-B	FR	03.03.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit H18, H19 plötzlich hoch)
FR-J	FR	05.03.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit F18, H19 plötzlich hoch)
FR-S	FR	04.03.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit F18, H19 plötzlich hoch)
GL-Z	GL	03.03.2020	Stichprobe	Gruppe 2 (TM vorher neg (H18 nicht), H19 hoch pos)
LU-S	LU	24.02.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM pos seit F18, H19 plötzlich hoch)
SG-E	SG	02.03.2020	Stichprobe	Gruppe 1 (TM langsamer Anstieg seit F18)
SG-K	SG	06.03.2020	Kanton	Gruppe 1 (TM pos seit H18 langsam steigend)
SG-L	SG	12.03.2020	Kanton	Gruppe 3 (TM pos seit H17, H18 und H19 hoch pos)
SG-R	SG	27.02.2020	Kanton	Gruppe 3 (TM pos seit H17, H19 hoch pos)
TG-H	TG	14.04.2020	Stichprobe	Gruppe 2 (TM vorher neg, H19 hoch pos)

wurde eine zeitnahe Tankmilchprobenahme mit dem Betriebsleiter oder der Betriebsleiterin organisiert und die Probe auf dem Postweg der Suisselab AG zugestellt.

In der Studie wurden mittels Bronopol und Natamycin (Broad Spectrum Microtabs II von Advanced Instruments) konservierte Milchproben verwendet, um Veränderungsfehler aufgrund von ungeeigneter Lagerung zu vermeiden. Der Transport dieser Proben erfolgte bei Umgebungstemperatur. Zwischen Probeneingang im Labor und ELISA-Untersuchung wurden die Proben während maximal 3 Monaten bei  $-20\pm 5^\circ\text{C}$  gelagert. Dagegen wurden in der regulären BVD-Überwachung nicht konservierte Proben der Milchprüfung untersucht, welche zwischen Probenahme und Eingang im Labor durchgehend bei  $1-5^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Diese Proben wurden zwischen Probeneingang und ELISA-Untersuchung während maximal 3 Wochen bei  $-20\pm 5^\circ\text{C}$  gelagert.

Das Probenmaterial und die Beprobung wurden durch die Veterinärämter organisiert. Für die Tankmilchproben stellte die Suisselab AG das Material sowie Informationen für die korrekte Entnahme und den Versand den Ämtern zur Verfügung.

Beim Betriebsbesuch wurde vom Tierarzt oder von der Tierärztin erfasst, welche Tiere zum Zeitpunkt der Probenahmen laktierend waren.

### Tankmilchuntersuchung

Die Tankmilchproben wurden von der Suisselab AG untersucht. Es wurden die beiden zugelassenen Tankmilch-ELISAs der Hersteller Svanova (SVANOVIR® BVDV-Ab) und IDvet (ID Screen® BVD p80 Antibody Competition) verwendet. So konnte der für die BVD-Überwachung verwendete ELISA-Test (SVANOVIR® BVDV-Ab) mit den Ergebnissen eines anderen ELISA-Tests (ID Screen® BVD p80 Antibody Competition) verglichen werden.

Der SVANOVIR® BVDV-Ab beruht auf einem indirekten ELISA-Verfahren und wird seit 2012 für die BVD-Überwachung in der Schweiz eingesetzt. Der ID Screen® BVD p80 Antibody Competition beruht auf einem kompetitiven ELISA-Verfahren und ist seit 2019 in der Schweiz für die Tankmilchuntersuchung zugelassen.<sup>21</sup> Die Werte der beiden Tests (PP-Wert bzw. percentage inhibition value (PI-Wert)) sind nicht direkt vergleichbar, da die Verfahren unterschiedlich sind und in Relation zu den Testkontrollen auf der jeweiligen Testplatte berechnet werden. Die quantitative Interpretation in Form des Anteils seropositiver Kühe in der Tankmilchprobe ist dagegen vergleichbar. Da vom SVANOVIR®-Test keine quantitative Interpretation des Herstellers zum Zusammenhang zwischen PP-Wert und Seroprävalenz in der Tankmilch gemacht wird, wurden

die Ergebnisse der zugrundeliegenden Studie von Niskanen (1993)<sup>15</sup> entsprechend der Anwendung im Überwachungsprogramm ausgewertet (Tabelle 1 und Abbildung 1 der Beilage). Die ID Screen®-Ergebnisse lassen sich gemäss Hersteller anhand Tabelle 3 interpretieren. Abbildung 2 der Beilage zeigt die dem Schema zugrundeliegenden Daten.

Die Milchproben wurden vor der Untersuchung in einem zweistufigen Verfahren entrahmt: Die Probenflaschen wurden über Nacht bei  $5\pm 3^\circ\text{C}$  aufrecht gelagert und anschliessend unterhalb der Fettschicht ein Aliquot in 48-Well Deepwell-Platten überführt. Die Deepwell-Platten wurden vor der Testdurchführung während 15 Minuten bei  $2000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und anschliessend ein Aliquot unterhalb der Fettschicht in die ELISA-Platten überführt.

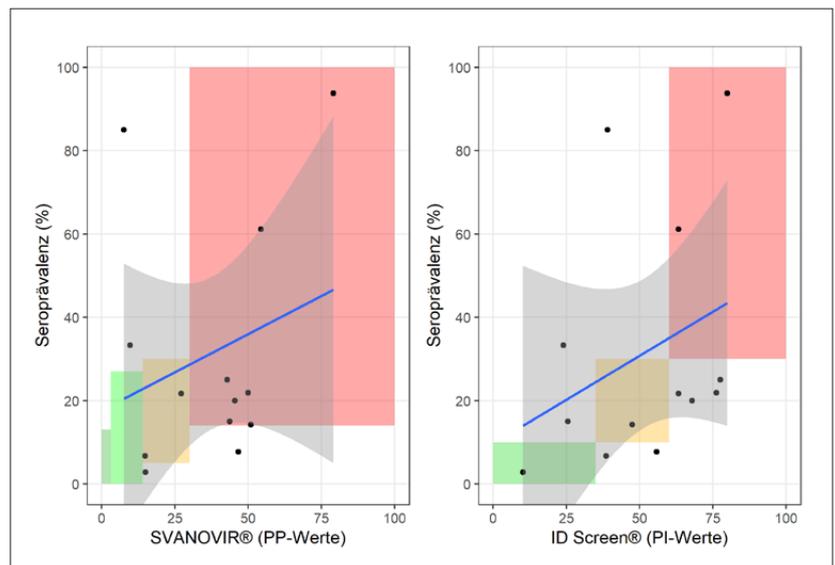
BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch-Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

**Tabelle 3:** Interpretation des ID Screen® BVD p80 Antibody Competition Tests (IDvet) für den Nachweis von Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) Antikörpern in Tankmilchproben

PI-Werte	Erwartete Seroprävalenz†
<35%	<10%
≥ 35 und <60%	10–30%
≥ 60%	>30%

† IDvet



**Abbildung 2:** Ergebnisse beider ELISA-Tests (SVANOVIR® BVDV-Ab und ID Screen® BVD p80 Antibody Competition) zur Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) Situation verglichen mit der Seroprävalenz bei den laktierenden Kühen. Die farbigen Boxen stellen die gemäss Hersteller- bzw. Literaturangaben erwartete Seroprävalenz dar. Die blaue Linie zeigt die lineare Korrelation der beiden Tests. Der graue Bereich zeigt das 95% Konfidenzintervall. Die farbigen Kästen stellen die Ergebnis-Intervalle der verschiedenen Klassen und die daraus zu erwartende Seroprävalenz der laktierenden Kühe dar. SVANOVIR® von dunkelgrün (Klasse 0) zu rot (Klasse 3). ID Screen® von hellgrün (tief, erwartete Seroprävalenz <10%) zu rot (hoch, erwartete Seroprävalenz >30%).

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

Die Durchführung der ELISA-Tests erfolgte gemäss den Angaben der Testhersteller automatisiert auf einer Tecan Freedom EVO200 ELISA-Workstation mit einem Tecan HydroSpeed Washer und einem Tecan Sunrise Reader. Beim SVANOVIR BVDV-Ab ELISA wurde das Protokoll mit kurzer Inkubation der Milchproben (1 Stunde) verwendet. Beim ID Screen® BVD p80 Antibody Competition ELISA wurde das quantitative Protokoll für Tankmilchproben verwendet. Die eigens für die Studie gefassten Proben wurden im 4-fach Ansatz untersucht. Die Untersuchungen im Rahmen der regulären BVD-Überwachung erfolgten im Einzelansatz mit einer Bestätigungsuntersuchung der im Screening positiven Proben (PP-Wert  $\geq 14\%$ ). Der mittlere Variationskoeffizient des 4-fach Ansatzes betrug 5.9% beim SVANOVIR Test und 7.1% beim ID Screen Test. Die Validierung der ELISA-Platten und die Berechnung der PP- (SVANOVIR) bzw. PI-Werte (ID Screen) erfolgte gemäss den Angaben der Testhersteller.

Als Kontrollproben wurden die im jeweiligen Testkit enthaltenen Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Als interne schwach-positive Kontrolle wurde eine 1:200 Verdünnung des BVD-Referenzserums RAB0042 (APHA) mitgeführt.

Der SVANOVIR BVDV-Ab ELISA wurde innerhalb des Geltungsbereichs der Akkreditierung nach ISO/IEC 17025:2005 (STS-Verzeichnis 0235) durchgeführt, der ID Screen® BVD p80 Antibody Competition ELISA ausserhalb des Geltungsbereiches.

### Blutuntersuchungen

Die Blutproben der beprobten Tiere wurden durch das Institut für Virologie und Immunologie (IVI) Standort Bern - das Referenzlabor für BVD - serologisch untersucht. Das Labor ist von der Schweizerische Akkreditierungsstelle SAS akkreditiert (Akkreditierungsnummer STS 0624) mit der Norm ISO/IEC 17025:2017.

Die serologische Blutuntersuchung erfolgte mit dem IDvet ID Screen® BVD p80 Antibody Competition. Die Serumproben wurden gemäss Hersteller des Testkits getestet. Es wurden die positive und negative Kontrolle des Testkits sowie eine interne Referenzkontrolle (in house-Referenzserum) mitgeführt. Letztere wurde einmal pro Testkit durchgeführt und mittels cumulative sum control chart (CUSUM) überwacht. Die Proben wurden im Duplikat im gleichen Ansatz getestet.

Dieses ELISA-Verfahren ermöglicht eine semi-quantitative Interpretation des Ergebnisses hinsichtlich des Antikörpergehalts des Serums. Es sind Werte zwischen 0 und 100 möglich, wobei tiefe Zahlen einen höheren Antikörpergehalt anzeigen. Proben gleich oder unter 40 werden gemäss Hersteller als positiv interpretiert.

Bei dem Betrieb SG-E wurde die Kombination eines niedrigen Tankmilchwertes bei zugleich hohem Anteil seropositiver Kühe festgestellt. Da tiefe Resultate in der Tankmilch aufgrund kompetitiver Bindung von Antikörpern durch Antigenen beschrieben worden sind<sup>22</sup>, wurden die Blutproben dieses Betriebes auch noch virologisch durch das IVI untersucht, um ein laktierendes PI- oder TI-Tier auszuschliessen. Da beim Betrieb SG-K der Tankmilchwert ähnlich niedrig war, der Anteil seropositiver Kühe jedoch deutlich geringer und damit nicht die Gefahr eines laktierenden PI-Tieres bestand, wurden im Betrieb SG-K keine virologischen Untersuchungen durchgeführt.

Die virologische Untersuchung erfolgte durch ein RT-PCR-Verfahren. Alle Seren wurden auf das Vorhandensein von pestiviraler RNA mittels RT-PCR wie beschrieben von Stalder et al. (2016)<sup>23</sup> und Braun et al. (2018)<sup>24</sup> mit geringfügigen Modifikationen getestet. Kurz gesagt, die RNA-Extraktion erfolgte auf einem KingFisher Flex System (Thermo Fisher Scientific, Reinach, Schweiz) unter Verwendung des NucleoMag VET Kits (Macherey-Nagel, Oensingen, Schweiz) gemäss dem Protokoll des Herstellers. Die RT-PCR wurde nach dem Protokoll des QuantiTect® Probe RT-PCR Kits (Qiagen AG, 11 Hombrechtikon, Schweiz) mit einem ABI 7300 Real-Time PCR Gerät und Softwarepaket (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) durchgeführt. Um die Effizienz der RNA-Isolierung jeder Probe zu überwachen, wurde Sendai-Virus hinzugefügt, das eine Kontroll-RNA darstellt, die innerhalb des Viruspartikels vor RNase-Abbau geschützt ist. Zu jeder Probe wurde vor der RNA-Isolierung eine definierte Menge zugegeben, die einen Ct-Endwert von ca. 25 ergab. So konnte die Leistung der RNA-Isolierung und der RT-PCR-Reaktion für jede einzelne Probe bewertet werden.<sup>25</sup>

Threshold cycles (Ct-Werte) höher als 30 weisen eher auf transiente Infektionen hin, wohingegen Ct-Werte unter 30 eher auf persistente Infektionen hinweisen. Eine definitive Unterscheidung zwischen PI- und TI-Tiere ist aber nur möglich durch die Wiederholung der Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt.<sup>26</sup>

Die RT-PCR Untersuchung wurde für alle Blutproben des Betriebs SG-E mit negativem Ergebnis durchgeführt.

### Daten

Neben den serologischen Blutresultaten der Studie wurden auch die seropositiven Resultate jener Tiere in den Betrieben berücksichtigt, die schon ein seropositives Ergebnis aus der BVD-Überwachung hatten. Somit war der serologische Status aller laktierenden Tiere zum Zeitpunkt der Probenahme für diese Studie bekannt. Nicht bekannt war der serologische Status aller Kühe, die zum Zeitpunkt der Tankmilchproben im Herbst 2019 oder im Frühjahr 2020 möglicherweise laktierend

waren, da einige ungetestete Kühe vor der Probenahme den Betrieb verlassen hatten und einige Kühe erst nach der Probenahme in den Bestand gekommen waren. Zudem war ein quantitatives ELISA-Ergebnis nur für die in dieser Studie untersuchten Rinder bekannt. Die quantitativen ELISA-Ergebnisse konnten nicht auf Betriebsebene ausgewertet werden, da diese bei allen Betrieben unvollständig vorlagen. Im Einzelfall wurden die Werte aber für die Beurteilung der Betriebe herangezogen. Weiter wurden die Angaben zur Betriebsgröße aus der Tierverkehrsdatenbank und die zum Zeitpunkt der Auswertung verfügbaren Tankmilchresultate des BVD-Überwachungsprogramms in die Auswertung einbezogen.

### Auswertung

Die Daten wurden mit Microsoft Excel vorbereitet. Die Auswertung erfolgte mittels RStudio 1.0.136 (RRID:SCR\_000432) mit R 3.3.3 «Another Canoe» (R Project for Statistical Computing, RRID:SCR\_001905). Benutzt wurden packages readxl 1.1.0 (RRID:SCR\_018083), tidyr 0.8.0 (RRID:SCR\_017102), dplyr 0.7.4 (RRID:SCR\_016708), ggplot2 2.2.1 (RRID:SCR\_014601), cowplot 0.9.2 (RRID:SCR\_018081) and knitr 1.20 (RRID:SCR\_018533).

Die Population eines Betriebs wurde als die Gruppe von allen Rindern älter als sechs Monaten definiert, die auf diesem Betrieb zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren. Die Tiere jünger als sechs Monate wurden in dieser Studie nicht beprobt und auch bei der Auswertung aller Daten ausgeschlossen.

Die Studie wird bewusst als multipler Fallbericht angelegt. Durch die kleine Stichprobengröße und der nicht repräsentativen Auswahl der Studienbetriebe können die Ergebnisse nicht mittels statischer Auswertung auf die Grundgesamtheit verallgemeinert werden. Die lineare Regression wurde als Methode gewählt, um eine graphische Hilfe für den Vergleich zwischen beiden Tests und zwischen den Testergebnissen und der Seroprävalenz der Betriebe zu ermöglichen. Daher sollte die Darstellung unbedingt ausschliesslich als grobe Repräsentation für den Zusammenhang des Trends (blaue Linie) und des Unsicherheitsumfang (grauen Bereich) verstanden werden.

## Resultate

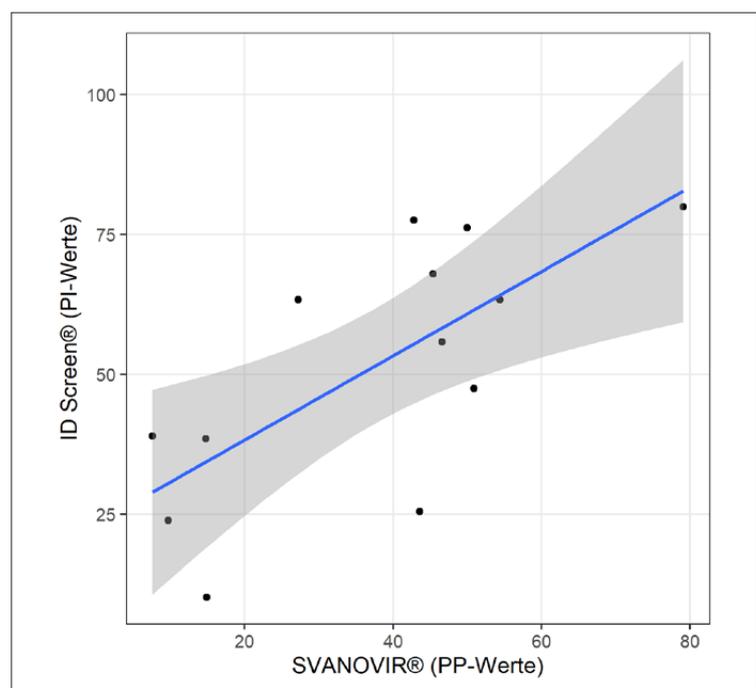
### Ergebnisse der Probenahmen in dieser Studie

Von den 13 Betrieben sind 11 Betriebe positiv im SVANOVIR®-Test gemäss dem Cut-off-Wert (Tabelle 4). Für den ID Screen®-Test war kein Cut-off-Wert definiert, da dieser Test nicht in der Überwachung verwendet wird. Die Ergebnisse der Tankmilch-ELISAs wurden über den prädiktierten Anteil seropositiver Kühe in der Tank-

milchprobe (Tabelle 4, Abbildung 2) verglichen. Die gemäss SVANOVIR® interpretierte Seroprävalenz stimmte bei neun Betrieben mit den Ergebnissen der Blutuntersuchungen überein. Je zwei Betriebe hatten einen grösseren (SG-E und SG-K) bzw. einen kleineren (FR-S und GL-Z) Anteil laktierender seropositiver Kühe als gemäss Testresultat zu erwarten. Mit dem ID Screen®-Test wurden vier Betriebe richtig zugeordnet (BE-G, GL-Z, SG-L und SG-R). Drei Betriebe wurden zu tief (AR-M, SG-E und SG-K) und sechs Betriebe zu hoch eingestuft (BE-W, FR-B, FR-J, FR-S, LU-S und TG-H).

Zwei Betriebe (SG-E, SG-K) wurden mit dem SVANOVIR®-Test als Klasse 1 eingestuft, wobei eine Seroprävalenz bis maximal 27% zu erwarten ist. Mit dem ID-Screen®-Ergebnis war beim Betrieb SG-K eine Seroprävalenz von weniger als 10% zu erwarten und beim Betrieb SG-E eine Seroprävalenz von 10% bis 30%. Die Seroprävalenz der Blutproben betrug 33.3% (SG-K) bzw. 85.0% (SG-E). Der Betrieb FR-S wurde hingegen mit dem SVANOVIR®-Test in der höchsten Klasse (Klasse 3, erwartete Seroprävalenz  $\geq 14\%$ ) eingeordnet, obwohl er eine wirkliche Seroprävalenz von nur 7.7% aufwies.

Abbildung 3 zeigt den Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Tankmilchtests. Der Betrieb AR-M wurde in der höchsten Klasse mit dem SVANOVIR® (PP 43.6%) und in der tiefsten Klasse mit dem ID Screen® (PI 25.5%) eingestuft.



**Abbildung 3:** Korrelation der Ergebnisse des SVANOVIR® BVDV-Ab und ID Screen® BVD p80 Antibody Competition ELISA-Tests zur Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) Situation. Die blaue Linie zeigt die lineare Korrelation der beiden Tests. Der graue Bereich zeigt das 95% Konfidenzintervall.

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch-Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

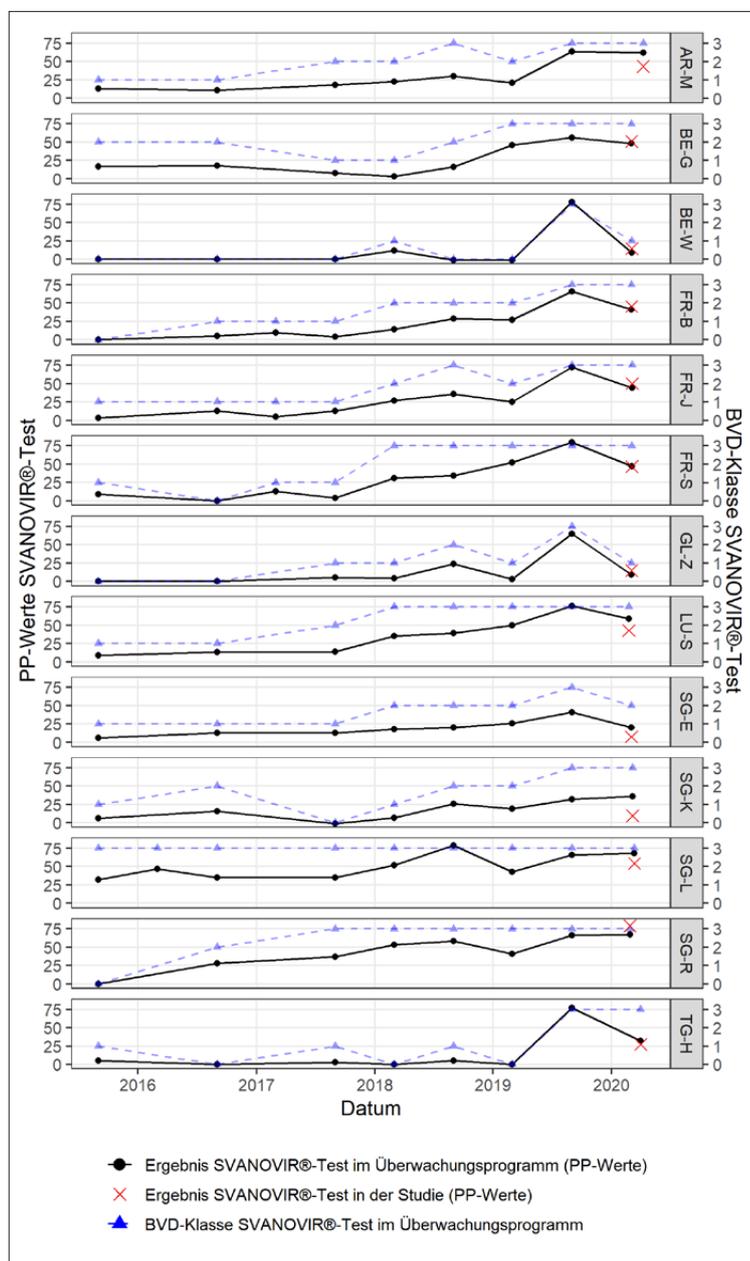
G. Delalay et al.

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

### Einordnung des Ergebnisses der Studienprobe in den zeitlichen Verlauf der Tankmilchergebnisse aus dem Überwachungsprogramm

Die in den Tankmilchproben der Studie mit dem SVANOVIR®-Test bestimmten PP-Werte liegen, ausser bei den Betrieben SG-E und SG-K, im Bereich der PP-Werten aus dem Frühjahr 2020. Bei zehn Betrieben waren die Werte im Herbst 2019 höher als die Werte aus dem Überwachungsprogramm im Frühjahr 2020 und den Werten der Studie (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Historie der Ergebnisse und Ergebnisklassen vom Überwachungsprogramm sowie der Ergebnisse des SVANOVIR®-Verfahrens dieser Studie zur Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) -Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch.

### Seroprävalenz in der Population

Die Seroprävalenz in der Population ist in Tabelle 4 ersichtlich. Abbildung 5 zeigt den Zusammenhang zwischen der Seroprävalenz bei den laktierenden Kühen bzw. zwischen dem SVANOVIR®-Ergebnis und der Seroprävalenz in der Population. Abbildung 6 zeigt die Zahl und den Anteil der seropositiven und seronegativen Kühen pro Geburtsjahr und pro Betrieb. Während bei den Betrieben BE-W und GL-Z nur Kühe eines Geburtsjahres positiv waren, sind bei den meisten Betrieben Kühe mehrerer Geburtsjahre seropositiv. Nur bei Betrieb FR-B ist eine Kuh des jüngsten Jahrgangs seropositiv.

### Diskussion

Beide Tankmilchtests erlauben eine Schätzung der Seroprävalenz der laktierenden Kühe. Es wurde kein bedeutender Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Tests gefunden. Das stimmt mit einer grösseren Vergleichsuntersuchung von 1665 Proben, die durch die Suiselab AG im Rahmen der Zulassung des ID Screen® gemacht wurde, überein. Die anhand der Klasseneinteilung prädizierte Seroprävalenz des SVANOVIR®-Tests stimmte häufiger mit der gemessenen Seroprävalenz bei den laktierenden Kühen überein als die prädizierte Seroprävalenz des ID Screen®-Tests. Das kann aber alleine dadurch erklärt werden, dass der zu erwartende Bereich der Seroprävalenz der SVANOVIR®-Klassen viel breiter und damit unpräziser ist als der angegebene Seroprävalenzbereich des ID Screen®-Tests.

Obwohl der anhand der definierten Klassen erwartete Anteil gut mit dem tatsächlichen Anteil seropositiver laktierender Kühe im Bestand übereinstimmte, war es in unserer Studie nicht möglich, die Seroprävalenz im gesamten Bestand direkt mit dem Ergebnis des Tankmilchtests in unserer Studie zu eruieren. Dies obwohl auch der Anteil seropositiver laktierender Kühe mit dem Anteil aller seropositiven Kühe im Bestand übereinstimmte. Da die Schlussfolgerung vom Tankmilchergebnis auf den gesamten Rinderbestand auf indirektem Wege erfolgen muss, ist das Ergebnis nicht überraschend und zeigt die Notwendigkeit der Rindergruppenuntersuchung nach einem Tankmilchergebnis oberhalb der Cut-off Wertes, wie schon von Moennig et al. (2005) in einer Nachbetrachtung der schwedischen und dänischen BVD-Ausrottungsprogramme festgestellt wurde.

Aus den Ergebnissen der Studie ist ersichtlich, dass eine niedrige Anzahl seropositiver Kühe, teilweise nur eine einzige seropositive laktierende Kuh, genügen kann, um hohe Werte bei der Tankmilchuntersuchung und damit eine Klassifikation in den Klassen 2 oder 3 zu verursachen: Dies war bei den Betrieben BE-W, FR-S und GL-Z

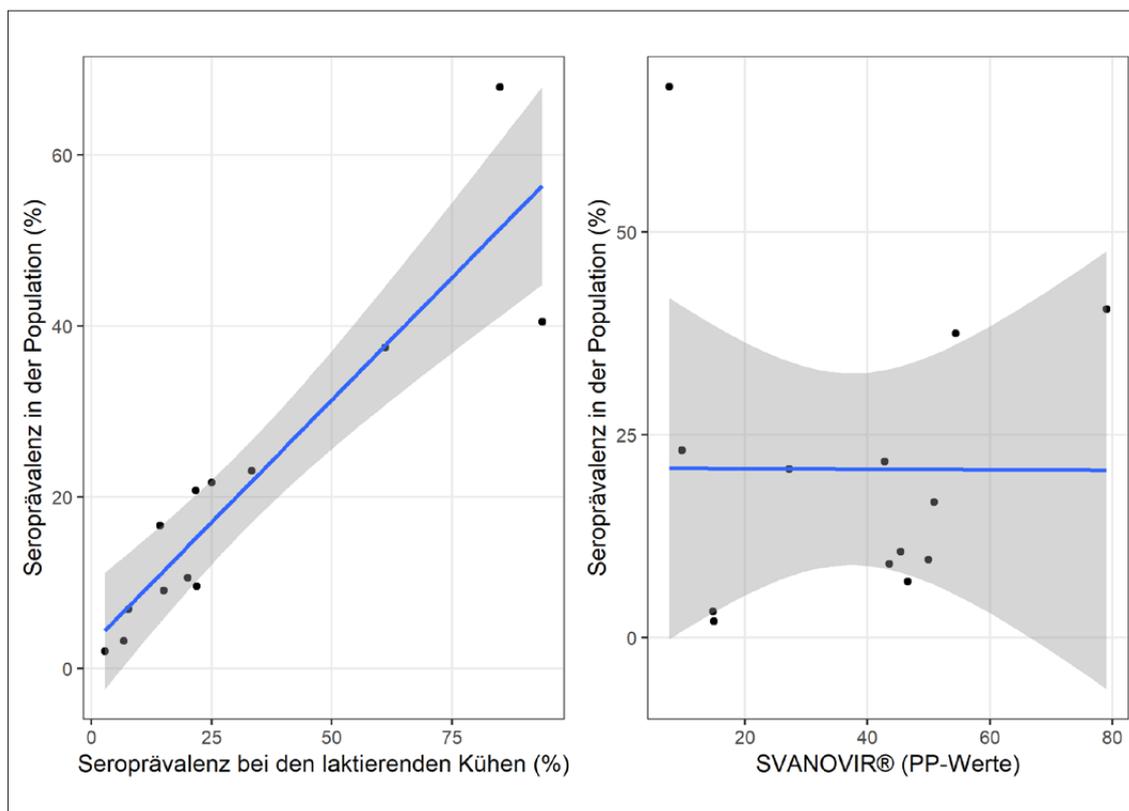
**Tabelle 4:** Ergebnisse zur Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) Situation aus Tankmilch- und Blutuntersuchungen

Betrieb	SVANOVIR® BVDV-Ab				ID Screen® BVD p80 Anti-body Competition		Tiere		
	PP-Wert	Ergebnis qualitativ †	Ergebnis Klasse ‡	Erwartete Seroprävalenz ‡	PI-Wert	Erwartete Seroprävalenz §	Anzahl laktierende Kühe	Anteil laktierende seropositive Kühe	Seroprävalenz Population
AR-M	43.6%	pos	3	≥ 14%	25.5%	< 10%	20	15.0%	9.1%
BE-G	50.9%	pos	3	≥ 14%	47.5%	10–30%	14	14.3%	16.7%
BE-W	14.8%	pos	2	5–30%	38.5%	10–30%	15	6.7%	3.2%
FR-B	45.4%	pos	3	≥ 14%	67.9%	> 30%	30	20.0%	10.6%
FR-J	50.0%	pos	3	≥ 14%	76.2%	> 30%	32	21.9%	9.6%
FR-S	46.6%	pos	3	≥ 14%	55.8%	10–30%	26	7.7%	6.9%
GL-Z	14.9%	pos	2	5–30%	10.2%	< 10%	36	2.8%	2.0%
LU-S	42.8%	pos	3	≥ 14%	77.5%	> 30%	12	25.0%	21.7%
SG-E	7.6%	neg	1	≤ 27%	39.0%	10–30%	20	85.0%	67.9%
SG-K	9.7%	neg	1	≤ 27%	23.9%	< 10%	9	33.3%	23.1%
SG-L	54.4%	pos	3	≥ 14%	63.3%	> 30%	18	61.1%	37.5%
SG-R	79.1%	pos	3	≥ 14%	79.9%	> 30%	16	93.8%	40.5%
TG-H	27.2%	pos	2	5–30%	63.3%	> 30%	46	21.7%	20.8%

† Cut-off bei einem Prozentualen Positivitäts (PP) –Wert von 14% (Überwachungsprogramm)

‡ Cut-offs bei PP 3%, 14% und 30% (SVANOVA), erwartete Seroprävalenz nach Niskanen R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. Vet. Rec. 1993; 133(14) 341–344. doi:10.1136/vr.133.14.341.

§ Cut-offs bei einem Prozentualen Inhibitions-Wert (PI) von 35% und 60% (IDvet)



**Abbildung 5:** Korrelation der Bovinen Virus-Diarrhoe (BVD) Seroprävalenz in der Population mit der BVD Seroprävalenz laktierender Kühe und den Ergebnissen des SVANOVIR®-Verfahrens. Die blaue Linie zeigt die lineare Korrelation der beiden Tests. Der graue Bereich zeigt das 95% Konfidenzintervall.

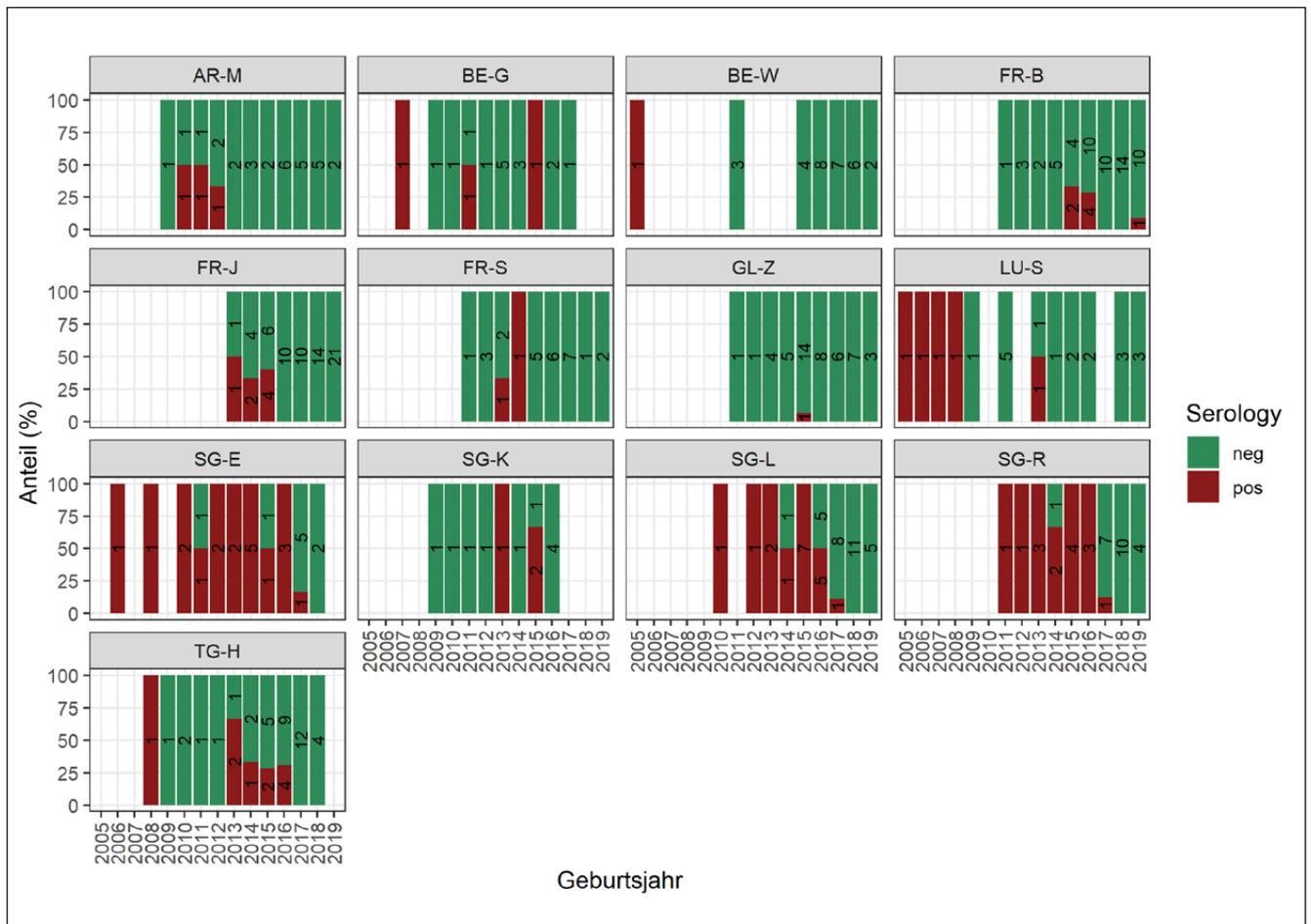


Abbildung 6: Anzahl und Anteil Bovine Virus-Diarrhoe (BVD) seropositiver Kühe pro Bestand und Geburtsjahr

der Fall. Bis zum Zeitpunkt der Bestandsabklärung nach der Probenahme für das Überwachungsprogramm können mehrere Wochen verstreichen. Nur wenige Tierabgänge oder nicht untersuchte Kühe können in solchen Fällen schon erklären, weshalb auch bei einer Bestandsabklärung, welche die serologische Untersuchung aller Rinder umfasst, kein seropositives Tier gefunden wird.

Die Werte von zwei dieser Betriebe (BE-W und GL-Z) waren im Überwachungsprogramm im Herbst 2019 ungewöhnlich hoch, obwohl sie seitdem wieder auf ein niedriges Niveau, aber noch oberhalb des Cut-off-Wertes, gesunken sind. Auch wenn diese Werte wie Ausreisser aussehen, bedeutet es nicht, dass sie falsch sind. Der Anteil seropositiver Kühe auf diesen Betrieben ist jedoch so gering, dass dieser alleine die hohen Werte nicht erklären kann. Der Einfluss des Laktationsstadiums auf die Antikörperausscheidung der seropositiven Kühe könnte möglicherweise die Ergebnisse erklären, da bei den beiden Betrieben die einzige seropositive Kuh am Anfang der Laktation war (am neunten Tag beim Betrieb BE-W und am fünfzehnten Tag beim Betrieb GL-Z). Bachofen et al. (2013)<sup>27</sup> und Walraph et al. (2018)<sup>28</sup> ha-

ben gezeigt, dass der BVDV-Antikörpergehalt in der Milch schnell und innerhalb weniger Tage nach der Geburt sinkt. Diese Abnahme war aber bis zur Ende der Studie von Walraph et al. (Woche 11) ersichtlich.<sup>28</sup> Damit ist es wahrscheinlich, dass diese Kühe zu diesem Zeitpunkt eine grössere Menge Antikörper ausgeschieden haben als später in der Laktation.<sup>16,17</sup> Möglich ist aber auch, dass für diese Betriebe die Probe aus dem Herbst 2019 nicht repräsentativ für die zum Zeitpunkt der Probenahme laktierenden Kühen im Bestand war und ein grösserer Anteil an der Milch von den seropositiven Kühen in der Probe vorhanden gewesen ist. Allerdings gibt es dafür aus den vorhandenen Daten keinen Hinweis.

Im Gegensatz dazu weisen die Tankmilchproben den Betrieben SG-E und SG-K in der Studie tiefe Resultate, welche unterhalb der Cut-off-Wert sind (Klasse 1), auf. Diese Resultate sind unerwartet und stimmen weder mit den Ergebnissen aus der Überwachung noch mit der Seroprävalenz der laktierenden Kühe überein. Mehrere Gründe können diese Ergebnisse erklären. So wurde nachgewiesen, dass Antigene von PI-Tieren die Antikör-

per in der Milch kompetitiv binden können, was zu tieferen Werten führen kann.<sup>22</sup> Für TI-Tiere sind uns keine derartige Untersuchung bekannt, wir gehen aber davon aus, dass ein ähnlicher Effekt beobachtet werden könnte. Dies ist beim Betrieb SG-E jedoch praktisch ausgeschlossen, da alle beprobten Kühe virologisch negativ waren und die nicht beprobten Kühe aufgrund vorheriger seropositiver Ergebnisse und lebenslangem Immunschutz nicht infiziert sein sollten.<sup>29</sup> Andererseits kann auch eine Tankmilchprobe, die nicht repräsentativ für die gesammelte Tankmilch war, etwa durch ungenügende Vermischung im Tank, ein solches Ergebnis erklären. Die Nachfrage beim Kanton ergab, dass die Tankmilchprobe des Betriebs SG-E bei der Milchablieferung an die Käserei und nicht durch den Tierarzt oder die Tierärztin auf dem Betrieb genommen wurde. Die Tankmilchprobe des Betriebs SG-K wurde vom Betriebsleiter oder von der Betriebsleiterin organisiert.

Da das niedrige Tankmilchresultat bei hoher Seroprävalenz für den Betrieb SG-E weiterhin nicht erklärbar war, wurde die Probe ein weiteres Mal mit dem SVANO-VIR®-Test untersucht, um ein falsch-negatives Ergebnis auszuschliessen. In dieser Untersuchung war der PP-Wert zwar höher, aber immer noch unter dem Cut-off-Wert (13.9%). Der Betrieb SG-E zeigte in der Überwachung jedoch einen langsamen Anstieg der PP-Werte und wies seit Frühling 2018 Resultate oberhalb des Cut-off-Werts, bis zu Werten in Klasse 3 im Herbst 2019, auf. Die Probe im Rahmen des normalen Überwachungsprogrammes im Frühling 2020 wies auch wieder ein positiver Wert auf (20%, Klasse 2). Da im Betrieb SG-E die virologischen Untersuchungen negativ waren, und somit keine laktierende und BVDV-ausscheidende Kuh im Betrieb vorhanden ist, bleibt der niedrige PP-Wert der Tankmilch in dieser Studie ohne direkte Erklärung. Als wahrscheinlichste Erklärung bleibt eine Verfälschung der in der Studie entnommenen Probe bestehen, da die PP-Werte der Proben aus der Überwachung gut zur beobachteten Seroprävalenz im Kuhbestand passen. Dies könnte zusätzlich erklären, weshalb der Tankmilchwert eher tief ist, obwohl die Seroprävalenz bei den laktierenden Kühen hoch ist. Nach unserer Kenntnis wurden jedoch die ELISA-Ergebnisse von Tankmilchproben bisher noch nie direkt mit individuellen quantitativen Werten der Blut- oder Milchserologie verglichen. In unserer Studie konnte der Zusammenhang der Tankmilch-ELISA-Ergebnisse mit dem Mittelwert oder mit dem Median der Ergebnisse der Blutserologie auch nicht bewertet werden, weil die quantitativen serologischen Ergebnisse von den zu Studienbeginn schon als seropositiv bekannten Tieren nicht bekannt waren. Auch wenn das Ergebnis des Betriebs SG-E in der Studie nicht eindeutig erklärbar ist, kann man aufgrund der hohen Seroprävalenz im Kuhbestand und der durchweg seronegativen jüngeren Kühe davon ausgehen, dass dieser

Bestand in der Vergangenheit Kontakt zu einem nicht entdeckten PI-Tier hatte. Dieser Verdacht gilt auch für die Betriebe SG-L und SG-R, welche auch eine hohe Seroprävalenz bei älteren Alterskategorien und eine tiefere bei jüngeren Alterskategorien aufweisen.

Unsere Einschätzung ist, dass die beobachteten Ergebnisse der Betriebe SG-E und SG-K aufgrund der Möglichkeit eines verfälschten Ergebnisses der Studienprobe nicht dazu führen sollten, die grundsätzliche Eignung der Tankmilch-ELISAs zur Entdeckung von Betrieben mit für die BVD-Überwachung bedeutsamer Seroprävalenz im Kuhbestand in Frage zu stellen. Im Gegensatz zu dieser Studie erfolgt im Überwachungsprogramm die Probenahme standardisiert im Rahmen der Milchprüfung und die Ergebnisse der Tankmilchproben aus dem Überwachungsprogramm passen sehr gut zur hohen tatsächlichen Seroprävalenz.

### Limitationen

Da unsere Studie in der Form eines multiplen Fallberichts ausgeführt worden ist, und da die Betriebsauswahl nicht zufällig stattgefunden hat, können wir aufgrund der zu kleinen Stichprobe und des Auswahl-Bias die Resultate nicht auf die Schweizer Rinderpopulation generalisieren.

Es sollte auch beachtet werden, dass die Voraussetzungen für statistisch korrekte Durchführung für die abgebildete lineare Regressionen aufgrund der kleinen Anzahl beprobte Herden und der Methode der Betriebsauswahl der Stichprobe nicht geprüft wurden und eher nicht erfüllt sind.

Es muss berücksichtigt werden, dass der für die BVD-Überwachung festgelegte Cut-off des Tankmilchtests nicht der Unterscheidung von BVD-positiven und BVD-negativen Betrieben dient. Es handelt sich um einen Cut-off, der festlegt, ob ein Ausschluss eines aktuellen BVD-Geschehens erfolgen muss oder nicht.

Für die zwei Betriebe SG-E und SG-K konnten wir keine eindeutige Ursache eruieren, warum die Ergebnisse der Tankmilchprobe aus dieser Studie einen unerwartet tiefen Wert aufwiesen. Dennoch spricht die Konsistenz der Ergebnisse aus der Überwachung und den Blutuntersuchungen dafür, dass die niedrigen PP-Werte der Tankmilchproben dieser beiden Betriebe durch verfälschende Eigenschaften der in dieser Studie gezogenen Proben entstanden sind.

### Schlussfolgerung

Die Studie zeigt, dass die beiden Tankmilch-ELISAs den Anforderungen des BVD-Überwachungsprogramms entsprechen.

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch-Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

Einzelne Tiere haben einen grösseren Einfluss auf die Höhe der PP-Werte und damit die Klassifikation des Betriebs als bisher bekannt. Bei Betrieben mit seropositiven Einzeltieren könnten das Laktationsstadium, aber auch die korrekte Entnahme der Probe eine grosse Rolle spielen. Ebenfalls muss der Einfluss des Tierverkehrs stärker berücksichtigt werden, da einzelne seropositive Tiere den Bestand verlassen oder dazukommen können und in der Folge das Ergebnis der Tankmilchuntersuchung über oder unter den cut-off-Wert liegen kann.

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse von Tankmilchproben ist anspruchsvoll. Zu beachten ist, dass die PP- bzw. PI-Werte aus den Tankmilchproben aus verschiedenen Gründen von Probenahme zu Probenahme variieren können, und aus diesem Grund die Klasseneinteilung des Betriebs wechseln kann. Anhand des Tankmilchergebnisses sind direkte Rückschlüsse auf die Seroprävalenz aller Rinder auf dem Betrieb nicht möglich und deswegen auch nicht auf das Ergebnis der Rindergruppenuntersuchung. So können in Tankmilch-positiven Betrieben die Jungtiere des Bestandes alle seronegativ sein, weshalb folglich auch die Rindergruppe in solchen Betrieben negativ ausfallen wird.

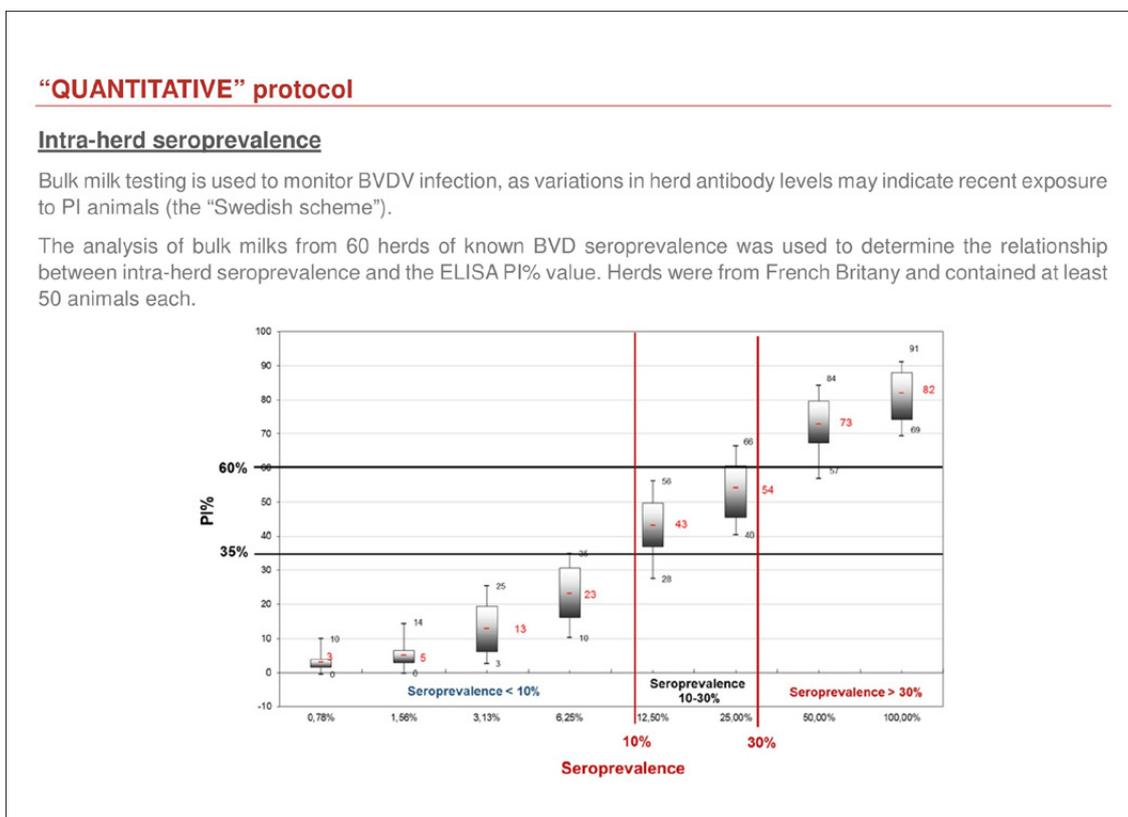
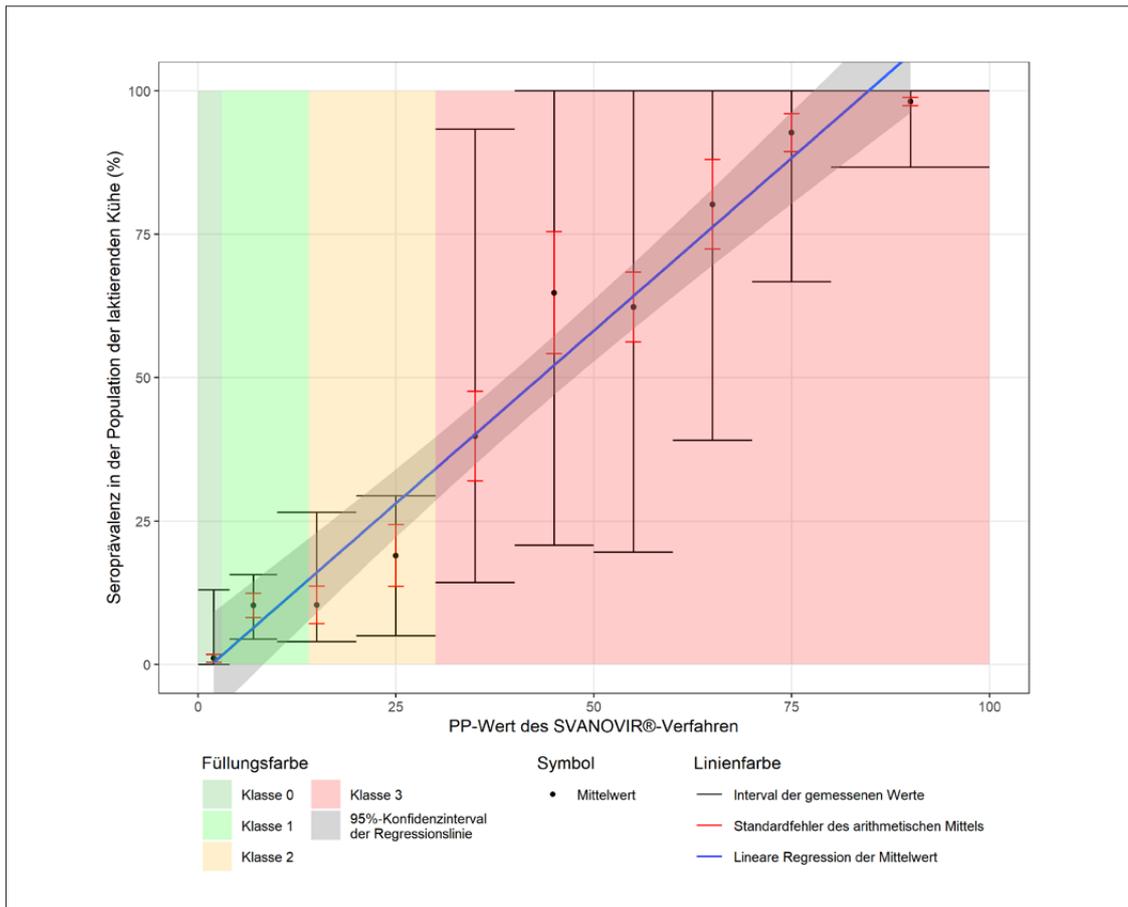
Die Studie lieferte auch Hinweise, dass einer der Betriebe wahrscheinlich Kontakt zu einem PI-Tier hatte, das nicht entdeckt worden ist. Das zeigt, dass die unentdeckte Übertragung des Virus durch PI-Tiere trotz des Überwachungsprogramms noch möglich war und infizierte Betriebe nicht immer zeitnah festgestellt wurden. Daher wurde das Überwachungsprogramm auch seit 2017 wieder intensiviert.

## Danksagung

Wir danken den Betriebsleiter und den Betriebsleiterinnen, die an dieser Studie teilgenommen haben. Wir danken auch allen kantonalen Veterinärämtern, die sich bereit erklärt haben, bei dieser Studie mitzumachen und die Probenahmen organisiert haben. Wir danken allen Mitarbeitenden vom IVI Bern und der Suiselab AG, die die Proben untersucht und uns bei den technischen Fragen unterstützt haben und wir danken Carlos Abril-Gaona und Dagmar Heim für die kritische Durchsicht und die konstruktiven Vorschläge zum Manuskript.

### Abkürzungsliste / Liste d'abréviations / Elenco delle abbreviazioni

BLV	Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen /	OSAV	Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires	USAV	Ufficio federale della sicurezza alimentare e di veterinaria	FSVO	Federal Food Safety and Veterinary Office
BDV	Border disease virus	BDV	Border disease virus	BDV	Virus della pestivirus ovina	BDV	Border disease virus
BVD	Bovine Virus-Diarrhoe	BVD	Diarrhée virale bovine	BVD	Diarrea virale bovina	BVD	Bovine viral diarrhea
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus	BVDV	Virus de la diarrhée virale bovine	BVDV	Virus della diarrea virale bovina	BVDV	Bovine viral diarrhea virus
Ct-Wert	Threshold cycle	Ct	Threshold cycle	valore di Ct	Threshold cycle	Ct-Value	Threshold cycle
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IVI	Institut für Virologie und Immunologie	IVI	Institut de virologie et d'immunologie	IVI	Istituto di virologia e di immunologia	IVI	Institute of Virology and Immunology
PI	persistent infiziert	IP	infecté permanent	PI	persistentemente infetti	PI	Persistently infected
PI-Wert	Prozentualer Inhibitions-Wert	Valeur PI	Valeur de pourcentage d'inhibition	Valore PI	Valore della percentuale di inibizione	PI value	percentage inhibition value
PP-Wert	Prozentualer Positivitäts-Wert	Valeur PP	Valeur de pourcentage de positivité	Valore PP	Valore della percentuale di positività	PP value	percentage positivity value
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse	RT-PCR	Reazione a catena della polimerasi inversa	RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SNT	Serumneutralisationstest	SN	test de séroneutralisation	SN	prova di sieroneutralizzazione	SVN assay	Serum virus neutralization assay
TI	Transient infiziert	IT	Infecté transitoirement	TI	Transitorie infetti	TI	Transiently infected



BVD-Situation auf Betrieben mit hohen serologischen Werten in der Tankmilch – Einzeltiere haben einen grösseren Einfluss als bisher bekannt

G. Delalay et al.

## Situation concernant la BVD dans les exploitations avec des valeurs sérologiques élevées dans le lait de citerne – un unique animal peut avoir une plus grande influence qu'on ne le considérait jusqu'à présent

La diarrhée virale bovine (BVD) est une maladie des bovins économiquement importante. En Suisse, cette maladie fait l'objet d'un programme d'éradication depuis 2008. Après l'examen virologique initial de tous les bovins, suivi de l'examen de tous les veaux nouveau-nés, la prévalence de la BVD en 2012 était suffisamment faible pour permettre d'adapter le programme de surveillance et de procéder à un suivi sérologique des exploitations laitières. Un nombre inhabituellement grand de valeurs élevées dans les examens de lait de citerne a été observé lors de cette surveillance sérologique en automne 2019. Dans de nombreuses exploitations, aucun animal séropositif n'a pu être découvert lors des tests de suivi des groupes de bovins. Cette étude a été conçue sous la forme d'un rapport de cas multiples pour mieux évaluer la situation de la BVD dans un troupeau après un résultat sérologique de lait de citerne supérieur à la valeur limite.

Le lait de citerne de 13 exploitations avec des valeurs sérologiques supérieures à la valeur limite en automne 2019 a été analysé à nouveau avec deux tests ELISA différents au printemps 2020. De plus, des échantillons de sang ont été prélevés en même temps pour obtenir les valeurs sérologiques de tous les bovins adultes présents sur l'exploitation.

Les résultats des deux tests utilisés pour examiner les échantillons de lait de citerne montraient une bonne corrélation entre les deux tests. Les résultats de la sérologie du lait de citerne ont montré une faible corrélation avec la séroprévalence chez les vaches en lactation mais pas avec la séroprévalence de tous les animaux adultes du troupeau. Un seul animal séropositif pouvait avoir à lui seul une forte influence sur les résultats de la sérologie du lait de citerne dans certains troupeaux. De plus, un prélèvement correct du lait de citerne doit être assuré car la représentativité de l'échantillon est décisive pour obtenir un résultat significatif pour l'exploitation étudiée. Si le résultat du test est supérieur à la valeur limite, l'examen d'un groupe de bovins reste le meilleur moyen d'identifier une infection dans un troupeau.

**Mots clés:** BVD, Suisse, surveillance, lait de mélange

## La situazione della BVD nelle aziende con valori serologici elevati nelle cisterne di latte, i singoli animali hanno un'influenza ben superiore a quanto pensato fino ad ora

La diarrea virale bovina (BVD) è una malattia dei bovini di grande impatto economico. Nel 2008 la Svizzera ha iniziato un programma di eradicazione. Dopo i test virologici iniziali su tutti i bovini, seguiti dai test su tutti i vitelli appena nati, la prevalenza della BVD nel 2012 risultava abbastanza bassa per poter iniziare la sorveglianza sierologica. Nell'autunno del 2019, nell'ambito di questa sorveglianza sierologica, sono stati osservati dei livelli insolitamente elevati nei test effettuati sul latte di cisterna. Ulteriori esami per chiarire la situazione sono stati effettuati su gruppi di bovini in molte aziende ma non sono stati trovati animali sieropositivi. Al fine di valutare al meglio la situazione della BVD in una mandria, dopo un risultato sierologico del latte di cisterna superiore al valore di cut-off, abbiamo condotto il presente studio sotto forma di un rapporto di casi multipli. Il latte di cisterna di 13 aziende che hanno mostrato valori sierologici superiori al valore di cut-off nell'autunno del 2019 è stato testato nuovamente nella primavera del 2020 con due diversi test ELISA. Inoltre, sono stati prelevati simultaneamente dei campioni di sangue per ottenere i valori sierologici di tutti i bovini adulti dell'allevamento. I risultati dei due test utilizzati per esaminare i campioni di latte della cisterna erano ben correlati tra loro. I risultati della sierologia del latte della cisterna mostravano una bassa correlazione con la sieroprevalenza nei bovini in lattazione, ma nessuna correlazione con la sieroprevalenza di tutti gli animali adulti della mandria. In alcune mandrie, un singolo animale sieropositivo aveva un grande impatto sui risultati della sierologia del latte della cisterna. Al fine di ottenere un risultato significativo è essenziale garantire un campionamento corretto dei campioni di latte della cisterna, poiché la rappresentatività del campione per il latte della cisterna di un'azienda è fondamentale. Se il risultato del test del latte della cisterna è al di sopra del valore di cut-off, testare un gruppo di animali è ancora il modo migliore per rilevare un caso reale di infezione in una mandria.

**Parole chiave:** BVD, Svizzera, Sorveglianza, Bulk tank milk

## Literaturnachweis

<sup>1</sup> Fourichon C, Beaudeau F, Bareille N, Seegers H. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72(1–2): 177–181. <https://www.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.08.018>.

<sup>2</sup> Thomann B, Tschopp A, Magouras I, Meylan M, Schüpbach-Regula G, Häslér B. Economic evaluation

of the eradication program for bovine viral diarrhoea in the Swiss dairy sector. *Prev. Vet. Med.* 2017; 145: 1–6. <https://www.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.020>.

<sup>3</sup> Häslér B, Howe KS, Presi P, Stärk KDC. An economic model to evaluate the mitigation programme for bovine viral diarrhoea in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 2012; 106(2): 162–173. <https://www.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.01.022>.

- <sup>4</sup> Gethmann J, Probst C, Bassett J, Blunk P, Hövel P, Conraths FJ. An Epidemiological and Economic Simulation Model to Evaluate Strategies for the Control of Bovine Virus Diarrhea in Germany. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6: 406.
- <sup>5</sup> Pinior B, Firth CL, Richter V, Lebl K, Trauffler M, Dzieciol M, et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137: 77–92. <https://www.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>.
- <sup>6</sup> Richter V, Lebl K, Baumgartner W, Obritzhauser W, Käsbohrer A, Pinior B. A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection. *Vet. J.* 2017; 220: 80–87. <https://www.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.005>.
- <sup>7</sup> OIE. Bovine Viral Diarrhoea. In: OIE (ed.), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (28th ed.). OIE, Paris, FR, 2019: 1075–1096.
- <sup>8</sup> McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can. J. Comp. Med.* 1984; 48(2): 156–161.
- <sup>9</sup> Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet. Microbiol.* 1999; 64(2–3): 89–107. [https://www.doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00262-4](https://www.doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00262-4).
- <sup>10</sup> Stähl K, Alenius S. BVDV control and eradication in Europe – an update. *Jpn. J. Vet. Res.* 2011; 60(SUPPL): S31–9.
- <sup>11</sup> Moennig V, Houe H, Lindberg A. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Heal. Res. Rev.* 2005; 6(1): 63–74. <https://www.doi.org/10.1079/ahr2005102>.
- <sup>12</sup> Presi P, Heim D. BVD eradication in Switzerland – A new approach. *Vet. Microbiol.* 2010; 142(1–2): 137–142. <https://www.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.054>.
- <sup>13</sup> Bachofen C, Stalder H, Vogt H-R, Wegmüller M, Schweizer M, Zanoni R, et al. Bovine Virusdiarrhoe (BVD): von der Biologie zur Bekämpfung. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 2013; 126(11/12): 452–461.
- <sup>14</sup> BLV. Ausrottung BVD. 2020. <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/tiere/tierseuchen/bekaempfung/ausrottung-bvd.html> (accessed: 16.4.2021).
- <sup>15</sup> Niskanen R. Relationship between the levels of antibodies to bovine viral diarrhoea virus in bulk tank milk and the prevalence of cows exposed to the virus. *Vet. Rec.* 1993; 133(14): 341–344. <https://www.doi.org/10.1136/vr.133.14.341>.
- <sup>16</sup> Van Opdenbosch E, Wellemans G, Strobbe R, De Brabander DL, Boucqué CV. Evolution des anticorps anti rota dans le lait de vaches traitées en fin de gestation soit par le vaccin anti rota complet, soit par l'adjuvant seul. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1981; 4(3–4): 293–300. [https://www.doi.org/10.1016/0147-9571\(81\)90015-1](https://www.doi.org/10.1016/0147-9571(81)90015-1).
- <sup>17</sup> Crouch CF, Oliver S, Hearle DC, Buckley A, Chapman AJ, Francis MJ. Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. *Vaccine.* 2000; 19(2–3): 189–196. [https://www.doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00177-8](https://www.doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00177-8).
- <sup>18</sup> Brownlie J, Hooper LB, Thompson I, Collins ME. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) – The bovine pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* 1998; 10(2–3): 141–150. [https://www.doi.org/10.1016/S0928-0197\(98\)00030-0](https://www.doi.org/10.1016/S0928-0197(98)00030-0).
- <sup>19</sup> Bendfeldt S, Flebbe U, Fritzsche J, Greiser-Wilke I, Grummer B, Haas L, et al. Untersuchung von Sammelmilchproben mittels Polymerasekettenreaktion: Eine ergänzende Methode für die BVD-überwachung. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 2005; 112(4): 130–135.
- <sup>20</sup> Menanteau-Horta AM, Ames TR, Johnson DW, Meiske JC. Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhoea vaccines. *Can. J. Comp. Med.* 1985; 49(1): 10–14.
- <sup>21</sup> BLV. Liste zugelassener Veterinärdiagnostika. Bern, CH, 2020. [https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/tiere/tierkrankheiten-und-arzneimittel/tierseuchendiagnostik/liste-zugelassener-veterinaerdiagnostika.pdf.download.pdf/Liste\\_zugelassener\\_Veterinaerdiagnostika.pdf](https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/tiere/tierkrankheiten-und-arzneimittel/tierseuchendiagnostik/liste-zugelassener-veterinaerdiagnostika.pdf.download.pdf/Liste_zugelassener_Veterinaerdiagnostika.pdf) (accessed: 16.4.2021).
- <sup>22</sup> Sandvik T, Larsen IL, Nyberg O. Influence of milk from cows persistently infected with BVD virus on bulk milk antibody levels. *Vet. Rec.* 2001; 148(3): 82–84. <https://www.doi.org/10.1136/vr.148.3.82>.
- <sup>23</sup> Stalder H, Hug C, Zanoni R, Vogt H-R, Peterhans E, Schweizer M, et al. A nationwide database linking information on the hosts with sequence data of their virus strains: A useful tool for the eradication of bovine viral diarrhoea (BVD) in Switzerland. *Virus Res.* 2016; 218: 49–56. <https://www.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.012>.
- <sup>24</sup> Braun U, Janett F, Züblin S, von Büren M, Hilbe M, Zanoni R, et al. Insemination with border disease virus-infected semen results in seroconversion in cows but not persistent infection in fetuses. *BMC Vet. Res.* 2018; 14(1): 159. <https://www.doi.org/10.1186/s12917-018-1472-6>.
- <sup>25</sup> Kaufmann C, Stalder H, Sidler X, Renzullo S, Gurtner C, Grahofer A, et al. Long-Term Circulation of Atypical Porcine Pestivirus (APPV) within Switzerland. *Viruses.* 2019; 11(7): 653. <https://www.doi.org/10.3390/v11070653> (accessed: 17.5.2021).
- <sup>26</sup> Hanon J-B, Van der Stede Y, Antonissen A, Mullender C, Tignon M, van den Berg T, et al. Distinction Between Persistent and Transient Infection in a Bovine Viral Diarrhoea (BVD) Control Programme: Appropriate Interpretation of Real-Time RT-PCR and Antigen-ELISA Test Results. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(2): 156–162. <https://www.doi.org/https://doi.org/10.1111/tbed.12011>.
- <sup>27</sup> Bachofen C, Bollinger B, Peterhans E, Stalder H, Schweizer M. Diagnostic gap in Bovine viral diarrhoea virus serology during the periparturient period in cattle. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 2013; 25(5): 655–661. <https://www.doi.org/10.1177/1040638713501172>.
- <sup>28</sup> Walraph J, Zoche-Golob V, Weber J, Freick M. Decline of antibody response in indirect ELISA tests during the periparturient period caused diagnostic gaps in *Coxiella burnetii* and BVDV serology in pluriparous cows within a Holstein dairy herd. *Res. Vet. Sci.* 2018; 118: 91–96. <https://www.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.018>.
- <sup>29</sup> Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M. BVDV and innate immunity. *Biologicals.* 2003; 31(2): 107–112. [https://www.doi.org/10.1016/S1045-1056\(03\)00024-1](https://www.doi.org/10.1016/S1045-1056(03)00024-1).

## Korrespondenzadresse

Gary Delalay  
Federal Food Safety and Veterinary Office FSVO  
Department of Animal Health  
Schwarzenburgstrasse 155  
CH-3003 Bern  
Telefon: +41 58 467 62 93  
E-Mail: gary.delalay@vetsuisse.unibe.ch