

Nationale Tierseuchenüberwachung: Aktueller Stand und Einsatz der Tankmilchdiagnostik

M. Schorer¹, M. Schmid¹, C. Wunderwald¹, M. Engels², R. Zanoni³, H. Schwermer¹

¹Bundesamt für Veterinärwesen (BVET), Bern, ²Institut für Virologie, Universität Zürich, ³Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern

Hintergrund

Die Tankmilchdiagnostik ist ein wichtiges und sehr effizientes Instrument zur Untersuchung und Überwachung von Krankheitserregern in der Rinderpopulation. Das Erregerspektrum reicht von Viren und Bakterien bis zu parasitischen Würmern. In Skandinavien wird die Tankmilchuntersuchung bereits seit Mitte der 80er Jahre erfolgreich zur Ausrottung und Überwachung der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR) und der enzootischen bovinen Leukose (EBL) genutzt. Auch in Grossbritannien spielt die Tankmilchdiagnostik eine integrale Rolle im nationalen Kontrollprogramm, etwa bei EBL oder der Rinderbrucellose (Pritchard, 2001). In der Schweiz wurde die serologische Milchuntersuchung während des IBR-Ausrottungsprogramms in den 80er Jahren eingeführt, obschon damals aufgrund der geringeren Empfindlichkeit nur die Untersuchung von Milchmischproben von höchstens fünf Tieren möglich war (Riggenbach, 1998). In den letzten Jahren wurden die Testsysteme laufend verbessert und mittlerweile können Sammelgemelke von mehreren Hundert Einzeltieren analysiert werden. So kann die Gesamtzahl der Probenentnahmen erheblich reduziert werden. 2007 erfolgte die aktive Bluetongueüberwachung der Rinderpopulation mittels Milchserologie (Chaignat et al., 2010).

Eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Milchproben als Untersuchungsmaterial ist die Tatsache, dass zwischen der Antikörperkonzentration im Blut und jener in der Milch eine Korrelation besteht (Pritchard et al., 2002). Für die Diagnostik infektiöser Krankheiten in Tankmilchproben ist ausserdem vorteilhaft, dass im Allgemeinen mehrere Kühe einer Herde infiziert werden und Antikörper ausscheiden. Der Antikörpernachweis mittels Tankmilchdiagnostik kann sich aber auch zur Erfassung des Prävalenzniveaus innerhalb eines Betriebes eignen, da eine Korrelation zwischen Antikörpergehalt der Tankmilch und Anzahl infizierter Kühe besteht (Niskanen, 1993). Weiter kann die Tankmilchdiagnostik auch für die Überwachung von seuchenfreien Gebieten im Rahmen der Aufrechterhaltung der Seuchenfreiheit genutzt werden. In diesem Fall ist das Ziel der Tankmilchdiagnostik,

ein aktives Infektionsgeschehen auf den untersuchten Betrieben ausschliessen zu können. Bei vorher durchgeführten Impfkampagnen oder hoher Seroprävalenz – wie bei boviner Virusdiarrhoe (BVD) in der Schweiz vor der Bekämpfung – ist die Tankmilchdiagnostik jedoch nicht geeignet, infizierte von nicht infizierten Betrieben zu unterscheiden (Zimmerli et al., 2009). Neben der Tierseuchenüberwachung kann die Tankmilchdiagnostik auch zur Überprüfung der Milchqualität auf Mastitiserreger oder zur Erstellung von Prävalenzstudien von Krankheitserregern eingesetzt werden. Das Verfahren kann nicht nur bei Kuhmilch, sondern auch für die Untersuchung von Ziegen- und Schafmilch verwendet werden. So wurden vor Kurzem Studien über den Antikörper- und Erregernachweis der caprinen Arthritis Enzephalitis (CAE) und anderer Lentiviren der kleinen Wiederkäuer publiziert (Brinkhof et al., 2010; Barquero et al., 2011).

Die Tankmilchdiagnostik

Die Tierseuchendiagnostik basiert meistens auf der Grundlage von serologischen Tests, die auf den spezifischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Antigen beruhen. Die am häufigsten verwendete Screening-Methode ist der kostengünstige und automatisierbare Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA; Sandvik, 2005). ELISAs werden als Einzeltiertest, Herdentest oder Pooltest eingesetzt. Ob diagnostische Tests für spezifische Anwendungen geeignet sind, kann an zwei Kennwerten des Testsystems festgemacht werden: Der Sensitivität und der Spezifität. Zwischen den beiden besteht eine inverse Korrelation; bei zunehmender Sensitivität nimmt die Spezifität ab und umgekehrt (Abb. 1). Daher treten bei hoher Sensitivität und daraus folgender geringerer Spezifität vermehrt falsch-positive Ergebnisse auf. Die Sensitivität ist ein Mass für den Anteil richtig positiver Resultate gemessen an der gesichert (wahr) positiven Population, oder anders ausgedrückt die Wahrscheinlichkeit, dass infizierte Tiere richtig als solche erkannt werden. In der Tankmilchdiagnostik werden sehr sensitive Tests benötigt, da der Verdünnungseffekt in den

494 Kurzmittelungen/Short communications

Sammelmilch enorm ist und das Ziel von Bekämpfungsprogrammen darin besteht, auch noch einzelne serologisch positive Tiere zu erkennen. Bei einem Freiheitsnachweis geht es hingegen darum, negative Betriebe als solche zu bestätigen. Allfällige positive Befunde werden anschliessend mit Hilfe von spezifischeren Tests bestätigt oder verworfen. Falsch negative Ergebnisse entstehen häufig, wenn erst kürzlich infizierte Herden untersucht werden, in denen zum Probeentnahmezeitpunkt nur wenige Tiere serokonvertiert haben. Dies ist besonders im Zusammenhang mit der Überwachung der BVD zu berücksichtigen (Lindberg et al., 2006). Dieser Umstand kann behoben werden, indem die Tankmilchuntersuchung im Abstand von einigen Monaten wiederholt wird. In diesem Fall kann auch der Verlauf der Messwerte über die einzelnen Zeitpunkte Aufschluss über den Seuchenstatus eines Betriebs geben. Aufgrund des nicht invasiven Verfahrens und der geringen Kosten sind solche wiederholten Untersuchungen problemlos möglich.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Auswertung von ELISA-Resultaten ist die Festlegung des sogenannten Cut-off Werts. Die gemessenen OD-Werte (optische Dichte) können beliebige kontinuierliche Werte auf der Messskala einnehmen. Bei der Interpretation gelten Werte über dem Cut-off als positiv, diejenigen unterhalb als negativ (Abb. 1). Weil sich die Testmesswerte von infizierten und nicht infizierten Populationen überlappen, kann prinzipiell kein diagnostischer Test gleichzeitig 100 % sensitiv und 100 % spezifisch sein. Dementsprechend kann in Abhängigkeit der gewünschten Sensitivität grundsätzlich ein beliebiger Wert als Cut-off gewählt werden. Die Genauigkeit des Tests sollte jedoch mittels im Feld erworbener Daten unter Zuhilfenahme eines Goldstandards für den

«wahren» Status abgesichert werden. (McKenna and Dohoo, 2006). Entscheidend bei der Tankmilchdiagnostik ist dabei, in welchem Rahmen sie zur Anwendung kommt, da die Eignung eines diagnostischen Tests vom Ziel des jeweiligen Programms und der zu testenden Population abhängig ist (Mars et al., 2010). Somit können – abhängig vom Einsatzzweck des Tests – unterschiedliche Cut-off-Werte für den gleichen Test sinnvoll sein.

Aus labordiagnostischer Sicht stellt die Untersuchung von Milchproben einige spezielle Anforderungen. Faktoren wie unspezifische Antikörper-Kreuzreaktionen, pathologische Veränderungen und insbesondere der Fettgehalt der Milch können zu unspezifischen Reaktionen führen, welche das Testergebnis verfälschen (Chaignat et al., 2010). Ein hoher Fettanteil interferiert nicht nur mit den Antikörpern in der Probe selbst, sondern hat auch einen Einfluss auf die optische Dichte und somit auf die Auswertung des ELISAs (Plaza et al., 2009). Aus diesem Grund wird die Milchprobe vor der Durchführung des Tests häufig entrahmt (Schulze et al., 2011).

Als grösster Nachteil der Tankmilchdiagnostik gilt der Umstand, dass nur laktierende Tiere erfasst werden. Darüber hinaus kann es vorkommen, dass aufgrund schwankender Milchleistung einzelne Tiere überproportional in der Bestandesprobe vertreten sind und das Resultat verzerrt wird. Deshalb müssen bei einem positiven Befund immer alle Tiere des betroffenen Bestandes blutserologisch nachuntersucht werden, um die genaue Identität und Anzahl positiver Tiere ermitteln zu können. Das abschliessende Ziel der Tankmilchprobenuntersuchung ist nicht die Interpretation der Sammelprobe an sich, sondern die daraus abgeleitete Beurteilung von Einzeltieren, Betrieben oder Populationen (Greiner, 2003).

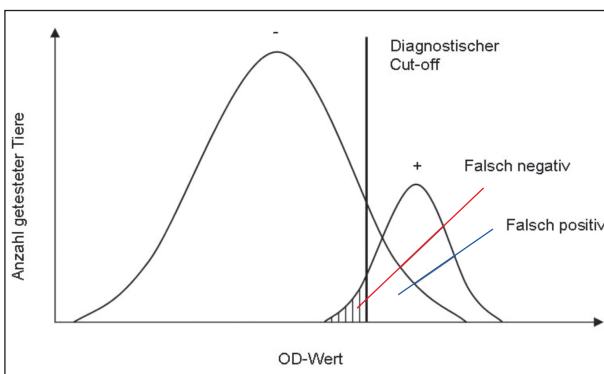


Abbildung 1: Wahl des diagnostischen Cut-offs und das Auftreten von falsch negativen und falsch positiven Testergebnissen. Mit der Verschiebung des Cut-offs verändert sich auch der Anteil an falsch negativen bzw. falsch positiven Resultaten. Höhere Sensitivität (Verschieben des Cut-offs nach links) führt zu einem höheren Anteil an falsch positiven Ergebnissen, wohingegen die Verschiebung nach rechts (höhere Spezifität) den Anteil an falsch negativen Resultaten erhöht. -: infizierte Population, +: nicht infizierte Population. Adaptiert nach McKenna & Dohoo (2006).

Gegenwärtiger Einsatz der Tankmilchdiagnostik

Im Jahr 2012 wird in der Schweiz die Überwachung von BVD, IBR und EBL aus einer Kombination aus Tankmilch- und Blutprobung bestehen. Im Hinblick auf die Tankmilchdiagnostik sind die Voraussetzung in der Schweiz sehr gut, da alle Proben parallel zur Milchqualitätsprüfung im selben Milchprüfungslabor untersucht werden, wodurch aufwändige oder fehleranfällige Zwischenschritte gut standardisiert werden können. Im Fall von IBR und EBL werden insgesamt 2'900 Rinderhaltungen jährlich kontrolliert, 1'800 milchliefernde Betriebe mittels zwei Tankmilchproben im Abstand von 3 Monaten und 1'100 Rindviehhaltungen ohne Milchkühe über Blutproben. Die Ziehung der Tankmilchproben ist im Februar und Mai 2012 erfolgt. Die Rate der falsch positiven Testresultate war nach der ersten Probenentnahme bei EBL sehr gering (4 Betriebe, 0,2 %) und bei IBR etwas höher (14 Betriebe, 0,78 %). Auf den betroffenen Betrieben wurden alle Kühe blutserologisch mit negativem Ergebnis nachuntersucht. Diese Betriebe werden in der zweiten Probenent-

nahmerunde nicht mehr untersucht. Im Rahmen der BVD-Überwachung werden alle milchliefende Betriebe untersucht. Insgesamt wurden im Februar und Oktober 2012 je 25'000 Tankmilchproben auf das Vorkommen von BVD-Antikörpern untersucht. Die Tankmilchergebnisse aus dem Februar zeigen eine nach wie vor hohe Rate von Betrieben (18%), auf denen fast ausschliesslich serologisch positive Kühe vorhanden sind. Da sich diese Betriebe nicht für eine Überwachung mit Tankmilchproben eignen (da schon alle Kühe serokonvertiert haben), müssen Rindergruppen blutserologisch untersucht werden, um zu zeigen, dass keine aktuellen BVD-Infektionen vorliegen. Auf 39% der Betriebe waren nur wenige Kühe serologisch positiv. Auf diesen ist eine BVD-Infektion unwahrscheinlich. Für die restlichen Betriebe besteht die Möglichkeit, über den Verlauf der Messwerte im Herbst, eine aktuelle BVD-Infektion mit hoher Sicherheit ausschliessen zu können. Neben der Tankmilchkontrolle findet eine zusätzliche blutserologische Beprobung von Jungrindern von nicht milchliefenden Betrieben statt. Eine möglichst genaue Datengrundlage, sowie die Anpassung der Cut-off Werte an die besondere Tierseuchensituation in der Schweiz, würde aufgrund der Reduktion falsch-positiver Testergebnisse, eine noch höhere Effizienz des Verfahrens bedeuten.

Schlussfolgerungen

Die Tankmilchserologie stellt eine international gut etablierte, reproduzierbare und kosteneffiziente Methode zur Kontrolle von Bestandesproben dar. Die Methode hat ein grosses Potential bei entsprechender Messwertinterpretation, die Einsatzmöglichkeiten zu erweitern.

Literatur

Barquero N., Arjona A., Domenech A., Tournal C., de las Heras A., Fernandez-Garayzabal J. F., Ruiz-Santa Quiteria J. A., and Gomez-Lucia E.: Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. *Vet. Rec.* 2011, 168: 20.

Brinkhof J. M., Houwers D. J., Moll L., Dercksen D., and van Maanen C.: Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Vet. Microbiol.* 2010, 142: 193–198.

Chaignat V., Nitzsche S., Scharer S., Feyer D., Schwermer H., Thur B.: Milk concentration improves Bluetongue antibody detection by use of an indirect ELISA. *Vet. Microbiol.* 2010, 143: 179–183.

Greiner M.: Serodiagnostische Tests. Springer Verlag. 2003, 8–10.

Lindberg A., Brownlie J., Gunn G. J., Houe H., Moennig V., Saatkamp H. W., Sandvik T., Valle P. S.: The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech.* 2006, 26: 961–979.

Mars M. H., van Maanen C., Vellema P., Kramps J. A., and van Rijn P. A.: Evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies in bulk milk against bluetongue virus infections in the Netherlands. *Vet. Microbiol.* 2010, 146: 209–214.

McKenna S. L., and Dohoo I. R.: Using and interpreting diagnostic tests. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2006, 22: 195–205.

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: 341–344.

Plaza M., Sanchez A., Corrales JC., De la Fe C., Contreras A.: Caprine arthritis encephalitis virus diagnosed by ELISA in lactating goats using milk samples. *Small Ruminant Res.* 2009, 81: 189–192.

Pritchard G.: Milk antibody testing in cattle. In *Practice.* 2001, 23: 542–549.

Pritchard G. C., Kirkwood G. M., Sayers A. R.: Detecting antibodies to infectious bovine rhinotracheitis and BVD virus infections using milk samples from individual cows. *Vet. Rec.* 2002, 150: 182–183.

Riggenbach C.: Die Bekämpfung der Infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR) in der Schweiz. Bundesamt für Veterinärwesen (BVET). 1998.

Sandvik T.: Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. *Prev. Vet. Med.* 2005, 72: 3–16.

Schulze M., Thalheim S., Possardt C., Hlinak A.: Milchserologie – ein wichtiges Instrument im Rahmen der Tierseuchenüberwachung. Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, 2011, 18: 142–144.

Zimmerli U., Presi P., Heim, D.: BVD eradication campaign in Switzerland: first results and outlook. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2009, 151: 5–11.

Korrespondenz

Michelle Schorer
Bundesamt für Veterinärwesen BVET
Schwarzenburgstrasse 155
CH-3003 Bern-Liebelfeld
Tel.: + 41 (0)31 323 23 96
michelle.schorer@bvet.admin.ch

Manuskripteingang: 22. Februar 2012

Angenommen: 28. Mai 2012