

Protocol voor het toezicht op laboratoria die diagnostiek uitvoeren voor bestrijding van BVD in Nederland

1. Inleiding

De Nederlandse rundveehouderij heeft het voornemen om Bovine Virus Diarree (BVD) in Nederland te elimineren. Om dit te realiseren is een bestrijdingsprogramma opgesteld onder leiding van de Stuurgroep Voorbereiding collectieve bestrijding IBR en BVD in Nederland. Deze stuurgroep is ingericht door de Themacommissie Diergezondheid Rund (DKR), waarvan het secretariaat is belegd bij ZuivelNL. In het programma worden aan rundveebedrijven eisen gesteld om vrij te worden en vrij te blijven van BVD.

Status infectie

Runderen kunnen persistent of transiënt geïnfecteerd zijn met het BVD-virus (BVDV). Persistent geïnfecteerde (PI) runderen (ook wel genoemd: BVD-dragers) scheiden hun leven lang grote hoeveelheden virus uit en zullen op die manier andere dieren op het bedrijf infecteren. Transiënt geïnfecteerde runderen genezen na een infectie met BVDV en bouwen een afweer op tegen BVDV. Deze dieren scheiden gedurende een korte periode een lage hoeveelheid BVDV uit. Doel van het bestrijdingsprogramma is om de Nederlandse rundveestapel vrij te maken van BVD door dieren die persistent drager zijn van BVDV op te sporen en af te voeren.

Globale beschrijving bestrijdingsprogramma

Het bestrijdingsprogramma richt zich op het realiseren van de status 'BVD-vrij' voor alle bedrijven. Bedrijven kunnen daarvoor een intakeprotocol doorlopen waarin van elk dier dat bij de start aanwezig is wordt vastgesteld of het een PI is en waarin daarnaast gedurende minimaal tien maanden alle nieuw geboren kalveren (met inbegrip van dood geboren kalveren en geaborteerde kalveren) worden getest op BVD-dragerschap. Na het succesvol doorlopen van dit protocol wordt de status 'BVD-vrij' toegekend aan het bedrijf. Vervolgens moet het bedrijf worden bewaakt door onderzoek op antistoffen in de tankmelk (viermaal per jaar), onderzoek op antistoffen in serum in een steekproef uit vijf kalveren van 8 tot 12 maanden oud (tweemaal per jaar) of door het testen op dragerschap van alle nieuw geboren kalveren voort te zetten.

Bedrijven kunnen ook direct starten met één van de bewakingsprotocollen. Zolang geen antistoffen worden aangetoond in tankmelk of steekproef heeft het bedrijf de status 'BVD-onverdacht'. Na twee jaar gunstige resultaten in antistoffen onderzoek wordt het bedrijf beschouwd als 'BVD-vrij' en wordt de bewaking voortgezet. Indien tien maanden lang geen virus wordt aangetoond in de nieuwgeboren kalveren, krijgt het bedrijf eveneens de status 'BVD-onverdacht'. Na nogmaals twee jaar gunstige testresultaten krijgt het bedrijf de status 'BVD-vrij'.

Om insleep van virus via aanvoer van dieren te voorkomen, moeten dieren die worden aangevoerd van een niet-BVD-vrij bedrijf worden onderzocht op virus en – indien ouder dan één jaar - op aanwezigheid van antistoffen.

Laboratoriumdiagnostiek

Laboratoriumdiagnostiek heeft dus een centrale rol in het BVD-bestrijdingsprogramma. Op grond van de uitslagen van laboratoriumonderzoek op aanwezigheid van het virus of antilichamen tegen het virus worden statussen aan individuele dieren en aan individuele bedrijven toegekend. Met

laboratoriumdiagnostiek worden de BVD-dragers geïdentificeerd en wordt bepaald of een bedrijf al dan niet vrij is van BVDV.

De laboratoriumdiagnostiek dient aan te sluiten op het doel van het BVD-bestrijdingsprogramma en de juiste resultaten op te leveren die bijdragen aan het bereiken van dit doel. Dit betekent dat middels het laboratoriumonderzoek dragers van BVDV opgespoord dienen te kunnen worden, en middels laboratoriumonderzoek op antilichamen dient ook een besmetting met BVDV opgespoord te kunnen worden. Ook in transiënt geïnfecteerde dieren kan BVDV aangetoond worden door laboratoriumonderzoek. Dit is echter geen minimumvoorwaarde voor het bestrijdingsprogramma.

In dit protocol worden de eisen geformuleerd voor laboratoria die diagnostiek uitvoeren voor de bestrijding van BVD in Nederland. Ook wordt de wijze beschreven waarop laboratoria toegelaten kunnen worden als laboratorium voor uitvoering van diagnostiek in het kader van het BVD-bestrijdingsprogramma.

2. Lijst met toegelaten laboratoria voor BVD diagnostiek

- Om richting veehouders en dierenartsen transparant te maken welk laboratorium diagnostiek uitvoert die aansluit bij de doelstellingen van het BVD-bestrijdingsprogramma, zal een lijst worden opgesteld met laboratoria die zijn toegelaten en voor elke combinatie van testmethodiek en matrix waarvoor ieder laboratorium is toegelaten.
- ZuivelNL is eindverantwoordelijk voor vaststelling van de eisen waaraan een laboratorium moet voldoen voor de toelating van een test en voor het behoud van toelating.
- ZuivelNL is ook eindverantwoordelijk voor het toezicht op de toegelaten laboratoria. Het toezicht wordt namens ZuivelNL uitgevoerd door een expertlaboratorium te weten Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) in Lelystad.
- ZuivelNL stelt op advies van een WBVR de lijst op van met laboratoria die hebben aangetoond aan de gestelde voorwaarden te voldoen.

3. Aanvraag voor toelating

- Het laboratorium dient bij ZuivelNL een aanvraag in voor plaatsing op de lijst met toegelaten laboratoria voor BVD-diagnostiek. De aanvrager vult het formulier voor aanvraag van toelating in. In dit formulier wordt (o.a.) de aanvraag gespecificeerd naar agens detectie / antistof detectie, testmethode en matrix.
- Bij de aanvraag moeten de algemene gegevens en de contactgegevens van het laboratorium worden opgegeven.
- Tevens moet de aanvrager zich bereid verklaren de testuitslagen geautomatiseerd aan te leveren aan de door ZuivelNL beheerde databank, op door ZuivelNL te bepalen wijze en format.
- ZuivelNL controleert de aanvraag op compleetheid en legt een complete aanvraag voor aan WBVR.
- WBVR zal in overleg met de aanvrager de toetsingsprocedure van de aangevraagde testmethode(n) opstarten. Nadat WBVR de toetsing heeft afgerond, ontvangen ZuivelNL en de aanvrager een rapport met daarin het advies of wel/niet aangesloten wordt bij de voorwaarden van het bestrijdingsprogramma.

4. Overzicht van diagnostiek voor BVD bestrijding

Voor het laboratoriumonderzoek voor het BVD-bestrijdingsprogramma kunnen testmethodes toegepast worden op een aantal matrices volgens het schema in tabel 1.

Tabel 1. Overzicht van detectiemethoden en matrices voor diagnostiek voor het BVD-bestrijdingsprogramma

Detectie – Methode	Matrix	Eisen Diagnostische Sensitiviteit en Specificiteit (Dsp / Dse – in %)
Agens – PCR	Oorbiopt (individueel)	99,5 / 99,0 ²
	Oorbiopt (gepooled)	
	Bloed, serum (individueel)	
	Tankmelk	
Agens - ELISA	Oorbiopt (individueel)	99,5 / 99,0
	Bloed, serum (individueel) ³	
Antilichamen – ELISA ¹	Serum (individueel) ³	98,0 / 98,0
	Tankmelk	Afkapwaarde bij (ongeveer) 30% seropositieve dieren.

¹ De antilichaam ELISA moet een zogenaamde p80 (ook wel NS3) ELISA zijn.

² Betreft testspecificaties voor aantonen van dragerschap bij een individueel dier. Bij testen in gepoolde monsters is de maximale poolingsgraad van groot belang.

³ Het toezicht op deze beide ELISA's is onderdeel van de "Regeling erkenning veterinaire laboratoria" (REVL). In paragraaf 7.6 is beschreven hoe de resultaten van dit toezicht gebruikt worden voor het toezicht in het kader van het BVD bestrijdingsprogramma.

5. Voorwaarden voor de eerste toelating

Laboratoria dienen voor elke combinatie van detectie, testmethode en matrix te voldoen aan een aantal voorwaarden om toegelaten te worden als laboratorium voor diagnostiek in het kader van het BVD-bestrijdingsprogramma. Deze eisen zijn de volgende:

- Het laboratorium is conform ISO 17025 geaccrediteerd door de RvA voor de test/methode/matrix combinatie waarvoor de toelating is aangevraagd.
- De rondzendoefening wordt doorlopen met voldoende resultaat (zie paragraaf 7.2 voor details).
- De aanvangsaudit inclusief beoordeling van het validatierapport van het betreffende laboratorium worden door WBVR geschikt geacht om BVD-dragers op te sporen en een BVDV-besmetting te signaleren zoals wordt nagestreefd in het BVD-bestrijdingsprogramma.
- Testen worden alleen uitgevoerd met door WBVR laboratorium goedgekeurde batches van kits voor ELISA en PCR. Buitenlandse laboratoria kunnen op verzoek en na toestemming van ZuivelNL gebruik maken van resultaten van batchcontroles van het referentielaboratorium in hun eigen land (zie paragraaf 7.3).

Overige eisen:

- Bij meerdere vestigingen van een laboratorium vraagt iedere vestiging een eigen toelating aan.
- Twee laboratoria kunnen een gecombineerde toelating aanvragen voor uitvoering van een test. Gezamenlijk dienen ze een aanvraag in voor toelating, ze beschrijven daarbij hoe de verdeling is van de werkzaamheden. De laboratoria zijn gezamenlijk verantwoordelijk voor de correcte uitvoering van de test. Het toezicht wordt uitgevoerd daar waar de werkzaamheden plaatsvinden. Het laboratorium waar de test wordt uitgevoerd is in het bezit van een accreditatie conform ISO17025.
- Buitenlandse laboratoria worden op dezelfde wijze beoordeeld door WBVR als laboratoria gelegen op Nederlands grondgebied.

6. Voorlopige en definitieve toelating bij aanvang

Rekening houdend met de doorlooptijd van de procedure voor accreditatie door de RvA en omdat de initiële audit door WBVR ten minste gelijkwaardig is aan de RvA audit, wordt de toelating (zodanig) opgebouwd met eerst een voorlopige toelating en later de definitieve toelating.

Dit betekent het volgende:

- Een voorlopige toelating, welke maximaal 6 maanden geldig is, wordt gebaseerd op:

- Een beoordeling van het validatierapport.
- Het bewijs van (aanvraag van) de ISO17025 accreditatie.
- De resultaten van de initiële audit (zie 7.1).
- De resultaten van deelname aan een rondzendoefening.
- Een definitieve toelating wordt gebaseerd op het bewijs dat het lab ISO17025 geaccrediteerd is voor de betreffende test.

7. Voorwaarden voor behoud van de toelating

7.1 Deelname aan een audit door WBVR

- Voorafgaand aan de audit dient het laboratorium de analysevoorschriften op te sturen.
- Status ISO17025 en bijbehorende auditrapporten zijn beschikbaar voor inzage tijdens audit.
- Tijdens de audit zal onder andere gecontroleerd worden op:
 - Uitvoering van de test met goedgekeurde batches. Het laboratorium moet dit eisen van de leverancier van de kits.
 - Resultaten van ingangscntroles van in house testen.
 - Het laboratorium administratiesysteem: borgen van monster inname op het laboratorium en verwerking van het resultaat.
 - De werkprotocollen: inhoudelijk en ruwe data.
 - Bewaartermijn monsters minimaal één maand (om bij twijfel te kunnen hertesten door WBVR) en ruwe data minimaal 5 jaar.
 - De resultaten van de eerstelijnscontroles (controlekaarten). Zie ook 7.4.
 - Stabiliteit van diagnostische sensitiviteit en specificiteit van de test.
- WBVR auditeert het laboratorium jaarlijks. Na drie jaar goed resultaat over naar één audit per twee jaar. Wanneer een audit niet als voldoende is beoordeeld dan zal teruggedaan worden naar een jaarlijkse audit gedurende drie jaar.
- Eventueel kan een extra audit uitgevoerd worden of monsters hertest worden als daar aanleiding voor is. Dit is ter beoordeling van WBVR. Dat kan bij sterk afwijkende resultaten in rondzendoefeningen, afwijkingen in de sensitiviteit en specificiteit van de testen (trendanalyse).

7.2 Deelname aan rondzendoefeningen

Deelname aan twee rondzendoefeningen georganiseerd door WBVR per jaar; na drie jaar goed resultaat over naar één rondzendoefening per jaar.

Rondzendoefening agensdetectie (ELISA, PCR)

- Kritisch voor het bestrijdingsprogramma is dat BVD-dragers geïdentificeerd worden. Monsters van BVD-dragers in de rondzendoefening (kritische monsters) dienen allemaal aangetoond te worden. Er zal geen onderscheid gemaakt worden in eisen aan de antigeen ELISA en PCR in deze rondzendoefening.
- De verschillende matrices (oorbiopt, serum, bloed, tankmelk) zullen opgenomen worden in de rondzendoefening.
- Er zal getoetst worden op de analytische gevoeligheid van de test.
- Poolen van oorbiopten: uitgangspunt blijft dat PI dieren niet gemist mogen worden. Laboratoria moeten laten zien dat bij de verdunning die ze hanteren ze in staat zijn om één PI dier aan te tonen.
- Beoordelingscriteria monsters in de rondzendoefening agensdetectie:
 - Alle kritische monsters goed gescoord.
 - Als overige monsters gemist worden:
 - < 75% goed gescoord, score is onvoldoende. WBVR zal ZuivelNL adviseren om het laboratorium gelegenheid te geven om éénmaal een hertest aan te vragen. Wanneer de score opnieuw onvoldoende is dan zal het advies zijn om het laboratorium tijdelijk te schorsen totdat uit controle gebleken is dat het probleem is opgelost.
 - Alles tussen 75 en 100% juist aangetoond is ter beoordeling aan WBVR.

- WBVR adviseert ZuivelNL over de interpretatie van de beoordelingscriteria.

Rondzend oefening antilichaamdetectie (ELISA)

In het kader van het BVD-bestrijdingsprogramma dienen ook transiënte infecties aangetoond te worden. Dit gebeurt door sera van individuele dieren en de tankmelk te onderzoeken.

- Antilichamen serum (ELISA):
 - Er zal onder andere getoetst worden op de analytische gevoeligheid van de test.
- Antilichamen tankmelk (ELISA):
 - Bedrijven met meer dan 30% serologisch positieve runderen dienen met de (p80) ELISA op tankmelk opgespoord te kunnen worden (zie tabel 1). Hier zal op getoetst worden.
- Beoordelingscriteria: Voor zowel de rondzend oefening voor antilichaamdetectie in serum als in tankmelk dient de juistheid van de verkregen uitslagen 90% te zijn. WBVR adviseert ZuivelNL over de interpretatie van de beoordelingscriteria.

7.3 Uitvoeren van batchcontrole

- Testen alleen met door WBVR goedgekeurde batches kits inclusief commerciële PCRs.
- PCR en ELISA (antigeendetectie): negatieve dieren moeten negatief zijn en PI dieren positief.
- In house PCR testen: laboratorium voert de ingangscntrole uit. Voorafgaand aan gebruik wordt het ingangscntroleverslag voorgelegd aan WBVR ter goedkeuring.
- Buitenlandse laboratoria kunnen gebruik maken van resultaten van batchcontroles van het referentielaboratorium in hun eigen land (zie ook paragraaf 5). Laboratoria in het buitenland die hiervan gebruik willen maken dienen daartoe een verzoek in bij ZuivelNL en ZuivelNL. WBVR beoordeelt de opzet van de betreffende batchcontrole en adviseert ZuivelNL.

7.4 Uitvoeren van een controle inzake de nauwkeurigheid van de testmethode en de betrouwbaarheid van de testuitslagen (eerstelijnscontroles).

- Het is mogelijk dat het laboratorium zelf zorgt voor eerstelijnscontrolemonsters, deze monsters kunnen ook aangeschaft worden bij WBVR.
- Controle op de controlekaarten (kitcontroles en eerstelijnscontroles) gebeurt door deze op te sturen naar WBVR.

7.5 Verandering van test of testmethode

- Bij verandering van test of testmethode door bijv. over te stappen van een test van de ene fabrikant naar een test van een andere fabrikant dient WBVR goedkeuring te geven voor gebruik van de nieuwe test. WBVR zal o.a. voorschriften en validatie van de andere test of testmethode toetsen.
- Overstappen naar een eigen test dient beschouwd te worden als overstappen naar een andere fabrikant.
- Ook relevante wijzigingen in de testmethode bijv. verandering van nucleïnezuur-extractie dient gevalideerd te worden door het laboratorium en goedgekeurd te worden door WBVR.

7.6 De REVL en dit protocol

- In de "Regeling erkenning veterinaire laboratoria" (REVL) is het toezicht op de kwaliteit van de uitvoering van de ELISA's voor BVD antilichaam en de BVD antigeendetectie in serum van individuele dieren geregeld.
- De instrumenten voor het toezicht op deze beide testen in het kader van de REVL zijn vrijwel hetzelfde als voor het BVD bestrijdingsprogramma, uitgezonderd een audit van de laboratoria. Een audit van de laboratoria is onderdeel in het BVD bestrijdingsprogramma, dat is niet het geval in de REVL. Voor de overige instrumenten voor het toezicht is er sprake van overlap in het toezicht tussen de REVL en het BVD bestrijdingsprogramma.
- Het toezicht in het kader van de REVL wordt als leidend gezien en die onderdelen die al voor de REVL worden gedaan hoeven dus niet uitgevoerd te worden voor het BVD bestrijdingsprogramma.
- De laboratoria dienen bewijzen te overleggen van een erkenning in het kader van de REVL met de resultaten van de rondzendingen die in het kader van de REVL worden uitgevoerd. Tijdens de initiële

en jaarlijkse audits zal hierop gecontroleerd worden door WBVR. WBVR zal ZuivelNL in de rapportages over de resultaten van de audits hiervan op de hoogte stellen. Eventuele wijzigingen in de erkenningen zullen door het laboratorium per ommegaande aan WBVR worden gemeld.

- Voor buitenlandse laboratoria is de aanpak hetzelfde als voor de Nederlandse laboratoria. Buitenlandse laboratoria kunnen ook vrijstelling krijgen als ze erkend zijn in hun eigen land. Specifieke invulling zal, net als de Nederlandse laboratoria plaatsvinden tijdens de initiële en jaarlijkse audits.

8. Structuur met rapportagepaden en verantwoordelijkheden op het toezicht

- WBVR adviseert over eisen en toelating, Zuivel NL stelt de eisen vast en laat laboratoria toe. ZuivelNL houdt toezicht op WBVR.
- Relevante informatie over de toelating van laboratoria zoals deze procedure en de lijst met toegelaten laboratoria zal op de website van ZuivelNL geplaatst worden.
- Klachten ten aanzien van procesmatige zoals protocol en inhoudelijke aspecten zoals toetsing en evaluatie kunnen enkel bij ZuivelNL worden ingediend. ZuivelNL is volledig zelfstandig bevoegd over eventuele klachten te oordelen.
- Naast de jaarlijkse evaluatie is ZuivelNL bij gerede twijfel over de werkwijze van een laboratorium gerechtigd een tussentijdse evaluatie door WBVR uit te laten voeren op kosten van het betreffende laboratorium.
- Een geschorst laboratorium kan opnieuw toegelaten worden na een herbeoordeling door WBVR. Op basis van de resultaten hiervan zal WBVR een advies uitbrengen aan ZuivelNL over toelating.

9. Kosten en facturatie

WBVR stelt een lijst op met de kosten die verbonden zijn aan het toezicht. De kosten voor toetsing en de opstelling van een toetsingsrapport zijn voor de aanvrager, ongeacht of dit leidt tot toelating. Tevens zijn bij deze kosten inbegrepen de kosten van het opzetten van rondzendoefeningen voor de deelnemende laboratoria. De kosten zullen verdisconteerd worden in de kosten voor de rondzendoefening gedurende de looptijd van het contract tussen ZuivelNL en WBVR. WBVR stuurt rechtstreeks een rekening naar het betreffende aanvragende laboratorium. Middels ondertekening van het aanvraagformulier voor toelating stemt de aanvrager in met betaling van de kosten die verbonden zijn aan de toetsing.