



Briefrapport 330331002/2008

M. Nauta

# Campylobacter-besmetting van kippenvleesproducten in 2007

een vergelijking van vier onderzoeken

**RIVM Briefrapport nr 330331002/2008**

*Campylobacter*-besmetting van kippenvleesproducten in  
2007: een vergelijking van vier onderzoeken

**30 september 2008**

**auteur**

Maarten Nauta

**LZO**

**CIb**

**maarten.nauta@rivm.nl**

**opgesteld voor de directie VGP/VWS (V/330331/01/AA)**

**contactpersoon VGP:**

*ir. Inge Stoelhorst*

*Ministerie van VWS*

*Directie Voeding, Gezondheidsbescherming en Preventie*

*Postbus 20350*

*2500 EJ Den Haag*

**In het kort:**

Een vergelijking van vier onafhankelijke onderzoeken uit 2007 naar de besmetting van kippenvleesproducten met *Campylobacter* laat zien dat het percentage producten meer dan 10 kve/g in alle gevallen zoals verwacht ongeveer 6% van de producten is.

## Samenvatting

In 2007 is de *Campylobacter*besmetting van kippenvleesproducten door vier verschillende organisaties onderzocht. In dit briefrapport worden deze onderzoeken naast elkaar gezet en vergeleken.

De onderzoeken verschillen in onderzocht type monsters, tijdstip van bemonstering, onderzoeksmethoden en toegepaste statistisch-analytische methoden. Naast de gerapporteerde gegevens zijn ook enkele aanvullende statistische analyses uitgevoerd. Er is gevonden dat de schattingen van prevalentie en gemiddelde concentraties behoorlijk uiteenlopen, maar dat de percentages producten met meer dan 10 cfu/g product dicht bij elkaar liggen, op ongeveer 6%. Dat is van belang omdat het aan *Campylobacter* gerelateerde humane risico sterk toeneemt met de concentratie op het product. Het genoemde percentage producten is daarom een betere maat voor het humane risico dan het percentage positief geteste producten of de gemiddelde concentratie.

Interessant genoeg ligt het percentage van 6% vlakbij het getal dat voorspeld werd in het CARMA model voor kipfilet na de uitsnijderij. Er lijkt geen ruimte voor de conclusie dat de situatie in 2007 anders is dan zoals die in de jaren daarvoor tijdens het CARMA project is ingeschat.

Het verdient aanbeveling bij rapportage van onderzoek naar de besmetting van levensmiddelen met pathogenen aandacht te geven aan de impact van karakteristieken van de gebruikte microbiologische tests (met name de "detectielimiet") op de gerapporteerde prevalentie en concentraties. De hier beschreven statistische methoden laten zien dat een nieuwe analyse van de data waarin dergelijke karakteristieken worden meegenomen heel andere interpretaties van de resultaten kan opleveren.

Het meest opvallend is dit verschijnsel bij de prevalentie: het gerapporteerde percentage positieve monsters kan veel lager uitvallen dan het percentage daadwerkelijk besmette monsters als de detectielimiet hoog is en de sensitiviteit van de test laag. Dit levert onvergelykbare getallen op en kan suggereren dat *Campylobacter* minder vaak voorkomt dan in werkelijkheid het geval is.

Vanuit het oogpunt van risicobeheersing is het gunstig dat de producten met een hogere concentratie, die de belangrijkste bijdrage leveren aan het humane risico, relatief gemakkelijk te meten zijn. Het verdient aanbeveling de percentages hoogbesmette producten in rapportages van onderzoek naar het vóórkomen van *Campylobacter* specifiek te benoemen.



## Inleiding

In 2007 is door verschillende organisaties onderzoek uitgevoerd naar de besmetting van kippenvleesproducten met *Campylobacter*. Deze onderzoeken zijn van belang om inzicht te krijgen in de ontwikkelingen in de *Campylobacter*-problematiek in Nederland. De uitgevoerde onderzoeken worden hier op een rijtje gezet en nader geanalyseerd, om een beeld te krijgen van overeenkomsten en verschillen en daarmee inzicht te krijgen in de stand van zaken van de besmetting van de kipproducten in 2007.

De analyse heeft als specifiek doel de onderzoeken te vergelijken met betrekking tot het aan de kipproducten gekoppelde risico voor de consument. Risicoschattingen van *Campylobacter* op kipproducten hebben laten zien dat deze risico's het grootst zijn als de concentratie van *Campylobacter* op het (verse) product hoog is (Rosenquist et al. 2003, Nauta et al. 2007, Brynstad et al. in press, Nauta et al. 2008b). Daarom is er in deze analyse voor gekozen het risico te karakteriseren door de prevalentie van besmette producten, de gemiddelde concentratie op besmette producten en de percentages producten met meer dan 10 cfu/g en meer dan 100 cfu/g<sup>1</sup>. Omdat de dosis-respons relatie onzeker is, het risico van besmette producten geleidelijk en zonder drempelwaarde toeneemt bij toenemende concentraties, en omdat dit risico afhangt van de door de consument betrachtte hygiëne en de hoeveelheid geconsumeerd vlees, is er vooralsnog geen norm aan te geven voor 'veilig' en 'niet veilig'.

Bij de vergelijking van de onderzoeken is gekeken naar de gerapporteerde bepalingen en de door de onderzoekers getrokken conclusies. Daarnaast is, zo mogelijk, een aanvullende data-analyse uitgevoerd. Dit is enerzijds gebeurd om de onderzoeken beter te kunnen vergelijken in termen van waargenomen prevalentie en concentraties, en anderzijds omdat de gerapporteerde gegevens soms meer informatie bevatten dan er door de uitvoerende onderzoekers is uitgehaald<sup>2</sup>. De concentraties zijn in alle gevallen uitgedrukt in cfu/g product. Daarbij is ervan uitgegaan dat elke filet 160 g weegt (Nauta et al., 2005) en dat bij het gebruik van een spoelmethode om *Campylobacters* van het product te spoelen, alle *Campylobacters* in de spoelvoeistof terecht komen.

De resultaten van de analyses zijn aan het eind van dit briefrapport samengevat in Tabel 6. Hieronder wordt in het kort een beschrijving gegeven van de vier geanalyseerde onderzoeken van ASG/RIVM, Pluimveesector, Consumentenbond en VWA. Tenslotte wordt, ter vergelijking, gerefereerd aan het CARMA project (Havelaar et al 2007). Uit het voor dit project ontwikkelde model kunnen

---

<sup>1</sup> cfu = colony forming units (kolonievormende eenheden)

<sup>2</sup> Uiteraard zijn eventuele onjuiste interpretaties van de gegevens in deze aanvullende analyses niet toe te rekenen aan de onderzoekers die de gegevens daarvoor verstrekt hebben.

onafhankelijk schattingen gedaan worden voor dezelfde parameters, die zijn vergeleken met de resultaten van de onderzoeken uit 2007.

## 1. Onderzoeksinstituten ASG/RIVM

(bron: Nauta et al 2008a)

### *Korte omschrijving van het onderzoek:*

Uitgevoerd in opdracht van VWS/VGP, VWA en LNV.

Doel van het onderzoek was een beschrijving stand van zaken, vergelijking van concentraties in twee typen mest (containermest en blinde-darmmest) en op het eindproduct (filet), en vergelijking van verschillende microbiologische methoden. Van 62 vleeskuikenkoppels zijn in de periode september 2007 - november 2007 (in principe) vijf filets geanalyseerd, in totaal 308. Dat is gebeurd met verschillende methoden: d.m.v. ophoping (ASG), een kwantitatieve bepaling (ASG) en d.m.v. kwantitatieve PCR (TNO).

De kwantitatieve PCR is inmiddels aan nader onderzoek onderworpen en verbeterd (J, van de Vossen (TNO), pers. comm.). De resultaten worden hier daarom niet meegenomen.

### *Methode*

Elke filet werd ingewogen en met een gelijke hoeveelheid BPW gedurende 5 minuten gespoeld. Uit de spoelvloeistof werd 1 ml op een CCDA plaat gespateld. Uit de spoelvloeistof werd tevens 1 ml opgehoopt in Preston en vervolgens uitgeplaat. Het resultaat werd genoteerd als het werkelijk getelde aantal cfu, dan wel na ophopen positief (<10) of negatief (0). Het werkelijk getelde aantal cfu werd aangegeven, hoewel aantallen onder de 10 niet erg betrouwbaar zijn.

Bij de analyse van de data zijn de volgende waarden berekend:

(1) prevalenties:

- de prevalentie op het nivo van de individuele monsters.
- de prevalentie op koppelnivo; als er minstens een monster in een koppel positief is, is het koppel positief.

(2) concentraties:

Voor het berekenen van het gemiddelde en de standaard deviatie van de concentratie per meetmoment is gebruik gemaakt van een multilevel model dat 'censored data' meeneemt. Dat laatste wil zeggen dat waarnemingen waarbij geen telling kon worden uitgevoerd, maar de ophoping wel positief was, worden meegenomen in de kwantitatieve data-analyse. Dat kan door aan te nemen dat de log van de concentraties binnen een koppel  $i$  normaal verdeeld zijn met een gemiddelde  $\mu_i$  en één vaste binnen-koppel standaard deviatie ( $\sigma_{i.binnen}$ ) voor alle koppels. Het overall

gemiddelde *mu.tot* is het gemiddelde van de normale verdeling die fit aan deze *mu.i*'s met tussen-koppel standaard deviatie (*sigma.tussen*).

*Tabel 1. Resultaten van het onderzoek van ASG en RIVM, na data analyse.*

	filet
<i>prevalentie monsters</i>	30.0%
<i>koppelprevalentie</i>	42.0%
<i>mu.tot (log cfu/g)</i>	0.27
<i>sigma.tussen koppels</i>	0.77
<i>sigma.binnen koppels</i>	0.5

### *Resultaat*

De resultaten van een analyse van de gecombineerde gegevens van tellen en ophopen, uitgevoerd door ASG, zijn samengevat in tabel 1.

Er is ook gekeken naar het percentage filets dat daadwerkelijk en naar verwachting een hogere concentratie heeft dan 10 of 100 cfu per gram. Van de 308 monsters blijken er 19 (6.2%) resp. 4 (1.3%) boven deze waarden uit te komen. Worden de gefitte verdelingen als uitgangspunt genomen, met een prevalentie van besmette filets van 30%, dan is dat resp. 6.4% en 0.9%.

## **2. Pluimveesector**

(bron: pers. informatie dr. Peter Vesseur, Nepluvi, 3 april en 21 augustus 2008)

### *Korte omschrijving van het onderzoek:*

Dit onderzoek is uitgevoerd door de pluimveevleesproducenten, gecoördineerd door Nepluvi, ter voorbereiding op de later uit te voeren pilot 2008. Doel was een vooronderzoek uit te voeren naar te gebruiken methodes, niet zozeer om een inventarisatie te doen van de mate van besmetting van het vlees. Er is van tevoren geselecteerd op koppels met een hogere kans op besmetting.

Voor de vergelijking van resultaten van onderzoek naar de besmetting van kipproducten zijn met name de resultaten van experiment 5 uit het onderzoeksprogramma van belang.

### *Resultaten:*

De resultaten zijn weergegeven in Tabel 2.

Er zijn van 10 koppels 10 monsters per koppel onderzocht op verschillende punten in de keten. Er zijn verschillende eindproducten bekeken, direct na het uitsnijden, bij verschillende methoden van uitsnijden.



Ter vergelijking met het overige onderzoek zijn de resultaten van de fileerlijn het belangrijkste. Aan de fileerlijn zijn van de 100 monsters er 23 positief bevonden (23%). Bij slechts één koppel leverde de kwantitatieve methode een resultaat op, gemiddeld 1 log cfu/g.

Handfileren, geeft minder positieven dan de fileerlijn en ook verpakken onder gas of "stretch" geeft in dit onderzoek minder positieven.

Bij vleugels worden hogere waarden gevonden: 34% positieven gevonden, en telbare aantallen tot gemiddeld 1.8 log cfu/g per koppel.

Ook dit onderzoek is in het najaar van 2007 uitgevoerd.

Uit deze gegevens valt af te leiden dat 23% van de filet-monsters besmet is, en dat gemiddelde 1 log cfu/g wordt gevonden in de telbare monsters. Uit de gemiddelden is niet af te leiden welk percentage van de producten meer dan 10 en 100 cfu/g bevatten. De ruwe data van koppel K1 laten zien dat vier van de tien monsters hoger uitkomen dan 1 log cfu/g en geen hoger dan 2 log cfu/g. Daaruit valt, met enige onzekerheid, te schatten dat 4% hoger uitkomt dan 1 log cfu/g en 0% hoger dan 2 log cfu per gram.

Tabel 2. Gegevens uit de prepilot van de sector. KM = container mest, NVP = nekvel plukker, NVE = nekvel evisceratie, NVL = nekvel koeling



## Experiment 5



### Samenvatting voorlopige resultaten experiment 5:

Koppel	Status	K1		K2		K3		K4		K5		K6		K7		K8		K9		K10	
		kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+	kve/gr	C+
	KM	6,7	10	4,1	8	5,1	10	4,8	10	6,4	10	6,0	10	3,3	1	5,9	10	3,0	5	3,0	2
	NVP	2,0	7	<1	0	1,8	6	2,5	10	2,4	10	2,2	10	<1	0	2,0	6	<1	0	<1	0
	NVE	2,4	10	<1	0	1,3	1	1,7	8	2,5	10	1,8	5	<1	0	1,8	4	<1	0	<1	0
	NVK	2,4	6	<1	0	1,5	2	1,7	9	2,7	10	2,0	8	<1	0	1,4	2	<1	0	<1	0
	Borstvel	2,3	9	<1	0	1,0	1	1,1	2	1,6	8	1,2	7	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	Vleugel	1,8	8	<1	0	<1	1	1,3	5	1,8	9	1,1	7	<1	0	<1	4	<1	0	<1	0
	VleugelStretch	1,1	7	<1	0	<1	0	<1	0	<1	2	<1	1	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	VleugelGas	<1	3	<1	0	<1	0	<1	0	<1	1	n.a.		<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	Handfileren	<1	3	<1	0	<1	0	<1	0	<1	3	<1	1	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	HandfilerenStretch	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0	<1	2	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	HandfilerenGas	<1	2	<1	0	<1	0	<1	0	<1	2	n.a.		<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	Fileerlijn	1,0	9	<1	0	<1	3	<1	3	<1	3	<1	4	<1	0	<1	0	<1	1	<1	0
	FileerlijnStretch	n.a.		<1	0	<1	2	<1	0	<1	2	<1	1	<1	0	<1	0	<1	0	<1	0
	FileerlijnGas	n.a.		<1	0	<1	0	<1	0	<1	0	n.a.		<1	0	<1	0	<1	0	<1	0

### 3. Consumentenbond

(bron: Consumentenbond, afdeling Onderzoek, 2008, projectnr. PS07002.)

#### *Korte omschrijving van het onderzoek:*

In totaal 240 winkelmonsters (filets) van een aantal winkels/supermarkten zijn onderzocht. Het ging om 12 merken, 20 monsters per merk. De periode van monsternamen was 10 september - 16 november 2007.

#### *Methode*

Dezelfde spoelmethode is gebruikt als bij het ASG/RIVM onderzoek. Er is zowel een kwalitatieve als een kwantitatieve methode gebruikt. Een filet werd ingewogen en met een gelijke hoeveelheid PFZ gedurende 5 minuten gespoeld op een mechanische schudder op 200 rpm (analoog aan ASG en VWA). Vanuit deze spoelvloeistof werd een telling ingezet door 2 x 0,1 ml vloeistof uit te spatelen op CCDA platen (ISO 10272-2). Ophoping in Bolton (4 h bij 37C, gevolgd door 44 h bij 41,5C, daarna afgestreaken op alleen CCDA, ISO 10272-1) werd uitgevoerd met 25 ml van deze spoelvloeistof. Bij de kwantitatieve methode is de verwachte detectiegrens 10 per gram, bij de kwalitatieve methode 1 per 25 ml spoelvloeistof, wat neerkomt op 1 per 25 g.

#### *Resultaat*

De Consumentenbond vond dat er significante verschillen waren tussen de twaalf onderzochte merken in de test. In de kwalitatieve test verschilden de merken van 5% tot 80% prevalentie op filet. De resultaten zijn weer te geven als in onderstaande Tabel 3

*Tabel 3. Testuitslagen van de twee uitgevoerde tests van de Consumentenbond. Horizontaal de uitslag van de kwalitatieve test (- = negatief, + = positief). Verticaal de uitslagen van de kwantitatieve test (<10 = niets aangetroffen, 10, 20, 40 is geschatte cfu/g). Verder zijn de totalen weergegeven.*

		kwalitatief		
		-	+	
kwantitatief	<10	153	71	224
	10	5	8	13
	20	1	1	2
	40	0	1	1
		159	81	240

Met de kwalitatieve methode werd *Campylobacter* aangetroffen in 34% van de monsters. Als de monsters waarin een telbaar resultaat werd verkregen bij een negatieve kwalitatieve test ook meegenomen worden is dat in 36% van de monsters.

De gecombineerde testuitslagen zijn ook te gebruiken om een alternatieve schatting te maken van de prevalentie. De methode staat beschreven in Appendix 1. Daarbij wordt ervan uitgegaan dat de sensitiviteiten van de beide bepalingen  $< 100\%$  (kunnen) zijn, dat de specificiteit van de tests  $100\%$  is en dat de beide testen onafhankelijk van elkaar zijn. De sensitiviteit is dan breed gedefinieerd als “de kans op een positief testresultaat, gegeven dat er op het monster *Campylobacter* voorkomt.” Dat is een wat andere definitie dan gewoonlijk, omdat in dit geval de sensitiviteit afhangt van de concentraties *Campylobacter* op het vlees. De prevalentie is in dit geval het geschatte percentage producten waarop *Campylobacter* voorkomt, inclusief concentraties onder de detectielimiet. Deze laatste prevalentieschatting is in dit geval  $54\%$ .

De testovereenkomst van de diagnostische tests (op aan-/afwezigheid) kan worden uitgedrukt in een kappa-waarde (Noordhuizen et al. 1997). In dit geval is deze  $\kappa = 0.1$ . Dat is te laag om te kunnen spreken van overeenkomende tests. Voor een deel is dit te verklaren door de verschillen in verwachte detectiegrens, maar aan de andere kant doordat zes monsters positief zijn in de kwantitatieve test en negatief in de kwalitatieve test.

Ook kan een “Maximum Likelihood Estimation” (MLE) methode gebruikt worden om de data te fitten aan een model dat ervan uitgaat dat de concentraties op de besmette filets lognormaal verdeeld zijn, waarbij de  $\log C$  (het logaritme van de concentraties) normaal verdeeld is met gemiddelde  $\mu$  en standaard deviatie  $\sigma$  (zie Appendix). Daarbij is de prevalentie  $p$  het percentage van de filets dat besmet is met *Campylobacter*. Bij het uitvoeren van de MLE kan deze  $p$  worden vastgezet (b.v. op een eerder gevonden waarde), maar ook rechtstreeks geschat worden uit de data.

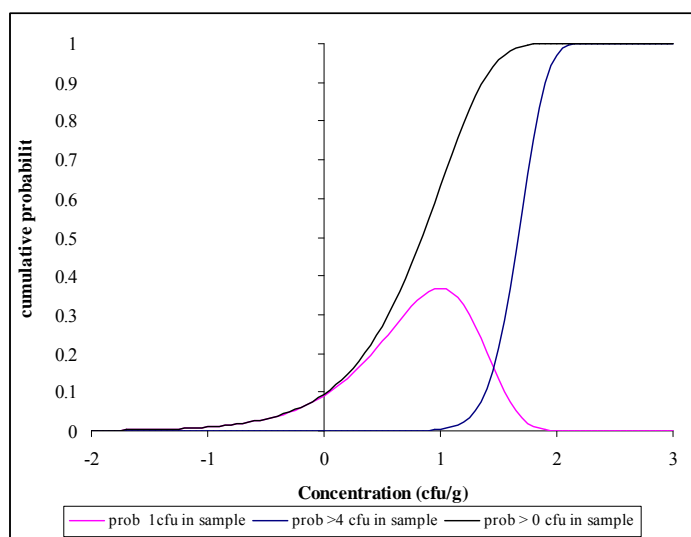
De MLE schatting van de best passende verdeling is  $p = 79\%$ ;  $\mu = -0.46$  en  $\sigma = 0.66$ . Merk op dat in dit geval weliswaar de prevalentie  $p$  hoog is, maar dat ook  $82\%$  van de besmette monsters een concentratie heeft  $< 1/g$ . De verwachte gemiddelde concentratie van positieve monsters bij gebruikmaking van de gebruikte kwantitatieve methode (als je oneindig veel monsters zou nemen en de best passende verdeling is correct) is  $\log C = 0.36$  cfu/g

Deze MLE schatting is nogal onzeker, het betrouwbaarheidsinterval rondom de parameterschattingen is groot, maar vrij lastig te kwantificeren. Daarom dienen de getallen vooral ter illustratie van de bevinding dat er veel producten besmet zouden kunnen zijn met een lage concentratie *Campylobacter*. Deze worden in microbiologische tests niet snel gevonden.

Als deze fit is uitgevoerd, kun je weer de percentages filets met naar verwachting meer dan  $10$  cfu/g en  $100$  cfu/g inschatten. Daarbij speelt de aanname van een

lognormale verdeling van concentraties dan wel een belangrijke rol, maar deze aanname is niet ongebruikelijk.

Bij de MLE schatting heeft 1% van de monsters een concentratie  $> 10$  cfu/g en 0.01% een concentratie  $> 100$  cfu/g. Dat is opmerkelijk, omdat  $16/240 = 6.7\%$  van de monsters volgens de kwantitatieve bepaling op  $> 10$  cfu/g uitkomt, en de MLE resultaten op deze bevinding zijn gebaseerd. De reden hiervan is de (standaard) statistische aanname dat de resultaten van een kwantitatieve bepaling het gevolg zijn van een Poissonproces. Hierbij is de kans op het aantreffen van 1 cfu ook vrij groot is als de concentratie maal het testvolume (iets) lager is dan die 1 cfu. Dat is hier het geval. Daarnaast zijn er nooit meer dan 4 cfu gevonden zodat de best passende standaard deviatie laag moet zijn. Figuur 1 kan helpen hiervoor het juiste inzicht te verkrijgen.



*Figuur 1. Het aan de data gefitte lognormale model voorspelt een lager % monsters met meer dan 10 cfu/g dan de data alleen suggereren. Dat wordt veroorzaakt door de eigenschappen van het onderliggende Poisson proces. Deze grafiek geeft aan wat de kans is op het vinden van  $> 0$  cfu, 1 cfu en  $> 4$  cfu in een monster van 0.1 g, afhankelijk van de concentratie (horizontale as, log cfu/g) Ook bij een concentratie  $< 10$  cfu/g is er een behoorlijk grote kans op een positief resultaat. Als de concentratie  $> 10$  cfu/g is, verwacht je regelmatig meer dan 4 cfu in een monster van 0.1g, en dat is maar 1x gevonden. Daarom voorspelt de gefitte verdeling minder vaak  $> 10$  cfu/g dan de data suggereren.*

#### 4. Onderzoek VWA

(bron: pers. informatie ing. B. Wit, VWA, Regio Oost)

*Korte omschrijving van het onderzoek:*

Ook de VWA heeft in de reguliere monitoring van kipproducten m.b.t.

*Campylobacter*-onderzoek zowel kwalitatieve als kwantitatieve methoden gebruikt

(B. Wit, pers. comm.) Het gaat hier niet alleen om kipfilet, maar om verschillende verse, onbehandelde kip-producten.

#### *Methode*

De gebruikte methoden zijn hetzelfde als bij het Consumentenbond-onderzoek, met zowel een kwantitatieve als een kwalitatieve methode. Verschil is dat bij de kwantitatieve methode niet een filet, maar een hoeveelheid monstermateriaal van 250 gram met een gelijke gewichtshoeveelheid BPW gespoeld wordt ; 0.1 ml van de primaire spoelvloeistof is uitgespateld op een CCDA-plaat.

#### *Resultaten*

Op 1349 monsters is de kwantitatieve en/of de kwalitatieve test uitgevoerd, met 216 (16%) een positief resultaat voor minstens een van beide methoden over het hele jaar heen.

De kwantitatieve methode geeft de volgende resultaten (tabel 4.)

*Tabel 4. Resultaten kipmonitoring Campylobacter 2007. In kolommen de aantallen monsters gevonden in klassen met aantallen cfu/g.*

Kipdeel	aantal	< 10	≥ 10 < 50	≥ 50 < 100	≥ 100 < 500	≥ 500 < 1000	≥ 1000 < 5000
borst (-deel)	479	457	17	2	2		1
hele kip	141	128	8	3	2		
overige delen	50	45	4	1			
poot (-deel)	555	528	19	1	6		1
vleugel	75	66	4	1	3		1
totaal	1300	1224	52	8	13	0	3

Rechtstreeks schatten van de gemiddelde (log) concentratie in 771 positieve monsters uit alleen de kwantitatieve analyses geeft een waarde van 1.8 log cfu/g. Hiervoor is aangenomen dat de gevonden concentratie voor elke klasse de log van de gemiddelde concentratie in die klasse is.

Deze resultaten vertellen dat op alle kiplen in 5.8% van de monsters meer dan 10 cfu/g is gevonden en op 1.2% meer dan 100 cfu/g

Als de kwantitatieve en kwalitatieve methode vergeleken worden, voor alle monsters die met beide methoden onderzocht zijn, worden de resultaten verkregen die zijn weergegeven in tabel 5. Hierin staan alleen de monsters vermeld die met beide methoden zijn geanalyseerd, 1246 van de 1300 monsters.

Tabel 5. Testuitslagen van de twee uitgevoerde tests van de VWA. Horizontaal de uitslag van de kwalitatieve test (negatief, positief). Verticaal de uitslagen van de kwantitatieve test ( $<10$  = niets aangetroffen, daarna klassen met concentraties in cfu/g). Verder zijn de totalen weergegeven.

kwantitatief	kwalitatief		aantal
	negatief	positief	
$< 10$	1039	133	1172
$\geq 10 < 50$	45	5	50
$\geq 50 < 100$	5	3	8
$\geq 100 < 500$	11	2	13
$\geq 500 < 1000$			0
$\geq 1000 < 5000$	3		3
totaal	1103	143	1246

Uit deze tabel is de testovereenkomst m.b.t. aan- en afwezigheid vast te stellen. De kappa- waarde  $\kappa = 0.02$ . Dat is erg laag en duidt er op dat de tests niet overeenkomen. Ook is de prevalentie in te schatten, uitgaande van onafhankelijke tests en testspecificiteit van 100%, zoals beschreven bij de Consumentenbond-gegevens en inde Appendix. De geschatte prevalentie van producten waarop *Campylobacter* zou kunnen worden gevonden is dan 85%.

Als je alle 1300 kwantitatieve analyses gebruikt om een verdeling te fitten door de gevonden concentraties, is de MLE  $p = 13.6\%$ ,  $\mu = -0.56$ ,  $\sigma = 1.06$ .

Het percentage producten  $> 10$  cfu/g is geschat op 4.5%, die met  $> 100$  cfu/g op 1.1 %. De verwachte gemiddelde concentratie van positieve monsters bij de gebruikte kwantitatieve methode (als je oneindig veel monsters zou nemen en de best passende verdeling is correct) is  $\log C = 1.42$ .

Als je alleen de 479 kwantitatieve analyses van de borst(-delen) gebruikt om een verdeling te fitten door de gevonden concentraties, is de MLE  $p = 72.2\%$ ,  $\mu = -1.98$ ,  $\sigma = 1.7$ . Het percentage producten  $> 10$  cfu/g is geschat op 2.7%, die met  $> 100$  cfu/g op 0.65 %. Bij deze normale verdeling is op veel producten de concentratie zo laag, dat er in de praktijk geen *Campylobacters* op voorkomen: 91.5% van de monsters heeft een concentratie  $< 1$  cfu/g en 64% een concentratie  $< 0.01$  cfu/g.

De verwachte gemiddelde concentratie van positieve monsters bij de gebruikte kwantitatieve methode (als je oneindig veel monsters zou nemen en de best passende verdeling is correct) is  $\log C = 1.11$ .

## 5. CARMA

In de kwantitatieve risicoschatting voor *Campylobacter* in vleeskuikens, uitgevoerd in het CARMA project (Nauta et al 2005), is ook een inschatting gemaakt voor de concentraties *Campylobacter* op kipfilets na de uitsnijderij en bij aankoop door de

consument. Op grond van beschikbare gegevens is hier aangenomen dat er afsterving van *Campylobacter* plaatsvindt tijdens gekoeld en verpakt bewaren.

De onafhankelijke schattingen op basis van deze modelstudie geven, op basis van 100.000 iteraties van het CARMA model, na de uitsnijderij een prevalentie van 43 %, een gemiddelde concentratie van  $-0.16 \log \text{ cfu/g}$  en 6.2 % van de monsters met  $> 10 \text{ cfu/g}$  en 1.3 % meer dan 100 cfu/g na de uitsnijderij, en een prevalentie van 36 %, een gemiddelde concentratie van  $-0.77$  en 1.6 % van de monsters met  $> 10 \text{ cfu/g}$  en 0.3 % meer dan 100 cfu/g na aankoop. Merk op dat in de CARMA rapportage sprake is van cfu/ filet, niet van cfu/g. Deze waarden zijn hier omgerekend naar cfu/g, uitgaande van een filetgewicht van 160 g, om de model-resultaten te kunnen vergelijken met de observationele data.

### Conclusies en Discussie

Tabel 6 geeft een samenvatting van de resultaten van de vergelijking van de vier onderzoeken uit 2007, en CARMA. Waar de gevonden prevalentieschattingen en de gemiddelden van de (log van de) concentraties behoorlijk van elkaar verschillen, zijn de overeenkomsten van de percentages producten met meer dan 10 en 100 cfu/g opvallend. Het percentage  $> 10 \text{ cfu/g}$  valt in veel gevallen uit in de buurt van 6%. (Het percentage  $> 100 \text{ cfu/g}$  is onnauwkeuriger, omdat er meer monsters nodig zijn om dit percentage nauwkeurig in te schatten.) Dit is een interessant resultaat, omdat het humane risico vooral bepaald wordt door producten met een hoge(re) concentratie *Campylobacter*.

De gevonden verschillen in prevalentie en gemiddelde concentratie zijn (deels) te verklaren door een verschil in methoden. Als de prevalentieschatting direct uit data is afgeleid, is deze, naast de mate van besmetting van de producten en de sensitiviteit van de test, sterk afhankelijk van de detectielimiet. Wordt in de data-analyse rekening gehouden met deze detectielimiet, en worden verwachte besmettingen onder de detectielimiet meegenomen, dan valt de prevalentieschatting hoger uit. Ook de precieze definitie van "prevalentie" speelt hier een rol (zie ook de Appendix). Evenzo kan de schatting van de gemiddelde concentratie in besmette producten lager uitvallen als concentraties onder de detectielimiet worden meegenomen.

Uiteraard gaat een statistische analyse waarbij waarden onder de detectielimiet worden meegenomen gepaard met de nodige aannames, bijvoorbeeld over de vorm van de verdeling van de variatie in concentraties (lognormaal). Dat betekent dat de resultaten van een dergelijk analyse nogal onzeker kunnen zijn. Belangrijker dan het specifieke getal is echter de constatering dat de prevalentie behoorlijk hoger kan zijn dan op basis van de waarnemingen alleen. Dit is ook het geval als waarnemingen van twee testmethoden (kwalitatief en kwantitatief) vergeleken worden. De constatering dat, bij het VWA en Consumentenbond onderzoek, de kwalitatieve en kwantitatieve

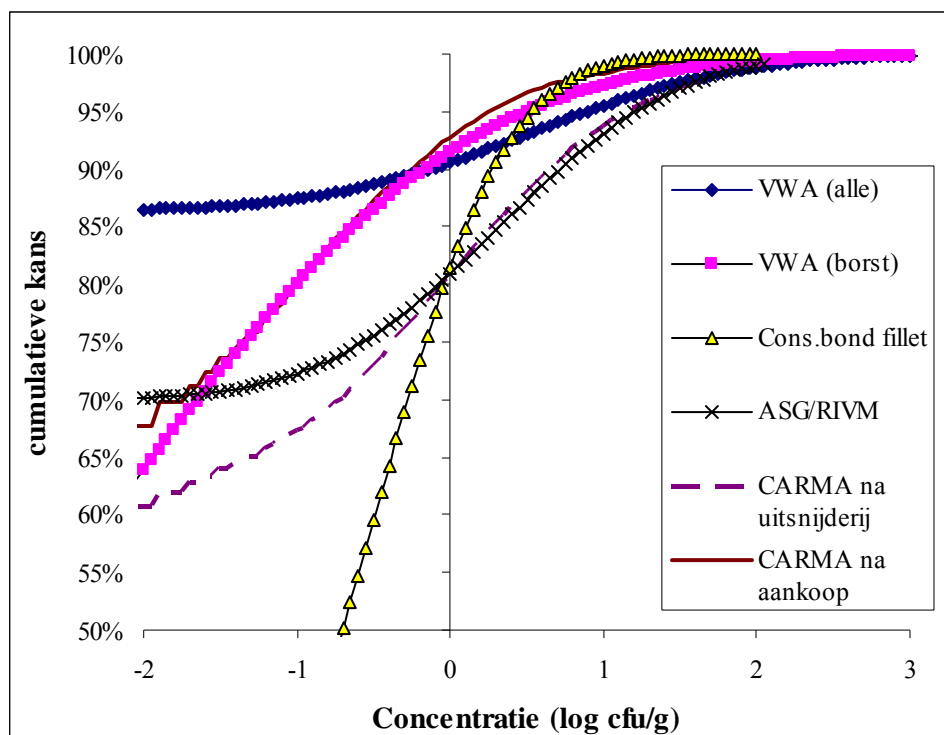
tests qua diagnostische waarde (aan-/afwezigheid) niet met elkaar overeenstemmen is opmerkelijk en zou reden moeten zijn voor een nadere evaluatie van het gebruik van deze beide methoden. Publicaties van prevalentieschattingen op basis van deze data zouden in het licht van deze bevinding moeten worden gezien alvorens er conclusies aan te verbinden.

Vooraf bij de analyse van de data van de VWA valt op dat de prevalentieschatting bij gecombineerde analyse van kwalitatieve en kwantitatieve data (85%) veel hoger uitvalt dan bij beschouwing van de kwalitatieve analyse alleen (16%). Dit wordt veroorzaakt door de grote aantallen monsters die positief worden gevonden met de ene methode, maar negatief met de andere. Een verklaring daarvoor is het optreden van stoorflora, die het uitgroeien van *Campylobacter* en daarmee een positief testresultaat bij de kwalitatieve test kunnen voorkómen. Als het optreden van stoorflora gecorreleerd is met een hoge concentratie *Campylobacter* zal de prevalentieschatting van 85% lager uitvallen. Het verdient aanbeveling negatieve testresultaten die het gevolg zijn van het optreden van stoorflora apart te rapporteren, en de discrepantie tussen de resultaten van de kwalitatieve en kwantitatieve tests nader te onderzoeken, omdat dit grote impact heeft op het gerapporteerde percentage met *Campylobacter* besmette producten.

Er kan onderscheid gemaakt worden in resultaten voor kipfilet en kipproducten in het algemeen, en bemonstering direct na uitsnijden en in de winkel. Het ASG/RIVM onderzoek, het sector onderzoek, en CARMA geven waarden voor kipfilet direct na de uitsnijderij weer, en liggen (heel) dicht bij elkaar. Waarden voor kipfilet in de winkel van Consumentenbond en CARMA liggen ook dicht bij elkaar, als naar de resultaten na statistische bewerking van de Consumentenbond gekeken wordt. De VWA kipmonitoring valt dan wat hoger uit, wat veroorzaakt zou kunnen zijn doordat niet alleen kipfilet, maar ook producten met vel meegenomen worden, en doordat (in vergelijking met het Consumentenbondonderzoek) het hele jaar bemonsterd wordt.

De gefitte verdelingen voor de concentraties volgens de gegevens van het ASG/RIVM onderzoek, het onderzoek van de Consumentenbond, het VWA onderzoek en CARMA zijn met elkaar vergeleken in Figuur 2. Dit bevestigt dat de overeenkomsten, zeker voor de relevante hogere concentraties, behoorlijk groot zijn.





*Figuur 2. Vergelijking van de gefitte lognormale verdelingen door de gegevens van de VWA, de Consumentenbond en ASG/RIVM, en de modelvoorspellingen van CARMA, na de uitsnijderij en bij aankoop. De aan de data gefitte verdelingen zijn met name bepaald door de hoge, meetbare, waarden, de vorm van de verdeling voor lage waarden is vooral theoretisch. Met name de hoge waarden zijn van belang voor risicoschattingen.*

## Dankwoord

Met dank aan de pluimveesector (Nepluvi, Peter Vesseur), de Consumentenbond (Gerard Kramer) en de VWA (Ben Wit) voor hun bereidwillige medewerking en het vroegtijdig toezenden van de resultaten van hun onderzoek. Ook met dank aan Jan van de Kasstele (RIVM, EMI) voor statistische ondersteuning. Een speciaal woord van dank aan Wilma Jacobs-Reitsma (Rikilt) voor commentaar en aanvullingen op een eerdere versie van dit briefrapport.

Tabel 6. Vergelijking van de onderzoeksresultaten. Zowel de resultaten direct afgeleid uit de waarnemingen (standaard lettertype) en de resultaten na statistische bewerking (cursief) zijn gegeven. Verschillen ontstaan doordat bij statistische bewerking ook waarden onder de detectielimiet meegenomen kunnen worden. NB = niet bekend.

onderzoek	aantal monsters	prevalentie (% besmette producten)	gemiddelde concentratie (log cfu/g) positieve producten	> 10/g (percentiel alle producten)	>100/g (percentiel alle producten)	product	jaar	seizoen
<b>ASG/RIVM</b>	308	30%	<i>0.27</i>	6.2% <i>6.4%</i>	1.3% <i>0.9%</i>	Filet (na uitsnijden)	2007	najaar
<b>Sector</b>	100	23%	1.0	4%	0%	Filet (fileerlijn)	2007	najaar
<b>Consumentenbond</b>	240	34% <i>54%</i>	1.1 <i>0.36</i>	6.7% <i>1%</i>	0% <i>0.01%</i>	Filet (aankoop)	2007	najaar
<b>VWA kipmonitoring</b>	1349	16% <i>85%</i>	1.8 <i>1.4</i>	5.8% <i>4.5%</i>	1.2% <i>1.1%</i>	Kipdelen (aankoop)	2007	hele jaar
<b>CARMA</b>	<i>nvt</i>	43% <i>36%</i>	-0.16 <i>-0.77</i>	6.2% <i>1.6%</i>	1.3% <i>0.3%</i>	Filet (na uitsnijden) (aankoop)	2000-2005	hele jaar

## Literatuur

- Anonymus 2008. Kipfilet. Kwaliteit, veiligheid en welzijn. Consumentenbond, afdeling Onderzoek, 2008, projectnr. PS07002.
- Brynstad, S., Lubber, P., Braute, L., and Bartelt, E., 2008. Quantitative Microbiological risk assessment of campylobacteriosis cases in the German population due to consumption of chicken prepared in home. *International Journal of Risk Assessment and Risk management*, *in press*.
- Gardner, I.A., Stryhn, H., Lind, P., and Collins, M.T., 2000. Conditional dependence between tests affects the diagnosis and surveillance of animal diseases. *Prev Vet Med* 45: 107-22.
- Havelaar, A.H., Mangen, M.J., de Koeijer, A.A., Bogaardt, M.J., Evers, E.G., Jacobs-Reitsma, W.F., van Pelt, W., Wagenaar, J.A., de Wit, G.A., van der Zee, H., and Nauta, M.J., 2007. Effectiveness and efficiency of controlling campylobacter on broiler chicken meat. *Risk Analysis* 27: 831-44.
- Nauta, M.J., Jacobs-Reitsma, W., Evers, E.G., Van Pelt, W., and Havelaar, A.H., 2005. Risk assessment of *Campylobacter* in the Netherlands via broiler meat and other routes. RIVM report 250911 006, Bilthoven, The Netherlands
- Nauta, M.J., Jacobs-Reitsma, W. and Havelaar, A.H., 2007. A risk assessment model for *Campylobacter* in broiler meat. *Risk Analysis* 27, 845-861.
- Nauta, M., Bolder, N., Van der Vossen, J. 2008a. Onderzoek tbv risicobeheersing *Campylobacter* in de pluimveevleesketen 2007 ASG-rapport 08/CVI0137, CVI-WUR, Lelystad
- Nauta, M.J., Fischer, A.R.H., Van Asselt, E.D., De Jong, A.E.I., Frewer, L.J. and De Jonge, R., 2008b. Food Safety in the domestic environment: the effect of consumer risk information on human disease risks. *Risk Analysis* 28, 179-192.
- Noordhuizen, J.P.T.M., Frankena, K., Van der Hoofd, C.M. and Graat, E.A.M. 1997 *Application of Quantitative Methods in Veterinary Epidemiology*. ,p.82. Wageningen Press, Wageningen.
- Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B., and Christensen, B.B., 2003. Quantitative risk assessment of human *Campylobacteriosis* associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology* 83: 87-103.

**Appendices:****I. Methode inschatten prevalentie op basis van 2 tests**

Toegepast bij de gegevens van de Consumentenbond en de VWA

Als er meerdere microbiologische testen zijn uitgevoerd om de besmetting van (dezelfde) kipproducten met *Campylobacter* te bepalen, kunnen de uitkomsten gecombineerd worden om het inzicht in het voorkomen van *Campylobacter* te vergroten.

De vraag is daarbij welk percentage van de monsters besmet is met 1 of meer levende *Campylobacters*. Als dat zo is, is er een kans  $> 0$  dat dit met de gebruikte methoden gevonden wordt. Die kans kan klein zijn, zeker als er inderdaad maar 1 levende *Campylobacter* op het product zit, maar de kans op detectie bestaat. Als er geen levende *Campylobacter* op het product zit, en de specificiteit van de test is 100%, is de kans op detectie nul. Bij het toepassen van de hier beschreven wiskundige methode, noemen we deze kans de prevalentie.

Stel:

De specificiteit van beide testen is 100% : Een positief resultaat is nooit vals.

Noem:

De sensitiviteit  $s_t$  van de test  $t$  is de kans op een positief testresultaat (= een positieve kwalitatieve test of een uitslag  $\geq 10$  cfu / g in de kwantitatieve bepaling) gegeven dat het bemonsterde product besmet is met (een of meer levende) *Campylobacters*. [Merk op dat die sensitiviteit dus ook afhangt van de verdeling van concentraties over alle bemonsterde producten. Dat is een wat ongebruikelijke definitie van sensitiviteit.] De prevalentie  $p$  is het percentage besmette producten, zoals gezegd het percentage producten waarbij een positieve testuitslag mogelijk is.

Dan is de kans op de verschillende uitkomsten [kl= kwalitatief, kn = kwantitatief]:

		kwalitatief	
		-	+
kwantitatief	<10	$1-p+(1-s_{kl})(1-s_{kn})p$	$s_{kl}(1-s_{kn})p$
	>10	$s_{kn}(1-s_{kl})p$	$s_{kl} s_{kn} p$

De kans op het gevonden resultaat, gegeven  $s_B$ ,  $s_{sk}$  en  $p$  kun je dan uitrekenen voor de gemeten waarden  $n$ ,  $x_1, x_2, x_3$  maximaliseren ( $n$  = aantal metingen,  $x_i$  is telling  $i$ ).

		kwal	
		-	+
kwan.	<10	$n-x_1-x_2-x_3$	$x_2$
	>10	$x_3$	$x_1$

Aangenomen dat de specificiteit van de test 100% is  
Er zijn  $k$  besmette monsters en  $n-k$  niet besmette.

Gegeven de onafhankelijkheid van de twee tests verwacht je bij de besmette monsters

$$x_1/k = (x_1+x_3) \times (x_1+x_2)/k^2,$$

dus

$$k = (x_1+x_3) \times (x_1+x_2)/x_1$$

en de prevalentie

$$p = k/n$$

De geschatte sensitiviteiten zijn dan  $(x_1+x_3)/k$  en  $(x_1+x_2)/k$ .

Bij afhankelijke tests wordt het ingewikkelder (zie b.v. Gardner et al 2000), maar dat valt buiten het bestek van deze rapportage.

## II. Methode MLE (Maximum Likelihood Estimation) schatting van verdeling concentraties.

toegepast bij VWA en Consumentenbond-data

Uitgaande van:

- 1) We beschikken over data van 0.1 ml monsters van 1g/1 ml spoelvoeistof. 10 cfu/g betekent dan dat er 1 cfu gevonden is,  $10x$  cfu/g betekent dat er  $x$  cfu gevonden zijn.
- 2) Het aantal cfu op een plaat is een trekking uit een Poissonverdeling met parameter  $CV$ , met  $C$  = concentratie en  $V$  = volume. De kans op het vinden van  $x$  cfu is dan uit te rekenen, gegeven  $C$  en  $V$  als  $P(x|CV)$ . De  $x$  zit in de data (dataset van  $i = 1..n$  monsters  $\{x_i\}$ ). De vraag is wat de verdeling is die de variatie in  $C$  beschrijft.
- 3)  $C = 0$  in  $1-p$  van de monsters, anders is  $C$  lognormaal verdeeld ( $\log(C)$  is normaal verdeeld met parameters  $\mu$  en  $\sigma$ )

Dan is de likelihood uit te rekenen van het vinden van de dataset  $\{x_i\}$  gegeven  $p$ ,  $\mu$  en  $\sigma$ :  $C$  heeft een kansverdeling, en elke waarde van  $C$  heeft een kansdichtheid  $Q(C)$ .  $V = 0.1$  ml. De likelihood van het gevonden resultaat is  $Q(C) \times P(x|CV)$ .

- 5) In Excel is dit te benaderen en op te lossen met Solver. Het resultaat is MLE schatters voor  $p$ ,  $\mu$ , en  $\sigma$ .

**RIVM**

Rijksinstituut  
voor Volksgezondheid  
en Milieu

Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)