

**Rapport: van het epidemiologisch/statistische onderdeel voor het project:
Validatie van serologische testen met het doel om de surveillance op Trichinella
te optimaliseren**

**De detectie van een laag prevalentie infectie in het kader van een surveillance
systeem**

**Projectnummer (ASG-WUR): 2032149000
Looptijd: 1.1.2005 t/m 31.12.2005
Opdrachtgever: LNV (contactpersoon: Wieke Galama)
Programmaleider en projectleider: Kitty Maassen/ASG**

**Projectnummer (RIVM): V/330040/05/AA
Looptijd: 1-1-2005 tm 31-12-2005
Opdrachtgever: VWA (Contactpersoon Rob van Oosterom)
Projectleider: Joke van der Giessen/RIVM**

**Auteurs: D. Döpfer/ASG, C.B.M. Maassen/ASG, J.W.B. van der Giessen/RIVM, P.
Teunis/RIVM, M.C.M. de Jong/ASG, W. Buist/ASG en B. Engel/ASG
Animals Sciences Group of Wageningen UR
Edelhertweg 15
8200 AB Lelystad**

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid en het Milieu (RIVM)
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9,
P.O. Box 1
3720 BA Bilthoven
the Netherlands**

Inhoud:

Samenvatting van de adviezen en opmerkingen

I Inleiding

II Stappen voor de uitwerking van het project

II.1 Bepaling van de negatieve cut-off waarde

II.2 Bepaling van de specificiteit van de serologische testen

**II.3 Steekproefgrootteberekening voor het aantonen van de “freedom-of-
infection status”**

II.4 Opstellen van de raamvoorwaardes voor een surveillance systeem

III Conclusies

IV Literatuur

V Appendices

Samenvatting van de adviezen en opmerkingen:

De adviezen en opmerkingen zijn in de tekst rood gemarkeerd en de lezer kan deze per hoofdstuk terugvinden. Het rapport kan op verschillende niveaus gelezen worden. De snelle lezer krijgt een indruk van de adviezen en opmerkingen, kan vervolgens de tekst voor meer detail raadplegen en voor de verdieping in de statistische details zijn er drie appendices toegevoegd.

Blz. 8

Een mogelijke integratie van het Trichinella surveillance project naar het project “integrale analyse dierziektes” binnen de Kennisbasis 8.4.1 van 2006 wordt overwogen om de uitvoering van het project in een procedure te plaatsen die tot een nog effectievere uitwerking van beleidsvragen door onderzoekers van ASG-WUR moet leiden. De strategische samenwerking van onderzoekers vanuit een multidisciplinaire achtergrond wordt hierdoor versterkt en toekomstige beleidsvragen op het gebied van de surveillance van infectieziektes gestroomlijnd.

Blz. 9

Het is duidelijk dat de bepaling van de cut-off waarde van een test een kritieke stap voor de verdere studie voorstelt omdat alle testresultaten in het vervolg afhankelijk van deze cut-off als test positief of test negatief vastgelegd worden. De auteurs adviseren om te overwegen om recent ontwikkelde methodes voor de bepaling van testuitslagen met en zonder cut-off waardes te gaan gebruiken. Aan de ontmenging van verdelingen van OD-waardes afkomstig uit serum panels wordt b.v. reeds op het RIVM gewerkt. Gezien de gevoeligheid van de cut-off bepalingen wijden we nu en volgend jaar nog iets meer aandacht aan dit onderwerp.

Blz.10

Een vervolg van de discussie over de bepaling van de cut-off waardes is uiteraard noodzakelijk. Deze discussie moet gaan over de vergelijking van de negatieve testresultaten en specificiteiten voor de 4 tests zo als gepresenteerd in het GD rapport omdat de cut-off bepalingen per test zo verschillend zijn uitgevoerd. Hierdoor staat men voor de ASG-SPR en de RIVM-ELISA vals positieve test resultaten toe terwijl men dat voor de Pourquier en de Safeopath testen niet doet.

Blz. 14

Voor een verbeterde validatie van de testen zouden meer controle sera aan het begin en aan het einde van een run respectivelijk een plaat meegenomen moeten worden. Dit vraagt om afstemming tussen de diagnostici en de epidemiologen.

Blz. 16

Voor de studie van veldsera in 2006 met sera afkomstig uit endemische gebieden besmet met Trichinella spp. zouden correcties voor de verschillen tussen runs en tussen platen m.b.v. berekeningen met een mixed model kunnen worden afgeleid. Daartoe zouden meer controle monsters per run en plaat meegenomen moeten worden om verbeterde schattingen voor the cut-off waardes te kunnen berekenen.

Blz. 17

Zonder veldsera afkomstig van positieve dieren blijft de sensitiviteit van de testen onbekend en kan men de data eindeloos blijven afkappen voor het vastleggen van de specificiteit zonder de eigenschappen van de test in een veldsituatie ook maar bij benadering te kunnen beoordelen.

Blz. 17

De zoektocht naar de beste methode voor de bepaling van de cut-off waarde onderstreept nog eens het advies om methodes ter bepaling van testuitslagen zonder cut-off waardes te overwegen. Voor het geval dat er **met** cut-off waardes gewerkt zal worden zou methode 1c, het mixed model, de voorkeur voor de bepaling van de cut-off waarde moeten krijgen om zo een correctie voor het verschil tussen runs of platen in de berekeningen te betrekken.

Blz. 19

De notitie maakt duidelijk dat bij zeer lage bedrijfsprevalenties, zo als 0.001% of lager¹ een surveillance gebaseerd op screening op bedrijfsniveau slechts voldoende garanties biedt wanneer alle varkens per bedrijf worden getest. Onder aanname dat Nederland één samenhangend Trichinella-vrij gebied is (volgens de nieuwe EU richtlijn zou in een Trichinella-vrij gebied 10 jaar lang geen positief bedrijf meer gevonden zijn en dat is voor Nederland niet 100% het geval) zouden minimaal 300.000 varkens per jaar aan de slachtlijn getest moeten worden om bij een bedrijfsprevalentie van 0.001% of hoger met 95% kans positieve varkens te kunnen signaleren.

Blz. 24 t/m 26

De met behulp van het simulatie systeem gegenereerde aantallen zijn niet als absolute waarden te beschouwen maar geven een orde van grootte en de verhoudingen tussen de aantallen weer. Een belangrijke maar niet verrassende uitkomst van de simulatie is dat bij een surveillancesysteem gebaseerd op bedrijfsniveau onder aanname van een vele malen hogere bedrijfsprevalentie (1% positieven i.t.t. de 0.001% onder 3) het aantal te testen slachtvarkens per jaar met gemiddeld: $173.74 * 9000 = 1.563.660$ ruim 5 maal hoger ligt dan de ongeveer 300.000 varkens die onder 3 uit de steekproefgrootte berekening op regionaal niveau komen. Bij een surveillance systeem gebaseerd op het bemonsteren op regionaal niveau wordt de kans dat positieve bedrijven gevonden worden zeer gering.

Verder blijft bij een individuele test specificiteit vastgesteld op 99.9% en een oplopende individuele sensitiviteit van 70% t/m 99% de bedrijfssensitiviteit tussen de 82.7% en 93.2% hangen (dit voor een grenswaarde voor het positief verklaren van een bedrijf van 1 positief dier, de hogere grenswaardes voor m leveren nog lagere bedrijfssensitiviteiten op terwijl voor m=5 de bedrijfsspecificiteit naar 99.6% stijgt; de data voor m=5 worden in tabel 2 niet getoond). Dit maakt duidelijk dat in 2006 een beslisboom ontwikkeld moet worden, die bepaalt hoe positieve bedrijven en positieve individuele dieren verder getest moeten worden. Het is duidelijk dat hoe groter de individuele test sensitiviteit en hoe kleiner de individuele test specificiteit zijn hoe meer vals positieve varkens er gedetecteerd worden.

¹ bedrijfsprevalentie: het % Trichinella postieve bedrijven in Nederland

Het doel van het surveillancesysteem op bedrijfsniveau is de garantie van “freedom-of-infection” en de inperking van het aantal individueel te testen varkens. Dat zou kunnen geschieden via de selectie van te testen bedrijven gebaseerd op een risico assessment voor bedrijven met risico op besmetting met trichinellose terwijl er een versoepeling van de teststrategie voor bedrijven met een negatieve bedrijfshistorie van toepassing zou kunnen worden. Daarom is het surveillance systeem met de diagnostische testparameters niet van de beslissingen over de uitkomsten van de testen te scheiden en moeten er boven op de hier besproken raamvoorwaardes aanvullende criteria voor de effectieve surveillance vastgelegd worden.

In de toekomst zullen de volgende onderdelen aan het simulatie systeem toegevoegd moeten worden (z. figuur 8):

- Risico assessment voor het risico op insleep van *Trichinella* larven zodat een besmet bedrijf ontstaat
- De selectie van bedrijven voor sero-monitoring zal afhankelijk van de bedrijfshistorie gemaakt worden
- Een beslisboom zou ontwikkeld moeten worden over hoe positieve bedrijven verder getest (hertesten, combinatie van testen etc.) moeten worden in afhankelijkheid van de bedrijfshistorie, het risico op insleep en het besmettingsrisico voor de mens uitgaande van het positieve bedrijf
- Verwerken van diagnostische testparameters geschat uit velddata
- De samenhang tussen besmettingsgrade (b.v. # larven/g spierweefsel) en de verdeling van serotiters in besmette slachtvarkens m.b.v. een dose response onderzoek
- Een risico assessment voor het besmettingsrisico voor de mens uitgaande van een bepaalde (sero)prevalentie binnen een bedrijf (dierprevalentie) en tussen bedrijven (bedrijfsprevalentie)
- Ook kan het systeem rekening houden met de transmissie van de infectie binnen een bedrijf en tussen bedrijven, maar dat zou voor *Trichinella* infecties niet zo relevant, omdat het vaak puntbesmettingen zijn die niet of zeer beperkt spreiden (dit i.t.t. ander infectieziektes zo als *M. avium spp. avium* waar het transmissie proces een grote invloed op de variatie in prevalenties kan hebben)

Één manier om de uitbreidingen in de lijst hierboven op het surveillance simulatie systeem aan te brengen is de vertaling in een Bayesiaanse methode van surveillance simulatie waarbij de stochasticiteit van de variabelen beter vast te leggen is.

Blik op de toekomst voor de simulatie van de Trichinella surveillance:



figuur 8: samenhangen tussen het ontwikkelde simulatie systeem voor de surveillance van *Trichinella spiralis* infecties en een blik op toekomstige uitbreidingen afhankelijk van velddata, toegevoegde informatie en risico analyses

Dit aangevulde simulatie systeem kan als besliskader dienen om risk-based monitoring op *Trichinella spiralis* infecties in Nederland te plannen, te berekenen en uit te voeren. Een voordeel van dit systeem is dat het direct naar andere vraagstellingen vertaald kan worden zoals b.v. het monitoring op *Mycobacterium avium* infecties bij varkens.

I Inleiding :

Een surveillance systeem gericht op het aantonen en garanderen van freedom-of-disease² moet een duidelijke doelstelling hebben: voldoende preventie van humane infecties door het garanderen van een bepaald besmettingsniveau in de dierpopulatie. In Nederland is er een zeer lage prevalentie voor *Trichinella* infecties bij slachtvarkens³. Het risico voor de mens om besmet te raken door Nederlandse slachtvarkens is dan ook zeer gering, d.w.z. bijna 0.

De nieuwe EU richtlijn (annex V; *Trichinella* infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004, z.o. bijlage 1) voorziet in *Trichinella* vrije gebieden in een surveillance gebaseerd op een serologische test i.p.v. de digestiemethode. Een dergelijk surveillance systeem moet aan bepaalde eisen voldoen.

Volgens de OIE aanbevelingen⁴ zijn voor de surveillance van “freedom-of-infection” de volgende onderdelen van belang:

- een doelpopulatie: hier Nederlandse vleesvarkens zoals aangeleverd aan de slachtlijn
- een diagnostische test: in deze studie worden 4 diagnostische tests met elkaar vergeleken tijdens een aanzet tot een test validatie procedure, de 4 tests zijn de: ASG-SPR test (tot heden zonder de zgn. “versterking”), de RIVM (ES) ELISA test, de Pourquier ELISA en de Safepath ELISA (voor details over de testen z. ook rapport door van der Heijden et al., 2005)
- een opzet voor een surveillance systeem incl.
- een bemonsteringsstrategie met de frequentie voor bemonstering en een
- steekproefgrootteberekening voor de te testen dieren; deze worden in het kader van het project nader uitgewerkt.

De diagnostische tests zoals gebruikt voor deze studie moeten vooralsnog gevalideerd worden en hiervoor zijn testuitslagen gebaseerd op een cut-off waarde en diagnostische testparameters zoals sensitiviteit, specificiteit en prevalenties nodig. Voor de bepaling van de test parameters zijn velddata van essentieel belang. De cut-off waarde bepaling en de bepaling van de specificiteit zullen tijdens de stappen 1 en 2 uitgewerkt worden. De randvoorwaarden voor het op te stellen surveillance systeem staan in stappen 3 en 4. De kortsluiting tussen de deelnemende instituten en de rapportage van de raamvoorwaarden voor het surveillance systeem met het oog op de nieuwe EU-richtlijn (annex V; *Trichinella* infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004) staan in stap 5 op de volgende bladzijden.

² met freedom-of-disease is hier een “risk-based” mate van vrijheid van infectie bedoeld. Dat wil zeggen men accepteert een bepaald laag besmettingsniveau in de dierpopulatie die gepaard gaat met een verwaarloosbaar besmettingsrisico voor de mens.

³ gebruikmakend van een digestietest van spierweefsel zijn er gedurende de afgelopen 50 jaar twee positieve dieren gevonden

⁴ Manual for diagnostic tests and vaccines in terrestrial animals Chapter I.1.3

II Stappen voor de uitwerking van het project (de strategie voor de test validatie; de details volgen hier onderaan en in de appendices 1 t/m 3); de resultaten zijn aan de hand van het voorbeeld van de SPR resultaten uitgewerkt, maar dat had voor elk andere test op dezelfde manier gedaan kunnen worden:

1- **bepaling van de cut-off waarde en specificiteit gebaseerd op een panel van n=1104** sera genomen aan de slachtlijn bij 2 slachtvarkens van 552 bedrijven (de doelpopulatie) en geanalyseerd m.b.v. de ASG-SPR test⁵. De volgende methodes voor de cut-off bepaling zijn van toepassing:

a: door middel van het 99.5% percentiel als afkapwaarde te gebruiken

waarbij 99.5% van de gevonden waardes als negatief beschouwd worden; hierdoor kan de test zgn. 'afgesteld' worden. Men had ook voor een ander percentiel als afkapwaarde kunnen kiezen zoals 99.9% of zelfs 100%.

b: door middel van een frequentieverdeling

hierbij wordt de natuurlijke logaritme van de ruwe data genomen, een normale verdeling gebaseerd op het gemiddelde en de standaardafwijking berekend en vervolgens het 99.5% percentiel van de verdeling als cut-off waarde gebruikt.

Deze aanpak veronderstelt dat het gaat om werkelijk negatieve data met een "normale" verdeling(eigenlijk: een unimodale verdeling).

c: door het toepassen van een frequentistische regressie methode, een mixed model (actie: Bas Engel en Willem Buist, september 2005); deze aanpak komt in principe overeen met de Bayesiaanse methode voor een mixed model die Peter Teunis op het RIVM heeft toegepast voor de cut-off bepaling van de RIVM-ELISA en betreft ook een correctie voor het verschil tussen runs voor de ASG-SPR test en de RIVM-ELISA test in de berekeningen.

2- de cut-off waardes uit 1a t/m c worden toegepast op data set 1 uit de zgn. GD/ASG/RIVM studie (z. zgn. GD-rapport blz. 6: Evaluatie van serologische testen voor *Trichinella spiralis* bij Nederlandse slachtvarkens door H.M.J.F. v/d Heijden/GD);

Attentie: oorspronkelijk zou hier de schatting van testparameters zonder gouden standaard worden uitgevoerd maar door het gebrek aan een serum panel met positieve **en** negatieve veldsera uit een endemisch gebied kan deze Bayesiaanse aanpak van het "bepalen van de diagnostische test parameters zonder gouden standaard" niet toegepast Hierbij moet duidelijk worden gesteld dat tot nog toe niets over de verdeling van de positieve titers in het veld bekend is en dus niets over de sensitiviteit van de testen gezegd kan worden. De testvalidatie blijft daardoor in gebreke wat betreft het leveren van een sensitiviteitsschatting, omdat de tot op heden gebruikte positieve controlesera afkomstig zijn van slechts enkele experimenteel geïnfecteerde varkens met titers die vele malen hoger zijn dan in het veld is te verwachten. Het opstellen van ROC curves zoals in het GD rapport gedaan is is dan ook niet juist want het suggereert informatie over de sensitiviteit van de testen in het veld die er niet is.

⁵ data zijn verkregen zonder de zgn. 'versterking'; zodra de data voor de SPR test met versterking toegankelijk zijn – in de loop van 2006 – zouden de cut-off bepalingen ook hiermee uitgevoerd kunnen worden

3- de steekproefgrootteberekening voor het aantonen van de “freedom-of-infection status” waarbij ervan uitgegaan wordt dat in Nederland als Trichinella vrij gebied⁶ max. 0.001%⁷ van de bedrijven besmet zijn (zgn. bedrijfsprevalentie; de werkelijke bedrijfsprevalentie is veel kleiner, namelijk zelfs <0.00001%) terwijl men aanneemt dat <1% van de varkens op een positief bedrijf besmet zijn; zgn. dierprevalentie).

Een open vraag is: wat is de werkelijke blootstelling van de Nederlandse consument aan Trichinella larven ten gevolg van consumptie van rauw of bereid varkensvlees voor het geval dat de bedrijfsprevalentie een van de bovengenoemde waardes aanneemt? En welke serotiters en aantallen larven/g spierweefsel corresponderen met dit besmettingsniveau in de varkenspopulatie? Een aanzet tot antwoorden op deze vragen zou kunnen zijn:

Op dit moment kan ervan uitgegaan worden dat de Nederlandse consument niet aan Trichinella blootgesteld wordt gezien het feit dat al 50 jaren lang tussen de miljoenen geteste slachtvarkens zo goed als geen positieve slachtvarkens gevonden zijn. Dosis respons onderzoek in diermodellen en velddata zouden uitslag over de relatie tussen infectiedosis en besmettingsniveau bij varkens en b.v. ratten kunnen geven. Dit om een indicatie te hebben van de noodzakelijke dosis voor de infectie van mensen.

4- het opstellen van de raamvoorwaardes voor een surveillance systeem voor het aantonen van de “freedom-of-infection”status m.b.v. van een imperfecte test in een populatie met lage prevalentie

Het verband tussen de blootstelling van mensen aan Trichinella larven en de werkelijke bedrijfsprevalentie in Nederland schept het kader voor het opstellen van een surveillance systeem met een bemonsteringsstrategie aan de slachtlijn en de berekening van de nodige steekproefgroottes. Ter illustratie en discussie van de raamvoorwaardes voor een dusdanig surveillance systeem wordt een simulatie systeem met aannames over bedrijfsprevalenties, bedrijfsomvang en diagnostische testparameters ontwikkeld. Het simulatie systeem kan in 2006 met de werkelijke gegevens en test parameters worden aangevuld en verbeterd om tot een besluitkader voor de surveillance op Trichinella te kunnen komen.

5- kortsluiten van de uitkomsten met het RIVM met het oog op de nieuwe EU richtlijn Annex V (Trichinella infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004)

De kortsluiting tussen projectmedewerkers onderling en samen met de opdrachtgevers heeft gedurende verschillende projectvergaderingen in 2005 plaatsgevonden en zal met behulp van dit rapport en toekomstige projectbesprekingen in 2006 voortgezet worden.

Advies:

⁶ Trichinella vrij gebied volgens: Annex V (Trichinella infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004)

⁷ De prevalentie van positieve bedrijven in Nederland is zo goed als 0 en de tijdens screening gevonden waarde van < 0.5% zou een indicatie voor de ruis van vals positieve testresultaten kunnen zijn (bepaald met de RIVM ELISA test gebruikmakend van een oude verdunning van het serum van 1/20 terwijl inmiddels een verdunning van 1/100 gehandhaafd wordt en minder ruis gevonden is; bron: Joke van der Giessen: recente RIVM studie van 2005)

Een mogelijke integratie van het Trichinella surveillance project naar het project “integrale analyse dierziektes” binnen de Kennisbasis 8.4.1 van 2006 wordt overwogen om de uitvoering van het project in een procedure te plaatsen die tot een nog effectievere uitwerking van beleidsvragen door onderzoekers van ASG-WUR moet leiden. De strategische samenwerking van onderzoekers vanuit een multidisciplinaire achtergrond wordt hierdoor versterkt en toekomstige beleidsvragen op het gebied van de surveillance van infectieziektes gestroomlijnd.

Ad 1:

bepaling van de cut-off waarde en specificiteit gebaseerd op een panel van n=1104 sera genomen aan de slachtlijn bij 2 slachtvarkens van 552 bedrijven (de doelpopulatie) en geanalyseerd m.b.v. de ASG-SPR techniek⁸. De volgende methodes voor de cut-off bepaling zijn van toepassing:

a: door middel van het 99.5% percentiel als afkapwaarde te gebruiken

waarbij 99.5% van de gevonden waardes als negatief beschouwd worden en dus de specificiteit van deze test systematisch op 99.5% vastgelegd wordt. Men had ook voor een ander percentiel als afkapwaarde kunnen kiezen zoals 99.9% of zelfs 100%. Voor het 99.5% percentiel als afkapwaarde is op deze manier bij een ASG data set van n=1400 afkomstig van negatieve slachtvarkens een waarde van 14% PP (percent positivity) tot de cut-off waarde bestempeld en kon de test voorlopig zgn. ‘afgesteld’ worden (actie Willem Buist in Mei 2005). Deze cut-off waarde is gebruikt voor de vergelijking van de ASG-SPR test met de 3 ELISA testen. De vergelijking staat beschreven in het GD rapport (v/d Heijden et al 2005).

De huidige data set met n=1104 sera afkomstig van negatieve slachtvarkens neemt even reeds aan dat 99.5% van de ruwe waardes negatief zijn en komt tot een cut-off waarde van 191 RU's oftewel 12 %PP behorend tot de specificiteit van 99.5%.

Een derde data set zal nog een andere cut-off waarde kunnen leveren. Om deze reden is er ook een “grijs” gebied tussen de 14% en de 20% PP voor de afkapwaarde ingesteld om een ruimer aantal positieven voor het hertesten toe te staan. Een cut-off waarde berekend m.b.v. het n=1104 data set zal veel kleinere waardes in het veld als positief gaan bestempelen vergeleken met het n=1400 data set. Het is duidelijk dat de bepaling van de cut-off waarde een kritieke stap voor de verdere studie voorstelt omdat alle testresultaten in het vervolg afhankelijk van deze cut-off als test positief of test negatief vastgelegd worden. De auteurs adviseren om te overwegen om recent ontwikkelde methodes voor de bepaling van testuitslagen met en zonder cut-off waardes te gaan gebruiken. Aan de ontmenging van verdelingen van OD-waardes afkomstig uit serum panels wordt b.v. reeds op het RIVM gewerkt. Gezien de gevoeligheid van de cut-off bepalingen wijden we nu en volgend jaar nog iets meer aandacht aan dit onderwerp.

Een opmerking voorafgaande: voor de Pourquier test en de Safepath test zijn de cut-off waardes uit de respectievelijke handleidingen gebruikt en is de specificiteit op 100% vastgesteld. Voor de RIVM-ELISA is de cut-off waarde bepaald a.d.h.v. een negatief cohort

⁸ data zijn verkregen zonder de zgn. ‘versterking’; zodra de data voor de SPR test met versterking toegankelijk zijn – eind oktober 2005 - zouden de cut-off bepalingen ook hiermee uitgevoerd kunnen worden

en is er m.b.v. een mixed model in een Bayesiaanse aanpak voor verschillen tussen platen gecorrigeerd (zie ad 1c). Door de hoge cut-off waardes is er van begin af aan voor de Pourquier en de Safepath test een specificiteit van 100% aangenomen omdat geen enkele door de Pourquier test en de Safepath test gevonden waardes beneden de commerciële cut-off waarde lagen. Dit gaat ten kosten van de sensitiviteit van de testen in het veld. Omdat we geen informatie over de sensitiviteit voor de tests uit het veld hebben geven de auteurs van het huidige rapport er de voorkeur aan om eerst de diagnostische test parameters te bepalen in een panel van veldsera waar o.a. positieve sera te vinden zijn. De bepaling van cut-off waardes en de diagnostische testparameters zouden voor alle vier testen beter op dezelfde manier uitgevoerd moeten worden.

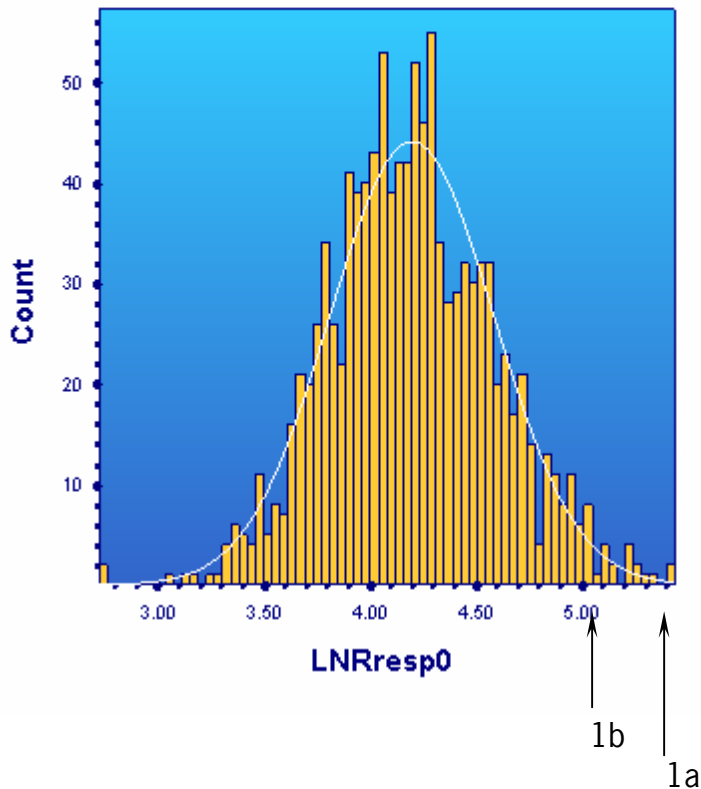
Stel dat men de 99.5% percentielen voor de ruwe data zou gebruiken dan krijgt de Pourquier test een cut-off waarde van S/P: 25.7% (dat is duidelijk lager dan de 30% uit de handleiding) en de Safepath test een cut-off waarde van: OD: 124 (wat ook duidelijk lager is dan de OD: 300 uit de handleiding is); de RIVM ELISA test zou een cut-off waarde van 0.23 krijgen (dit gebaseerd op de ruwe data).

Een vervolg van de discussie over de bepaling van de cut-off waardes is uiteraard noodzakelijk. Deze discussie moet gaan over de vergelijking van de negatieve testresultaten en specificiteiten voor de 4 tests zo als gepresenteerd in het GD rapport omdat de cut-off bepalingen per test zo verschillend zijn uitgevoerd. Hierdoor staat men voor de ASG-SPR en de RIVM-ELISA vals positieve test resultaten toe terwijl men dat voor de Pourquier en de Safeopath testen niet doet. Voor de toekomstige vergelijkingen van testparameters zouden de cut-off waardes voor alle testen beter op dezelfde manier bepaald kunnen worden (z. o. advies onder ad 1c).

b: bepaling van de negatieve cut-off waarde door middel van een frequentieverdeling (n=1000 negatieve sera van data set 1 uit het GD rapport)

Hierbij wordt de natuurlijke logaritme van de ruwe data genomen, de gemiddeldes en standaardafwijkingen bepaald en vervolgens hieraan een normale verdeling gefit. Het 99.5% percentiel van deze verdeling zou als cut-off waarde gebruikt kunnen worden. Omdat men bij relatief hoge specificiteit (hier b.v. 99.5%) de cut-off waarde in het uiterste einde van het staartje van de verdeling zoekt, waar bijzonder weinig waardes (voor de data set met n=1000 zijn dat 5 waardes) aan de vorm van deze staart bijdragen worden de resulterende cut-off waardes afhankelijk van de toevallige waarnemingen in de hoge waarden verschoven en op deze manier zeer arbitrair gekozen. Dat is hetzelfde voor de methode onder a met behulp van de percentielen. Voor de data set n=1104 uit 1a ontstaat er voor een specificiteit van 99.5% doormiddel van de normale verdelingsaanname een cut-off waarde van 147 RU's ($\ln(147)=4.99$) oftewel 8%PP, (z. figuur 1). Dat is duidelijk lager dan de met percentielen bepaalde 191 RU's ($\ln(191)=5.25$) oftewel 12%PP. Vandaar dat de methode voor de cut-off bepaling m.b.v. de frequentieverdelingen niet aan te raden is tenzij dat de data set vele malen groter is dan de huidige waardoor meer waarnemingen aan de staart van de verdelingen bijdragen. Een grotere dataset zou de kosten voor het afstellen van de testen verhogen en dat is niet wenselijk. Voorzichtigheid in de omgang met zeer kleine datasets (n<1000) voor het afstellen van de testen is daarom geboden.

I



Figuur 1: verdeling van de RU (LNRresp0) waarden afkomstig van de ASG-SPR test voor het negatieve data set (n=1104); met pijl 1a: de 99.5% cut-off waarde bepaald in 1a m.b.v. een 99.5% percentiel (het aantal positieven wordt hierdoor: 5 observaties) en pijl 1b: de cut-off waarde bepaald in 1b m.b.v. de normale verdeling (het aantal positieven wordt hierdoor: 27 observaties).

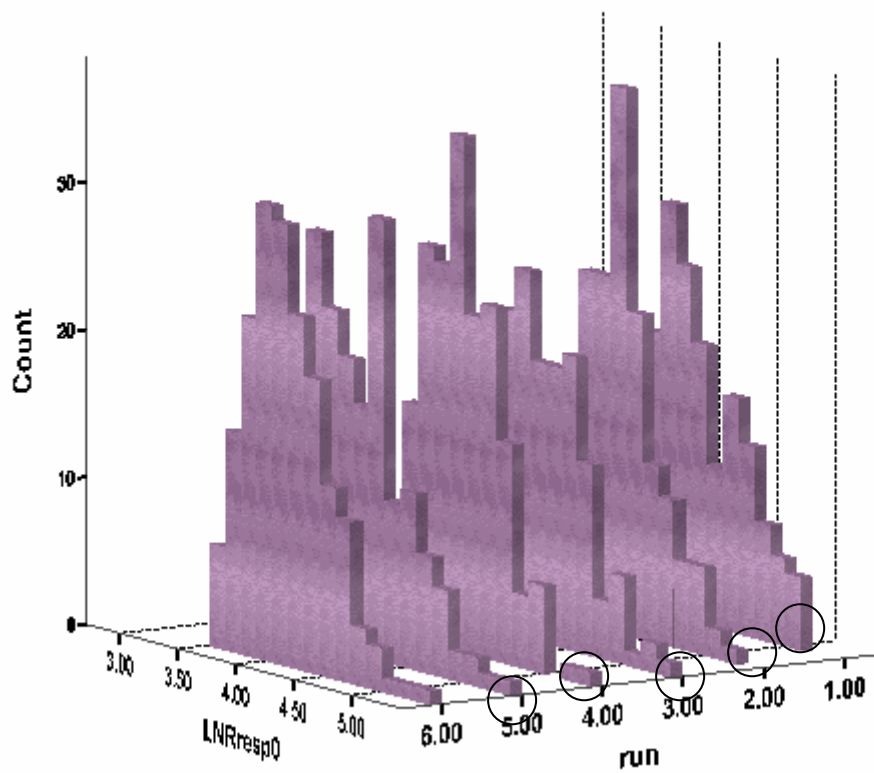
Het concept van de correctie voor verschillen tussen runs en platen is toepassing voor alle 4 testen omdat ze duidelijke run- en platteffecten hebben. Ook hiervoor is een advies voor toekomstige vergelijkingen van tests op zijn plaats. Dit advies heeft betrekking op de indeling van controle en test sera tijdens runs voor de ASG-SPR test en indeling van sera op de platen voor alle ELISA tests en een mixed model voor de cut-off waarde bepalingen (het advies staat onder 1c).

c: bepaling van de cut-off waarde door het toepassen van een frequentistische regressie methode voor de data set uit 1a n=1104, een mixed model (actie: Bas Engel en Willem Buist, september 2005); deze aanpak komt in principe overeen met de Bayesiaanse methode van aanpak die door het RIVM reeds is toegepast voor de cut-off bepaling van de RIVM ELISA test

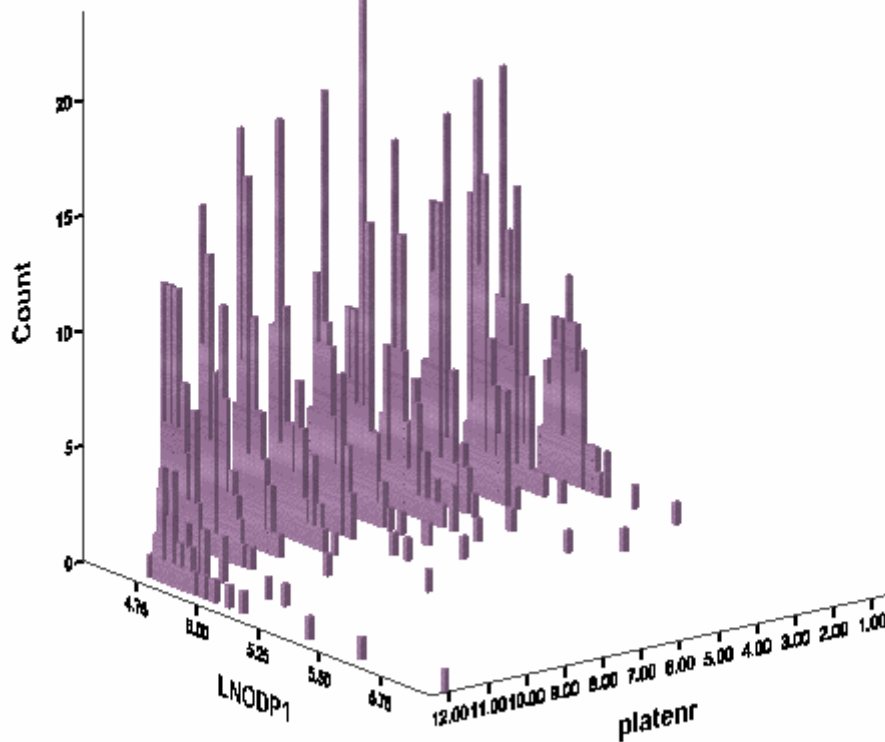
Er zijn duidelijke verschillen tussen runs tijdens de ASG-SPR test en de platen per test voor alle ELISA tests gevonden, omdat de gemiddelden en standaardafwijkingen per run of plaat verschillen (een illustratie hiervan is exemplarisch te vinden in figuur 2 voor de ASG-SPR en figuur 3 voor de Pourquier test met log-getransformeerde ruwe data; de details van de mixed model analyse van de data is te vinden in appendix 1). Bij voorbeeld in figuur 2 vallen run 2 en 4, in figuur 3 valt plaat 5 op door hun relatief hoge gemiddelde of grote standaardafwijking. Voor een verbeterde cut-off waardebepaling zou voor deze verschillen gecorrigeerd moeten worden en deze correctie gaat vooraf aan het berekenen van de S/P (Pourquier test), OD (Safepath test) en de OD-ratio data (RIVM-ELISA). Deze correctie is b.v. voor de ASG-SPR test (door Bas Engel met een mixed model, data set uit 1a met n=1104 observaties) en de RIVM ELISA (door Peter Teunis met een Bayesiaanse aanpak voor een mixed model, deze analyse wordt hier niet getoond) uitgevoerd.

Voor de ASG-SPR, de Pourquier test en de Safepath test zijn voor het GD rapport geen en voor de RIVM-ELISA wel correcties m.b.v. mixed modellen voor de verschillen tussen de runs of platen uitgevoerd. Dus waren de 4 testresultaten eigenlijk ook om deze reden van begin af aan niet werkelijk vergelijkbaar.

Ln(Rresp0) per run



Figuur 2: log getransformeerde ruwe response units (LnRresp0, n=1104 uit 1a) voor de ASG-SPR test opgesplitst per run; de 5 cirkeltjes geven aan welke 5 waardes als positief afgeknip worden door de vastlegging van het 99.5% percentiel als cut-off waarde



Figuur 3: log-getransformeerde ruwe OD waardes voor de Pourquier ELISA (LNODP1, n=1000, set 1 uit GD rapport) test opgesplitst per plaat met zichtbare verschillen van de gemiddeldes en standaardafwijkingen per plaat

Nu volgt een voorstel tot een cut-off waarde bepaling m.b.v. een mixed model onder de aanname van een normale verdeling voor de log-getransformeerde ruwe data van de ASG-SPR test (data set n=1104 zo als onder ad 1; voor details zie appendix 1).

Een probleem waar het mixed model toegepast op de ASG-SPR data tegenaan loopt is dat er maar 2 negatieve controle en 2 positieve controle waardes per run meegenomen zijn en dat is te weinig om de variantie tussen de controles goed te kunnen berekenen. De hier uitgevoerde analyse van de data met het mixed model is dan ook maar een voorbeeld voor wat het model voor de bepaling van cut-off waardes uit data zou kunnen betekenen en dat dit tot verschillen in de testuitslagen: positief vs. negatief kan leiden. Het advies voor de indeling van runs en platen in de toekomst luidt dan ook:

Advies:

Voor een verbeterde validatie van de testen zouden meer controle sera aan het begin en aan het einde van een run respectievelijk een plaat meegenomen moeten worden. Dit vraagt om afstemming tussen de diagnostici en de epidemiologen.

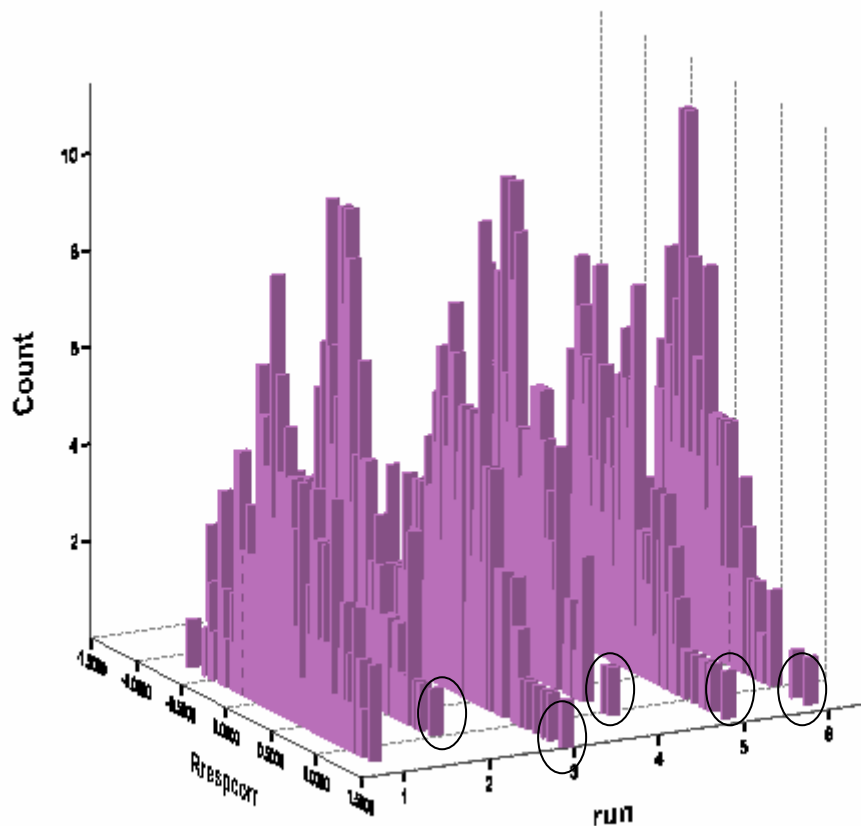
Onder aanname van een normale verdeling van de log-getransformeerde ruwe data en correctie met de negatieve controle waarden (test sera – negatieve controle sera) aan het begin en aan het einde van de run wordt er een mixed model opgesteld dat in appendix 1 nader beschreven is. Hierin is de correctie voor verschillen tussen runs meegenomen als zgn. “fixed effect”. Dit mixed model is in principe hetzelfde als het Bayesiaanse mixed model zoals door Peter Teunis voor het RIVM data set gebruikt (Teunis et al., in prep.), alleen dan zonder de apriori verdelingen voor verschillende parameters zoals vereist voor een Bayesiaanse aanpak.

Uiteindelijk komt uit het huidige model voor de ASG-SPR data naar voren:

- dat er significante verschillen tussen runs bestaan met gevolgen voor de testuitslagen,
- dat er significante verschillen zijn tussen test sera en negatieve controle sera, naar schatting is het verschil: 0.15 lnRU's (SD: 0.041) (het is dus zinnig om voor deze verschillen m.b.v. een model te corrigeren) en
- dat er een significant verschil tussen test sera en positieve controle sera bestaat, naar schatting is het verschil: -2.84 lnRU's (SD: 0.022).

In deze data set zijn geen significante verschillen gevonden tussen de begin- en de eindwaarden van de negatieve als ook de positieve controle sera maar het gebrek aan controle monsters zou hier oorzaak van kunnen zijn.

De schatting voor de negatieve cut-off waarde als het 99.5% percentiel (d.w.z. dat de specificiteit 99.5 % is) gecorrigeerd voor de negatieve controles is 1.17 wat niet intuïtief te vergelijken valt met de eerder bepaalde cut-off waarden. In een poging tot een vergelijking zijn de cut-off waarden per run bepaald en vervolgens de afgekapte positieve observaties bij elkaar opgeteld tot een totaal van 5. De order van grootte van deze schattingen ligt in de buurt van de negatieve cut-off waarden zo als beschreven onder 1a (de cut-off waarde bepaalt m.b.v. het 99.5% percentiel).



figuur 4: histogrammen per run voor LN(Resp) data gecorrigeerd voor het niveau van de negatieve controle sera m.b.v. een mixed model; de cirkels wijzen de waardes aan die uiteindelijk per run als positief afgekapt worden (z. o. tabel 1).

Advies:

Voor de studie van veldsera in 2006 met sera afkomstig uit endemische gebieden besmet met *Trichinella* spp. zouden correcties voor de verschillen tussen runs en tussen platen m.b.v. berekeningen met een mixed model kunnen worden afgeleid. Daartoe zouden meer controle monsters per run en plaat meegenomen moeten worden om verbeterde schattingen voor the cut-off waardes te kunnen berekenen.

Ad 2

de cut-off waardes uit 1a t/m c worden toegepast op data set 1 uit de zgn. GD/ASG/RIVM studie (z. zgn. GD-rapport blz. 6: Evaluatie van serologische testen voor *Trichinella spiralis* bij Nederlandse slachtvarkens door H.M.J.F. v/d Heijden/GD);

Attentie: oorspronkelijk zou hier de schatting van testparameters zonder Gouden Standaard uitgevoerd worden maar door het gebrek aan een serum panel met positieve en negatieve veldsera uit een endemisch besmet gebied kan deze Bayesiaanse aanpak

voor het “bepalen van de diagnostische test parameters zonder Gouden Standaard” niet toegepast worden. In plaats daarvan wordt geprobeerd om de cut-off waardes zoals bepaald in 1a t/m 1c op een nieuwe dataset toe te passen. Dit is schermen in het donker want het is duidelijk dat tot nog toe in 2005 niets over de verdeling van de positieve titers in het veld bekend is en dus niets over de sensitiviteit van de testen gezegd kan worden.

Zonder veldsera afkomstig van positieve dieren blijft de sensitiviteit van de testen onbekend en kan men de data eindeloos blijven afkappen voor het vastleggen van de specificiteit zonder de eigenschappen van de test in een veldsituatie ook maar bij benadering te kunnen beoordelen.

De testvalidatie blijft in gebreke wat betreft het leveren van een sensitiviteitsschatting, omdat de tot op heden gebruikte positieve controlesera afkomstig zijn van experimenteel geïnfecteerde varkens met titers die vele malen hoger zijn dan in het veld te verwachten en geen reële inschattingen van de sensitiviteit van de testen geven. Het opstellen van ROC curves zoals in het GD rapport gedaan is dan ook niet juist want het suggereert informatie over de sensitiviteit van de testen in het veld die er in werkelijkheid niet is. Om dit beter te onderbouwen zal eerst een cohort varkens uit een *Trichinella* endemisch gebied moeten worden onderzocht.

In tabel 1 zijn de cut-off waardes bij een veronderstelde specificiteit van 99.5% voor de ASG-SPR test bepaald m.b.v. de methodes zoals beschreven in 1a t/m 1c. De in 1a en 1b gevonden cut-off waardes worden ook toegepast op de set 1 uit het GD rapport⁹. Het wordt duidelijk dat het aantal positieven in GD set 1 (n=1000) afhankelijk van de toegepaste methode zeer verschillend uitvallen (er worden voor n=1000 b.v. 3 i.p.v. 5 waardes als positief afgekapt). Uit tabel 1 volgt dat 1a en 1c gelijke aantallen positieve monsters produceren (dat is logisch want het 99.5% percentiel is gebruikt als afkapwaarde) vergeleken met de methode 1b waarbij niet voor run of plaat effecten is gecorrigeerd. Uit figuur 2 en figuur 4 en tabel 1 wordt wel duidelijk dat door methodes 1a en 1c verschillende waardes per run afgekapt worden (z. o. de cirkeltjes in beide figuren). Methode 1b produceert bijzonder veel positieven onder aanname van een normale verdeling van de LN(Rresp) data. Het mixed model in methode 1c heeft als bijkomend voordeel dat de positieven per run afgekapt worden nadat voor het niveau per run gecorrigeerd is terwijl de data log-getransformeerd zijn zodat de aanname van de normale verdeling goed te verdedigen is (z.o. de twijfels over de aannames over de normale verdeling van de data en het “vissen in de staarten” onder 1b). De bepaling van een cut-off waarde zal discussie blijven opleveren en de voorgestelde methode m.b.v. een mixed model is wellicht de beste oplossing gezien de omstandigheden oftewel “het kleinste euvel”.

De zoektocht naar de beste methode voor de bepaling van de cut-off waarde onderstreept nog eens het advies om methodes ter bepaling van testuitslagen zonder cut-off waardes te overwegen. Voor het geval dat er **met** cut-off waardes gewerkt zal worden zou methode 1c, het mixed model, de voorkeur voor de bepaling van de cut-off waarde moeten krijgen om zo een correctie voor het verschil tussen runs of platen in de berekeningen te betrekken.

⁹ Methode 1c (mixed model) is niet op de data set 1 van het GD rapport toegepast omdat er geen informatie over de controle sera aanwezig was. De implicaties van het mixed model voor de cut-off waarde en het aantal positieve observaties worden reeds uit de data set met n=1104 duidelijk.

Methode	Cut-off waarde 99.5% percentiel	# pos. voor n=1104	# pos. voor set 1, n=1000 (GD-rapport)	
1a (percentielen)	191 RU/12%PP	Totaal : 5 run1: 0 run2: 1 run3: 1 run4: 1 run5: 1 run6: 1	3	
1b (normaalverdeling)	147 RU/ 8%PP	27	12	
1c (mixed model voor de log- getransformeerde data gecorrigeerd voor de negatieve controles per run en normaalverdeling)	Overall: 1.17 run1: 1.26 run2: 0.99 run3: 1.51 run4: 1.07 run5: 1.40 run6:1.36	Totaal: 5 run1: 1 run2: 0 run3: 1 run4: 1 run5: 1 run6: 1	Niet gedaan, z. voetnoot 8	

tabel 1: cut-off waarden voor de ASG-SPR data bepaald in 1a t/m 1c toegepast op de data set 1 uit het GD rapport bij een vastgelegde specificiteit van 99.5%

3- de steekproefgrootteberekening voor het aantonen van de “freedom-of-infection status” waarbij ervan uitgegaan wordt dat in Nederland als Trichinella vrij gebied¹⁰ max. 0.001%¹¹ van de bedrijven besmet zijn (zgn. bedrijfsprevalentie; de werkelijke bedrijfsprevalentie is veel kleiner, namelijk zelfs <0.00001%) terwijl men aanneemt dat <1% van de varkens op een positief bedrijf besmet zijn; zgn. dierprevalentie).

Een open vraag is: wat is de blootstelling van de Nederlandse consument aan Trichinella larven in werkelijkheid voor het geval dat de bedrijfsprevalentie een van de bovengenoemde waarden aanneemt? En welke serotiters en aantallen larven/g spierweefsel corresponderen met dit besmettingsniveau in de varkenspopulatie?

¹⁰ Trichinella vrij gebied volgens: Annex V (Trichinella infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004)

¹¹ De prevalentie van positieve bedrijven in Nederland is zo goed als 0 en de tijdens screening gevonden waarde van < 0.5% zou een indicatie voor de ruis van vals positieve testresultaten kunnen zijn (bepaald met de RIVM ELISA test gebruikmakend van een oude verdunning van het serum van 1/20 terwijl inmiddels een verdunning van 1/100 gehandhaafd wordt en minder ruis gevonden is; bron: Joke van der Giessen: recente RIVM studie van 2005)

Met het oog op het besmettingsrisico voor de mens op welk niveau (landelijk, bedrijfs- of individueel niveau) zou een surveillance systeem moeten monitoren om freedom-of-disease voor de mens te garanderen?

Een aanzet tot antwoorden op deze vragen is:

Men kan op dit moment ervan uitgaan dat de Nederlandse consument niet aan *Trichinella* blootgesteld wordt gezien het feit dat al 50 jaar lang zo goed als geen positieve slachtvarkens gevonden zijn en geen autochtone gevallen van trichinellose bij de mens geconstateerd zijn die in Nederland zijn opgelopen. Dosis respons onderzoek in diermodellen en velddata zou informatie over de relatie tussen infectiedosis en besmettingniveau bij varkens en b.v. ratten kunnen leveren. Dat zijn zeer kostbare experimenten, die echter voor het opzetten van een surveillance systeem van grote waarde zouden zijn. In 2006 zal een Europees project starten (Trichimed) waarbij juist bovenstaande onderwerpen zoals de dosis respons modellering in knaagdieren en de modellering van de transmissie van wild naar varkens en de mens worden geanalyseerd. Het RIVM heeft een trekkende rol bij dit onderwerp.

Er is een notitie met adviezen over steekproefgroottes voor het opstellen van een surveillance systeem opgemaakt en (reeds in Oktober 2005) aan de opdrachtgever verstuurd. Deze notitie richt zich op de nieuwe EU richtlijn Annex V (*Trichinella* infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004).

De notitie maakt duidelijk dat bij zeer lage bedrijfsprevalenties, zo als 0.001% of lager¹² een surveillance gebaseerd op screening op bedrijfsniveau slechts voldoende garanties biedt wanneer alle varkens per bedrijf worden getest. Onder aanname dat Nederland één samenhangend *Trichinella*-vrij gebied is (volgens de nieuwe EU richtlijn zou in een *Trichinella*-vrij gebied 10 jaar lang geen positief bedrijf meer gevonden zijn en dat is voor Nederland niet 100% het geval) zouden minimaal 300.000 varkens per jaar aan de slachtlijn getest moeten worden om bij een bedrijfsprevalentie van 0.001% of hoger met 95% kans positieve varkens te kunnen signaleren. Voor details van de methode voor de berekening z. appendix 2.

Omdat het samenspel van bedrijfsprevalenties, bedrijfsomvang en diagnostische testparameters gevolgen heeft voor het opstellen van een surveillance systeem wordt in het vervolg een simulatie systeem uitgewerkt dat de discussie over het surveillance systeem op bedrijfsniveau als besluitkader vergemakkelijkt en de samenhangen tussen testparameters op individueel dier- en op bedrijfsniveau illustreert.

4- het opstellen van de raamvoorwaardes voor een surveillance systeem voor het aantonen van de “freedom-of-infection”status m.b.v. van een imperfecte test in een populatie met lage prevalentie

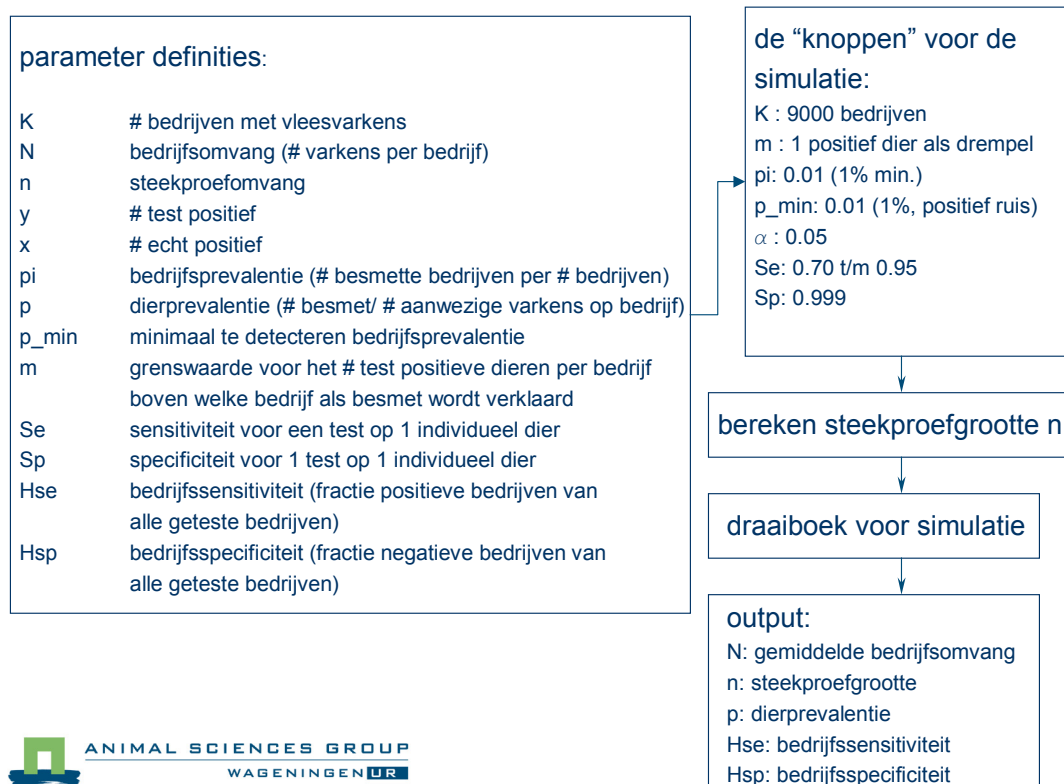
Het verband tussen de blootstelling van de mens aan *Trichinella* larven, zijn kans op besmetting en ziekte en de werkelijke bedrijfsprevalentie in Nederland vormt het kader voor het opstellen van een surveillance systeem op bedrijfsniveau. Dit surveillance systeem beschrijft een bemonsteringsstrategie aan de slachtlijn en de berekening van de nodige steekproefgroottes voor (sero)monitoring. Ter illustratie en discussie van de randvoorwaardes voor een dergelijk surveillance systeem is een simulatie systeem met

¹² bedrijfsprevalentie: het % *Trichinella* postieve bedrijven in Nederland

aannames over bedrijfsprevalenties, bedrijfsomvang en diagnostische testparameters ontwikkeld. Het simulatie systeem wordt in 2005 onder vele aannames ontwikkeld en zal in 2006 met werkelijke waarnemingen en test parameters worden aangevuld en verbeterd worden. Dit simulatie systeem kan als model voor de surveillance van *Trichinella* in Nederland en de EU gebruikt worden. Na een aanpassing is het surveillance systeem ook voor andere infectieziektes van toepassing.

De details over de opzet van het simulatie systeem staan in appendix 3. Kort samengevat werken de volgende delen samen om de steekproefgrootte en output voor het *Trichinella* surveillance systeem te simuleren, (z. figuur 5):

definities van de parameters als onderdelen van het systeem, vastlegging van een selectie aan parameters als input voor de simulatie (de zgn. “knoppen” voor de simulatie), de berekening van de steekproefgrootte n (z. figuur 6 en toelichting hieronder), een draaiboek voor de simulatie (z. figuur 7) en de output (z. tabel 2).



figuur 5: de opbouw van het simulatie systeem met als onderdelen: de parameter definities, de voor een simulatie vast te leggen parameters (de “knoppen”), het moment van de steekproefgrootte berekening, het draaiboek voor de simulatie en het output van de simulatie

Het gesimuleerde surveillance systeem maakt gebruik van de formule voor de steekproefgrootte zoals die staat in Dohoo et al. 2003 (z. figuur 6) en een op kansverdelingen gebaseerde kader voor de raamvoorwaardes van een surveillance systeem. Dit surveillance systeem is gericht op het aantonen van de “freedom-of-

infection" status zoals o.a. voorgesteld door J. Dewulf/Universiteit Ghent/B tijdens de SVEPM 2005.¹³

Berekening van de steekproefgrootte n:
(Dohoo et al. 2003)

$$n = \left(1 - \alpha^{\frac{1}{N p_{\min}}} \right) \left(1 - \frac{N p_{\min} - 1}{2} \right)$$

n = steekproefomvang,
 N = omvang van het bedrijf (dus, $n \leq N$)
 p_{\min} = een zekere minimale te detecteren bedrijfsprevalentie
 $1 - \alpha$ = vereiste betrouwbaarheid,



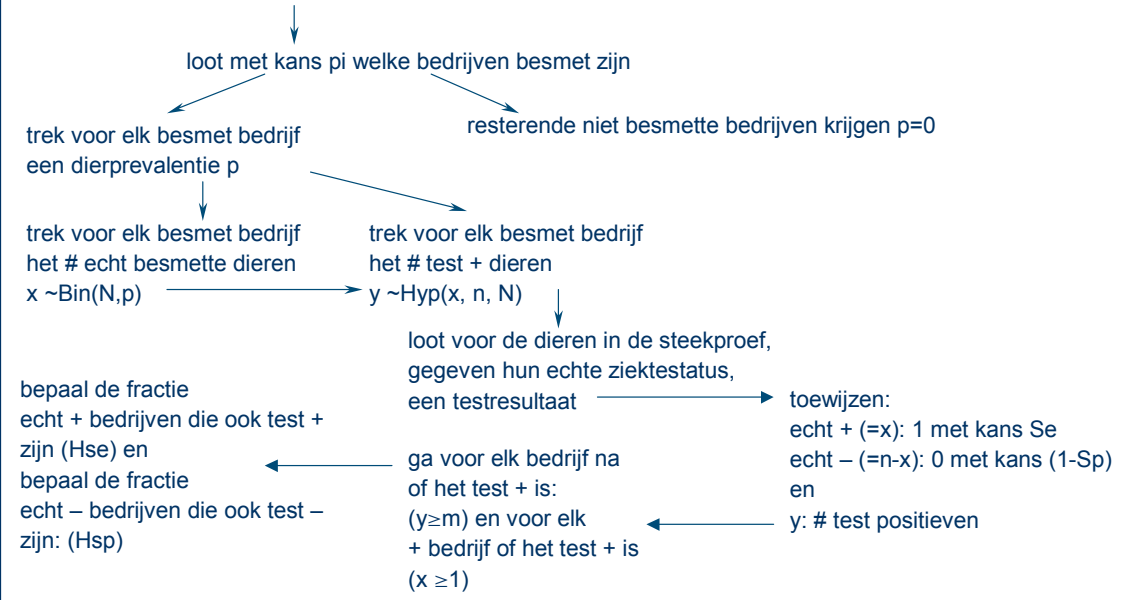
figuur 6: de berekening van de steekproefgrootte n met het doel om op een bedrijf met grootte N met een vereiste betrouwbaarheid ($1-\alpha$) een minimale bedrijfsprevalentie p_{\min} aan te kunnen tonen

¹³ Jeroen Dewulf is bereid om mee te denken tijdens het aanpassen van zijn surveillance systeem aan de huidige vraagstelling. Bas Engel heeft het systeem van Dewulf et al. 2005 geëvalueerd en aangepast aan de vraagstelling en de beschikbare informatie tijdens het huidige Trichinella project .

Draaiboek voor simulatie:

wat gebeurt er tijdens een simulatie?

trek K keer ($K=9000$) een bedrijfsomvang uit een verdeling ($\text{Ln}(N) \sim N(5.6, 1.4757)$)



figuur 7: het draaiboek voor de simulatie; de pijlen geven de volgorde voor de acties tijdens de simulatie aan

Een proefsimulatie is uitgevoerd met behulp van de beschikbare data om de samenhang in de opbouw te illustreren en eerste conclusies over de randvoorwaarden voor het op te stellen surveillance systeem te trekken.

Aangenomen zijn (z. figuur 5):

K: het aantal bedrijven met slachtvarkens: 9000 (dit getal komt ongeveer overeen met de gegevens van CBS uit 2004; er is geen rekening gehouden met hobby houders)

- m: 1 positief dier wordt als drempel vastgelegd voor het positief verklaren van een besmet bedrijf
- p_i : ware bedrijfsprevalentie is vastgelegd op 1% (in werkelijkheid is dat veel kleiner, maar dit is een beginwaarde voor de simulatie)
- p_{\min} : minimaal 1% positieve bedrijven zouden gedetecteerd moeten kunnen worden (ook deze beginwaarde is veel hoger dan de door de nieuwe EU regelgeving aangehouden 0.001% bedrijfsprevalentie, maar komt ongeveer overeen met de te verwachten 'ruis' voor de testen)
- S_p : wordt één keer in eerste instantie vastgezet op 99.5% (zo als in deze studie verondersteld) en in tweede instantie op 99.9%
- S_e : de individuele test sensitiviteit loopt op van 70% t/m 95% met stappen van 5% en van 95% t/m 99% met stappen van 1%

De uitkomsten van een eerste simulatie staat in tabel 2 hieronder.

Output van de simulatie onder aanname van K, m, pi, p_min, α , Se en Sp:
(de zgn. "knoppen" in figuur A)

K	m	pi	p_min	alpha	Se	Sp	test positief	echt positief	fractie test		p	N	n
									pos. Hse	neg. Hsp			
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.7000	0.9950	4963.24	74.50	0.912	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.7500	0.9950	4964.10	74.50	0.923	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.8000	0.9950	4964.91	74.50	0.934	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.8500	0.9950	4965.64	74.50	0.944	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9000	0.9950	4966.35	74.50	0.954	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9500	0.9950	4966.97	74.50	0.962	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9600	0.9950	4967.09	74.50	0.964	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9700	0.9950	4967.21	74.50	0.965	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9800	0.9950	4967.33	74.50	0.967	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9900	0.9950	4967.45	74.50	0.968	0.452	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.7000	0.9990	1462.94	74.50	0.827	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.7500	0.9990	1464.58	74.50	0.849	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.8000	0.9990	1466.08	74.50	0.870	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.8500	0.9990	1467.40	74.50	0.887	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9000	0.9990	1468.72	74.50	0.905	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9500	0.9990	1469.89	74.50	0.921	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9600	0.9990	1470.10	74.50	0.924	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9700	0.9990	1470.31	74.50	0.926	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9800	0.9990	1470.52	74.50	0.929	0.843	0.01	586.74	173.74
9000	1	0.01	0.010	0.05	0.9900	0.9990	1470.73	74.50	0.932	0.843	0.01	586.74	173.74



tabel 2: output van een eerste simulatie voor K=9000 slachtvarkensbedrijven onder aanname van een minimaal te detecteren bedrijfsprevalentie $p_{min}=0.01$ (1% positieve bedrijven) en een minimaal te detecteren bedrijfsprevalentie van $\pi=0.01$ (1% positieve bedrijven) met een drempelwaarde van 1 positief dier om een bedrijf als positief te verklaren, de aangenomen individuele test sensitiviteit en specificiteit, de output voor de gemiddelde aantallen test positieve en waar positieve dieren, de berekende bedrijfssensitiviteit en bedrijfsspecificiteit (Hse: herd sensitivity en Hsp: herd specificity), N: de berekende gemiddelde bedrijfsgrootte N en n: de berekende gemiddelde steekproefgrootte per bedrijf

De met behulp van het simulatie systeem gegenereerde aantallen zijn niet als absolute waarden te beschouwen maar geven een orde van grootte en de verhoudingen tussen de aantallen weer. Een belangrijke maar niet verrassende uitkomst van de simulatie is dat bij een surveillancesysteem gebaseerd op bedrijfsniveau onder aanname van een vele malen hogere bedrijfsprevalentie (1% positieven i.t.t. de 0.001% onder 3) het aantal te testen slachtvarkens per jaar met gemiddeld: $173.74 * 9000 = 1.563.660$ ruim 5 maal hoger ligt dan de ongeveer 300.000 varkens die onder 3 uit de steekproefgrootte berekening op regionaal niveau komen. Bij een surveillance systeem gebaseerd op het bemonsteren op regionaal niveau wordt de kans dat positieve bedrijven gevonden worden zeer gering.

Verder blijft bij een individuele test specificiteit vastgesteld op 99.9% en een oplopende individuele sensitiviteit van 70% t/m 99% de bedrijfssensitiviteit tussen de 82.7% en 93.2% hangen, d.w.z. dat maar 82.7 à 93.2% van de positieve bedrijven gevonden zullen worden (dit voor een grenswaarde voor het positief verklaren van een bedrijf van 1

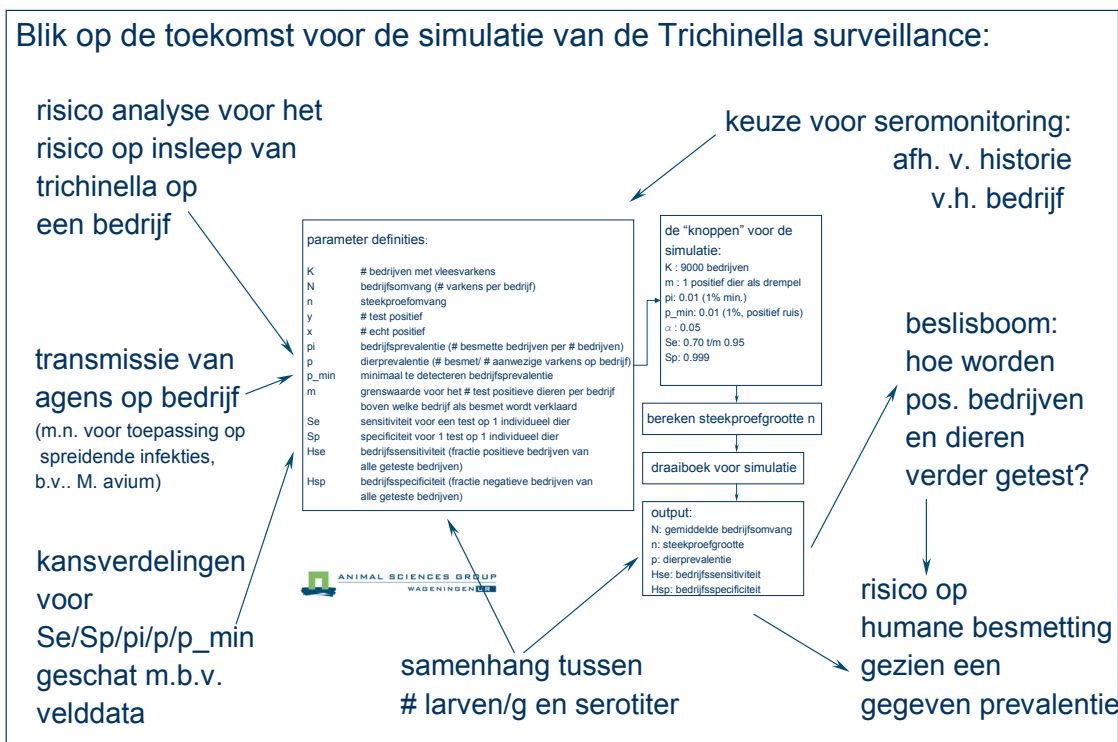
positief dier, de hogere grenswaarden voor m leveren nog lagere bedrijfssensitiviteiten op terwijl voor $m=5$ de bedrijfsspecificiteit naar 99.6% stijgt; de data voor $m=5$ worden in tabel 2 niet getoond). Dit maakt duidelijk dat in 2006 een beslisboom ontwikkeld moet worden, die bepaalt hoe positieve bedrijven en positieve individuele dieren verder getest moeten worden. Het is duidelijk dat hoe groter de individuele test sensitiviteit en hoe kleiner de individuele test specificiteit zijn hoe meer vals positieve varkens er gedetecteerd worden.

Het doel van het surveillancesysteem op bedrijfsniveau is de garantie van “freedom-of-infection” en de inperking van het aantal individueel te testen varkens. Dat zou kunnen geschieden via de selectie van te testen bedrijven gebaseerd op een risico assessment voor bedrijven met risico op besmetting met trichinellose terwijl er een versoepeling van de teststrategie voor bedrijven met een negatieve bedrijfshistorie van toepassing zou kunnen worden. Daarom is het surveillance systeem met de diagnostische testparameters niet van de beslissingen over de uitkomsten van de testen te scheiden en moeten er boven op de hier besproken raamvoorwaardes aanvullende criteria voor de effectieve surveillance vastgelegd worden.

In de toekomst zullen de volgende onderdelen aan het simulatie systeem toegevoegd worden (z. figuur 8):

- Risico assessment voor het risico op insleep van *Trichinella* larven zodat een besmet bedrijf ontstaat
- De selectie van bedrijven voor sero-monitoring zal afhankelijk van de bedrijfshistorie gemaakt worden
- Een beslisboom zou ontwikkeld moeten worden over hoe positieve bedrijven verder getest (hertesten, combinatie van testen etc.) moeten worden in afhankelijkheid van de bedrijfshistorie, het risico op insleep en het besmettingsrisico voor de mens uitgaande van het positieve bedrijf
- Verwerken van diagnostische testparameters geschat uit velddata
- De samenhang tussen besmettingsgrade (b.v. # larven/g spierweefsel) en de verdeling van serotiters in besmette slachtvarkens m.b.v. een dose response onderzoek
- Een risico assessment voor het besmettingsrisico voor de mens uitgaande van een bepaalde (sero)prevalentie binnen een bedrijf (dierprevalentie) en tussen bedrijven (bedrijfsprevalentie)
- Ook kan het systeem rekening houden met de transmissie van de infectie binnen een bedrijf en tussen bedrijven, dat is voor *Trichinella* infecties niet zo relevant, omdat het vaak puntbesmettingen zijn die niet of zeer beperkt spreiden (dit i.t.t. ander infectieziektes zo als *M. avium spp. avium* waar het transmissie proces een grote invloed op de variatie in prevalenties kan hebben)

Één manier om deze uitbreiding op het surveillance simulatie systeem aan te brengen is de vertaling ervan in een Bayesiaanse methode van surveillance simulatie waarbij de stochasticiteit van de variabelen beter te bepalen valt.



figuur 8: samenhangen tussen het ontwikkelde simulatie systeem voor de surveillance van *Trichinella spiralis* infecties en een blik op toekomstige uitbreidingen afhankelijk van velddata, toegevoegde informatie en risico analyses

Dit aangevulde simulatie systeem kan als besliskader dienen om risk-based monitoring op *Trichinella spiralis* infecties in Nederland te plannen, te berekenen en uit te voeren. Een voordeel van dit systeem is dat het direct naar andere vraagstellingen vertaald kan worden zoals b.v. het monitoring op *Mycobacterium avium* infecties bij varkens.

III Tot slot - Conclusies

De adviezen voorkomend uit dit rapport zijn bedoeld om duidelijk te maken dat het huidige project over de test validatie en het vaststellen van raamvoorwaarden voor een surveillance systeem voor *Trichinella spiralis* infecties in Nederlandse slachtvarkens nog lang niet afgesloten kan worden omdat er cruciale informatie over diagnostische test parameters, beslisbomen en risico analyses ontbreken. Desondanks zijn er een aantal waardevolle adviezen en opmerkingen uit voort gekomen die samenvattend vooraf aan het rapport gesteld zijn met de bedoeling om de toekomstige data analyse en beslissingen over de surveillance te vergemakkelijken. De appendices helpen de geïnteresseerde lezer aan informatie over de nodige details van de gemaakte berekeningen.

IV Literatuur:

Annex V (*Trichinella* infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004), z.o. bijlage

H.M.J.F. van der Heijden, J.W.B. van der Giessen, C.B.M. Maassen, M.T.M. Fonville, R.P. Achterberg, H.W.A. van der Sande, P.J. van der Wolf, 2005. Evaluatie van serologische testen voor *Trichinella spiralis* bij slachtvarkens; rapport Gezondheidsdienst voor Dieren, 2005

Dohoo, I., W. Martin and H. Stryhn (2003). Veterinary Epidemiologic research. AVC Inc., Charlottetown, Prince Edwards Island, Canada. p.47

Teunis, P., Fonville, M., Eijck, I., Van der Giessen, J. Sero-surveillance for *Trichinella* infections in animal populations using a negative cohort as a reference. In voorbereiding.

V Appendices en bijlagen:

Appendix 1:

Details over het mixed model ter correctie van run effecten voor de ASG-SPR test

Appendix 2:

De steekproefgrootte notitie

Appendix 3:

Het simulatie systeem voor de *Trichinella* surveillance

Bijlagen:

1: De nieuwe EU richtlijn (annex V; *Trichinella* infestation as referred to in article 18 (9) and (10) of regulation (EC) No 854/2004)

2: De bijdrage van J. Dewulf et al. tijdens de SVEPM 2005 in Nairn/Scotland, UK is op aanvraag beschikbaar.