

Projectnr.: 71.532.01

Betrouwbaarheid en herhaalbaarheid microscopische analysemethode diermeel

Projectleider: J. de Jong

Rapport 99. 015

november 1999

Betrouwbaarheid en herhaalbaarheid microscopische analysemethode diermeel

H. van der Voet¹⁾, J. de Jong²⁾, V.G.Z. Pinckaers²⁾

¹⁾ Centrum voor Biometrie, CPRO-DLO

²⁾ Afdeling Kwaliteitsbewaking, RIKILT-DLO

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1999, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO).
Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (4x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

LNV/DL - T. Kampstra

LNV/DL - ir. G. de Peuter

LNV/DL - drs. M.H. van den Berg

LNV/VVM - drs. P.H. Draaisma

LNV/JZ - mr. K.P.R. Hoedelmans

RVV - drs. J. Borgmeier

RVV - C. Hagen

RVV - ing. D.D.J. van Deursen

AID - A.H.M. Schleedoorn

Productschap Diervoeder - drs. J.H.M. Kienhuis

Keuringsdienst Diervoedersector - ing. F. Mink

Europese Commissie, DG Health and Consumer Protection, Unit E1 – F. Verstraete

Rijksontledingslaboratorium Tervuren (België) – ir. K. Haustraete

VOORWOORD

In verband met het terugdringen van het risico voor Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) is op 1 maart 1999 de 'Regeling verbod diermelen in diervoeders' in werking getreden. De Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (RVV) verricht controles bij mengvoerbedrijven en rundveehouderijen, waarbij monsters worden genomen van herkauwersvoer. In de maanden maart, april en mei bevatte ongeveer 30 % van de monsters sporen van diermeel. De sporen van diermeel worden gevonden in zeer lage percentages die vermoedelijk worden veroorzaakt door minieme verontreiniging.

Een aandachtspunt bij de controle van de RVV waren verschillen in resultaten van de door de overheid en het bedrijfsleven ingeschakelde laboratoria. Ten dele kon dit verklaard worden door verschillen in de technische uitvoering van het microscopisch onderzoek, overigens binnen de marge van de Europese richtlijnen. Ten dele is het geconstateerde gebrek aan herhaalbaarheid inherent aan de statistische eigenschappen van de microscopische onderzoeksmethode. In dit rapport wordt op basis van statistische overwegingen en empirische demonstraties een onderbouwing gegeven van de feiten met betrekking tot betrouwbaarheid en herhaalbaarheid van de microscopische onderzoeksmethode.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij.

INHOUD	blz.
VOORWOORD	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 DE BEGRIPPEN BETROUWBAARHEID EN HERHAALBAARHEID	7
3 MOGELIJKHEDEN VOOR DE INRICHTING VAN CONTRA-EXPERTISEONDERZOEK	8
4 ILLUSTRATIE	9
5 EMPIRISCHE ONDERBOUWING VAN DE BETROUWBAARHEID	9
6 EMPIRISCHE DEMONSTRATIE VAN DE VARIABILITEIT VAN RESULTATEN VAN LAAG-GECONTAMINEERDE MONSTERS	10
7 DETECTEERBARE GEHALTEN BOTFRAGMENTEN IN DIERVOEDERS	11
8 CONCLUSIES	13

SAMENVATTING

Op basis van inschattingen van deskundigen en van statistische overwegingen wordt in dit rapport het volgende geconcludeerd:

- De microscopische methode is volledig betrouwbaar in die zin dat het onmogelijk is botfragmenten te detecteren in botfragment-vrij materiaal. Fout-positieve uitslagen zijn dus onmogelijk. Er bestaat wel een kans op fout-negatieve uitslagen (botfragmenten wel aanwezig, maar niet gedetecteerd). Deze foutkans is afhankelijk van het gehalte botfragmenten in het materiaal.
- Materiaal met tenminste ongeveer 0,01 % botfragmenten (100 parts per million, ppm) wordt met de door RIKILT gehanteerde microscopische methode in 95 % van alle gevallen positief bevonden. Dit betekent dat bij contra-expertise volgens dezelfde analysemethode een herhaald positief resultaat verwacht mag worden.
- Materiaal met ten hoogste ongeveer 0,0000005 % botfragmenten (0,05 ppm) wordt met de door RIKILT gehanteerde methode in 95 % van alle gevallen negatief bevonden. Dit volgt uit de statistische onwaarschijnlijkheid dat bij extreem lage gehalten in het materiaal er een botfragment onder de microscoop terecht komt. Bij herhaalde analyse mag opnieuw een negatief resultaat verwacht worden.
- In het tussenliggende gehaltegebied (grofweg tussen 0,05 en 100 ppm) kunnen met de microscopische analysemethode soms positieve en soms negatieve uitslagen verkregen worden. Per definitie zijn de positieve uitslagen correct en betrouwbaar (het gehalte aan botfragmenten is immers groter dan 0). De negatieve uitslagen zijn dus fout-negatieve uitslagen. Deze beperkte gevoeligheid van de methode bij zeer lage gehalten is normaal en onvermijdelijk, en geen reden de methode onbetrouwbaar te noemen. Een onvermijdelijke consequentie is wel dat de met de methode verkregen uitslagen bij deze lage gehalten niet altijd herhaalbaar zijn.
- Uit het bovenstaande volgt dat een contra-expertise onderzoek bij een gehalte van meer dan 0,01 % op de gebruikelijke wijze kan plaats vinden. Bij een lager werkelijk gehalte aan botfragmenten is de kans op een fout-negatieve uitslag aanmerkelijk. Daarom zal het dan nodig zijn meer monstermateriaal in onderzoek te nemen om de conclusie van het eerste onderzoek effectief te kunnen aanvechten.

De genoemde grenswaarde (0,01 %) is berekend uit een zeer beperkt aantal gegevens, en is daarom slechts indicatief. Voor een preciezere kwantificering is nader onderzoek nodig.

1 INLEIDING

De microscopische analysemethode voor bestanddelen van dierlijke oorsprong in diervoeders wordt door deskundigen als 100 % betrouwbaar beschouwd, maar door statistische fluctuaties kunnen positieve uitslagen van laag-gecontamineerde monsters soms niet herhaald worden bij enkelvoudig contra-onderzoek. Dit kan in eventuele rechtszaken tot verwarring leiden. In dit rapport wordt een onderbouwing gegeven van de feiten m.b.t. betrouwbaarheid en herhaalbaarheid van de microscopische analysemethode. Deze onderbouwing bestaat uit:

- Statistische onderbouwing van de gevolgde procedure waarbij de onvermijdelijkheid van slecht-herhaalbare resultaten van een analysemethode zonder fout-positieve resultaten wordt aangegeven.
- Aanbevelingen met betrekking tot de vormgeving van contra-expertise onderzoek waarbij door intensievere analyse positieve resultaten toch bevestigd kunnen worden.
- Empirische onderbouwing van de betrouwbaarheid, d.w.z. het ontbreken van fout positieve uitslagen.
- Empirische demonstratie van de variabiliteit van resultaten (gebrek aan herhaalbaarheid) van laag-gecontamineerde monsters.
- Een inschatting van de werkelijk detecteerbare gehalten botfragmenten voor de bij RIKILT-DLO gebruikte microscopische methode.

2 DE BEGRIPPEN BETROUWBAARHEID EN HERHAALBAARHEID

Het lijkt wellicht logisch dat een betrouwbaar analyseresultaat bij herhaalde analyse bevestigd moet kunnen worden. Andersom kan men zich de vraag stellen of een analyseresultaat dat bij herhaald onderzoek niet bevestigd wordt wel betrouwbaar kan zijn. Toch zijn betrouwbaarheid en herhaalbaarheid verschillende begrippen, en kan een analyseresultaat betrouwbaar, maar niet zonder meer herhaalbaar zijn, of omgekeerd.

Betrouwbaarheid heeft betrekking op het vermijden van fout positieve resultaten. De kans op een positieve uitslag bij analyse van een negatief monster met een betrouwbare analysemethode is zeer klein of nul. Hoe klein deze kans is, kan experimenteel worden ingeschat, of men kan zich baseren op de expertise van deskundigen. In het geval van de analyse van botfragmenten zal volgens deskundigen iets wat geen botfragment is nooit benoemd worden als botfragment. Derhalve is de kans op een fout positief resultaat in dit geval nul.

Herhaalbaarheid heeft betrekking op de constantheid van de meetresultaten in een reeks identieke analyses van hetzelfde materiaal. Bij kwantitatieve meetresultaten wordt herhaalbaarheid meestal gekarakteriseerd door een maat voor de spreiding van de resultaten, bijvoorbeeld de standaardafwijking. Bij kwalitatieve meetuitslagen (wel / geen bestanddelen van dierlijke oorsprong in het onderzochte monster) wordt herhaalbaarheid gekarakteriseerd door de kans op een positieve uitslag. Zowel een kans nabij 0 % als een kans nabij 100 % duidt op een grote herhaalbaarheid (resp. van negatieve en positieve resultaten), terwijl een kans van 50 % de slechtst mogelijke herhaalbaarheid impliceert.

In het algemeen gesproken geldt dat de herhaalbaarheid afhankelijk is van het gehalte van de gezochte component. Bij hoge gehalten zullen nagenoeg altijd dierlijke bestanddelen worden aangetroffen, dus de kans op een positief resultaat nadert dan tot 100 % en de herhaalbaarheid kan volledig worden genoemd. Bij zeer lage concentraties moet er gezocht worden naar een speld in een hooiberg. Derhalve nadert de kans op een positief resultaat tot 0 %, waarbij de herhaalbaarheid eveneens weer volledig is. Het is duidelijk dat er een tussenliggend traject van gehalten moet zijn waar de kans op een positief resultaat overgaat van 0 % naar 100 %. In dit gebied is de herhaalbaarheid van de analyse niet perfect.

Betrouwbaarheid en herhaalbaarheid hoeven niet samen te gaan. Een methode waarbij niet-dierlijke bestanddelen als dierlijk worden aangemerkt, kan heel goed herhaalbaar zijn (steeds dezelfde uitslag), maar is niet betrouwbaar. Voor de praktijk meer relevant is de omgekeerde situatie van een methode waarbij niet-dierlijke bestanddelen nooit voor dierlijk worden aangezien, maar waarbij het wel geregeld voorkomt dat lage gehalten van dierlijke bestanddelen gemist worden; een dergelijke methode is wel betrouwbaar, maar bij lage gehalten niet goed herhaalbaar. Door naar steeds lagere gehalten te kijken zal er altijd een gehaltetraject zijn, waar dit het geval is.

In veel gevallen van chemische analyse is een gering meetsignaal niet principieel te onderscheiden van de ruis. In die gevallen is het dus nodig om te bewijzen dat het meetsignaal significant groter is dan de ruis. Het gehalte waarbij het meetsignaal in (b.v.) 95 % van de gevallen significant boven de ruis uitsteekt is dan de aantoonbaarheidsgrens, en op dit niveau zal een betrouwbare analysemethode dan ook herhaalbare resultaten opleveren.

Bij de microscopische analyse van dierlijke bestanddelen in diervoeders is de situatie wezenlijk anders. Een klein signaal (nl. één botfragment) is hier wezenlijk anders dan andere bestanddelen (de 'ruis') die men onder de microscoop kan waarnemen. Het is dus niet nodig om aan te tonen dat het signaal 'statistisch significant groter is dan de ruis' (dit is zelfs geen zinvolle uitdrukking, omdat er geen onderliggende continue meetschaal is voor zowel signaal als ruis). Één botfragment dat met zekerheid worden aangemerkt als van dierlijke oorsprong, is voldoende om tot een positieve uitslag te besluiten. Maar dergelijke signalen zijn mogelijk bij alle gehalten waar de kans op een positief resultaat niet te verwaarlozen klein is, met name dus ook in het middengebied van gehalten, waar de herhaalbaarheid niet optimaal is.

3 MOGELIJKHEDEN VOOR DE INRICHTING VAN CONTRA-EXPERTISE ONDERZOEK

Veel wettelijke regelingen kennen de mogelijkheid van contra-expertise onderzoek. Bij monsternamen behoudt de eigenaar van het bemonsterde materiaal een deel van het monster. Als hij later de uitslag van de officiële keuring wil betwisten, kan hij het contramonster laten onderzoeken. Het is duidelijk dat de regelgever hierbij is uitgegaan van herhaalbaarheid van de analysemethode. Alleen dan immers kan men verwachten dat eerste analyse en heranalyse in principe tot dezelfde conclusie leiden, zodat een afwijkende uitslag van de heranalyse de geldigheid van de eerste analyse ter discussie stelt.

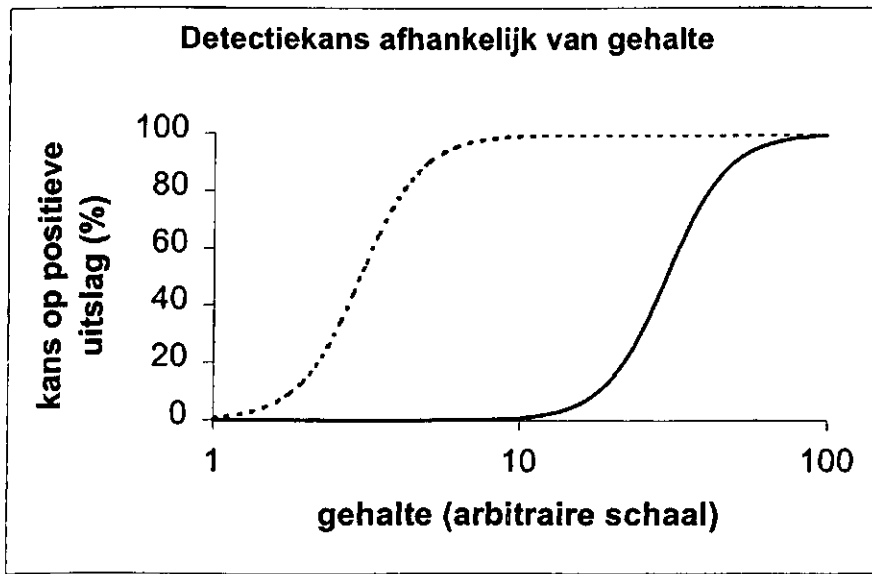
Zoals boven is aangegeven, wijkt de analyse van dierlijke bestanddelen in diervoeders af van de gangbare situatie, met als gevolg dat betrouwbare uitslagen niet persé goed herhaalbaar hoeven te zijn. Voor de juridische gang van zaken kan het echter onacceptabel zijn als er geen mogelijkheid tot contra-expertise onderzoek bestaat. Gelukkig kan het contra-expertise onderzoek anders worden ingericht, zodanig dat wel een herhaalbaar resultaat van een positieve uitslag verwacht mag worden. Door een veelvoud van de hoeveelheid monstermateriaal te onderzoeken, kan de gevoeligheid van de analysemethode naar believen vergroot worden. Hiermee kan bereikt worden dat de kans op een positief resultaat bij het op grond van het eerste onderzoek geschatte gehalte toeneemt tot nagenoeg 1.

Voorbeeld 1: Stel bij het eerste onderzoek wordt één botfragment gezien. Het is duidelijk dat er geen zekerheid bestaat dat bij een herhaalde analyse weer botfragmenten worden gezien. Door bij een eventueel contra-expertise onderzoek analyse van een grotere hoeveelheid materiaal verplicht te stellen (b.v. 10 porties van 10 g in plaats van 1 portie van 10 g) wordt het verwachte aantal botfragmenten vergroot (in dit voorbeeld van 1 naar 10) en wordt het, bij correcte uitvoering van beide analyses, onwaarschijnlijk dat er geen enkel botfragment zal worden gevonden.

Voorbeeld 2: Stel bij het eerste onderzoek worden meer dan 100 botfragmenten gezien. In dit geval is er geen onzekerheid over de uitslag van een herhaalde analyse, en kan de contra-expertise op dezelfde hoeveelheid monstermateriaal worden gebaseerd.

4 ILLUSTRATIE

Een illustratie van de herhaalbaarheid van kwalitatieve methoden wordt gegeven in onderstaande figuur. De doorgetrokken curve geeft de detectiegrens van werkelijk positieve monsters weer in afhankelijkheid van het gehalte. In dit (fictieve) voorbeeld zijn analyses van monsters met een gehalte tussen ongeveer 10 en ongeveer 100 niet volledig herhaalbaar: de uitslag zal soms positief, soms negatief zijn.



Bij een eerste onderzoek kunnen drie typen resultaat worden gevonden:

1. een positieve uitslag met een geschat gehalte ≥ 100 . De methode is voor dit soort gehalten goed herhaalbaar, en dus kan bij contra-expertise onderzoek ook volstaan worden met onderzoek aan de normale hoeveelheid monstermateriaal.
2. een positieve uitslag met een geschat gehalte tussen 10 en 100. De methode is voor dit soort gehalten niet goed herhaalbaar. Door bij contra-expertise onderzoek 10 maal de normale hoeveelheid monstermateriaal te onderzoeken wordt de gevoeligheid van de methode met een factor 10 verbeterd. Dit houdt in dat de curve die de kans op een positief resultaat weergeeft verschuift naar lagere waarden (zie de onderbroken lijn in de figuur). In het gebied 10-100 is deze intensievere methode goed herhaalbaar.
3. een negatieve uitslag, waarbij uiteraard contra-expertise onderzoek niet aan de orde is. In dit voorbeeld is een negatieve uitslag goed mogelijk voor alle monsters met een werkelijk gehalte lager dan ongeveer 100.

5 EMPIRISCHE ONDERBOUWING VAN DE BETROUWBAARHEID

De betrouwbaarheid, d.w.z. het ontbreken van fout positieve resultaten is onderzocht door een partij maïsglutenvoer een groot aantal keren ($n = 40$) te onderzoeken. Vooraf waren 10 porties van 10 g van dit product onderzocht en negatief bevonden zodat voldoende zekerheid bestond dat het maïsglutenvoer geen botfragmenten bevatte.

De 40 porties zijn onafhankelijk van elkaar gemalen en vervolgens onderzocht op aanwezigheid van botfragmenten. Dit onderzoek (malen en analyseren) werd verricht verspreid over 5 aansluitende werkdagen. Het doel ervan was om uit te sluiten dat negatieve monsters binnen het laboratorium (inclusief de monstervoorbewerking) gecontamineerd kunnen worden met botfragmenten waardoor fout positieve resultaten verkregen kunnen worden. Tijdens bovengenoemde periode werden 48 praktijkmonsters diervoeders in behandeling genomen in de

monsterkamer waarvan 3 monsters sporen diermeel bevatten (de volledige samenstelling van de producten die door het RIKILT onderzocht worden is niet altijd bekend; het is dus mogelijk dat er in genoemde periode nog meer diermeel-bevattende producten in behandeling genomen zijn). In geen enkele van de 40 porties werden botfragmenten aangetroffen. Dit resultaat ondersteunt de mening van deskundigen dat de microscopische analysemethode betrouwbaar is.

6 EMPIRISCHE DEMONSTRATIE VAN DE VARIABILITEIT VAN RESULTATEN VAN LAAG-GECONTAMINEERDE MONSTERS

Drie monsters die bij voorafgaand onderzoek positief waren gebleken en waarin geringe aantallen botfragmenten waren aangetroffen ("een enkel botfragment") zijn opnieuw onderzocht in vijfvoud, d.w.z. dat van elk monster 5 maal een portie van 10 g is onderzocht volgens de normale procedure. Elk sediment is volgens de standaard procedure op twee verschillende wijzen onderzocht:

Macro = vergroting 16X, gehele sediment bekeken

Micro = vergroting 200X, per sediment twee preparaten van samen ongeveer 50 mg bekeken (ongeveer 1/3 van gehele sediment).

Onderstaand is het aantal botfragmenten vermeld dat bij de vijf bepalingen werd aangetoond. Tevens zijn tussen haakjes de geschatte oppervlakten per botfragment (in vierkante micrometers) vermeld.

Monster 99/9920:

1. geen botfragmenten
 2. micro. 3 (90, 200, 300)
 3. micro. 4 (300,30,50,8)
 4. micro. 2 (60,48)
 5. micro. 9 (gem.150, individuele waarden niet geregistreerd)
- Gemiddeld aantal botfragmenten: 0 macroscopisch, 3,6 microscopisch

Monster 99/10706

1. macro 1 (opp. niet geregistreerd, geschat 4500*), micro 2 (600,150)
2. micro. 1 (300)
3. micro. 1 (200)
4. macro 1 (opp. niet geregistreerd, geschat 4500*), micro geen
5. micro. 1 (400)

Gemiddeld aantal botfragmenten: 0,4 macroscopisch, 1 microscopisch

* gemiddelde oppervlakte van macroscopische botfragmenten in monster 99/10973

Monster 99/10973

1. macro 1 (5400), micro 4 (450,120,150,700)
 2. macro 1 (6250), micro 1 (150)
 3. macro 2 (7500,1000), micro 1 (200)
 4. macro 3 (5400,4000,1500), micro 1 (300)
 5. macro 1 (4500), micro 2 (150,500)
- Gemiddeld aantal botfragmenten: 1,6 macroscopisch, 1,8 microscopisch

Ten behoeve van een gehalteschatting is de relatie tussen waargenomen oppervlak en gewicht grofweg bepaald via waarneming en weging van 10 grote botfragmenten. Gemiddeld was één

groot botfragment 6500 μm^2 groot en 100 μg zwaar. Uitgaande van een vaste vorm geeft dit de relatie:

$$\text{gewicht in } \mu\text{g} \approx 0,0002 \times (\text{oppervlak in } \mu\text{m}^2)^{3/2}$$

Rekening houdend met het feit dat microscopische analyse aan slechts 1/3 van het gehele sediment wordt gedaan, leidt dit tot de volgende schattingen van het gehalte botfragmenten:

Monster	gehalte botfragmenten (ppm)	herhaalbaarheid
99/9920	2	4/5 positief, 1/5 negatief
99/10706	14	5/5 positief
99/10973	55	5/5 positief

Het monster 99/9920, met een op basis van de oppervlakten geschat gehalte van ca. 2 ppm, werd 4 maal positief en 1 maal negatief bevonden.

Monster 99/10706, met een geschat gehalte van ca. 14 ppm, werd alle 5 keer positief bevonden via macroscopische (2 van de 5) en/of microscopische waarneming (4 van de 5). Gezien de lage aantallen botfragmenten lijken negatieve uitslagen zonder meer verwacht te moeten worden in een langere reeks herhalingen.

Alleen bij monster 99/10973, met een geschat gehalte van 55 ppm, werden zowel macroscopisch als microscopisch in alle 5 herhalingen botfragmenten gezien. Toch zijn de waargenomen aantallen botfragmenten ook voor dit monster nog laag, en zou een herhaalde analyse waarbij geen enkel botfragment wordt gezien niet vreemd zijn..

De waarnemingen maken tevens duidelijk dat de verhouding tussen macroscopisch waarneembare en microscopisch waarneembare botfragmenten verschilt tussen de monsters, in ieder geval tussen het eerste monster en de twee laatste.

7 DETECTEERBARE GEHALTEN BOTFRAGMENTEN IN DIERVOEDERS

De door RIKILT-DLO gebruikte microscopische methode is zeer gevoelig, en lijkt in staat om gehalten vanaf ongeveer 0,01 % g/g (100 ppm) botfragmenten betrouwbaar en herhaalbaar te detecteren. Voor monsters met een lager gehalte botfragmenten, tussen ongeveer 0,1 ppm (10^{-5} % g/g) en ongeveer 0,01 % g/g, zijn positieve uitslagen wel betrouwbaar, maar niet altijd goed herhaalbaar. Beneden 10 ppb is de kans op een positief resultaat nagenoeg nul. De genoemde waarden zijn uitsluitend indicatief, want gebaseerd op zeer weinig empirische gegevens en zeer eenvoudige modellering.

De gevoeligheid van de methode is afhankelijk van de deeltjesgrootteverdeling, en deze weer van het type diervoeder. Via nader validatie-onderzoek zou per type diervoeder de gevoeligheid beter bepaald moeten worden.

In het onderstaande wordt aangegeven hoe de grenswaarden zijn afgeleid. Hierbij is er vanuit gegaan dat botfragmenten in een microscopisch preparaat altijd goed herkenbaar zijn.

Bij het microscopische onderzoek wordt 10 g (10.000 mg) monstermateriaal ingewogen, waarvan ongeveer 150 mg sedimenteert in tetrachloorethyleen. De botfragmenten zijn nu aanwezig in het sediment, in een concentratie die ongeveer een factor $10.000/150 = 67$ hoger is dan in het oorspronkelijke monster.

Een enkel botfragment heeft een oppervlakte van ongeveer $250 \mu\text{m}^2$ en een gewicht van ongeveer 4 μg . Dit betekent bijvoorbeeld dat bij een gehalte van 67 ppm in het sediment (1 ppm in het

oorspronkelijke monster), een sediment van 150 mg ongeveer 2,5 botfragmenten bevat ($67 \cdot 10^{-6} \times 37500$ deeltjes van $4 \mu\text{g}$).

Bij een gehalte van 1 ppm in het monster worden dan gemiddeld ongeveer 0,84 botfragmenten onder de microscoop verwacht. Evenzo worden gemiddeld ongeveer 8,4 botfragmenten verwacht bij een gehalte van 10 ppm, 84 botfragmenten bij een gehalte van 100 ppm (0,01 %), en slechts 0,08 bij een gehalte van 0,1 ppm.

Intuïtief is wellicht reeds duidelijk dat de analyse op het 100 ppm niveau goed herhaalbaar is, terwijl dit niet het geval is bij een gehalte van 1 ppm, waarbij de aanwezigheid onder de microscoop van een botfragment niet zeker is. De redenering kan verfiend worden door rekening te houden met statistische fluctuaties. Allereerst is er de variatie tussen tellingen aan herhalingen van dezelfde procedure (Poisson-variantie). Op basis hiervan kan bijvoorbeeld berekend worden dat er bij een gehalte van 1 ppm (gemiddeld 0,83 botfragmenten onder de microscoop) 44 % kans is dat in een gegeven analyse geen enkel botfragment onder de microscoop verschijnt. De overgang van 0 % kans naar 100 % kans wordt tamelijk snel gemaakt (zie tabel)

Maar de werkelijke variatie zal nog groter zijn dan alleen de Poisson-variantie doordat het sedimentgewicht (150 mg), het botfragmentgewicht ($4 \mu\text{g}$) en de onder de microscoop bekeken hoeveelheid sediment (50 mg) geen constanten zijn, maar zelf ook aan variatie onderhevig. Met name de spreiding in grootte van de botfragmentgewichten is van de belang, de twee andere factoren zijn veel minder variabel. Botfragmentgewichten variëren van $0,005\text{-}3 \mu\text{g}$ in monster 99/9920, en van $0,8\text{-}130 \mu\text{g}$ in monster 99/10973 (monster 99/10706 blijft hier buiten beschouwing, omdat de oppervlakten van de macroscopisch waargenomen fragmenten niet zijn geregistreerd). De variatiecoëfficiënt (vc) van botgewichten binnen een monster is op basis van de beschikbare gegevens ongeveer 130 %. Deze spreiding kan gecombineerd worden met de Poisson-variantie door gebruik te maken van een negatief-binomiale verdeling met gamma-index $1/vc^2$.

Dit levert dan de resultaten in de volgende indicatieve tabel:

% bot	ppm bot	verw.aantal	Poisson		negatief binomiaal	
			p0	p1	p0	p1
0.00000010	0.001	0.001	0.999	0.001	0.999	0.001
0.00000100	0.010	0.008	0.992	0.008	0.992	0.008
0.00001000	0.100	0.083	0.920	0.080	0.925	0.075
0.00010000	1.000	0.833	0.435	0.565	0.594	0.406
0.00100000	10.000	8.333	0.000	1.000	0.201	0.799
0.01000000	100.000	83.333	0.000	1.000	0.053	0.947
0.10000000	1000.000	833.333	0.000	1.000	0.014	0.986
0.50000000	5000.000	4166.667	0.000	1.000	0.005	0.995

De berekeningen zijn gebaseerd op analyse van microscopische fragmenten: 'verw. aantal' is het verwachte aantal botfragmenten in 2 microscopische preparaten, en p0 en p1 zijn de kansen op een negatief resp. positief resultaat, berekend uitgaande van het Poisson-model (alle botfragmenten even zwaar, nl. $4 \mu\text{g}$) en het negatief-binomiale model (botfragmentgewichten gamma verdeeld met een variatiecoëfficiënt van 130 %).

Bij 10 ppm in het monster is de kans op een negatief resultaat nu dus 20 % i.p.v. 0 %. Bedenk dat de aanwezigheid van één groot botfragment ($100 \mu\text{g}$) per 10 g monstermateriaal al goed is voor een gehalte van 10 ppm. Pas op het 0,01 % (100 ppm) niveau is de kans op een negatief resultaat gedaald tot ongeveer 5 % en op het 0,1 % niveau tot ongeveer 1 %.

8 CONCLUSIES

- Gebrek aan herhaalbaarheid hoeft geen reden te zijn om aan de betrouwbaarheid van de microscopische analysemethode te twijfelen, maar is een onvermijdelijk statistisch verschijnsel bij de analyse van diervoeders met zeer lage gehalten botfragmenten. Grote variatie in de botfragmentgewichten verergert dit probleem.
- Bij positieve uitslagen, maar zeer lage gehalten-schattingen dient contraexpertise-onderzoek uitvoeriger te zijn dan het oorspronkelijke onderzoek om de herhaalbaarheidsproblemen te ondervangen.
- Inschattingen van de herhaalbaarheid van de microscopische analysemethode voor bestanddelen van dierlijke oorsprong in diervoeders zijn in dit rapport gebaseerd op zeer weinig gegevens. Preciezer kwantitatieve uitspraken over detectiegrenzen en benodigde opschalingsfactoren bij contra-expertise vereisen een uitvoeriger onderzoek, waarbij tevens onderscheid gemaakt moet worden tussen verschillende typen diervoeders.