



**WETENSCHAPPELIJK COMITE VAN HET FEDERAAL
AGENTSCHAP VOOR DE VEILIGHEID VAN DE
VOEDSELKETEN**

ADVIES 39-2006

Betreft: Proceshygiëncriteria met betrekking tot het aëroob kiemgetal, *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* (dossier Sci Com 2006/11)

Het Wetenschappelijk Comité van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Gelet op de wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Gelet op het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Overwegende het huishoudelijk reglement bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 27 maart 2006;

Gelet op de adviesaanvraag van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen aangaande de proceshygiëncriteria met betrekking tot het aëroob kiemgetal, *Enterobacteriaceae* en *Salmonella*;

Overwegende de besprekingen tijdens de plenaire zittingen van 10 maart, 23 juni en 8 september 2006;

geeft het volgende advies :

INLEIDING

In Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen worden onder meer proceshygiëncriteria vastgesteld. Proceshygiëncriteria geven aan of een productieproces aanvaardbaar verloopt. Dergelijke criteria gelden niet voor in de handel gebrachte producten, maar geven een mate van besmetting aan bij overschrijding waarvan corrigerende maatregelen moeten worden genomen om ervoor te zorgen dat de proceshygiëne in overeenstemming met de levensmiddelenwetgeving blijft.

Met betrekking tot karkassen van runderen, schapen, geiten en paarden zijn volgende proceshygiëncriteria vastgelegd voor het stadium na het uitslachten maar vóór het koelen:

- Aëroob kiemgetal: $m = 3,5 \log \text{kve/cm}^2$, $M = 5,0 \log \text{kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 1,5 \log \text{kve/cm}^2$, $M = 2,5 \log \text{kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Salmonella*: afwezig op elk getest karkasoppervlak, $n = 50$, $c = 2$.

Met betrekking tot karkassen van varkens zijn volgende proceshygiëncriteria vastgelegd voor het stadium na het uitslachten maar vóór het koelen:

- Aëroob kiemgetal: $m = 4,0 \log \text{kve/cm}^2$, $M = 5,0 \log \text{kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 2,0 \log \text{kve/cm}^2$, $M = 3,0 \log \text{kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Salmonella*: afwezig op elk getest karkasoppervlak, $n = 50$, $c = 5$.

Voor de bepaling van het aëroob kiemgetal en de *Enterobacteriaceae* kan de destructieve of de niet-destructieve bemonsteringsmethode worden toegepast, zoals beschreven in de ISO-norm 17604. De bovenvermelde grenswaarden gelden echter alleen voor monsters die via de destructieve methode zijn genomen. Voor de bepaling van *Salmonella* moet met behulp van een schuurspons worden bemonsterd.

REFERENTIETERMEN

Aan het Wetenschappelijk Comité worden volgende vragen gesteld.

1. Welke methode verdient de voorkeur voor de bemonstering van karkassen van runderen, schapen, geiten, paarden en varkens: de destructieve of de niet-destructieve bemonsteringsmethode?
2. Welke grenswaarden dienen gebruikt te worden voor het aëroob kiemgetal en *Enterobacteriaceae* bij het gebruik van de niet-destructieve bemonsteringsmethode?
3. Mag voor de bemonstering met het oog op de opsporing van *Salmonella* de door de Verordening opgelegde schuursponsmethode vervangen worden door een bemonstering m.b.v. wattenschijfjes? Geeft dit gelijkwaardige resultaten?

ADVIES

1. Destructieve versus niet-destructieve bemonsteringsmethode

Zoals hierboven vermeld kan zowel met de destructieve als met de niet-destructieve methode worden bemonsterd, zoals beschreven in ISO-norm 17604. In geval van de destructieve methode wordt aan het karkasoppervlak een weefselmonster uitgesneden, terwijl bij de niet-destructieve methode een uitstrijkje (swab) van het karkasoppervlak genomen wordt. Er zijn reeds talrijke wetenschappelijke studies uitgevoerd waarin beide methoden vergeleken worden. In de bijlage bij dit advies wordt een kort overzicht gegeven van de recente wetenschappelijke literatuur met betrekking tot dit onderwerp. De voornaamste conclusies worden hierbij samengevat.

In geval van de destructieve methode worden nagenoeg alle bacteriën die aanwezig zijn op het karkasoppervlak gerecupereerd. Dit resulteert in hogere tellingen in vergelijking met de niet-destructieve methode. De tellingen zijn doorgaans minder variabel dan tellingen bekomen op basis van de niet-destructieve methode. Daartegenover staat dat bij de destructieve methode slechts een beperkt oppervlak bemonsterd wordt. De methode is tevens tijdsintensief en vereist een zekere bekwaamheid, wat ze minder geschikt maakt voor routinetesten. Bovendien wordt het karkas beschadigd en daalt het dus in waarde.

In geval van de niet-destructieve methode wordt slechts een fractie van de bacteriën die aanwezig zijn op het karkasoppervlak gerecupereerd, resulterend in lagere en meer variabele tellingen. Aangezien doorgaans een groter oppervlak bemonsterd wordt, is deze methode meer geschikt dan de destructieve methode voor de detectie van bacteriën die slechts in lage aantallen voorkomen en ongelijkmatig over het karkasoppervlak verspreid zijn.

Beide methoden hebben dus voor- en nadelen. Ze komen beide in aanmerking voor de bemonstering van karkassen in het kader van de controle op proceshygiëncriteria uit de Verordening. Het Wetenschappelijk Comité wenst wel te benadrukken dat, welke methode ook gekozen wordt, deze methode goed gestandaardiseerd moet worden, zodat de eventuele variabiliteit tot een minimum beperkt wordt en de resultaten onderling goed vergeleken kunnen worden. Indien geopteerd wordt gebruik te maken van swabs, worden best grote cosmetische wattenschijfjes gebruikt.

2. Grenswaarden voor het aëroob kiemgetal en *Enterobacteriaceae* bij de niet-destructieve bemonsteringsmethode

Bij het vaststellen van de grenswaarden voor het aëroob kiemgetal en *Enterobacteriaceae* bij de niet-destructieve methode dient rekening gehouden te worden met de fractie cellen die hierbij gerecupereerd wordt ten opzichte van de destructieve methode. Deze fractie wordt voornamelijk bepaald door de mate waarin de bacteriën vastgehecht zijn aan het karkasoppervlak. Deze vasthechting wordt door verschillende factoren beïnvloed, zoals type karkas (diersoort), weefseltype, bacterieel species, contaminatieniveau, vochtigheidsgraad, tijdstip van bemonstering (bijv. voor of tijdens koeling), ...

De in de literatuur vermelde fracties cellen gerecupereerd volgens de niet-destructieve ten opzichte van de destructieve methode zijn zeer divers (zie ook literatuurstudie in bijlage). In deze context wordt vaak verwezen naar Beschikking 2001/471/EG van de Commissie¹ die aangeeft het gedeelte van de totale flora dat gerecupereerd wordt door bemonstering met swabs gemiddeld slechts 20% (of nog minder) van de totale flora van het karkasoppervlak bedraagt. In het overzichtsartikel van Capita et al. (2004) wordt een waarde van gemiddeld 50% vermeld voor de nat/droog swabtechniek (waarbij achtereenvolgens een natte en een droge swab wordt toegepast). Het Wetenschappelijk Comité stelt voor om, voor alle betrokken diersoorten en voor beide parameters (aëroob kiemgetal en *Enterobacteriaceae*), uit

¹ Beschikking van de Commissie van 8 juni 2001 tot vaststelling van voorschriften voor het regelmatig doen controleren van de algemene hygiëne door exploitanten in inrichtingen overeenkomstig Richtlijn 64/433/EEG betreffende de gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van vers vlees en Richtlijn 71/118/EEG inzake gezondheidsvraagstukken op het gebied van de productie en het in de handel brengen van vers vlees van pluimvee (2001/471/EG).

te gaan van een fractie gerecupereerde cellen die ca. 0.5 log eenheid (20-50%) lager ligt dan het aantal cellen dat bekomen zou worden met de destructieve methode. Op die manier worden volgende grenswaarden bekomen, die telkens een halve logeenheid lager liggen dan de oorspronkelijke grenswaarde. Deze grenswaarden zijn enkel geldig bij het gebruik van de swabmethode.

Met betrekking tot karkassen van runderen, schapen, geiten en paarden voor het stadium na het uitslachten maar vóór het koelen:

- Aëroob kiemgetal: $m = 3,0 \log \text{ kve/cm}^2$, $M = 4,5 \log \text{ kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 1,0 \log \text{ kve/cm}^2$, $M = 2,0 \log \text{ kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde).

Met betrekking tot karkassen van varkens voor het stadium na het uitslachten maar vóór het koelen:

- Aëroob kiemgetal: $m = 3,5 \log \text{ kve/cm}^2$, $M = 4,5 \log \text{ kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde);
- *Enterobacteriaceae*: $m = 1,5 \log \text{ kve/cm}^2$, $M = 2,5 \log \text{ kve/cm}^2$ (dagelijkse gemiddelde logwaarde).

Het Wetenschappelijk Comité raadt tevens aan om, bij de berekening van de dagelijkse gemiddelde logwaarde, eventuele resultaten die kleiner zijn dan de detectielimiet gelijk te stellen aan de detectielimiet gedeeld door 2, om een vertekening van het gemiddelde te voorkomen (Hutchison et al., 2005).

Tenslotte wenst het Wetenschappelijk Comité op te merken dat *Escherichia coli* de voorkeur verdient boven *Enterobacteriaceae* als meer specifieke hygiëne-indicator bij de bemonstering van karkassen (cfr. Advies 44-2001 van het Wetenschappelijk Comité). Aanwezigheid van *E. coli* wijst steeds op fecale contaminatie en duidt op de mogelijke aanwezigheid van andere fecale pathogenen (taxonomisch - ecologisch - fysiologisch). Bovendien is de analysemethode voor *E. coli* beter reproduceerbaar dan deze voor *Enterobacteriaceae*.

3. Bemonstering met schuursponsmethode versus bemonstering met wattenschijfjes voor de opsporing van *Salmonella*

In de Verordening wordt vermeld dat exploitanten van levensmiddelenbedrijven andere bemonsterings- en testprocedures mogen gebruiken als zij tot tevredenheid van de bevoegde autoriteit kunnen aantonen dat die procedures ten minste gelijkwaardige garanties bieden. Het is dus mogelijk een studie uit te voeren waarin beide methoden met elkaar vergeleken worden. Bij deze studie zouden beide karkashelften (bijv. 250 karkassen van varkens) moeten bemonsterd worden, waarbij bij de ene karkashelft gebruik wordt gemaakt van een swab (cosmetische wattenschijfjes) en bij de andere karkashelft van een schuurspons. Idealiter zou de studie minstens 50 positieve monsters moeten omvatten met betrekking tot *Salmonella*, om een statistisch gefundeerde analyse mogelijk te maken.

Er dient echter gewezen te worden op het feit dat in de literatuur wordt aangegeven dat bij gebruik van materiaal met een meer schurend karakter dan een wattenschijfje meestal hogere microbiële tellingen (bijv. met betrekking tot het totaal kiemgetal) worden bekomen. Des te meer het materiaal schurend van aard is, des te meer bacteriën van het karkasoppervlak kunnen gerecupereerd worden. Het ligt dus in de lijn der verwachtingen dat bemonstering voor de opsporing van *Salmonella* met een schuurspons enerzijds en met behulp van wattenschijfjes anderzijds verschillende resultaten zal opleveren.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. Ir. A. Huyghebaert
Brussel, 4 oktober 2006

Bijlage

Volgende beperkte literatuurstudie geeft een overzicht van de efficiëntie van de verschillende methoden die kunnen gebruikt worden in het kader van Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen.

Dorsa et al. (1996) vergeleken de efficiëntie van verschillende bemonsteringsmethoden voor de bepaling van het aëroob kiemgetal van runderkarkassen in twee afzonderlijke studies. Voor de eerste studie, waarbij niet-geïnoculeerde karkassen werden bemonsterd, werden volgende vier methoden gebruikt: excisie, een uitstrijkje met behulp van kaasdoek, met behulp van een spons en met behulp van katoenwollen swabs (op een houten staafje). Voor de tweede studie, waarbij uitgesneden karkasstukken werden bemonsterd die vooraf met fecaal materiaal besmet werden op verschillende inoculatie-niveaus, werden volgende vier methoden gebruikt: excisie, een uitstrijkje met behulp van een spons, met behulp van griddle screen en met behulp van 3M mesh. De materialen kaasdoek, griddle screen en 3M mesh zijn meer schurend dan de spons, die zelf meer schurend is dan de katoenwollen swabs. Voor beide studies bleek excisie de meest consistente en efficiënte methode (grootste recuperatie van bacteriën), terwijl de eerste studie aangaf dat de katoenwollen swabs het minst efficiënt waren (kleinste recuperatie van bacteriën). Tevens bleek voor beide studies dat de schurende materialen de efficiëntie van excisie sterk benaderden, zelfs bij een laag inoculatie-niveau. Bij hogere inoculatie-niveaus (tweede studie) bleek er geen statistisch significant verschil tussen de verschillende bemonsteringsmethoden. Dorsa et al. concluderen dat met uitzondering van de katoenwollen swabs, alle geteste methoden geschikt zijn voor de detectie van fecale contaminatie. Aangezien excisie tijdsintensief is en een zekere vakkundigheid vereist, is deze methode echter minder aangewezen in de praktijk.

In een studie van Gill en Jones (1999) werden karkassen van runderen en varkens bemonsterd volgens vier methoden: excisie, een uitstrijkje met behulp van een spons (cellulose acetaat), met behulp van gaas en met behulp van katoenwol. Er dient opgemerkt te worden dat in geval van katoenwol er achtereenvolgens met een vochtige en een droge swab bemonsterd werd, waarna beide swabs samengevoegd werden voor analyse. Van de stalen werd het aëroob kiemgetal, het aantal coliformen en *Escherichia coli* bepaald. Statistische analyse van de data toonde aan dat er geen significant verschil was tussen het aantal bacteriën dat gerecupereerd werd met excisie, spons of gaas. De aantallen bacteriën bekomen met katoenwol bleken in sommige gevallen lager te zijn dan deze bekomen met de andere drie methoden, en waren in de andere gevallen hoogstens vergelijkbaar met de lagere aantallen bekomen met de andere drie methoden. Het verschil tussen de gemiddelde logwaarde bij katoenwol en de gemiddelde logwaardes bij de andere methoden was echter doorgaans niet groter dan 0.5.

Ware et al. (1999) evalueerden bemonstering van borststukken van runderkarkassen door excisie en met behulp van een spons. De borststukken werden geïnoculeerd met een celsuspensie van *Escherichia coli* (3×10^8 kve/ml). Staalname vond plaats 30 minuten na inoculatie en na een koelperiode van 24h bij 7°C. Op de stalen werden het aëroob kiemgetal, aantal coliformen en *E. coli* bepaald. Het aantal bacteriën gerecupereerd 30 minuten na inoculatie was vergelijkbaar voor beide methoden. Daarentegen was het aantal bacteriën gerecupereerd na de koelperiode significant lager voor de sponsmethode dan voor de excisiemethode.

In een onderzoek naar de microbiologische kwaliteit van runderkarkassen in Australië maakten Phillips et al. (2001) een vergelijking tussen de excisiemethode en

de sponsmethode (polyurethaanspons). Voor het totaal kiemgetal werden vergelijkbare waarden bekomen wat betreft de gemiddelde logwaarde, de mediaan, de 80^{ste} en 95^{ste} percentielen en de maxima. De aantallen coagulase-positieve staphylococci bepaald volgens beide methoden waren ook vergelijkbaar. Daarentegen werden met de excisiemethode hogere *E. coli* aantallen gerecupereerd dan met de sponsmethode.

Ransom et al. (2001) vergeleken de excisie- en sponsmethoden voor de detectie van *Salmonella* en de telling van *E. coli* biotype I op runderkarkassen. Er werden geen significante verschillen vastgesteld tussen de methoden.

In een overzichtsartikel van Capita et al. (2004) worden de voor- en nadelen van de excisie- en swabmethoden voor karkasbemonstering op een rijtje gezet (zie Tabel 1).

Tabel 1. Vergelijking van excisie- en swabmethode.

Methode	Voordelen	Nadelen
Excisie	Leverd meest betrouwbare en minst variabele tellingen op vanwege een nagenoeg volledige recuperatie van bacteriën, zelfs in geval van sterke vasthechting aan karkas	Destructieve methode (waarde van karkas daalt). Beperkt bemonsteringsoppervlak. Tijdsintensief. Vereist bekwaamheid. Minder geschikt voor routinetesten.
Swab	Geen of beperkte beschadiging van karkasoppervlak. Bestrijkt doorgaans groter oppervlak. Geschikt voor detectie van bacteriën die slechts in laag aantal voorkomen en ongelijkmatig over karkas verspreid zijn (omdat vaak groter oppervlak bemonsterd wordt).	Povere en variabele resultaten m.b.t. tellingen aangezien enkel de minder vastgehechte bacteriën gerecupereerd worden. Percentage gerecupereerde bacteriën sterk afhankelijk van verschillende factoren.

Het verschil in tellingen bij de twee methoden heeft voornamelijk te maken met de mate waarin bacteriën vastgehecht zijn aan het karkasoppervlak. Deze vasthechting wordt door vele factoren beïnvloed, zoals type karkas, weefseltype, bacterieel species, contaminatieniveau en vochtigheidsgraad. In geval van de swabtechniek wordt de recuperatie van bacteriën bevorderd als het gebruikte materiaal meer schurend van aard is. In geval van katoenwollen swabs (weinig schurend) kan een sterke verbetering van de recuperatie bekomen worden door gebruik van achtereenvolgens een vochtige en een droge swab.

Bij een onderzoek naar het gebruik van excisie en polyurethaanswabs voor de bemonstering van karkassen van runderen en schapen werd door Byrne et al. (2004) geen significant verschil vastgesteld tussen de twee methoden bij de bepaling van het totaal kiemgetal en het aantal *Enterobacteriaceae*. Volgens de onderzoekers heeft polyurethaan een meer schurend karakter dan katoenwol, waardoor de efficiëntie verhoogd wordt.

Miraglia et al. (2005) onderzochten de recuperatie van bacteriën (totaal kiemgetal) volgens de excisiemethode en swabmethode (achtereenvolgens vochtige en droge swab) voor karkassen van runderen en varkens. Met de excisiemethoden werden steeds significant hogere aantallen bekomen. De auteurs vermelden dat het moeilijk is om een nauwkeurig verband vast te stellen tussen de resultaten bekomen met

enerzijds de excisiemethode en anderzijds de swabmethode, gezien beide methoden een grote variabiliteit vertonen.

Hutchison et al. (2005) probeerden het verband tussen resultaten van excisie en de swabtechniek (katoenwol; achtereenvolgens vochtige en droge swab) te kwantificeren voor wat betreft het totaal kiemgetal op karkassen van runderen, schapen en varkens. Beide technieken werden afwisselend toegepast op achtereenvolgende (dus verschillende) karkassen. De lineaire correlatie tussen de tellingen bekomen volgens de twee technieken is echter zeer zwak. Volgens de auteurs kan dit verschillende oorzaken hebben, zoals bijvoorbeeld een ongelijkmatige verdeling van bacteriën over identieke bemonsteringsplaatsen op achtereenvolgende karkassen.

Literatuurlijst

1. Byrne B., Dunne G., Lyng J., Bolton D.J. 2005. Microbiological carcass sampling methods to achieve compliance with 2001/471/EC and new hygiene regulations. *Res. Microbiol.*, 156(1), pg. 104-106
2. Capita R., Prieto M., Alonso-Calleja C. 2004. Sampling methods for microbiological analysis of read meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 67(6), pg. 1303-1308
3. Dorsa W.J., Cutter C.N., Siragusa G.R. 1996. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 22(1), pg. 39-41
4. Gill, C.O., Jones T. 2000. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. *Journal of Food Protection*, 63(2), pg. 167-173
5. Hutchison M.L., Walters L.D., Reid C.-A., Avery S.M., Wilson, D., Howell M., Johnston A., Buncic S. 2005. A comparison of wet-dry swabbing and excision-sampling methods for microbiological testing of bovine, porcine and ovine carcasses at red meat slaughterhouses. *Journal of Food Protection*, 68(10), pg. 2155-2162
6. Miraglia D., Ranucci D., D'Ovidio V., Branciarri R., Severini M. 2005. Comparison between Carcass Microbial Load Recovered by Swabbing Surfaces of Different Size and Using the Reference Excision Method. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2), pg. 339-341
7. Phillips D., Sumner J., Alexander J.F., Dutton K.M. 2001. Microbiological quality of Australian beef. *Journal of Food Protection*, 64(5), pg. 692-696
8. Ransom J.R., Belk K.E., Bacon R.T., Sofos J.N., Scanga J.A., Smith G.C. 2002. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/colonal feces, hides and carcasses. *Journal of Food Protection*, 65(4), pg. 621-626
9. Ware L.M., Kain M.L., Sofos J.N., Belk K.E., Smith G.C. Comparison of sponging and excising as sampling procedures for microbiological analysis of fresh beef-carcass tissue. *Journal of Food Protection* , 62(11), pg. 1255-1259