



Symposium

Wat doet dat micro-organisme daar?

Wageningen, 11 juni 2015

FiMM, Postbus 381, 6700 AJ WAGENINGEN
Tel. 06-44834988, info@fimm.nl, www.fimm.nl





Programma

- 09.15 - 10.00 Ontvangst, koffie en thee, expositie apparatuur
- 10.00 - 10.10 Welkom en inleiding.
Dr. Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit / FiMM)
- 10.10 - 10.40 De mogelijkheden en grenzen van identificatie van micro-organismen met MALDI-TOF in de levensmiddelenmicrobiologie
Ing. Gerrieke van Middendorp (Onderwijs-/onderzoeksmidewerker, Wageningen University)
- 10.40 - 11.10 Gezondheidsrisico's van water in de stad
Dr. Ir. Heleen de Man (Adviseur Water en Gezondheid, Sanitas-Water)
- 11.10 - 11.50 Expositie apparatuur, koffie en thee
- 11.50 - 12.20 Normen, criteria, codes en richtlijnen - stand van zaken
Ir. Enne de Boer (Levensmiddelenmicrobioloog, FiMM)
- 12.20 – 12.50 Microbiologische aspecten van verse vis
Prof. Frank Devlieghere (Hoogleraar, Laboratorium voor levensmiddelenmicrobiologie en -conservering, Universiteit Gent - Food2Know)
- 12.50 - 14.30 Lunch, expositie apparatuur (standhouders lunch vanaf 12.20 uur)
- 14.30- 15.00 Microbiologische veiligheid van insecten bestemd voor humane consumptie
Dr. Lieve Herman (Afdelingshoofd, ILVO - Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek)
- 15.00 - 15.30 Pathogenen en kiemgroenten
Ir. Jeanette Koedijk (Kwaliteitsmanager, Van der Plas Sprouts)
- 15.30 - 15.50 Afsluiting
Dr. Rijkelt Beumer (Wageningen Universiteit / FiMM)
- 15.50 - 17.00 Expositie apparatuur en borrel

Standhouders

Tritium Microbiologie, LA Biosystems, Pedak Meettechniek, Dijkstra Vereenigde, LED Techno, Sartorius, BioControl Systems, Eurofins KBBL – Inspection, Consultancy & Advice, Boom, Eppendorf Nederland, Neogen Europe, Hettich Benelux, bioTRADING Benelux, Wilten Bioteknika, LabBio Technology, Promega.



Veilig voedsel door kennis

FIMM geeft diverse cursussen levensmiddelenmicrobiologie en organiseert symposia om de kennis van u of uw collega's over de microbiologie van voedingsmiddelen te vergroten.

Cursus Levensmiddelenmicrobiologie en -hygiëne

De hygiëne tijdens het productieproces bepaalt grotendeels de veiligheid en microbiologische kwaliteit van levensmiddelen. Daarvoor is een gedegen kennis nodig van micro-organismen: wat is hun gedrag in levensmiddelen en in de (productie)omgeving. Dat is wat u leert bij deze cursus.

Deze vijfdaagse cursus levensmiddelenmicrobiologie en -hygiëne op hbo-niveau is bestemd voor mensen die bijvoorbeeld werkzaam zijn in de levensmiddelenindustrie, bij controlerende instanties of adviserende bedrijven.

Vervolgcurcus Levensmiddelenmicrobiologie

Voor uw voedselveiligheidssysteem is een gevareninventarisatie onmisbaar. U bent verplicht een risicoanalyse op te stellen die degelijk onderbouwd is. Hoe u dat moet doen, dat leert u tijdens deze driedaagse cursus waarbij u vooral zelf aan de slag gaat. Via praktijkgerichte oefeningen leert u welke pathogene micro-organismen relevant zijn in uw grondstoffen, halffabricaten en/of eindproducten.

U leert werken met de computerprogramma's Risk Ranger®, Combase en Pathogen Modelling Program (PMP). Verder maken wij u vertrouwd met het uitvoeren van literatuuronderzoek zodat u uw risicoanalyses goed kunt onderbouwen.

Workshop Microbiologische media

Ook in de moderne microbiologie worden nog steeds traditionele voedingsbodems gemaakt om micro-organismen te laten groeien. Van al die media moet de gebruiker zeker zijn dat de samenstelling ervan geen of nauwelijks invloed heeft op de aanwezige (gezochte) micro-organismen. Controle van de media is noodzakelijk.

Vorig jaar werd de nieuwe norm 'Microbiology of food, animal feeding stuffs and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media (ISO/DIS 11133:2012)' gepubliceerd. De workshop microbiologische media zorgt ervoor dat u in één dag op de hoogte bent van de belangrijkste zaken uit deze norm en over nieuwe ontwikkelingen met betrekking tot mediuwbereiding en -controle.

Advies & ondersteuning

Heeft u microbiologische vraagstukken of wilt u advies? Ook daarvoor kunt u bij ons terecht.

Neem contact met ons op voor meer informatie (06-44 83 49 88, info@fimm.nl) of kijk op de website: www.fimm.nl.



De mogelijkheden en grenzen van identificatie van micro-organismen met MALDI-TOF in de levensmiddelenmicrobiologie

Gerrieke van Middendorp

Wageningen University

Deze presentatie gaat over de toepassing van Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) binnen de levensmiddelenmicrobiologie. Wat zijn potentiële mogelijkheden, en wat zijn de grenzen?

Principe

Voor bacterie identificatie wordt vers koloniemateriaal geanalyseerd met de MALDI-TOF. Hiervan wordt een ontoegje op een target (plaat) 'gespot'. Een plaat bevat honderden spots, en op iedere spot kan een monster worden aangebracht, en zo kunnen honderden monsters tegelijk worden gemeten. Het monster wordt vervolgens overdekt met een matrix waarmee het co-kristalliseert. Dat is de enige monstervoorbereiding die nodig is. In het MALDI-TOF apparaat wordt de eiwitsamenstelling van het monster geanalyseerd met als resultaat een spectrum. Dit spectrum is een fingerprint van de eiwitcompositie van de bacterie. Hieruit kunnen de massa's van de eiwitten, die in hoge concentratie aanwezig zijn, worden bepaald. Wanneer verschillende bacteriesoorten worden geanalyseerd, blijkt iedere soort een eigen eiwitcompositie, dus een uniek eiwit fingerprint te hebben. Daarom kan identificatie plaatsvinden met behulp van een database met spectra van referentiestammen. Om te achterhalen van welk eiwit een bepaalde piek uit een spectrum afkomstig is, kan de massa van de piek vergeleken worden met de massa's van bekende eiwitten uit online databases zoals Uniprot.

Geschiedenis

De term Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, oftewel MALDI, werd geïntroduceerd door professor Franz Hillenkamp en zijn groep in 1985. Zij beschreven dat de aminozuur alanine makkelijker geïoniseerd kan worden wanneer het wordt gemixt met tryptofaan en bestraald met bepaalde laserstraling. Ook kleine peptides konden worden geïoniseerd met de 'matrix' tryptofaan. Sinds eind 20^e eeuw worden MALDI-TOF apparaten op grote schaal geproduceerd voor wetenschappelijk onderzoek.

Product- en omgevingsflora in kaart brengen

Vanwege de hoge doorvoercapaciteit is MALDI-TOF een geschikte methode om de product- en omgevingsflora van een productieruimte snel in kaart te brengen. Wanneer de MALDI-TOF wordt gebruikt in combinatie met kwantitatieve methoden zoals plate counting, kan binnen een week een algemeen beeld worden geschetst van de microbiologische 'stand van zaken' in productieruimten. Uit eigen onderzoek bleek dat van flora uit omgevingsmonsters uit een productieruimte van een fabriek, gekweekt op VRBG media, 90% van de stammen kon worden geïdentificeerd met de Biotyper library. *Pantoea agglomerans* is de soort die het meest gedetecteerd werd uit de omgevingsmonsters van deze fabrikant van droge ontbijtproducten. De samenstelling van de flora was gedurende de schoonmaak anders dan tijdens productie. Door de identificatie gegevens te koppelen aan de locatie van monsternamen, kan de spreiding van de veelvoorkomende soorten in kaart gebracht worden. Zo is bijvoorbeeld te zien dat de *Leclercia* soorten alleen in de high care area werden gedetecteerd.

De mogelijkheden en grenzen van identificatie van micro-organismen met MALDI-TOF in de levensmiddelenmicrobiologie



Database optimalisatie

Voor identificatie op basis van fingerprinting is een database nodig met referentie spectra van bekende stammen. Er zijn uitgebreide databases beschikbaar. Hoewel de Biotyper library op dit moment met meer dan 5000 referentiestammen de grootste is, bestaat deze database voor verreweg het grootste gedeelte uit klinische isolaten, omdat de ontwikkeling van de MALDI-TOF techniek vooral gericht is op de medische microbiologie. De MALDI-TOF is binnen de medische diagnostiek namelijk de gouden standaard geworden op het gebied van bacterie-identificatie. Binnen de levensmiddelenmicrobiologie loopt de ontwikkeling van de MALDI-TOF techniek nog een beetje achter, hoewel er de laatste vijf jaar wel veel over werd gepubliceerd. Klinisch irrelevante soorten, zoals bepaalde bederfflora, kunnen vaak niet geïdentificeerd worden met de Biotyper library omdat deze simpelweg niet in de database voorkomen. In ons laboratorium in Wageningen hebben we een kleine test gedaan met voedsel- en omgevingstammen. Uit kruiden hebben we de total viable count geïsoleerd, geanalyseerd met de MALDI-TOF en geïdentificeerd met de Biotyper library. 69% Van de stammen kon worden geïdentificeerd, de rest had een te lage score om volgens Bruker aan te mogen nemen dat het resultaat betrouwbaar is.

De *Cronobacter* soorten kunnen niet geïdentificeerd worden met de Biotyper library, omdat maar één soort vertegenwoordigd is in de database. We hebben onderzocht of het mogelijk is om *Cronobacter* stammen te identificeren met een eigen in-house database, gecreëerd met referentiestammen van alle *Cronobacter* soorten. Uit een kleine validatie, waarbij andere referentiestammen zijn gebruikt om de specificiteit van de methode te berekenen, blijkt dat het percentage correcte identificaties voor de verschillende soorten tussen 50% en 100% varieert.

Biomarker methode

Wanneer identificatie op basis van fingerprinting niet specifiek genoeg is om zeer verwante soorten te differentiëren, is identificatie op basis van biomarkers een goed alternatief. Een biomarker is de massa van één eiwit dat een bepaalde specificiteit heeft, bijvoorbeeld genusspecifiek of soortspecifiek. Wanneer een biomarker 100% soortspecifiek is, bewijst de aanwezigheid van deze biomarker dus dat het geanalyseerde monster tot die bepaalde soort hoort. We hebben soortspecifieke biomarkers geïdentificeerd uit *Cronobacter* spectra. Deze biomarkers werden vervolgens gebruikt om te differentiëren tussen *C. malonaticus* en *C. sakazakii* stammen. De biomarkers die we vonden zijn niet 100% soortspecifiek, maar wanneer alle biomarkers worden gecombineerd d.m.v. een algoritme, ontstaat een identificatie methode met een hogere specificiteit dan de fingerprinting methode.

Pathoog en bederfflora detectie zonder kweek

Voor de levensmiddelenindustrie zou het ideaal zijn als de MALDI-TOF pathogenen en bederfflora kan detecteren en identificeren direct vanuit de voedselmatrix, zonder dat een kweekstap nodig is, zodat de time-to-result wordt beperkt tot één productiedag. Het is al mogelijk om uit besmet bloed de contaminant te detecteren zonder voorafgaande kweekstap. Om te onderzoeken of het ook mogelijk is om bacteriesoorten direct vanuit een vloeibaar voedselproduct te detecteren, hebben we *Cronobacter* in melk onderzocht. Er bleken veel storende eiwitten aanwezig te zijn in melk. Deze eiwitten verstoren de identificatie van de *Cronobacter*. Dat zien we wanneer we de melk inoculeren met *Cronobacter* en de resulterende spectra gebruiken voor identificatie m.b.v. de Biotyper library. De storende eiwitten uit de melk zijn minstens zo duidelijk aanwezig in de spectra als de eiwitten van de *Cronobacter*, en daardoor wordt de *Cronobacter* onjuist geïdentificeerd als *Escherichia coli*.



Wellicht zijn er manieren om de methode te optimaliseren, maar tot nu toe is het niet mogelijk om identificatie van bacteriën uit voedsel te verrichten zonder eerst een reinkweek te maken.

Ook zijn we op zoek gegaan naar de minimale concentratie die nodig is voor het detecteren van één bacteriesoort wanneer deze is gemixt met een andere soort. Voor de detectie van *Cronobacter* in een mix met *Lactobacillus* werden *Cronobacter*-specifieke biomarkers gebruikt. *Cronobacter* kon op deze manier worden gedetecteerd in de mix wanneer de *Cronobacter* concentratie minstens 3% was t.o.v. de *Lactobacillus* concentratie. Uit literatuuronderzoek blijkt dat dit overeenkomt met vergelijkbaar onderzoek waarbij andere soorten werden geanalyseerd. In de praktijk betekent dit dus dat detectie alleen mogelijk is wanneer een stam een maximaal 1 a 2 log lagere concentratie heeft dan bijgaande flora.



Gezondheidsrisico's van water in de stad

Heleen de Man

Sanitas-Water

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Health risk assessment for splash parks that use rainwater as source water



H. de Man^{a,*}, M. Bouwknecht^b, E. van Heijnsbergen^b, E.J.T.M. Leenen^c,
F. van Knapen^a, A.M. de Roda Husman^{a,b}

^a Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

^b National Institute for Public Health and The Environment, Bilthoven, The Netherlands

^c Grontmij Water & Energy, De Bilt, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2013

Received in revised form

30 January 2014

Accepted 2 February 2014

Available online 12 February 2014

Keywords:

Interactive splash park

Fountain

Risk of infection

Exposure

QMRA

Rainwater

ABSTRACT

In the Netherlands, rainwater becomes more and more popular as an economic and environmentally sustainable water source for splash parks, however, the associated public health risk and underlying risk factors are unknown. Since splash parks have been associated with outbreaks of infectious diseases, a quantitative microbial risk assessment was performed using *Legionella pneumophila* as a target pathogen to quantify the risk of infection for exposure due to inhalation and *Campylobacter jejuni* for ingestion. Data for *L. pneumophila* and *C. jejuni* concentrations in rainfall generated surface runoff from streets were extracted from literature. Data for exposure were obtained by observing 604 people at splash parks, of whom 259 were children. Exposure volumes were estimated using data from literature to determine the volume of exposure through inhalation at 0.394 $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 0.0446–1.27 $\mu\text{L}/\text{min}$), hand-to-mouth contact at 22.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, (95% CI-range 2.02–81.0 $\mu\text{L}/\text{min}$), ingestion of water droplets at 94.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 5.1–279 $\mu\text{L}/\text{min}$) and ingestion of mouthfuls of water at 21.5 $\cdot 10^3$ $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 1.17 $\cdot 10^3$ –67.0 $\cdot 10^3$ $\mu\text{L}/\text{min}$). The corresponding risk of infection for the mean exposure duration of 3.5 min was 9.3 $\cdot 10^{-5}$ (95% CI-range 0–2.4 $\cdot 10^{-4}$) for inhalation of *L. pneumophila* and 3.6 $\cdot 10^{-2}$ (95% CI-range 0–5.3 $\cdot 10^{-1}$) for ingestion of *C. jejuni*. This study provided a methodology to quantify exposure volumes using observations on site. We estimated that using rainwater as source water for splash parks may pose a health risk, however, further detailed quantitative microbial analysis is required to confirm this finding. Furthermore we give insight into the effect of water quality standards, which may limit infection risks from exposure at splash parks.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: QMRA, Quantitative Microbial Risk Assessment; C, concentrations of pathogenic micro-organisms; V, individual exposure volume; D, ingested dose of pathogenic micro-organisms; CFU, Colony Forming Unit; MPN, Most Probable Number; CI, Confidence Interval; r , infectivity parameter of the exponential dose–response model; α, β , infectivity parameters of the hypergeometric dose–response model; P_{inf} , Risk of infection.

* Corresponding author. Institute for Risk Assessment Sciences, Division of Veterinary Public Health (VPH), P.O. Box 80175, 3508 TD Utrecht, The Netherlands. Tel.: +31 30 2539688.

E-mail address: h.deman@uu.nl (H. de Man).

0043-1354/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.010>

1. Introduction

Splash parks are often located in shopping areas or play grounds. They are popular features that encourage many children to play with water. Splash parks use water that is typically stored in an underground reservoir or surge chamber and is sprayed into the air; after it hits the ground, it flows back to the reservoir through floor drains. Although almost all splash parks incorporate some form of disinfection, many show poor water quality through poor design or poor maintenance (Kebabjian, 2003). Thus, splash parks have been associated with outbreaks of infectious diseases, including *Legionella* (Hlady et al., 1993; Palmore et al., 2009; Haupt et al., 2012; Correia et al., 2001), *Cryptosporidium* and *Giardia* (Eisenstein et al., 2008; Anonymous, 2000, 1999), *Shigella* (Fleming et al., 2000; Bancroft et al., 2010), *Salmonella* (Andión Campos, 1995; Molinero et al., 1998; Usera et al., 1995), *Leptospira* (Cacciapuoti et al., 1987), and noroviruses (Hoebe et al., 2004).

People may be exposed to waterborne pathogens in splash park through inhalation, ingestion and dermal contact. Inhalation of aerosols causes deposition of water in the respiratory tract (Heyder et al., 1986) and may cause allergic reactions (Douwes et al., 2003). If pathogens are present in water of splash parks, inhalation may cause infectious diseases such as pneumonia due to *Legionella pneumophila* (Fields et al., 2002). Ingestion of water, whether intended (by swallowing mouthfuls of water) or unintended (through getting water droplets in the mouth or through hand-to-mouth contact) can cause gastroenteritis though infection with enteric pathogens such as norovirus, rotavirus, *Campylobacter*, *Giardia* or *Cryptosporidium*, and may cause other severe illnesses such as hemolytic uremic syndrome (Keene et al., 1994) or Gullain-Barré syndrome (McCarthy and Giesecke, 2001). Finally, dermal contact (skin and mucous membranes of nose, ears and eyes in contact with the water) can result in infections such as wound infections due to *Aeromonas hydrophila* (Semel and Trenholme, 1990), otitis externa due to *Pseudomonas aeruginosa* (Van Asperen et al., 1995), or conjunctivitis due to adenoviruses (Crabtree et al., 1997).

Quantitative microbial risk assessment (QMRA) is a tool to quantify health risks and to get insight into measures that can prevent outbreaks (World Health Organization, 2011). A QMRA requires information on the concentration of pathogens in the matrix, the fate and behavior of pathogens, the volume of water to which people were exposed, and the dose–response relation for the pathogen.

Because harvested rainwater has been widely regarded as a sustainable source for water (re)use in urban areas and for recreational purposes, it is often used as a source water of splash parks (De Man et al., 2014b). Pathogens may be present in rainwater dependent on weather conditions such as rainfall intensity and temperature (Schets et al., 2010; Kaushik et al., 2012). Furthermore, the atmospheric deposition of airborne microorganisms (Evans et al., 2006), the (rooftop) runoff of fecal depositions of birds and other mammals (Ahmed et al., 2012; Fewtrell and Kay, 2007), and the growth or decay of micro-organisms in collected rainwater may influence the presence of pathogens in rainwater (Ahmed et al., 2014).

Pathogens may also be introduced into water of splash parks by people, dogs, birds and other animals upon contact with the water (Hoebe et al., 2004).

To be able to quantify the public health risk of splash parks that use rainwater as their source water, an exposure assessment was performed using field observations. The generated exposure data were used to determine exposure volumes and infection risks for inhalation and ingestion by a QMRA approach. The QMRA was performed with Monte Carlo simulations to provide a range of uncertainties in infection risks.

2. Methods

2.1. Hazard identification

People are exposed to the water of urban splash parks through ingestion, inhalation and dermal contact. To estimate the public health risks, these exposure routes were used to choose model organisms that (I) were pathogens of concern in situations where people were exposed to water, (II) were present in rainwater and (III) showed a dose–response relation. Based on these criteria, *L. pneumophila* was chosen to model inhalation and *Campylobacter jejuni* for ingestion. These pathogens were preferred above other pathogens such as *Giardia*, *Cryptosporidium* or *Salmonella* because *L. pneumophila* and *C. jejuni* may be present in high concentrations in rainwater, combined with a high pathogenicity and environmental survival, thus posing a potential health risk. For dermal contact, no dose–response relationship is available and therefore this exposure route could not be considered.

Legionella spp. are found in a wide range of water environments and can proliferate at temperatures above 25 °C (World Health Organization, 2011). *Legionella* was assumed not to proliferate in the water of splash parks because the water temperature is generally below 25 °C in the Netherlands (Zuurman, personal communication). Data on *Legionella* concentrations in splash parks are lacking, and therefore we assumed that its concentration was equal to concentrations found in rainwater samples on roads. Reservoirs of splash parks were filled with such rainwater runoff at several locations in the Netherlands (Zuurman, personal communication). *L. pneumophila* was found in rainwater by several studies using PCR (Ahmed et al., 2008, 2010) and data about cultured *L. pneumophila* in rainwater on roads were previously reported by Sakamoto et al. (2009) and recently by Van Heijnsbergen et al. (submitted for publication) who used the method described by Schalk et al. (2012). Counts and tested volumes of these data were used to fit a gamma distribution for the concentration of *L. pneumophila* in water of splash parks using the method of Schijven et al. (2011).

Campylobacter is an enteric pathogen that occurs in a variety of environments, such as food and water (World Health Organization, 2011). The presence of *C. jejuni* in rainwater was confirmed by several studies (Fewtrell and Kay, 2007) and also by using PCR (Ahmed et al., 2010). A study by De Man et al. (2014a) showed that culturable *C. jejuni* was present in rainfall generated overland flow; these data were used to fit a gamma distribution for the concentration of *C. jejuni* in water of splash

parcs. *C. jejuni* may also contaminate the source water of splash parks through the activities of people, birds and other animals while a water feature is in operation. Because there is no information about such contaminations, these were not included as part of the current study.

Almost all splash parks incorporated some form of disinfection. Nevertheless, many splash parks exhibited poor water quality resulting from poor design and/or poor maintenance (Kebabjian, 2003). Furthermore, as De Man et al. (2014a,b,c) showed, disinfection of rainwater at splash parks is ineffective in reducing pathogen concentrations. Therefore disinfection was not included in this study.

2.2. Exposure assessment

Exposure volumes ($\mu\text{L}/\text{min}$) were quantified for inhalation and for ingestion. The volume of ingestion due to hand-to-mouth-contact with wet hands per minute (Q_{HM}) was calculated using:

$$Q_{\text{HM}} = h \times A \times f_{\text{HM}} \quad (1)$$

where h represented the film thickness of water on hands (mm), A the skin-surface area of the hand that touched the mouth (mm^2) and f_{HM} the frequency of hand-to-mouth contact (n per min). The volume of ingestion of droplets of water in the mouth (Q_{D}) was determined using:

$$Q_{\text{D}} = V_{\text{D}} \times f_{\text{D}} \quad (2)$$

where V_{D} represented the volume of water droplets (μL) and f_{D} the frequency of splashing water droplets in someone mouth (n per min). The volume of ingestion due to drinking mouthfuls of water per minute (Q_{M}) was determined using:

$$Q_{\text{M}} = V_{\text{M}} \times f_{\text{M}} \quad (3)$$

where V_{M} represented the volume of a mouthful of water (μL) and f_{M} the frequency that people take a mouthful of water (n per min). The inhaled volume of water per minute during the visit of the splash park was determined using:

$$Q_{\text{I}} = \text{IR} \times \text{VIWS} \quad (4)$$

where IR represented the inhalation rate of air (m^3/min) and VIWS the fraction of inhalable water spray (μL water/ m^3 air).

Values of model parameters were considered to be uncertain, therefore an uncertainty analysis was carried out through Monte Carlo simulations. Model parameters were explained by various types of distributions. To determine the volume distributions according to Equations (1)–(4), from each of these distributions, 10^6 values were randomly drawn using Mathematica version 9.0 (Wolfram Research).

Film thickness of water on hands, h [mm]. The film thickness of liquids on skin was represented by the amount of material that remains on the skin after contact with a liquid. A value for h was estimated in an experiment by U.S. EPA (2011) as the amount of liquid retained on the skin (g/mm^2) divided by the density of the liquid (g/mm^3) used. This showed a range of 2.34×10^{-2} to 1.97×10^{-2} mm for retention of water on the skin after initial contact with water. The uncertainty of h was considered to be uniformly distributed within this range.

Skin-surface area of the hand that was mouthed, A [mm^2]. Most frequently, a finger or a part of a finger is mouthed by children (U.S. EPA, 2011). The average surface area of child's finger is reported to be 2000 mm^2 (U.S. EPA, 2011). Therefore, the uncertainty of A was assumed to be uniformly distributed between 100 and 2000 mm^2 of a hand for children (U.S. EPA, 2011).

The frequency of hand-to-mouth contact f_{HM} [min^{-1}]. Freeman et al. (2001) gathered hand-to-mouth frequency data of 102 children. Boys were observed to have hand-to-mouth contact of 1.7 (0–5.6) times per hour, girls 2.3 (0–6.2) times per hour. Because data on the variability of hand-to-mouth contact for boys and girls and its uncertainty have not been reported and were unavailable upon request, we assumed the uncertainty of f_{HM} could be described by a Gamma Distribution. The gamma (α, β) distribution models the time required for α events to occur, given that the events occur randomly in a Poisson process with a mean time between events of β (Vose, 2008). Therefore, the uncertainty of f_{HM} was assumed to be gamma distributed with $\alpha = 2$ and $\beta = 0.5$.

Volume of a droplet, V_{D} [μL]. Children who make each other wet cause droplets of water to be ingested by themselves or other children. These water droplets were assumed to be spherical and to have a diameter that varied between 1 and 10 mm, to reflect the range in inhalable droplet sizes. The volume of a water droplet was determined by $4/3\pi r^3$, thus the volume of water of one droplet varied between 0.5 μL and 524 μL , for which a uniform distribution was assumed in absence of data on a more specific distribution.

Frequency of getting droplets of water in the mouth f_{D} [min^{-1}]. The frequency of getting a splash of water in the mouth was determined using onsite observations. The number of times that an individual received a splash of water in their face was counted, assuming that per moment of splashing one droplet was ingested by that person. Using the total duration of exposure of a person, a gamma distribution was fitted for the frequency of getting droplets of water in the mouth as described previously in this paragraph.

Volume of a mouthful of water V_{M} [μL]. The volume of a mouthful of water V_{M} was estimated by Schets, Schijven et al. (2011). The mean volume of a mouthful of water for a child was described by a Gamma distribution with $\alpha = 4.72$ and $\beta = 5300$ and used as such in this study.

Frequency of taking a mouthful of water f_{M} [min^{-1}]. The frequency of taking a mouthful of water was also determined using observations on site. The number of times that a person leans over a fountain to take a mouthful of water was counted assuming that each time, one mouthful was ingested. Using the total duration of exposure of a person, a gamma distribution for the frequency of taking a mouthful of water was fitted as described previously.

Inhalation Rate, IR [m^3/min]. The inhalation rate (IR) is dependent on the intensity of people's activity. IR for children varied between $1.01 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{min}$ for light activities and $6.24 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{min}$ for high intensity activities. For adults, it varied between $1.03 \cdot 10^{-2}$ and $7.77 \cdot 10^{-2} \text{ m}^3/\text{min}$ (U.S. EPA, 2011).

Volume of inhalable water spray, VIWS [μL water/ m^3 air]. The fraction of inhalable water spray (VIWS) per m^3 was extracted from a study of De Man et al. (2014b). The

Table 1 – Results of observations: number of people observed per category of exposure.

	Having wet hands	Having wet face	Drinking mouthfuls of water	Being present within 2 m of water spray
Children	198	65	8	257
Adults	192	31	2	347

concentration of inhalable endotoxin in air near splash parks varied from 7.2 to 19 endotoxin units (EU)/m³, while the concentration of endotoxins in water varied from 9 to 2799 EU/mL. That study showed a significant linear relation between the EU in water and air ($R^2 = 0.645$). The volume of inhalable aerosols per cubic meter (VIWS) was estimated by maximum likelihood using beta regression (Espinheira et al., 2008, 2004). The parameters α and β for a Beta (α, β) distribution were re-parameterized with a mean dilution factor μ and a precision parameter φ according to $\alpha = \mu\varphi$ and $\beta = (1 - \mu)\varphi$. The values for μ and φ were estimated by maximum likelihood. The uncertainty distribution for μ was obtained by Markov Chain Monte Carlo sampling from the likelihood function with the Metropolis-Hastings algorithm (Gilks et al., 1996).

Field observations to collect quantitative data on the behavior of splash park visitors were performed at two splash parks in urban centers on five days in June 2010 from 12:00AM until 4:00PM. During these observations, distinction was made between the different routes of exposure: 1) having wet hands, 2) having a wet face, 3) drinking mouthfuls of water and, 4) being present within 2 m of the water spray. Field observations were used to quantify several exposure model parameters (see Table 2).

Exposure through ingestion was mainly the case for children who interacted with water. Therefore, exposure through ingestion was only calculated for children. This choice was also made because there was a lack of information for model parameters A , f_{HM} , f_D and f_M for adults. Exposure through inhalation was calculated for children as well as for adults, because adults were exposed through inhalation while chaperoning their children.

2.3. Dose response

The dose D of exposure to the model organisms *L. pneumophila* and *C. jejuni* was calculated by multiplication of the

concentration distribution C (numbers of pathogens per liter) and total exposure volume V (liter). The distribution for V for ingestion was calculated by:

$$V_{\text{ingestion}} = (Q_{HM} + Q_D + Q_M)t \quad (5)$$

where t was the duration of exposure according to the field observations and Q_{HM} , Q_D and Q_M were summed when relevant according to the observed routes of exposure during the field observations.

The risk of infection for inhalation due to exposure to *Legionella* was analyzed using the exponential dose–response relation

$$P_{\text{inf}} = 1 - e^{-r \cdot D} \quad (6)$$

where r represents an infectivity of 0.06 (Armstrong and Haas, 2007). The risk of infection for ingestion due to exposure to *Campylobacter* was analyzed using the hypergeometric dose–response relation

$$P_{\text{inf}}(D; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta, -D) \quad (7)$$

where ${}_1F_1$ was a Kummer confluent hypergeometric function and α and β represented the beta distributed dose response parameters for *Campylobacter*. In the case of *C. jejuni*, the values for parameters α and β were 0.024 and 0.011, respectively (Teunis et al., 2005).

2.4. Risk characterization

The risk of infection for inhalation and ingestion was calculated as a function of the duration of exposure. Given the large range of possible concentrations of *L. pneumophila* and *C. jejuni*, a scenario analysis was performed for five scenarios with different concentrations, from 1–10⁴ cfu/L water. Subsequently a sensitivity analysis was carried out to determine the effect of the model parameters on the risk of infection. It was

Table 2 – Model parameters used in the exposure assessment.

Parameter	Value or distribution of values	Source
IR, Inhalation Rate (m ³ /min)		
Children	Uniform [1.11·10 ⁻² , 4.36·10 ⁻²]	(U.S. EPA, 2011)
Adults	Uniform [1.03·10 ⁻² , 7.77·10 ⁻²]	
VIWS, Volume of inhalable water spray, (μL/m ³)	Average: 10.8	(De Man et al., 2014b)
	95% Confidence Interval: 1.76–36.3	
h , Film Thickness of water on hands, (mm)	Uniform [1.97·10 ⁻² , 2.34·10 ⁻²]	(U.S. EPA, 2011)
A , Surface area of the hand that is mouthed, (mm ²)	Uniform [100,2000]	(U.S. EPA, 2011)
f_{HM} , Frequency of hand-to-mouth contact, (n/min)	Gamma [2,0.5]	(Freeman et al., 2001)
f_D , Frequency of getting water droplets in the mouth (n/min)	Gamma [2.1,0.17]	Field observations
V_D , Volume of a droplet (μL)	Uniform [0.5,524]	Estimate
V_M , Volume of a mouthful of water (μL)	Gamma [4.72,5300]	(Schets, Schijven and de Roda Husman, 2011)
f_M , Frequency of taking a mouthful of water (n/min)	Gamma [1.2,0.76]	Field observations

assumed that the model parameters were independent. The effect of the value of a model parameter was calculated by varying a model parameter (within its range of uncertainty), including the uncertainties of the other parameters.

3. Results

A QMRA was performed to calculate the risk of infection inherent to exposure to splash parks using rainwater as their source. To quantify the risk of infection, *L. pneumophila* and *C. jejuni* were selected as target pathogens. The concentration of *L. pneumophila* in rainwater was described by a Gamma distribution with $r = 0.045$ and $\lambda = 26,000$ with an average concentration of *L. pneumophila* of 1200 cfu/l. The concentration of *C. jejuni* in rainwater was described by a Gamma distribution with $r = 0.76$ and $\lambda = 330$, the average concentration of *C. jejuni* was 250 cfu/l.

Exposure was investigated during outdoor temperatures between 20 and 23°. Six hundred and four people were observed, of whom 259 were children estimated to be below 13 years old. Significant differences ($p < 0.05$) in behavior (i.e. in exposure) were observed between people younger and older than 13 years (Table 1). The mean duration of a visit at an interactive water fountain was 3.5 min (range 1–120 min). No significant differences ($p > 0.05$) were observed between the duration of a visit for people younger and older than 13 years. Observations on site were used to quantify the frequency that droplets of water reached children's mouths (f_D), these data ($N = 12$ children) were fitted to a gamma distribution, resulting in parameters $r = 2.1$ and $\lambda = 0.17$. Also, the frequency with which people take a mouthful of water (f_M) was quantified ($N = 8$ children) and fitted to a gamma distribution, resulting in $r = 1.2$ and $\lambda = 0.76$ (Table 1).

The estimated mean volume of inhalation of water aerosols for children was 0.394 $\mu\text{L}/\text{min}$, (95% CI-range 0.0446–1.27 $\mu\text{L}/\text{min}$) and for adults 0.489 $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 0.0494–1.55 $\mu\text{L}/\text{min}$). The estimated mean volume of ingestion due to hand-to-mouth-contact with wet hands for children was 22.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, (95% CI-range 2.02–81.0 $\mu\text{L}/\text{min}$). The estimated mean volume of ingestion of water droplets that splash into children's mouths was 94.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 5.1–279 $\mu\text{L}/\text{min}$) and the mean volume of ingestion through drinking mouthfuls of water amounted 21.5 $\cdot 10^3$ $\mu\text{L}/\text{min}$ (95% CI-range 1.17 $\cdot 10^3$ –67 $\cdot 10^3$ $\mu\text{L}/\text{min}$) for children.

The estimated infection risk due to inhalation of *L. pneumophila* for a child was $9.3 \cdot 10^{-5}$ (95% CI-range $0-2.4 \cdot 10^{-4}$) and for adults $1.1 \cdot 10^{-4}$ (95% CI-range $0-82.8 \cdot 10^{-4}$) for the mean exposure duration of 3.5 min (Fig. 1). The estimated risk of infection due to ingestion of *Campylobacter* was $1.3 \cdot 10^{-2}$ (95% CI-range $0-5.3 \cdot 10^{-2}$) for ingestion due to hand-to-mouth contact with wet hands, $4.5 \cdot 10^{-2}$ (95% CI-range $0-1.9 \cdot 10^{-1}$) for ingestion of water droplets in the mouth and $4.7 \cdot 10^{-1}$ (95% CI-range $2.3 \cdot 10^{-2}-7.1 \cdot 10^{-1}$) for ingestion of mouthfuls of water. Based on the observational data, the estimated mean total risk of infection for children after ingestion of *Campylobacter* amounted to $3.6 \cdot 10^{-2}$ (95% CI-range $0-5.3 \cdot 10^{-1}$) for the mean exposure duration of 3.5 min.

The sensitivity analysis showed that the risk of infection was most affected by the volume of inhalable water spray VIWS and the volume of a water droplet V_D and least affected

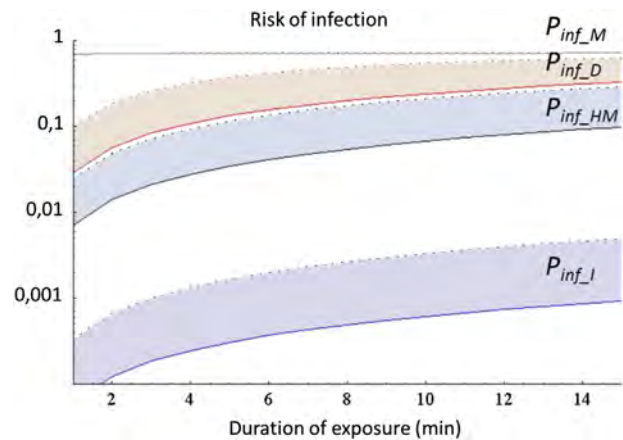


Fig. 1 – Risk of infection (mean and 95th percentile) for ingestion of mouthfuls of water P_{inf_M} , ingestion of water droplets P_{inf_D} , ingestion due to hand-to-mouth contact P_{inf_HM} and inhalation P_{inf_I} for mean concentrations of *C. jejuni* and *L. pneumophila* in rainwater that is used as source water for splash parks. (95th percentiles were shown by dotted lines).

by the volume of a mouthful of water V_m and the film thickness of water on hands h (Fig. 2). Fig. 3 shows the results of the scenario-analyses, here the risks of infection are presented for different concentrations of pathogens in the water of splash parks. It demonstrates that concentrations of *L. pneumophila* and *C. jejuni* of less than 10 cfu/l (which is equal to absence in 100 ml) would lead to a decrease in the risk of infection for both *L. pneumophila* and *C. jejuni*.

4. Discussion

4.1. Hazard Identification

This study estimated the public health risk of splash parks that use rainwater as their source water. *L. pneumophila* and *C.*

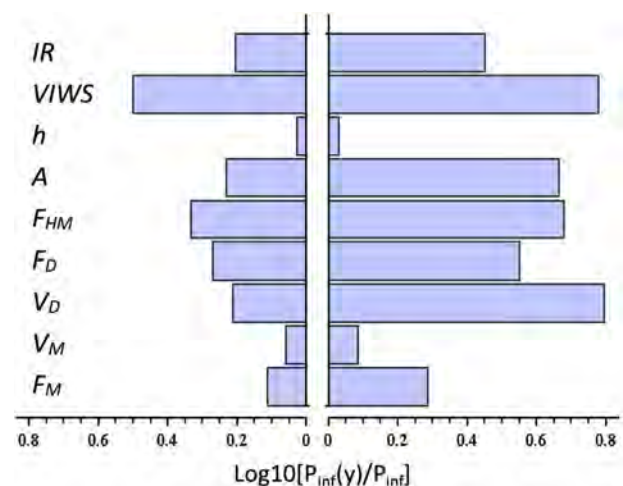


Fig. 2 – Sensitivity of P_{inf} by varying a model parameter within its range of uncertainty.

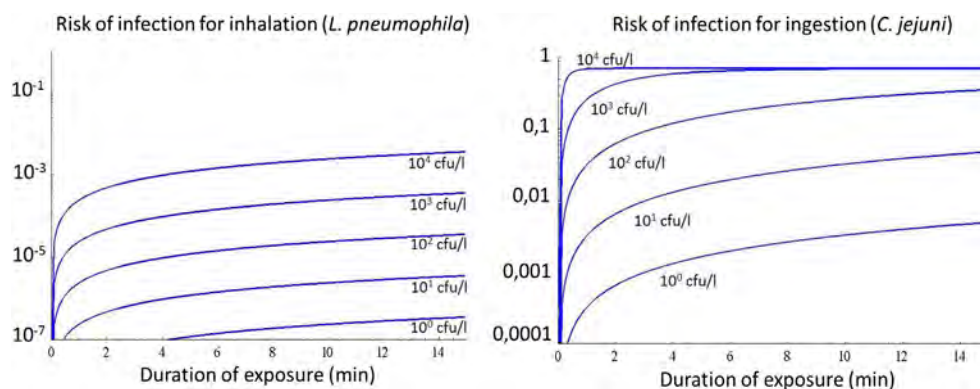


Fig. 3 – Risk of infection for inhalation and ingestion for different scenarios with respect to concentrations of pathogens in water as a function of the duration of exposure to water of a splash park.

jejuni have been chosen to determine the risk of infection for inhalation and ingestion at splash parks. The target pathogen *L. pneumophila* that is used to quantify health risks after inhalation, can grow and become more virulent at water temperatures above 25 °C. The growth of *Legionella* was not incorporated into our model, because water temperatures above 25 °C require prolonged outside temperatures of 30–35 °C (Zuurman, personal communication), which is uncommon in The Netherlands. Under optimal conditions, the concentration of *L. pneumophila* may double in 8 h (Cooling Tower Institute, 1990) and increase 3 to 4 orders of magnitude in 48–72 h (Holden et al., 1984). This is in contrast to *C. jejuni* which will not multiply at temperatures between 25 and 30 °C (Jones, 2001). Besides the investigated model parameter *C. jejuni*, other pathogens at splash parks may also cause gastro-intestinal diseases. For instance, norovirus may be introduced in water of splash parks by people who interact with the water (Hoebe et al., 2004) or bird and other animals may introduce pathogens like *Giardia* and *Cryptosporidium* (Eisenstein et al., 2008). Given the poor water quality at splash parks (De Man et al., 2014b; De Man et al., 2014a,b,c), together with the increase of water temperature on warm days also gives rise to risks of non-fecal pathogens such as *A. hydrophila* and *P. aeruginosa*. While risks posed by these pathogens deserve evaluation, the necessary dose–response data is currently lacking. And health risk from contact exposure cannot be assessed.

4.2. Exposure Assessment

The present study quantified exposure volumes through inhalation and ingestion, by providing insight into volumes of exposure due to inhalation, hand-to-mouth contact, splash of droplets in someone's mouth and drinking of water. The observational component of the study yielded important data that was previously missing. The methodology used in this study can be used to inform QMRA in other situations where people are exposed to water in the studied ways.

The exposure assessment for ingestion was not performed for adults, because information was missing for several model parameters (A , F_{HM} , F_D , F_M). Based on the uncertain assumption that exposure volumes of ingestion of adults were equal to children and using the data of the field observations (i.e.

55% of the people got wet hands and 9% got water droplets in their mouths) gives an exposure volume of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. This exposure volume was approximately one order of magnitude lower than the volume of exposure of children (707 $\mu\text{L}/\text{min}$), which supports the conclusion that children were more at risk at splash parks than adults.

In our study, we quantified infection risk as a function of exposure. The importance of exposure is endorsed by the study of Hoebe et al. (2004), who reported that the attack rate for gastrointestinal illnesses was higher for children who interacted for a longer duration with a splash park. This assumption is also supported by the outbreak of Legionellosis at the 1999 West Frisian Flower Show in The Netherlands, where a relation was found between the duration of exposure and the concentration of antibodies in titers of exposed individuals (Den Boer et al., 2002). It should be noted that the average exposure duration of 3.5 min reported in this study was short because these observations took place in an urban environment. At playgrounds and other recreational water parks, the exposure duration may increase to 0.5 h or possibly up to 2 h (Hoebe et al., 2004), which would increase the ingested or inhaled dose of pathogens and therefore the subsequent health risk. According to our model, the risk of infection would increase to $2.3 \cdot 10^{-1}$ for ingestion of *C. jejuni* and $2.8 \cdot 10^{-3}$ for inhalation of *L. pneumophila* for an exposure duration of 2 h.

4.3. Risk assessment

A standard for exposure to enteric pathogens by consumption of unboiled tap water in set by the Dutch Ministry of Infrastructure and Environment, stating that less than one infection per 10,000 persons per year should occur. Relating this standard to the current study results showed exceedence for *C. jejuni* and *L. pneumophila* (for the latter one, in case of exposure of adults and for exposures of children longer than 5 min). The risk of infection for ingestion of water of a splash park also exceeded the value of 0.001 pppy, which was recommended as an infection risk benchmark for the reuse of rooftop-harvested rainwater (Lim and Jiang, 2013). Furthermore, the estimated risk of infection exceeded the value of 0.01, being at the threshold at which epidemiologic studies can identify health risks (Wade et al., 2006; Ashbolt et al., 2010).

Thus, the present study shows that exposure to splash parks may pose a public health risk. This, together with the fact that outbreaks were associated with malfunctioning of disinfection systems (Kebabjian, 2003; Hoebe et al., 2004) indicates that legislation is required to minimize health risks. Water quality standards, we believe, can provide a tool for operators to monitor water quality and to make interventions when necessary. The scenario analyses (Fig. 3) provides information about the estimated effect of a reduction of *C. jejuni* or *L. pneumophila* (i.e. the effect of water quality standards) on the risk of infection determined for splash parks that use rainwater as their source water. Concentrations of *L. pneumophila* and *C. jejuni* of less than 10 cfu/l (which is equal to absence in 100 ml) would lead to a decrease in the risk of infection of 10–100 times for *C. jejuni* and *L. pneumophila*, respectively.

5. Conclusion

This study showed that exposure to splash parks that use rainwater as their source water can cause an infection risk. While at this moment, splash parks do not have to meet any criteria for water quality and/or design, this study should give rise to debates concerning the need for such guidelines. The scenario analyses gives information about infection risks for specific concentrations of pathogens in their source water. This information is valuable in terms of the insight it provides into the effect of water quality standards on public health. Furthermore, this study uses a new methodology making it possible to quantify exposure volumes using onsite observations, a methodology both practical and useful when assessing quantitative microbial risk wherever people are exposed to water.

Disclosure

The authors declare they have no competing financial interests.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. R. Sakamoto who provided raw data of *Legionella* in rainwater samples. The research was funded by STOWA (Dutch Foundation for Applied Water Research), RIONED (Dutch Centre of Expertise in Sewer Management and Urban Drainage), the Municipalities of Groningen, Nijmegen, Rotterdam and Utrecht, and the Water Boards 'Noorderzijlvest', 'Hoogheemraadschap de Stichtse Rijnlanden', 'Hoogheemraadschap Delfland', 'Waterschap Hollandse Delta' and 'Hoogheemraadschap Schieland en de Krimpenerwaard'.

REFERENCES

Anonymous, 2000. Outbreak of gastroenteritis associated with an interactive water fountain at a Beachside –Florida, 1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49 (25), 565–568.

- Anonymous, 1999. Outbreak of cryptosporidiosis associated with a water sprinkler fountain—Minnesota, 1997. *Canada communicable disease report = Relevé des maladies transmissibles au Canada* 25 (2), 13–15.
- Ahmed, W., Richardson, K., Sidhu, J.P.S., Jagals, P., Toze, S., 2014. Inactivation of faecal indicator bacteria in a roof-captured rainwater system under ambient meteorological conditions. *J. Appl. Microbiol.* 116 (1), 199–207.
- Ahmed, W., Hodgers, L., Sidhu, J.P.S., Toze, S., 2012. Fecal indicators and zoonotic pathogens in household drinking water taps fed from rainwater tanks in Southeast Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (1), 219–226.
- Ahmed, W., Vieritz, A., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2010. Health risk from the use of Roof-Harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia, as potable or nonpotable water, determined using quantitative microbial risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (22), 7382–7391.
- Ahmed, W., Huygens, F., Goonetilleke, A., Gardner, T., 2008. Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (17), 5490–5496.
- Andión Campos, E., 1995. Study of a typhoid fever outbreak in Baiona (Pontevedra). *Revista española de salud pública* 69 (2), 233–242.
- Armstrong, T.W., Haas, C.N., 2007. A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: animal model selection and dose-response modeling. *Risk Anal.* 27 (6), 1581–1596.
- Ashbolt, N.J., Schoen, M.E., Soller, J.A., Roser, D.J., 2010. Predicting pathogen risks to aid beach management: the real value of quantitative microbial risk assessment (QMRA). *Water Res.* 44 (16), 4692–4703.
- Bancroft, J.E., Keifer, S.B., Keene, W.E., 2010. Shigellosis from an interactive fountain: implications for regulation. *J. Environ. Health* 73 (4), 16–20.
- Cacciapuoti, B., Ciceroni, L., Maffei, C., 1987. A waterborne outbreak of leptospirosis. *Am. J. Epidemiol.* 126 (3), 535–545.
- Cooling Tower Institute, 1990. Legionnaires' disease bacteria. *CTI J.* 11 (1), 70–71. *CTI Journal* 1, 70–71.
- Correia, A.M., Gonçalves, G., Reis, J., Cruz, J.M., Castro e Freitas, J.A., 2001. An outbreak of legionnaires' disease in a municipality in northern Portugal. *Euro surveillance : bulletin european sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 6 (8), 121–124.
- Crabtree, K.D., Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N., 1997. Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Water Sci. Technol.* 35 (11–12), 1–6.
- De Man, H., Van Den Berg, H., Leenen, E.T.J.M., Schijven, J., Schets, F.M., Van der Vliet, J.C., Knapen, F., De Roda Husman, A.M., 2014a. Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Res.* 48 (1), 90–99.
- De Man, H., Heederik, D.J.J., Leenen, E.T.J.M., Spithoven, J.J.G., De Roda Husman, A.M., Knapen, F., 2014b. Human exposure to endotoxins and fecal indicators originating from water features. *Water Res.* 51, 198–205.
- De Man, H., Leenen, E.T.J.M., Knapen, F., De Roda Husman, A.M., 2014c. Best water quality management practices for splash parks. *J. Water Health* (in press).
- Den Boer, J.W., Yzerman, E.P.F., Schellekens, J., Lettinga, K.D., Boshuizen, H.C., Van Steenberghe, J.E., Bosman, A., Van Hof, S.D., Van Vliet, H.A., Peeters, M.F., Van Ketel, R.J., Speelman, P., Kool, J.L., Marina, A.E., Spaendonck, C., 2002. A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (1), 37–43.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47 (3), 187–200.

- Eisenstein, L., Bodager, D., Ginzl, D., 2008. Outbreak of giardiasis and cryptosporidiosis associated with a neighborhood interactive water fountain-Florida, 2006. *J. Environ. Health* 71 (3), 18–22.
- Espinheira, P.L., Ferrari, S.L.P., Cribari-Neto, F., 2008. On beta regression residuals. *J. Appl. Stat.* 35 (4), 407–419.
- Evans, C.A., Coombes, P.J., Dunstan, R.H., 2006. Wind, rain and bacteria: the effect of weather on the microbial composition of roof-harvested rainwater. *Water Res.* 40 (1), 37–44.
- Ferrari, S.L.P., Cribari-Neto, F., 2004. Beta regression for modelling rates and proportions. *J. Appl. Stat.* 31 (7), 799–815.
- Fewtrell, L., Kay, D., 2007. Quantitative microbial risk assessment with respect to *Campylobacter* spp. in toilets flushed with harvested rainwater. *Water Environ. J.* 21 (4), 275–280.
- Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E., 2002. Legionella and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (3), 506–526.
- Fleming, C.A., Caron, D., Gunn, J.E., Horine, M.S., Matyas, B.T., Barry, M.A., 2000. An outbreak of *Shigella sonnei* associated with a recreational spray fountain. *Am. J. Public Health* 90 (10), 1641–1642.
- Freeman, N.C.G., Jimenez, M., Reed, K.J., Gurunathan, S., Edwards, R.D., Roy, A., Adgate, J.L., Pellizzari, E.D., Quackenboss, J., Sexton, K., Liroy, P.J., 2001. Quantitative analysis of children's microactivity patterns: the Minnesota children's pesticide exposure Study. *J. Expo. Analysis Environ. Epidemiol.* 11 (6), 501–509.
- Gilks, W.R., Richardson, S., Spiegelhalter, D.J., 1996. *Markov Chain Monte Carlo in Practice*. Chapman & Hall, London, p. 486.
- Haupt, T.E., Heffernan, R.T., Kazmierczak, J.J., Nehls-Lowe, H., Rheineck, B., Powell, C., Leonhardt, K.K., Chitnis, A.S., Davis, J.P., 2012. An outbreak of legionnaires disease associated with a decorative water wall fountain in a hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33 (2), 185–191.
- Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C.F., Stahlhofen, W., 1986. Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 μm . *J. Aerosol Sci.* 17 (5), 811–825.
- Hlady, W.G., Mullen, R.C., Mintz, C.S., Shelton, B.G., Hopkins, R.S., Daikos, G.L., 1993. Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 138 (8), 555–562.
- Hoeb, C.J.P.A., Vennema, H., De Roda Husman, A.M., Van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water Fountain. *J. Infect. Dis.* 189 (4), 699–705.
- Holden, E.P., Winkler, H.H., Wood, D.O., Leinbach, E.D., 1984. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infect. Immun.* 45 (1), 18–24.
- Jones, K., 2001. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. *J. Appl. Microbiol. Symposium Suppl.* 90 (30), 68S–79S.
- Kaushik, R., Balasubramanian, R., de la Cruz, A.A., 2012. Influence of air quality on the composition of microbial pathogens in fresh rainwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (8), 2813–2818.
- Kebabjian, R.S., 2003. Interactive water fountains: the potential for disaster. *J. Environ. Health* 66 (1), 29–30.
- Keene, W.E., Mcanulty, J.M., Hoesly, F.C., Williams Jr., L.P., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., Fleming, D.W., 1994. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331 (9), 579–584.
- Lim, K., Jiang, S.C., 2013. Reevaluation of health risk benchmark for sustainable water practice through risk analysis of rooftop-harvested rainwater. *Water Res.* 47 (20), 7273–7286.
- McCarthy, N., Giesecke, J., 2001. Incidence of Guillain-Barré syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *Am. J. Epidemiol.* 153 (6), 610–614.
- Molinero, M.E., Fernández, I., García-Calabuig, M.Á., Peiró, E., 1998. Investigation of an outbreak of water origin due to salmonella ohio. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clin.* 16 (5), 230–232.
- Palmore, T.N., Stock, F., White, M., Bordner, M., Michelin, A., Bennett, J.E., Murray, P.R., Henderson, D.K., 2009. A cluster of cases of nosocomial legionnaires disease linked to a contaminated hospital decorative water fountain. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30 (8), 764–768.
- Sakamoto, R., Ohno, A., Nakahara, T., Satomura, K., Iwanaga, S., Kouyama, Y., Kura, F., Kato, N., Matsubayashi, K., Okumiya, K., Yamaguchi, K., 2009. *Legionella pneumophila* in rainwater on roads. *Emerg. Infect. Dis.* 15 (8), 1295–1297.
- Schalk, J.A.C., van Leeuwen, A.E.D., Lodder, W.J., de Man, H., Euser, S., den Boer, J.W., de Roda Husman, A.M., 2012. Isolation of *Legionella pneumophila* from pluvial floods by amoebal coculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (12), 4519–4521.
- Schets, F.M., Schijven, J.F., de Roda Husman, A.M., 2011. Exposure assessment for swimmers in bathing waters and swimming pools. *Water Res.* 45 (7), 2392–2400.
- Schets, F.M., Italiaander, R., Van Den Berg, H.H.J.L., De Roda Husman, A.M., 2010. Rainwater harvesting: quality assessment and utilization in The Netherlands. *J. Water Health* 8 (2), 224–235.
- Schijven, J.F., Teunis, P.F.M., Rutjes, S.A., Bouwknecht, M., de Roda Husman, A.M., 2011. QMRAspot: a tool for quantitative microbial risk assessment from surface water to potable water. *Water Res.* 45 (17), 5564–5576.
- Semel, J.D., Trenholme, G., 1990. *Aeromonas hydrophila* water-associated traumatic wound infections: a review. *J. Trauma* 30 (3), 324–327.
- Teunis, P.F.M., van den Brandhof, W., Nauta, M., Wagenaar, J., van den Kerkhof, H., van Pelt, W., 2005. A reconsideration of the *Campylobacter* dose - response relation. *Epidemiol. Infect.* 133 (4), 583–592.
- U.S. EPA, 2011. *Exposure Factors Handbook*, 2011 ed. EPA/600/R-09/052F.
- Usara, M.A., Echeita, A., Aladuena, A., Alvarez, J., Carreno, C., Orcau, A., Planas, C., 1995. Investigation of an outbreak of typhoid fever of water origin in Catalonia (Spain) in 1994. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clin.* 13 (8), 450–454.
- Van Asperen, I.A., De Rover, C.M., Schijven, J.F., Bambang Oetomo, S., Schellekens, J.F.P., Van Leeuwen, N.J., Colle, C., Havelaar, A.H., Kromhout, D., Sprenger, M.W.J., 1995. Risk of otitis externa after swimming in recreational fresh water lakes containing *Pseudomonas aeruginosa*. *Br. Med. J.* 311 (7017), 1407–1410.
- Van Heijnsbergen, E., de Roda Husman, A.M., Bouwknecht, M., Docters van Leeuwen, A.E., Lodder, W.J., Bruin, J.P., Euser, S.M., Den Boer, J.W., Schalk, J.A.C., 2014. Viable *Legionella pneumophila* Bacteria Isolated from Rainwater on the Road and in Nearby Soils in the Netherlands (submitted for publication).
- Vose, D., 2008. *Risk Analyses, a quantitative guide*. In: Anonymous (Ed.), *Gamma Distribution*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England, p. 633.
- Wade, T.J., Calderon, R.L., Sams, E., Beach, M., Brenner, K.P., Williams, A.H., Dufour, A.P., 2006. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. *Environ. Health Perspect.* 114 (1), 24–28.
- World Health Organization, 2011. *Guidelines for Drinking-water Quality*, fourth ed. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/index.html.

Twee mensen in debat over een actueel thema



Herengracht 5, Middelburg

22

Het Waterschap

Mede door het steeds intensiever worden van de tuinbouw blijft de waterbehoefte binnen deze sector erg groot. De afgelopen decennia is hard gewerkt aan het optimaliseren van het hergebruik van het gietwater op de individuele bedrijven. Het Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard heeft samen met zijn waterpartners een AquaReUse-installatie gerealiseerd in de Overbuurtse polder in Bleiswijk. De Overbuurtse polder is een modern glastuinbouwgebied in de gemeente Lansingerland. Bij dit nieuwe zuiveringsconcept verzamelen we het afvalwater van de glastuinbouwbedrijven - huishoudelijk en tuinbouwwater - centraal in het gebied en zuiveren dit tot gietwater voor dezelfde bedrijven.

Wesluiten de water keten. Door het afvalwater van de glastuinbouwbedrijven ter plaatse te zuiveren, in de bodem op te slaan en opnieuw te gebruiken, hoeven de glastuinbouwbedrijven zelf geen grond- of/of oppervlaktewater meer te onttrekken.

Glastuinbouwbedrijven beschikken daarvoor, naast hemelwater, over ander goed gietwater voor hun bedrijfsvoering. Qua kosten is het alternatief voor de tuinders vergelijkbaar met een gangbare gietwatervoorziening. Bijkomend voordeel is dat er minder afvalwater naar de afvalwaterzuiveringsinstallatie gaat, wat een aanzienlijke kostenbesparingen oplevert.

De installatie bestaat uit twee onderdelen: de zuiveringsinstallatie en het distributiesysteem met een ondergrondse wateropslag. Het afvalwater wordt in een aantal stappen gezuiverd. Opvallend daarin is de biologische

zuivering met een rietfilter. Om te voldoen aan de hoge eisen voor goed en betrouwbaar gietwater worden extra zuiveringsstappen doorlopen. Belangrijk stap daarbij is de omgekeerde osmose. Hiermee worden de laatste verontreinigingen uit het water gehaald. Het gezuiverde water wordt gecontroleerd en via een distributiesysteem teruggeleverd aan de tuinders. Als er overschot is dat op dat moment niet door de tuinders kan worden gebruikt, wordt dit gietwater opgeslagen in de bodem. Het kan op een later tijdstip worden opgepompt en gebruikt. Op deze manier worden verliezen beperkt.

Het AquaReUse-concept voorziet in hergebruik van 75 procent van het bedrijfsafvalwater. Een reststroom van 25 procent wordt nog op de riolering geloosd. Wij streven naar de reststroom verder te minimaliseren. Daar waar nieuwe glastuinbouwgebieden worden ontwikkeld en clusters van bedrijven gaan samenwerken, is het meer en meer vanzelfsprekend de belasting van grond- en oppervlaktewater tot het minimum te beperken. Dit nieuwe zuiveringsconcept geeft daar op een goede manier invulling aan. Bovendien kan dit concept worden doorontwikkeld voor andere bedrijfssectoren die afvalwater produceren en tegelijkertijd een waterbehoefte hebben.

Wij vinden dat het AquaReUse concept navolging verdient.

Meer informatie op www.aquareuse.nl

Het hergebruik van gietwater uit afvalwater is (g)een goed idee



Left corner:

Theo Oijpers, beleidsadviseur op de afdeling Afvalwaterketen van het Hoogheemraadschap van Schieland en de Krimpenerwaard

Right corner:

Ang Maria de Roda Husman, hoofd van de afdeling Milieu bij het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM, en verbonden aan het Instituut for Risk Assessment Sciences van de UU

De gewassen waarvoor gietwater wordt gebruikt consumeren wij van kruit; denk aan sla, komkommers en tomaten. Daarom stellen wij in Nederland hoge eisen aan gietwater, deze moet dezelfde kwaliteit hebben als ons drinkwater. In de praktijk wordt vaak opgepompt grondwater gebruikt, maar ook oppervlaktewater zoals uit sloten, vaarten en rivieren. Dit water kan besmet zijn met dierlijke en humane uitwerpselen waarin resten van bijvoorbeeld gewasbeschermingsmiddelen en ziekteverwekkers aanwezig kunnen zijn.

Het AquaReUse-concept is gebaseerd op hergebruik van zowel afvalwater van glastuinbouwbedrijven als van huishoudelijk afvalwater. Net als oppervlaktewater en grondwater kan dit verontreinigd zijn, denk aan fruit, ziekte verwekkers, zoals voedselverwekkers afkomstig uit uitwerpselen. Deze ziekteverwekkers, bacteriën, virussen en parasieten, kunnen via het eten van groente en fruit ziekte veroorzaken, zoals voedselvergiftiging. Ook in de leidingen en de berging van het watersysteem kunnen ziekteverwekkers voorkomen. Meestal zijn de gevolgen van een voedselvergiftiging alleen diarree en overgeven. Soms zijnde de gevolgen ernstig zoals het uitvalven van de nierfunctie.

Naast de technische en financiële haalbaarheid van het zuiveringsconcept is het daarom van belang na te gaan welke mogelijke gezondheidsrisico's het hergebruik van afvalwater in de glastuinbouw met zich meebrengt. Een gezondheidsrisicoanalyse is noodzakelijk. Hierbij wordt de hele waterketen, van bron tot toepassing, in beschouwing genomen en worden alle mogelijke verontreinigingsbron-

nen (zowel afvalwater van glastuinbouwbedrijven als huishoudelijk afvalwater) en maatschappelijke in kaart gebracht. Een dergelijk risicoanalyseeramenwerk wordt in Nederland al gehanteerd voor drinkwater.

Bij het uitvoeren van zo'n risicoanalyse wordt ook de toegepaste zuivering onder de loep genomen. Van belang is vooral het AquaReUse concept zijn het rendement en de betrouwbaarheid van de zuivering. De installatie van AquaReUse maakt gebruik van een rietfilter en daarna van omgekeerde osmose. Rietfilters zijn niet of nauwelijks effectief bij de verwijdering van ziekteverwekkers; omgekeerde osmose is dat wel. Echter, een zuivering die gebaseerd is op slechts één effectief proces is weinig robuust. Bij het falen van de zuiveringsinstallatie zullen direct gezondheidsrisico's ontstaan voor consumenten. Een gedegen ontwerp én het juiste beheer van de zuivering van AquaReUse zijn daarom essentieel. Het is daarnaast belangrijk om de waterkwaliteit van het gietwater regelmatig te monitoren.

De afweging of het hergebruik van afvalwater aanvaardbaar is, moet per sector gemaakt worden. Naast technische en financiële afwegingen moeten bij innovatieve technische concepten in een vroeg stadium ook eventuele gezondheidsrisico's worden meegewogen. Aanpassingen zijn dan nog relatief eenvoudig te doen en kunnen ervoor zorgen dat een innovatief systeem geen nadelige gezondheidsrisico's heeft. Een gezondheidsrisicoanalyse is hiervoor een uitstekend de doel.



Herengracht 5, Middelburg

23

Het Waterschap



Normen, criteria, codes en richtlijnen – stand van zaken

Enne de Boer

FiMM

Normen

Normen zijn afspraken die belanghebbende partijen maken over een product, dienst of – in het geval van de normcommissie Microbiologie – vooral analysemethoden. Door goede afspraken over analysemethoden te maken, worden representatieve, reproduceerbare en vergelijkbare resultaten verkregen. De normcommissie Microbiologie wordt begeleid door NEN, het Nederlands Normalisatie-instituut. De commissie, die meer dan 30 leden telt, vormt een breed platform waarin vertegenwoordigers van de overheid, het bedrijfsleven en de wetenschap elkaar ontmoeten en besluiten nemen over bestaande en nieuwe normen. Gezamenlijk representeren deze experts Nederland in internationale (ISO) en Europese (CEN) werkgroepen. Contactpersoon is Laura Mout, secretaris normcommissie Microbiologie, telefoon (015) 2 690 436, e-mail laura.mout@nen.nl.

Het werkpakket van de normcommissie bevat ruim zeventig normen. De meeste normen beschrijven bemonsterings- en analysemethoden voor microbiologisch onderzoek in de voedselketen. Het vaststellen van nieuwe normen en de evaluatie en revisie van bestaande normen is een continu proces. In het kader van het zgn. CEN-mandaat M/381 zijn recent veel validatie-onderzoeken van bestaande en nieuwe normen uitgevoerd. Publicatie van deze nieuwe of gereviseerde normen wordt verwacht in 2016 en 2017. NEN publiceert regelmatig een overzicht van actuele normen op het gebied van de levensmiddelen- en watermicrobiologie. Het laatst gepubliceerde overzicht (21 april 2015) is bijgevoegd.

Criteria

Sinds 1 januari 2006 is de Verordening (EG) nr. 2073/2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen van kracht. Deze verordening richt zich met name op verplichtingen voor het bedrijfsleven tot beheersing van de microbiologische veiligheid van levensmiddelen. In deze verordening zijn voor veel productgroepen voedselveiligheids- en proceshygiëncriteria opgenomen. In de afgelopen jaren zijn diverse amendementen op deze verordening vastgesteld, o.a. betreffende *Bacillus cereus* in zuigelingenvoeding, *Salmonella* Typhimurium en *Salmonella* Enteritidis in pluimveevlees en STEC in ontkiemde groenten. Over de vaststelling van een voedselveiligheids criterium voor virussen in schelpdieren en een proceshygiëncriterium voor *Campylobacter* in pluimveevlees wordt door de Europese lidstaten gediscussieerd.

In veel landen bestaat nog een nationale wetgeving betreffende microbiologische criteria voor levensmiddelen. In Nederland zijn deze criteria vastgelegd in het Warenwetbesluit bereiding en behandeling van levensmiddelen (1992). In de toekomst zullen deze criteria niet meer van kracht zijn, wanneer ze door Europese regelgeving voldoende worden afgedekt.



Codes

Om de veiligheid van het bereidingsproces te waarborgen, zijn alle ondernemers verplicht voedselveiligheidsprocedures op te stellen die gebaseerd zijn op HACCP-principes (Warenwetbesluit Hygiëne van Levensmiddelen). Ambachtelijke ondernemers wordt de mogelijkheid geboden om gebruik te maken van Hygiëncodes. Deze Hygiëncodes zijn gebaseerd op HACCP-principes en zijn opgesteld door de vertegenwoordigers van de betreffende branches. Hygiëncodes kunnen microbiologische richtwaarden, gekoppeld aan CCP's bevatten, als onderdeel van de verificatiestap. Een overzicht van de hygiëncodes per sector is te vinden op de website van de NVWA <https://www.nvwa.nl/onderwerpen/regels-voor-ondernemers-dier/dossier/haccp/hygiencodes-per-sector>.

Er zijn inhoudelijke criteria vastgesteld voor het opstellen of herzien van een hygiëncode. Concept-hygiëncodes worden opgesteld door sectoren van de levensmiddelenindustrie en –handel. De concepten worden beoordeeld door het Deskundigenoverleg Hygiëne Levensmiddelen (DHL) van het Regulier Overleg Warenwet (ROW) en goedgekeurd door het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport of het ministerie van Economische Zaken. Er komt een evaluatieronde voor alle bestaande codes. Hiertoe is een concept document opgesteld “Evaluatie en vernieuwing hygiëncodes vanaf 2014”, dat binnenkort wordt gepubliceerd.

Richtlijnen

De Codex Alimentarius is een VN-organisatie, onder de vlag van zowel de FAO (Internationale Voedsel- en Landbouworganisatie van de Verenigde Naties) en de WHO (Wereldgezondheidsorganisatie). In Nederland valt de verantwoordelijkheid voor de deelname aan dit internationale forum deels onder het ministerie van Economische Zaken en deels onder het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (www.codexalimentarius.nl).

Het Codex Comité voor Voedselhygiëne (CCFH) is een horizontaal comité van de Codex Alimentarius Commission (CAC). Dit comité, voorgezeten door de Verenigde Staten, houdt zich bezig met algemene hygiëneprincipes voor de productie en verwerking van levensmiddelen en product(groep)-specifieke hygiëncodes.

De CAC publiceert ‘Standards for commodities’ (beschrijving van verschillende productgroepen), ‘Codes of Practice’ (richtlijnen voor hygiënische praktijken) en ‘Guidelines’ (richtlijnen op verschillende gebieden van voedselveiligheid en –kwaliteit).

Momenteel zijn in voorbereiding ‘Guidelines for the Control of *Trichinella* spp. in meat of Suidae’, ‘Draft Code of Hygienic Practice for Low-Moisture Foods’, ‘Draft Guidelines for Control of Nontyphoidal *Salmonella* spp. in Beef and Pork Meat’ en ‘Draft Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of Foodborne Parasites’.



NEN

Normcommissie Microbiologie

Normen zijn afspraken die belanghebbende partijen maken over een product, dienst of – in het geval van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' – vooral analysemethoden. Door goede afspraken over analysemethoden te maken, worden representatieve, reproduceerbare en vergelijkbare resultaten verkregen. De normcommissie Microbiologie wordt begeleid door NEN, het Nederlands Normalisatie-instituut. NEN heeft een faciliterende rol en de normen worden ontwikkeld door de betrokken experts.

De normcommissie Microbiologie telt meer dan dertig leden, afkomstig van organisaties uit de gehele voedselketen. De commissie vormt een breed platform waarin vertegenwoordigers van de overheid, het bedrijfsleven en de wetenschap elkaar ontmoeten en besluiten nemen over bestaande en nieuwe normen. Gezamenlijk representeren deze experts Nederland in internationale (ISO) en Europese (CEN) werkgroepen. Op deze manier kunnen organisaties invloed uitoefenen op de inhoud van normen en hiervan profiteren. Ook u kunt lid worden van de normcommissie Microbiologie.

Het werkpakket van de normcommissie bevat ruim zeventig normen. De meeste normen beschrijven bemonsterings- en analysemethoden voor microbiologisch onderzoek, zoals het detecteren van *Salmonella*, *Campylobacter* en *Listeria monocytogenes*. Met één gestandaardiseerde analysemethode kan zo de aanwezigheid van, of de hoeveelheid aan micro-organismen worden vastgesteld. Een groot aantal normen is geschikt voor het aantonen van microben in verschillende productgroepen waaronder diervoeder, zuivel, vis en vlees.

Uw voordelen

Het lidmaatschap van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' levert u het volgende op:

- Snel op de hoogte van toekomstige normontwikkelingen en herzieningen
- Toegang tot een nationaal, Europees en internationaal netwerk van experts
- Invloed op de ontwikkeling van normen en gezamenlijk het nationale standpunt bepalen
- Deelname aan een krachtig platform voor het signaleren en kenbaar maken van praktijkknelpunten
- Continue informele benchmark (waar staat uw organisatie ten opzichte van andere partijen?)

Normalisatie: de wereld op één lijn.



Nationale, Europese en internationale invloed

NEN beheert en publiceert een omvangrijke collectie van Nederlandse (NEN), Europese (EN) en internationale (ISO) normen. Door het lidmaatschap op Europees en mondiaal niveau heeft NEN een centrale positie in het web van normalisatie. Het standaardiseren van methoden, die gebruikt worden binnen het microbiologisch onderzoek, vindt steeds vaker plaats op Europees of internationaal niveau. Internationale normalisatie leidt immers tot schaalvoordelen door een grotere markt, betere exportmogelijkheden en het sluit aan bij de toename van Europees beleid en regelgeving.

Nederlandse experts zijn actief vertegenwoordigd in zowel de Europese als internationale normcommissies en werkgroepen. Zij bekleden daar verschillende sleutelposities als projectleider en brengen de nodige inhoudelijke kennis in. Enkele actuele onderwerpen:

- Opstellen van een richtlijn in drie delen voor de detectie, telling en serotypering van *Salmonella*
- Herzien van ISO 16140:2003 'Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Protocol voor de validatie van alternatieve methoden'
- Verbeteren van de norm met algemene eisen voor microbiologische onderzoeken (ISO 7218:2007)

Voor sommige onderwerpen geeft de normcommissie Microbiologie er de voorkeur aan om nationale normen of richtlijnen te ontwikkelen, bijvoorbeeld in de werkgroep Zuivelmicrobiologie. Deze werkgroep stelt NEN-normen op en herzielt bestaande normen, die van belang zijn voor de zuivelsector. In een andere nationale werkgroep bundelen experts hun krachten om bij te dragen aan de herziening van een ISO-norm voor de bepaling van meetonzekerheid.

Normalisatie: de wereld op één lijn.

De nationale normalisatie-instituten moeten als leden van CEN een EN-norm in principe zonder afwijkingen als NEN-norm overnemen. Wel is vertaling in de betrokken landstaal toegestaan. Na een vastgestelde datum dienen afwijkende nationale NEN-normen te zijn ingetrokken. In het geval van de normcommissie Microbiologie worden (bijna) alle ISO-normen overgenomen. Deze normen kunt u herkennen aan de afkorting NEN-EN-ISO, bijvoorbeeld deel 1 en deel 2 van NEN-EN-ISO 4833:2013 'Microbiologie van de voedselketen - Horizontale methode voor de telling van micro-organismen', respectievelijk de gietplaat- en strijkplaattechniek.

Normalisatie en NEN: professionaliteit

NEN is een onafhankelijke stichting zonder winstoogmerk. In Nederland is NEN de enige toegangspoort tot Europese (CEN) en internationale (ISO) normalisatie. Door lid te worden van nationale normcommissies kunt ook u als expert op Europees en internationaal vlak deelnemen aan werkgroepen en commissies. Wie meedoet aan normalisatie, deelt zijn kennis om er samen met anderen voordeel uit te halen. Op een slimme manier worden meerdere belangen met elkaar verenigd. De commissieleden financieren, naar draagkracht, gezamenlijk de inzet van NEN voor de normcommissie.

Meer weten of geïnteresseerd in het lidmaatschap?

Wilt u meer informatie over normalisatie of wilt u lid worden van de normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen', neem dan contact op met Laura Mout, secretaris van deze normcommissie en Consultant AgroFood & Consument, telefoon (015) 2 690 436, e-mail laura.mout@nen.nl.



NEN

Normsubcommissie Watermicrobiologie

Normen zijn afspraken die belanghebbende partijen maken over een product, dienst of – in het geval van de normsubcommissie Watermicrobiologie – vooral over methoden voor microbiologisch onderzoek van water (en slib). Door goede afspraken over analysemethoden te maken, worden representatieve, reproduceerbare en vergelijkbare resultaten verkregen. De normsubcommissie Watermicrobiologie wordt begeleid door NEN, het Nederlands Normalisatie-instituut. NEN heeft een faciliterende rol en de normen worden ontwikkeld door de betrokken experts.

De normsubcommissie Watermicrobiologie (de officiële naam luidt: Microbiologische parameters) telt circa vijftien leden, afkomstig van organisaties die vooral in de drinkwatersector actief zijn. De commissie vormt een breed platform waarin vertegenwoordigers van de overheid, het bedrijfsleven en de wetenschap elkaar ontmoeten en besluiten nemen over bestaande en nieuwe normen. Gezamenlijk representeren deze experts Nederland in internationale (ISO) en Europese (CEN) commissies. Organisaties oefenen zo invloed uit op de inhoud van normen en kunnen hiervan profiteren. Ook u kunt ook lid worden van de commissie Watermicrobiologie.

Het werkpakket van deze commissie bevat ruim vijftig normen. De meeste normen beschrijven bemonsterings- en analysemethoden voor microbiologisch onderzoek van water (en slib), zoals het detecteren van *Clostridium*, *Legionella* en *Salmonella*. Met één gestandaardiseerde analysemethode kan zo de aanwezigheid van of de hoeveelheid aan micro-organismen worden vastgesteld. Daarnaast bestaan er een aantal meer generieke normen en informatiedocumenten voor bijvoorbeeld algemene aanwijzingen voor microbiologisch onderzoek, kiemgetallen, kwaliteitsborging, mediumbereiding, validatie en verificatie.

Uw voordelen - het lidmaatschap van de normsubcommissie Watermicrobiologie levert u het volgende op:

- Snel op de hoogte van toekomstige normontwikkelingen en herzieningen
- Toegang tot een nationaal, Europees en internationaal netwerk van experts
- Invloed op de ontwikkeling van normen en gezamenlijk het nationale standpunt bepalen
- Deelname aan een krachtig platform voor het signaleren en kenbaar maken van praktijkknelpunten
- Continue informele benchmark (waar staat uw organisatie ten opzichte van andere partijen?)

Normalisatie: de wereld op één lijn.



Nationale, Europese en internationale invloed

NEN beheert en publiceert een omvangrijke collectie van Nederlandse (NEN), Europese (EN) en internationale (ISO) normen. Door het lidmaatschap op Europees en mondiaal niveau heeft NEN een centrale positie in het web van normalisatie. Het standaardiseren van methoden, die gebruikt worden binnen het microbiologische onderzoek voor water, vindt steeds vaker plaats op Europees of internationaal niveau. Internationale normalisatie leidt immers tot schaalvoordelen door een grotere markt en het sluit aan bij de toename van Europees beleid en regelgeving.

Nederlandse experts zijn actief vertegenwoordigd in zowel de Europese als internationale normcommissies en werkgroepen. Zij bekleden daar verschillende sleutelposities als projectleider en brengen de nodige inhoudelijke kennis in. Enkele actuele onderwerpen op nationaal en internationaal niveau zijn:

- Het ontwikkelen van een Nederlandse Praktijkrichtlijn (NPR) voor de kwaliteitsborging van PCR-methoden op basis van 'niet-conventionele technieken', zoals moleculaire technieken of screeningsmethoden.
- Revisie van ISO 11731:1998 'Water quality - Detection and enumeration of *Legionella*' inclusief het uitvoeren van een ringonderzoek. De toekomstige versie van ISO 11731 zal van toepassing zijn op verschillende watertypen, zoals: leiding-, oppervlakte-, koel-, industrie- en proceswater. Op Europees niveau (CEN) wordt het normontwikkelingstraject ook gevolgd, waardoor de definitieve versie als NEN-EN-ISO gepubliceerd gaat worden. De publieke commentaarronde vindt naar verwachting in de tweede helft van 2015 plaats.

De nationale normalisatie-instituten moeten als leden van CEN een EN-norm in principe zonder afwijkingen als NEN-norm overnemen. Wel is vertaling in de betrokken landstaal toegestaan. Na een vastgestelde datum dienen afwijkende nationale NEN-normen te zijn ingetrokken. In het geval van de normsubcommissie Watermicrobiologie worden (bijna) alle ISO-normen overgenomen. Deze normen kunt u herkennen aan de afkorting NEN-EN-ISO, bijvoorbeeld deel 1 t/m 3 van NEN-EN-ISO 9308 'Water - Telling van *Escherichia coli* en bacteriën van de coligroep'. Van deze normserie zijn deel 1 en deel 2 vrij recent herzien.

Normalisatie en NEN: professionaliteit

NEN is een onafhankelijke stichting zonder winstoogmerk. In Nederland is NEN de enige toegangspoort tot Europese (CEN) en internationale (ISO) normalisatie. Door lid te worden van nationale norm(sub)commissies kunt u ook als expert op Europees en internationaal vlak deelnemen aan werkgroepen en commissies. Wie meedoet aan normalisatie, deelt zijn kennis om er samen met anderen voordeel uit te halen. Op een slimme manier worden meerdere belangen met elkaar verenigd. De commissieleden financieren, naar draagkracht, gezamenlijk de inzet van NEN voor de normsubcommissie.

Meer weten of geïnteresseerd in het lidmaatschap?

Wilt u meer informatie over normalisatie of wilt u lid worden van de normcommissie Watermicrobiologie, neem dan contact op met Laura Mout, secretaris van deze normsubcommissie en Consultant Milieu & Maatschappij, telefoon (015) 2 690 436, e-mail laura.mout@nen.nl.

versie: 20150421

Normalisatie: de wereld op één lijn.

Overzicht van normen voor microbiologie

Dit overzicht toont de microbiologische normen voor de voedselketen en water. Deze normen behoren tot het werkprogramma van de Nederlandse normcommissie 'Microbiologie van de voedselketen' en de normsubcommissie 'Microbiologische parameters'. De norm(sub)commissies worden begeleid door NEN, het Nederlands Normalisatie-instituut. NEN heeft een faciliterende rol. Normen zijn afspraken die belanghebbende partijen maken over een product, dienst of systeem en normalisatie is het proces om tot een norm te komen. NEN beheert en publiceert een omvangrijke collectie van duizenden internationale en nationale normen. Door zijn lidmaatschap op Europees en mondiaal niveau heeft NEN een centrale positie in het web van internationale normalisatie. Dit document geeft een overzicht van de gepubliceerde normen op het gebied van microbiologie; een deel van deze gepubliceerde normen zijn nog in ontwikkeling. Het overzicht start met de normen gerangschikt naar micro-organisme. Daarna zijn de meer algemene normen voor microbiologisch onderzoek opgenomen.

Normen kennen verschillende stadia en kunnen op nationaal, Europees en/of mondiaal niveau gelden. Hierna volgt een verklaring bij veelgebruikte afkortingen.

- NEN: Nederlandse norm
- NPR: Nederlandse praktijkrichtlijn
- NEN of NPR Ontw.: Nederlands normontwerp of praktijkrichtlijnontwerp, ontwerpteksten waarop commentaar kan worden ingediend.
- EN: Europese norm, deze normen moeten altijd als Nederlandse norm worden overgenomen en heten dan NEN-EN.
- NEN-EN: Europese norm, die is overgenomen als Nederlandse norm.
- NEN-EN Ontw.: de Europese concept norm wordt ter stemming en commentaar door de nationale normalisatie-instituten naar de normcommissies verstuurd en daarnaast ter commentaar gepubliceerd.
- ISO: internationale norm
- NEN-ISO: ISO-norm, die is overgenomen als Nederlandse norm.
- NEN-EN-ISO: ISO-norm, die Europees is overgenomen en daardoor ook binnen Nederland.
- NEN-(EN-)ISO Ontw. of ISO/DIS (Draft International Standard): de concept internationale norm wordt ter stemming en commentaar door de nationale normalisatie-instituten naar de normcommissies verstuurd en daarnaast ter commentaar gepubliceerd.
- TS: een Technical Specification (TS) heeft een normatief karakter. Het document wordt opgesteld voor voorlopige toepassing, ten aanzien van een technisch onderwerp waarvoor of de technische stand van zaken of de Europese en/of mondiale consensus nog onvoldoende is om een Europese en/of mondiale norm uit te brengen. Een TS kan ook overgenomen worden in Nederland en heet dan: NPR-CEN-ISO/TS, NPR-CEN/TS of NPR-ISO/TS.
- TR: een Technical Report (TR) heeft een informatief karakter. Het document wordt uitgegeven als het wenselijk blijkt om bepaalde informatie, zoals technische gegevens of een inventarisatie van wettelijke regels en normen per land, beschikbaar te stellen. Een TR mag ook overgenomen worden in Nederland en heet dan: NPR-CEN-ISO/TR, NPR-CEN/TR of NPR-ISO/TR.

Meer informatie

U kunt terecht bij onze klantenservice voor informatie over normen, bestellingen van normen en abonnementen via telefoonnummer (015) 2 690 391 of e-mail klantenservice@nen.nl. Voor meer informatie over of deelname aan de norm(sub)commissies kunt u contact opnemen met Laura Mout, Consultant AgroFood & Consumer, telefoon (015) 2 690 436, e-mail laura.mout@nen.nl. Op www.nen.nl/microbiologie vindt u het overzicht van normen digitaal.

Onderwerp	Norm	Titel
<i>Aeromonas</i>	NEN 6263:2009	Water - Detectie en telling van <i>Aeromonas</i>
Antibiotica in zuivel	NEN-EN-ISO 13969:2004 NEN-EN-ISO 18330:2003 NPR-ISO/TS 26844:2006	Milk and milk products - Guidelines for a standardized description of microbial inhibitor tests Milk and milk products - Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues Milk and milk products - Determination of antimicrobial residues - Tube diffusion test
<i>Bacillus cereus</i>	NEN-EN-ISO 7932:2004 NEN-EN-ISO 18465:2015 Ontw.	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive <i>Bacillus cereus</i> - Colony-count technique at 30 degrees C Microbiology of the food chain - Quantitative analysis of emetic toxin (cereulide) using LC-MS/MS

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-EN-ISO 21871:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive <i>Bacillus cereus</i> - Most probable number technique and detection method
Bacteriöfagen	NEN 6816:2001	Melk en melkproducten - Het aantonen van voor zuursels storende bacteriöfagen
	NEN-EN-ISO 10705-1:2001	Water quality - Detection and enumeration of bacteriöfages - Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriöfages
	NEN-EN-ISO 10705-2:2001	Water quality - Detection and enumeration of bacteriöfages - Part 2: Enumeration of somatic coliphages
	NEN-ISO 10705-3:2003	Water quality - Detection and enumeration of bacteriöfages - Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriöfages from water
	NEN-ISO 10705-4:2002	Water quality - Detection and enumeration of bacteriöfages - Part 4: Enumeration of bacteriöfages infecting <i>Bacteroides fragilis</i>
Besmettingsflora	NEN 6820:2005	Melk en melkproducten - Het aantonen van ongewenste besmetting van lang-houdbare vloeibare melkproducten
	NEN 6821:2013	Gepasteuriseerde melk en vloeibare melkproducten - Aantonen van nabesmetting
Boterzuurbacteriën	NEN 6877:2009	Melk en melkproducten - Aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën volgens de MPN-methode
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	NEN-ISO 13722:1997	Meat and meat products - Enumeration of <i>Brochothrix thermosphacta</i> - Colony-count technique
<i>Campylobacter</i>	NEN 6252:2010	Detectie van thermolerante <i>Campylobacter</i> met Preston en mCCDA in mest en vlees, afkomstig van pluimvee
	NEN-EN-ISO 10272-1:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of <i>Campylobacter</i> spp. - Part 1: Detection method
	NEN-EN-ISO 10272-1:2015 Ontw.	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for detection and enumeration of <i>Campylobacter</i> - Part 1: Detection method
	NPR-ISO/TS 10272-2:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of <i>Campylobacter</i> spp. - Part 2: Colony-count technique
	NEN-EN-ISO 10272-2:2015 Ontw.	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for detection and enumeration of <i>Campylobacter</i> - Part 2: Colony-count technique
	NEN 6269:1996	Bacteriologisch onderzoek van water - Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele <i>Campylobacter</i> -bacteriën
	NPR 6270:1996	Bacteriologisch onderzoek van water - Toelichting bij het onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele <i>Campylobacter</i> -bacteriën
	ISO 17995:2005	Water quality - Detection and enumeration of thermotolerant <i>Campylobacter</i> species
<i>Clostridium</i>	NEN-ISO 15213:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions
	NPR-CEN-ISO/TS 17919:2013	Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia
	NEN-EN-ISO 6461-1:1993	Water quality - Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) - Part 1: Method by enrichment in a liquid medium
	NEN-EN-ISO 6461-2:1993	Water quality - Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) - Part 2: Method by membrane filtration
<i>Clostridium perfringens</i>	NEN-EN-ISO 7937:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> - Colony-count technique
	NEN-ISO 14189:2013	Water quality - Enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> - Method using membrane filtration
Coliformen en <i>Escherichia coli</i>	NEN-ISO 4831:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique
	NEN-ISO 4832:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique
	NEN-ISO 7251:2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> - Most probable number technique
	NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012	Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
	NEN-ISO 16649-1:2001	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-ISO 16649-2:2001	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide
	NPR-ISO/TS 16649-3:2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide
	NEN-EN-ISO 16649-3:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide
	NEN-EN-ISO 16654:2001	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of <i>Escherichia coli</i> O157
	NEN-ISO 11866-1:2005	Milk and milk products - Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> - Part 1: Most probable number technique using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG)
	NEN-ISO 11866-2:2005	Milk and milk products - Enumeration of presumptive <i>Escherichia coli</i> - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using membranes
	NEN-EN-ISO 9308-1:2014	Water quality - Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora
	NEN-EN-ISO 9308-2:2012	Water quality - Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria - Part 2: Most probable number method
	NEN-EN-ISO 9308-3:1999 (en correctieblad C1:2000)	Water quality - Detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria - Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of <i>E. coli</i> in surface and waste water
	NPR-CEN/TR 15214-1:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 1: Membrane filtration method for quantification
	NPR-CEN/TR 15214-2:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium
	NPR-CEN/TR 15214-3:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i> in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 3: Macromethod (Most Probable Number) in liquid medium
	NPR-CEN/TR 16193:2013	Sludge, treated biowaste and soil - Detection and enumeration of <i>Escherichia coli</i>
	NPR-ISO/TS 22964:2006	Milk and milk products - Detection of <i>Enterobacter sakazakii</i>
	NEN-EN-ISO 22964:2015 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of <i>Cronobacter</i> spp.
	NEN-EN-ISO 18744:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Detection and enumeration of <i>Cryptosporidium</i> and <i>Giardia</i> in fresh leafy green vegetables and berry fruits
	NEN-ISO 15553:2006	Water quality - Isolation and identification of <i>Cryptosporidium</i> oocysts and <i>Giardia</i> cysts from water
	NEN-ISO 21528-1:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment
	NEN-EN-ISO 21528-1:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection of Enterobacteriaceae
	NEN-ISO 21528-2:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method
	NEN-EN-ISO 21528-2:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method
	NEN 6817:2002	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan fecale enterococci
	NEN-EN-ISO 7899-1:1998 (en correctieblad C1:2000)	Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water
	NEN-EN-ISO 7899-2:2000	Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method
	NEN-ISO 21527-1:2008	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95
Gisten en schimmels		

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-ISO 21527-2:2008	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95
	NEN-ISO 6611:2004	Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - Colony-count technique at 25 degrees C
Legionella	NEN 6254+C1:2013	Water - Detectie en kwantificering van <i>Legionella pneumophila</i> - Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR)
	NEN 6265:2007	Water - Detectie en telling van <i>Legionella</i>
	NPR 6266:2014	Water - Toelichting bij de detectie van <i>Legionella</i> volgens NEN 6265
	ISO 11731:1998	Water quality - Detection and enumeration of <i>Legionella</i>
	NEN-EN-ISO 11731-2:2008	Water quality - Detection and enumeration of <i>Legionella</i> - Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts
	ISO/TS 12869:2012	Water quality - Detection and quantification of <i>Legionella</i> spp. and/or <i>Legionella pneumophila</i> by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
<i>Listeria monocytogenes</i>	NEN-EN-ISO 11290-1:1997 (en wijzigingsblad A1:2004)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> - Part 1: Detection method (Amendment 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data)
	NEN-EN-ISO 11290-1:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> and other <i>Listeria</i> spp. - Part 1: Detection method
	NEN-EN-ISO 11290-2:1998 (en wijzigingsblad A1:2004)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> - Part 2: Enumeration method (Amendment 1: Modification of the enumeration medium)
	NEN-EN-ISO 11290-2:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> and of <i>Listeria</i> spp. - Part 2: Enumeration method
Meikzuurbacteriën	NEN-ISO 15214:1998	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C
	NEN 6814:2002	Pekel, stremsel, kaas en omgevingsmateriaal - Aantonen van gasvormende zouttolerante micro-organismen
	NEN 6815:2009	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan lactobacillen
	NEN-ISO 7889:2003	Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count technique at 37 degrees C
	NEN-ISO 9232:2003	Yogurt - Identification of characteristic microorganisms (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> and <i>Streptococcus thermophilus</i>)
	NEN-ISO 17792:2006	Milk, milk products and mesophilic starter cultures - Enumeration of citrate-fermenting lactic acid bacteria - Colony-count technique at 25 °C
	ISO/DIS 19344:2014	Milk and milk products - Starter cultures, probiotics and fermented product - Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry
	ISO 20128:2006	Milk products - Enumeration of presumptive <i>Lactobacillus acidophilus</i> on a selective medium - Colony-count technique at 37 °C
	NEN-ISO 27205:2010	Fermented milk products - Bacterial starter cultures - Standard of identity
	NEN-ISO 29981:2010	Milk products - Enumeration of presumptive bifidobacteria - Colony count technique at 37 degrees C
<i>Pseudomonas</i>	NEN-EN-ISO 13720:2010	Meat and meat products - Enumeration of presumptive <i>Pseudomonas</i> spp.
	NPR-ISO/TS 11059:2009	Milk and milk products - Method for the enumeration of <i>Pseudomonas</i> spp.
	NEN-EN-ISO 16286:2008	Water quality - Detection and enumeration of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Method by membrane filtration
Psychotrofen	NEN-ISO 17410:2001	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
	ISO 6730:2005	Milk - Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic microorganisms - Colony-count technique at 6,5 degrees C
	NEN-ISO 8552:2004	Milk - Estimation of psychrotrophic microorganisms - Colony-count technique at 21 degrees C (Rapid method)
<i>Salmonella</i>	NEN-EN-ISO 6579:2002 (en correctieblad C1:2004 en wijzigingsblad A1:2007)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp. (Amendment 1: Annex D: Detection of <i>Salmonella</i> spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage)

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-EN-ISO 6579-1:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 1: Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp.
	NPR-CEN-ISO/TS 6579-2:2012	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique
	NPR-CEN-ISO/TR 6579-3:2014	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 3: Guidelines for serotyping of <i>Salmonella</i> spp.
	NEN-EN-ISO 6785:2007	Milk and milk products - Detection of <i>Salmonella</i> spp.
	NEN-EN-ISO 19250:2013	Water quality - Detection of <i>Salmonella</i> spp.
	NPR-CEN/TR 15215-1:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Salmonella</i> spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 1: Membrane filtration method for quantitative resuscitation of sub-lethally stressed bacteria (to confirm efficacy of log drop treatment procedures)
	NPR-CEN/TR 15215-2:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Salmonella</i> spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 2: Liquid enrichment method in selenite-cystine medium followed by Rapport-Vassiliadis for semi-quantitative Most Probable Number (MPN) determination
	NPR-CEN/TR 15215-3:2006	Characterization of sludges - Detection and enumeration of <i>Salmonella</i> spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rapport-Vassiliadis
Shigella	NEN-EN-ISO 21567:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of <i>Shigella</i> spp.
Sporevormers	NEN 6809:2014	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan sporen van thermofiele aerobe sporenvormende bacteriën
	NEN 6813:2014	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan sporen van mesofiele aerobe sporenvormende bacteriën
	ISO/TS 27265:2009	Dried milk - Enumeration of the specially thermoresistant spores of thermophilic bacteria
Staphylococceen	NEN-EN-ISO 6888-1:1999 (en wijzigingsblad A1:2003)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (Amendment 1: Inclusion of precision data)
	NEN-EN-ISO 6888-2:1999 (en wijzigingsblad A1:2003)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium (Amendment 1: Inclusion of precision data)
	NEN-EN-ISO 6888-3:2003 (en correctieblad C1:2007)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species) - Part 3: Detection and MPN technique for low numbers
	NEN-ISO 8870:2006	Milk and milk-based products - Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci
Thermoresistenten	NEN 6807:2014	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan thermoresistente micro-organismen
	NEN 6808:2014	Melk en melkproducten - Bepaling van het gehalte aan thermoresistente streptococceen
Trichinella	NEN-EN-ISO 18743:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Detection of <i>Trichinella</i> Larvae in meat by artificial digestion method
Vibrio	NPR-ISO/TS 21872-1:2007 (en correctieblad C1:2008)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic <i>Vibrio</i> spp. - Part 1: Detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio cholerae</i>
	NPR-ISO/TS 21872-2:2007	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic <i>Vibrio</i> spp. - Part 2: Detection of species other than <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>Vibrio cholerae</i>
Viruses	NPR-CEN-ISO/TS 15216-1:2013	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification
	NPR-CEN-ISO/TS 15216-2:2013	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection
	NEN-EN 14486:2005	Water quality - Detection of human enteroviruses by monolayer plaque assay

Onderwerp	Norm	Titel
<i>Yersinia enterocolitica</i>	NEN-EN-ISO 10273:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i>
Algemene aanwijzingen	NEN-EN-ISO 7218:2007 (en wijzigingsblad A1:2014)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
	NPR 6268:2012	Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water
	NEN-EN-ISO 8199:2007	Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture
Kiemgetallen	NEN-EN-ISO 4833-1:2013	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique
	NEN-EN-ISO 4833-2:2013 (en correctieblad C1:2014)	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique
	NEN-ISO 8553:2004	Milk - Enumeration of microorganisms - Plate-loop technique at 30 degrees C
	NEN-ISO 13559:2002	Butter, fermented milks and fresh cheese - Enumeration of contaminating microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C
	NPR 6267:2002	Toelichting bij NEN-EN-ISO 6222:1999 - Water - Telling van kweekbare micro-organismen - Bepaling van het koloniegetal door enting in een voedingsbodem van gistextractagar
	NEN 6276:1995	Bacteriologisch onderzoek van water - Bepaling van het koloniegetal op R ₂ A-agar bij 25 °C
	NEN-EN-ISO 6222:1999	Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium
Mediumbereiding en -controle	NEN-EN-ISO 11133:2014	Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media
	NEN 6275:1996	Bacteriologisch onderzoek van water - pH-meting van bacteriologische media
	ISO 9998:1991	Water quality - Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests
Monsternamen	NEN-EN-ISO 13307:2013	Microbiology of food and animal feed - Primary production stage - Sampling techniques
	NEN-ISO 17604:2003 (en wijzigingsblad A1:2009)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Carcass sampling for microbiological analysis (Amendment 1: Sampling of poultry carcasses)
	NEN-EN-ISO 17604:2014 Ontw.	Microbiology of the food chain - Carcass sampling for microbiological analysis
	NEN-ISO 18593:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
	NEN-EN-ISO 707:2008	Milk and milk products - Guidance on sampling
	ISO 5538:2004	Milk and milk products - Sampling - Inspection by attributes
	ISO 8086:2004	Dairy plant - Hygiene conditions - General guidance on inspection and sampling procedures
	NEN-EN-ISO 5667-1:2007	Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques
	NEN-EN-ISO 5667-3:2012	Water quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples
	NEN-EN-ISO 19458:2007	Water quality - Sampling for microbiological analysis
Monster-voorbehandeling	NEN-EN-ISO 6887-1:1999	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
	NEN-EN-ISO 6887-1:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
	NEN-EN-ISO 6887-2:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-EN-ISO 6887-2:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products
	NEN-EN-ISO 6887-3:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products
	NEN-EN-ISO 6887-3:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products
	NEN-EN-ISO 6887-4:2003 (en correctieblad C1:2004 en wijzigingsblad A1:2011)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products
	NEN-EN-ISO 6887-4:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products
	NEN-EN-ISO 6887-5:2010	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products
	NEN-EN-ISO 6887-6:2013	Microbiology of food and animal feed - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage
	ISO 7704:1985	Water quality - Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses
Overig	NEN-ISO 11289:1993	Heat-processed foods in hermetically sealed containers - Determination of pH
	NEN-EN-ISO 17468:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Technical requirements and guidance on establishment or revision of standard methods
	NEN-ISO 21807:2004	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity
	NEN-ISO 15174:2012	Milk and milk products - Microbial coagulants - Determination of total milk-clotting activity
	NEN 6271:1995	Bacteriologisch onderzoek van water - Bepaling van het gehalte aan gemakkelijk Assimileerbaar Organische Koolstof (AOC)
	NPR 6272:1995	Bacteriologisch onderzoek van water - Toelichting bij de bepaling van het gehalte aan gemakkelijk Assimileerbaar Organisch Koolstof (AOC)
	ISO 6107-6:2004	Water quality - Vocabulary
	NPR-CEN/TR 15175:2006	Characterization of sludges - Protocol for organizing and conducting inter-laboratory tests of methods for chemical and microbiological analysis of sludges
Polymerase chain reaction	NPR-CEN-ISO/TS 20836:2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Performance testing for thermal cyclers
	NEN-EN-ISO 20837:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection
	NEN-EN-ISO 20838:2006	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods
	NEN-EN-ISO 22118:2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens - Performance characteristics
	NEN-EN-ISO 22119:2011	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions
	NEN-EN-ISO 22174:2005	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions
Validatie en verificatie	NEN-EN-ISO 16140:2003 (en wijzigingsblad A1:2011)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods

Onderwerp	Norm	Titel
	NEN-EN-ISO 16140-1:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Method validation - Part 1: Vocabulary
	NEN-EN-ISO 16140-2:2013 Ontw.	Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
	NPR-ISO/TS 19036:2006 (en wijzigingsblad A1:2009)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (Amendment 1: Measurement uncertainty for low counts)
	NPR-CEN-ISO/TS 22117:2010	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison
	ISO 14461-1:2005	Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories - Part 1: Analyst performance assessment for colony counts
	ISO 14461-2:2005	Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories - Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps
	NEN-EN-ISO 21187:2005	Milk - Quantitative determination of bacteriological quality - Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results
	NPR-CEN-ISO/TR 13843:2001	Water quality - Guidance on validation of microbiological methods
	NEN-EN-ISO 17994:2014	Water quality - Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods
	ISO 29201:2012	Water quality - The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

©2015 Nederlands Normalisatie-instituut (21 april 2015)

Geheel of gedeeltelijke overname van informatie is toegestaan na goedkeuring van NEN en met bronvermelding. Hoewel bij deze uitgave de uiterste zorg is nagestreefd, kunnen fouten en onvolledigheden niet geheel worden uitgesloten. Het Nederlands Normalisatie-instituut en/of de leden van de commissies aanvaarden derhalve geen enkele aansprakelijkheid, ook niet voor directe of indirecte schade, ontstaan door of verband houdend met toepassing van door het Nederlands Normalisatie-instituut gepubliceerde uitgaven.



Microbiologische aspecten van verse vis

Frank Devlieghere

Universiteit Gent – Food2know

4.11 Vis, visproducten, schaal- en schelpdieren

4.11.1 Vis

De samenstelling van de microbiële flora van visserijproducten komt meestal overeen met die van de (natuurlijke) vangstomgeving. De huid, kieuwen en ingewanden zijn besmet, terwijl het visvlees van vers gevangen vis steriel is. De micro-organismen die aanwezig zijn op vis en visproducten zijn afkomstig van 2 belangrijke besmettingsbronnen. In de eerste plaats het water waarin wordt gevestigd, waarbij de graad van besmetting afhangt van het leefmilieu (zie tabel 1) en ten tweede de handelingen die plaatsvinden na visvangst.

De temperatuur is de bepalende factor bij de samenstelling van de microflora. Vis uit koud water is vooral besmet met psychrotrofe Gramnegatieve bacteriën als *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella* en *Vibrionaceae*. Halotolerante *Vibrio*-soorten kunnen voorkomen op zoutwatervis, *Aeromonas* spp. op zoetwatervis. Daarentegen is vis uit warm water vooral besmet met Grampositieve bacteriën als *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium* en *Lactobacillus*. Door verontreinigde stranden en kustlijnen kunnen pathogene micro-organismen op vis aanwezig zijn. Meestal zijn ze van fecale oorsprong.

Tabel 1. Gemiddelde kwantitatieve besmetting van vis.

Leefmilieu	Kieuwen (kve/cm ²)	Huid (kve/cm ²)	Ingewanden (kve/cm ²)
Zuiver koud water	10 ² -10 ⁴	10 ² -10 ⁴	10 ² -10 ⁸
Verontreinigd tropisch en subtropisch water	10 ³ -10 ⁶	10 ³ -10 ⁶	10 ² -10 ⁸

Bij bewaring onder ijs bestaat, na verloop van tijd, de flora voor meer dan 90% uit *Pseudomonas* spp. en *Shewanella putrifaciens*. Bij aerobe bewaring bij 25°C wordt de microflora gedomineerd door *Vibrionaceae*. Is de vis gevangen in verontreinigde gebieden (strand en kustlijnen), dan zijn vooral mesofiele *Enterobacteriaceae* aanwezig.

Door handelingen die plaatsvinden na de vangst en tijdens opslag raakt het visvlees besmet. Bijvoorbeeld via het gereedschap, bij het gutten (verwijderen van ingewanden), het spoelen (met zeewater), het stapelen onder ijs in het ruim en via mensen. Aan land is besmetting mogelijk door onder meer het lossen, fileren, portioneren, verpakken en vervoeren.

Productveiligheid

In levende vis kunnen 2 pathogene bacteriesoorten worden aangetroffen: *Clostridium botulinum* type E en *Vibrio parahaemolyticus* (in warm water, temperatuur > 15°C). *V. parahaemolyticus*

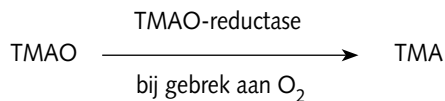
is een zouttolerante bacterie die zich heeft aangepast aan de mariene omgeving. Daarnaast is in bepaalde regio's *Vibrio cholerae* endemisch aanwezig. *Vibrio vulnificus* kan aangetroffen worden in estuaria (waar de riviermond uitkomt in de zee).

Vis gevangen in verontreinigde gebieden of vis die aan boord of aan land onhygiënisch is behandeld, kan bovendien met de pathogenen *Salmonella*, enteropathogene *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (coagulasepositieve staphylococci) en *Listeria monocytogenes* besmet zijn.

Vorming van microbiële metabolieten is mogelijk tijdens de opslag van vis. Dat kan leiden tot een voedselvergiftiging (scombroïde vergiftiging, zie 3.3.6 Biogene aminen). Een voorbeeld hiervan is de vorming van histamine door *Proteus morganii* bij een pH van 6 tot 7 en een temperatuur van 20°C tot 30°C. Dat is een bekend verschijnsel bij tonijn en makreel.

Productkwaliteit

Het bederf van vis (beenvis) is voor 95% van bacteriële aard. De overige 5% is autolytisch (door enzymen van het visvlees of de ingewanden). Het bacterieel bederf treedt onmiddellijk op na de 'rigor mortis' en verloopt hoofdzakelijk in 2 fasen. Bij de eerste fase wordt trimethylamineoxide (TMAO) enzymatisch omgezet naar trimethylamine (TMA) via de volgende reactie:



Meerdere soorten bacteriën vormen het enzym TMAO-reductase. Bijvoorbeeld door enkele *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter* en *Moraxella*-soorten, *Enterobacteriaceae*, sommige clostridia en *Photobacterium phosphorum*. Vis is daardoor maar kort houdbaar. Zelfs bij lage temperatuur. Zeewatervis bevat TMAO als osmoregulator. Zoetwatervis niet.

In de tweede fase vindt afbraak plaats van aminozuren waarbij ammoniak (NH₃) en aminen worden gevormd. Deze geven de vis een onaangename geur en smaak. Waterstofsulfide (H₂S) en vluchtige zwavelverbindingen worden uit zwavelhoudende aminozuren gevormd (cysteïne, cystine, methionine). *S. putrefaciens* en sommige *Vibrionaceae* zijn producenten van H₂S uit het zwavelhoudende aminozuur L-cysteïne.

Het bederf van kraakbeenvissen (bijvoorbeeld rog en haaiachtigen) wordt gekenmerkt door een enzymatische snelle vorming van NH₃ uit ureum. In een later stadium treedt bederf op door TMA-productie en vorming van NH₃ en aminen uit aminozuren langs bacteriële weg. De som van TMA, aminen en ammoniak wordt de Totale Vluchtige Basische stikstoffractie (TVB) genoemd. Dat gehalte wordt uitgedrukt in mg N per 100 gram visvlees.

De intrinsieke factoren bepalen mede in welke mate en welk deel van de aanwezige microflora zal uitgroeien. Bij vis zijn deze factoren optimaal en als volgt:

- hoge a_w;
- neutrale pH (afhankelijk van de glycolyse gedurende de 'rigor mortis'-periode);
- hoog gehalte aan stikstofbestanddelen;
- rijk aan vitamines en mineralen.

Het gehalte aan koolhydraten in vis is laag (< 1%) waardoor slechts kleine hoeveelheden melkzuur post mortem kunnen worden gevormd. Hierdoor kan de pH-gevoelige bederfveroorzakende bacterie *S. putrefaciens* uitgroeien.

Opslag van vis bij lage temperatuur (bij voorkeur tussen 0-4°C) is essentieel voor het vertragen van microbiële groei. Diepgevroren vis bewaard bij -18°C vertoont geen microbiologisch bederf. Verpakken van vis onder gemodificeerde atmosfeer (MAP) remt de groei van de bederfflora en de microbiële reductie van TMAO tot TMA. Dat leidt tot verlenging van de houdbaarheid, met behoud van de sensorische kwaliteit. Bederf van zeevis verpakt onder gemodificeerde atmosfeer wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door *S. putrefaciens* en *P. phosphorum*.

Methodologie

Het microbiologisch onderzoek van verse vis is om de volgende redenen niet zo zinvol:

- de tijd die nodig is voor marktdistributie is zeer kort en meestal korter dan de analysetijd, ook al treden vertragingen op tijdens distributie;
- vers verkochte vis uit diepzeezones is minimaal besmet met micro-organismen van hygiënisch belang.

Bovendien kan bederf van verse vis worden veroorzaakt door bacteriën die moeilijk groeien op de gebruikelijke media waardoor bacteriologische resultaten niet representatief zijn. Daarom kan in de keuze van cultuurmedia beter worden afgeweken van de algemeen geldende methoden voor levensmiddelen (zie hierna).

Belangrijke parameters voor de kwaliteit van vis zijn het aerobisch kiemgetal en het aantal H₂S-producerende bacteriën. Bij de bepaling van het aerobisch kiemgetal vindt bebroeding plaats gedurende 5 dagen bij 22°C in plaats van bij 30°C. Op deze manier wordt de methode specifieker voor vis en visproducten, omdat vooral het aantal psychrotrofe bacteriën wordt bepaald. Sommige van deze psychrotrofe bacteriën kunnen zich ook niet ontwikkelen bij 30°C. Voer de telling van de H₂S-producerende bacteriën uit met IJzer Agar (gietplaattechniek met het aanbrengen van een deklaag). De bebroeding vindt plaats bij 22°C gedurende 3 dagen.

Het vaststellen van de microbiologische kwaliteit gaat bijvoorbeeld samen met bepalingen van TVB en TMA-gehalten. Tevens is een sensorische evaluatie door een testpanel belangrijk bij het vaststellen van de kwaliteit. De criteria voor het TVB-gehalte van verse vis bewaard onder ijs zijn afhankelijk van de vissoort (zie tabel 2). De richtlijn voor TMA is maximaal 12-15 mg N per 100 gram visvlees.

Voor producten bewaard bij een hogere temperatuur (bijvoorbeeld 4°C), zoals typisch bij in gemodificeerde atmosfeer verpakte vis, gelden bovenstaande normen niet. Naast het onderzoek naar kiemgetallen is het raadzaam ook sensorische analyses, of bepaling van vluchtige componenten zoals TMA, azijnzuur, ethanol, 2,3-butaandiol, 3-methyl-1-butanol en dimethylsulfide uit te voeren om de houdbaarheidstermijn vast te stellen

Tabel 2. Criteria voor het TVB-gehalte van verschillende soorten vis (vers, bewerkt of ingevroren).

Categorie	Vissoort	Naam	Gehalte TVB (mg N/100 g)
A	Roodbaars	<i>Sebastes</i> spp.	25 mg N/100 g
	Blauwkeeltje	<i>Helicolenus dactylopterus</i> <i>Sebastichthys capensis</i>	
B	Scholachtigen	<i>Pleuronectidae</i> (uitgezonderd <i>Hippoglossus</i> spp.)	30 mg N/100 g
C	Heekachtigen	<i>Merlucciidae</i>	35 mg N/100 g
	Kabeljauwachtigen	<i>Gadidae</i>	
	Zalm	<i>Salmo salar</i>	

Bron: Verordening (EG) Nr. 2074/2005, 2005.

4.11.2 Visproducten

Visproducten kunnen op uiteenlopende manieren worden geproduceerd. Daarmee kan het product tegelijkertijd ook in meer of mindere mate worden geconserveerd. Deze verschillende productiewijzen zijn medebepalend voor het soort en de snelheid van microbiel bederf. Voorbeelden van deze (conserverings)technieken zijn indrogen, roken, pekelen of marinieren van vis.

Bij snijhandelingen zoals fileren, wordt het oppervlak van de vis sterk vergroot. Daarmee nemen de mogelijkheden voor besmetting ook sterk toe. Vooral bij onvoldoende hygiënische bedrijfsvoering.

Productveiligheid

Visproducten kunnen besmet zijn met diverse pathogene bacteriën, zoals enteropathogene *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* (coagulasepositieve staphylococcen), *L. monocytogenes* en *C. botulinum* type B en vooral type E. In principe remmen processen als zouten, roken en drogen de groei van deze pathogenen. In welke mate dat hangt af van de uiteindelijke zoutconcentratie en de mate van droging (verlaging van de wateractiviteit (a_w -waarde)). Daalt de wateractiviteit slechts in een lichte mate dan wordt de groei niet geremd en blijft koeling noodzakelijk. Problemen kunnen ontstaan als de temperatuur tijdens bewaren hoger is dan 5°C.

Bij lichtgezouten koudgerookte vis is het belangrijk dat rekening wordt gehouden met een mogelijke besmetting van de vis met *L. monocytogenes* (via visserijwateren en/of productieomgeving). Gezien het psychrotrofe karakter van deze pathogeen (groei mogelijk bij lage temperatuur) is het noodzakelijk de houdbaarheid van deze productsoorten te beperken. Door besmetting vanuit de productieomgeving kan warmgerookte vis ook met *L. monocytogenes* besmet raken.

Productkwaliteit

Melkzuurbacteriën en gisten en schimmels zijn meestal verantwoordelijk voor bederf van vismarinades vanwege de lage pH van dit soort producten (pH ± 4.0). Gezouten en gedroogde visproducten, al of niet gerookt, zijn door de hun verlaagde a_w -waarde vooral onderhevig aan bederf door Grampositieve bacteriën (vooral micrococcen en staphylococcen), gisten en schimmels.



Microbiologische veiligheid van insecten bestemd voor humane consumptie

Lieve Herman

ILVO – Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

Inleiding

Het Wetenschappelijk Comité van het FAVV (het Belgische Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen) en de Hoge Gezondheidsraad (HGR) hebben een advies uitgebracht over de mogelijke gevaren die verbonden kunnen zijn aan de humane consumptie van insecten (http://www.favv.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES14-2014_NL_DOSSIER2014-04_002.pdf, <http://www.health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/19099421.pdf>). De studie betreft enkel insecten die in hun geheel geconsumeerd worden of als “preparaat van het gehele insect” (bv. vermalen van hele wormen) en die in een gestandaardiseerde omgeving gekweekt worden. De studie gaat m.a.w. niet dieper in op insecten die gewonnen worden via wildvang, proteïne- of andere extracten afkomstig van insecten of insecten gekweekt voor niet-humane consumptie. In dit advies worden overigens enkel de insectensoorten beschouwd die het meest frequent op de Belgische markt (anno 2011) werden aangeboden voor humane consumptie. De verkoop van deze soorten wordt momenteel gedoogd in België, bij gebrek aan een eenduidig juridisch kader op Europees niveau.

Insecten zijn rijk aan eiwitten, vitamines, mineralen en vetzuren. De specifieke voedingswaarde en chemische samenstelling wordt bepaald door de soort, het ontwikkelingsstadium en het voeder. Naargelang de soort, worden insecten door de mens geconsumeerd in verschillende stadia van ontwikkeling, nl. in ei-, larve-, pop- of volwassen stadium (Belluco *et al.*, 2013; Verkerk *et al.*, 2007; Finke, 2002). Veelal worden insecten in hun geheel geconsumeerd, maar ze kunnen ook verwerkt worden tot pasta's of poeders. Extractie van proteïnen, vetten, chitine, mineralen en vitamines is eveneens mogelijk (FAO, 2013).

Microbiologische kwaliteit van rauwe insecten

Net zoals vertebraten kunnen insecten biologische agentia en stoffen bevatten die bij consumptie een gevaar voor de gezondheid kunnen betekenen. De kweek-, verwerkings- en verdere bewaarcondities zijn in grote mate bepalend voor de voedselveiligheid van eetbare insecten. Insecten hebben een grote diversiteit aan micro-organismen in hun darmflora en verschillende micro-organismen kunnen aanwezig zijn op de cuticula of het exoskelet.

Er bestaan weinig specifieke wetenschappelijke studies over de microbiologische kwaliteit en veiligheid van eetbare insecten die onder gecontroleerde condities gekweekt worden. In de beschikbare studies wordt een vrij hoog kiemgetal gerapporteerd, met voor rauwe insecten getallen tussen 10^7 en 10^9 kve/g. Veelal betreft het fecale contaminatie met aanwezigheid van *Enterobacteriaceae* en *E. coli* maar ook Gram positieve bacteriën kunnen aanwezig zijn tot gehalten van 10^5 kve/g. Een speciale zorg betreft de aanwezigheid van aerobe sporenvormers die werden

aangetroffen in gehalten tot 10^4 kve/g. In een verkennende studie werden sporenvormende bacteriën aangetroffen in de darm en de cuticula van gekweekte meelwormlarven (*Tenebrio molitor*) en huiskrekels (*Acheta domesticus*). Het betrof voornamelijk *Bacillus licheniformis* en, sporadisch, *B. subtilis* en *B. megaterium* (Klunder *et al.*, 2012).

Pathogene schimmels zoals *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* en *Rhizopus* kunnen via het voeder de gastheerinsecten besmetten. Deze schimmels kunnen direct besmettelijk zijn voor de mens of kunnen secundaire stoffen uitscheiden die toxisch of allergeen zijn. *Aspergillus*, *Penicillium* en *Fusarium* schimmels worden vaak geassocieerd met de productie van mycotoxines (FAO, 2013; NVWA, 2014 Schabel, 2010). In een preliminaire, Belgische studie werden gisten en schimmels in behoorlijke aantallen aangetroffen in zowel verse, gevriesdroogde als ingevroren meelwormen (*Tenebrio molitor*) en sprinkhanen (*Locusta migratoria*) (interne communicatie 02/05/2014, J. Stoops & L. Van Campenhout, Lab4Food, K.U.Leuven).

Agentia verantwoordelijk voor overdraagbare spongiforme encefalopathieën ('transmissible spongiform encephalopathies' of TSE) zouden een risico kunnen inhouden. Studies hebben aangetoond dat insecten gevoed op basis van componenten van het zenuwstelsel van herkauwers, die besmet zijn met het scrapie agens, zelf een bron van besmetting waren (Lupi, 2006 & 2003; Post *et al.*, 1999; Rubenstein *et al.*, 1998; Wisniewski *et al.*, 1996).

Een ander mogelijk gevaar, verbonden aan de consumptie van rauwe of onvoldoende verhitte insecten, is dat de consument een parasitaire infectie kan oplopen. Parasieten kunnen namelijk insecten als (tussen-)gastheer of als "tijdelijke" gastheer gebruiken (Belluco *et al.*, 2013; NVWA, 2014; Chai *et al.*, 2009; Hinz, 2001). Er zijn een aantal gastro-intestinale wormen (helminthen) beschreven die onder meer in menselijke uitwerpselen gevonden worden en waarvoor insecten specifiek tussengastheer zijn (Hinz, 2001).

Microbiologische kwaliteit van insecten na verwerking en bewaring

Veel insecten en hun producten ondergaan een verwerkingsproces vooraleer ze worden vermarkt. De meest effectieve verhittingsprocessen in relatie tot een daling van de microbiologische besmetting is **verhitting**. Ovendrogen (110 min., 90 °C) leidde in diverse studies tot een reductie van het totaal aerob kiemgetal ($> 3,0 \times 10^7$ kve/g) met 2 à 3 log en tot een reductie van de *Enterobacteriaceae* ($> 1,5 \times 10^7$ kve/g) met 3 à 5 log. Roosteren zou een geringer effect hebben, maar de gegevens in deze studie waren onvolledig om een grondige evaluatie toe te laten. Blancheren voor het roosteren resulteerde in deze studie wel tot een sterke daling van het aantal *Enterobacteriaceae*. Koken (5 - 10 min., 100 °C) reduceerde het aantal *Enterobacteriaceae* sterk (van 10^7 in meelwormlarven en 10^4 kve/g in huiskrekels tot < 10 kve/g). Door het kookproces worden de sporen niet volledig geïnactiveerd. De overlevende sporen kunnen door de condities tijdens de verwerking tot ontkieming gebracht worden en uitgroeien tijdens de bewaring.

Bij **vriesdrogen** wordt het water aan het product onttrokken bij vriestemperaturen, om een relatief lange houdbaarheid (bij bewaring op een koele, droge plaats) te bekomen. **Invriezen** en vriesdrogen zou geen beduidend effect hebben op het totaal aerob kiemgetal en het aantal *Enterobacteriaceae*. **Malen** zou de microbiële contaminatie kunnen verhogen door het vrijkomen van de microbiota uit de darm en de verhoogde mogelijkheid tot groei tijdens de bewaring.



Malen van insecten voorafgaand aan het braden of koken zou de doeltreffendheid van de thermische behandelingen niet verbeteren, maar daarentegen leiden tot een hogere microbiële belasting in vergelijking met hele meelwormlarven (Klunder *et al.*, 2012).

Gemalen insecten kunnen potentieel ook in **gefermenteerde** levensmiddelen gebruikt worden. Het zure milieu dat gecreëerd wordt door de fermentatie verhoogt de houdbaarheid en microbiële veiligheid van (gemalen) insecten en de verzuurde condities (pH 3,7) verhinderen de ontkieming en uitgroei van de sporen.

Net zoals voor overige levensmiddelen, verhogen allerlei **manipulaties** tijdens de productie en verwerking de kans op besmetting vanuit de omgeving bv. met *Staphylococcus sp.*

Om verdere uitgroei van bacteriën te voorkomen of te beperken zijn geschikte **bewaarcondities** belangrijk. Onder bepaalde omstandigheden (bv. temperaturen rond 30 °C en een vochtige omgeving) kunnen bacteriën, waaronder ook ontkiemde sporen, verder uitgroeien.

Er zijn geen sluitende onderzoeken bekend die de microbiële veiligheid van insecten tijdens of na de door producenten vermelde **houdbaarheidstermijn** (bv. 52 weken) nagaan. In het kader van preliminaire testen op de houdbaarheid van meelwormenpasta (zonder toegevoegde additieven) werden het totaal aerobisch kiemgetal, de *Enterobacteriaceae*, het totaal anaerobisch kiemgetal, gisten en schimmels geanalyseerd op meerdere tijdstippen bij bewaring onder verschillende condities. De resultaten van deze studie wijzen op een indicatieve houdbaarheid tussen 3 en 7 dagen bij 2 – 7 °C wanneer de pasta bewaard wordt in een steriel potje; bij bewaring onder vacuüm is de pasta 7 dagen houdbaar, en na pasteurisatie van de pasta in een steriel potje meer dan 14 dagen (interne communicatie 29/04/2014; F. Wouters, VIVES - associatie K.U.Leuven).

Microbiologische analyses van insecten in de handel in België en Nederland

Uit een microbiële analyse van 55 gevriesdroogde insectenproducten (sprinkhanen, kleine meelwormen, meelwormen en meelwormsnacks) uit de Nederlandse detailhandel (anno 2010) bleek het aantal aerobe bacteriën in 59 % van de monsters hoger dan 10^6 kve/g en werd in 65 % van de monsters meer dan 10^3 kve *Enterobacteriaceae* per gram aangetroffen. *Clostridium perfringens*, *Salmonella* en *Vibrio* werden niet aangetroffen en in 93 % van de monsters lag de concentratie aan *Bacillus cereus* onder 100 kve/g (NVWA, 2014). Deze waarden van het aerobe kiemgetal en de concentraties *Enterobacteriaceae* en sporenvormende bacteriën in de gevriesdroogde meelwormen (*Tenebrio molitor*) zijn vergelijkbaar met de waarden die Klunder *et al.* (2012) vermelden voor verse meelwormen.

Een recente Belgische studie (anno 2014, N. Botteldoorn persoonlijke mededeling) werden in 5 gelyofiliseerde producten de volgende resultaten bekomen: totaal aerobisch kiemgetal variërend van 10^3 tot 10^7 , *E. coli* <10 kve/g; *B. cereus* werd gedetecteerd in 2 stalen met gehalten 10^3 en 10^4 kve/g. In een geroosterd staal was het aerobisch totaal kiemgetal 10^3 , bedroeg *E. coli* <10 kve/g en was *B. cereus* negatief. Een gedroogd staal bevatte een totaal aerobisch kiemgetal van $>10^8$ kve/g, 10^5 kve/g *E. coli* en 10^6 kve/g *B. cereus*. Er werden geen *Salmonella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, STEC, coagulasepositieve *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes* en *Clostridium perfringens* gedetecteerd.



Microbiologische richtwaarden

Er bestaat geen specifieke reglementering (microbiologische eisen, etc.) voor de productie en het op de markt brengen van insecten die bestemd zijn voor humane consumptie. Net als alle andere levensmiddelen dient voldaan te worden aan de eisen van de “General Food Law” (Verordening (EG) 178/2002). Deze verbiedt het op de markt brengen van levensmiddelen indien zij schadelijk zijn voor de volksgezondheid of ongeschikt zijn voor menselijke consumptie. Producenten en verdelers van insecten zijn tevens onderworpen aan de Verordening (EG) 852/2004 inzake levensmiddelenhygiëne. Deze regelgeving vereist onder meer dat levensmiddelenbedrijven geregistreerd zijn en beschikken over een preventief autocontrolesysteem gebaseerd op de HACCP (‘hazard analysis and critical control point’) principes.

Ook op het niveau van de Codex Alimentarius zijn er geen standaarden beschikbaar die specifiek betrekking hebben op het gebruik van insecten in humane of dierlijke voeding (PROteINSECT rapport “Deliverable 5.1”, september 2013¹). Gelijkaardig aan andere levensmiddelen van dierlijke oorsprong, zijn voor eetbare insecten onder de Codex Alimentarius volgende normen (geheel of gedeeltelijk) van toepassing (FAO, 2014):

- General Principles of Food Hygiene (CAC/RCP 1-1969);
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/23/CXP_001e.pdf
- Hygienic Practices for meat (CAC/RCP 58-2005);
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/10196/CXP_058e.pdf
- The Codex code of practice on good animal feeding (CAC/RCP 54-2004);
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/10080/CXP_054e.pdf

Voor mogelijke voedselveiligheids- en proceshygiënerichtwaarden kan men zich baseren op de criteria voor “vergelijkbare” producten (**tabel 1**) vermeld in Verordening (EG) nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen.

¹ “Deliverable 5.1” – Mapping Exercise Report with regard to current legislation and regulation: Europe and Africa & China. http://www.proteinsect.eu/fileadmin/user_upload/deliverables/D5.1t-FINAL.pdf

Tabel 1. Mogelijke richtwaarden op basis van de voedselveiligheids- en proceshygiëncriteria (Verordening (EG) nr. 2073/2005).

levensmiddelcategorie	micro-organisme	grenswaarden	opmerking m.b.t. gebruik criterium voor eetbare insecten
<u>Voedselveiligheidsrichtwaarden</u>			
Kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor <i>Listeria monocytogenes</i> kunnen dienen	<i>L. monocytogenes</i>	100 kve/g ⁽¹⁾	
Gehakt vlees en vleesbereidingen van andere diersoorten dan pluimvee bedoeld om na verhitting te worden gegeten	<i>Salmonella</i>	afwezig in 10 g ⁽¹⁾	Enkel op voorwaarde dat gegarandeerd kan worden dat de insecten nog verhit worden.
Levendige tweekleppige weekdieren en levende stekelhuidigen, manteldieren en buikpotigen (bv. slakken)	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> ⁽²⁾	afwezig in 25 g ⁽¹⁾ 230 MPN/100 g vlees en lichaamsvocht ^(1, 3)	
<u>Proceshygiënerichtwaarden</u>			
Gehakt vlees	Aeroob kiemgetal	m = 5 x 10 ⁵ kve/g M = 5 x 10 ⁶ kve/g ⁽⁴⁾	Op basis van (beperkte) literatuurgegevens lijkt dit criterium moeilijk haalbaar voor rauwe insecten. Dit criterium kan desalniettemin als richtwaarde gebruikt worden en zou na hittebehandeling in een gecontroleerd hygiënisch uitgevoerd proces mogelijk moeten zijn.
	<i>E. coli</i> ⁽²⁾	m = 50 kve/g M = 500 kve/g	

⁽¹⁾ Producten die in de handel zijn gebracht, voor de duur van de houdbaarheidsstermijn

⁽²⁾ *E. coli* als indicator voor fecale verontreiniging

⁽³⁾ MPN : 'most probable number'

⁽⁴⁾ 'm' en 'M': waarden waartussen een bepaald aantal deelmonsters moet genomen worden

In tabel 2 worden deze mogelijke richtwaarden op basis van wat beschikbaar is in de huidige wetgeving getoetst aan de gegevens die beschikbaar zijn in de literatuur voor insecten en die hierboven beschreven werden.

Tabel 2: Toetsen van mogelijke microbiologische richtwaarden aan de beschikbare analyseresultaten van insecten.

Parameter	Rauwe insecten	Praktijkstalen België (droog geroosterd)	Koken Blancheren/roosteren	Richtwaarden
	Kve/g			
Totaal aerob kiemgetal	$10^7 - 10^9$	$5 \times 10^3 - >10^8$	< 10 ↓ 2 – 3 log	$5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$
Sporen	$10^2 - 10^4$		ontkiemen, ev. groei	?
<i>E. coli</i>		$<10 - 8 \times 10^4$		50 -500
<i>B. cereus</i>		$<100 - 2,3 \times 10^6$		$< 10^{-4} - <10^5$
Schimmels	Preliminair analyses tonen behoorlijke aantallen			?

Op basis van de gegevens uit de literatuur en uit praktijkgegevens blijkt dat de voorgestelde richtwaarden wellicht niet haalbaar zijn voor rauwe insecten. Vandaar dat een behandeling die micro-organismen afdoodt zoals bv. een hittebehandeling (blancheren, koken, frituren of wokken) essentieel is. Bovendien stelt zich de vraag of er geen proceshygiënerichtwaarden dienen geformuleerd te worden voor het aantal sporen na behandeling en voor het aantal schimmels, en of er geen voedselveiligheidsrichtwaarde dient gehanteerd te worden voor *B. cereus*.

Conclusies en aanbevelingen

Er is in de literatuur weinig informatie te vinden met betrekking tot de mogelijke gevaren verbonden aan de humane consumptie van gekweekte insecten. De informatie die beschikbaar is, is weinig gedetailleerd en/of berust op extrapolatie van gegevens over de consumptie van andere levensmiddelen. Ofschoon er een aantal projecten lopen, is er nood aan meer onderzoek, onder meer over het effect van verwerking en verschillende conserveringsmethodes (koken, stomen, bakken, frituren, malen, koelen, diepvriezen, inblikken, vriesdrogen, gasverpakken) op de microbiële en chemische veiligheid van insecten. Toch lijkt het vrij onwaarschijnlijk dat insecten gekweekt onder gecontroleerde, hygiënische omstandigheden, vanuit de kweekomgeving of de voedingsbodem met virale of parasitaire ziekteverwekkers besmet zouden raken. Aangezien niet uit te sluiten valt dat pathogene bacteriën (en sporen) uit de productieomgeving de insecten en zijn consumenten kunnen besmetten, is een verhittingsstap (minimaal blancheren, koken, frituren of wokken) essentieel vooraleer de producten op de markt gebracht of geconsumeerd worden. Tevens dient besmetting met gisten en schimmels, die schadelijke secundaire metabolieten kunnen produceren (mycotoxines), vermeden te worden.

Bij de kweek, verwerking, commercialisering en bewaring van insecten en hun producten dienen dezelfde gezondheids- en sanitaire regels (cf. Goede Hygiëne Praktijken (GHP) en Goede Productiepraktijken (GMP)) gevolgd te worden als voor alle andere traditionele levensmiddelen (of

diervoeders) om de voedselveiligheid te waarborgen. Verschillende controlemechanismen dienen geïmplementeerd te worden.

Specifieke aandachtspunten hierbij zijn:

- Het microbiologisch risicopotentieel van eetbare insecten is grotendeels afhankelijk van de gebruikte voedingsmedia. De voeders of de kweekbodems die gebruikt worden dienen te voldoen aan de voorschriften voor diervoeders. Gezien de potentiële gevaren, mogen onder meer behandeld hout, mest, keukenafval of –resten niet als voeders voor de kweek van insecten gebruikt worden.
- Bewaarcondities die de groei van micro-organismen beperken, dienen op het etiket vermeld te worden.
- Het is sterk aangeraden om, indien mogelijk, te werken met droge kweekbodems en om regelmatig de feces te verwijderen en/of het voeder te verversen, alsook om de kweekruimte, de kweekbedden en het materiaal na iedere kweekcyclus te desinfecteren.
- Aan de consument wordt ten stelligste afgeraden insecten voor eigen consumptie aan te kopen bij kwekers van insecten bestemd als vis- of vogelvoer, als voeder voor “new companion animals”, reptielen en andere insectivoren, waarbij het kweekproces geen rekening houdt met mogelijke gevaren in geval van humane consumptie. Insectenkwekers dienen de lijn bestemd voor humane voeding strikt gescheiden te houden van deze bestemd voor dierlijke voeders.

Dankbetuiging

De auteurs van deze abstract willen Het Wetenschappelijk Comité van het FAVV en het college van de HGR danken voor het wetenschappelijk advies waarop deze tekst is gebaseerd. Tevens willen ze L. Van Campenhout (K.U.Leuven) en Nadine Botteldoorn (WIV) danken voor de verstrekte bijkomende informatie.

Referenties

- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. 2013. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12, 296-313.
- Chai, J.Y., Shin, E.H., Lee, S.H., & Rim, HJ. 2009. Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. *Korean J. Parasitol.* 47(Suppl), S69–102.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. Discussion paper: Regulatory frameworks influencing insects as food and feed (preliminary draft, Version: 01/04/2014). Halloran, A., & Münke, C. <http://www.fao.org/forestry/39620-05b06a99d2e805528641b9f3498c940b0.pdf>
- Finke, M. D. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* 21(3), 269-285.
- Hinz, E. 2001. Ueber Entomophagie und ihre Bedeutung fuer die Humanparasitologie. *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 23, 1-16.
- Klunder, H.C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J.M. & Nout, M.J.R. 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 26, 628–631.

- Lupi, O. 2006. Myiasis as a risk factor for prion diseases in humans. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 20(9), 1037-1045.
- Lupi, O. 2003. Could ectoparasites act as vectors for prion diseases? *Int. J. Dermatol.* 42(6), 425-429.
- NVWA – Nederlandse Voedsel- & Warenautoriteit. 2014. Consumptie gekweekte insecten. Advies BuRO. <http://www.nvwa.nl/onderwerpen/risicobeoordelingen/bestand/2207475/consumptie-gekweekte-insecten-advies-buro>
- Schabel, H. G. 2010. Forest insects as food: A global review. In P. B. Durst, D. V. Johnson, R. N. Leslie, & K. Shono (Eds.), *Forest insects as food: Humans bite back* (pp. 37–64). Bangkok, Thailand: FAO.
- Post, K., Riesner, D., Walldorf, V., Mehlhorn, R. 1999. Fly larvae and pupae as vectors for scrapie. *Lancet* 353, 199-204.
- Rubenstein, R., Kascsak, R.J., Crp, R.I., Papini, M.C., La Fauci, G., Sigudarson, S., *et al.* 1998. Potential role of mites as vector for scrapie transmission. *Alzheimer Dis. Rev.* 3,52-56.
- Verkerk, M.C., Tramper, J., van Trijp, J.C.M., & Martens, D.E. 2007. Insect cells for human food, *Biotechnology Advances* 25, 198-202.
- Wisniewski, H., Sigudarson, S., Rubenstein, R., Kascsak, R.J., Carp, R.I. 1996. Mites as vectors for scrapie. *Lancet* 347(9008):1114.



Pathogenen en kiemgroenten

Jeanette Koedijk

T. van der Plas bv

Kiemgroenten worden vaak rauw geconsumeerd, net zoals bijvoorbeeld sla en rucola. Als je het RASFF Portal er op nakijkt, dan blijkt dat het bij kiemgroenten voornamelijk gaat om meldingen met betrekking tot de pathogenen *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* en *Bacillus cereus*.

Wat doen we bij Van der Plas sprouts om veilige kiemgroenten te produceren en op de markt te brengen? Hoe gaan we om bij Van der Plas Sprouts met de verordening (EU) Nr. 209/2013, die voor onder meer kiemgroenten is geïntroduceerd in 2013? Waar kan het fout gaan in de keten? En wat kunnen de verschillende schakels in de keten doen om problemen te voorkomen?

Salmonella, STEC

Na de uitbraak van shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC) in mei 2011 in Duitsland, werd de consumptie van kiemgroenten aangewezen als de meest waarschijnlijke bron van de uitbraken. Voor mei 2011 lag de nadruk bij de controle op *Salmonella* spp. en *L. monocytogenes*. Tevens werd er gecontroleerd op *E. coli*. Indien die uitslag aan de hoge kant was (boven de 100 kve/g), dan was de procedure om testen op *E. coli* O157.

Sinds de uitbraak in 2011 worden alle zaadpartijen gecontroleerd op de aanwezigheid van STEC en *Salmonella* spp. Beide bacteriën behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en kunnen tijdens de teelt van kiemen goed uitgroeien. Bij andere groentes, zoals bijvoorbeeld sla groeien die bacteriën ook uit. Minder snel vanwege lagere temperaturen, maar de teeltduur is van die groentes weer langer dan van kiemgroenten, zodat het aantal bacteriën ook bij een eindproduct zoals kas-sla ziekmakend kunnen zijn.

Sinds 2013 zijn er vier nieuwe verordeningen van kracht die betrekking hebben op de teelt en distributie van kiemen of zaden die bestemd zijn voor de teelt van kiemen.

Nr. 208/2013 betreffende de traceerbaarheid voor kiemgroenten en voor de productie van kiemgroenten bestemde zaden. Hierin staat o.a. wat er wordt verstaan onder kiemgroenten. “Kiemgroenten” het product dat wordt verkregen uit het kiemen van zaden en de ontwikkeling daarvan in water of een ander medium, dat vóór de ontwikkeling van echte bladeren wordt geoogst en dat bedoeld is om geheel te worden gegeten, inclusief het zaad.

Ook wordt er een definitie gegeven van een partij. Voor de traceerbaarheid is het punt dat de taxonomische naam moet worden genoteerd op de documenten zoals bijvoorbeeld de factuur.

Nr. 209/2013 tot wijziging van verordening nr. 2073/2005 inzake microbiologische criteria voor kiemgroenten en de bemonsteringsvoorschriften voor pluimveekarkassen en vers pluimveevlees. Hierin staat dat elke zaadpartij moet voor 0,5 % representatief worden bemonsterd. Dat monster moet worden ingezet voor een teelt zoals het gangbaar is op de kiemgroentenkwekerij. Na minimaal 48 uur moeten er 5 monsters worden genomen die worden geanalyseerd op *Salmonella* en STEC. Bij



alle 5 de monsters moeten de bacteriën *Salmonella* spp. en STEC afwezig zijn. Er worden in de verordening specifieke STEC's benoemd. Te weten: O157, O26, O111, O103, O145 en O104:H4. De insteek bij Van der Plas is om een zaadpartij die toxine-genen (stx1 en/of stx2) bevatten niet te accepteren. Ook al is het geen STEC. De methode om STEC te analyseren bestaat uit twee stappen. De eerste stap... zitten er stx-genen in het monster? Is een analyse die binnen 24 uur resultaat geeft. De bevestigingsstap kost meer tijd (en geld). Zolang de uitslag niet bekend is, moet de partij worden geblokkeerd. Voor een product als taugé, met een korte teeltduur en een beperkte houdbaarheid, duurt zo'n test eigenlijk te lang. Ook is het gevaar dat als een partij met stx-genen, maar niet *E. coli*, wordt gebruikt, dat we door kruisbesmetting meerdere teelten moeten controleren op aanwezigheid/afwezigheid van *E. coli*.

De beleidslijn van de NVWA (2014) is om niet naar de specifieke serotypes van STEC te kijken, maar alle STEC's te mijden in hoog risico producten.

Werkwijze voor controle en monitoring. Alle zaadpartijen worden bemonsterd volgens verordening 209/2013. Alleen zaadpartijen die zijn vrijgegeven worden gebruikt voor de teelt van kiemen. Elke week worden er 6 monsters genomen van lekwater (spent sprout irrigation water). Deze monsters worden geanalyseerd op *Salmonella*, STEC en *L. monocytogenes*.

Elke maand worden minimaal 5 producten onderzocht op einde houdbaarheidsdatum op STEC, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* en *Bacillus cereus*.

Nr. 210/2013 betreffende de erkenning van inrichtingen die kiemgroenten produceren overeenkomstig verordening 852/2004.

Van der Plas is erkend door de NVWA. In juni 2013 heeft T. van der Plas eerst een voorlopige erkenning gekregen met de verplichting om de vloer aan te pakken. Die vloer is in september 2013 gerealiseerd. Voor 2015 is en wordt weer een gedeelte van de kwekerij vernieuwd.

Nr. 211/2013 betreffende de certificeringsvoorschriften voor de invoer in de Unie van kiemgroenten en voor de productie van kiemgroenten bestemde zaden.

Listeria monocytogenes

Bij Van der Plas laten we, die 5 monsters die volgens verordening 209/2013 moeten worden geanalyseerd op STEC en *Salmonella*, ook analyseren op de aanwezigheid van *L. monocytogenes*. Waarbij we ook 5 maal afwezig in 25 gram vereisen.

Vanwege het karakter van *L. monocytogenes*, is de kans van uitgroei tijdens de teelt klein. *L. monocytogenes* heeft het vermogen goed uit te groeien bij lage temperaturen als andere bacteriën zich niet of nauwelijks meer vermeerderen. Dan heeft *L. monocytogenes* weinig concurrentie van andere bacteriën. *Listeria monocytogenes* is meer een gevaar op de inpak afdeling en dan voornamelijk op de automatische inpaklijnen. Deze lijnen worden met *Listeria* Swabs gecontroleerd en elke 14 dagen worden er producten van deze lijnen bemonsterd voor controle op aanwezig-/afwezigheid van *L. monocytogenes*.



Met betrekking tot NVWA Infoblad 85 m.b.t. Verordening (EG) nr. 2073/2005:

Kiemen vallen in de categorie: Kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen. Producenten van deze categorie levensmiddelen dienen studies te verrichten om na te gaan of gedurende de hele houdbaarheidstermijn wordt voldaan aan het criterium <100 kolonie vormende eenheden (kve) *L. monocytogenes* per gram.

Kiemen hebben een pH van boven de 5,0 en een aW van 0,99. We hebben diverse challengetesten laten uitvoeren voor de uitgroei van *L. monocytogenes* op kiemgroenten tijdens de houdbaarheidstermijn.

Bacillus cereus

De norm voor *Bacillus cereus* in Nederland is 100.000 kve/g. De hoeveelheid die nodig is voor toxine vorming is 10.000.000 kve/g.

In Duitsland is er een richtlijn (DGHM) die als richtwaarde 100 kve/g geeft en als

waarschuwingswaarde 1.000 kve/g. Deze Duitse norm is voor kiemgroenten niet realistisch.

Op het einde van de houdbaarheidstermijn zijn de meeste uitslagen wel onder de 1.000 kve/g, maar uitslagen tussen de 1.000 en de 10.000 kve/g komen ook regelmatig voor. Een Europese norm voor toxine gehalte, zoals in de planning ligt zou zeer welkom zijn.

Keten

Zaadteelt en distributie, kiementeel, retail, consument.

Voor het gedeelte van de zaadteelt van zaad bestemd voor kiemgroenten en voor de teelt van kiemen is veel aandacht. De ESSA (European Sprouted Seeds Association) is bezig met een Europese richtlijn voor de zaadteelt en teelt van kiemen.

Hygiëne, koelketen en verpakking zijn van belang bij de distributie van de kiemen. Wat kan de consument zelf doen? Volgens het voedingscentrum moet je de kiemen goed verhitten...een leuke tip... goed bruikbaar bij bijvoorbeeld taugé. Maar kiemen als alfalfa, venkelkiemen, rode bietenkiemen zijn toch meer geschikt om rauw te eten.

Naast wassen met heet water, is even weken in azijn en daarna omspoelen met koud water ook een mogelijkheid om het aantal bacteriën zoals die van de familie van de *Enterobacteriaceae* terug te dringen. De vroegere in gewoonte Nederland om de sla aan te maken met azijn was zo gek nog niet.

Referenties

Warenwet.

De genoemde verordeningen.

Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: Mai 2012), Eine Empfehlung der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und –hygiene, Arbeitsgruppe

Mikrobiologische Richt- und Warnwerte der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM e.V.).