

RIJKSINSTITUUT VOOR  
VOLKSGEZONDHEID EN MILIEU  
BILTHOVEN

Rapport nr. 285859 005

**Microbiologisch onderzoek  
destructoren 1997**

J.J.H.C. Tilburg en A.W. van de Giessen

Augustus 1998

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Veterinaire Inspectie van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, en valt onder project 285859, getiteld: "Surveillance van Zoönosenverwekkers".

This investigation has been performed in order and for the account of the Veterinary Public Health Inspectorate within the framework of project 285859.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven,  
tel. 030-2749111, fax 030-2744434

Veterinaire Inspectie van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, Postbus 5406, 2280 HK  
Rijswijk, tel. 070-3407911, fax 070-3407080

---

**VERZENDLIJST**

- 1 - 4        Inspectie Waren en Veterinaire zaken van het ministerie van Volksgezondheid,  
              Welzijn en Sport
- 5            Drs. A. Lam, Inspectie Waren en Veterinaire zaken van het ministerie van  
              Volksgezondheid, Welzijn en Sport
- 6            Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 7            Hoofdinspecteur Gezondheidszorg
- 8            Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer
- 9 -12       Regionale Inspecties Waren en Veterinaire zaken
- 13          Hoofdinspecteur voor de Geestelijke Gezondheidszorg en Gehandicapten  
              zorg
- 14          Voorzitter van de Gezondheidsraad
- 15-16       Directeuren destructiebedrijven
- 17          Depot van Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
- 18          Directie RIVM
- 19 -20      Auteurs
- 21          Bibliotheek RIVM
- 22          A.M. Henken
- 23          D. Kromhout
- 24          H.P. van Egmond
- 25          Hoofd Voorlichting & Public Relations
- 26          Bureau Rapportenregistratie
- 27 -50      Bureau Rapportenbeheer

---

**INHOUDSOPGAVE**

	<u>Blz.</u>
Verzendlijst	2
Inhoudsopgave	3
Abstract	4
Samenvatting	5
1. Inleiding	6
2. Materiaal en methoden	7
2.1. Materiaal	7
2.1.1. Monsters halfproduct	7
2.1.2. Monsters eindproduct	7
2.1.3. Controle-onderzoek m.b.v. referentiemateriaal	7
2.2. Methoden	8
2.2.1. Onderzoek op aanwezigheid van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name sporen van <i>C. perfringens</i>	8
2.2.2. Onderzoek op aanwezigheid van <i>Salmonella</i>	8
2.2.3. Bepaling van het <i>Enterobacteriaceae</i> -kiemgetal	9
2.2.4. Procedure voor het inzetten van referentiematerialen	9
3. Resultaten en discussie	11
Literatuur	13
Tabellen	15
Bijlage	22

---

**ABSTRACT**

At two rendering plants for dead animals and animal wastes in the Netherlands studies were carried out in 1997 on the efficacy of autoclaving processes and the microbiological condition of final products. For this, samples of half-products were examined for the presence of spores of *Clostridium perfringens*. Samples of final products were examined for the presence of *Salmonella*, while the *Enterobacteriaceae*-count was determined in 5 sub-samples of each sample of final product. At plant N spores of sulfite reducing clostridia were detected in 1 (4,8 %) of 21 samples taken directly after autoclaving. At plant C spores of sulfite reducing clostridia were detected in 5 (20,0 %) of 25 samples taken directly after autoclaving. At neither of the two plants spores of *C. perfringens* were detected. In accordance with EU-Directive 90/425/EEC samples taken directly after autoclaving (as far as processing of high risk material is concerned) should be free of spores of *C. perfringens* (23). No *Salmonella* could be detected in samples of final product at both plants, while the *Enterobacteriaceae*-count in all subsamples of final product was < 10 colony forming units per gram. In accordance with EU-Directive 90/425/EEC samples of final products (from both high risk and low risk materials) should be free of *Salmonella*, while the *Enterobacteriaceae*-count should not be  $\geq 300$  in any of the subsamples and may be  $\geq 10$  en  $< 300$  in 2 of the 5 sub-samples, at maximum.

## SAMENVATTING

Bij de twee Nederlandse destructiebedrijven werd in 1997 onderzoek uitgevoerd naar de effectiviteit van de autoclaveringsprocessen en de microbiologische gesteldheid van eindproducten. Daartoe werden monsters halfproduct, genomen direct na autoclaveren, onderzocht op sporen van *Clostridium perfringens*. Monsters eindproduct werden onderzocht op *Salmonella*, terwijl in vijf deelmonsters van ieder eindproductmonster het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal werd bepaald. Bij bedrijf N werden sporen van sulfiet reducerende clostridia aangetoond in 1 (4,8 %) van de 21 monsters halfproduct. Bij bedrijf C werden sporen van sulfiet reducerende clostridia aangetoond in 5 (20,0 %) van de 25 monsters halfproduct. Bij geen van beide bedrijven werden sporen van *C. perfringens* aangetoond. Conform EU-Richtlijn 90/425/EEG dienen monsters halfproduct (als het verwerking van hoog-risicomateriaal betreft), die onmiddellijk na autoclavering worden genomen, vrij te zijn van sporen van *C. perfringens* (23). In geen van de monsters eindproduct werd *Salmonella* aangetoond. In alle deelmonsters was het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal lager dan 10 kiemen per gram. Conform EU-Richtlijn 90/425/EEG dienen monsters eindproduct (hoog- en laag-risicomateriaal) vrij te zijn van *Salmonella* en dient het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal in géén van de 5 deelmonsters  $\geq 300$  en in maximaal 2 van de 5 deelmonsters  $\geq 10$  en  $< 300$  te zijn (23).

Naast het onderzoek van half- en eindproducten werd door het RIVM in 1997 tweemaal een microbiologisch controle-onderzoek uitgevoerd met de twee laboratoria (lab. A t.b.v. bedrijf N en lab. C t.b.v. bedrijf C) die het "eigen" microbiologische onderzoek van de destructoren verrichten. Daarbij werd gebruik gemaakt van referentiematerialen die dienden te worden onderzocht op *Salmonella*, *C. perfringens* of *Enterobacteriaceae*. Wat *Salmonella* betreft voldeden de bevindingen van geen van beide laboratoria aan de verwachtingen. Wat de *Enterobacteriaceae*-kiemtelling betreft voldeden de resultaten van lab. C volledig aan de verwachtingen. Bij lab A. werd bij het tweede controle-onderzoek een geringe afwijking van de gemiddelde kiemtelling t.o.v. de verwachte waarde geconstateerd. Wat *C. perfringens* betreft voldeden de resultaten van lab. C volledig aan de verwachtingen. De resultaten van het eerste controle-onderzoek van lab. A kwamen echter niet overeen met de verwachtingen. Hierop werd op verzoek van de opdrachtgever een extra controle-onderzoek m.b.t. *C. perfringens* uitgevoerd bij dit laboratorium. De resultaten van dit extra onderzoek kwamen overeen met de verwachte resultaten.

## 1. INLEIDING

Destructie van materialen van dierlijke oorsprong is in Nederland geregeld in de Destructiewet. In het kader van deze wet zijn momenteel twee destructiebedrijven actief, elk bedrijf met een eigen verzorgingsgebied. Doel van de Destructiewet is om dierlijke afvalfen onschadelijk te maken zodat ze gebruikt kunnen worden in diervoeders. Tot het destructiemateriaal behoren ondermeer landbouwhuisdieren die op het landbouwbedrijf zijn gestorven, dieren die in het kader van ziektebestrijdingsmaatregelen zijn gedood, slachtafvalfen (inclusief bloed) van bij de slacht afgekeurde (delen van) dieren en bedorven materialen van dierlijke oorsprong. Voor de dier- en volksgezondheid is van belang dat de in het destructiemateriaal eventueel aanwezige verwekkers van zoönosen worden vernietigd. De Destructiebeschikking (Art.9) eist dan ook dat na beëindiging van het autoclaveringsproces in het destructiemateriaal geen micro-organismen meer aantoonbaar zijn. Het Veterinaire Staatstoezicht op de Volksgezondheid ziet toe op handhaving van de wettelijke voorschriften inzake de procesgang bij de Nederlandse destructoren. Teneinde de effectiviteit van de autoclaveringsstap in het destructieproces te controleren, worden door de Veterinaire Inspecties jaarlijks op verschillende tijden monsters halfproduct genomen die bij het RIVM worden onderzocht op aanwezigheid van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name op aanwezigheid van sporen van *Clostridium perfringens*. Verder worden bij het RIVM sinds 1972 regelmatig stofveegmonsters en monsters eindproduct onderzocht op aanwezigheid van *Salmonella* en wordt het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal daarin bepaald (1 t/m 22). Vanaf april 1995 is de monstername aangepast en in overeenstemming gebracht met de voorwaarden genoemd in de EU Destructoren-richtlijn (90/425/EEG) (23). Daarmee is de monstername van stofveegmonsters komen te vervallen. De controle van monsters halfproduct en eindproduct-monsters is blijven bestaan.

In het kader van de Destructie-richtlijn vindt bij de twee Nederlandse Destructiebedrijven tevens een eigen microbiologische controle van de productie (half- en eindproducten) plaats. Hierbij wordt het microbiologisch onderzoek bij bedrijf C door het eigen laboratorium (lab. C) uitgevoerd, terwijl bij bedrijf N het microbiologisch onderzoek wordt uitbesteed aan laboratorium A. Bij deze microbiologische controle dienen de in de richtlijn vastgestelde microbiologische normen in acht genomen te worden. Teneinde, van overheidswege, toezicht te houden op de kwaliteit van dit "eigen" microbiologisch onderzoek, worden door het RIVM microbiologische controle-onderzoeken uitgevoerd met de betreffende laboratoria (lab. A en lab. C), waarbij gebruik wordt gemaakt van bij het RIVM geproduceerde referentiematerialen.

## 2. MATERIAAL EN METHODEN

### 2.1. Materiaal

#### 2.1.1. Monsters halfproduct

Gedurende 1997 werden op regelmatige tijden bij de twee Nederlandse destructiebedrijven (bedrijf N en C) door controleurs van de betreffende regionale Veterinaire Inspecties, die verantwoordelijk waren voor de keuze van de monsternamepunten en de uitvoering van de monstername, monsters halfproduct genomen. In de regel werden per maand per destructor twee monsters halfproduct genomen, direct na de autoclaveringsstap in het proces. De monsters werden vervolgens opgestuurd naar het RIVM voor onderzoek op de aanwezigheid van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name op de aanwezigheid van sporen van *C. perfringens*. In totaal werden in 1997 46 monsters halfproduct onderzocht. Het soort monsters halfproduct (HP) afkomstig van bedrijf C betrof diermeel en bloedmeel (en één mengmonster diermeel/bloedmeel). Het soort monsters halfproduct (HP) afkomstig van bedrijf N betrof diermeel, bloedmeel en vet. Daarnaast werden van bedrijf C en N ook monsters bloedwei onderzocht.

#### 2.1.2. Monsters eindproduct

Gedurende 1997 werden op regelmatige tijden bij de twee Nederlandse destructiebedrijven (bedrijf N en C) door controleurs van de betreffende regionale Veterinaire Inspecties, die verantwoordelijk waren voor de keuze van de monsternamepunten en de uitvoering van de monstername, monsters eindproduct genomen. De monsters werden vervolgens opgestuurd naar het RIVM voor onderzoek op aanwezigheid van *Salmonella* en bepaling van het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal. In de regel werd per maand per destructor één monster eindproduct genomen, dat was samengesteld uit vijf deelmonsters. In totaal werden 23 monsters eindproduct onderzocht, welke bestonden uit 115 deelmonsters.

#### 2.1.3. Controle-onderzoek m.b.v. referentiematerialen

In de eerste helft (april) en tweede helft (oktober) van 1997 werd een zending referentiematerialen door het RIVM verstuurd naar de twee laboratoria die het "eigen" microbiologisch onderzoek in opdracht van de destructiebedrijven uitvoeren, namelijk laboratorium A (uitbesteed door bedrijf N) en laboratorium C (bedrijf C). In september werd een extra zending referentiematerialen door het RIVM verstuurd naar laboratorium A.

De referentie materialen waren afkomstig van de Stichting Bevordering Volksgezondheid en Milieu (SVM) binnen het RIVM. Het referentiemateriaal bestaat uit een gelatine capsule met een hoeveelheid kunstmatig besmet gesproeidroogde melk.

Gebruik werd gemaakt van capsules met *Salmonella* (ca. 5 kolonie vormende eenheden per capsule: *Salmonella* CRM507), capsules met *E. coli* (ca. 500 kolonie vormende eenheden per capsule: *E. coli* WR1 06004R), capsules met *C. perfringens* (ca. 5000 kolonie vormende eenheden per capsule: *C. perfringens* D10 08001/1R en 2R) en blanco capsules.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Onderzoek op aanwezigheid van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name sporen van *C. perfringens*

Het onderzoek op aanwezigheid van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name sporen van *C. perfringens* werd uitgevoerd volgens RIVM SOP nr. LWL/132 (24). In afwijking van deze SOP werd echter van elk monster 1 gram monstermateriaal afgewogen, waarna deze hoeveelheid materiaal conform de SOP aseptisch werd overgebracht in een buis met 20 ml sulfiet cycloserine ijzer bouillon. De buizen werden afgedekt met vloeibaar gemaakte vaste paraffine en 10 minuten in een waterbad van 70 °C geplaatst om aanwezige sporen een hitte-activering te geven. Na afkoeling in koud water werden de buizen gedurende 20 uur geïncubeerd bij 37 °C. Vanuit buizen waarin na incubatie zwartkleuring of vertroebeling werd geconstateerd, werd een entoog cultuur uitgestreken op sulfiet cycloserine agar, waarna een deklaag met dezelfde agar werd aangebracht. Na anaerobe incubatie van deze platen gedurende 20 uur bij 37 °C werden per plaat (indien aanwezig) vijf zwarte kolonies (sulfiet reducerende clostridia) overgebracht in buizen met thioglycolaat bouillon en werden deze buizen vervolgens onder dezelfde condities geïncubeerd. De aldus verkregen reïnculturen werden onderzocht op aanwezigheid van *C. perfringens* door uitvoering van de volgende bevestigingstesten (criteria voor *C. perfringens* tussen haakjes): beweeglijkheid (-), nitraatreductie (+), zuur/gas uit lactose (+/+) en gelatine vervloeiing (+).

### 2.2.2. Onderzoek op aanwezigheid van *Salmonella*

Het onderzoek op de aanwezigheid van *Salmonella* werd uitgevoerd volgens RIVM SOP nr. MGB/M124 (25). Van elk van de vijf deelmonsters eindproduct werd vijf gram afgewogen, welke porties werden samengevoegd tot één monster van 25 gram. Dit monster werd overgebracht in 225 ml gebufferd pepton water (BPW). Vanuit het niet-selectieve ophopingsmedium (BPW) werd na 16-20 uur incubatie bij 37 °C 0.1 ml overgeënt in 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV) selectief ophopingsmedium en 10 ml in 100 ml Seleniet Cysteïne



Bouillon (SCB) selectief ophopingsmedium. Vervolgens werden de RV buizen 2 x 24 uur geïncubeerd bij 42 °C en de SCB potten 2 x 24 uur geïncubeerd bij 37 °C.

Na 24 uur incubatie werd vanuit RV en SCB een entoog cultuur uitgestreken op briljantgroen agar (BGA) en op bismuth sulfiet agar (BSA). Deze platen werden na 24 uur incubatie bij 37 °C afgelezen. In geval van negatieve platen werd opnieuw vanuit RV en SCB (na 48 uur incubatie) een uitstrijk gemaakt op BGA en BSA. In afwijking van de SOP werd per plaat slechts één verdachte kolonie geselecteerd voor bevestiging en typering.

Vervolgens werden verdachte kolonies conform de SOP bevestigd door beënting van de volgende bevestigingsmedia: ureum agar met triple sugar iron agar (UATSI) en lysine decarboxylase medium (LDC). Deze buizen werden 24 uur bij 37 °C geïncubeerd, waarna interpretatie van de bevestigingsreacties plaatsvond. Serotypering van *Salmonella* isolaten werd verricht op het Nationaal Salmonella Centrum (RIVM).

### 2.2.3. Bepaling van het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal

Voor de bepaling van het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal werd van elk deelmonster 20 gram monster 1:10 verdund in 180 ml pepton fysiologisch zout oplossing. Vanuit de verkregen verdunning werd 1 ml in duplo overgebracht in petrischalen van 9 cm doorsnede. De bepaling werd vervolgens uitgevoerd volgens RIVM SOP nr. MGB/M111 (26). Daartoe werd de overgebrachte hoeveelheid materiaal gemengd met 15 ml violet red bile glucose agar (VRBG) van 49 °C. Na stolling van de agar werd met dezelfde vloeibare agar een deklaag aangebracht. Na 24 uur incubatie bij 37 °C werden de specifieke kolonies (violetrood van kleur met een violetrode hof) geteld. Vervolgens werden verdachte kolonies conform de SOP bevestigd door beënting van een oxidatie/fermentatie medium met glucose en onderzoek van verdachte kolonies op oxydasereactie. Het oxidatie/fermentatie medium met glucose werd 24 uur bij 37 °C geïncubeerd, waarna interpretatie van de bevestigingsreactie plaatsvond.

### 2.2.4. Procedure voor het inzetten van referentiematerialen

Het verzenden van de referentiematerialen aan laboratoria A en C vond plaats in vooraf vastgestelde weeknummers. Met de referentiematerialen werd een voorschrift voor het inzetten van de referentiematerialen meegestuurd (zie bijlage 1) Per zending werden in totaal 60 capsules apart verpakt en gekoeld verstuurd. Bij de extra zending t.b.v. lab. A werden 20 capsules apart verpakt en gekoeld verstuurd. De capsules referentiemateriaal dienden bewaard te worden voor maximaal één week bij -20 °C.

De capsules 1 t/m 25 dienden te worden onderzocht op *Salmonella*. Hiertoe werd elke capsule, met behulp van een steriele pincet, overgebracht in het voorophopingsmedium en verder onderzocht volgens eigen analyseprocedure. Het voorophopingsmedium mocht niet geschud worden om het oplossen van de capsules te versnellen.

De capsules 26 t/m 40 waren bedoeld voor de bepaling van het *Enterobacteriaceae* kiemgetal. Vijftien buizen met elk 10 ml fysiologisch zout met pepton (1g/l) oplossing (PFZ) werden gedurende 30 minuten in een waterbad van  $38,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  geplaatst.

Met een steriele pincet werd één capsule per buis toegevoegd, gemengd op een vortex en teruggeplaatst in het waterbad. De buizen werden nogmaals na 10, 20, 30 en 40 minuten gemengd met behulp van een vortex. De buizen werden vervolgens op smeltend ijs geplaatst en dienden binnen 2 uur gebruikt te worden. Van elke buis werd 2,0 ml in petrischalen overgebracht en verder onderzocht volgens eigen analyseprocedure.

De capsules 41 t/m 60 en de extra zending van 20 capsules dienden te worden onderzocht op de aanwezigheid van sporen van *Clostridium perfringens*. Vijftien buizen met elk 10 ml fysiologisch zout met pepton (1g/l) oplossing (PFZ) werden gedurende 30 minuten in een waterbad van  $38,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  geplaatst. Met behulp van steriele handschoenen of steriele pincetten werd vervolgens een capsule geopend boven een buis en de inhoud werd toegevoegd aan de buis. Vervolgens werd de geopende capsule aan de buis toegevoegd. De buis werd vervolgens gemengd gedurende 5 seconden op een vortex en op ijs geplaatst. Van de oplossing werd binnen 30 minuten 0,1 ml verder onderzocht volgens eigen analyseprocedure.

### 3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

In tabel 1 zijn de resultaten samengevat van het onderzoek op sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name *C. perfringens* in monsters halfproduct. Tabellen 2 en 3 geven de resultaten weer van dit onderzoek uitgesplitst naar bedrijf en naar soort halfproduct. Uit de resultaten blijkt dat in 1 (4,8 %) van de 21 monsters halfproduct, afkomstig van bedrijf N, sporen van sulfiet reducerende clostridia werden aangetoond. Het betrof hier een monster diermeel. Uit de resultaten blijkt eveneens dat in 5 (20,0 %) van de 25 monsters halfproduct, afkomstig van bedrijf C, sporen van sulfiet reducerende clostridia werden aangetoond. Het betrof hier monsters diermeel en bloedmeel. Conform EU-Richtlijn 90/425/EEG (23) dienen monsters halfproduct (als het verwerking van hoog-risicomateriaal betreft), die onmiddellijk na autoclaving worden genomen, vrij te zijn van sporen van *C. perfringens*. Daarmee voldeden de onderzochte monsters allen aan de voorwaarden gesteld in de EU-Richtlijn. In tabel 4 wordt een overzicht gegeven van het voorkomen van sporen in monsters halfproduct van bedrijven N en C in de afgelopen jaren van onderzoek. Opvallend is de toename van het percentage monsters waarin sulfiet-reducerende clostridia zijn aangetoond bij bedrijf C, van 0 % in 1995 naar 26,1 % in 1996 en 20,0 % in 1997. Deze resultaten geven aan dat het destructiemateriaal na beëindiging van het autoclaveringsproces niet altijd steriel was.

In tabel 5 zijn de resultaten samengevat van het onderzoek op *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in monsters eindproduct van de twee Nederlandse destructoren in 1997. In geen van de monsters eindproduct werd *Salmonella* aangetoond. In alle deelmonsters was het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal lager dan 10 kiemen per gram. Daarmee voldeden de onderzochte deelmonsters allen aan de voorwaarden gesteld in de EU-Destructie-richtlijn (90/425/EEG) (23).

Conform deze Richtlijn dienen monsters eindproduct (hoog- en laag-risicomateriaal) vrij te zijn van *Salmonella* en dient het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal in géén van de 5 deelmonsters  $\geq 300$  en in maximaal 2 van de 5 deelmonsters  $\geq 10$  en  $< 300$  te zijn (23). In tabel 6 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van het onderzoek op *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* van bedrijf N en C in de afgelopen jaren van onderzoek.

Tabel 7 geeft de resultaten weer van het onderzoek van de referentiematerialen op *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* of *C. perfringens* bij laboratorium A en C. Bij lab. A en lab. C voldeden de bevindingen t.a.v. *Salmonella* niet aan de verwachtingen. Bij lab. A werden er bij het onderzoek in de eerste helft van 1997, slechts 18 van de 23 *Salmonella*-capsules positief bevonden en bij lab. C 19 van de 23. Berekend werd dat bij gebruik van de ISO-methode, welke zowel door lab. A als lab. C werd toegepast, maximaal 2,7 % van de onderzochte *Salmonella*-capsules negatief bevonden mogen worden. Dit betekent dat een score van 21 van de 23 nog steeds goed zou zijn. Zowel lab. A alsook lab. C scoorden lager dan 21 positief. In de tweede helft van 1997 werden door lab. A 20 van de 19 "*Salmonella*-capsules" positief bevonden. Hierbij werden 2 blanco capsules positief bevonden en werd één positieve capsule negatief bevonden.

---

Door lab. C werden in de tweede helft van 1997 18 van de 19 “*Salmonella*-capsules” positief bevonden. Berekening geeft aan dat indien 19 capsules onderzocht worden er met 95 % betrouwbaarheid minimaal 17 positief gevonden moeten worden. Voor wat betreft de *Enterobacteriaceae*-kiemtelling vond lab. A bij de eerste zending een gemiddelde kiemtelling van de positieve capsules die binnen het 95 % betrouwbaarheidsgebied viel, zoals voor deze referentiematerialen bepaald op basis van kiemtellingen op VRBG. Bij lab. A werd bij het onderzoek in de tweede helft van 1997 een gemiddelde *Enterobacteriaceae*-kiemgetal van de positieve capsules gevonden dat boven het 95 % betrouwbaarheidsgebied lag. Hier kan mogelijk sprake zijn van een afwijking op de procedure voor het inzetten van het referentie materialen (bijlage 1), zoals een langere gehanteerde incubatietijd dan 40 minuten. Ook kan het referentiemateriaal te lang hebben gestaan alvorens de platen gegoten werden. Lab. C vond zowel bij de eerste alsook de tweede zending een gemiddelde *Enterobacteriaceae*-kiemgetal van de positieve capsules die binnen het 95 % betrouwbaarheidsgebied viel. Bij de eerste zending werd echter één blanco capsule positief bevonden. Voor wat betreft het onderzoek van referentie materiaal op *C. perfringens* sporen kwamen bij lab. C de gevonden resultaten volkomen overeen met de verwachte resultaten. Lab. A vond echter bij de eerste zending 4 blanco capsules positief en 4 positieve capsules negatief. Mogelijk is hierbij verwisseling van capsules bij het inzetten van de materialen opgetreden. Hierop werd op verzoek van de opdrachtgever een extra controle-onderzoek m.b.t. *C. perfringens* uitgevoerd bij dit laboratorium. De resultaten van dit extra onderzoek kwamen overeen met de verwachte resultaten.

---

**LITERATUUR**

1. Van Schothorst M. Het voorkomen van *Enterobacteriaceae* in het algemeen en *Salmonella* in het bijzonder in Nederlandse meloenen van dierlijke oorsprong. RIVM rapport nr. 168/72. RIVM, Bilthoven, 1972.
2. Van Schothorst M en Edel W. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in enkele Nederlandse destructoren. RIVM rapport nr. 101/73. RIVM, Bilthoven, 1973.
3. Edel W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in enkele Nederlandse destructoren (II). RIVM rapport nr. 160/73. RIVM, Bilthoven, 1973.
4. Edel W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in enkele Nederlandse destructoren (III). RIVM rapport nr. 75/75. RIVM, Bilthoven, 1975.
5. Edel W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (IV). RIVM rapport nr. 91/76. RIVM, Bilthoven, 1976.
6. Edel W., Erne E.H.W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (V). RIVM rapport nr. 234/77. RIVM, Bilthoven, 1977.
7. Oosterom J., Erne E.H.W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (VI). RIVM rapport nr. 132/78. RIVM, Bilthoven, 1978.
8. Oosterom J., Erne E.H.W. en van Schothorst M. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (VII). RIVM rapport nr. 151/79. RIVM, Bilthoven, 1979.
9. Oosterom J. en Erne E.H.W. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (VIII). RIVM rapport nr. 70/80. RIVM, Bilthoven, 1980.
10. Oosterom J. en Erne E.H.W. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (IX). RIVM rapport nr. 147310010. RIVM, Bilthoven, 1981.
11. Oosterom J en Erne E.H.W. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (X) (periode 1-12-80 tot 1-12-81). RIVM rapport nr. 147310011. RIVM, Bilthoven, 1982.
12. Oosterom J. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (XI) (periode 1982). RIVM rapport nr. 148110001. RIVM, Bilthoven, 1985.

13. Oosterom J. Onderzoek naar het voorkomen van *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in Nederlandse destructoren (XII) (periode 1983). RIVM rapport nr. 148110002. RIVM, Bilthoven, 1985.
14. Oosterom J. Microbiologische controle van sterilisatie en hygiënebeheersing in de Nederlandse destructoren (XIII) (periode 1984). RIVM rapport nr. 148110003. RIVM, Bilthoven, 1985.
15. Van de Giessen A.W., Berkers P.A.T.A. en Notermans S.H.W.. Microbiologisch onderzoek destructoren 1989. RIVM rapport nr. 148110004. RIVM, Bilthoven, 1990.
16. Van de Giessen A.W., Berkers P.A.T.A. en Notermans S.H.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1990. RIVM rapport nr. 149104002. RIVM, Bilthoven, 1991.
17. Van de Giessen A.W., Berkers P.A.T.A., Ritmeester W.S. en Notermans S.H.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1991. RIVM rapport nr. 149104003. RIVM, Bilthoven, 1992.
18. Van de Giessen A.W., Ritmeester W.S. en Notermans S.H.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1992. RIVM rapport nr. 149106001. RIVM, Bilthoven, 1993.
19. Van de Giessen A.W. en Ritmeester W.S. Microbiologisch onderzoek destructoren 1993. RIVM rapport nr. 149106002. RIVM, Bilthoven, 1994.
20. During M., Ritmeester W.S, Tilburg J.J.H.C. en Van de Giessen A.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1994. RIVM rapport nr. 149106003. RIVM, Bilthoven, 1995.
21. Tilburg J.J.H.C., During M., Van de Giessen A.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1995. RIVM rapport nr. 285859003. RIVM, Bilthoven, 1996.
22. Tilburg J.J.H.C., In 't Veld P.H., Van de Giessen A.W. Microbiologisch onderzoek destructoren 1996. RIVM rapport nr. 285859004. RIVM, Bilthoven, 1997.
23. Richtlijn van de raad tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften voor de verwijdering en verwerking van dierlijke afvallen, voor het in de handel brengen van dierlijke afvallen en ter voorkoming van de aanwezigheid van ziekteverwekkers in diervoeders van dierlijke oorsprong (vissen daaronder begrepen). EG-richtlijn 90/425/EEG. EG, Brussel, 1990.
24. RIVM SOP nr. LWL\132. Analysevoorschrift voor onderzoek op de aanwezigheid van *Clostridium perfringens* in levensmiddelen en destructiemateriaal. Revisie nr. 1.
25. RIVM SOP nr. LWL\124. Analysevoorschrift voor de bepaling van de aanwezigheid van *Salmonella* in levensmiddelen, diervoeders, stofveegmonsters en faeces van dierlijke oorsprong. Revisie nr. 2.
26. RIVM SOP nr. LWL\111. Analysevoorschrift voor de bepaling van het aantal kolonievormende eenheden van *Enterobacteriaceae* in levensmiddelen, diervoeders en stofveegmonsters. Revisie nr. 2.

**TABELLEN**

Tabel 1. *Resultaten van het onderzoek op sporen van sulfiet-reducerende clostridia en met name C. perfringens in monsters halfproduct van de Nederlandse destructoren in 1997.*

destructor	aantal monsters onderzocht	aantal monsters waarin sporen van sulfiet-reducerende clostridia werd aangetoond (perc.)	aantal monsters waarin sporen van <i>C. perfringens</i> werd aangetoond (perc.)
bedrijf N	21	1 (4,8)	0 (0,0)
bedrijf C	25	5 (20,0)	0 (0,0)
totaal	26	6 (13,0)	0 (0,0)

Tabel 2. Resultaten van het onderzoek op sporen van sulfiet-reducerende clostridia en met name *C. perfringens* in monsters halfproduct (HP) en bloedwei van bedrijf N in 1997.

soort materiaal	aantal monsters onderzocht	aantal monsters waarin sporen van sulfiet-reducerende clostridia werd aangetoond	aantal monsters waarin sporen van <i>C. perfringens</i> werd aangetoond
diermeel HP	13	1	0
bloedmeel HP	4	0	0
vet HP	4	0	0
bloedwei	5	0	0
totaal	26	1	0



Tabel 3. Resultaten van het onderzoek op sporen van sulfiet-reducerende clostridia en met name *C. perfringens* in monsters halfproduct (HP) en bloedwei van bedrijf C in 1997.

soort materiaal	aantal monsters onderzocht	aantal monsters waarin sporen van sulfiet-reducerende clostridia werd aangetoond	aantal monsters waarin sporen van <i>C. perfringens</i> werd aangetoond
diermeel HP	12	4	0
bloedmeel HP	13 <sup>1</sup>	1 <sup>2</sup>	0
bloedwei	1	0	0
totaal	26	5	0

<sup>1</sup> Eén monster betrof een mengmonster met diermeel.

<sup>2</sup> Het betrof hier een monster bloedmeel.

Tabel 4. *Voorkomen van sporen van sulfiet reducerende clostridia en met name C. perfringens in monsters halfproduct van bedrijven N en C in de afgelopen jaren van onderzoek.*

jaar	bedrijf N			bedrijf C		
	aantal monsters onderzocht	aantal monsters sporen van s.r.clostridia <sup>1</sup> aangetoond (perc.)	aantal monsters sporen van <i>C. perfringens</i> aangetoond (perc.)	aantal monsters onderzocht	aantal monsters sporen van s.r.clostridia aangetoond (perc.)	aantal monsters sporen van <i>C. perfringens</i> aangetoond (perc.)
1989	197	19 (9,7)	1 (0,5)	60	16 (26,7)	3 (5,0)
1990	162	10 (6,2)	2 (1,2)	125	22 (17,6)	0 (0,0)
1991	111	4 (3,6)	0 (0,0)	102	5 (4,9)	0 (0,0)
1992	121	4 (3,3)	1 (0,8)	104	12 (11,5)	0 (0,0)
1993	98	3 (3,1)	1 (1,0)	76	7 (9,2)	0 (0,0)
1994	99	1 (0,0)	0 (0,0)	98	14 (14,3)	0 (0,0)
1995	50	1 (2,0)	1 (2,0)	36	0 (0,0)	0 (0,0)
1996	37	1 (2,7)	1 (2,7)	23	6 (26,1)	0 (0,0)
1997	21	1 (4,8)	0 (0,0)	25	5 (20,0)	0 (0,0)

<sup>1</sup> s.r.clostridia: sulfiet reducerende clostridia

Tabel 5. *Resultaten van het onderzoek op Enterobacteriaceae en Salmonella in monsters eindproduct van de Nederlandse destructoren in 1997.*

	aantal (deel-) <sup>1</sup> monsters onderzocht	E.kgt.(kve/g) <sup>2</sup> < 10 (perc.)	E.kgt.(kve/g) ≥ 10 en < 300 (perc.)	E.kgt.(kve/g) ≥ 300 (perc.)	Aantal monsters waarin <i>Salmonella</i> werd aangetoond (perc.)
bedrijf N	11 (55)	55 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
bedrijf C	12 (60)	60 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

<sup>1</sup> Elk monster bestond uit 5 deelmonsters. Het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal werd in elk deelmonster bepaald. *Salmonella* werd in elk monster bepaald d.m.v. het samenvoegen van de deelmonsters.

<sup>2</sup> E.kgt.(kve/g): *Enterobacteriaceae*-kiemgetal (kolonie vormende eenheden / gram)

Tabel 6. Resultaten van het onderzoek op *Enterobacteriaceae* en *Salmonella* in monsters eindproduct van bedrijf N en C in de afgelopen jaren van onderzoek.

jaar	aantal (deel-) monsters onderzocht	E.kgt.(kve/g) <sup>1</sup> < 10	E.kgt.(kve/g) ≥ 10 en < 300	E.kgt.(kve/g) ≥ 300	aantal monsters waarin <i>Salmonella</i> werd aangetoond (perc.)
<b>bedrijf N</b>					
1989	30	30	0	0	0 (0,0)
1990	25	25	0	0	0 (0,0)
1991	26	24	2	0	0 (0,0)
1992	29	28	1	0	0 (0,0)
1993	30	30	0	0	0 (0,0)
1994	30	30	0	0	1 (3,3)
1995a <sup>2</sup>	10	10	0	0	1 (10,0)
1995b <sup>3</sup>	9 (45)	44	1	0	1 (11,1)
1996	16 (80)	80	0	0	0 (0,0)
1997	11 (55)	55	0	0	0 (0,0)
<b>bedrijf C</b>					
1989	25	25	0	0	0 (0,0)
1990	46	46	0	0	1 (2,2)
1991	47	43	3	1	0 (0,0)
1992	35	35	0	0	0 (0,0)
1993	30	30	0	0	0 (0,0)
1994	30 <sup>4</sup>	25	0	0	0 (0,0)
1995a <sup>2</sup>	10	10	0	0	0 (0,0)
1995b <sup>3</sup>	6 (30)	26	4 <sup>5</sup>	0	0 (0,0)
1996	12 (60)	60	0	0	0 (0,0)
1997	12 (60)	60	0	0	0 (0,0)

<sup>1</sup> E.kgt.(kve/g): *Enterobacteriaceae*-kiemgetal (kolonie vormende eenheden / gram)

<sup>2</sup> jan. t/m mrt.

<sup>3</sup> april t/m dec. Vanaf april 1995 werden monsters eindproduct onderzocht bestaande uit 5 deelmonsters, *Salmonella* werd in elk monster bepaald en het *Enterobacteriaceae*-kiemgetal werd in elk deelmonster bepaald.

<sup>4</sup> Van vijf monsters werd géén *Enterobacteriaceae*-kiemgetal bepaald.

<sup>5</sup> Het betrof hier 4 deelmonsters allen afkomstig van 1 monster.

Tabel 7. Resultaten van het onderzoek van referentiematerialen op *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* of *Clostridium perfringens* door laboratoria A en C in 1997.

	<i>Salmonella</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>C. perfringens</i>	
	aantal pos. monsters verwacht	aantal pos. monsters gevonden <sup>1</sup>	aantal kve <sup>2</sup> verwacht <sup>3</sup>	aantal kve gevonden <sup>4</sup>	aantal pos. monsters verwacht	aantal pos. monsters gevonden
lab. A						
a <sup>5</sup>	23	18	14-41	24,7	12	12 <sup>8</sup>
b <sup>6</sup>					16	16
c <sup>7</sup>	19	20 <sup>9</sup>	14-41	50,9	16	16
lab. C						
a <sup>5</sup>	23	19	14-41	29,3 <sup>10</sup>	12	12
c <sup>7</sup>	19	18	14-41	29,7	16	16

<sup>1</sup> Volgens EU rapport CRM507 (bcr information, Commission of the European Communities, report: EUR 15062 EN, ISSN 1018-5593) dienen minimaal 21 van de 23 of minimaal 17 van de 19 capsules positief te zijn (95 % betrouwbaarheid).

<sup>2</sup> kve: kolonie vormende eenheden.

<sup>3</sup> 95 % betrouwbaarheidsinterval op basis van tellingen op VRBG.

<sup>4</sup> Gemiddelde *Enterobacteriaceae*-kiemtelling positieve capsules, blanco's uitgezonderd.

<sup>5</sup> Onderzoek eerste helft 1997.

<sup>6</sup> Extra onderzoek lab. A.

<sup>7</sup> Onderzoek tweede helft 1997.

<sup>8</sup> Vier positieve capsules werden negatief bevonden en 4 blanco capsules werden positief bevonden.

<sup>9</sup> Hierbij werden 2 blanco capsules positief bevonden en 1 positieve capsule negatief bevonden.

<sup>10</sup> Één blanco capsule werd positief bevonden.

## BIJLAGE 1

**PROCEDURE VOOR HET INZETTEN VAN REFERENTIE MATERIALEN**

Hierbij ontvangt u 60 capsules referentiemateriaal. Bewaar de capsules bij  $-20 \pm 5$  °C. Onderzoek de capsules binnen een week na ontvangst.

De capsules **1 t/m 25** dienen te worden onderzocht op *Salmonella*. Hiertoe wordt elke capsule, met behulp van een steriele pincet, overgebracht in het voorophopingsmedium en verder onderzocht volgens uw laboratorium voorschrift. Hierbij mag het voorophopingsmedium **niet** geschud worden om het oplossen van de capsules te versnellen.

De capsules **26 t/m 40** zijn bedoeld voor de bepaling van het *Enterobacteriaceae* kiemgetal. Plaats 15 buizen met elk 10 ml fysiologisch zout met pepton (1 g/l) oplossing (PFZ) gedurende 30 minuten in een waterbad van  $38,5 \pm 0,5$  °C. Voeg, met een steriele pincet, een capsule per buis toe en meng op een vortex na 10, 20, 30 en 40 minuten. Zet de buizen op smeltend ijs. Gebruik de buizen binnen 2 uur. Breng van elke buis **2,0 ml** over in een petrischaal en vervolg het onderzoek volgens uw laboratorium voorschrift.

De capsules **41 t/m 60** dienen te worden onderzocht op de aanwezigheid van sporen van *Clostridium perfringens*. Plaats 20 buizen met elk 10 ml fysiologisch zout met pepton (1 g/l) oplossing (PFZ) gedurende 30 minuten in een waterbad van  $38,5 \pm 5$  °C. Open vervolgens een capsule (draag steriele handschoenen of gebruik steriele pincetten) boven een buis en voeg de inhoud toe aan de buis. Voeg vervolgens de geopende capsule toe aan de buis. Meng de buis op een vortex gedurende 5 seconden. Plaats de buizen in smeltend ijs en onderzoek z.s.m. (binnen 30 minuten) 0,1 ml van deze oplossing volgens uw laboratorium voorschrift.

Uitslagen dienen te worden genoteerd op de door het RIVM meegestuurde uitslagformulier en dienen vervolgens opgestuurd te worden naar het RIVM. De resultaten van de laboratoria worden daar verwerkt en aan de VHI en het betreffende laboratorium toegezonden. De resultaten worden vertrouwelijk behandeld.