



RIVM-RIKILT FRONT OFFICE VOEDSELVEILIGHEID

RISICOBEOORDELING INZAKE AANWEZIGHEID VAN CEREULIDE TOXINE (*BACILLUS CEREUS*) IN LEVENSMIDDELEN

Risicobehoordeling aangevraagd door:	Dr. B.H. ter Kuile (NVWA-BuRO)
Risicobehoordeling opgesteld door:	RIVM
Datum aanvraag:	27-05-2013
Datum risicobehoordeling:	21-11-2013 (<i>definitieve versie</i>)
Coördinator:	Piet Wester (RIVM)
Opsteller(s) risicobehoordeling:	Lucas Wijnands, Gerrit Wolterink Bas Bokkers (RIVM)
Toetser(s) risicobehoordeling:	Tjakko Abee (WUR, Levensmiddelenmicrobiologie), Arie Havelaar, Marco Zeilmaker, Astrid Bulder (RIVM)
Projectnummer:	V/100181/01/AA

Onderwerp

De NVWA heeft een methode ontwikkeld om het cereulide toxine dat geproduceerd wordt door de bacterie *Bacillus cereus* aan te tonen in levensmiddelen. Dit toxine wordt gevormd in levensmiddelen en leidt tot ziekteverschijnselen, voornamelijk misselijkheid en braken. In de darmen kan *B. cereus* een ander toxine vormen, dat diarree veroorzaakt. In beide gevallen zijn hoge concentraties van de bacterie vereist. Het toxine blijft intact bij hittebehandeling. Zelfs bij temperaturen waarbij de sporen van *B. cereus* vernietigd worden. Omdat het cereulide toxine, en niet zozeer de bacterie zelf, tot misselijkheid en braken aanleiding kan geven, lijkt het voor de hand te liggen dat een norm voor het toxine een betere maat is dan de concentratie van de bacteriën.

Vraagstelling

Om tot een advies te komen of er niet beter een norm kan worden vastgesteld voor het cereulide toxine i.p.v. de bacterie zelf, wil het Bureau Risicobehoordeling en Onderzoeksprogrammering van de NVWA (BuRO) graag antwoord op de volgende vragen:

- 1) Kunt u een schatting geven van de ziektelast die veroorzaakt wordt door het cereulide toxine in levensmiddelen?
- 2) Kunt u een schatting geven van de blootstelling van de Nederlandse bevolking aan producten die het cereulide toxine bevatten?
- 3) Bij welke dosis van cereulide toxine ontstaat er een gerede kans op ziekteverschijnselen en kan dit vertaald worden naar een concentratie van het cereulide toxine in levensmiddelen?
- 4) Is die concentratie hetzelfde voor de meeste relevante producten?
- 5) Zijn er risicogroepen waarbij lagere concentraties van het cereulide toxine dan de grenswaarde voor de algehele populatie al een voedselvergiftiging veroorzaken?

- 6) Kunt u op grond van de antwoorden op bovenstaande vragen een onderbouwd voorstel doen voor een norm voor het cereulide toxine in levensmiddelen?
- 7) Worden de cereulide en de darmtoxines door dezelfde stammen van *B. cereus* gevormd?
- 8) Is de concentratie van *B. cereus* die aanleiding geeft tot vorming van het cereulide toxine eveneens ziekteverwekkend door middel van darmtoxines?
- 9) Kan het cereulide toxine gevormd worden in levensmiddelen die aan de norm voor *B. cereus* voldoen?
- 10) Welke levensmiddelen geven de grootste kans op vorming van het cereulide toxine?
- 11) Hoe groot is de kans dat het cereulide toxine gevormd wordt als de bereider van het product alle voorschriften aangaande bereiding en opslag in acht neemt?
- 12) Zijn er andere zaken die u onder de aandacht van BuRO wilt brengen aangaande dit onderwerp

Conclusie

- 1) De geschatte ziektelast ligt op ca. 19 DALYs per jaar.
- 2) De gemiddelde consument eet 0,06 dagen per jaar, ofwel eens per 17 jaar, een met cereulide besmette maaltijd.
- 3) Op basis van een studie met muskusspitsmuizen is een Acute Reference Dose (ARfD) van 0,03 µg/ kg lichaamsgewicht voor de mens afgeleid. Op basis van Nederlandse voedselconsumptiegegevens is berekend dat bij een cereulideconcentratie van $\leq 1,8$ µg/kg bereide pasta- of rijstgerechten er geen nadelige effecten voor de gezondheid verwacht worden.
- 4) De blootstelling aan cereulide hangt af van de concentratie in het voedsel en de hoeveelheid voedsel die wordt geconsumeerd. De afgeleide tolereerbare concentratie van 1,8 µg cereulide/kg bereide pasta- of rijstgerechten is worstcase gebaseerd op het consumeren van een grote portie bereid pastagerecht door kinderen van 2-6 jaar. De hoeveelheid cereulide die gevormd kan worden is product-afhankelijk.
- 5) Kinderen vormen door hun relatief hoge voedselconsumptie in relatie tot hun lichaamsgewicht een risicogroep. De afgeleide tolereerbare concentratie (punt 3) is op deze worst case situatie gebaseerd, en kan dus als veilig voor de gehele populatie beschouwd worden.
- 6) Op basis van de beschikbare gegevens is berekend dat voor een cereulideconcentratie van $\leq 1,8$ µg/kg bereide pasta- of rijstgerechten er geen nadelige effecten voor de gezondheid verwacht worden.
- 7) Nee, cereulide en enterotoxines (darmtoxines) worden niet door dezelfde stammen gevormd.
- 8) Gezien de verschillen in stammen en processen die leiden tot de productie van de toxines en de daardoor veroorzaakte ziektes, is een vergelijking niet reëel.
- 9) Het kan niet worden uitgesloten dat in levensmiddelen die voldoen aan de norm voor *B. cereus* cereulide toxine gevormd kan worden dan wel aanwezig kan zijn.
- 10) Koolhydraatrijke levensmiddelen geven de grootste kans op vorming van cereulide toxine.
- 11) De kans, dat cereulide toxine gevormd wordt als de bereider alle voorschriften aangaande bereiding, koelen en opslag, zoals omschreven in de Hygiëncode voor Horeca en Catering (2004), in acht neemt, wordt uiterst gering geacht.
- 12) Monitoring op aanwezigheid van de bacterie *B. cereus* is in geval van mogelijke cereulide toxine besmetting niet doeltreffend. Er zou direct naar cereulide toxine gezocht moeten worden.

Opmerking bij de beoordeling:

Door gebrek aan gegevens zijn mogelijke lange termijn effecten als gevolg van langduriger blootstelling aan lage doses cereulide niet in deze beoordeling meegenomen. Indien gegevens over de chronische toxiciteit van cereulide beschikbaar komen zou een risico-beoordeling voor chronische blootstelling kunnen worden uitgevoerd.

1) Kunt u een schatting geven van de ziektelast die veroorzaakt wordt door het cereulide toxine in levensmiddelen?

Bacillus cereus toxine geeft aanleiding tot gemiddeld 50.000 ziektegevallen per jaar met een totale ziektelast van 112 DALYs per jaar (Havelaar, Haagsma *et al.* 2012). Expert raadpleging heeft geleid tot de constatering dat 90% van de ziektegevallen als gevolg van *B. cereus* toxinen toegeschreven kan worden aan voedsel (Havelaar, Galindo *et al.* 2008). Met andere woorden, ziekte door *B. cereus* toxinen via voedsel leidt tot $0,9 \times 50.000 = 45.000$ ziektegevallen en $0,9 \times 112 = 100,8$ DALYs per jaar. Deze ziektelast geldt voor pathogene *B. cereus* in het algemeen, er is geen onderscheid gemaakt tussen ziekte veroorzaakt door enterotoxinen (de diarreevariant) en ziekte veroorzaakt door cereulide (de braakvariant). Bij de meldingen over voedselinfecties en -vergiftigingen aan de Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit (NVWA) over 2010, 2011 en 2012 is gekeken naar de gemelde symptomen (Friesema, de Jong *et al.* 2011, Friesema, de Jong *et al.* 2012, Friesema, de Jong *et al.* 2013). Bij 6 van de 31 meldingen (19%) werden uitsluitend of voornamelijk symptomen gemeld die overeenkomen met de braakvariant. Die uitbraken zijn hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door cereulide. Op basis van deze vermeldingen is de vermoedelijke ziektelast veroorzaakt door cereulide berekend op $0,19 \times 100,8 = 19,2$ DALYs.

2) Kunt u een schatting geven van de blootstelling van de Nederlandse bevolking aan producten die het cereulide toxine bevatten?

Producten die cereulide producerende *B. cereus* bevatten zijn koolhydraatrijk, zijnde rijst/pasta/deegwaren (Wareing, Stuart *et al.* 2010). Uit gegevens van de Nederlandse voedselconsumptiepeiling (VCP-basis, VCP-kids) blijkt dat op 21-25 %, ofwel ongeveer een kwart van de consumptiedagen rijst, pasta of deegwaren worden genuttigd, ofwel, de gemiddelde Nederlander consumeert ongeveer 90 dagen per jaar een maaltijd of snack die rijst, pasta of deegwaren bevat. De NVWA vond in 2 van de 3008 onderzochte monsters cereulide (Biesta-Peters, Dissel *et al.* 2012). Op basis van deze gegevens kan geschat worden dat de gemiddelde consument $(2/3008) \times 90 = 0,06$ dagen per jaar, ofwel eens per 17 jaar, een met cereulide besmette maaltijd eet.

3) Bij welke dosis van cereulide toxine ontstaat er een gerede kans op ziekteverschijnselen en kan dit vertaald worden naar een concentratie van het cereulide toxine in levensmiddelen?

Er zijn slechts twee studies bekend waarbij cereulide met opzet werd toegediend aan proefdieren. Daarnaast zijn twee studies bekend waarin op basis van gegevens van uitbraken de hoeveelheid cereulide wordt berekend die ziekteverwekkend was.

In een studie met rhesusapen wordt aangetoond dat deze dieren ziek worden van ca. 10 µg/kg lichaamsgewicht. Met een gewicht tussen de 3 en 6 kilogram betekent dit dat de ziekteverwekkende dosis voor dergelijke apen op 30 – 60 µg ligt (Shinagawa, Konuma *et al.* 1995).

Agata *et al.* (1995) gebruikten muskusspitsmuizen, verschillende doses en twee toedieningsvormen (per os en intraperitoneaal). Vanaf een dosis van 8 µg/kg werden de eerste ziektesymptomen waargenomen (Agata, Ohta *et al.* 1995).

Jääskeläinen *et al.* (2003) en Pirhonen *et al.* (2005) hebben monsters van een pastage-recht dat de veroorzaker was van een uitbraak, waarbij twee volwassenen waren betrokken, onderzocht. Er werd berekend dat de patiënten ongeveer 1,6 µg cereulide per gr voedsel binnen hadden gekregen, hetgeen volgens één van de publicaties overeenkomt

met een dosis van ongeveer 8 µg cereulide per kg lichaamsgewicht (Jääskeläinen, Teplova *et al.* 2003, Pirhonen, Andersson *et al.* 2005).

De studie van Agata *et al.* (1995) is gebruikt om een Acute Reference Dose (ARfD) te berekenen. De Acute Referentie Dosis is een schatting van de hoeveelheid van een stof in voedsel of drinkwater die men binnen 24 uur kan innemen zonder noemenswaardige gezondheidseffecten. De ARfD is een norm die voor de gehele populatie, inclusief gevoelige subpopulaties, geldt. Voor details van deze afleiding zie Bijlage 1. In het kort, vijf muizen werden oraal of intraveneus blootgesteld aan respectievelijk 4, 8, 16 of 32 en 2, 4, 8, 16 of 32 µg cereulide/kg lichaamsgewicht. Vervolgens werd het aantal brakende dieren, het aantal keer braken en de tijd tussen toediening en braken gerapporteerd. Het aantal brakende dieren per dosagroep is gebruikt om een ARfD op af te leiden. Daartoe werd een dosis-respons analyse uitgevoerd en de (probabilistische) BMD10 afgeleid. Vervolgens is deze BMD10 gedeeld door (probabilistische) inter- en intraspecies extrapolatie factoren om rekening te houden met mogelijke verschillen in toxicokinetiek en toxicodynamiek tussen dier en mens en mensen onderling. Dit resulteert in een ARfD van 0,03 µg/ kg lichaamsgewicht, ofwel 30 ng/kg lg.

Op basis van Nederlandse gegevens over consumptie van (gerechten met) rijst en pasta (deegwaren) in 7-69 jarigen (VCP-basis) en 2-6 jarigen (VCP-kids) is berekend in welke subpopulatie de hoogste inname te verwachten valt (zie Tabel 1). Hiervoor is het 97,5 percentiel van de portiegrootte gebruikt, zoals gebruikelijk is in de pesticidenrisicobeoordeling in het geval van acute toxiciteit. Daarnaast is de inname van het bereide product omgerekend naar hoeveelheid onbereid product. Voor conversie van bereide rijst en pasta naar onbereide rijst of pasta wordt de inname gedeeld door respectievelijk een factor 2 en 2,9. Tevens is in Tabel 2 aangegeven wat de maximale cereulide concentraties in producten zouden mogen zijn zonder dat bij consumptie van een grote portie de ARfD wordt overschreden.

Tabel 1: Berekende dagelijkse inname (P97,5 percentiel) van rijst en pasta in de VCP-basis (7-69 jarigen) en de VCP-kids (2-6 jarigen).

	7-69 jarigen (gemiddeld lichaamsgewicht 66 kg)				2-6 jarigen (gemiddeld lichaamsgewicht 18,3 kg)			
	Bereid product (g)	Bereid product (g/kg lg)	Onbereid product (g)	Onbereid product (g/kg lg)	Bereid product (g)	Bereid product (g/kg lg)	Onbereid product (g)	Onbereid product (g/kg lg)
Rijst	420	6,4	210	3,2	203	11,1	102	5,6
Gerecht met rijst	649	9,8	-	-	240	13,1	-	-
Pasta	405	6,1	140	2,1	159	8,7	55	3,0
Gerecht met pasta	711	10,8	-	-	310	16,9	-	-

Tabel 2: Maximale cereulideconcentraties (µg/kg) in rijst, pasta en rijst- en pastagerechten. Berekend met de consumptiehoeveelheden (P97,5 percentielen) uit Tabel 1 op basis van de afgeleide Acute Reference Dose van 30 ng/kg lg.

	7-69 jarigen (gemiddeld lichaamsgewicht 66 kg)		2-6 jarigen (gemiddeld lichaamsgewicht 18,3 kg)	
	Bereid product (µg/kg)	Onbereid product (µg/kg)	Bereid product (µg/kg)	Onbereid product (µg/kg)
Rijst	4,7	9,4	2,7	5,4
Gerecht met rijst	3,0	-	2,3	-
Pasta	4,9	14,3	3,4	10,0
Gerecht met pasta	2,8	-	1,8	-

Uit Tabel 1 blijkt dat kinderen in de leeftijdsgroep van 2-6 jaar een grotere portie consumeren van (gerechten met) rijst en pasta per kg lichaamsgewicht dan de oudere leeftijdsgroep.

Uitgaande van een hoogste consumptie van 16,9 gram bereid pastagerecht/kg lichaamsgewicht zou bij cereulide concentraties $\leq 1,8$ µg/kg in een bereid gerecht de ARfD van 0,03 µg/kg lg niet overschreden worden (Tabel 2). Ook voor gerechten op basis van rijst zal bij een cereulide concentratie $\leq 1,8$ µg/kg bereid gerecht de ARfD niet worden overschreden. Derhalve worden op basis van de toxicologische overwegingen bij consumptie van een bereid gerecht met een cereulide concentratie $\leq 1,8$ µg/kg geen nadelige effecten op de gezondheid verwacht.

Uitgaande van een hoogste consumptie van 5,6 gram onbereide rijst/kg lichaamsgewicht zou bij cereulide concentraties $\leq 5,4$ µg/kg onbereide rijst de ARfD van 0,03 µg/kg lg niet overschreden worden. Ook voor pasta (deegwaren) zal bij een cereulide concentratie $\leq 5,4$ µg/kg onbereid product de ARfD niet worden overschreden (Tabel 2). Derhalve worden op basis van de toxicologische overwegingen bij consumptie van voedsel met een cereulide concentratie $\leq 5,4$ µg/kg onbereid product geen nadelige effecten op de gezondheid verwacht.

NB: Een overschrijding van de ARfD leidt niet per definitie tot het optreden van nadelige gezondheidseffecten. Bij de afleiding van de ARfD wordt gebruik gemaakt van veiligheidsfactoren waarmee rekening gehouden wordt met eventuele hogere gevoeligheid van de mens t.o.v. het proefdier en voor verschillen in gevoeligheid binnen de humane populatie.

NB2: Bovenstaande berekeningen gelden uitsluitend voor het acute effect van cereulide. Mogelijke lange termijn effecten als gevolg van langduriger blootstelling aan lagere concentraties mogen niet worden uitgesloten (Apetroaie, Andersson et al. 2005).

4) Is die concentratie hetzelfde voor de meeste relevante producten?

Wanneer de ARfD wordt overschreden kunnen nadelige gezondheidseffecten niet worden uitgesloten. Of de ARfD wordt overschreden hangt af van de concentratie in het voedsel en de hoeveelheid voedsel die wordt geconsumeerd. De onder punt 3 afgeleide maximaal tolereerbare concentraties van 1,8 µg/kg bereid gerecht of 5,4 µg/kg onbereid product zijn gebaseerd op de worstcase situaties, d.w.z het consumeren van een grote portie pastagerecht of een grote portie rijst door kinderen van 2-6 jaar. Op basis van de con-

sumptiegegevens in Tabel 1 zou de cereulideconcentratie in onbereide pasta hoger mogen zijn.

Hierbij kan worden opgemerkt dat de concentratie in het levensmiddel mede afhankelijk is van de omgevingsomstandigheden. De concentratie die in levensmiddelen geproduceerd wordt, verschilt per levensmiddel (Agata, Ohta *et al.* 2002). Agata *et al.* (2002) inoculeerden verschillende typen voedsel met *B. cereus* NC7401 en incubeerden deze monsters gedurende 24 uur bij 30 °C. De gevonden toxine-titers varieerden van 20 ng/g in brood tot 320 ng/g in gekookte of gebakken rijst, terwijl bijbehorende aantallen *B. cereus* werden gevonden van resp. $5,2 \times 10^8$ /g en $3,2 - 3,4 \times 10^8$ /g. Met andere woorden, afhankelijk van de omgevingsomstandigheden (lees: levensmiddel) zal de productie van cereulide verschillen bij gelijkblijvend aantal bacteriën.

5) Zijn er risicogroepen waarbij lagere concentraties van het cereulide toxine dan de grenswaarde voor de algehele populatie al een voedselvergiftiging veroorzaken?

Er zijn geen bruikbare gegevens over verschillen tussen subpopulaties in gevoeligheid voor het cereulidetoxine beschikbaar. Er zijn twee uitbraken beschreven waarbij kinderen betrokken waren. In de eerste beschrijving overleed een 17 jarige jongen nadat hij samen met zijn vader van hetzelfde besmette voedsel had gegeten. De vader werd weliswaar ziek maar overleefde. (Mahler, Pasi *et al.* 1997). Op basis van deze studie kan niet geconcludeerd worden of de jongen is overleden omdat hij gevoeliger was voor de toxische effecten van cereulide dan zijn vader of omdat hij hoger was blootgesteld dan zijn vader door een grotere voedselinname.

In zowel de studie van Mahler, Pasi *et al.* (1997) en een tweede studie waarbij kinderen waren betrokken zijn (Dierick, Van Coillie *et al.* 2005) waren helaas geen concentraties cereulide in voedselresten of excreties gemeten waardoor geen schatting van de blootstelling gedaan kan worden. Ook over andere mogelijke risicogroepen kan geen uitspraak gedaan worden.

De toxicologische grenswaarde, in dit geval de ARfD, geldt voor de gehele populatie, inclusief gevoelige groepen, en wordt uitgedrukt in mg/kg lg, (of in dit geval 0,03 µg cereulide/kg lg). Kinderen vormen door hun relatief hoge voedselconsumptie in relatie tot hun lichaamsgewicht een risicogroep.

6) Kunt u op grond van de antwoorden op bovenstaande vragen een onderbouwd voorstel doen voor een norm voor het cereulide toxine in levensmiddelen?

In dit geval is enkel op basis van de beschikbare toxicologische gegevens en voedselconsumptiedata gekeken wat de laagste maximale concentratie cereulide in voedsel is waarbij geen nadelige gezondheidseffecten te verwachten zijn, dit is voor bereide maaltijden $\leq 1,8$ µg/kg en voor onbereide producten 5,4 µg/kg (zie antwoord onder punt 3). Bij het afleiden van een officiële productnorm voor contaminanten zoals toxinen wordt echter naast de toxicologie mede rekening gehouden met distributie van concentraties in levensmiddelen, gevoeligheid van beschikbare analysemethoden en het ALARA principe (As Low as Reasonably Achievable). De hiervoor beschikbare informatie in deze beoordeling is dat de NVWA in 2 van de 3008 geanalyseerde monsters cereulide aangetroffen heeft in een concentratie van respectievelijk 3,2 en 5,4 µg/kg product (Biesta-Peters, Dissel *et al.* 2012). De gebruikte LC-MS methode is in staat 1.5 µg cereulide/kg aan te tonen en de gerapporteerde limit of quantification (LOQ) is 4,1 µg/kg voedsel (Biesta-Peters, Reij *et al.* 2010).

7) Worden de cereulide en de darm toxines door dezelfde stammen van *B. cereus* gevormd?

Nee. Er zijn diverse studies die gekeken hebben naar de mogelijkheid tot vorming van enterotoxinen en cereulide. Uit die studies blijkt dat stammen ofwel enterotoxinen kunnen vormen ofwel cereulide. (Mikami, Horikawa *et al.* 1994, Agata, Ohta *et al.* 1996, Pirhonen, Andersson *et al.* 2005).

Bovendien blijkt dat de cereulide-producerende stammen zeer nauw aan elkaar verwant zijn en genetisch apart clusteren binnen de *B. cereus* stammen (Ehling-Schulz, Svensson *et al.* 2005).

8) Is de concentratie van *B. cereus* die aanleiding geeft tot vorming van het cereulide toxine eveneens ziekteverwekkend door middel van darm toxines?

Het optreden van ziekte door cereulide en door enterotoxines (darmtoxines) is gebaseerd op twee totaal verschillende processen. Voor ziekte door enterotoxines dienen levensvatbare *B. cereus* cellen (vegetatief en/of sporen) ingeslikt te worden, de maag te passeren en in de dunne darm uit te groeien. De productie van enterotoxines start in de exponentiële groeifase van de bacterie in de darm van de mens. De productie van cereulide komt op gang in de laat logaritmische groeifase. In vitro gaat het dan over aantallen $> 10^6$ *B. cereus* per ml. Deze concentratie ligt ver boven de norm van 10^5 *B. cereus* per ml waarvan wordt aangenomen dat hoeveelheden boven die norm aanleiding kunnen geven tot ziekte veroorzaakt door enterotoxines.

In de strikte zin van het woord is het antwoord op deze vraag dus "ja, de concentratie van *B. cereus* die aanleiding geeft tot vorming van het cereulidetoxine is eveneens ziekteverwekkend door middel van darm toxines". Maar gezien de verschillen in processen en *B. cereus* stammen die leiden tot productie van toxines en de daardoor veroorzaakte ziektes, is het niet echt reëel een vergelijking te maken in concentraties die ziekteverwekkend zijn.

9) Kan het cereulide toxine gevormd worden in levensmiddelen die aan de norm voor *B. cereus* voldoen

Cereulide, een extreem hitte stabiele stof (Wareing, Stuart *et al.* 2010), wordt gevormd in het voedsel door vegetatieve cellen in de laat logaritmische – vroeg stationaire groeifase. Als het voedsel vóór testen op de aanwezigheid van *B. cereus*, nog een hittebehandeling heeft ondergaan, is het mogelijk dat hoeveelheden *B. cereus* worden gevonden die onder de norm liggen, terwijl er hoeveelheden cereulide gevormd zijn die hoger zijn dan op grond van de telling van *B. cereus* zouden kunnen worden verwacht en die hoger zijn dan de in deze beoordeling afgeleide maximaal tolereerbare concentraties. Het antwoord op deze vraag, die eigenlijk zou moeten luiden "Kan cereulide aanwezig zijn in voedsel dat aan de norm voor *B. cereus* voldoet?" is derhalve "ja".

10) Welke levensmiddelen geven de grootste kans op vorming van het cereulide toxine?

Algemeen wordt gesteld dat het vóórkomen van *B. cereus* stammen die in staat zijn cereulide te produceren hoger is in zetmeelrijke levensmiddelen en in deze levensmiddelen is ook de productie van cereulide per bacteriecel het hoogst (Wareing, Stuart *et al.* 2010). Het betreft dan voornamelijk rijstgerechten en deegwaren (pasta, mie). Ook is productie van cereulide in brood aangetoond, maar de daarin gevormde concentraties liggen ongeveer 15 keer lager dan die gevormd in rijst(-produkten) bij vergelijkbare con-

concentratie bacteriën (Agata, Ohta et al. 2002). Deze levensmiddelen geven overigens niet altijd de grootste kans op vorming van cereulide. Ingeval bereiding plaats vindt met azijn, mayonaise of ketchup, wordt de groei en toxineproductie geremd (Agata, Ohta et al. 2002).

11) Hoe groot is de kans dat het cereulide toxine gevormd wordt als de bereider van het product alle voorschriften aangaande bereiding en opslag in acht neemt?

Bij het beantwoorden van deze vraag moet met twee zaken rekening gehouden worden. Ten eerste werd altijd aangenomen dat cereulide producerende *B. cereus* stammen mesofiel waren, i.e. niet in staat te groeien beneden een temperatuur van ca. 10 °C. Hoewel geen *B. cereus* in de strikte zin van het woord, bestaan er wel een zeer nauw verwante soort, *B. weihenstephanensis*, die in staat is cereulide te produceren. Deze stammen kunnen groeien bij temperaturen beneden 10 °C (Thorsen, Hansen et al. 2006). Ten tweede is aangetoond dat cereulide productie bij lagere temperaturen, 12 – 15 °C, hoger is dan bij 30 °C (Finlay, Logan et al. 2000).

Als de bereider van voedsel alle voorschriften aangaande de bereiding, terugkoelen en opslag, zoals beschreven in de Hygiëncode voor Horeca en Catering (Anonymous 2004) in acht neemt, wordt de kans op productie van cereulide uiterst gering geacht. In het bijzonder dient gelet te worden op het juist en snel terugkoelen van warm voedsel. Wat de gevolgen kunnen zijn van verkeerd koelen komt naar voren uit de beschrijvingen van enkele uitbraken, waarbij steeds sprake was van temperatuur misbruik (Mahler, Pasi et al. 1997, Dierick, Van Coillie et al. (2005), Pirhonen, Andersson et al. 2005).

12) Zijn er andere zaken die u onder de aandacht van BuRO wilt brengen aangaande dit onderwerp?

De eigenlijke oorzaak van het braak-syndroom, dat door *Bacillus cereus* wordt veroorzaakt, is een toxine dat door de bacterie wordt gevormd in voedsel vóór consumptie. De bacterie hoeft niet eens meer in het voedsel aantoonbaar te zijn, terwijl het braaktoxine (cereulide) aanwezig en aantoonbaar is. Het verdient dan ook aanbeveling de risicoschatting over dit type aandoening uitsluitend te benaderen vanuit toxicologisch oogpunt in plaats van uit microbiologisch oogpunt. Dat wil zeggen dat risico-producten onderzocht zouden moeten worden op de aanwezigheid van cereulide en niet op de aanwezigheid van *B. cereus*. Immers, de afwezigheid van detecteerbare hoeveelheden van de bacterie betekent niet automatisch afwezigheid van cereulide, in analogie met *Staphylococcus aureus* enterotoxinen.

De in dit stuk afgeleide Acute Reference Dose en de daarvan afgeleide maximaal toereerbare cereulideconcentraties zijn gebaseerd op één kleine studie met een beperkt aantal proefdieren waarin slechts één toxicologisch eindpunt (braken) is onderzocht. Dit lijkt wel het meest gevoelige eindpunt te zijn. Indien meer gegevens over de toxiciteit van cereulide beschikbaar komen kan de ARfD worden herzien.

Deze beoordeling is gericht op het acute effect van cereulide, namelijk voedselvergiftiging. Daarnaast is bekend dat cereulide-producerende *B. cereus* voor kan komen in de darm van individuen met een historie van gastro-intestinale ziekte (Apetroaie, Andersson et al. 2005). Lange termijn blootstelling aan cereulide lijkt dus mogelijk, maar over mogelijke lange termijn effecten is nog niets bekend.

Referenties

- Agata, N., M. Ohta and M. Mori (1996). "Production of an emetic toxin, cereulide, is associated with a specific class of *Bacillus cereus*." Current Microbiology **33**(1): 67-69.
- Agata, N., M. Ohta, M. Mori and M. Isobe (1995). "A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*." FEMS Microbiology Letters **129**(1): 17-19.
- Agata, N., M. Ohta and K. Yokoyama (2002). "Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods." International Journal of Food Microbiology **73**(1): 23-27.
- Anonymous (2004). Hygienecode voor de Horeca. Zoetermeer NL, Bedrijfschap Horeca en Catering.
- Apetroaie, C., M. A. Andersson, C. Spröer, I. Tsitko, R. Shaheen, E. L. Jääskeläinen, L. M. Wijnands, R. Heikkilä and M. S. Salkinoja-Salonen (2005). "Cereulide-producing strains of *Bacillus cereus* show diversity." Archives of Microbiology **184**(3): 141-151.
- Biesta-Peters, E. G., M. W. Reij, R. H. Blaauw, P. H. In't Veld, A. Rajkovic, M. Ehling-Schulz and T. Abee (2010). "Quantification of the emetic toxin cereulide in food products by liquid chromatography-mass spectrometry using synthetic cereulide as a standard." Applied and Environmental Microbiology **76**(22): 7466-7472.
- Biesta-Peters, E. G., S. Dissel and P. H. In 't Veld (2012). Factsheet prevalentie braaktoxine van *Bacillus cereus* (cereulide) in voedingsmiddelen en karakterisering van cereulide producerende *Bacillus cereus* stammen. Utrecht, The Netherlands, NVWA.
- Dierick, K., E. Van Coillie, I. Swiecicka, G. Meyfroidt, H. Devlieger, A. Meulemans, G. Hoedemaekers, L. Fourie, M. Heyndrickx and J. Mahillon (2005). "Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning." Journal of Clinical Microbiology **43**(8): 4277-4279.
- Ehling-Schulz, M., B. Svensson, M. H. Guinebretiere, T. Lindbäck, M. Andersson, A. Schulz, M. Fricker, A. Christiansson, P. E. Granum, E. Märtlbauer, C. Nguyen-The, M. Salkinoja-Salonen and S. Scherer (2005). "Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains." Microbiology **151**(1): 183-197.
- Finlay, W. J. J., N. A. Logan and A. D. Sutherland (2000). "Bacillus cereus produces most emetic toxin at lower temperatures." Letters in Applied Microbiology **31**(5): 385-389.
- Friesema, I. H. M., A. E. I. de Jong and W. van Pelt (2011). Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de IGZ en de nVWA. Resultaten 2010. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- Friesema, I. H. M., A. E. I. de Jong and W. van Pelt (2012). Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de nVWA en het CIb, 2011. RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- Friesema, I. H. M., A. E. I. de Jong and W. Van Pelt (2013). Registratie voedselinfecties en -vergiftigingen bij de nVWA en het CIb, 2012. RIVM, In preparation.
- Havelaar, A. H., A. V. Galindo, D. Kurowicka and R. M. Cooke (2008). "Attribution of foodborne pathogens using structured expert elicitation." Foodborne Pathogens and Disease **5**(5): 649-659.

Havelaar, A. H., J. A. Haagsma, M. J. J. Manges, J. M. Kemmeren, L. P. B. Verhoef, S. M. C. Vijgen, M. Wilson, I. H. M. Friesema, L. M. Kortbeek, Y. T. H. P. van Duynhoven and W. van Pelt (2012). "Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009." International Journal of Food Microbiology **156**(3): 231-238.

Jääskeläinen, E. L., V. Teplova, M. A. Andersson, L. C. Andersson, P. Tammela, M. C. Andersson, T. I. Pirhonen, N. E. L. Saris, P. Vuorela and M. S. Salkinoja-Salonen (2003). "In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*." Toxicology in Vitro **17**(5-6): 737-744.

Mahler, H., A. Pasi, J. M. Kramer, A. C. Scoging, W. Bär and S. Krähenbühl (1997). "Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*." New England Journal of Medicine **336**(17): 1142-1148.

Mikami, T., T. Horikawa, T. Murakami, T. Matsumoto, A. Yamakawa, S. Murayama, S. Katagiri, K. Shinagawa and M. Suzuki (1994). "An improved method for detecting cytostatic toxin (emetic toxin) of *Bacillus cereus* and its application to food samples." FEMS Microbiology Letters **119**(1-2): 53-57.

Pirhonen, T. I., M. A. Andersson, E. L. Jääskeläinen, M. S. Salkinoja-Salonen, T. Honkanen-Buzalski and T. M. L. Johansson (2005). "Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case." Food Microbiology **22**(1): 87-91.

Shinagawa, K., H. Konuma, H. Sekita and S. Sugii (1995). "Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*." FEMS Microbiology Letters **130**(1): 87-90.

Thorsen, L., B. M. Hansen, K. F. Nielsen, N. B. Hendriksen, R. K. Phipps and B. B. Budde (2006). "Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 5118-5121.

Wareing, P., F. Stuart and R. Fernandes (2010). Micro-Facts: the working companion for food microbiologists. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.

Wijnands, L. M. (2008). PhD Thesis. *Bacillus cereus* associated food borne disease: quantitative aspects of exposure assessment and hazard characterization, Wageningen University.

Bijlage 1. Determination of an acute reference dose (ARfD) for cereulide

In the hazard characterization the following elements can be identified, which eventually lead to the establishment of an ARfD:

1. Evaluation of the available toxicity data and identification of the critical endpoint(s)
2. Dose-response analysis and the derivation of a point of departure (PoD)
3. Identification and quantification of possible differences between the experimental population and circumstances and the target population and circumstances of interest, i.e. determination of the extrapolation (factors) to be applied.
4. Derivation of the ARfD

These steps are discussed below.

1. Evaluation of the available toxicity data and identification of the critical endpoint(s)

A literature review was performed to identify the relevant effects for cereulide [Agata, N., M. Ohta, et al. (1995), Pirhonen, T. I., M. A. Andersson, et al. (2005), Shinagawa, K., H. Konuma, et al. (1995)]. One study (Agata et al 1995) provided quantitative dose-response data that were suitable for dose-response analysis. In this study cereulide was found to cause vomiting in mice (*Suncus murinus*) after p.o and i.p administration (Table 1).

Dose (µg/kg bw)	route	No. of mice vomiting	Total no. tested
4	po	0	5
8	po	1	5
16	po	3	5
32	po	5	5
2	ip	0	3
4	ip	1	5
8	ip	2	5
16	ip	3	5
32	ip	5	5

2. Dose-response analysis and the derivation of a point of departure (PoD)

The benchmark dose approach (BMD) approach is applicable to all toxicological effects. It makes use of all of the dose-response data to estimate the shape of the overall dose-response relationship for a particular endpoint. The BMD is a dose level, derived from the estimated dose-response curve, associated with a specified change in response, the Benchmark Response (BMR). Here, we will derive the BMD using the benchmark dose software PROAST, which is developed by RIVM and available at <http://www.rivm.nl/proast>.

The application of the BMD approach is performed according to the guidelines as set by EFSA (2009) and involves the following steps:

- A. Specification of type of dose-response data
- B. Specification of the relevant (benchmark) response (BMR)
- C. Selection of candidate dose-response model(s)
- D. Identification of acceptable models
- E. Estimating the BMD

2A. Specification of type of dose-response data

Endpoints not showing dose response relationships are normally not used for deriving a BMD. The decision to disregard endpoints has been done by visual inspection of the data. Response data may be of various types: as an incidence (quantal data, non-parametric data), a magnitude (continuous data, parametric data) or both (ordinal data). The distinction between data types is important for statistical reasons (such as assumption of underlying statistical distribution), but also for the interpretation of the BMR.

Cereulide was found to cause vomiting after p.o and i.p administration. These effect data are quantal and are analyzed accordingly. For quantal data the number of affected individuals and the sample size are needed for each dose group.

2B. Specification of the relevant (benchmark) response (BMR)

For quantal data the BMR is defined in terms of an increase in the incidence of the lesion / response scored, compared with the background response. The common way of doing this is either by additional risk or extra risk. According to EFSA guidance (EFSA, 2009), the relevant BMR is 10% , which is in the case of cereulide defined in terms of extra risk. The dose corresponding to the 10% extra risk is termed BMD₁₀.

2C. Selection of candidate dose-response models

Different models, which fit the data equally well, can result in different BMD₁₀s, reflecting model uncertainty. To take this aspect of uncertainty into account, various models need to be fitted to the same dataset. The usual suit of quantal models, containing the two-stage, log-logistic, Weibull, log-probit, gamma, logistic, exponential and Hill models, is applied here. To avoid the models having undesirable properties, certain constraints are imposed on the model parameters. For instance, since quantal responses are usually between 0% and 100% response, the background response parameter (a) is constrained to be between (fractions) 0 and 1. For more details see EFSA (2009).

2D. Identification of acceptable models

The PROAST software takes care of fitting a model, which means finding the values of the unknown parameters in the model that make the associated dose-response curve approach the data as closely as possible. This is called the best fit and is achieved by maximizing the log-likelihood. The BMD approach does not aim to find the single statistically best estimate of the BMD but rather all plausible values that are compatible with the data; therefore, the goal is not to find the single best fitting model, but rather to find those models with an acceptable fit.

The acceptance of a fitted model is based on two principles. The first principle is that from a nested family of models (i.e. the exponential and Hill families) only one member is accepted, by comparing the log-likelihoods of the various members in that family, using the likelihood ratio test. When a member with fewer parameters does not show a significantly poorer fit, then this member will be preferred.

The second principle is that any fitted model should provide reasonable description of the dose-response data, according to a goodness-of-fit test with a P value greater than 0.05. There are several types of goodness-of-fit tests. The likelihood ratio test is the recommended choice here. In the likelihood ratio test, the log-likelihood value associated with a fitted model is compared with, and tested against, the log-likelihood value associated with the so-called "full model". The full model simply consists of the observed (mean) responses at each applied dose. Hence, the number of parameters equals the number of dose groups. If a model's fit is not significantly worse than that of the full model, then the model may be accepted. The likelihood ratio test may be used to test if additional

parameters in nested models result in a significant improvement of the fit. See Slob (2002) or EFSA (2009) for more details.

2E. Estimating the BMD

For the identified critical endpoint, the set of models is applied. Subsequently, for each of the accepted models the BMD is derived. The uncertainty around a BMD can be expressed by a confidence interval (Moerbeek et al., 2004). In the applied probabilistic risk assessment approach the whole uncertainty distribution around the BMD is used for further analysis, which can be obtained by bootstrapping (Slob and Pieters, 1998). Multiple models were fitted to the same data to account for model uncertainty. When a model is accepted (based on the log-likelihood criteria, see (Slob, 2002)) then the bootstrap technique (1000 runs) is used to generate a BMD distribution for each accepted model. The distributions obtained for each of them are combined to generate an overall BMD distribution.

Note: when the experimental data provide sufficient information on the dose-response relationship, the various models that fit the data will have similar shapes and will yield a narrow range of BMD values. In some circumstances, the dose response relationship may not be well defined. For instance, there may be large gaps between consecutive response levels. In such datasets the various models that fit the data (according to the statistical criteria discussed above) may assume different shapes, and consequently the ranges of BMD values obtained may be wide. These BMD values would not provide a secure basis for establishing an ARfD. Criteria to judge the adequacy of the dose-response data on the basis of the range of BMD values obtained have so far not been established. As a general rule, dose-response data should not result in a range of BMD values from different accepted models that substantially exceeds one order of magnitude. When this value is exceeded, several options are available and should be considered on a case-by-case basis, e.g. re-evaluating the set of models.

In the case of cereulide the dose-response data does not result in a range of BMD values from different accepted models that substantially exceeds one order of magnitude.

Results

The dose response data of the critical endpoint are analyzed and reported by one table (Table 2) and the figures of the accepted models (Figure 1). In the table the number of parameters (npar) and loglikelihood (loglik) are given for the identification of acceptable models by the likelihood ratio test (see 2D. above). The results of the null and full models are included for this reason as well.

The BMDL and BMDU, reported for the accepted models, are the lower 5th and upper 95th percent confidence limits of the BMD. These confidence limits are indicative for the quality of the experimental data. Poor experimental data will result in a large confidence interval.

The figures illustrates the dose-response data (including 90%-CI) and curve of the model.

The results of the vomiting data in mice (Table 2) show that:

- All models are highly significantly better than the no-response (null) model: the log-likelihood values are more than 10 units higher, where an increase of only less than 3 units would have been sufficient.
- For both the (nested) exponential and Hill family of models, the second model (E2 and H2) is significantly better than their family member with more parameters. For more details see Slob (2002).
- All models passed the goodness of fit test

- The ratios between BMDLs and BMDUs are relatively small (max. 8). Indicating experimental data of good quality.
- The associated BMD confidence intervals for the accepted models are similar indicating that these dose-response data are suitable for deriving an ARfD.

The p.o. and i.p. routes are analyzed together. Analysis is performed to test for differences in background response (parameter *a*) and sensitivity of these routes (parameter *b*). This analysis showed that there is not different dose-response to cereulide after p.o. or i.p. administration. Therefore the reported BMD confidence intervals are based on data from both routes. For more details see Slob (2002).

Table 2: Results of the analysis of the vomiting data from Agata et al (1995)

model	covar	npar	loglik	Accept*	BMDL (µg/kg bw)	BMDU (µg/kg bw)
Null (no response)	NA	1	-29.7	--	NA	NA
full	NA	9	-15.1	--	NA	NA
two-stage	--	3	-18.64	yes	1.17	2.62
log-logist	--	3	-17.09	yes	2.54	17.8
Weibull	--	3	-16.5	yes	2.14	17
log-prob	--	3	-16.97	yes	2.69	16.2
gamma	--	3	-16.69	yes	2.1	15
logistic	--	2	-16.63	yes	3.44	8.03
LVM: Exponential model 2	--	2	-16.49	yes	3.26	7.58
LVM: Hill model 2	--	2	-18.09	yes	1.76	4.48

* P value GoF is 0.05

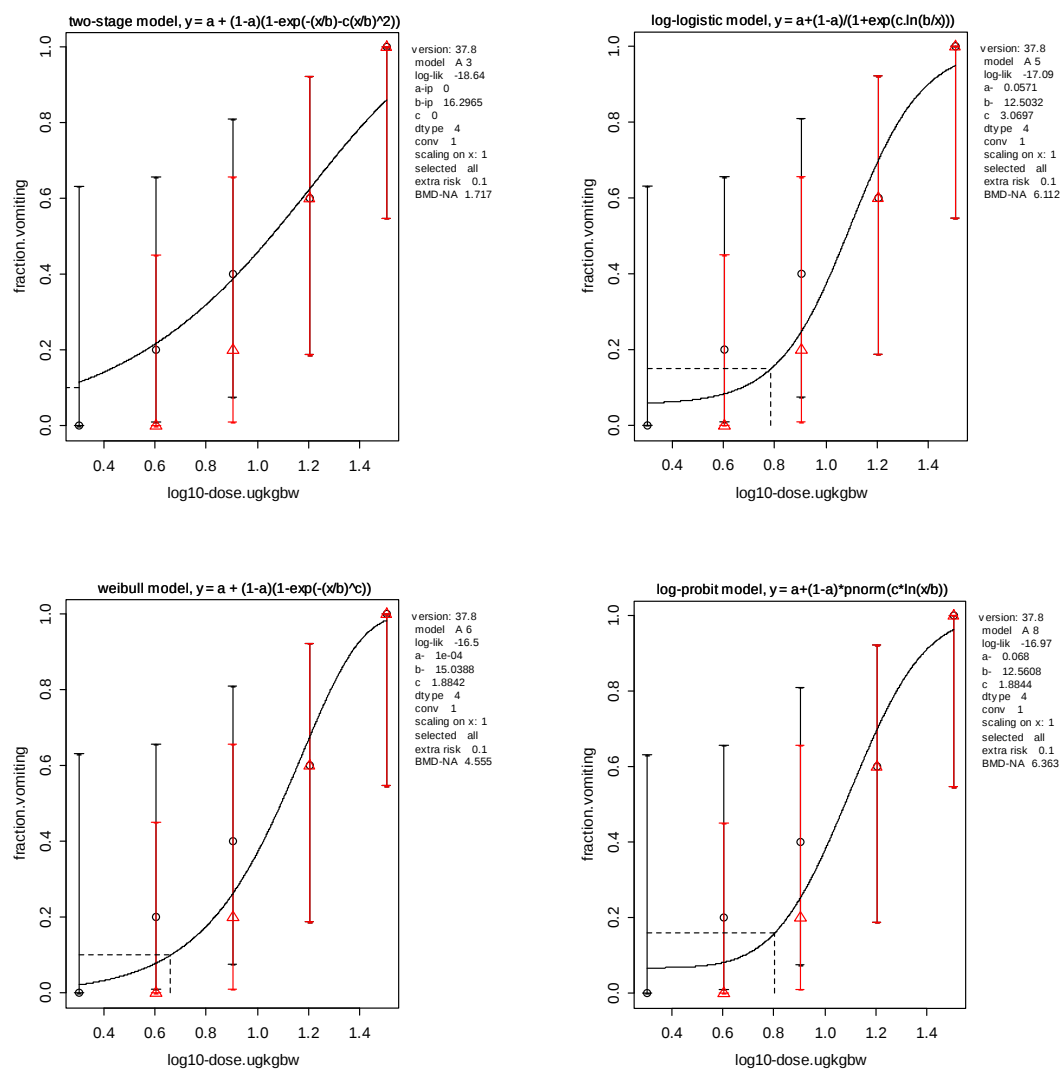


Figure 1: dose-response curves of the accepted models. Circles are the data from the i.p. route and triangles from the p.o. route.

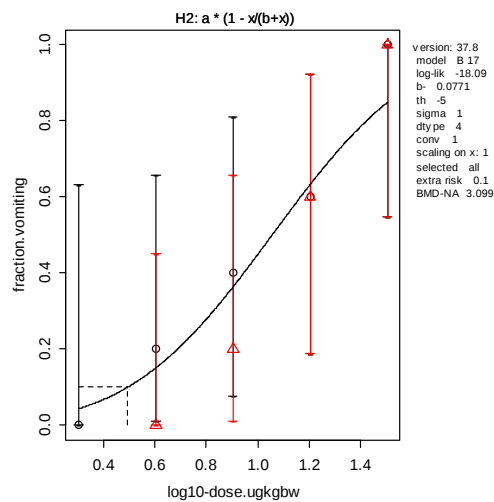
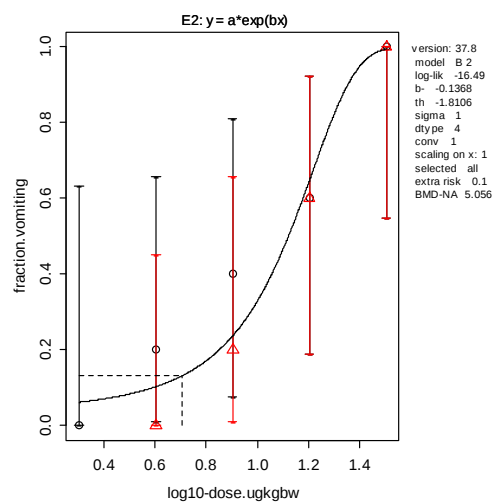
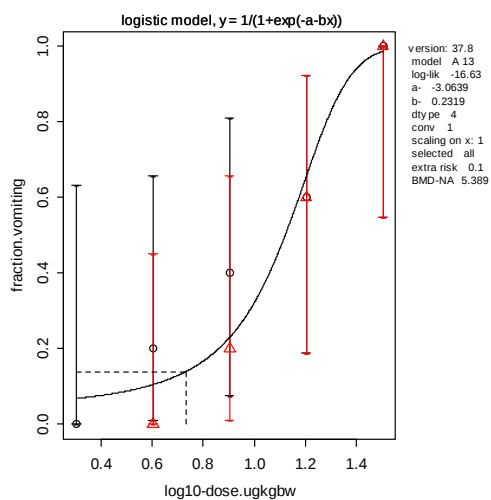
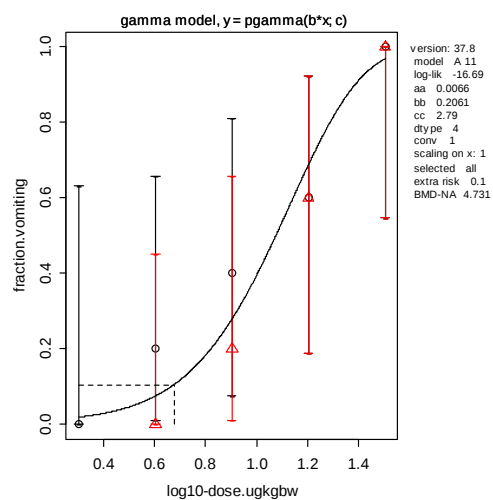


Figure 1: continued

3. Identification and quantification of possible differences between the experimental population and circumstances and the target population and circumstances of interest

Generally, the experimental exposure scenario and the experimental population (often animal studies) are not (exactly) the same as the exposure scenario and the (human) population which the risk assessment is intended for. Therefore the BMD distribution derived from an experimental study cannot directly be used to derive an ARfD. Hence, the BMD distribution is divided by one or more extrapolation factor (EFs), which account for these differences, to derive the ARfD. By default interspecies and intraspecies extrapolation is applied. Other extrapolation factors, e.g. to correct for duration of exposure or route-to-route extrapolation, are not required here.

Interspecies extrapolation

According to its definition, a BMD distribution derived from an animal can be considered to relate to the average animal. Since the (average) animal is regarded as a model for the average human being, an interspecies EF is required to obtain the (average) human BMD (Bokkers, 2009).

Interspecies extrapolation is performed in two steps: allometric scaling to account for interspecies differences in body weight (bw) and applying an EF for interspecies differences in kinetics and dynamics (Bokkers and Slob, 2007). To achieve allometric scaling the following factor is derived:

$$\left(\frac{\text{mean human bw}}{\text{mean animal bw}} \right)^{1-\text{scaling power}}$$

This factor depends on the body weight (60 g, Agata et al 1995) of the species used in the toxicological study, as well as on the human body weight (70 kg) in target population. The (geometric) mean of the body weights instead of a distribution of body weights is used, because interspecies extrapolation is defined as extrapolation from the mean animal to the mean human. Variation in animal body weight is not relevant for human risk assessment and the variation in human body weight will be accounted for in the intraspecies extrapolation.

The allometric scaling power is assumed to be in the range of 0.65 to 0.75. To account for this uncertainty, the scaling power is described by a (normal) distribution with a mean of 0.7 and SD of 0.033. This SD is derived by assuming that the 5th and 95th percentiles of the distribution are 0.65 and 0.75, respectively.

The EF for interspecies differences in kinetics and dynamics is considered uncertain and is therefore implemented as a distribution. We assumed a lognormal EF distribution with a geometric mean (GM) of 1 and a geometric standard deviation (GSD) of 2, based on an extensive analysis comparing rat and mouse data from NTP studies (Bokkers and Slob, 2007).

Intraspecies extrapolation

To account for intraspecies differences in toxicokinetics and toxicodynamics EF distributions have been designed based on theoretical grounds. Slob and Pieters (1998) proposed a log-normal distribution with a GM of 3 (+1) and a GSD of 1.6. The shift of +1 ensures that the intraspecies EF is always larger than 1, as sensitive humans cannot be less sensitive than the average human. Furthermore, the distribution was developed to be consistent with the default AF of 10. Hence, the GSD of the distribution is chosen such that the 99th percentile of the distribution equals 10. Note that the intraspecies distribution as defined here relates to the difference between the average individual of the whole

population and the average individual in some undefined sensitive subpopulation. Therefore, this distribution reflects uncertainty only.

4. Deriving the ARfD

Dividing the overall BMD distribution (Figure 2), obtained in step 2E, by the inter- and intraspecies extrapolation factor distributions (Figure 3) results in a BMD distribution for sensitive humans (Figure 4). A low (e.g. the 5th) percentile of this latter distribution is regarded as ARfD (Slob and Pieters, 1998). **In the case of cereulide the ARfD is 0.03 µg / kg bw.**

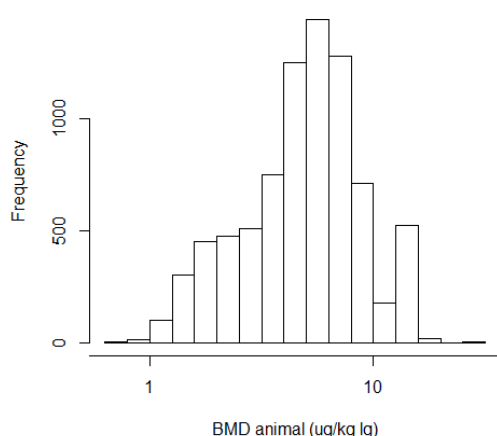


Figure 2: the overall animal BMD distribution

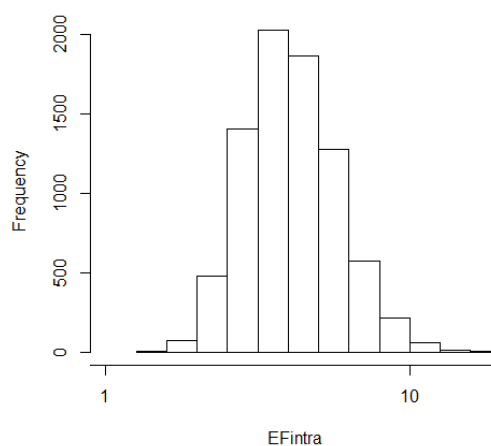
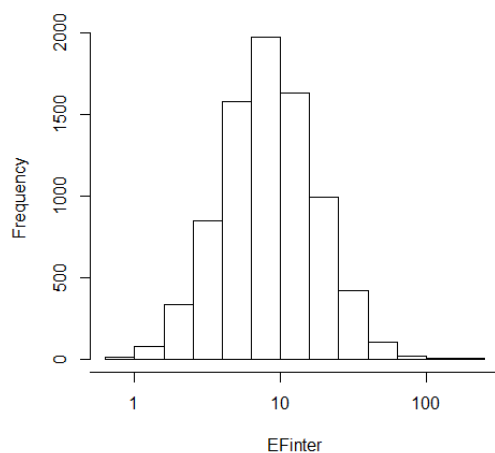


Figure 3: the applied inter- (left) and intraspecies (right) EF distributions

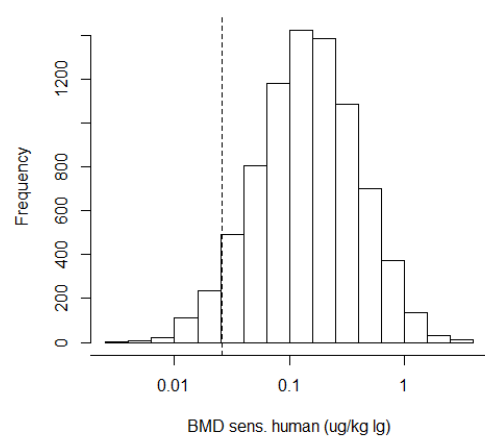


Figure 4: the sensitive human BMD distribution. The vertical dashed line indicates the 5th percentile of 0.03 $\mu\text{g/kg bw}$

References

- Agata, N., M. Ohta, et al. (1995). "A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*." FEMS_Microbiology Letters 129(1): 17-19.
- Bokkers, B. G. H., and Slob, W. (2007). Deriving a data-based interspecies assessment factor using the NOAEL and the benchmark dose approach. Critical Reviews in Toxicology 37, 355-373.
- Bokkers, B. G. H., Bakker, M. I., Boon, P. E., Bos, P., Bosgra, S., Van der Heijden, G. W. A. M., Janer, G., Slob, W. and Van der Voet, H. (2009). The practicability of the integrated probabilistic risk assessment (IPRA) approach for substances in food, <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320121001.pdf>, Ed.^ Eds.). RIVM report 320121001/2009, Bilthoven, the Netherlands.
- EFSA (2009). Guidance of the Scientific Committee on a request from EFSA on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. The EFSA Journal 1150, 1-72.
- Moerbeek, M., Piersma, A. H., and Slob, W. (2004). A comparison of three methods for calculating confidence intervals for the Benchmark Dose. Risk Analysis 24, 31-40.
- Pirhonen, T. I., M. A. Andersson, et al. (2005). "Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case." Food Microbiology 22(1): 87-91.
- Shinagawa, K., H. Konuma, et al. (1995). "Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*." FEMS Microbiology Letters 130(1): 87-90.
- Slob, W., Pieters, M.N. (1998) A probabilistic approach for deriving acceptable human intake limits and human health risks from toxicological studies: General framework. Risk Analysis 18, 787-798.
- Slob, W. (2002). Dose-response modeling of continuous endpoints. Toxicological Sciences 66, 298-312.