

E. coli en andere hygiëne-indicatoren

Waarom blijven we al die analyses uitvoeren?

Indicatoren als Enterobacteriaceae, coliformen, *E. coli* en enterococci helpen bij de verificatie van goede werkpraktijken en borging van voedselveiligheid. Maar zijn ze wel betrouwbaar? En kunnen we niet beter vaker testen op deze hygiëne-indicatoren, nu deze tests goedkoper zijn. Of gaan we toch liever die *Salmonella*, *Campylobacter* of het norovirus zelf zoeken, nu sneltesten beschikbaar zijn gekomen.

Bij het verifiëren of de principes van GAP, GMP en HACCP inderdaad goed zijn geïmplementeerd, komen bedrijven en overheid in een spagaat tussen testen op hygiëne-indicatoren en pathogenen. Hygiëne-indicatoren zijn goedkoper en kunnen daarom vaker worden getest, terwijl voor snelle, accurate, maar duurdere pathogentesten vaak uitgebreidere bemonsteringsplannen nodig zijn om de meestal lage aantallen te vinden. In bepaalde gevallen ontstaat er consensus. De detectie van *Salmonella* en *L. monocytogenes* bijvoorbeeld, is zo toegankelijk en doorgedrongen in de markt dat het kiezen voor pathogentesten een evidentie is geworden en veruit favoriet is ten opzichte van testen naar hun mogelijke indexorganismen *E. coli* of *Listeria* spp.

Keuze-indicator en type voedsel

Het is belangrijk dat er bij inzet van de analyse duidelijk is wat de mogelijkheden en onmogelijkheden zijn van besluitvorming bij het vinden van hygiëne-indica-

toren in bepaalde levensmiddelen. Een aantal voorbeelden van functionaliteit van Enterobacteriaceae en *E. coli* als indicatororganisme worden opgesomd

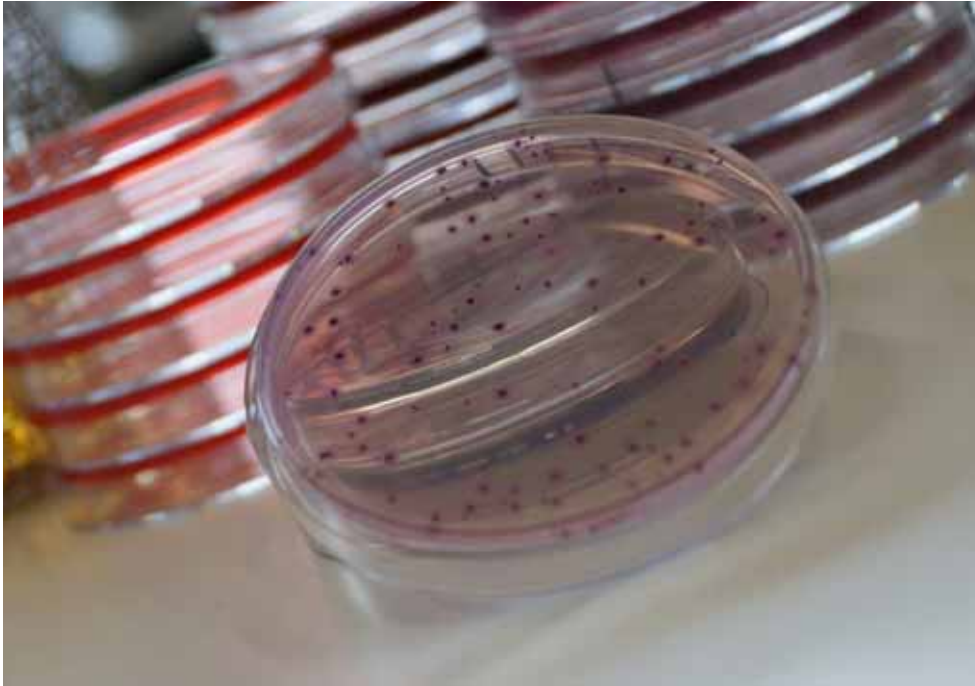
in tabel 1 en hieronder besproken.

Enterobacteriaceae bestaat uit een aantal species die eerder van fecale oorsprong zijn, zoals *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* en *Edwardsiella*. Een aantal andere species zijn echter niet noodzakelijk altijd van fecale oorsprong, maar behoren tot de natuurlijke microbiota van de productie-omgeving. Voorbeelden daarvan zijn *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia* en *Erwinia*. In het slachtproces van varkens en runderen en versneden vlees hebben Enterobacteriaceae bewezen een goede hygiëne-indicator te zijn, omdat deze →



Foto: Steffi Vermeir, Universiteit Gent

Labs tellen nog vaak met behulp van agarplaatjes Enterobacteriaceae of *E. coli*. Is dat wel nog van deze tijd en wat drijft ons om ze te blijven gebruiken?



Labs tellen nog vaak met behulp van agarplaatjes.

vooral diegene zijn die afkomstig zijn van dierlijke fecale besmetting. Maar Enterobacteriaceae of coliformen zijn minder geschikt als hygiëne-indicator bij rauwe, verse of minimaal bewerkte plantaardige levensmiddelen. De Enterobacteriaceae zijn dan vaak species die afkomstig zijn uit de natuurlijke omgeving. Ook zijn de aantallen die na oogst aangetroffen worden op plantaardige levensmiddelen vaak heel variabel. Klimaat en regio van de teelt zijn mede van invloed, waardoor niet echt een limietwaarde kan worden vooropgesteld die eenduidig gelinkt is met al dan niet toepassen van goede werkpraktijken. Bij plantaardige levensmiddelen is *E. coli* eerder aangevoerd als hygiëne-indicator.

Interventiestap

Enterobacteriaceae en coliformen worden meestal verkozen als hygiëne-indicator in productieprocessen waarbij er een interventiestap is geweest. Vaak is dat een hittebehandeling of bij water een desinfectie met chloor, of alternatieve technieken om effectief vegetatieve pathogene kiemen af te doden (5-6 log reductie als streefdoel). Aanwezigheid van de brede groep van de

Enterobacteriaceae of coliformen wijst dan op nabesmetting. Of de origine van nabesmetting dan fecaal of vanuit de productieomgeving is, maakt niet uit: goede werkpraktijken dienen dergelijke substantiële nabesmetting boven bepaalde limietwaarden te vermijden. Het is wel evident dat als nadien rauwe ingrediënten worden toegevoegd aan (hitte)behandelde producten, er opnieuw hogere aantallen Entero-

'Discussie over welke analyse woedt ook bij nieuwere pathogenen'

bacteriaceae zijn te verwachten. Dat is bijvoorbeeld het geval bij toevoegen van niet-gepasteuriseerd fruit of coulis aan gepasteuriseerd consumptie-ijs.

Enterococcen

Soms worden enterococcen gebruikt als hygiëne-indicator in behandeld water en levensmiddelen. Ze hebben als voordeel

dat ze minder snel afsterven dan Enterobacteriaceae en *E. coli*, vooral in omstandigheden van milde hittebehandeling, lage a_w en langdurige diepvriestemperatuur. Zij vormen dan een betere indicator voor overleving van meer resistente (Gram-positieve) kiemen zoals *Listeria monocytogenes*. Maar bepaalde *Enterococcus*-species worden ook wel eens gebruikt als startercultuur in gefermenteerde producten. Het is dus uitkijken geblazen bij het vinden van onaanvaardbare aantallen enterococcen bij bijvoorbeeld salami.

Dierlijke producten

Bij dierlijke bewerkte producten, zoals vleesbereiding of vleeswaren, maar ook bij zuivelproducten als kaas of boter, zal men vaak opteren om *E. coli* te gebruiken als hygiëne-indicator in plaats van Enterobacteriaceae. Dit omdat dergelijke producten toch een houdbaarheid hebben van vijf tot tien dagen of zelfs meerdere weken onder koeling indien verpakt onder gemodificeerde atmosfeer. Binnen de groep van Enterobacteriaceae bevinden zich heel wat koude-tolerante bacteriën. Deze psychrotrofe Enterobacteriaceae kunnen dus ook uitgroeien tijdens de houdbaarheidsperiode. Dat kan zelfs leiden tot het aantreffen van hogere aantallen, ook als goede werkpraktijken

en de koude keten werden gerespecteerd. Enterobacteriaceae zijn dus wel een goede indicator van hygiëne af productie, op dag nul, maar niet meer tijdens de houdbaarheidsperiode.

Wil men toch controleren op goede werkpraktijken – ook wanneer dergelijke bewerkte producten bemonsterd worden in de retail, bijvoorbeeld ergens halfweg of op einde houdbaarheid –, dan kan beter *E. coli* worden geanalyseerd. Immers *E. coli* is een mesofiele kiem, die dus niet uitgroeit tijdens koeling. Verhoogde aantallen *E. coli* wijzen dus steeds op onvoldoende hygiëne, mogelijke fecale

besmetting of temperatuurmisbruik ergens tijdens productieproces of verdere bewaring.

Slachtproces gevogelte

Hoewel Enterobacteriaceae hun sporen hebben verdiend als hygiëne-indicator in het slachtproces van varkens en runderen, blijken ze toch minder aangewezen voor het monitoren van hygiëne in het slachtproces van gevogelte. Als alternatief zou op *E. coli* kunnen worden gecontroleerd.

In EU Verordening 2073/2005 heeft men echter verkozen om dit keer niet *E. coli* te gaan zoeken als indexorganisme, maar de echte pathogeen: detectie van *Salmonella* of telling van *Campylobacter*. Wellicht is dit ingegeven door onvrede over de correlatie tussen bijvoorbeeld aantreffen van *E. coli* en *Campylobacter* en de urgentie van de problematiek.

Er is een sterke wetenschappelijke onderbouwing dat gevogelte een belangrijke bron is van ziekte bij de mens door deze twee pathogenen. De kans op aantreffen van *Salmonella* en *Campylobacter* op gevogeltekarkassen en afgeleide producten is relatief hoog, en testen op *Salmonella* en *Campylobacter* is mogelijk in elk routinelab dankzij de komst van chromogene media en sneltesten.

VTEC

Ook bij nieuwere pathogenen, zoals humaan pathogene verotoxineproducerende *E. coli* (VTEC) en voedselgebonden norovirus of hepatitis A-virus woedt de discussie over welke analyse te verkiezen is: zoeken naar de brede hygiëne-indicator *E. coli* of eerder direct naar de pathogeen zelf.

E. coli functioneert normaal gezien als

Dit artikel is gebaseerd op de lezing 'Zin en onzin van het gebruik van Enterobacteriaceae of *E. coli* als indicatororganismen' van prof. Mieke Uyttendaele tijdens het twintigste congres voor Levensmiddelenmicrobiologie in Brussel op 8 en 9 oktober. www.BSFM.be.

Tabel 1: Indicatorfunctie geassocieerd met Enterobacteriaceae en *E. coli*, gebaseerd op ILSI Technical report on Enterobacteriaceae and their significance to the food industry, december 2011, www.ilsil.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf.

Productieproces of levensmiddel	Indicatorfunctie	Commentaar op keuze indicatororganismen
Slachthygiëne en verwerking van (rauw) vlees en vis.	GMP/GHP*, fecale besmetting	Enterobacteriaceae en <i>E. coli</i> zijn beiden aanvaardbare indicatoren.
Oogsten en verwerken van rauwe groenten en fruit.	GAP, omgevingsbesmetting en fecale besmetting	Enterobacteriaceae is aanwezig in hogere en variabelere aantallen dan <i>E. coli</i> . Hoge aantallen <i>E. coli</i> is een nuttige indicator voor fecale besmetting.
Rauwe melk, gefermenteerde zuivelproducten en roomijs.	GMP/GHP, hygiëne	Sommige Enterobacteriaceae kunnen groeien in koeling en zijn niet eenduidig gelinkt met feces, in tegenstelling tot <i>E. coli</i> . Beperkingen wanneer de producten gemengd of aangevuld worden met (gedroogde) rauwe ingrediënten zoals fruit.
Onder meer gekookt vlees, gepasteuriseerde melk en zuivelproducten, melkpoeder, chocolade, eierproducten en REPFEDs.	GMP/GHP, nabesmetting en ontoereikende hittebehandeling	Enterobacteriaceae en <i>E. coli</i> zijn beiden aanvaardbare indicatoren. Beperkingen wanneer de producten gemengd of aangevuld worden met (gedroogde) rauwe ingrediënten.
Ingeblikte en in de verpakking verhitte levensmiddelen	Lekkage en ontoereikende hittebehandeling	Enterobacteriaceae en <i>E. coli</i> zijn beiden aanvaardbare indicatoren.
Persoonlijke hygiëne en omgevingsswabs	GMP/GHP, fecale besmetting	<i>E. coli</i> is de aangewezen keuze

* GMP = Good Manufacturing Practice, GHP = Good Hygiene Practices, GAP = Good Agricultural Practices, REPFED = Refrigerated Processed Foods of Extended Durability.

goede index voor VTEC. Deze pathogenen zijn immers stammen binnen hetzelfde bacterieel species, maar gezien de impact van deze hoog virulente humaan pathogene VTEC-stammen willen we nu eenmaal geen missers. Om die reden is een correlatie tussen verhoogde aantallen *E. coli* en VTEC die geen 100 procent is, moeilijk te aanvaarden door markt en overheid vanwege het consumentenrisico. Maar ook fabrikanten hebben soms problemen met het gebruik van *E. coli* als indexorganisme

voor VTEC vanwege het producentenrisico. Het gebruik van indexorganismen berust op het voorzorgsprincipe. Het aantreffen van VTEC is immers weinig waarschijnlijk. En aangezien verhoogde aantallen *E. coli* incidenteel voorkomen, zal dit dan ook soms onnodig leiden tot het stoppen van uitlevering van het product en intensiever testen (zonder detectie of isolatie van VTEC in dezelfde batch, of de volgende batch product) omdat de correlatie tussen *E. coli* en VTEC nooit 100 procent is. Als

correlatie tussen *E. coli* en VTEC dus onvolgende sterk geacht wordt, dan rest voor *E. coli* nog de functie als indicatororganisme, namelijk via herhaalde analyses de vinger aan de pols te houden qua goede werkpraktijken en om dus tijdig correctieve maatregelen aan te sturen in geval het productieproces niet aanvaardbaar, niet conform erkende hygiënecodes verloopt.

Norovirus en hepatitis A-virus

In geval van norovirus of hepatitis A-virus is het duidelijk dat *E. coli* als bacterie weinig overeenkomst vertoont taxonomisch, ecologisch en qua groei- en overlevingskarakteristieken met virussen. Bovendien wijst *E. coli* wel op fecale besmetting, maar die kan zowel van humane als dierlijke oorsprong zijn. Omdat norovirus en hepatitis A geen zoönosen zijn, is een indicatororganisme van uitsluitend humane fecale oorsprong te verkiezen. Humaan adenovirus wordt wel eens gepropageerd als alternatief indicatororganisme, maar ook humaan adenovirus dient te worden bepaald met de toch nog steeds omslachtige PCR-technieken die heden gehanteerd worden voor virusdetectie. Ook dient nog wel wat datacollectie plaats te vinden om de goede correlatie van norovirus en hepatitis A met humaan adenovirus – en daarmee zijn functionaliteit als indexorganisme – in diverse voedseltypen en omgevingsmonsters vast te stellen. Rest dus voorlopig enkel de directe bepaling van norovirus of hepatitis A-virus bij bezorgdheid over mogelijke besmetting in de voedselketen. Maar dan zijn we weer terug aan het begin van het verhaal. Voedselveiligheid en -kwaliteit kan niet berusten op eindproductcontrole alleen; het moet ook berusten op het beheersen van goede werkpraktijken. Naast testen op indicatororganismen kunnen dan zeker ook inspecties en audits hiervoor een goede tool zijn.

Toekomst

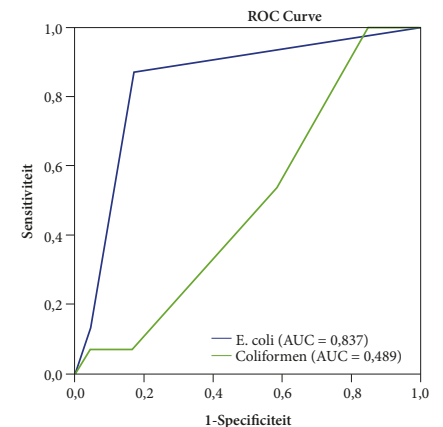
Met verdere introductie van DNA-methoden en sequenceringstechnieken hoeven we misschien in de toekomst niet meer op zoek

Casestudie

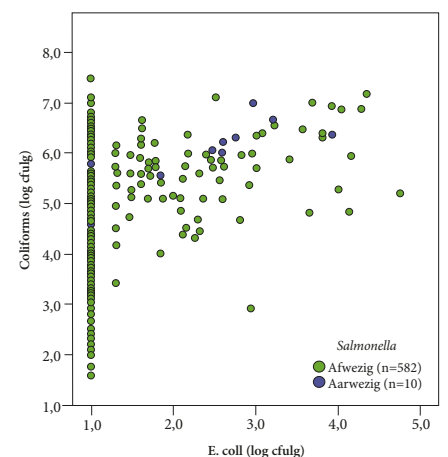
Coliformen versus Escherichia coli als hygiëne-indicator voor rauwe of minimaal bewerkte plantaardige levensmiddelen.

Uit recent onderzoek, verricht binnen het EU FP7 Veg-i-Trade-project dat analyses deed op bladgroenten en aardbeien in diverse landen binnen en buiten Europa, blijkt dat coliformen minder goede indicatororganismen zijn dan *E. coli* voor rauwe plantaardige producten. Immers, bij een subset van monsters waarbij zowel coliformen als *E. coli* werd geteld en ook *Salmonella* werd bepaald, werden 15 van de 178 monster positief bevonden voor *Salmonella* per 25 gram. Vastgesteld werd dat enkel *E. coli* geschikt is als indexorganisme voor *Salmonella* (Area Under the Curve, AUC = 0,837), terwijl coliformen geen significante voorspellende waarde hadden (AUC ongeveer 0,500) voor het aantreffen van *Salmonella* (zie figuur 1). Het moet wel duidelijk zijn dat bij de functie van bijvoorbeeld *E. coli* als indexorganisme voor *Salmonella* het niet gaat over een 100 procent correlatie tussen overschrijden van de limietwaarde van *E. coli* en het effectief aantreffen van *Salmonella*. Bij wijze van voorbeeld bij analyse van 592 monsters van verse kruiden werden in respectievelijk 32, 13 en 8 monsters meer dan 100, 1.000 of 10.000 kve/g *E. coli* aangetroffen waarbij in

naar een indicatororganisme, maar eerder naar een indicatorgemeenschap. Wellicht is het zo dat bij ongewenste besmetting niet alleen de pathogeen in kwestie, bijvoorbeeld *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* of norovirus, op het levensmiddel terechtkomt, maar een volledig geassocieerde microbiële gemeenschap die typisch is voor de bron van besmetting – mens, diersoort, omgeving. Misschien kunnen we dan uit de analyse van de hele microbiële gemeenschap van een levensmiddel



Figuur 1



Figuur 2

5 van 32, 2 van 13 en 0 van 8 monsters ook daadwerkelijk *Salmonella* geïsoleerd werd. Maar daarenboven werd ook *Salmonella* aangetroffen in drie andere monsters waar *E. coli* minder dan 100 kve/g bedroeg, en zelfs twee monsters waarin *E. coli* niet gedetecteerd (< 10/g) werd (zie figuur 2).

via metagenomics afleiden of dit dan de typische intrinsieke gemeenschap is of die extern verstoord is, omwille van het niet respecteren van goede werkpraktijken. Vooraleer het zover is, staat er nog wel wat jaren onderzoek op de agenda.

▪ MIEKE UYTTENDAELE ▪

Prof. dr. ir. M. Uyttendaele, Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Department of Food Safety and Food Quality, Faculty of Bio-Science Engineering, Ghent University, Mieke.Uyttendaele@UGent.be