

# **MICROBIËLE VOEDSELVEILIGHEID IN EEN DYNAMISCHE SAMENLEVING**

**Door: Prof.dr.ir. F.M. Rombouts**

**Afscheidsrede als hoogleraar levensmiddelenhygiëne en -microbiologie op donderdag  
29 november 2001 in de Aula van Wageningen Universiteit**

## MICROBIËLE VOEDSELVEILIGHEID IN EEN DYNAMISCHE SAMENLEVING

Prof.dr.ir. F.M. Rombouts

Mijnheer de Rector Magnificus; dames en heren:

In dit afscheidscollege wil ik proberen een analyse te maken van de manier waarop vanuit wetenschap en technologie wordt getracht de microbiële voedselveiligheid te beheersen, tegen de achtergrond van de enorme veranderingen die er optreden in de voedselproductie en voedselvoorziening als gevolg van een veranderende samenleving. Omwille van het perspectief neem ik een ruime aanloop en ga ik zo'n 150 jaar terug in de tijd.

Omstreeks 1850 was de levensverwachting in de landen van de Westerse wereld nog zeer laag (Fig. 1). Het percentage sterfte door infectieziekten was dienovereenkomstig hoog. De tweede helft van de negentiende eeuw is bij uitstek de periode waarin de relatie tussen microben en ziekten werd gelegd. In hoge frequentie werden bacteriële ziekteverwekkers ontdekt. Men raakte doordrongen van hun besmettelijke aard en daarmee van het belang van hygiëne. Wij hebben deze kennis en inzichten primair te danken aan zulke uiteenlopende mensen als John Snow, Ignaz Semmelweis, Robert Koch, Louis Pasteur, Florence Nightingale en vele anderen.

De enorme stijging van de levensverwachting vanaf 1850 is dan ook te danken aan, onder andere betere voeding en medische voorzieningen, maar vooral aan de invoering van betere hygiëne. Ik noem in dit verband de verbetering van de woonomstandigheden, de invoering van riolering en sanitaire voorzieningen, de moderne drinkwatervoorziening, pasteurisatie van melk e.d. Zo zien we het percentage sterfte door infectieziekten in de eerste helft van de twintigste eeuw nog teruglopen van 30% tot beneden 10%. Door de ontwikkeling en toepassing van vaccins en antibiotica was het mogelijk om na de tweede wereldoorlog infectieziekten verder te marginaliseren. Denk maar aan polio, pokken, differie, kinkhoest, tetanus, tuberculose, longontsteking en hersenvliesontsteking. Echter, sinds het begin van de jaren 80 heeft de strijd tegen infectieziekten een duidelijke wending genomen. De mens is opnieuw verliezer door de opkomst van nieuwe virussen en nieuwe of antibioticaresistente bacteriën, zoals de veroorzakers van legionellose, de ziekte van lyme, AIDS en de nieuwe variant van Creutzfeldt-Jakob, een prionziekte. Ook zijn oude ziekten zoals tuberculose en longontsteking weer in opmars. Gelukkig is in de Westerse wereld de kans om aan een infectieziekte te overlijden overigens nog steeds erg klein. De situatie is veel erger in veel ontwikkelingslanden waar epidemieën van cholera, malaria, dysenterie en tuberculose uitbreken als gevolg van armoede en slechte hygiënische omstandigheden, vooral onder door oorlog en etnische onrust te hoop gedreven mensen.

Hoe is nu de situatie bij de door voeding veroorzaakte infecties en microbiële intoxicaties? Ook hier is het gemakkelijk om een lijst van tien of meer door voeding en drinkwater overgedragen ziekteverwekkers op te schrijven, die de laatste twintig jaar zijn onderkend en waarvan sommigen sterk op de voorgrond zijn getreden (Tabel 1). Hoe moeten we dit verklaren? Wat betekent dat voor de microbiële voedselveiligheid? En wat zijn de opties voor beheersing?

Laat ik allereerst opmerken dat we niet onmiddellijk moeten concluderen dat voedsel en drinkwater in de Westerse wereld dus microbiologisch onveiliger zijn geworden. De beste indicaties die wij in Nederland daarover hebben laten namelijk deze conclusie niet toe. Alles wat we daarover kunnen beweren op grond van het werk van de Keuringsdienst van Waren, en medisch onderzoek, is dat we met een min of meer constant of licht dalend niveau van maagdarminfecties te maken hebben. Dit blijkt bijvoorbeeld uit onderzoek in huisartsenpeilstations naar het voorkomen van gastro-enteritis onder de Nederlandse bevolking over de periode 1996 tot en met 1999 (Fig. 2)

Voor wat betreft de verklaring van het fenomeen van de nieuw-onderkende voedselpathogenen moeten we ons allereerst afvragen of ze echt nieuw zijn, dan wel pas sinds kort onderkend. Het laatste is inderdaad het geval met *Campylobacter jejuni*, en

*Campylobacter coli*, die speciale voorzorgen vereisen bij het kweken en daardoor eigenlijk pas sinds het baanbrekende werk van de Engelsman Skirrow en de Belg Butzler aan het einde van de jaren zeventig gemakkelijk aangetoond kunnen worden. Ze blijken veel voor te komen op rauw vlees, vooral op kip en ander gevogelte. Veel andere ziekteverwekkers waren al wel eerder bekend, maar niet zozeer de overdracht via voedsel of drinkwater, die over diezelfde periode van de laatste twintig jaar vaak ook veel belangrijker is geworden. Voorbeelden zijn *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* DT104, *Escherichia coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub>, *Vibrio cholerae*, Norwalk virussen, *Cyclospora cayetanensis* en *Cryptosporidium*.

Verklaringen voor de opkomst van deze nieuwe belagers van de mens via zijn voedsel moeten we zoeken bij (1) ontwikkelingen in de voedselketen, (2) veranderingen in het levens- en voedingspatroon van de mens en (3) genetische mutatie, adaptatie en selectie bij de ziekteverwekkers (Tabel 2).

### *Salmonella* in kip en ei

Bij de ontwikkelingen in de voedselketen moeten we op de eerste plaats denken aan de schaalvergroting en intensivering die zich de laatste tientallen jaren heeft voorgedaan in de dierlijke productie, met name die van slachtkuikens en eieren. Zoals vele dieren zijn ook kippen natuurlijke reservoirs van voor de mens pathogene bacteriën. Die heeft men bij de opgetreden schaalvergroting bepaald niet buiten de deur weten te houden. Door allerlei maatregelen in de bedrijfsvoering is het besmettingsniveau van pluimvee met *Salmonella* in Scandinavische landen inmiddels drastisch verlaagd. Met zogenaamde plannen van aanpak tracht Nederland dit voorbeeld te volgen, met wisselend succes tot nu toe.

Van bijzondere betekenis in de pluimveehouderij is de opkomst van *Salmonella* Enteritidis. Dit serotype was in Spanje en in het Verenigd Koninkrijk al eind jaren zeventig in opkomst, in Nederland eigenlijk pas vanaf midden jaren tachtig. Zoals bekend komt dit organisme vooral voor bij legkippen, en kan het door transovariële infectie eieren inwendig besmetten. Met een dramatische consequentie van dit feit zijn we vorige maand nog geconfronteerd, toen in de Zwolse Isala klinieken vijf bejaarde bewoners van het verpleeghuis op de locatie Weezenlanden zijn overleden als gevolg van een infectie opgelopen door een bavarois bereid met rauwe eieren. Nu blijkt er een omgekeerde relatie te bestaan tussen de voor pluimvee ziekteverwekkende, maar voor de mens ongevaarlijke *Salmonella* Gallinarum/Pullorum en *S. Enteritidis*. Pas vrij recent is men gaan vermoeden dat dit wel eens geen toevallige relatie zou kunnen zijn. De typen hebben namelijk het somatische antigen O<sub>9</sub> gemeenschappelijk (Fig. 3). Met *S. Gallinarum* geïnfecteerde of gevaccineerde kippen hebben een hoge antilichaamstiter tegen het O<sub>9</sub> antigen. Daardoor is er sprake van competitieve exclusie van *S. Enteritidis*, die ook dit immunodominante antigen heeft en daardoor in het verleden dus vermoedelijk effectief werd onderdrukt. Toen aan het eind van de jaren 70 immunisatie niet meer nodig was en met vaccinatie is gestopt is de antilichaamstiter tegen het immunodominante O<sub>9</sub> antigen in de kippenpopulatie gaan dalen. Zo zou *S. Enteritidis* zijn kans hebben gekregen. Ook *S. enteritidis* heeft men geprobeerd te elimineren, in Nederland voornamelijk door het ruimen van met deze bacterie besmette koppels die broedeieren leveren. Dat deze tactiek niet het succes heeft wat men had met het ruimen van met *S. Gallinarum* besmette kippen wordt toegeschreven aan het feit dat *S. Enteritidis*, anders dan de kipspecifieke *S. Gallinarum*, wel nog een paar andere reservoirs heeft, namelijk de knaagdieren en trouwens ook de mens. Het inenten van legkippen tegen *S. Enteritidis* zou het probleem dus kunnen oplossen. Het lijkt er ondertussen sterk op dat men daarmee in het Verenigd Koninkrijk succes heeft. Het aantal gevallen van salmonellose bij de mens is daar sinds 1997 gehalveerd.

## Campylobacter

Naast *Salmonella* is *Campylobacter* een frequent veroorzaker van voedselinfecties. In de Nederlandse voedselvoorziening zijn alweer het slachtkuiken en in mindere mate varkensvlees belangrijke besmettingsbronnen. Een vervelende complicatie is dat men er tot nu toe niet in slaagt om deze bacterie, uit de kippenmesterij te weren. Volgens recent onderzoek wil dit ook in Denemarken absoluut niet lukken. Dit blijkt duidelijk uit Fig. 4 waar een constant laag *Salmonella*-besmettingsniveau van in totaal zo'n 9000 koppels slachtkippen in Denemarken gepaard blijkt te gaan met een hoge en sterk seizoensgebonden besmetting met *Campylobacter*. De Denen veronderstellen dat nog een veel hogere mate van "biosecurity", biologische afgrenzing dus, nodig is om *Campylobacter* bij kippen te weren. Ik vraag me af wat ik me daarbij moet voorstellen en of we niet heel andere wegen moeten inslaan om dit probleem op te lossen. Met competitieve exclusie, dat wil zeggen het oraal toedienen van bepaalde bacteriën of zelfs gisten met anti-campylobacter eigenschappen heeft men tot nu toe ook weinig succes gehad. Momenteel zijn er in het Verenigd Koninkrijk studies gaande waarbij men kippen koloniseert met voor de mens niet pathogene *Campylobacter* stammen en vervolgens onderzoekt in hoeverre zulke stammen de kolonisatie door andere campylobacters kunnen voorkomen. Men spreekt hier van homologe competitieve exclusie (Newell & Wagenaar, 2000).

Hoewel kippen niet ziek worden van campylobacters vertonen ze wel een immuun respons. Er is dus zeker potentieel voor oraal toegediende vaccins en ook zou men de mogelijkheden voor oraal toegediende antistoffen kunnen beschouwen. Weliswaar bestaat er een enorme diversiteit aan serotypes en zijn campylobacters genetisch behoorlijk instabiel, maar dat geldt ook, bijvoorbeeld, voor meningococcen, waarvoor het recent door een overwegend Italiaanse groep van Chiron (Pizza et al., 2000) wel is gelukt om geschikte kandidaat-vaccins tegen de moeilijke serogroep B te identificeren. Zoals u weet heeft deze serogroep dit jaar ook in ons land nog van zich doen spreken door het veroorzaken van een aantal nekkrampgevallen.

De Italianen gingen uit van het recent opgehelderde genoom van *Neisseria meningitidis*, stam MC58 (Fig. 5) waarin zij 570 ORF's (open reading frames) identificeerden die potentieel codeerden voor nieuwe aan het oppervlak van de cel geëxposeerde of uitgescheiden eiwitten (Fig. 6). Door clonering in *E. coli* slaagden zij er in 350 daarvan tot expressie te brengen, op te zuiveren en te gebruiken om muizen te immuniseren. Immunsera van deze muizen werden vervolgens getest op een zeer diverse groep meningococcen type B stammen, waaruit 85 veelbelovende zogenaamde *genome-derived Neisseria* antigenen kwamen. Zeven daarvan hebben ze verder bij een enorm aantal stammen onderzocht en vijf van die zeven bleken sterk geconserveerd met meer dan 99% aminozuur identiteit en tevens zeer toegankelijk voor de respectievelijke, sterk bactericide immunsera. Deze antigenen bleken lipoproteïnes en membraaneiwitten met onder andere enzymatische functies te zijn, heel andere moleculen dan waarvan men traditioneel uitgaat bij het zoeken naar kandidaatvaccins.

## *Listeria monocytogenes*

We blijven nog even bij de voedselketen en noemen uit vele ontwikkelingen nog de opkomst van mild geconserveerde voedingsmiddelen. Karakteristiek voor deze producten is, dat daarbij qua voedselveiligheid veel meer op het scherp van de snede wordt gewerkt dan we vroeger in de levensmiddelentechnologie gewend waren. Bij deze productcategorie worden namelijk niet alle micro-organismen *rücksichtslos* gedood, maar past men combinaties van conserveringsfactoren toe die met maximaal behoud van het verse karakter van het product een voldoende lange houdbaarheidstermijn mogelijk maken. Deze producten treft men veelal aan in de koelsector van het levensmiddelenbedrijf. Een dergelijk bewaarregime geeft natuurlijk kansen aan overlevende of door nabesmetting ingebrachte pathogene micro-organismen die bij die lage temperaturen nog relatief snel kunnen groeien. Een berucht

voorbeeld hiervan is *Listeria monocytogenes*, een bacterie die we vroeger eigenlijk alleen maar kenden als een veroorzaker van een zogenaamde beroepsziekte bij boeren en dierenartsen. Een aantal explosies van listeriose door producten uit de koelsector zoals zachte kazen, patés en salades heeft ons geleerd dat de ontwikkeling van de koelketen gepaard gaat met een sterk verhoogd risico op problemen met deze bacterie. Inmiddels heeft uitgebreid onderzoek, onder andere ook in ons laboratorium door dr. Beumer uitgevoerd, aangetoond dat *Listeria monocytogenes* bij producten in de koelketen door hygiënisch werken en monitoring in principe goed te beheersen is.

### *Escherichia coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub>

*E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> is een andere bacterie waarover we de laatste jaren heel wat te horen kregen in relatie tot onze voeding. Het is een buitengewoon gemene bacterie, die niet alleen maagdarminfecties veroorzaakt maar ook zeer ernstige nierdysfuncties, vooral bij jongeren. We kennen deze bacterie onder andere als de veroorzaker van de "Hamburger disease", naar een explosie als gevolg van de consumptie van besmette halfvrouw geconsumeerde hamburgers, in 1993 in de Verenigde Staten. De combinatie van die typisch Amerikaanse gewoonte van het eten van halfvrouw hamburgers, met een verregaande veronachtzaming van hygiëneregels in het betreffende productiebedrijf konden deze explosie doen ontstaan. Maar ook de moderne grootschaligheid van voedselverstreking is een risicofactor, zoals bijvoorbeeld bleek in de zomer van 1996 in Ozaka waar 9.000 mensen, voornamelijk kinderen, ook zo'n voedselinfectie van *E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> opliepen door het gebruik van o.a. schoollunches met besmette radijskiemen.

*E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> was altijd al een bacterie die net als *Shigella* maagdarminfecties en ernstige complicaties, zoals nierdysfuncties veroorzaakte, maar hij is door bovengenoemde incidenten sterk op de voorgrond getreden, en met voedsel geassocieerd geraakt. In Nederland hebben we gelukkig tot nu toe geen toename gezien in het aantal klinische gevallen van *E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> of aanverwante, zogenaamde VTEC infecties. Toch is overduidelijk, vooral uit het proefschrift van dr. Heuvelink (2000) dat deze bacteriën regelmatig voorkomen bij diverse landbouwhuisdieren en op rauw vlees, en daarmee ook terecht komen in onze keukens en in instellingen voor grootschalige voedselbereiding. Een uitbraak zou zich hier te lande ook voor kunnen doen. Zoals dr. Heuvelink opmerkte in haar proefschrift bieden momenteel toegepaste methoden van productie en distributie van rauw vlees de consument onvoldoende bescherming. Gekoppeld aan verdere verbetering van de hygiëne in de bedrijfstak, zouden decontaminatiemethoden moeten worden ingevoerd, zoals ook aanbevolen in het in 2000 verschenen rapport van de Gezondheidsraad over voedselinfecties.

### Diffuse en wijdverspreide explosies

De traditionele explosie van een microbiële voedselvergiftiging is er een die ontstaat als gevolg van het gebruik van voedsel tijdens evenementen zoals een bruiloft, een braderie of een congres. De Keuringsdienst van Waren en de Gezondheidszorg worden ingeschakeld en vaak kunnen de aard en de oorzaak van de explosie worden vastgesteld en eventueel maatregelen worden genomen om herhaling te voorkomen.

Een steeds groter aandeel van ons voedingsmiddelenpakket wordt op grootindustriële wijze geproduceerd en komt door grootschalige distributie terecht bij consumenten verspreid over grote regio's die zelfs verschillende landen kunnen omvatten. Bij een lage besmettingsgraad van zulke producten met ziekteveroorzakende micro-organismen, die dan vaak ook niet aan te tonen zijn, kunnen, verspreid over het grote distributiegebied toch in principe zeer veel mensen ziek worden, waarbij het lijkt of het allemaal op zichzelf staande ziektegevallen zijn, zogenaamde incidenten. Het is in zo'n situatie niet voor de hand liggend

om aan een gemeenschappelijke oorzaak te denken en ook veel moeilijker om deze vast te stellen. Er zijn een paar gevallen in de Verenigde Staten beschreven waarbij op deze wijze een paar honderdduizend mensen een salmonella-infectie opliepen voordat men de oorzaak had achterhaald. Uit zulke voorvallen is men het belang gaan inzien van het opzetten van "early warning" systemen. In het geval van *Salmonella* betekent dit dat men landelijk, en door koppeling van bestanden nu ook internationaal in het Internet het voorkomen van salmonella-infecties en de verantwoordelijke serotypen registreert. Bij de geringst mogelijke verheffing van de frequentie of bij het opduiken van een ongebruikelijk serotype kan men aldus onmiddellijk in actie komen. Dit is een fantastische ontwikkeling die ook voor andere voedselpathogenen zoals *E. coli* O<sub>157</sub> wordt ingevoerd. Lang niet altijd leveren serologie en faagtypering zoveel onderscheidingsvermogen op als bij salmonella's, en dan zijn de moderne op DNA of RNA gebaseerde typeringstechnieken een ware uitkomst.

In dit verband wordt ook steeds belangrijker dat voedselproducenten en distributeurs weten waar hun grondstoffen vandaan komen, welke behandelingen die hebben ondergaan, in welke producten die gaan en waar vervolgens die producten zich bevinden in de distributie. Het belang van zogenaamde *tracing* en *tracking* van grondstoffen en producten wordt juist in deze tijd wel heel duidelijk, als we bedenken dat voedsel ook nog eens een gemakkelijk doelwit van bioterrorisme kan zijn.

### Genotypische en fenotypische flexibiliteit van ziekteverwekkers

Door mutatie, adaptatie en selectie hebben micro-organismen ongekennde mogelijkheden om op veranderingen in hun omgeving in te spelen, dus ook op de bovengenoemde ontwikkelingen in de voedselketen en levens- en voedingsgewoonten. Een voorbeeld is het opduiken van de multiresistente *Salmonella* Typhimurium definite type (DT) 104. Hoewel multiresistentie tegen antibiotica zeldzaam is bij salmonella's zijn sommige stammen van dit faagtype gaandeweg resistent geraakt tegen wel negen verschillende antibiotica, vrijwel uitsluitend door chromosomale insertiemutaties. Hoewel DT104 het eerste opdook bij rundvee heeft het zich verspreid over vrijwel alle soorten huisdieren in Europa en in Amerika. De antibioticaresistentie is mogelijk ontstaan door het veelvuldig toepassen van antibiotica bij de bestrijding van infecties met *S. Typhimurium* bij landbouwhuisdieren. Hoewel dit type zich verder niet of nauwelijks onderscheidt van andere salmonella's heeft het een duidelijk competitief voordeel in een omgeving waar veel antibiotica worden gebruikt. In Nederland zien we een opvallend sterke toename van DT104, zowel bij de landbouwhuisdieren als bij de mens (Fig. 7). Momenteel veroorzaakt DT104 al 18% van alle humane salmonellosegevallen. De recente toename wordt wel in verband gebracht met het grootschalig verslepen van dierlijke mest in ons land (Van Pelt *et al.*, 2001). Het valt nog te bezien of het restrictieve beleid ten aanzien van het gebruik van antibiotica in de veehouderij dit type salmonella naar de achtergrond zal doen verdwijnen. Een aanbeveling voor een geïntegreerde risico-bepaling ten aanzien van antibioticagebruik is hier op zijn plaats.

Micro-organismen hebben ook adaptieve mechanismen ontwikkeld waarmee ze in staat zijn om op veranderende omgevingsfactoren te reageren en om te overleven onder stresscondities, door middel van de zogenaamde stressrespons. Daarvoor hebben ze signaal-transductiesystemen ontwikkeld, die in reactie op ongunstige omgevingsfactoren sigma-factoren activeren die op hun beurt de gecoördineerde expressie van genen aansturen waarvan de producten aanpassingen in de cel en daarmee overleving en eventueel opnieuw groei mogelijk maken. Zulke processen treden op bij koudeschok of hiteschok, maar ook bij veranderingen in osmotische druk, zuurgraad, enz. Ter illustratie de koudeschok-reactie bij bacteriën (Fig8 Normaal kan het ribosoom het boodschapper RNA vlot aflezen en het overeenkomstige eiwit synthetiseren (A). Bij een koudeschok valt het ribosoom uiteen en klapt het boodschapper RNA dubbel (B). Pas als door koudeschok-eiwitten (CSP's) het boodschapper RNA weer ontvouwen is en de ribosomale structuur weer hersteld is door toedoen van (eveneens door koude geïnduceerde) ribosomale bindingsfactoren, kan opnieuw eiwit worden gesynthetiseerd.

Door de opkomst van de milde conservering is de microbiële stressrespons een belangrijk onderwerp van studie geworden in de levensmiddelenmicrobiologie. Immers bij milde conservering gaat het vaak minder om rigoureuze inactivering van micro-organismen dan wel om het opwerpen van voldoende barrières, dat wil zeggen stresscondities om microbiële groei voor een bepaalde tijd onder controle te houden. Zo worden milde hittebehandelingen en in de toekomst waarschijnlijk ook steeds vaker behandelingen met hoge hydrostatische drukken of pulserende elektrische velden gecombineerd met vacuüm- of gasverpakking en het gebruik van natuurlijke antimicrobiële stoffen zoals voedingszuren, humectantia, bacteriocines en antimicrobiële enzymen. Voorts worden zulke producten vrijwel altijd gekoeld bewaard. Als gevolg daarvan hebben we in dit productassortiment ernstig rekening te houden met de voedselvergiftiging- en voedselinfectie-veroorzakende micro-organismen in Tabel 3. Daarbij treffen we zowel Gram-negatieve als Gram-positieve micro-organismen aan en ook verschillende sporevormers.

De vraag rijst nu of en in hoeverre zulke micro-organismen, blootgesteld aan de genoemde stressfactoren in mild geconserveerde producten door middel van hun stressrespons niet alleen hun persistentie maar ook hun virulentie kunnen verhogen. Er is namelijk vaak opvallende gelijkenis tussen de stressfactoren in mild-geconserveerde voedingsmiddelen en de afweermechanismen die pathogene bacteriën tegenkomen bij het belagen van hun gastheer, *in casu* de mens. Zuurtolerantie of zuurresistentie geïnduceerd door koolzuurgas of een voedingszuur in een levensmiddel kan bijvoorbeeld een bacterie uitstekend van pas komen bij het overleven van de maagzuurbarrière in zijn gastheer. Dit verschijnsel ligt mogelijk mede ten grondslag aan ernstige explosies van *E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> in de VS door de consumptie van besmet vers appelsap en verse appelcider. Voorts blijkt koeling de virulentie van *Listeria monocytogenes* voor muizen significant te kunnen verhogen, mogelijk door veranderingen in de celmembraan, de productie van koudeschok eiwitten of de productie van specifieke virulentiefactoren (Czuprynski et al., 1989; Stephens et al., 1991). Tenslotte blijkt *Salmonella* Enteritidis PT4 door aanwezigheid van het *RpoS* regulon bij een temperatuur of een wateractiviteit beneden het minimum voor groei, nog door te kunnen gaan met celstrekking en DNA replicatie, zodat vervolgens bij een optimale temperatuur of wateractiviteit in enkele uren tijd een groot aantal losse cellen kunnen ontstaan, waardoor de kans op infectie natuurlijk toeneemt (Fig. 9).

De mogelijke samenhang tussen stressrespons en virulentie bij pathogene bacteriën is daarom een onderwerp dat dr. Abee in onze groep heeft opgepakt en onder andere in een samenwerkingsverband met het RIVM en het RIKILT bestudeert. Daarbij zal de DNA *micro-array* techniek, ook wel de DNA-chip genoemd, worden gebruikt voor het bestuderen van de regulatie van de bacteriële genexpressie door omgevingsfactoren. Veranderingen in virulentie zullen worden bestudeerd met diezelfde techniek toegepast op darmepitheelcellen alsook door het biochemisch meten van bijvoorbeeld de cytokine-respons. Uiteindelijk zal worden geprobeerd deze data, aangevuld met *in-vivo* proeven op ratten, te vertalen naar effecten op de dosis-respons curve voor de mens.

De DNA *micro-array* techniek is een zeer krachtige onderzoekstechniek die momenteel in zeer veel laboratoria wordt ingezet, onder andere voor het bestuderen van gastheer-pathogeen interacties. Daardoor zal in de komende jaren de kennis omtrent de virulentiefactoren van ziekteverwekkers, zeker ook van zulke die door voedsel worden overgebracht, enorm te noemen. Onze bedoeling is om in het zojuist genoemde onderzoeksproject daar snel op in te spelen en specifiek te bestuderen hoe en in hoeverre allerlei ongunstige omgevingsfactoren, zoals die voorkomen bij mild-geconserveerde levensmiddelen, deze virulentiefactoren beïnvloeden, dan wel binnen de populatie selecteren voor meer of voor minder virulente vormen van deze bacteriën.

Wij zijn ons er overigens wel van bewust dat deze techniek van *gene-profiling* het boodschapper RNA meet, en niet het genproduct, dus niet het eiwit. Voor het analyseren van eiwitpatronen, ook wel aangeduid met de term "proteomics" hebben we overigens ook uitstekende mogelijkheden, hoewel deze techniek, door zijn afhankelijkheid van tweedimensionale gel-electrophorese ook zo zijn beperkingen heeft.

## Microbiële veiligheidsborging

De tijd ligt achter ons dat we voedselveiligheid trachten te bereiken uitsluitend door inspectie en analyse van monsters die aan bepaalde specificaties moesten voldoen. Daarmee was ook geen voedselveiligheid te garanderen, omdat de controle pas achteraf gebeurde en ook bijvoorbeeld omdat het vrijwel onmogelijk is om door wat voor bemonsteringsschema dan ook kleine aantallen ondeugdelijke eenheden in een partij aan te tonen. Via het opstellen van hygiëncodes, veelal branchegewijs, zijn we vervolgens toegekomen aan HACCP, het veiligheidsborgingssysteem dat krachtens de EU richtlijn 93/43 EEG sinds 1996 verplicht is voor alle levensmiddelenbedrijven. Met HACCP wordt voedselveiligheid ingebouwd in het productieproces. Daarvoor is evenwel omvangrijke kennis nodig van de eigenschappen van voedingsmiddelen, de processen en de relevante micro-organismen.

Deze situatie roept vragen op zoals: wat is er aan kennis, wat is de kwaliteit van die kennis met betrekking tot toepasbaarheid in HACCP, hoe toegankelijk is die kennis en wat ontbreekt er nog aan.

Al sinds vele tientallen jaren wordt in de levensmiddelenmicrobiologische literatuur gerapporteerd over de ecologie van grondstoffen, ingrediënten en daaruit bereide voedingsmiddelen, over de eigenschappen van de aangetroffen micro-organismen, over bederf en beheersing van bederf, over het voorkomen aan ziekteverwekkers en methoden om die te elimineren enzovoorts. Het is de grote verdienste van de International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) dat haar leden steeds hebben geprobeerd in een lange reeks van monografieën deze kennis overzichtelijk bij elkaar te brengen. Van grote betekenis is vervolgens de ontwikkeling van de "predictive microbiology". Hierbij wordt kennis van microbiële groei, overleving of afsterving in relatie tot omgevingsfactoren uitgedrukt in de vorm van mathematische modellen. Je zou het ook zoals gesuggereerd door Ros en McMeekin (1995) "kwantitatieve microbiële ecologie" kunnen noemen. Veel van die metingen en modellen zijn opgeslagen in databases, al dan niet kosteloos beschikbaar. Voorbeelden daarvan zijn het Pathogen Modelling Program van de USDA en het FoodMicro Model van de Campden Food and Drink Research Association.

Opvallend is overigens dat vooral veel aandacht is geschonken aan ziekteverwekkers en niet aan bederfverwekkers, en aan het effect van allerlei factoren op de groei van pathogenen terwijl men vanuit het oogpunt van voedselveiligheid natuurlijk veel meer geïnteresseerd is in overleving en afsterving. Dit is een niet onbelangrijk verschil in aandachtsgerictheid, omdat bijvoorbeeld bij lage temperatuur beneden het minimum de groei weliswaar stopt, maar overleving vaak beter is dan bij hogere temperaturen, zoals bij *E. coli* O<sub>157</sub>H<sub>7</sub> en *Campylobacter*. In Wageningen hebben vooral dr. Zwietering en later met hem dr. Wijtzes baanbrekend werk verricht door de ontwikkeling van modellen met zo weinig mogelijk, maar biologisch zinvolle parameters voor het voorspellen van microbiel bederf. De voorspellende waarde van die modellen is even goed als die van veel ingewikkelder modellen, waarbij veelal ook niet meer is te doorzien wat er precies gebeurt. Ook pionierden zij de mogelijkheden om zulke modellen uit te bouwen tot *expert systems* of beslissingsondersteunende systemen, waarmee de kwaliteit van voedingsmiddelen in productieketens, inclusief transport en opslag geoptimaliseerd kan worden.

Hierop voortbouwend ontwikkelde dr. Van Gerwen een trapsgewijze kwantitatieve risicobepalingsmethode, het zogenaamde SIEFE-model, primair bedoeld voor veilige productietechniek van voedingsmiddelen. Bij de formele risicobepalingen die tot dan toe waren uitgevoerd, ging het steeds om één pathogeen micro-organisme in één enkel product. Dr. Van Gerwen verplaatste zich in de situatie van de producent en stelde het product voorop. Natuurlijk wil de fabrikant een kwantitatief inzicht hebben in alle mogelijke gevaren en de bijbehorende risico's daarvan in zijn product. Hij kan zich dan vervolgens bij de veiligheidsborging richten op de gevoelige plekken in het productieproces.



## MRA: *microbiological risk assessment*

Niet alleen het bedrijfsleven maar ook de overheid heeft zijn verantwoordelijkheid meer speciaal als het aankomt op de formele microbiologische risicobepaling of *microbiological risk assessment*. In Nederland is vooral het RIVM te Bilthoven op dit terrein actief, voortbouwend op pionierswerk van dr. Notermans en dr. Havelaar. Het gaat bij een formele microbiologische risicobepaling om vier afzonderlijke onderdelen (Fig.10). Bij de *hazard identification* wordt allereerst vastgesteld om welk biologisch agens dat wil zeggen om welke ziekteverwekker het gaat in een eveneens nader te bepalen product of productgroep. De *exposure assessment* is de activiteit waarin zo nauwkeurig mogelijk wordt vastgesteld hoeveel van deze ziekteverwekker de consument bij consumptie van het product naar binnen krijgt. U zult begrijpen dat bij de *exposure assessment* de *predictive microbiology* goede diensten bewijst. Om de consequenties van het binnenkrijgen van die ziekteverwekker voor het optreden van ziekte bij de consument te kunnen beoordelen moet er een *hazard characterization* plaatsvinden. Dit is een evaluatie van de aard, de frequentie, de ernst en de duur van de aandoening. Daarvoor is onder andere een dosis-respons bepaling nodig, op zich al een buitengewoon lastige zaak omdat het bij blootstelling door levensmiddelen toch meestal gaat om lage aantallen en natuurlijk ook omdat de virulentie van het micro-organisme, evenals de weerstand binnen consumentengroepen nogal kunnen variëren. Toch zijn er uit de literatuur wel wat cijfers op te diepen die de kans weergeven om van één enkele opgenomen microbiële cel ziek te worden (Tabel 4).

In de *risk characterization* worden tenslotte de resultaten van de *exposure assessment* en van de *hazard characterization* gecombineerd tot een uitspraak, met bijbehorende onzekerheden, over de schadelijke effecten die in de bevolking zullen optreden. Het aldus verkregen resultaat noemt men de *risk estimate*. Als we bij de risicobepaling het gebruik van rauw ei in de voeding als voorbeeld zouden hebben genomen zou die uiteindelijke *risk estimate* dus een schatting opleveren van het aantal mensen dat in Nederland jaarlijks als gevolg daarvan een salmonellose oploopt, en eventueel ook hoeveel er daarvan in het ziekenhuis terechtkomen of misschien zelfs sterven.

Hoe moeilijk formele risico-bepaling ook is, en hoe zeer die nog in zijn kinderschoenen staat, ik ben er wel een voorstander van. Op de eerste plaats omdat risicobepaling je voortdurend confronteert met wat je niet weet. Voorts kan zo'n strikt wetenschappelijke benadering aantonen dat bepaalde producten of productiewijzen onaanvaardbare gezondheidsrisico's in zich dragen. Men kan dan overgaan tot maatregelen en deze toetsen op hun uitwerking. Omgekeerd kan men ook eerst proberen te omschrijven wat, gezien de aspecten van volksgezondheid, technische en economische haalbaarheid en publieke acceptatie, een aanvaardbaar risiconiveau is, en dat dan terugvertalen naar specificaties waaraan producten moeten voldoen. Je bent dan bezig met het ontwikkelen van zogenaamde *food safety objectives*, voedselveiligheidsdoelstellingen waarvoor ik mag terug verwijzen naar de inaugurele rede van prof. Van Schothorst (1997). Die kunnen er dan heel vertrouwd uit zien, bijvoorbeeld afwezigheid van *Listeria monocytogenes* in 0,01 g zachte rauwmelkse kaas op het uiterste moment van consumptie. Met een wetenschappelijk uitgevoerde en transparante risicobepaling kun je ook, ondanks vrijhandelsafspraken in WTO-verband importen weigeren van producten die blijken zo'n risicobepaling een onacceptabel risico voor de volksgezondheid betekenen.

## Tenslotte

Samenvattend: ik heb geprobeerd u te laten zien dat er een duidelijke relatie bestaat tussen veranderingen in productiewijzen van voedsel en levens- en voedingsgewoonten enerzijds en het optreden van microbiologische voedselveiligheidsproblemen anderzijds. Sommige van die problemen zijn zeer hardnekkig, voor anderen kan gemakkelijker een adequate oplossing gevonden worden. Voor de hardnekkige problemen moeten we de fantasie en de moed hebben om geheel nieuwe concepten op te pakken.

*Microbiological risk assessment* is een belangrijk hulpmiddel geworden bij de ontwikkeling van *food safety objectives*, waaruit in de toekomst gemakkelijker criteria voor producten, processen en bewaarcondities afgeleid kunnen worden.

Voor zover het de Wageningse bijdrage betreft kan ik signaleren dat wij enerzijds vrij reductionistisch bezig zijn om op populatie-, cel- en liefst zelfs op genniveau de reacties te bestuderen van micro-organismen op veranderingen in hun omgeving. Anderzijds zijn we ook geïnteresseerd in een meer holistische benadering, waarbij we eigenschappen van micro-organismen, voedingsmiddelen en de omgeving in getallen of verdelingen proberen te vangen. Deze gegevens stoppen we vervolgens in mathematische modellen, zoals we die onder anderen ook hier in Wageningen hebben ontwikkeld om aldus tot voorspellingen te geraken, bijvoorbeeld omtrent groeisnelheid of afstervingsnelheid van micro-organismen in levensmiddelen. Deze twee benaderingen zijn niet alleen maar complementair: ze kunnen elkaar sterk beïnvloeden, of zo u wilt, corrigeren. Het is mijn mening dat een universitaire groep levensmiddelenmicrobiologie, zoals de onze, zich ook in de toekomst het best zou kunnen richten op een tamelijk fundamentele benadering van relevante problemen in het vakgebied, daarbij direct inspeland op nieuwe mogelijkheden voortkomend uit de biologische basiswetenschappen en uit de levensmiddelentechnologie. Het uiteindelijke doel blijft om met de aldus verkregen kennisverdieping een bijdrage te leveren aan de kwaliteit en de veiligheid van de voeding van de mens.

#### Woorden van dank

Aan het eind van dit college wil ik graag van de gelegenheid gebruik maken om mijn dank en waardering uit te spreken aan al degenen die hebben bijgedragen aan mijn vorming en werk aan Wageningen Universiteit. Dat zijn op de eerste plaats mijn leermeesters professor Pilnik en professor Kampelmacher. Ik ben blij dat ze er vandaag bij wilden zijn. Verder zijn dat de collega's van Levensmiddelentechnologie, Humane Voeding en Toxicologie. Ik heb het zeer gewaardeerd om binnen de Onderzoeksschool VLAG en het Onderwijsinstituut Technologie en Voeding steeds nauwer te kunnen samenwerken. Een bijzonder woord van dank aan collega Voragen voor de vijfendertig jaar lange zeer aangename en succesvolle lotsverbondenheid.

Bij de leerstoelgroep Levensmiddelenmicrobiologie houden we ons niet alleen bezig met microbiële voedselveiligheid, maar ook met conservering en fermentatie. Vooral dit laatste onderdeel heeft onder de bezielende leiding van dr. Nout een sterke betrokkenheid met vele ontwikkelingslanden. Graag wil ik hem en alle medewerkers van de leerstoelgroep bijzonder hartelijk bedanken voor hun onvoorwaardelijke en collegiale inzet om het onderwijs en onderzoek van onze leerstoelgroep op het best mogelijke peil te krijgen. Een bijzonder woord van dank aan collega Van Schothorst, die met de European Chair in food safety microbiology een nieuwe dimensie aan onze groep heeft toegevoegd.

De sectie Levensmiddelenmicrobiologie van de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie was voor mij altijd het forum waar ik me bijzonder thuis voelde. Ik waardeer het zeer dat er vandaag bij mijn afscheid een symposium werd gehouden. Hartelijk dank aan de sprekers die er een interessante en geanimeerde dag van hebben gemaakt.

Het laatste woord van dank heb ik gereserveerd voor Trudie en onze drie dochters Marijke, José en Marjolein. Wij hebben het altijd heel fijn gehad in Heteren. Te vaak was ik er niet bij, maar dat wordt nu anders, tenminste vanaf 1 februari 2002 dan. Ik heb gezegd.