

De reiniging en desinfectie van vleeskuikentransportcontainers op de slachterij

Pilot-onderzoek Interventies ter verbetering containerwasstraat

Hermien van Bokhorst-van de Veen¹, Marleen van der Most², Masja Nierop Groot¹, Mark den Hartog³ en Miriam Koene²

1 Wageningen Food & Biobased Research

2 Wageningen Bioveterinary Research

3 NEPLUVI

Dit onderzoek is uitgevoerd in een samenwerking van Wageningen Bioveterinary Research met Wageningen Food and Biobased Research binnen de publiek-private samenwerking (PPS) 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' in het kader van Topsector Agri & Food (AF18112). Het onderzoek werd mede gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (projectnummer BO-63-001-026) en het pluimveebedrijfsleven. Binnen de PPS werken de kennisinstellingen Wageningen Bioveterinary Research, Wageningen Livestock Research en de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht samen met NEPLUVI, PLUIMNED, LTO-NOP en NVP aan de uitvoering van het onderzoek.

Wageningen Bioveterinary Research
Lelystad, maart 2023

Openbaar

Report 2343327

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/642389> of op www.wur.nl/bioveterinary-research (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2023 Wageningen Bioveterinary Research

Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E info.bvr@wur.nl, www.wur.nl/bioveterinary-research.
Wageningen Bioveterinary Research.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.

Wageningen Bioveterinary Research Report

Inhoudsopgave

Samenvatting	5	
1	Introductie	6
2	Opzet van het onderzoek	7
3	Microbiologisch onderzoek transportcontainers	8
	3.1 Nulmeting	8
	3.2 Mogelijke interventies	9
4	Materiaal en methoden	11
	4.1 Nulmeting containers	11
	4.2 Waswater uit de wasstraat	11
5	Resultaten	13
	5.1 Onderzoek transportcontainers (nulmeting)	13
	5.2 Waswater	15
	5.2.1 Nulmeting waswater	15
	5.2.2 Additionele reiniging en desinfectie van de wasstraat	16
6	Conclusies en discussie	17
	6.1 Microbiële contaminatie via het waswater	17
	6.2 Opties voor verbetering/vervolgonderzoek	20
7	Literatuur	23

Samenvatting

Eerder onderzoek uitgevoerd binnen de PPS “beheersing van *Campylobacter* in de pluimveeketen” heeft laten zien dat er, ondanks reiniging en desinfectie op slachterijen, nog levende *Campylobacter* bacteriën aanwezig kunnen zijn op transportcontainers bij aankomst op vleeskuikenbedrijven (rapport WUR 2013863)[1]. Om de kans op insleep van *Campylobacter* op vleeskuikenbedrijven via de transportcontainers te minimaliseren, is binnen dezelfde PPS onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om het reinigings- en desinfectieproces van de containers op de slachterij te verbeteren. Hierbij is de medewerking gekregen van een Nederlandse pluimveeslachterij. Samen met onderzoekers van Wageningen Universiteit en Research (Wageningen Food & Biobased Research [WFBR] en Wageningen Bioveterinary Research [WBVR]) is gekeken naar de effectiviteit van het gehele reiniging- en desinfectieproces (R&D) op microbiële bevuilding van transportcontainers en zijn mogelijke verbeteringen in het hele proces onderzocht.

Na verkennende bezoeken van de onderzoekers aan de wasstraat in september en november 2020, zijn in mei 2021 een aantal metingen uitgevoerd op verschillende plaatsen in de wasstraat (nulmeting). De resultaten hiervan maakten duidelijk dat zowel lucht als waswater potentiële bronnen waren van contaminatie van de transportcontainers. Het waswater werd hierbij als belangrijkste contaminatiebron beschouwd en vervolgonderzoek heeft zich hierop gefocust.

In een tweede onderzoek, uitgevoerd in december 2021 is de microbiologische belasting in het waswater gedurende een hele productiedag in kaart gebracht. Hoewel het onderzoek met name gericht was op contaminatie van containers met *Campylobacter*, is voor het beoordelen van de effectiviteit van het R&D proces gekeken naar het aantal coliforme bacteriën. Aangetoond is dat deze een goede indicator zijn voor microbiële verontreiniging en een goed beeld geven voor besmetting met *Campylobacter* (EFSA 2012 [2], Pacholewicz et al., 2015 [3]). Tijdens de productiedag werden van zowel de voorwasser als van de hoofdwasser op regelmatige tijdstippen watermonsters genomen. De resultaten lieten zien dat het aantal coliformen in het waswater van de voorwasser al vanaf de start van de productie om 4:00 uur hoog was, namelijk 5 log₁₀ om vervolgens al binnen een uur met 1 tot 1,5 log verder te stijgen naar een min of meer stabiel niveau. In het water van de hoofdwasser was het aantal coliformen bij start van de productie met ongeveer 2 log₁₀ een stuk lager dan in het water van de voorwasser, maar ook in de hoofdwasser werd in het eerste uur van productie een snelle stijging gezien, van ongeveer 2 log₁₀ om dan een aantal uur op een redelijk stabiel niveau te blijven. Vervolgens werd een tweede stijging gezien vanaf ~10:30 uur na start productie (= rond 14:30 uur). Dit was het duidelijkst te zien in het water van de hoofdwasser, met opnieuw een toename van zo’n 2 log₁₀ tot uiteindelijk waardes tussen 5 en 6 log₁₀/ml.

Nadat deze resultaten in maart 2022 met de betrokken personen van de slachterij waren gedeeld en mogelijke interventies zijn besproken is besloten om te kijken naar het effect van grondige reiniging van de hele wasstraat, inclusief leidingen. Een nieuwe serie metingen is uitgevoerd in mei 2022, maar de resultaten lieten geen significante verminderingen zien van de concentraties coliformen in het water van de voor- en hoofdwasser.

Deze studies hebben tot inzicht geleid in het niveau van microbiologische besmettingen in de verschillende deelprocessen binnen een wasstraat voor transportcontainers van de slachterij. Het vinden en doorvoeren van verbeteringen blijft echter uitdagend in de bestaande setting van het proces van wassen en desinfectie; aanpassingen worden al snel belemmerd door praktische bezwaren welke vaak om zeer grote investeringen vragen, met onzekerheid over de mate van effectiviteit van de voorgestelde maatregelen.

Kijkend naar de toekomst van de slachterij kan er worden nagedacht over het uitbreiden en/of ombouwen van de huidige wasstraat. Door WFBR en WBVR is een lijst opgesteld met mogelijke interventies ter verbetering van de containerwasstraat met name vanuit het oogpunt van *Campylobacter* beheersing, zoals het verhogen van de watertemperatuur in de gehele wasstraat tot 40-45°C, het aanbrengen van plastic flappen voor alle in- en uitloopstappen in de wasstraat om de verspreiding van aerosolen te reduceren, het verhogen van de frequentie van het handmatig reinigen van de containers met schuimontkalker naar 1 keer per week of het implementeren van een droogstap van de containers en trucks voordat de containers na R&D op de vrachtwagens geladen worden.

1 Introductie

Binnen het onderzoeksproject 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' is er onder andere onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van *Campylobacter* op transportcontainers, zowel op een slachterij als op pluimveebedrijven (WUR Rapport 2013863)[1]. Uit bemonstering van containers op een Nederlandse slachterij bleek dat er na reiniging en desinfectie (R&D) nog *Campylobacter* aanwezig kan zijn op deze containers. Aanvullend zijn containers bemonsterd op pluimveebedrijven, kort voor gebruik bij het uit- of wegladen van koppels vleeskuikens. De resultaten van deze bemonsteringen toonden aan dat er nog steeds kweekbare (levende) *Campylobacter* aanwezig kan zijn op containers op het moment dat deze aankomen op pluimveebedrijven.

Bovenstaande bevindingen waren aanleiding voor een samenwerking met een Nederlandse slachterij voor vleeskuikens, met als doel in kaart te brengen waar en welke verbeteringen in het R&D proces van de containerwasstraat mogelijk zouden zijn en wat de effecten daarvan zijn.

2 Opzet van het onderzoek

Een voor de gelegenheid samengestelde werkgroep bestond uit onderzoekers van WFBR en WBVR, medewerkers van de slachterij en een vertegenwoordiger van NEPLUVI.

Na een aantal bezoeken aan de wasstraat en overlegmomenten met de betreffende slachterij zijn diverse microbiologische metingen uitgevoerd op aanwezigheid van *Campylobacter* en coliforme bacteriën, om een indruk te krijgen van het effect van het R&D-proces en de mate van bacteriële verontreiniging op diverse plekken in de containerwasstraat.

Op basis van deze verkregen resultaten is door WFBR en WBVR een lijst opgesteld met mogelijke interventies ter verbetering van de containerwasstraat vanuit het oogpunt van *Campylobacter* beheersing. Op basis hiervan zijn door de slachterij maatregelen getroffen, waarna opnieuw microbiologische testen zijn gedaan om de effectiviteit van de door de slachterij uitgevoerde maatregelen te beoordelen. Daarnaast is gesproken over de mate van reductie van *Campylobacter* op containers die mogelijk te behalen is met aanvullende aanpassingen aan de wasstraat.

De volgende onderwerpen zijn binnen dit project besproken en uitgevoerd op pilot schaal:

- Nulmeting
 - o Containers
 - o Lucht in de wasstraat
- Mogelijke interventies
- Focus op waswater
 - o Reiniging en desinfectie van de wasstraat

3 Microbiologisch onderzoek transportcontainers

Niet alle koppels vleeskuikens zijn geïnfecteerd met *Campylobacter*. Om de bevindingen van het pilot-onderzoek in perspectief te plaatsen is het dus belangrijk te weten of de betreffende koppels *Campylobacter* bij zich dragen. Dit werd gedaan door voor ieder koppel waarvan de containers werden bemonsterd, ook blindedarmmest te onderzoeken op de aanwezigheid van *Campylobacter*; Uit iedere container die werd bemonsterd vóór het proces van reiniging en desinfectie (R&D) werden er van 5 dieren blindedarmmestmonsters genomen en deze monsters werden samengevoegd tot één verzamelmonster per koppel.

Op het moment dat er op de monsters genomen voor R&D geen tot weinig *Campylobacter* gevonden wordt, kan er geen uitspraak worden gedaan over de mate van reductie na R&D (met of zonder interventie). Door de monsters niet alleen te onderzoeken op de aanwezigheid van *Campylobacter*, maar ook het aantal kolonievormende eenheden van coliformen mee te nemen, wordt er toch een indruk verkregen van de bacteriële verontreiniging van de containers en het effect van R&D.

Ondanks dat de functie van de containerwasstraat het verwijderen van (onder andere bacteriële) verontreiniging is, kan niet worden uitgesloten dat er ook bacteriële contaminatie optreedt gedurende het doorlopen van de wasstraat. Om een indruk te krijgen van het risico op contaminatie met *Campylobacter* door kruisbesmetting tijdens R&D, is er ook een niet-gebruikte container door de wasstraat gestuurd. Bij deze container zijn alle kunststof onderdelen vervangen door nieuwe onderdelen (lades, kleppen, deksel, klemmen, etc.). In overeenstemming met de gebruikte containers, werd ook deze container bemonsterd voor het na het proces van R&D.

Om een indruk te krijgen van de eventuele rol van contaminatie met *Campylobacter* door aerosolvorming in de wasstraat, is een bioaerosol-sampler ('air-sampler') geplaatst op twee strategische plaatsen in de wasstraat.

3.1 Nulmeting

Definitie container: Een container bestaat uit een stalen frame met 8 lades. Aan de voorkant van de lades zitten kleppen die open kunnen om de kuikens te lossen. Aan de tegenovergestelde zijde kunnen de lades deels worden uitgeschoven om de kuikens te kunnen laden op de bedrijven. De lades kunnen niet helemaal los van het stalen frame worden gehaald.

Definitie koppel: Alle kuikens afkomstig uit één stal van een vleeskuikenbedrijf. Voor dit pilot-onderzoek werd van éénzelfde vleeskuikenbedrijf slechts één koppel bemonsterd op een monstername-dag.

- Containers van 6 verschillende koppels zijn bemonsterd.
- Van ieder van deze 6 koppels werden 5 containers bemonsterd voor R&D en 5 containers na R&D.
- De monstername van de containers voor R&D vond plaats in de wachtruimte. Tijdens deze monstername zaten de kuikens dus nog in de containers.
- De monstername van de containers na R&D vond plaats op het moment vlak voordat de containers op de vrachtwagen worden gezet.
- Containers werden bemonsterd door met een vochtig sponsje de buitenkant van een kwart van de zijkant één lade (plastic en frame) en de buitenkant van een kwart van de voorkant van één lade van de container te bemonsteren.

- Om te voorkomen dat containers bewust of onbewust een voorkeursbehandeling kregen in het R&D proces, werden de bemonsterde containers niet gemerkt. Dit voorkomt ook logistieke problemen en gevaarlijke handelingen aan het einde van de wasstraat (gemarkeerde containers kunnen slecht bereikbaar zijn). Dit betekent wel dat niet dezelfde containers werden bemonsterd voor en na R&D.
- Om voldoende betrouwbare uitspraken te kunnen doen is gekozen voor 6x5 monsters per meetmoment.
- De 6 koppels werden verspreid over verschillende dagdelen geslacht. Het tijdstip/moment van monsternamen op een slachtdag kan namelijk van invloed zijn op de hoeveelheden *Campylobacter* en coliformen die gevonden worden (de infectiedruk door aerosolvorming kan oplopen). Bovendien wordt op een bepaald moment op de dag al het water in de verschillende wasstappen ververst).
- Opnieuw bekleed frame ('nieuwe container'): Om te achterhalen of het huidige R&D proces schone containers potentieel kan vervuilen, heeft er tegen het einde van een slachtdag, een nieuw-beklede container het proces van R&D doorlopen.
- Air-sampler: Voor de detectie van *Campylobacter* in aerosolen werd er een air-sampler op een statief geplaatst zodat het apparaat actief lucht kan aanzuigen.

3.2 Mogelijke interventies

De interventies die zijn overwogen in dit pilot-onderzoek kunnen worden onderverdeeld in 3 categorieën:

1. Interventies gericht op het gehele proces van R&D van de containers
2. Interventies gericht op het optimaliseren van de reinigingsstap
3. Interventies gericht op het optimaliseren van de desinfectiestap

Tot de eerste categorie, interventies gericht op het gehele proces van reiniging en desinfectie, worden gerekend:

- Het verhogen van de watertemperatuur tot 40-50°C in de gehele wasstraat met als doel vettige stoffen gemakkelijker van de containers te verwijderen.
- Het aanbrengen van plastic flappen voor alle in- en uitloopstappen in de wasstraat met als doel het reduceren van de verspreiding van aerosolen tussen de verschillende stappen van R&D.
- Het verhogen van de frequentie van het handmatig reinigen van de containers met schuimontkalker van 1 keer per maand naar 1 keer per week.
- Het implementeren van een droogstap van de containers voordat deze op de vrachtwagen gaan door ventilatoren en/of een lucht-mes te plaatsen bij de stapels containers die reeds afgespoten zijn.

Tot de tweede categorie, interventies gericht op het optimaliseren van de reinigingsstap, worden gerekend:

- Het maximaal verwijderen van visueel vuil. In een eerste kleinschalig (handmatig) experiment kan een indruk worden gekregen van het effect van:
 - o De containers handmatig schoon te spuiten met water met een temperatuur van 40-50°C tot er geen vuil meer zichtbaar is.
 - o Overtollig water te verwijderen alvorens de zeep wordt aangebracht.
 - o De containers handmatig in te zepen met mogelijk de zeep die ook bij R&D van de vrachtwagens gebruikt wordt (afhankelijk van de producteigenschappen van deze zeep) en de voorgeschreven inweektijd aan te houden alvorens af te spuiten.

Tot de derde categorie, interventies gericht op het optimaliseren van de desinfectiestap, worden gerekend:

- Zorgen voor een optimale werking van het desinfectiemiddel. In een eerste kleinschalig (handmatig) experiment kan een indruk worden gekregen van het effect van:
 - o Het verwijderen van overtollig water alvorens het desinfectiemiddel wordt aangebracht.
 - o Het handmatig aanbrengen van desinfectiemiddel op het gehele oppervlak van de container in de voorgeschreven concentratie.
 - o De voorgeschreven inwerktijd van het desinfectiemiddel aan te houden en vervolgens de containers na te spuiten met water van drinkwaterkwaliteit.

Ook kan het drogen van containers na R&D als interventie toegepast worden. Het actief drogen van de containers kan namelijk *Campylobacter* inactiveren (zie bijvoorbeeld Kusumaningrum et al. 2003, Int Journal Food Microbiology 85:227-236 [4] en Berrang et al. 2011 doi: 10.3382/japr.2011-00391 [5]).

Op het verhogen van de watertemperatuur na, heeft geen van bovenstaande interventies rechtstreeks betrekking op het R&D-proces van de vrachtwagens (truck en trailer). Echter, interventies gericht op het optimaliseren van het R&D-proces van de containers kunnen natuurlijk wel worden doorgetrokken naar de vrachtwagens, denk aan het aanhouden van de voorgeschreven inweektijd van zeep en het laten drogen van de vrachtwagens na desinfectie.

4 Materiaal en methoden

4.1 Nulmeting containers

Opzet:

- Verspreid over de dag werden bij 6 verschillende koppels 5 containers bemonsterd, voorafgaand en na afloop van het doorlopen van het proces van R&D. Dit resulteerde in een aantal van 60 monsters. Aan de hand van de slachtplanning van deze dag werden de momenten van monsternamen reeds voor aanvang van deze dag vastgesteld.
- Opnieuw bekleed frame ('nieuwe container'): De gemarkeerde, nieuw-beklede container werd aan het einde van de slachtdag na handmatige decontaminatie met 70% ethanol de wasstraat in gestuurd om het R&D proces te doorlopen. Deze container is aan de buitenkant op 3 plaatsen bemonsterd voor en na R&D (dit zijn dezelfde oppervlakken voor en na R&D).
- Air-sampler: Voor de detectie van *Campylobacter* en coliformen in aerosolen werd een air-sampler op een statief geplaatst zodat het apparaat actief lucht kan aanzuigen. Er werden monsters genomen op de plaats waar de containers de wasstraat in gaan (in de wachtruimte) en daar waar ze het hele R&D proces hebben doorlopen. Dit gebeurde zowel tijdens de eerste helft van de slachtdag als tijdens de tweede helft. Per monsternamemoment werden er 3 volumes aan lucht aangezogen en onderzocht: 1, 10 en 100 liter. Dit resulteerde in een totaal van 12 luchtmonsters.

Analyses:

- Veegmonsters werden met een spons genomen (3M™ Hydrated sponge with 10 mL Buffered Peptone Water Broth and Gloves, HS10BPW2G, 3M Nederland), mestmonsters werden verzameld in een monsternamenepotje (urinepotje met schroefdeksel 125 ml, VWR International) en luchtmonsters met een air-sampler (MAS-100 Eco, Merck, Darmstadt, Duitsland).
- Een deel (100 µl) van een seriële verdunningsreeks van de veegmonsters werd uitgeplaat op modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA; WBVR BM322, Lelystad) voor de detectie van *Campylobacter*. Hiertoe werden de platen weggezet in een afgesloten container gedurende 48 uur bij 41,5°C onder microaerobe gassamenstelling (5% O₂, 10% CO₂). Daarnaast werd 100 µl van de verdunningsreeks uitgeplaat op brilliance *E. coli*/coliform selective agar (BECSA; Tritium Microbiologie, Eindhoven, Nederland) voor de detectie van coliformen. Hierbij is de incubatieduur 48 uur bij 37°C.
- Bovengenoemde platen met agar (groeimedia) en incubatieomstandigheden werden ook gebruikt voor de monsters die genomen waren met de air-sampler voor de detectie van *Campylobacter* en coliformen in de lucht.

4.2 Waswater uit de wasstraat

Opzet eerste pilot (nulmeting waswater):

- Waswatermonsters werden door een medewerker van de slachterij in duplo op 2 plaatsen in de wasstraat genomen [in deze volgorde; het idee hierbij is dat eerst het water met de (verwachte) laagste microbiologische belasting bemonsterd wordt, daarna het hoogst belaste]:
 - o aan het einde van de 1e bak van de hoofdwasser
 - o aan het einde van de bak van de tweede voorwasser
- Waswatermonsters werden gedurende de gehele productiedag genomen volgens onderstaand bemonsteringsschema:
 - o Zo snel mogelijk na schoonmaak wanneer er water in de wasstraat zit (en voordat de productie gestart is)
 - o Bij de start van productie
 - o Het eerste uur van productie: ieder kwartier
 - o Overige uren van de productiedag: ieder uur

- Het bemonsteringsschema resulteerde in een totaal van 96 monsters. Het bemonsteringsschema is als bijlage aan dit rapport toegevoegd.

Opzet tweede pilot waswater (nadat er door de slachterij een uitgebreide reiniging van de wasstraat was uitgevoerd):

- Voorafgaande aan het nemen van watermonsters werd er een grondige R&D van de hele wasstraat inclusief de leidingen uitgevoerd. Hierbij was het doel dat:
 - o De aanwezige biofilms zoveel mogelijk werden verwijderd en een zeer grondige schoonmaak werd uitgevoerd. Denk aan vuil en/of biofilms in slangen, leidingen, pompen, schoonmaakkbogen, nozzles, voor de schoonmaak moeilijk bereikbare hoeken, et cetera. Dit is tijdens een weekend uitgevoerd.
 - o Na de grondige reiniging ook een desinfectie van het hele systeem werd uitgevoerd. Om groei van micro-organismen te voorkomen, moet na reiniging en desinfectie het systeem binnen 2 uur droog zijn, maar dit is niet realistisch voor de situatie bij de slachterij. Een alternatief is om ook desinfectiemiddel toe te voegen aan de laatste naspoelstap, zodat er desinfectiemiddel in het resterende water blijft tot aanvang productie.
- Het systeem werd voor aanvang van de productie nagespoeld om het desinfectiemiddel weg te spoelen.
- De maandag nadat het aangepaste R&D van de wasstraat twee voorafgaande weekenden achtereenvolgens is uitgevoerd, werd het waswater opnieuw bemonsterd:
 - o In de bak van de hoofdwasser en voorwasser (zoals bij de eerste pilot op het waswater);
 - Aan het einde van de 1e bak van de hoofdwasser
 - En vervolgens aan het einde van de bak van de tweede voorwasser
 - o Wanneer in tijd:
 - Een kwartier voor aanvang productie (desinfectiemiddel moet er wel uitgespoeld zijn)
 - Bij start productie
 - Het eerste uur van productie: ieder kwartier
 - Overige uren van de productiedag: om het uur
 - o In duplo: dit resulteerde in een totaal van 60 monsters.

Analyses:

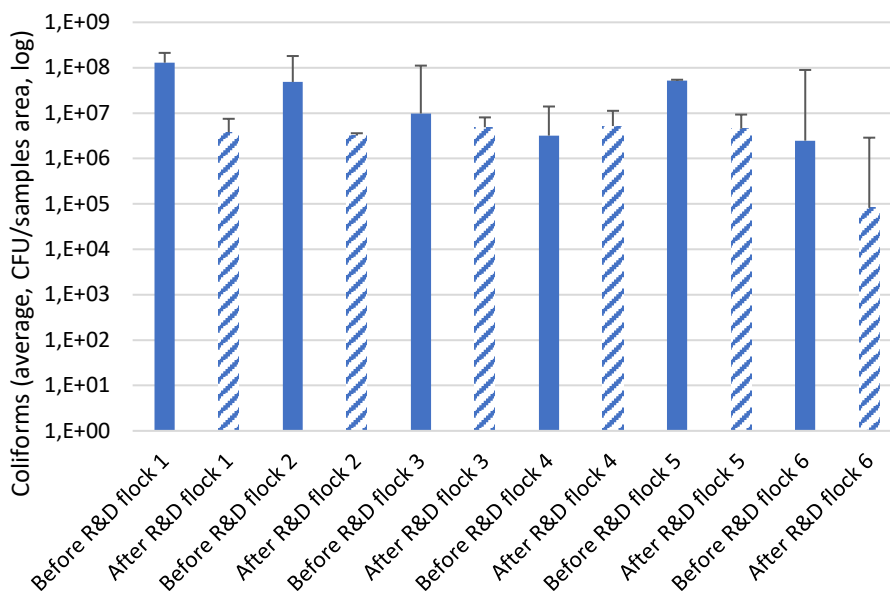
- Een deel (100 µl) van een seriële verdunningsreeks van de waswatermonsters werd uitgeplaat op BECSA voor de detectie van coliformen zoals beschreven bij sectie 3.1.
- Coliformen werden naast de klassieke plaatmethode ook via de 'meest waarschijnlijke aantal' (most probable number; MPN) methode bepaald. Voor deze methode werd 10 µl waswatermonster in triplo ('3 buizen') serieel verdund in 90 µl brilliant green bile lactose broth (BGBLB) in 96-wells microtiter platen (Greiner Bio-one, Alphen aan den Rijn, Nederland) met behulp van een pipeteer apparaat (ViaFlo96, INTEGRA Biosciences KK, Tokyo, Japan). De microtiter platen werden geïncubeerd gedurende 24 uur bij 35°C. BGBLB stimuleert groei van Gram-negatieve coliforme bacteriën, maar gasvorming door coliformen kan niet worden gedetecteerd in deze opzet, daarom werd er gekozen voor een additionele onderscheidende stap voor coliformen: 2 µl van de vloeistof uit ieder welletje wordt op een rechthoekige BECSA plaat gepipetteerd met behulp van de ViaFlo96. Deze platen werden gedurende 24 uur bij 37°C geïncubeerd.
 - o Roze- en paarsachtige koloniën op de BECSA platen werden geteld en, in combinatie met de verdunning, gebruikt in de berekening naar MPN. Dit gebeurde op basis van de online beschikbare rekentool van de FDA: <https://mpncalc.galaxytrkr.org/>. Vervolgens zijn de aantallen met 10 vermenigvuldigd, omdat we niet uitgaan van 1 ml monster (waarvan standaard wordt uitgegaan), maar 100 µl.

5 Resultaten

5.1 Onderzoek transportcontainers (nulmeting)

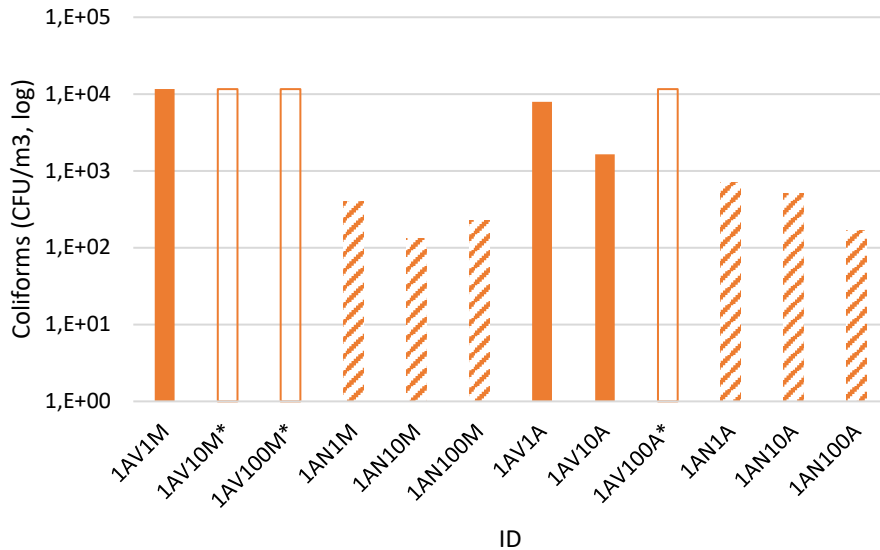
Slechts een enkel blindedarmmonster testte positief voor *Campylobacter*, maar pas na verlengde incubatie. Dit duidt op een lage (tot geen) beginbesmetting van *Campylobacter* in de koppels. Er werd geen *Campylobacter* gedetecteerd in de veegmonsters en luchtmonsters.

De veegmonsters toonden hoge aantallen coliformen op de transportcontainers, tot meer dan $8\log_{10}$ kiemen per gemeten oppervlakte. De gemiddelde reductie van het aantal coliformen op containers na R&D was minimaal (Figuur 1). Bij een enkel koppel nam deze zelfs toe na R&D, wat erop wijst dat het waswater een bron van (extra) contaminatie kan zijn.



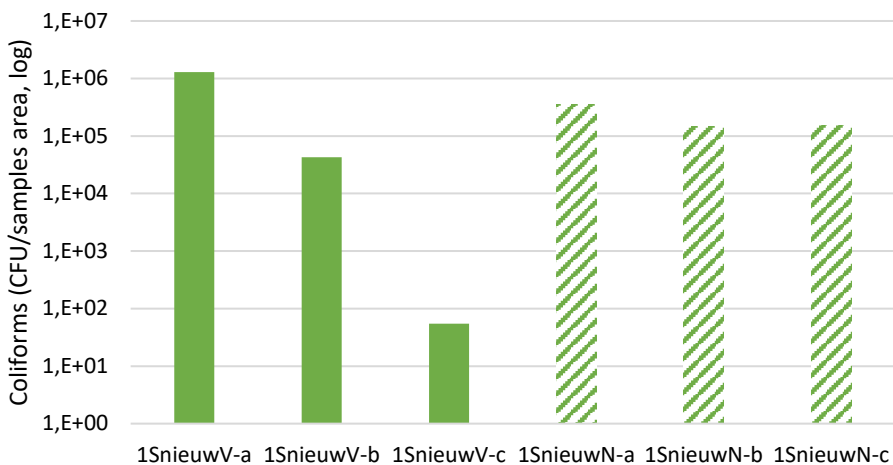
Figuur 1. Gemiddelde aantallen coliforme bacteriën aangetroffen op containers vóór (dichte kolommen) en na (schuin-gestreepte kolommen) reiniging en desinfectie (R&D). Gemiddelde van 5 containers per koppel. In totaal zijn 6 koppels onderzocht (flock 1 tot en met 6).

Zowel voor als na R&D zijn er ook aanzienlijke hoeveelheden coliformen in de lucht gedetecteerd, tot meer dan $4\log_{10}$ kiemen per m^3 lucht. Hoewel er in de ruimte na R&D wel een lager aantal coliforme bacteriën werd gedetecteerd ten opzichte van de ruimte voor R&D (wachtruimte; Figuur 2), kan de lucht in de wasstraat worden beschouwd als een potentiële bron van besmetting van schone containers en vrachtwagens.



Figuur 2. Gemiddelde aantallen coliforme bacteriën gemeten in de lucht in de ochtend (linker 6 kolommen) en in de avond (rechter 6 kolommen), vóór (dichte en open kolommen) en na (schuin-gestreepte kolommen) reiniging en desinfectie. Open kolom betekent dat de aantallen hoger dan de detectielimiet ($\sim 10^4$ CFU/m³) waren. De drie enkele metingen per moment en locatie zijn als losse kolom weergegeven.

De nieuw beklede container bleek bij aankomst stoffig te zijn. De microbiologische aantallen op oppervlak 'a' en 'b' voor R&D laten zien dat het lastig is om een "nieuw" oppervlak te desinfecteren zonder voorafgaande schoonmaak (Figuur 3). Bij oppervlak 'c' was het wel mogelijk om met lage coliform aantallen te starten voor R&D. Op basis van oppervlak 'c' kan er worden gezegd dat de nieuw beklede container is besmet met coliformen tijdens R&D. Het waswater kan dan ook worden beschouwd als een potentiële bron van besmetting van containers.



Figuur 3. Coliform aantallen op een nieuw beklede container vóór (dichte kolommen) en na (schuin-gestreepte kolommen) reiniging en desinfectie (R&D). Iedere kolom is een enkele meting; de oppervlakken a, b en c zijn dezelfde voor en na R&D.

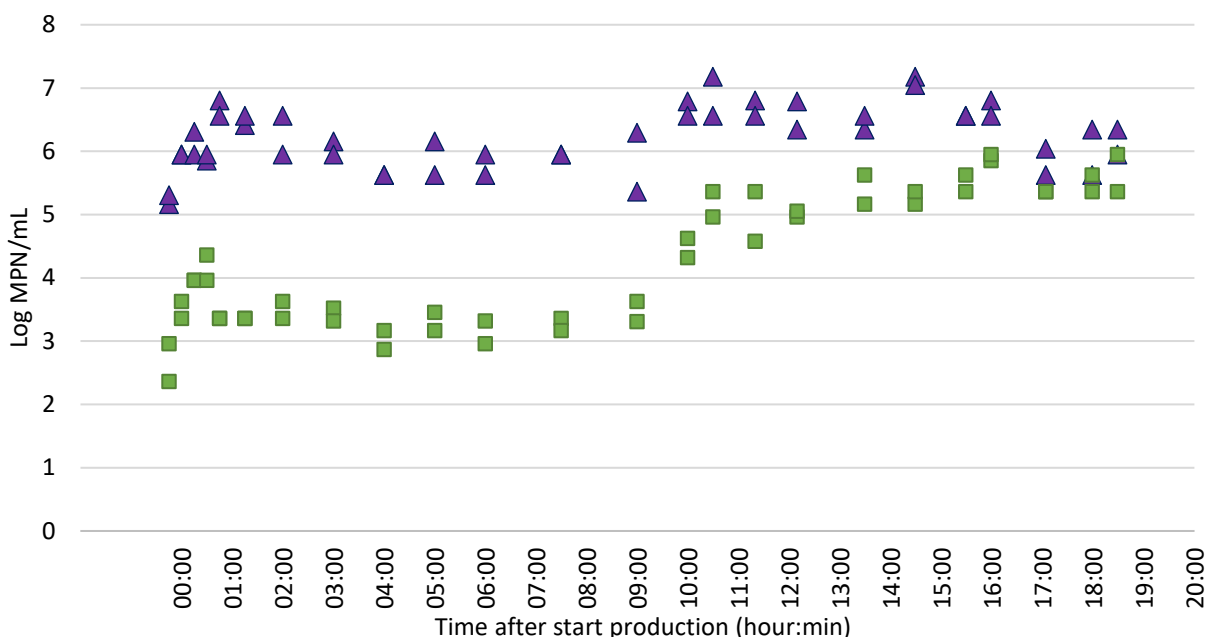
5.2 Waswater

Uit de resultaten van de transportcontainers (sectie 5.1) werd duidelijk dat sprake is van kruisbesmetting tijdens het hele proces. Er werd geconcludeerd dat het daarom weinig zin heeft om op kleine schaal interventies door te voeren in de wasstraat en het eerste speerpunt werd het minimaliseren van contaminatie gedurende het R&D-proces. Hoewel de rol van lucht als bron van microbiële contaminatie zeker niet mag worden onderschat, laten de resultaten van de nulmeting zien dat de aantallen coliformen in de lucht duidelijk van een andere (lagere) orde van grootte waren dan die op de containers na R&D. Om op relatief korte termijn een zo groot mogelijke slag te kunnen slaan in het verbeteren van het R&D-proces, is er in eerste instantie gekeken naar mogelijkheden om de microbiële contaminatie via het waswater te verlagen.

Hoewel er een continue aanvoer is van vers waswater, wordt het waswater (deels) hergebruikt bij de verschillende wasstappen in de wasstraat. Dit hergebruik vindt plaats binnen dezelfde schakel in het wasproces, maar ook wordt water wat reeds gebruikt is aan het einde van de wasstraat opnieuw ingezet bij eerdere wasstappen.

5.2.1 Nulmeting waswater

Om inzicht te verkrijgen in de microbiologische belasting van het waswater, is het water gedurende een hele productiedag bemonsterd (zie bijlage 1 voor het monsternamenameprotocol) en zijn de coliform aantallen bepaald via een MPN-methode. Uit de metingen van het waswater bleek het aantal coliformen in het waswater van de voorwasser vanaf start productie hoog: 100.000 MPN/mL ($5\log_{10}$) of hoger. In de hoofdwasser werden deze aantallen gedetecteerd vanaf ~10:30 uur na start productie (Figuur 4). Aan het begin van de productie namen de coliform aantallen relatief snel toe (eerste 3 kwartier), daarna vlakten ze iets af en namen later in de tijd weer toe (10:30 uur na start productie). Deze trend is bij beide wassers waar te nemen (en het duidelijkst bij de hoofdwasser; Figuur 4).



Figuur 4. Coliform aantallen in waswater van de transport container wasstraat. Aantallen in de voorwasser (paarse driehoeken) en hoofdwasser (groene vierkanten). Ieder symbool is een enkele meting.

Deze nulmeting van het waswater geeft aan dat vanaf de start productie het waswater hoog besmet is. Opvallend is dat de microbiologische belasting van het waswater in de hoofdwasser tijdens de eerste helft van de productiedag lagere aantallen geeft ten opzichte van de rest van de dag.

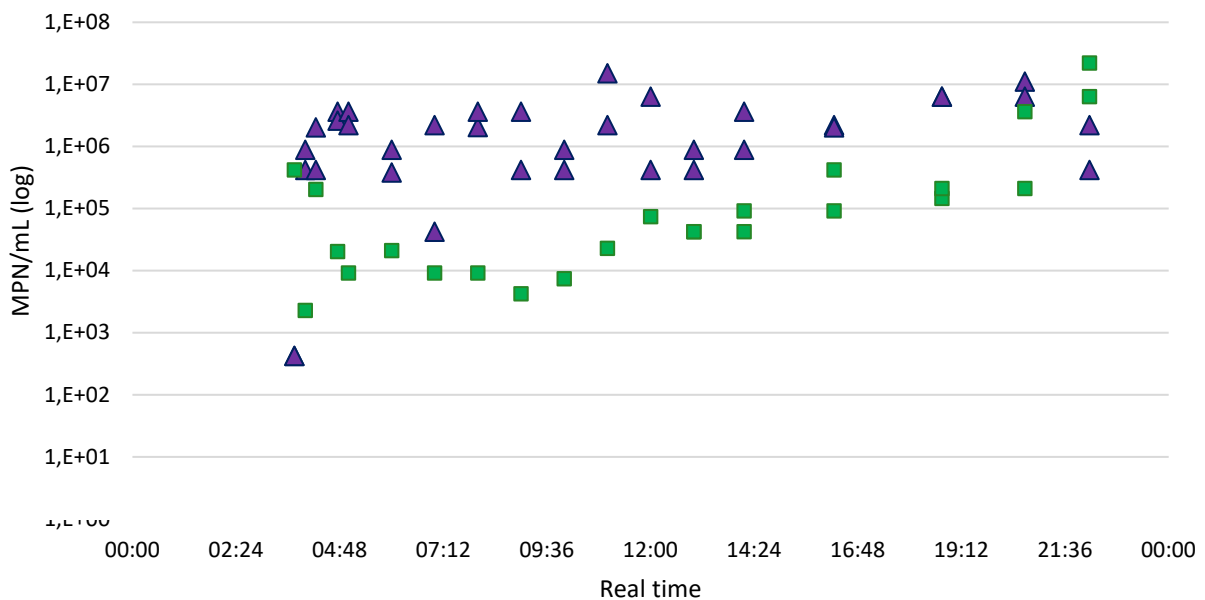
5.2.2 Additionele reiniging en desinfectie van de wasstraat

Er is een vervolgonderzoek uitgevoerd op het waswater na additionele R&D in twee voorafgaande weekenden voor monsternamen. De resultaten van de aantallen coliformen voor aanvang productie (3:45 uur) in het water van de voorwasser waren $\sim 2,5$ log KVE/mL zijn, maar namen toe met 3 log bij aanvang productie (4:00 uur). De aantallen bleven daarna stabiel (~ 6 Log MPN/mL; Figuur 5).

De beginwaarde (coliform aantallen) van de hoofdwasser was hoger dan de voorwasser, hier lijkt het dat er monsters zijn verwisseld.

Coliforme aantallen in water van de hoofdwasser begonnen relatief hoog en fluctueerden meer in het eerste uur van productie. Daarna bleven de coliforme aantallen enige tijd stabiel (~ 4 log MPN/mL) met een langzame stijging tot 7 log MPN/mL aan einde productiedag (Figuur 5).

Opmerkelijk was dat het water bij deze pilot visueel veel troebeler was ten opzichte van de nulmeting.



Figuur 5. Coliform aantallen in waswater van de transportcontainer wasstraat na additionele reiniging en desinfectie. Aantallen in de voorwasser (paarse driehoeken) en hoofdwasser (groene vierkanten). Ieder symbool is een enkele meting.

6 Conclusies en discussie

6.1 Microbiële contaminatie via het waswater

Hoewel er in de laatste processtap van de containerwasstraat een continue aanvoer is van vers waswater, wordt het waswater (deels) hergebruikt. Dit hergebruik vindt plaats binnen dezelfde schakel in het wasproces, maar ook wordt water wat reeds gebruikt is aan het einde van de wasstraat opnieuw ingezet bij eerdere wasstappen.

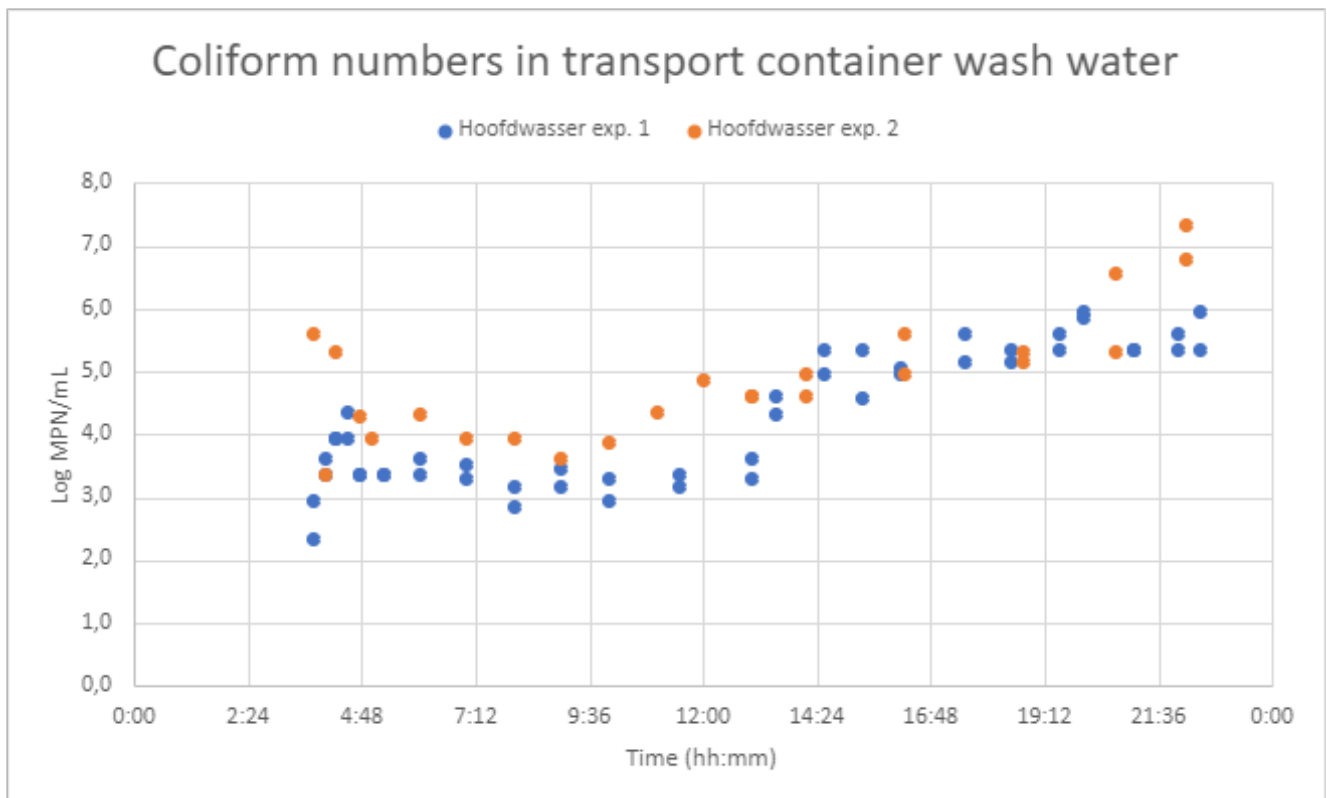
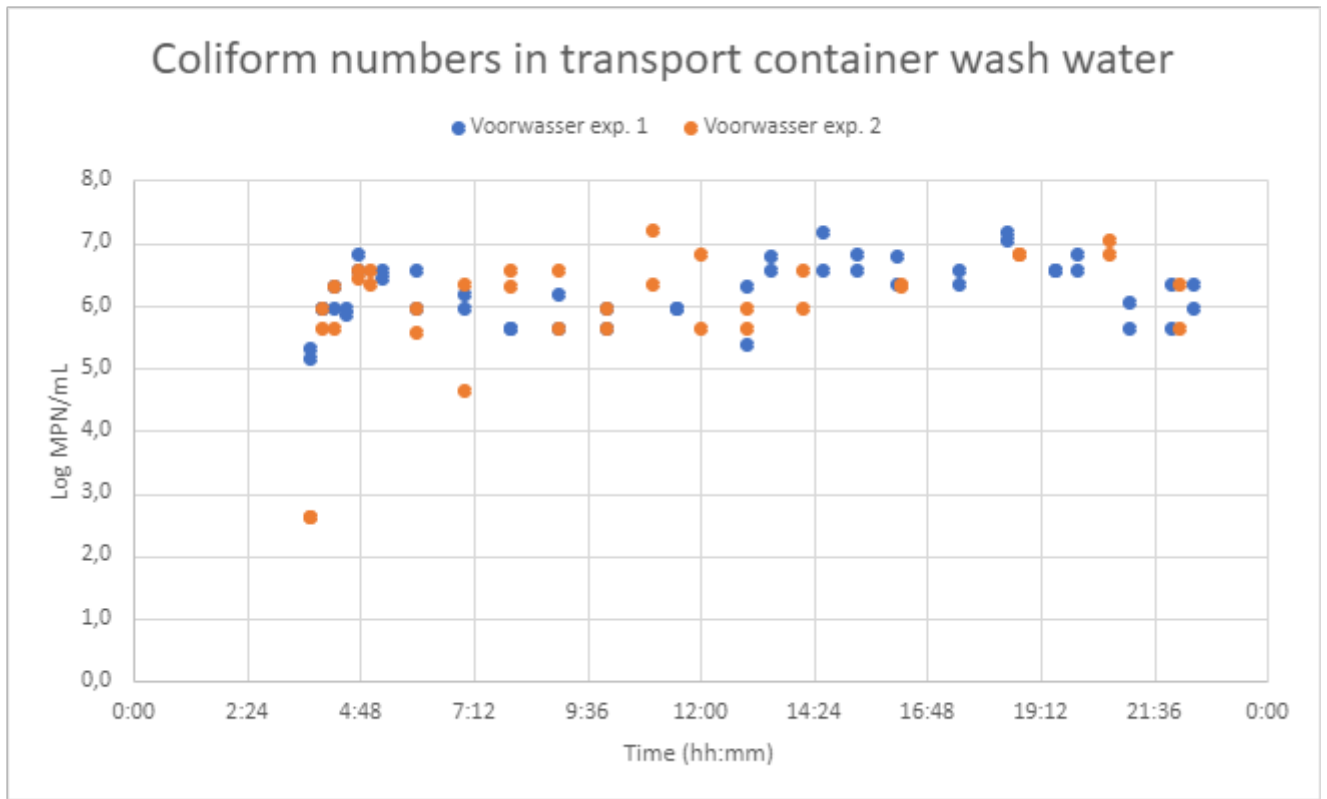
Om de mate van de microbiële verontreiniging van het waswater te inventariseren zijn tijdens twee verschillende stappen van het wasproces in december 2021 metingen uitgevoerd (experiment 1). De monsters zijn op 16 december 2021 verzameld door medewerkers van de slachterij en de dag erna verwerkt in Wageningen.

Uit de resultaten van de voorwasser bleek het aantal coliformen in het waswater al vanaf start productie hoog te zijn (100.000 MPN/mL [log 5] of meer), om in de eerste 3 kwartier van de productie verder toe te nemen tot uiteindelijke niveaus tussen log 6 en log 7 per ml waswater (Figuur 4).

In de hoofdwasser wordt in de eerste 9 uur van productie een vergelijkbare toename gezien, hoewel de aantallen coliformen in het waswater duidelijk lager zijn in vergelijking met het water in de voorwasser, met zo'n 2- 3 log verschil. Echter vanaf ~10,5 uur na start productie (= rond 14:30 uur) vindt in het water van de hoofdwasser een verdere stijging plaats, waarbij de aantallen coliformen rond het einde van de productiedag bijna vergelijkbare concentraties bereiken als het water van de voorwasser, namelijk tussen de 5 en 6 log coliformen per ml.

Om te proberen de microbiële verontreiniging van het waswater aan het begin van het productieproces te verlagen, werd door de slachterij een Undine® wasser ingebouwd in de wasstraat (na de voorwassers) en werd de temperatuur van het waswater verhoogd (~35°C). Tevens is door de slachterij gedurende twee opeenvolgende weekenden de hele wasstraat zeer grondig gereinigd en gedesinfecteerd waarbij vooral ook aandacht was voor de leidingen en pompen van het systeem. Om het effect van deze aanvullende reiniging te meten is op de eerstvolgende productiedag (maandag 23 mei 2022, experiment 2) het waswater opnieuw bemonsterd door medewerkers van de slachterij en zijn de dag erna de monsters geanalyseerd op aantallen coliforme bacteriën in het lab in Wageningen (WUR).

In Figuur 6 zijn de resultaten van beide bemonsteringen van het waswater met elkaar vergeleken. Wat opvalt is op dat de aantallen coliformen in het waswater van de voor- en hoofdwasser in beide bemonsteringen vergelijkbaar waren, met uitzondering van het moment voor aanvang van de productie. In de voorwasser liet het eerste monster van de productiedag na aanvullende R&D een duidelijk lager aantal coliforme bacteriën zien. Echter in het water van de hoofdwasser waren de aantallen coliformen niet alleen in het eerst genomen watermonster na R&D, maar in hele eerste helft van de productiedag juist hoger dan de waardes tijdens de nulmeting. Gedurende de tweede helft van de productiedag bereikten in beide experimenten de aantallen in beide wassers vergelijkbare waardes, tussen 5 en 6 log per ml.



Figuur 6. Concentraties coliforme bacteriën in waswater van de transportcontainer wasstraat vóór (exp. 1, blauwe punten) en na additionele reiniging en desinfectie gedurende 2 weekenden (exp.2, oranje punten). Aantallen in de voorwasser (bovenste figuur) en hoofdwater (onderste figuur). Ieder symbool is een enkele meting.

Ondanks een verschil in coliformen bij start productie laten de waardes dus geen effect zien van de extra grondige R&D op het aantal coliformen in het waswater. Opvallend was dat het water bij de tweede meting visueel troebeler/viezer werd bevonden. Onduidelijk is waardoor dit werd veroorzaakt, mogelijk dat bij het intensievere R&D proces biofilm is vrijgekomen wat tot extra troebeling heeft geleid.

In beide experimenten (december en mei) valt het op dat in het water van de hoofdwasser tijdens de eerste helft van de productiedag een plateau heeft, vervolgens stijgt het en bereikt een tweede plateau. Dit kan mogelijk liggen aan het type kuiken dat verwerkt wordt. Gedurende het eerste deel van de slachtdag worden er conceptkuikens geslacht, deze worden nuchter geslacht. In de betreffende slachterij worden ook uitladers geslacht uit de reguliere vleeskuikenhouderij. Deze kuikens worden altijd na de conceptkuikens ingepland en zijn niet volledig nuchter op het moment van slachten. Dit laatste veroorzaakt meer vervuiling van de transportcontainers wat mogelijk ook gevolgen heeft voor de mate van contaminatie van het waswater.

Conclusie: Er is geen resultaat gemeten van de extra intensieve R&D op vervuiling van het waswater bij aanvang; het niveau van de contaminatie na intensieve R&D in beide waterbakken blijft nog steeds vergelijkbaar. Ook na extra intensieve R&D loopt de vervuiling in de tijd dermate snel op dat niveaus van voorwasser en hoofdwasser elkaar bereiken. Dat de mate van contaminatie in de hoofdwasser hetzelfde niveau bereikt als het niveau in de voorwasser is niet wenselijk gezien de functie van beide wassers.

6.2 Opties voor verbetering/vervolgonderzoek

Het effect van de maatregelen die gedurende deze studie door de slachterij zijn genomen (verhoging van de temperatuur van het waswater, Undine, extra R&D) bleken geen significant effect te hebben op de uiteindelijke aantallen coliforme bacteriën die in deze studie in het waswater werden aangetoond. Tijdens deze studie zijn andere mogelijke maatregelen aangedragen die om praktische of financiële redenen niet konden worden onderzocht in dit project.

Chemische decontaminatie waswater

Tijdens bijeenkomsten eerder in het project werd (chemische) decontaminatie van het waswater als optie besproken. Eén van de opties is het gebruik van perazijnzuur (peracetic acid; PAA). Vanuit de voedingstuinbouw (groentesnijderij) zijn er ervaringen met het ontsmetten van waswater met PAA1. Een ander desinfectans met bewezen effectiviteit tegen *Campylobacter* is chloordioxide (ClO₂). Echter gezien de hoge mate van vervuiling van het water is de verwachting dat er veel chemicaliën gebruikt moeten worden, wat onwenselijk is wat betreft kosten, milieu en veiligheid voor medewerkers.

Het verhogen van de temperatuur van het waswater

Het gehele R&D proces vindt plaats bij een waswatertemperatuur tussen de 20 en 30°C, dit is voor het verwijderen van vet te laag. De slachterij heeft de temperatuur al verhoogd tot ~35°C, echter een verhoging van de temperatuur naar 45°C is naar verwachting effectiever.

Voor de slachterij was het ten tijde van deze studie niet mogelijk de temperatuur van het waswater verder te verhogen tot 45°C. Wel wordt deze interventie geagendeerd voor intern overleg op de slachterij, zodat er serieus gekeken kan worden wat haalbaar is in de toekomst.

Optimaliseren desinfectieproces

Een andere maatregel die mogelijk effect zou kunnen hebben op de uiteindelijke microbiële contaminatie van de transportcontainers is het optimaliseren van de desinfectiestap. De desinfectie vindt plaats aan het einde van de hoofdwasser. Het desinfectiemiddel dat wordt gebruikt is P3-Incidin 05, een biocide met als werkzaam bestanddeel alkyl(C12)dimethylbenzyl-ammoniumchloride. Voor transportmiddelen voor dieren is de toegestane gebruikconcentratie van dit desinfectiemiddel 2%. Volgens voorschrift is de minimale inwerktijd 5 minuten en er wordt geadviseerd de te desinfecteren materialen eerst grondig te reinigen en overtollige vloeistof te verwijderen alvorens het desinfectiemiddel wordt aangebracht. Verder dient er bij het desinfecteren een hoeveelheid vloeistof gebruikt te worden dusdanig dat de materialen gedurende de inwerkingstijd nat blijven.

De slachterij is zich er reeds van bewust dat er wat betreft de inwerktijd van het desinfectiemiddel op dit moment variatie zit tussen containers. Deze variatie is afhankelijk van het moment waarop de containers op de 'bufferplaats' aankomen (de eerste versus de laatste). Naar schatting varieert de inwerktijd van het desinfectiemiddel nu tussen 2 en 10 minuten (dit is bevestigd door Wageningen tijdens het bezoek in oktober). Belangrijk hier te vermelden is dat alle containers na het verlaten van de wasstraat handmatig volledig met water worden afgespoten alvorens zij op de vrachtwagen geplaatst worden. Deze handeling is bepalend voor de inwerktijd van het desinfectiemiddel.

Een mogelijkheid is om de inwerktijd van het desinfectiemiddel bij benadering te verdubbelen (is afhankelijk van de uitgangssituatie) en bijvoorbeeld 10 minuten aan te houden. Voorwaarde is wel dat er bij de desinfectie voldoende vloeistof wordt gebruikt om de containers gedurende de gehele (nieuwe) inwerktijd vochtig te houden.

Aanvullende droogstap

Aangezien *Campylobacter* bacteriën gevoelig zijn voor blootstelling aan de lucht (uitdroging en contact met zuurstof) valt te denken aan een droogstap. Indien dit plaatsvindt voordat het desinfectiemiddel wordt

aangebracht zal dit een tevens het proces van desinfectie verbeteren. Op deze manier wordt namelijk verdunning van de concentratie van het desinfectiemiddel tegengegaan en komt het desinfectiemiddel beter in contact met het te desinfecteren oppervlak.

Na het doorlopen van alle stappen van de wasstraat worden de containers handmatig nogmaals volledig afgespoten met water. Niet alleen betekent het afsputten van de containers het einde van de desinfectiestap, maar deze handeling draagt er ook toe bij dat de containers nat op de vrachtwagens worden geplaatst. In de wetenschap dat *Campylobacter* beter kan gedijen onder vochtige omstandigheden, is dit niet optimaal. Het actief drogen van de containers voor transport kan mogelijk bijdragen aan een reductie van de *Campylobacter* verontreiniging op de containers.

Voor het actief drogen van de containers zou bijvoorbeeld gebruik kunnen worden gemaakt van ventilatoren. Deze droogstap dient plaats te vinden nadat de containers zijn gedesinfecteerd en handmatig zijn afgespoten.

Voor deze interventie is het waarschijnlijk het meest handig wanneer de betreffende containers in een aparte ruimte worden geplaatst waar de ventilator(en) zijn werk kan doen.

7 Literatuur

1. M. Koene et al., Onderzoek naar de aanwezigheid van *Campylobacter* op containers, op een slachterij en op pluimveebedrijven. Rapport WUR 2013863. <https://doi.org/10.18174/574418>.
2. EFSA Panels on Biological Hazards (BIOHAZ), on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), and on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). *EFSA Journal* 2012;10(6):2741. [179 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2741. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
3. Ewa Pacholewicz, Arno Swart, Maarten Schipper, Betty G M Gortemaker, Jaap A Wagenaar, Arie H Havelaar and Len J A Lipman. A comparison of fluctuations of *Campylobacter* and *Escherichia coli* concentrations on broiler chicken carcasses during processing in two slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2015 Jul 16;205:119-27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.006.
4. Kusumaningrum et al. 2003, *Int Journal Food Microbiology* 85:227-236
5. Berrang et al. 2011 *Journal of Applied Poultry Research* Volume 20, Issue 4, 1 December 2011, Pages 567-572. <https://doi.org/10.3382/japr.2011-00391>

Wageningen Bioveterinary Research
Postbus 65
8200 AB Lelystad
T 0320 23 82 38
info.bvr@wur.nl
wur.nl/bioveterinary-research

Wageningen Bioveterinary Research
Report 2343327

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.200 medewerkers (6.400 fte) en 13.200 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.
