

563

Besluit van 1 oktober 1979 tot vaststelling van het Kokswarenbesluit (Warenwet)

Wij Juliana, bij de gratie Gods, Koningin der Nederlanden, Prinses van Oranje-Nassau, enz., enz., enz.

Op voordracht van Onze Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne van 22 juni 1979, DG Vgz/VA, no. 146386, van Onze Minister van Landbouw en Visserij en van de Staatssecretaris van Economische Zaken, Th. M. Hazekamp;

Overwegende, dat het in het belang van de volksgezondheid wenselijk is gebleken regelen te stellen ten aanzien van kokswaren;

Gelet op artikel 16 van de Warenwet (Stb. 1935, 793);

Gezien de adviezen van de Adviescommissie Warenwet van 31 maart 1978, nr. 12750/(115) en van 12 april 1978, nr. 12750a/(115);

De Raad van State gehoord (advies van 8 augustus 1979, nr. 17);

Gezien het nader rapport van Onze Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne van 5 september 1979, DG Vgz/VA, no. 147009, van Onze Minister van Landbouw en Visserij en van voornoemde Staatssecretaris van Economische Zaken;

Hebben goedgevonden en verstaan:

Artikel 1

In dit besluit en de daarop berustende bepalingen wordt verstaan onder:

- kokswaren*: de waren als bedoeld in de artikelen 3 tot en met 8 van dit besluit;

- gekoeld bewaard*: zodanig bewaard dat de temperatuur van de waar maximaal 7°C bedraagt;

- gekoeld vervoerd*: zodanig vervoerd dat de temperatuur van de waar maximaal 7°C bedraagt;

- diepvriesprocédé*: procédé waarbij een waar zodanig snel wordt bevroren dat het temperatuurtraject van maximale kristallisatie snel wordt doorlopen en, na thermische stabilisatie, in het hart van de waar een temperatuur van -18°C of lager wordt bereikt, waarna zij bij -18°C of lager wordt opgeslagen;

- in diepvries bewaard*: zodanig bewaard dat de temperatuur van de waar maximaal -18°C bedraagt;

- in diepvries vervoerd*: zodanig vervoerd dat de temperatuur van de waar maximaal -18°C bedraagt.

Artikel 2

De in dit besluit bedoelde waren moeten voldoen aan de volgende algemene eisen:

- 1.a. Zij moeten normaal van kleur, geur, smaak en consistentie zijn;
 - b. Zij moeten, indien zij kennelijk – teneinde ze voor consumptie gereed te maken – nog verhit moeten worden, ononderbroken gekoeld dan wel in diepvries bewaard of vervoerd worden, met dien verstande dat de temperatuur:
 - tijdens het gekoeld vervoer naar de detailhandel in de minst koude eenheid gedurende een korte periode maximaal 10°C mag bedragen;
 - tijdens het vervoer in diepvries gedurende een korte periode maximaal –15°C mag bedragen;
 - tijdens het vervoer in diepvries naar de detailhandel in de minst koude eenheid gedurende een korte periode maximaal –12°C mag bedragen;
 - tijdens het bewaren in diepvries in de verkoopmeubels bij de detailhandel in de minst koude eenheid gedurende een korte periode maximaal –12°C mag bedragen;
 - c. Zij mogen, indien zij kennelijk – teneinde ze voor consumptie gereed te maken – niet of niet meer verhit behoeven te worden, niet zodanig worden bewaard dat zij een temperatuur tussen 7°C en 55°C hebben.
2. Indien zij zijn voorzien van een aanduiding «diepvries» of een aanduiding van gelijke strekking, moeten zij volgens het diepvriesprocédé zijn ingevroren en ononderbroken in diepvries bewaard en, indien vervoerd, in diepvries vervoerd worden, met dien verstande dat de temperatuur:
 - tijdens het vervoer gedurende een korte periode maximaal –15°C mag bedragen;
 - van de minst koude eenheid tijdens het vervoer naar de detailhandel gedurende een korte periode maximaal –12°C mag bedragen;
 - van de minst koude eenheid tijdens het bewaren in de verkoopmeubels bij de detailhandel gedurende een korte periode maximaal –12°C mag bedragen.
 3. Zij mogen geen conserveermiddelen bevatten, behalve:
 - a. die genoemd in artikel 7, in de aldaar vermelde waren en tot een maximum van de aldaar vermelde hoeveelheden;
 - b. die, toegelaten in de voor de bereiding van de waar gebruikte grondstoffen, voorzover deze conserveermiddelen uit die grondstoffen afkomstig zijn, en tot een maximum van in totaal 50 mg per kg van de waar;
 - c. azijnzuur en melkzuur.
 4. Het bepaalde in het eerste lid, onder b en c, is niet van toepassing op eetwaren in dit besluit bedoeld, welke zich in een voor micro-organismen ondoordringbare verpakking bevinden en welke een conserverende behandeling hebben ondergaan, waardoor de waar na bewaring gedurende 7 dagen bij 23°C ± 1°C nog voldoet aan de eisen in dit besluit aan die waar gesteld.

Artikel 3

Eetwaren, voorhanden als:

- kroketten, bitterballen, nierbroodjes, bamiballen, nasiballen, loempia's en de met een en ander overeenkomende meelprodukten, eventueel gemengd of gevuld met vlees, pluimveevlees, wild, vis of groenten, of produkten daarvan, die in hun geheel gefrituurd zijn of bestemd zijn om in hun geheel gefrituurd te worden,
- saucijzenbroodjes, palingbroodjes, kaasbroodjes, hambroodjes, tosti's, pizza's en de met een en ander overeenkomende meelprodukten, eventueel gemengd of gevuld met vlees, pluimveevlees, wild, vis of groenten, of produkten daarvan, die in hun geheel gebakken zijn of bestemd zijn om in hun geheel gebakken te worden,
- pasteitjes en de met deze overeenkomende produkten, moeten:
 - a. indien zij kennelijk nog door verhitten voor consumptie moeten worden gereed gemaakt, voldoen aan de volgende eisen:
 - 1°. pathogene micro-organismen en hun toxinen moeten afwezig zijn, met dien verstande, dat coagulase-positieve Staphylococci geacht worden afwezig te zijn, indien het aantal kweekbare micro-organismen van dit type ten hoogste 500 per g bedraagt;

2°. het aantal kweekbare micro-organismen mag, uitgezonderd in waren waarin garnalen, onverhitte groenten of onverhitte taugheh als kenmerkende bestanddelen aanwezig zijn, en in de waren, die micro-organismen bevatten die voor aard of samenstelling noodzakelijk zijn of geweest zijn (zoals kaas-bevattende waren), ten hoogste 1.000.000 per g bedragen;

b. indien zij kennelijk gereed zijn voor consumptie of, teneinde ze voor consumptie gereed te maken, niet meer verhit behoeven te worden, voldoen aan de volgende eisen:

1°. pathogene micro-organismen en hun toxinen moeten afwezig zijn, met dien verstande, dat coagulase-positieve Staphylococci geacht worden afwezig te zijn, indien kweekbare micro-organismen van dit type in 0,1 g van de waar niet aantoonbaar zijn;

2°. het aantal kweekbare micro-organismen mag ten hoogste 10.000 per g bedragen;

3°. kweekbare Enterobacteriaceae mogen in 0,1 g van de waar niet aantoonbaar zijn.

Artikel 4

1. Eetwaren, voorhanden als patates frites en andere voor- en afgebakken aardappelprodukten, met uitzondering van de in artikel 5 bedoelde eetwaren, moeten:

a. indien zij kennelijk nog door verhitten voor consumptie moeten worden gereed gemaakt voldoen aan de eisen, gesteld in artikel 3, onder a;

b. indien zij kennelijk gereed zijn voor consumptie of, teneinde ze voor consumptie gereed te maken, niet meer verhit behoeven te worden, voldoen aan de eisen, gesteld in artikel 3, onder b.

2. Op de in het eerste lid bedoelde eetwaren, voorzover voorhanden als werkvoorraad voorgebakken frites en soortgelijke aardappelprodukten is het bepaalde in artikel 2, eerste lid, onder b en c niet van toepassing.

Artikel 5

1. Eetwaren, voorhanden als chips en soortgelijke aardappelprodukten, alsmede kroepoek en soortgelijke produkten, moeten voldoen aan de eisen, gesteld in artikel 3, onder a, 1°.

2. Op de in het eerste lid bedoelde eetwaren is het bepaalde in artikel 2, eerste lid, onder b en c, niet van toepassing.

Artikel 6

Eetwaren, voorhanden als

– gekookte, gestoomde, voorgebakken of op andere wijze toebeide mie, bami goreng, ravioli, toebeide spaghetti en op overeenkomstige wijze toebeide andere deegwaren '

– gekookte, gestoomde of voorgebakken rijst, nasi goreng of op andere wijze toebeide rijst,

moeten:

a. indien zij kennelijk nog vóór aflevering aan de verbruiker door verhitten voor consumptie moeten worden gereed gemaakt, voldoen aan de eisen, gesteld in artikel 3, onder a;

b. indien zij kennelijk bestemd zijn om na aflevering aan de verbruiker door verhitten voor consumptie te worden gereed gemaakt, voldoen aan de volgende eisen:

1°. de eis, gesteld in artikel 3, onder a, 1°,

2°. het aantal kweekbare micro-organismen mag, uitgezonderd in waren waarin onverhitte taugheh als kenmerkend bestanddeel aanwezig is, ten hoogste 100.000 per g bedragen;

c. indien zij, teneinde ze voor consumptie gereed te maken, niet meer verhit behoeven te worden, voldoen aan de eisen, gesteld in artikel 3, onder b.

Artikel 7

Eetwaren, voorhanden als salades, russisch ei, gevulde tomaat, gevulde paprika en soortgelijke koud te nuttigen waren moeten voldoen aan de volgende eisen:

- a. pathogene micro-organismen en hun toxinen moeten afwezig zijn, met dien verstande dat coagulase-positieve Staphylococci geacht worden afwezig te zijn indien het aantal kweekbare micro-organismen van dit type ten hoogste 500 per g bedraagt;
- b. het aantal kweekbare schimmels en gisten mag in totaal niet hoger zijn dan 10.000 per g, tenzij deze micro-organismen voor de aard van de gebruikte bestanddelen noodzakelijk zijn of zijn geweest;
- c. het aantal kweekbare Enterobacteriaceae mag ten hoogste 1000 per g bedragen;
- d. sorbinezuur, benzoëzuur en de natrium- en calciumzouten daarvan mogen in totaal tot ten hoogste 1000 mg per kg, berekend als sorbinezuur onderscheidenlijk benzoëzuur, aanwezig zijn.

Artikel 8

Eetwaren, voorhanden als zoete of zoetzure waren, welke als dessert plengen te worden genuttigd, zoals pudding mousse en dergelijke opgeklopte waren, weens dessert, bavaroise en soortgelijke koud te nuttigen waren, moeten voldoen aan de volgende eisen:

- a. pathogene micro-organismen en hun toxinen moeten afwezig zijn, met dien verstande dat coagulase-positieve Staphylococci geacht worden afwezig te zijn indien het aantal kweekbare micro-organismen van dit type ten hoogste 500 per g bedraagt;
- b. het aantal kweekbare micro-organismen mag ten hoogste 1.000.000 per g bedragen;
- c. het aantal kweekbare schimmels en gisten mag in totaal ten hoogste 1000 per g bedragen;
- d. het aantal kweekbare Enterobacteriaceae mag ten hoogste 1000 per g bedragen.

Artikel 9

Voor de beoordeling of de in dit besluit bedoelde waren voldoen aan de daaraan gestelde eisen, moet worden gebruik gemaakt van de daartoe vastgestelde methoden van onderzoek, aangegeven in de bij dit besluit gevoegde bijlage.

Artikel 10

1. Dit besluit kan worden aangehaald als «Kokswarenbesluit (Warenwet)».
2. Het treedt in werking met ingang van een jaar na de datum van uitgifte van het Staatsblad waarin het wordt geplaatst.

Lasten en bevelen dat dit besluit met de daarbij behorende nota van toelichting in het Staatsblad zal worden geplaatst en dat daarvan afschrift zal worden gezonden aan de Raad van State.

Soestdijk, 1 oktober 1979

Juliana

De Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne,
L. Ginjaar

De Minister van Landbouw en Visserij,
Van der Stee

De Staatssecretaris van Economische Zaken,
Th. M. Hazekamp

Uitgegeven de *dertigste* oktober 1979

De Minister van Justitie,
J. de Ruyter

Bijlage bij het Kokswarenbesluit (Warenwet)

Methoden van onderzoek, behorende bij het Kokswarenbesluit (Warenwet)

1. BEPALING VAN HET AANTAL AEROOB KWEKBARE MICRO-ORGANISMEN

1.1. Definitie

Onder het aantal aerob kweekbare micro-organismen wordt verstaan het aantal kolonies, dat zich bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per g van de onderzochte waar ontwikkelt in het onder 1.3.1 beschreven medium, voorzover deze kolonies tevens de onder 1.4 beschreven reactie vertonen.

1.2. Verdunning

1.2.1. verdunningsvloeistof

natriumchloride p.a.	8,5	g
pepton	1	g
water (zie 7.1)	1000	ml

Maak een oplossing van de bovenaangegeven samenstelling en steriliseer deze gedurende 20 min. bij 120°C .

1.2.2. werkwijze

Weeg in een adequaat te reinigen en steriele mixer bij voorkeur 20 g doch niet minder dan 10 g van het te onderzoeken materiaal af. Voeg per 5 g toe 45 ml van de onder 1.2.1 genoemde verdunningsvloeistof. Meng gedurende 1,5 min. bij een toerental van ca. 12.000 toeren per minuut (onder belasting).

Bereid zonodig, uitgaande van de aldus verkregen verdunning 1:10, verdere decimale verdunningen door steeds 1 ml in 9 ml verdunningsvloeistof te pipetteren en te mengen.

Een zogenaamde stomacher of soortgelijk apparaat met overeenkomstige werking mag ook worden gebruikt (zelfde mengtijd).

1.3. Telling

1.3.1. medium (zie 7.2)

trypsine-hydrolysaat van caseïne	5	g
gistextractpoeder	2,5	g
glucose	1	g
agar	15	g
water	1000	ml

Los onder verwarming de overige ingrediënten in het water op, breng de pH op $7,0 \pm 0,1$ en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C .

1.3.2. werkwijze

Verricht de bepaling als aangegeven in de meest recente versie van NEN 1507 met 1 ml van enkele passende verdunningen, evenwel onder gebruikmaking van het onder 1.3.1 beschreven medium. Het aantal getelde kolonies, verkregen uit de daartoe meest geschikte verdunning, wordt aangegeven met K.

Verricht, wanneer invloed op het kiemgetal is te verwachten van een zich in verwerkte bestanddelen bevindende functionele Lacto-bacilluaceae-flora, een bevestiging volgens 1.4.

1.4. Bevestiging

1.4.1. reagens

Bereid, onmiddellijk voor het gebruik, een oplossing van de volgende samenstelling:

waterstofperoxyde 30%	10	ml
water	90	ml

1.4.2. uitvoering

Onderzoek, indien van een plaat met 30 of meer kolonies kan worden uitgegaan, ten minste \sqrt{k} van deze kolonies die geheel willekeurig worden gekozen. Blijft in alle volgens 1.3.2 verkregen platen $K < 30$, ga dan uit van de plaat met de meest geconcentreerde verdunning en onderzoek zo mogelijk tenminste 5 kolonies.

Breng van elk voor dit doel geselecteerde kolonie een gedeelte op een afzonderlijk voorwerpglas en bedek dit met enkele druppels van de onder 1.4.1 genoemde oplossing. De reactie is positief wanneer gasontwikkeling optreedt.

Van zeer kleine kolonies kan men zondig tevoren enig bacteriemateriaal aankweken door afstrijken op een plaat of schuingestolde buis met het onder 1.3.1 beschreven medium en bebroeden bij 30°C.

1.5. Berekening en opgave

Indien een bevestiging volgens 1.4 is verricht, volgt het aantal gezochte kolonies per elke onder 1.3.2 genoemde plaat (K') uit de formule:

$$K' = \frac{q}{p} K, \text{ waarin}$$

K = het totaal aantal getelde kolonies

p = het aantal volgens 1.4.2 onderzochte kolonies

q = het aantal daarvan, dat positief is bevonden.

Indien genoemde bevestiging niet is verricht, is uiteraard $K' = K$. Neem het gemiddelde van de beide duplo-waarden en rond dit getal als volgt af:

a. indien het kleiner is dan 100 en geen geheel getal is: op het dichtstbijzijnde veelvoud van 2;

b. indien het groter is dan 100 en niet op 5 eindigt: op het dichtstbijzijnde veelvoud van 10;

c. indien het groter is dan 100 en op een 5 eindigt: op het dichtstbijzijnde veelvoud van 20.

Vindt men van meer dan één verdunning uitgaande een resultaat tussen 30 en 300, dan dient men voor de berekening van de meest geconcentreerde van die verdunningen uit te gaan.

Vermenigvuldig het aldus verkregen getal zondig met de gebruikte verdunningsfactor.

Geef kiemgetallen beneden 100 als zodanig op.

Geef kiemgetallen van 100 of meer als volgt op: $N = a \cdot 10^b$, waarin:

a = een getal met één decimaal, dat kan variëren van 1,0 tot 9,9;

b = een geheel getal, niet kleiner dan 2.

Was het aantal in de plaat, waarop de berekening werd gebaseerd, kleiner dan 5, geef dan op: $N < 50$.

2. GRENSREACTIE OP EN TELLING VAN ENTEROBACTERIACEAE

2.1. Grensreactie (voor het aantonen in een voorgeschreven hoeveelheid)

2.1.1. Definitie

Enterobacteriaceae worden geacht aanwezig te zijn, indien na bebroeding van een mengsel van het desbetreffende medium en 3 porties van 1 ml van de voorgeschreven volgens 2.1.2 bereide verdunning van de te onderzoeken waar, een en ander als beschreven onder 2.1.3, bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$ micro-organismen tot ontwikkeling komen, die bij afstrijken op het onder 2.1.4 genoemde medium kolonies geven die bij bevestiging volgens 2.1.5 het onder 2.1.6 vermelde reactiepatroon vertonen.

2.1.2. Verdunning

Hiervoor zij verwezen naar 1.2.

2.1.3. Ophoping (met voorbebroeding)

2.1.3.1. medium voor de voorbebroeding

pepton	10	g
natriumchloride p.a.	5	g
kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) p.a.	1,5	g
dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	9,0	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten in het water op en breng de pH op $7,0 \pm 0,1$. Vul af in buizen in porties van 15 ml en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C .

2.1.3.2. medium voor de ophoping (zie 7.3)

pepton	10	g
glucose	5	g
dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	8	g
kaliumdiwaterstoffosfaat (KH_2PO_4) p.a.	2	g
gedroogde rundergal	20	g
briljantgroen	15	mg
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten in het water op en breng de pH op $7,2 \pm 0,1$. Vul af in buizen in porties van 15 ml.

Verhit de buizen gedurende 30 min. op 100°C . Verhitting gedurende lange tijd of bij hogere temperatuur is niet nodig en bovendien ongewenst.

2.1.3.3. werkwijze

Breng 1 ml van de vereiste volgens 2.1.2 bereide verdunning in een buis met het volgens 2.1.3.1 bereide medium. Verricht dit in drievoud. Bebroed 16–18 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Breng daarna uit elke buis 0,1 ml over in een buis met 15 ml van het onder 2.1.3.2. genoemde medium. Bebroed deze 3 nieuwe buizen 24 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Strijk daarna uit elk ervan af op het onder 2.1.4 genoemde medium.

2.1.4. Isolatie

2.1.4.1. medium (zie 7.4)

pepton	7	g
gistextractpoeder	3	g
glucose	10	g
natriumchloride p.a.	5	g
galzouten	1,5	g
neutraalrood	30	mg
kristalviolet	2	mg
agar	15	mg
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming tot 100°C in het water op. Koel zodra alles volledig is opgelost af tot ca. 50°C en giet uit in petrischalen van 12 of 15 cm diameter. Een verdere verhitting is niet nodig en bovendien ongewenst. Droog de platen 20 min. bij 55°C of 45 min. bij 37°C, in ieder geval tot zij goed droog zijn.

2.1.4.2. werkwijze

Strijk uit elke onder 2.1.3.3 genoemde buis met ophopingsmedium af op een plaat van het onder 2.1.4.1 genoemde medium, en wel op dusdanige wijze dat aan het eind van de bebroedingsperiode losliggende kolonies zijn te verwachten. Bebroed 18–24 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Onderzoek, indien groei optreedt, enkele losliggende kolonies op de onder 2.1.5 genoemde eigenschappen, waarbij de oxydasereactie (2.1.5.2) dient te worden uitgevoerd met materiaal, gegroeid in buizen volgens 2.1.5.1.

2.1.5. Bevestiging

2.1.5.1. omzetting van glucose

2.1.5.1.1. medium

A. trypsine-hydrolysaat van caseïne	2	g
glucose	10	g
natriumchloride	5	g
dikaliumwaterstoffosfaat (K_2HPO_4) p.a.	0,3	g
broomthymolblauw	80	mg
agar	15	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Breng de pH op $7,1 \pm 0,1$. Vul af in cultuurbuizen in porties van 4 à 5 ml. Steriliseer 20 min. bij 120°C. Plaats de buizen rechtop en laat het medium stollen (zie 7.5.).

B. vleesextractpoeder	1	g
gistextractpoeder	2	g
pepton	5	g
natriumchloride	5	g
agar	15	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Breng de pH op $7,4 \pm 0,1$. Vul af in kolven en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C (zie 7.6).

Pipetteer onder aseptische voorzorgen in elke volgens A bereide buis 4 à 5 ml medium B bovenop het gestolde medium A. Laat stollen als onder A vermeld. De buizen dienen bij 4°C te worden bewaard en zijn dan maximaal 4 dagen houdbaar zonder hun diagnostische effect te verliezen.

2.1.5.1.2. uitvoering

Beënt volgens 2.1.5.1.1 verkregen buizen met het volgens 2.1.4.2 verkregen materiaal door middel van een diepe rechte streek.

Bebroed bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Controleer na 1 en 2 dagen bebroeden.

De reactie is positief (fermentatieve omzetting van glucose), indien door de gehele buis heen geelkleuring door zuurvorming optreedt.

2.1.5.2. reactie op oxydase

2.1.5.2.1. reagens

Bereid onmiddellijk voor het gebruik een oplossing van de volgende samenstelling:

N,N,N',N'-tetramethylparafenyleendiamine 2 HCl	1	g
water	100	ml

De in de handel verkrijgbare kant-en-klare papertjes zijn eveneens bruikbaar. Deze zijn geïmpregneerd met 2 andere reagentia dan het bovengenoemde.

2.1.5.2.2. uitvoering

Breng in een petrischaal een velletje filtreerpapier van 5 cm diameter of van 5 x 5 cm. Breng in het midden daarvan 3 druppels van het onder 2.1.5.2.1 genoemde reagens. Maak vervolgens met een weinig van het bacteriemateriaal, afkomstig van *het oppervlak* van een volgens 2.1.5.1.2 beënte en bebroede buis, op het bevochtigde papier een streep van ten hoogste 5 mm lengte. De reactie wordt als positief beschouwd, indien binnen 5 sec. op de plaats van deze streep een sterke diepblauwe tot purperen kleur ontstaat. Bij te hard wrijven met de naald over het papier kunnen vals positieve reacties ontstaan. Bij gebruik van de kant-en-klare papertjes dient het voorschrift bij de verpakking te worden opgevolgd. Het risico van vals positieve reacties is bij gebruik van deze papertjes minder groot.

Voer als controle de proef ook uit met een *Aeromonas*- of *Pseudomonas*-stam. Deze geven een positieve reactie.

2.1.6. Interpretatie

Enterobacteriaceae vertonen het volgende reactiepatroon:

glucose-omzetting	+	(fermentatief)
oxydase	θ	

Beschouw, indien – uitgaande van elke volgens 2.1.3.3 ingezette buis – één of meer van de onderzochte kolonies dit reactiepatroon vertonen, het resultaat van het onderzoek als positief.

2.2. Telling van Enterobacteriaceae

2.2.1. Definitie

Onder het aantal Enterobacteriaceae wordt verstaan het aantal kolonies dat zich bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per g van de onderzochte waar ontwikkelt in het onder 2.2.3.1 beschreven medium, voorzover deze kolonies tevens het onder 2.1.6 aangegeven reactiepatroon vertonen.

2.2.2. Verdunning

Hiervoor zij verwezen naar 1.2.

2.2.3. Telling

2.2.3.1. medium

Hiervoor zij verwezen naar 2.1.4.1. Giet echter niet uit in petrischalen, doch bewaar het op 100°C verhitte medium op circa 47°C tot aan het gebruik.

2.2.3.2. werkwijze

Gebruik in ieder geval een volgens 2.2.2 bereide verdunning 1:10 en daarnaast zonodig verdere decimale verdunningen, indien verwacht wordt dat alleen in dat geval platen zullen worden verkregen met een aantal specifieke kolonies, gelegen tussen 30 en 300. Gebruik voor elke te onderzoeken verdunning 2 petrischalen van circa 9 cm doorsnede.

Pipetteer in elk van deze schalen 1 ml van de betrokken verdunning. Voeg per petrischaal toe circa 15 ml van het onder 2.2.3.1 genoemde medium, meng en laat stollen. Bedek daarna de agar-laag met een ongeveer even grote hoeveelheid van hetzelfde medium en laat ook dit laagje stollen.

Bebroed de platen gedurende 18–24 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Tel na afloop van deze periode het aantal kolonies dat niet omgeven is door een bleekgele achtergrond, indien deze aanwezig zijn in die platen waarin hun aantal is gelegen tussen 30 en 300. Stel dit aantal gelijk aan K.

2.2.4. Bevestiging

Ga voor de selectie van de te onderzoeken specifieke kolonies te werk als aangegeven onder 1.4.2, eerste alinea. Verricht van de geselecteerde kolonies dezelfde reacties als aangegeven onder 2.1.5. Voor de interpretatie zij verwezen naar 2.1.6.

2.2.5. Berekening en opgave

Het aantal Enterobacteriaceae per elke onder 2.2.3.2 genoemde plaat (K') volgt uit de formule:

$$K' = \frac{q}{p} K, \text{ waarin}$$

K = het totaal aantal getelde kolonies

p = het aantal volgens 2.2.4 onderzochte kolonies

q = het aantal daarvan, dat het onder 2.1.6 beschreven reactiepatroon vertoont.

Neem het gemiddelde van de beide duplo-waarden en ga ook overigens te werk als aangegeven onder 1.5.

3. GRENSREACTIE OP SALMONELLA

3.1. Definitie

Als Salmonella worden beschouwd bacteriën die zich vermeerderd hebben in één der hierna te beschrijven vloeibare media en zich na overenting op het briljantgroen fenolrood agar medium ontwikkelen tot specifieke kolonies die het onder 3.5.7 vermelde reactiepatroon vertonen.

3.2. Media voor de ophoping

3.2.1. niet-selectief medium

Hiervoor zij verwezen naar 2.1.3.1.

3.2.2. selectief medium

Tetrathionaat-bouillon volgens Muller Kauffmann (zie 7.7)

3.2.2.1. basismedium

pepton	4,5	g
gistextractpoeder	1,8	g
vleesextractpoeder	0,9	g
natriumchloride p.a.	4,5	g
calciumcarbonaat (CaCO ₃)	25	g
natriumthiosulfaat (Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O) p.a.	40,7	g
water	1000	ml

Vermeng de ingrediënten onder verwarming met het water, waarbij uiteraad door de aanwezigheid van het calciumcarbonaat geen heldere oplossing ontstaat. Breng de pH op 7,0 ± 0,1 en verhit tot koken. Koel daarna af tot 45°C en vul, na het calciumcarbonaat regelmatig door de vloeistof te hebben verdeeld, af in kolven in porties van 100 ml.

3.2.2.2. jodiumoplossing

jodium p.a.	20	g
kaliumjodide (KI) p.a.	25	g
water	100	ml

Los het kaliumjodide op ca. 50 ml water. Voeg daarna het jodium toe en los op. Vul aan met water tot 100 ml.

3.2.2.3. gal

Bereid een oplossing van de navolgende samenstelling:

gedroogde rundergal	10	g
water	100	ml

Steriliseer gedurende 20 min. bij 115°C.

3.2.2.4. briljantgroenoplossing

Bereid een oplossing van de volgende samenstelling:

briljantgroen (BDH)	100	mg
water	100	ml

Verhit de oplossing gedurende een half uur in een bad met kokend water en gebruik hem dezelfde dag als waarop hij is bereid.

3.2.2.5. bereiding

Bereid kort voor het gebruik op aseptische wijze een mengsel van de bovengenoemde componenten in de hieronder aangegeven verhouding:

basismedium (3.2.2.1)	100	ml
jodiumoplossing (3.2.2.2)	2	ml
gal (3.2.2.3)	5	ml
briljantgroenoplossing (3.2.2.4)	1	ml

3.3. Isolatiemedium (zie 7.8)

vleesextractpoeder	5	g
gistextractpoeder	3	g
pepton	10	g
lactose	10	g
saccharose	10	g
dinatriumwaterstoffosfaat (Na_2HPO_4) p.a.	1	g
natriumdiwaterstoffosfaat (NaH_2PO_4) p.a.	0,6	g
fenolrood	0,09	g
briljantgroen (BDH)	4,7	mg
agar (gezuiverd en snel oplosbaar)	12	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Breng de oplossing aan de kook en laat ten hoogste 1 min. doorkoken. Koel direct af tot 50°C en giet uit in petrischalen van 15 cm doorsnede bij een zodanige temperatuur dat de agar snel in de schalen stolt. Droog de voedingsbodems vóór het gebruik goed (45 min. 37°C).

De pH dient $6,9 \pm 0,1$ te bedragen.

3.4. Werkwijze

Breng 25 g van het monster over in ca. 225 ml van het niet-selectieve vloeibare medium (3.2.1). Bebroed deze vloeistof 16–20 uur bij 37°C en breng daarna 10 ml over in ca. 100 ml tetrathionaatbouillon (3.2.2).

Bebroed de vloeistof gedurende 48 uur bij $42,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Strijk na 18–20 uur en na 48 uur de tetrathionaatbouillon met behulp van een entoog (2,3–3 mm) uit op briljantgroen fenolrood agar-platen (3.3). Bebroed de platen gedurende 18–24 uur bij 37°C en beoordeel ze op het voorkomen van specifiek rode kolonies. Onderzoek enkele van deze kolonies op de onder 3.5 genoemde identificatiereacties. (Indien gewenst, kan naast de briljantgroen fenolrood agar ook een ander isolatiemedium worden gebruikt).

3.5. Identificatie

3.5.1. te verrichten reacties

Strijk zo nodig de te onderzoeken kolonies van de onder 3.4 genoemde selectieve platen nog een keer uit op niet-selectieve selectieve vaste media en bebroed weer 18–24 uur bij 37°C. Voer daarna per oorspronkelijke kolonie, uitgaande van één losliggende nieuwe kolonie, de volgende reacties uit.

- T.S.I.-agar reacties (zie 3.5.2)
- lysinedecarboxylatie (zie 3.5.3)
- ureumsplitsing (zie 3.5.4)
- reactie op β -galactosidase (zie 3.5.5)
- agglutinatie (zie 3.5.6)

3.5.2. T.S.I.-agar

3.5.2.1. samenstelling en bereiding (zie 7.9)

pepton	20	g
gistextractpoeder	3	g
vleesextractpoeder	3	g
glucose	1	g
lactose	10	g
saccharose	10	g
natriumchloride p.a.	5	g
natriumthiosulfaat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,3	g
ijzer(III)citraat ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,3	g
fenolrood	50	mg
agar	12	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Breng de pH op $7,4 \pm 0,1$. Vul af in cultuurbuizen van 160 x 16 mm in porties van 7 ml. Steriliseer 20 min. bij 120°C.

Laat de buizen in schuine stand stollen, doch op dusdanige wijze dat deze, gerekend vanaf de onderkant, over een lengte van ca. 2,5 cm nog geheel met agar zijn gevuld.

Tussen bereiding en gebruik mogen deze buizen niet langer dan 1 week worden bewaard. Wil men ze op een later tijdstip gebruiken, dan dienen ze opnieuw te worden opgesmolten en tenminste 20 min. in een bad met kokend water te worden verhit. Laat ze daarna stollen op de eerder aangegeven wijze.

3.5.2.2. werkwijze

Beënt de volgens 3.5.2.1 verkregen buizen met het te onderzoeken bacteriemateriaal door afstrijken op het oppervlak en steken in het onderste gedeelte («voet») van de buis. Bebroed 1–2 dagen bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$. De waargenomen verschijnselen zijn als volgt te interpreteren:

«voet»:

geel	glucose omgezet
rood of onveranderd	glucose niet omgezet
zwart	vorming van zwavelwaterstof
bellen of scheuren	gasvorming uit glucose

oppervlak:

geel	lactose en/of saccharose omgezet
rood of onveranderd	noch lactose noch saccharose omgezet

3.5.3. lysinedecarboxylatie

3.5.3.1. *medium*

I-lysine, HCl	5	g
gistextract in poedervorm	3	g
glucose	1	g
broomkresolpurper	15	mg
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten in het water op en breng de pH op $7,2 \pm 0,1$. Vul af in de buizen in porties van ca. 5 ml en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C .

3.5.3.2. *werkwijze*

Beënt het onder 3.5.3.1 genoemde medium met het te onderzoeken bacteriemateriaal en bebroed gedurende 24 uur bij $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Een positieve reactie blijkt uit een paarse kleur van het medium, een negatieve uit een gele kleur.

3.5.4. *ureumsplitsing*

3.5.4.1. *medium*

3.5.4.1.1. *oplossing van ureum, voedingsstoffen en indicator*

Bereid een oplossing van de volgende samenstelling:

pepton	1	g
glucose	1	g
natriumchloride	5	g
kaliumdiwaterstoffsfaat (KH_2PO_4) p.a.	2	g
ureum p.a.	20	g
fenolrood	12	mg
water	1000	ml

Los hiertoe eerst onder verwarming het fenolrood in het water op. Koel daarna af en los de overige ingrediënten op. Breng de pH op $6,8 \pm 0,1$ en steriliseer door middel van filtratie.

3.5.4.1.2. *agar*

agar	15	g
water	900	ml

Los de agar onder verwarming in het water op en steriliseer 20 min. bij 120°C .

3.5.4.1.3. *bereiding*

Meng onder aseptische omstandigheden de onder 3.5.4.1.1 genoemde gefiltreerde oplossing met de onder 3.5.4.1.2 genoemde tot ca. 50°C afgekoelde agar. Vul eveneens onder aseptische omstandigheden af in buizen in porties van ca. 7 ml per buis. Leg de buizen in schuine stand en laat de inhoud stollen.

3.5.4.2. *werkwijze*

Beënt het oppervlak van het volgens 3.5.4.1.3 bereide medium met het te onderzoeken bacteriemateriaal door middel van een rechte streep. Bebroed gedurende 1 of 2 dagen bij $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Splitsing van het ureum geeft ammoniakontwikkeling, waardoor de kleur van de indicator fenolrood naar rose en, bij verdergaande reactie, naar rood omslaat.

3.5.5. *reactie op β -galactosidase*

3.5.5.1. *reagens*

3.5.5.1.1. *O.N.P.G.-oplossing*

orthonitrofenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	6	g
dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	2	g
water	1000	ml

Los in het water de overige ingrediënten op, breng de pH op $7,5 \pm 0,1$ en steriliseer de oplossing door middel van filtratie. Bewaar de oplossing bij 4°C en onder afsluiting van licht.

3.5.5.1.2. *peptonwater*

pepton	10	g
natriumchloride (NaCl) p.a.	5	g
water	1000	ml

Los in het water de overige ingrediënten op, breng de pH op $7,5 \pm 0,1$ en steriliseer gedurende 15 min. bij 120°C .

3.5.5.1.3. *bereiding*

Voeg onder aseptische omstandigheden bij elkaar:

O.N.P.G.-oplossing (3.5.5.1.1)	25	ml
peptonwater (3.5.5.1.2)	75	ml

Meng en vul op aseptische wijze af in buizen in porties van 2,5 ml per buis. Het mengsel is 1 maand houdbaar bij 4°C .

3.5.5.2. *werkwijze*

Beënt een volgens 3.5.5.1.3 verkregen buis met het te onderzoeken bacteriemateriaal en bebroed 24 uur bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$. De reactie is positief, indien een gele kleur ontstaat doordat β -galactosidase uit het O.N.P.G. het geel gekleurde orthonitrofenol vrijmaakt. Bij een controleproef met een O.N.P.G.-negatieve bacteriesoort (bijvoorbeeld *Salmonella* of *Proteus hauseri*) moet het reactiemengsel kleurloos blijven.

3.5.6. *serologische reacties* (zie 7.10)

3.5.6.1. *agglutinatie*

Culturen welke voldoen aan de biochemische specificaties voor *Salmonella* (3.5.7) moeten verder onderzocht worden op de aanwezigheid van *Salmonella* O- en/of H-antigenen. Hiertoe wordt een voorwerpglas-agglutinatie uitgevoerd met behulp van *Salmonella* O- en/of H-agglutinerende antisera.

3.5.6.2. *Salmonella O-antigenen*

3.5.6.2.1. *uitvoering van de reactie*

Breng op een zorgvuldig gereinigd voorwerpglas een druppel van een agglutinerende *Salmonella* O-antiserum en een druppel fysiologische zoutoplossing, wrijf in deze druppel een weinig van de te onderzoeken bacteriecultuur, afkomstig van de T.S.I.-agar tot een homogene, matig troebele suspensie ontstaat. Doe hetzelfde in de druppel fysiologische zoutoplossing.

Maak met het voorwerpglas schommelende bewegingen gedurende 30–60 sec. en lees dan de reacties af tegen een donkere achtergrond, bij voorkeur onder gebruikmaking van een loep.

Hebben de bacteriën zich aaneengesloten tot grotere eenheden, dan wordt gezegd dat agglutinatie heeft plaatsgevonden. Ingeval van een positieve agglutinatie dient de druppel antiserum positief en de druppel fysiologische zoutoplossing negatief te zijn. Vindt agglutinatie ook in de druppel fysiologische zoutoplossing plaats, dan heeft men met een auto-agglutinabele stam te maken. In dit geval kan de stam niet serologisch gedetermineerd worden.

3.5.6.2.2. omschrijving van de te gebruiken O-sera

In de handel zijn verschillende Salmonella O-sera te verkrijgen en wel het zogenaamde korte polyvalente serum (omvattende bijvoorbeeld de O-groepen A t/m E) en het zogenaamde lange omnivalente O-serum (omvattende alle tot nu toe bekende O-groepen). Daarnaast zijn groeps- of factorensera B, C, D, E, G, L en het anti-Vi-serum in de handel.

3.5.6.2.3. interpretatie

Indien een negatief resultaat met het omnivalente serum wordt verkregen, is het vrijwel zeker dat men niet met een Salmonellastam heeft te maken. De enige uitzondering bestaat hierin, dat men eventueel met een nieuwe nog niet ontdekte O-groep of met een der T-antigenen heeft te maken.

Indien de cultuur negatief reageert met het korte polyvalente serum, kan geagglutineerd worden met een lang omnivalent serum. Indien deze laatste reactie ook negatief is, heeft men vermoedelijk geen Salmonella geïsoleerd (zie boven). Indien deze laatste reactie positief is, heeft men vermoedelijk een Salmonella geïsoleerd die een O-antigeen heeft dat niet in het korte polyvalente is vertegenwoordigd.

Is de agglutinatie met een der polyvalente sera positief, dan is dit slechts een aanwijzing dat de te onderzoeken cultuur tot het genus Salmonella zou kunnen behoren, een en ander in verband met de talrijke O-antigeen-verbandschappen tussen de genera der familie Enterobacteriaceae. Een nader onderzoek met factorensera en eventueel met een polyvalent H-serum zal dienen te geschieden. Indien de cultuur reageert met een van de factorensera B, C, D, E, G, L of het Anti-Vi-serum luidt de uitslag: Salmonella, behorende tot de B-groep, de C-groep, enz. geïsoleerd. In alle gevallen, ook bij twijfel, dient de stam ter determinatie en eventuele serologische typering naar het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Bilthoven te worden gezonden.

3.5.6.3. Salmonella H-antigenen

3.5.6.3.1. uitvoering van de reactie

Zie 3.5.6.2.1, met dit verschil dat de agglutinerende H-sera (zie 3.5.6.3.2) gebruikt worden en dat de bacteriecultuur uit het vocht onder in de T.S.I.-buis wordt genomen.

3.5.6.3.2. omschrijving van de te gebruiken Salmonella H-sera

In de handel zijn verschillende Salmonella H-agglutinerende antisera verkrijgbaar en wel polyvalente sera, omvattende de meest voorkomende specifieke H-antisera en de specifieke H-antisera afzonderlijk.

3.5.6.3.3. interpretatie

Indien een negatief resultaat met een polyvalent serum wordt verkregen, is de kans groot dat men niet met een Salmonellastam te maken heeft. De enige uitzondering bestaat hierin, dat men met een eventueel nieuw H-antigeen te maken heeft, waarvan het antiserum niet in het polyvalente serum voorkomt of dat men met een te weinig beweeglijke cultuur te maken heeft. Indien een positief resultaat wordt verkregen met polyvalent serum of met een specifiek serum, kan de cultuur Salmonella-positief genoemd worden en dient deze ter nadere typering naar het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Bilthoven te worden gezonden.

3.5.7. interpretatie

Salmonellae vertonen het volgende reactiepatroon:

T.S.I.-glucose (zuurvorming)	+	100%
glucose (gasvorming)	+	92%
lactose	θ	99%
saccharose	θ	99%
zwavelwaterstof	+	92%
lysine-decarboxylatie	+	95%
ureumsplitsing	θ	100%
β-galactosidase reactie	θ	98%
agglutinatie (zie 3.5.6.2.3 en 3.5.6.3.3)		
+ = positief		
θ = negatief.		

De cijfers in de rechter kolom geven het percentage aan dat bij een bepaald onderzoek van een groot aantal stammen (W. H. Ewing and M. M. Ball, The biochemical reactions of numbers of the genus *Salmonella* (1966)) het resultaat gaf als in de middelste kolom (+ of θ) aangegeven (bijvoorbeeld lysinedecarboxylatie: 95% van de stammen +, derhalve 5% θ).

4. GRENSREACTIE OP EN TELLING VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

4.1. Grensreactie (voor het aantonen in een voorgeschreven hoeveelheid)

Hiervoor is nog een methode in bewerking.

4.2. Telling van *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Definitie

Onder het aantal bacteriën van de soort *Staphylococcus aureus* wordt verstaan het aantal specifieke kolonies dat zich bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per g van de onderzochte waar ontwikkelt op het onder 4.2.3.1 genoemde medium, voorzover deze kolonies tevens de onder 4.2.4 aangegeven reactie vertonen.

4.2.2. Verdunning

Hiervoor zij verwezen naar 1.2.

4.2.3. Telling

4.2.3.1. medium

4.2.3.1.1. basismedium (zie 7.11)

trypsiene-hydrolysaat van caseïne	10	g
vleesextractpoeder	5	g
gistextractpoeder	1	g
natriumpyruvaat	10	g
glycine	12	g
lithiumchloride (LiCl) p.a.	5	g
agar	20	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Breng de pH op $6,8 \pm 0,1$. Steriliseer gedurende 15 min. bij 120°C en koel af tot ca. 50°C .

4.2.3.1.2. tellurietoplossing

kaliumtelluriet (K_2TeO_3) p.a.	1	g
water	100	ml

Bereid een oplossing van de bovenaangegeven samenstelling en steriliseer deze door middel van filtratie. Gebruik de oplossing onmiddellijk of ten hoogste 1 week na de bereiding en bewaar hem in het laatste geval bij 4°C .

4.2.3.1.3. *eidooieremulsie*

Gebruik hiervoor bij voorkeur een in de handel in steriele vorm verkrijgbaar gestandaardiseerd preparaat met ca. 20% dooier.

4.2.3.1.4. *bereiding*

Voeg per 100 ml van het onder 4.2.3.1.1 genoemde tot ca. 50°C afgekoelde basismedium toe:

1 ml van de onder 4.2.3.1.2 genoemde tellurietoplossing;

5 ml van de onder 4.2.3.1.3 genoemde eidooieremulsie.

Meng door zwenken de toevoegingen door het basismedium heen en giet onmiddellijk daarna uit in petrischalen van 12 of 15 cm diameter, in porties van resp. 25 en 40 ml. Laat stollen. Droog de platen vóór het gebruik tenminste 20 min. bij 55°C of 45 min. bij 37°C, in elk geval tot ze goed droog zijn.

Gebruik de gegoten platen onmiddellijk of ten hoogste 24 uur na de bereiding.

4.2.3.2. *werkwijze*

Gebruik in ieder geval een volgens 1.2 bereide verdunning 1 : 10 en daarnaast zondig verdere decimale verdunningen, indien verwacht wordt dat alleen in dat geval platen zullen worden verkregen met een aantal specifieke kolonies gelegen tussen 30 en 300. Gebruik voor elke te onderzoeken verdunning 2 van de volgens 4.2.3.1.4 bereide platen.

Pipetteer op elk van deze platen 0,1 ml van de betrokken verdunning en verdeel de suspensie met een steriele Drigalskispatel gelijkmatig over de agar.

Bebroed de platen gedurende 30–40 uur bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en tel na afloop van deze periode het aantal specifieke kolonies, indien deze aanwezig zijn op die platen waarop hun aantal gelegen is tussen 30 en 300. Stel dit aantal gelijk aan K.

Specifieke kolonies kunnen het volgende uiterlijk hebben:

- a. gitzwart, glanzend en bol, met veelal rondom zich een heldere hof waarbinnen zich een doffe hof kan bevinden;
- b. grijszwart, glanzend en bol. In dat geval is de onder a genoemde heldere hof steeds aanwezig.

4.2.4. *Bevestiging*

4.2.4.1. *kweken van het materiaal*

4.2.4.1.1. *medium (zie 7.12)*

aftreksel van kalfshersenen in droge vorm	12,5	g
aftreksel van runderhart in droge vorm	5	g
enzymatisch verteerd vers vlees	10	g
glucose	2	g
natriumchloride p.a.	5	g
dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	2,5	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten in het water op en breng de pH op $7,4 \pm 0,1$. Vul af in cultuurbuizen in porties van 5 ml en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C.

4.2.4.1.2. *uitvoering*

Ga voor de selectie van de te onderzoeken specifieke kolonies te werk als aangegeven onder 1.4.2, eerste alinea. Ent elke geselecteerde kolonie over in een buis met het onder 4.2.4.1.1 aangegeven medium.

Bebroed gedurende 18–24 uur bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en verricht daarna de onder 4.2.4.2 aangegeven reactie.

4.2.4.2. *coagulasereactie*

4.2.4.2.1. *oplossen van het plasma*

Pipetteer 3 ml steriel gedestilleerd water in een flesje lyofiel gedroogd coagulaseplasma (niet met citraat gestabiliseerd). Los op door schudden. Dit gereconstitueerde plasma is niet houdbaar en dient dezelfde dag te worden gebruikt.

4.2.4.2.2. *uitvoering*

Pipetteer porties van 0,5 ml van de volgens 4.2.4.2.1 verkregen oplossing in steriele agglutinatiebuisjes.

Breng van elke volgens 4.2.4.1.2 verkregen goed gegroeide cultuur 0,1 ml in een buisje als in de vorige zinsnede genoemd. Plaats de buisjes bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Controleer na 1 uur, na 3 uur en maximaal na 6 uur. Bij een positieve reactie is het plasma geheel gestold; bij een negatieve reactie vindt geen of slechts gedeeltelijke stolling plaats.

4.2.5. *Berekening en opgave*

Hiervoor zij verwezen naar 1.5. Evenwel dient de verkregen waarde van K' met een extra factor van 10 te worden vermenigvuldigd, daar per plaat slechts 0,1 ml verdunning werd gebruikt.

5. BEPALING VAN HET AANTAL KWEKBARE SCHIMMELS EN GISTEN

5.1. Definitie

Onder het aantal kweekbare schimmels en gisten wordt verstaan het aantal specifieke kolonies dat zich bij $24 \pm 1^\circ\text{C}$ per g van de onderzochte waar ontwikkelt in het onder 5.3.1 beschreven medium.

5.2. Verdunning

Hiervoor zij verwezen naar 1.2.

5.3. Telling

5.3.1. *medium*

5.3.1.1. *basismedium*

gistextractpoeder	5	g
glucose	20	g
agar	20	g
water	1000	ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op, breng de pH op $6,5 \pm 0,1$ en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C .

5.3.1.2. *oxytetracycline-oplossing*

oxytetracycline HCl	50	mg
water	50	ml

Los de oxytetracycline HCl op door het water geleidelijk in kleine porties en onder voortdurend schudden en roeren aan het poeder toe te voegen. Druk grote delen, die zich niet snel genoeg in het water verdelen, fijn met een glazen staaf. Laat niet-opgeloste deeltjes gedurende korte tijd bezinken en steriliseer vervolgens de bovenstaande vloeistof door middel van filtratie.

Het antibioticum is tevens in steriele toestand in oplossing in ampullen verkrijgbaar. Open, bij gebruik daarvan, deze ampullen op aseptische wijze en verdun met steriel water tot de bovenaangegeven concentratie.

De aldus verkregen oplossing dient in de koelkast bewaard te worden en is dan enige weken houdbaar. Een lichte verkleuring duidt niet op wijziging van de activiteit.

5.3.1.3. bereiding

Voeg onder aseptische voorzorgen onmiddellijk vóór het gebruik per 100 ml van het opgesmolten en tot ca. 50°C afgekoelde basismedium (5.3.1.1) toe 10 ml van de onder 5.3.1.2 genoemde oxytetracycline-oplossing en meng.

5.3.2. werkwijze

Gebruik in ieder geval een volgens 5.2 bereide verdunning 1 : 10 en daarnaast zo nodig verdere decimale verdunningen, indien verwacht wordt dat alleen in dat geval platen zullen worden verkregen met een aantal specifieke kolonies gelegen tussen 10 en 100. Pipetteer 1 ml van elke te onderzoeken verdunning in elk van 2 petrischalen (diameter tenminste 12 cm), voeg toe 15–25 ml van het tot ca. 45°C afgekoelde volgens 5.3.1.3 bereide medium (hoeveelheid afhankelijk van de gebruikte petrischaal), meng en laat stollen.

Bebroed de platen bij $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Tel na 2, 3, en 5 dagen en noteer voor elke plaat het hoogste van de aldus verkregen resultaten.

Houd er rekening mee, dat sporen, afkomstig van eerder gegroeide schimmelkolonies, die zich over de platen hebben verspreid, na 5 dagen tot groei van secundaire kolonies kunnen leiden. De laatste dienen uiteraard niet te worden meegeteld.

Ga bij twijfel hieromtrent microscopisch na of op gistkolonies gelijkende kolonies ook inderdaad uit gisten bestaan.

5.4. Berekening en opgave

Neem het gemiddelde van de beide volgens 5.3.2 gevonden duplo-waarden en rond dit getal af als onder 1.5 aangegeven. Ga ook voor de verdere berekening en opgave te werk als aldaar vermeld.

6. MICROBIOLOGISCHE ORIËNTATIE OMTRENT CONSERVEERMIDDELEN

6.1. Definitie

Conserveermiddel wordt voorlopig geacht aanwezig te zijn, indien rondom een met extract van de te onderzoeken waar geïmpregneerd schijfje papier bij bebroeding op een met *Bacillus subtilis* beënte agarplaat gedurende 18–20 uur bij 30°C, als beschreven in 6.4.3, een heldere zone ontstaat terwijl de rest van de plaat troebel wordt.

6.2. Media en verdere benodigdheden

6.2.1. kweekmedium voor *Bacillus subtilis* ATCC 6633

vleesextract	3	g
pepton	5	g
agar	15	g
water	1000	ml

Maak een oplossing van de bovenaangegeven samenstelling, breng de pH op $6,8 \pm 0,1$ en steriliseer gedurende 20 min. bij 120°C.

6.2.2. suspensievloeistof voor *Bacillus subtilis*

Hiervoor zij verwezen naar 1.2.

6.2.3. extractievloeistof voor de conserveermiddelen

6.2.3.1. citroenzuuroplossing

citroenzuur ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	21	g
water	1000	ml

6.2.3.2. fosfaatoplossing

dinatriumwaterstoffosfaat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	17,8	g
water	1000	ml

6.2.3.3. bereiding

Voeg de beide bovengenoemde oplossingen in dusdanige hoeveelheid bij elkaar, dat een pH-waarde van $5,0 \pm 0,1$ wordt verkregen.

6.2.4. medium voor het aantonen

Hiervoor zij verwezen naar 1.3.1. Vul af in buizen à 5 ml per buis.

6.2.5. schijfjes filtreerpapier

Pons uit vellen dik filtreerpapier schijfjes met een diameter van 12,7 mm. De schijfjes zijn ook als zodanig in de handel verkrijgbaar.

6.3. Voorbereiding

6.3.1. het aanhouden van de bacteriecultuur

Ent de stam van *Bacillus subtilis* ATCC 6633 regelmatig over op het onder 6.2.1 genoemde schuingestolde medium. Kweek aanvankelijk bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en bewaar de cultuur daarna bij 4°C .

6.3.2. het bereiden van de sporesuspensie

Maak een zichtbaar troebele suspensie van het volgens 6.3.1 verkregen materiaal in de onder 6.2.2 genoemde vloeistof en beënt hiermede door overgieten een aantal platen met het onder 6.2.1 genoemde medium. Bebroed deze platen 7 dagen bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Breng vervolgens op elke plaat 5 ml van de onder 6.2.2 genoemde vloeistof en suspendeer daarin met behulp van een steriele entnaald het gegroeide bacteriemateriaal. Verzamel dit materiaal tot één hoeveelheid in een met steriele glaskralen voorziene steriele fles met schroefdoop, schud gedurende 5 min. op een schudapparaat en verhit gedurende 10 min. bij $80 \pm 1^\circ\text{C}$. Tel het aantal sporen op de wijze als aangegeven onder 1, daarbij echter gebruikmakend van het onder 6.2.1 genoemde medium. Breng de suspensie over in een steriel stopflesje.

Wil men de sporen langdurig bewaren zonder dat noemenswaardig verlies optreedt, dan dient men in plaats van de onder 6.2.2 genoemde vloeistof voor het suspenderen $\frac{1}{4}$ Ringer-vloeistof te gebruiken. Bewaar steeds bij ca. 5°C .

6.4. Werkwijze

6.4.1. het vervaardigen van de platen

Verdun de volgens 6.3.2 bereide sporesuspensie tot een concentratie van ca. 10^5 sporen per ml. Breng voor elke te gieten plaat 0,5 ml van deze suspensie in 5 ml van het onder 6.2.4 genoemde opgesmolten en tot ca. 50°C afgekoelde medium, meng, giet uit in verwarmde petrischalen met een diameter van 9 cm en laat stollen.

Desgewenst kunnen ook petrischalen met een andere diameter worden gebruikt, mits hiermee bij de hoeveelheid rekening wordt gehouden, zodat dezelfde laagdikte wordt verkregen.

6.4.2. het extraheren van de conserveermiddelen

Meng in een mixer het te onderzoeken monster met zo weinig mogelijk van de onder 6.2.3 genoemde extractievloeistof. Hiertoe is maximaal nodig een hoeveelheid gelijk aan 2 maal de afgewogen hoeveelheid monster, doch meestal veel minder.

Breng de pH van het mengsel op $\text{pH} = 5,0 \pm 0,1$ en centrifugeer bij 100 g. Indien reeds bij de extractie voldoende vrij vocht wordt verkregen, kan het centrifugeren achterwege worden gelaten.

6.4.3. uitvoering van de proef

Houd een schijfje van het onder 6.2.5 genoemde papier met behulp van een met 70% zuivere ethanol gereinigd pincet met de rand juist in de te onderzoeken vloeistof, zodat het schijfje zich snel daarmee volzuigt. Breng het schijfje over op een volgens 6.4.1 vervaardigde plaat en druk het zachtjes aan.

Verricht ter controle hetzelfde met een schijfje dat met de volgens 6.2.3 bereide extractievloeistof wordt geïmpregneerd.

Op één plaat kunnen op deze wijze ten hoogste 4 schijfjes worden aangebracht, waarvan één geïmpregneerd met alleen de extractievloeistof. Bebroed de platen gedurende 18–20 uur bij $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Conserveermiddelen worden voorlopig geacht aanwezig te zijn, indien zich na afloop rondom het betreffende schijfje een vrijwel concentrische heldere zone van tenminste 1 mm heeft gevormd, terwijl de rest van de plaat troebel is. Rond de controleschijfjes mag geen zone te zien zijn. Dit laatste is een gevolg van eventueel remmende stoffen in het papier, die ook aanleiding kunnen geven tot heldere lobben die niet het gehele papier omgeven.

7. OPMERKINGEN

7.1. Waar in deze Methoden van Onderzoek sprake is van water kan gebruikt worden hetzij gedemineraliseerd water, hetzij uit glas gedestilleerd water.

7.2. Het eerste ingrediënt is in de handel verkrijgbaar, bijvoorbeeld onder de namen «trypton» of «trypticase». Het gehele medium is in gedroogde vorm, met mogelijk een iets andere hoeveelheid agar, in de handel verkrijgbaar onder de naam «plate count agar».

7.3. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «E.E.-broth».

7.4. Het in gedroogde vorm met mogelijk een iets andere hoeveelheid agar in de handel verkrijgbare «violet red bile dextrose agar», dat naast de genoemde ingrediënten 10 g lactose per l bevat, kan hiervoor worden gebruikt. In de handel is tevens onder de naam «violet red bile agar» een medium verkrijgbaar, dat een analoge samenstelling vertoont. Het bevat echter alleen lactose. Dit medium kan ook worden gebruikt, mits per liter 10 g glucose wordt toegevoegd.

7.5. Soortgelijke media, maar zonder glucose en met minder agar zijn in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder namen als «OF basal medium». Deze zijn te gebruiken, mits de ontbrekende ingrediënten worden toegevoegd resp. aangevuld.

7.6. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «nutrient agar».

7.7. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «tetrathionate broth base».

7.8. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «brillant green agar (modified)».

7.9. Media van deze en analoge evenzeer bruikbare samenstelling zijn in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «triple sugar iron agar». Desgewenst kan ook de in de handel verkrijgbare «Kligler agar» worden gebruikt. Deze verschilt in samenstelling met triple sugar iron agar in dit opzicht, dat ze geen saccharose bevat. Dit dient dus afzonderlijk te worden toegevoegd.

7.10. De betreffende sera zijn verkrijgbaar bij het RIV in Bilthoven.

7.11. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «Baird-Parker-medium».

7.12. Dit medium is in gedroogde vorm in de handel verkrijgbaar onder de naam «brain heart infusion». Enzymatisch verteerd vers vlees is verkrijgbaar onder de naam «proteose peptone».

Ons bekend,

De Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne,
L. Ginjaar

De Minister van Landbouw en Visserij,
Van der Stee

De Staatssecretaris van Economische Zaken,
Th. M. Hazekamp

NOTA VAN TOELICHTING

Bijgaand ontwerp-Kokswarenbesluit (Warenwet) heeft ten doel, in het belang van de volksgezondheid voorschriften te geven met betrekking tot de microbiologische gesteldheid van bepaalde categorieën eetwaren, die beïnvloed kan worden door de wijze van bereiding en bewaring.

De voorschriften zullen ertoe moeten bijdragen dat in bedrijven, die zich met de bereiding van en de handel in bedoelde waren bezighouden, bepaalde essentiële normen van een hygiënische bedrijfsvoering in acht worden genomen.

Artikel 1 geeft een aantal omschrijvingen van begrippen, die in het besluit worden gehanteerd.

Artikel 2 geeft een aantal algemene eisen, waaraan de in het besluit bedoelde waren moeten voldoen.

De eisen, bedoeld in het eerste en tweede lid, hebben betrekking op de omstandigheden waaronder de in het besluit bedoelde eetwaren met het oog op hun microbiologische gesteldheid dienen te worden bewaard of vervoerd. In het derde lid worden de uitzonderingen vermeld op het algemeen voor bedoelde eetwaren geldende verbod van de toepassing van conserveermiddelen.

Dit verbod berust op het standpunt dat de goede microbiologische hoedanigheid waarin kokswaren behoren te verkeren, in principe verzekerd dient te worden door in hygiënisch opzicht zorgvuldige bereiding, bewaring, behandeling en vervoer en niet door toepassing van conserveermiddelen.

In de *artikelen 3 tot en met 8* worden de verschillende typen eetwaren vermeld, waarop het besluit betrekking heeft. Wat artikel 8 betreft, zij erop gewezen dat in dit artikel niet die waren worden begrepen, welke gerangschikt worden onder het Melkbesluit (Warenwet), zoals vla, het Consumptie-ijsbesluit (Warenwet), zoals roomijs en het Kaasbesluit (Warenwet), zoals kwark met vruchten. Aangezien het niet mogelijk is om de zeer uiteenlopende samenstelling van de desbetreffende waren aan te geven, worden de waren vermeld onder de benamingen die in de handel gebruikelijk zijn, waarbij de soortgelijke of daarmee overeenkomende eetwaren, voor wat hun aard of samenstelling betreft, tot de desbetreffende typen worden gerekend. Voor de verschillende typen eetwaren gelden verschillende microbiologische eisen, die afgestemd zijn op de aard, samenstelling en de omstandigheden waaronder zij aan de consument worden afgeleverd.

De in *artikel 10, tweede lid*, bedoelde datum van inwerkingtreding, namelijk één jaar na de datum van uitgifte van het betreffende Staatsblad, is voornamelijk gekozen om de eigenaren van koelmeubels, welke onvoldoende koelcapaciteit bezitten om de in dit besluit bedoelde waren op de voorgeschreven temperatuur te houden, een behoorlijke tijdslimiet te geven voor het vernieuwen of aanpassen van de kostbare apparatuur.

De Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne,
L. Ginjaar

De Minister van Landbouw en Visserij,
Van der Stee

De Staatssecretaris van Economische Zaken,
Th. M. Hazekamp