

Afdeling Microscopie 1983-06-21  
Rapport 83.53 Pr.nr. 505.0020

Onderwerp: Een kwaliteitsbeoordeling van  
gehakt door middel van histologisch, his-  
tometrisch en histobacterioscopisch on-  
derzoek.

Bijlagen: diverse

Verzendlijst:

directeur, directie VKA, sectorhoofd (2x), afdeling Microscopie (3x),  
projectbeheer, afd. Normalisatie (Humme), projectleider, afdeling  
Eiwitchemie, afdeling Microbiologie



Projekt: Ontwikkeling van microscopische en andere optische onderzoeksmethoden voor diverse landbouw- en visserijproducten.

Onderwerp: Een kwaliteitsbeoordeling van gehakt door middel van histologisch, histometrisch en histobacterioscopisch onderzoek.

Bijlagen: Statistische verwerking

Voorgaand verslag: 82.95

---

Doel:

Een kwaliteitsbeoordeling van gehakt met behulp van histologisch, histometrisch en bacterioscopisch onderzoek.

Samenvatting:

Bij de kwaliteitsbeoordeling van 46 monsters rauw gehakt, half om half, werden 3 onderzoeksmethoden toegepast:

1. door middel van een histologische/microscopische analyse werd een onderzoek ingesteld naar de weefsel- en orgaansamenstelling van het gehakt;
2. door middel van een histometrische analyse werd de verhouding collageen bindweefsel/dwarsgestreept spierweefsel vastgesteld van het gehakt;
3. door middel van een bacterioscopische analyse werd een onderzoek ingesteld naar het aantal en de ligging van bacteriën en kiemophoringen (z.g. kiemnesten) in het gehakt.

Conclusies:

Uit het onderzoek blijkt dat het gehakt door middel van histologisch, histometrisch en bacterioscopisch onderzoek kwalitatief te beoordelen is. Door middel van histologisch onderzoek kan men nevenbestanddelen naast de hoofdbestanddelen (spierweefsel, bindweefsel en vet) goed aantonen.

Niet vast te stellen was dat het gehakt zowel van runder- als varkensweefsels afkomstig was.

Door middel van histometrisch onderzoek kan men de verhouding collageen bindweefsel/dwarsgestreept spierweefsel vaststellen. Er bleek een positieve correlatie te bestaan tussen het collageen bindweefselvolumepercentage (histometrisch bepaald) en het chemisch bepaalde bindweefselgehalte (uit het hydroxyprolinegehalte).

Door middel van het bacterioscopisch onderzoek is het mogelijk om een indicatie te geven over de deugdelijkheid (microbiologische gesteldheid) van het gehakt. Het blijkt echter dat tevens een microbiologische bepaling van het kiemgetal noodzakelijk is om de kwaliteit juist te kunnen beoordelen.

Uit het onderzoek kan men concluderen dat het gehakt in het algemeen van goede kwaliteit is.

---

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong *af*  
Medewerkers/samenstellers: J.S. Ossenkoppele en J.J.M. Vliege *J*  
Projectleider: drs W.J.H.J. de Jong *af*

1. Inleiding
  - 1.1. Het histologisch onderzoek
  - 1.2. Het histometrisch onderzoek
  - 1.3. Het histobacterioscopisch onderzoek
  
2. Materiaal en methoden
  - 2.1. Voorbereiding van het monstermateriaal
  - 2.2. Histologisch onderzoek op weefselsamenstelling
  - 2.3. Histometrisch onderzoek op volumepercentage collageen bindweefsel
  - 2.4. Bacterioscopisch onderzoek op de aanwezigheid van bacteriën en gisten
  
3. Resultaten en discussie
  - 3.1. Histologisch onderzoek op weefselsamenstelling
  - 3.2. Histometrisch onderzoek op volumepercentage bindweefsel
  - 3.3. Bacterioscopisch onderzoek op de aanwezigheid van bacteriën en gisten
  
4. Conclusies
  
5. Literatuur
  
6. Bijlagen

## 1. Inleiding.

### 1.1 Het histologisch onderzoek

De histologische techniek beoogt weefsels en organen geschikt te maken voor microscopisch onderzoek. Deze techniek omvat onder meer het fixeren van het monstermateriaal, het snijden van coupes hiervan (weefselplakjes van 5 tot 10  $\mu\text{m}$  dik) en het kleuren van deze coupes met behulp van speciale kleurstoffen (4, 19, 20). Door middel van histologisch/microscopisch onderzoek van deze preparaten is het mogelijk om de weefselsamenstelling van het te onderzoeken materiaal vast te stellen, zoals spierweefsel, vetweefsel, bindweefsel, zenuwweefsel etc. Ook is het mogelijk om bepaalde organen te identificeren zoals nier, lever, hart, long, milt etc. (12, 19).

### 1.2 Het histometrisch onderzoek

Histometrisch onderzoek van vleesprodukten maakt een objectieve bepaling van volumepercentages van weefselbestanddelen mogelijk. Het doel van het histometrisch onderzoek is dus een kwantitatieve microscopische analyse, waarbij de verhouding tussen verschillende weefselcomponenten (in volumepercenten) wordt vastgesteld (7, 9). Aangezien de kwaliteit van vleesprodukten onder meer bepaald wordt door het gehalte aan bindweefsel (pees, zwoerd e.d.) is door Kotter (16) en Prändl (18) een kwantitatieve histologische techniek ontwikkeld, waarbij de vet- en waterige substantie wordt verdeeld in een collageen en niet collageen gedeelte. Het bindweefselvolumepercentage bepaalt hierbij de kwaliteit waartoe het gehakt moet worden gerekend (22). Met behulp van een integratieoculair is het mogelijk de verhouding collageen bindweefsel/dwarsgestreept spiefweefsel te bepalen (9).

### 1.3 Het histobacterioscopisch onderzoek

Bij het onderzoek naar de deugdelijkheid (microbiologische gesteldheid) van gehakt kan worden gebruik gemaakt van histobacterioscopische methoden, waarbij weefselcoupes na een bacteriekleuring worden beoordeeld en de kiemrijkheid van de te onderzoeken monsters kan worden bepaald (24, 28).

Uiteraard kan het kiemgetal ook volgens de gebruikelijke microbiologische methoden worden bepaald. De bacterioscopische methode is echter een snelle methode om een indruk van het aantal en de ligging van de bacterien te verkrijgen (3, 6, 24, 28).

## 2. Materiaal en methoden.

### 2.1 Voorbereiding van het monstermateriaal

Er werden 46 monsters rauw gehakt (half om half) histologisch onderzocht. Deze monsters werden onderzocht in het kader van een uitgebreid chemisch onderzoek voor een consumentenorganisatie. Uit ieder monster werd op 4 verschillende plaatsen een submonster getrokken met een diameter van 1 à 2 cm. Het submonster werd zo snel mogelijk gefixeerd in 10% formaline (4, 19, 20). Vervolgens vond ontwatering en inbedden in paraffine op de gebruikelijke wijze plaats (verslag 82.95). Na het snijden van de coupes van 5 tot 10  $\mu$ m dik op de rotatiemicrotoom, werden deze op schone objektglaasjes gebracht. Na deparaffinatie zijn de coupes geschikt voor de gewenste kleuring.

### 2.2 Histologisch onderzoek op weefselsamenstelling.

Vier preparaten werden per monster gekleurd met haemaluin-eosine (H.E.-kleuring volgens Mayer) (Zie verslag 82.95).

Resultaat van deze kleuring:

kernen, kraakbeen, kalk, kiemen: blauwrood

overige plasmastructuren en gelatine: roserood

erythrocyten (bloedstolsels): oranjegeel

plantaardige weefsel (o.a. kruiden): geelbruin (afwijkend van dierlijk weefsel)

T.V.P. (getextureerde soja): herkenbaar aan oxalaatkristallen en dragercellen.

Voor het aantonen van zetmeel werd een kleuring met lugol toegepast (lugol: 2 g kaliumjodide, 1 g jodium, 5 ml demiwater, aangevuld tot 300 ml). Zetmeel kleurt donkerblauw (10).

### 2.3 Histometrisch onderzoek op volumepercentage collageen bindweefsel

De preparaten werden gekleurd volgens de Weigert-van Giesonkleuring (20). De kleuring werd als volgt uitgevoerd:

- 4 minuten kleuren in Weigerts haematoxyline
- 10 minuten spoelen in stromend leidingwater
- 3 minuten in van Gieson kleurmengsel
- 15 sec spoelen in leidingwater
- 15 sec in alcohol 70%
- 1 minuut in alcohol 96%
- 1 minuut in alcohol 100%
- 1 minuut in alcohol 100%
- 1 minuut in xyleen
- 1 minuut in xyleen

Coupes insluiten met Entellan.

Samenstelling van de kleuroplossingen:

#### Weigert haematoxyline

- oplossing A: 10 gram haematoxyline oplossen om 1000 ml alcohol 96%
- oplossing B: 40 ml waterige oplossing van ferrichloride 29% oplossen in gedemineraliseerd water. Daarna 10 ml zoutzuur 25% toevoegen.

Voor gebruik gelijke delen Weigert A en B mengen, daarna filtreren. Weigert A en B zijn apart jarenlang houdbaar. Gemengd zijn ze echter maar dagen houdbaar.

#### Van Gieson kleurmengsel

- 80 ml 1% waterig zure fuchsine oplossen in gedemineraliseerd water
  - 800 ml waterige verzadigde pikrinezuuroplossing ( $\pm$  2,5 g)
- Voor gebruik filtreren.

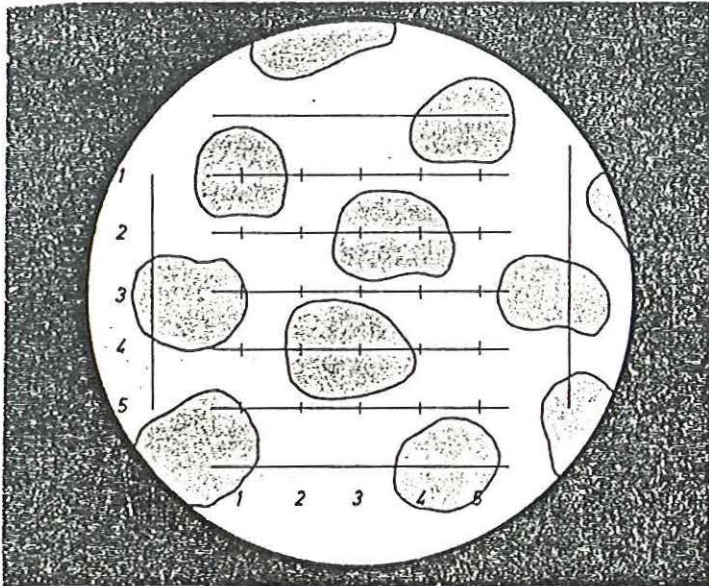
Het resultaat van deze kleuring:

- kernen : bruinzwart
- bindweefsel : roodpaars
- spierweefsel, protoplasma : geelbruin.

De Weigert- van Gieson-kleuring is in dit geval gekozen omdat deze kleuring beter geschikt is voor bindweefselkleuringen bij rauwe produkten.

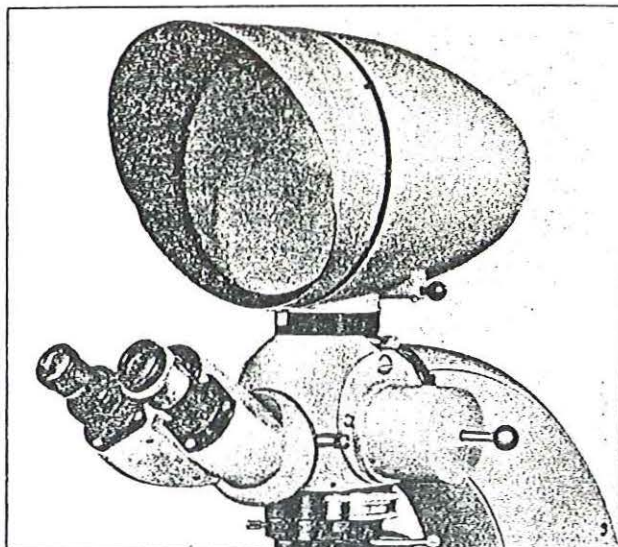


Bij verhitte produkten wordt de azankleuring toegepast (14, 22). De histometrische bepaling van de volumeverhouding van spierweefsel en bindweefsel werd uitgevoerd met het integratieoculair I van Zeiss volgens Hennig (7).



Afbeelding 1. Integratieoculair I (Zeiss) met 25 meetpunten.

In het oculair bevindt zich een sjabloon met 25 meetpunten, die op een afstand van 1,6 mm gerangschikt zijn, zowel in horizontale als in verticale richting (11). Dit sjabloon werd met "sheet"papier overgebracht op het scherm van een cytoscoop (Zeiss projectieopzet) (zie afbeelding 2). Het tellen op dit scherm is minder vermoeiend en gaat daardoor sneller. De vergroting bedraagt 100 x.



Afbeelding 2. Cytoscoop op een microscoop (Zeiss projectieopzet).

Per coupe werden minimaal 20 gezichtsvelden geanalyseerd en per monster tenminste 4 coupes beoordeeld, waarbij 100 "treffers" per coupe werden genoteerd. Onder een "treffer" wordt verstaan het samenvallen van een van de 25 meetpunten met een weefselbestanddeel resp. collageen bindweefsel en dwarsgestreept spierweefsel in het preparaat. Bij het opmeten worden dus telkens de spierweefsel- en bindweefselcomponenten, die zich onder de 25 meetpunten bevinden, als "treffers" geregistreerd, waarna men het preparaat 9,6 mm - dus een gezichtsveld - opschuift. De verhouding van het aantal "treffers" dwarsgestreept spierweefsel/collageen bindweefsel komt overeen met de verhouding van hun volumina (7, 9).

#### 2.4 Bacterioscopisch onderzoek op aanwezigheid van bacteriën en gisten

De preparaten werden gekleurd volgens de Löffler's methyleenblauwkleuring. De kleuring werd als volgt uitgevoerd:

- 30 sec kleuren in Löffler's methyleenblauw
- 15 sec spoelen in water
- 10 sec in alcohol 70%
- 1 minuut in alcohol 96%
- 1 minuut in alcohol 100%
- 1 minuut in alcohol 100%
- 1 minuut in alcohol 100%-xyleen (1:1)
- 1 minuut in xyleen
- 1 minuut in xyleen.

Vervolgens insluiten met behulp van Entellan (4).

Löffler's methyleenblauwoplossing werd als volgt bereid:

- 1,5 g methyleenblauw oplossen in 100 ml alcohol 96% (= een verzadigde alcoholische methyleenblauwoplossing = stamoplossing)
- 30 ml stamoplossing samenvoegen met 1 ml KOH 1%
- hieraan toevoegen 99 ml demiwater
- voor gebruik filtreren.

Het resultaat van deze kleuring:

Bacteriën en gistcellen: donkerblauw.

De grote gistcellen zijn typisch voor de verwerking van oud vlees (28).

Na de kleuring werden vier preparaten microscopisch onderzocht (vergroting 400 x) op de kiemrijkheid, het aantal en de ligging van de bacteriën en gisten.

### 3. Resultaten en discussie

Elk histologisch onderzoek begint met een kwalitatieve analyse, waarbij de eventuele verwerkte weefselcomponenten aan de hand van hun karakteristieke structuur aangetoond kunnen worden.

Op grond van wettelijke voorschriften (26) mogen in vleeswaren niet verwerkt worden: geslachtsorganen, navelzakken, ogen, ooruitsnijdsels, maag- en darmslijm, magen en darmen, die niet geheel van slijmvlies zijn ontdaan, snuiten, boven- en onderlippen (behalve van varkens), fijnverdeeld kraakbeen, fijn verdeelde beenderen, bedorven of ondeugdelijke delen van vlees of vleeswaren.

Door middel van histologisch onderzoek verkrijgt men een indruk van de verwerkte weefsels en organen en daarmee een goede indruk van de kwaliteit van de verwerkte grondstoffen en de samenstelling van een vleesprodukt. Tevens zijn pogingen ondernomen om histologisch vast te stellen uit welke diersoorten het gehakt is samengesteld. Het bleek niet mogelijk runder- en varkensweefsel in het gehakt te onderscheiden. Aangezien onze ervaring op dit gebied nog niet groot is, zal in een volgend onderzoek dit probleem opnieuw aan de orde komen.

Naast een zuiver chemisch onderzoek op eiwit, vocht, vet en hydroxyproline (bindweefsel) geeft een histologisch onderzoek dus meer informatie over de gebruikte grondstoffen.

### 3.1 Histologisch onderzoek op weefselsamenstelling

In het Vlees- en Vleeswarenbesluit (Warenwet) wordt onder gehakt verstaan: vlees dat is gehakt, gemalen of anderszins sterk verkleind (25).

Voor de bereiding van gehakt worden de grote pezen, zoals buig- en strekpezen verwijderd. Daarnaast zal vlees dat van nature arm is aan bindweefsel niet voor gehakt gebruikt worden (23).

In de meeste slagerijen worden vleesresten en afsnijdsels veelal verwerkt in gehakt. Juist deze afvallen zijn rijk aan bindweefsel (23). Naast de grote hoeveelheid bindweefsel, die in de meeste gehaktmonsters gevonden werden, werden nog de volgende nevenbestanddelen vastgesteld:

zenuwweefsel	31 x	speekselklier	4 x
kraakbeen	11 x	meerlagig verhoornd	
lymfatisch weefsel	8 x	plaveisel epitheel	1 x
lever	7 x	zweetklieren	1 x
klierweefsel	7 x	runderhuid	1 x
bot	4 x	hart	1 x

In totaal werden 76 maal nevenbestanddelen in het gehakt gevonden. Het meest voorkomend nevenbestanddeel was zenuwweefsel (in 31 monsters). Verder werden diverse orgaanweefsels aangetroffen, zoals van lever, hart en lymfatisch weefsel (zie tabel III).

Onder lymfatisch weefsel werden in dit geval behalve lymfeklieren ook thymus- en miltweefsel gerangschikt, omdat een microscopisch onderscheid door de voorbereiding van het gehakt niet te maken was.

De aanwezigheid van speekselklieren zou op de mogelijke verwerking van kopvlees duiden.

In 17 monsters (d.i. 37% van het totaal) werden kruidenmengsels waargenomen.

In 2 monsters werd de aanwezigheid van zetmeel vastgesteld.

### 3.2 Histometrisch onderzoek op volumepercentage collageen bindweefsel

Het histometrisch onderzoek is een kwantitatieve microscopische analyse, die de relatie tussen twee weefselcomponenten in volumepercentages weergeeft.

Voor de bepaling van het bindweefselgehalte staan twee alternatieve methoden ter beschikking:

1. de histometrische methode voor de bepaling van de volumedelen aan collageen bindweefsel en dwarsgestreept spierweefsel (7, 9)
2. de chemische methode, waarbij het bindweefselgehalte wordt berekend uit het hydroxyprolinegehalte, dat chemisch wordt bepaald (5).

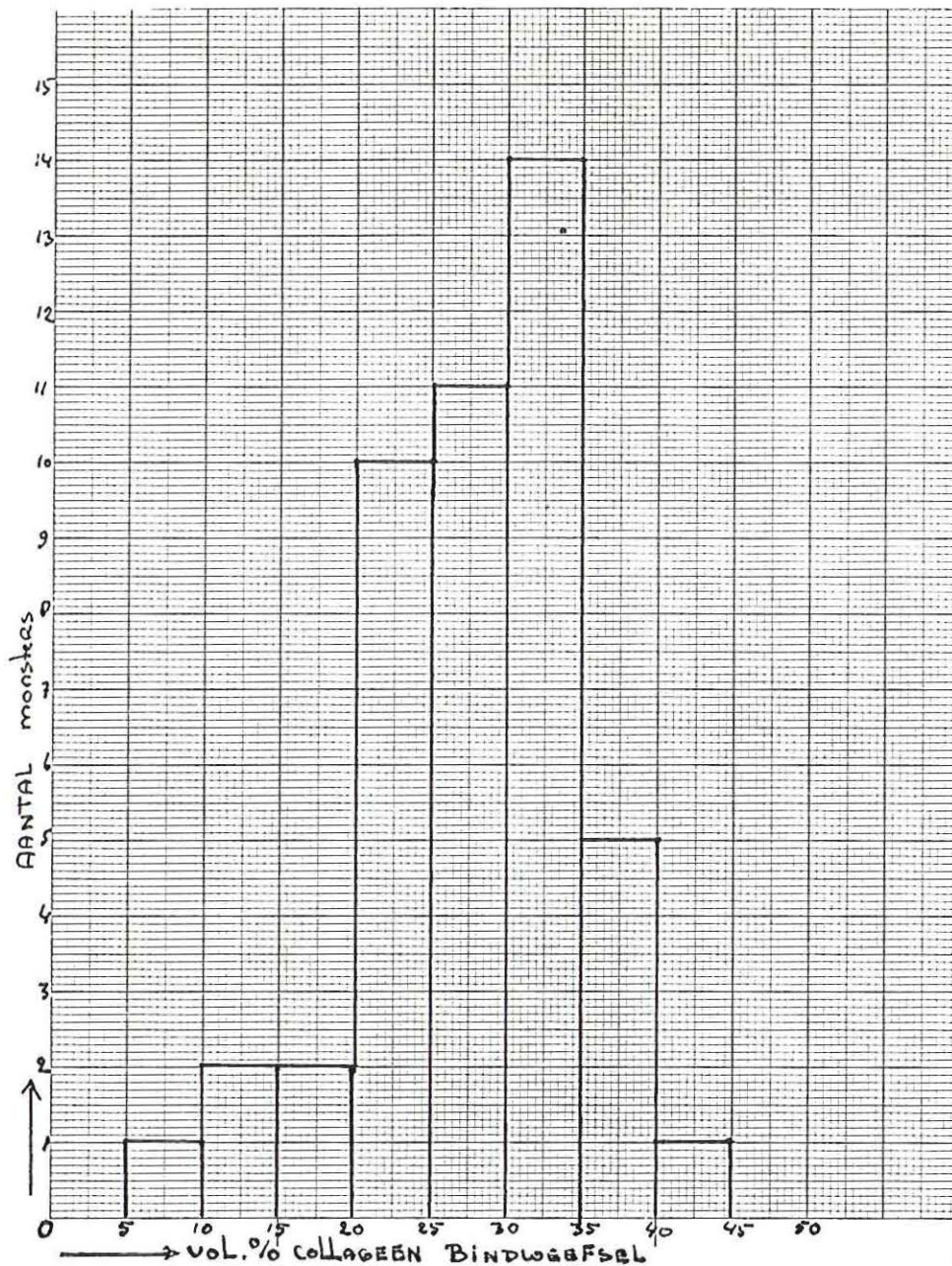
De beide methoden berusten op totaal verschillende principes. De histometrie bepaalt in dit geval volumedelen van het collageen bindweefsel en het dwarsgestreept spierweefsel.

Met het hydroxyprolinegehalte wordt de gewichtsverhouding van collageen bindweefseleiwit in vleeseiwit vastgesteld (9).

Uit het histometrisch onderzoek bleek, dat het collageen bindweefselpercentage varieerde van 5 tot 40 volumepercenten collageen bindweefsel (zie tabel III).

Gemiddeld bedroeg het collageen bindweefselgehalte 27 volumepercenten. In de Duitse literatuur wordt een gemiddeld volumepercentage bindweefsel van 30% gevonden (1, 18, 21).

De verdeling van het bindweefselgehalte is weergegeven in de volgende grafiek:



Grafiek I: Frequentieverdeling der volumepercentages collageen bindweefsel van 46 monsters rauw gehakt.

Uit deze grafiek blijkt dat 35 monsters (76% van het totaal) liggen tussen 20 en 35 volumepercenten bindweefsel.

Opvallend is de extreem lage waarde van twee monsters gehakt, die minder dan 10 volumepercenten bindweefsel bevatten.

Uit het gehalte aan hydroxyproline en het totaal eiwitgehalte kan men de verhouding collageeneiwit/vleeseiwit berekenen volgens de formule:

$$\text{Collageen/eiwit} = \frac{\text{hydroxyproline} \times 8}{N \times 6,25} \times 100\%$$

Op grond van bovenstaande berekening kan men een vergelijking maken tussen het chemisch gevonden gehalte aan collageen bindweefsel t.o.v. het vleeseiwit en het histometrisch bepaalde collageen bindweefselgehalte t.o.v. het totaal dwarsgestreept spierweefsel (8, 9).

Het "chemisch" collageenbindweefselpercentage is door de afdeling Eiwitchemie van deze 46 monsters rauw gehakt bepaald (verslag in voorbereiding). In tabel I zijn de resultaten van de beide bepalingmethoden van het collageen bindweefsel weergegeven.

Tabel I: Resultaten van de histometrische en chemische bepaling van het collageen bindweefselgehalte

Nr.	Histom. bindw. %	Chem. bindw. %	Nr.	Histom. bindw. %	Chem. bindw. %
1	29,5	18,9	26	22,0	20,4
2	33,3	20,9	27	30,3	23,0
3	31,3	17,6	28	32,8	24,8
4	27,5	22,2	29	25,0	22,9
5	25,0	23,6	30	28,3	23,6
6	39,5	39,2	31	25,0	17,5
7	34,5	19,3	32	4,5	11,8
8	35,3	33,3	33	15,5	19,9
9	35,8	26,3	34	32,5	29,4
10	20,3	22,0	35	29,8	20,1
11	25,5	27,2	36	32,5	24,1
12	24,8	16,6	37	34,0	22,2
13	31,5	20,2	38	35,0	30,0
14	31,0	20,0	39	25,8	22,3
15	23,3	19,3	40A*	9,8	7,4
16	22,8	17,3	40B**	24,0	17,3
17	21,3	26,0	41	32,8	19,5
18	21,0	20,7	42	34,8	24,0
19	24,3	23,6	43	29,8	26,4
20	24,3	24,3	44	27,5	22,3
21	28,3	28,7	45	12,8	19,0
22	34,5	30,5			
23	16,3	20,8			
24	22,3	27,6			
25	26,3	25,0			

\* = rundergehakt

\*\* = varkensgehakt

Om te kunnen na gaan of er een verband tussen de resultaten van beide methoden bestaat, kan de correlatiecoëfficiënt worden vastgesteld (27).

Deze correlatiecoëfficiënt wordt berekend met de volgende formule:

$$r = \frac{\sum (X - m_x) (Y - m_y)}{\sqrt{(X - m_x)^2 \times (Y - m_y)^2}}$$

waarin:

r = correlatiecoëfficiënt

X = histometrisch volumepercentage bindweefsel

Y = chemisch percentage bindweefsel

$m_x$  = gemiddelde van X

$m_y$  = gemiddelde van Y

Het kenmerkend getal voor de mate van correlatie is de correlatiecoëfficiënt, welke zodanig is gedefinieerd dat wanneer deze coëfficiënt 0 is er geen enkel verband bestaat, bij +1 een volledig verband en bij -1 er een negatief verband bestaat (27).

De correlatiecoëfficiënt bedraagt bij dit gehaktonderzoek 0,6. Dit duidt erop dat er wel degelijk een positieve correlatie aanwezig is tussen het histometrisch vastgestelde bindweefselvolumepercentage en het chemisch vastgestelde bindweefselpercentage (9).

Dat er geen correlatiecoëfficiënt van 1 gevonden wordt is onder meer verklaarbaar, doordat beide methoden voor de bepaling van het bindweefselgehalte geheel volgens verschillende principes werden uitgevoerd.

Zo werd het vleeseiwitgehalte bepaald uit het stikstofgehalte maal de factor 6,25. Deze factor bedraagt echter voor het bindweefsel 5,55 (9).

Tevens zal het N-gehalte te hoog zijn, wanneer stikstofverbindingen, die van het dier afkomstig zijn en geen skeletspierweefsel bevatten, verwerkt zijn (16, 17).

Ook blijken er invloeden voor wat betreft de verkleiningsgraad van het gehakt op het bindweefselvolumepercentage (2, 15).

De correlatiecoëfficiënt kan verbeterd worden, door het aantal histometrische bepalingen sterk uit te breiden.



Bij dit histometrisch onderzoek werden 400 treffers per monster (4 coupes met 100 treffers) geregistreerd. Bij meerdere coupes en een grotere hoeveelheid treffers per coupe zal de nauwkeurigheid maar ook de tijdsduur van het onderzoek toenemen.

Het verband tussen beide bepalingsmethoden van het bindweefselgehalte is verwerkt in Grafiek II en III (zie bijlagen p. e.v.).

### 3.3 Bacterioscopisch onderzoek op de aanwezigheid van bacteriën en gisten

Bij het onderzoek naar de deugdelijkheid van rauw gehakt kan gebruik worden gemaakt van histo-bacterioscopische methoden, waarbij weefselcoupes worden beoordeeld op kiemrijkheid dat wil zeggen het aantal en de ligging van de bacteriën. De microscopische beoordeling van de preparaten vindt plaats bij een vergroting van 400 x.

Het gehele preparaat wordt systematisch van links naar rechts, baan voor baan, onderzocht. Een verdeling in klassen, ten aanzien van de hoeveelheid aanwezige kiemen, is mogelijk.

De volgende klasse-indeling werd gehanteerd (3, 24):

Klasse 1. Er zijn nauwelijks enige kiemen te vinden of slechts plaatselijk enkele losse kiemen:

zeer kiemarm, goed, codering -.

Klasse 2. Als klasse 1, echter in enkele gezichtsvelden wat meer losse kiemen en tevens 1 t/m 5 kolonies per coupe:

kiemarm, voldoende, codering ±.

Klasse 3. In verschillende gezichtsvelden losse kiemen en tevens 6 t/m 25 kolonies per coupe:

kiemrijk, matig, codering +.

Klasse 4. In vrij veel gezichtsvelden losse kiemen en tevens 26 t/m 50 kolonies per coupe:

zeer kiemrijk, slecht, codering ++.

Klasse 5. In vrijwel alle gezichtsvelden losse kiemen en tevens meer dan 50 kolonies per coupe:

overmatig kiemrijk, zeer slecht, codering +++.

De resultaten waren als volgt:

16 monsters gehakt behoorden tot klasse 1, zeer kiemarm (-)

11 monsters behoren tot de klasse 2, kiemarm (±)

16 monsters behoorden tot de klasse 3, kiemrijk (+)

2 monsters behoorden tot de klasse 4, zeer kiemrijk (++)

1 monster behoorde tot de klasse 5, overmatig kiemrijk (+++).

Van 29 van de 46 gehaktmonsters was tevens het bacteriekiemgetal bepaald (verslag in voorbereiding).

Een vergelijking van het bacterioscopisch onderzoek met deze bacteriekiemgetalbepalingen staan vermeld in onderstaande tabel.

Tabel II. De resultaten van het bacterioscopisch onderzoek vergeleken met het aëroobkiemgetal van 29 monsters gehakt.

Bacterioscopische klasse	Aantal monsters	$< 10^6$	$10^6 > < 5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6 > < 10^7$	$10^7 > < 5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7 > < 10^8$	$10^8 > < 5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8 > < 10^9$	$> 10^9$
1. zeer kiemarm (-)	7	1	1		4	1			
2. kiemarm ( $\pm$ )	6				2	1	3		
3. kiemrijk (+)	13				4	2	7		
4. zeer kiemrijk (++)	2							2	
5. overmatig kiemrijk (+++)	1								1
	<u>29</u>								

Van de 7 monsters die bacterioscopisch als zeer kiemarm beoordeeld werden, hadden slechts twee monsters een aëroobkiemgetal dat kleiner was dan  $10^7$ .

Er werden 3 monsters met een kiemgetal groter dan  $5 \cdot 10^8$  bacterioscopisch beoordeeld als zeer kiemrijk of overmatig kiemrijk.

In het tussenliggende gebied ( $10^7$  tot  $5 \cdot 10^8$ ) leverde het bacterioscopische onderzoek uiteenlopende resultaten op. Het is dus mogelijk dat monsters met een kiemgetal tussen  $10^7$  en  $5 \cdot 10^8$  histobacterioscopisch worden beoordeeld van zeer kiemarm tot kiemrijk. In de praktijk blijkt het kiemgetal van rauw gehakt  $> 10^7 - 10^8$  veelvuldig voor te komen (24, 28).

Ook in de literatuur (24) wordt er op gewezen dat er uit de bacterioscopisch vastgestelde kiemrijkheid niet te veel conclusies mogen worden getrokken met betrekking tot het aëroobkiemgetal van het onderzochte monster.

Het bacterioscopisch onderzoek geeft echter een snelle indruk van de aard, het aantal en de ligging van de bacteriën. Het is mogelijk om ophopingen van bacteriën (z.g. kiemnesten of clusters) op te sporen.

In sommige coupes worden verspreid voorkomende kiemnesten en strengen aangetroffen, die afkomstig zijn van de oppervlakte van het vlees. Deze beelden zijn minder ernstig te beoordelen dan de weefseldeeltjes, die geheel met kiemen zijn geïnfecteerd. Een effectieve bacterioscopische en histologische beoordeling van coupes is moeilijk en vereist veel ervaring (24).

Tabel III. Totaal overzicht van het histologisch, histometrisch en bacterioscopisch onderzoek van 46 monsters rauw gehakt.

No.	Histom. bindw.%	Nevenbestanddelen			Bacteriosc. klasse	Aeroob kiemgetal
		Dierlijk	Plantaardig	Zetmeel		
1	29,5	klierweefsel (mogelijk kopvlees)	-	-	-	$3,5 \times 10^7$
2	33,3	zenuwweefsel	kruiden	-	-	$1,5 \times 10^7$
3	31,3	kraakbeen	tarweproduct kruiden	aanwezig	+	$1,2 \times 10^7$
4	27,5	zenuwweefsel kraakbeen, hart- en lymfatisch weefsel	-	-	+	$1,3 \times 10^8$
5	25,0	zenuwweefsel klierweefsel (mogelijk kopvlees)	-	-	±	$3,8 \times 10^8$
6	39,5	zenuwweefsel	-	-	±	$4,1 \times 10^8$
7	34,5	-	kruiden	-	+	$3,6 \times 10^8$
8	35,3	zenuwweefsel lymfatisch weefsel	-	-	+	$3,3 \times 10^8$
9	35,8	lymfatisch weefsel zenuwweefsel	-	-	±	$3,1 \times 10^7$
10	20,3	speekselklier zenuwweefsel	-	-	+	$1,2 \times 10^8$
11	25,5	kraakbeen	kruiden	-	+	$8,5 \times 10^7$
12	24,8	-	-	-	++	$5,6 \times 10^8$
13	31,5	lymfatisch weefsel, bot	-	-	±	$6,1 \times 10^7$
14	31,0	-	-	-	+	$1,4 \times 10^8$
15	23,3	zenuwweefsel	kruiden	-	+	$3,0 \times 10^7$
16	22,8	zenuwweefsel	-	-	+	$3,3 \times 10^7$
17	21,3	-	-	-	±	$3,0 \times 10^8$
18	21,0	kraakbeen	-	-	+++	$1,2 \times 10^9$
19	24,3	zenuwweefsel	-	-	+	$4,1 \times 10^8$
20	24,3	kraakbeen	kruiden	-	±	$1,3 \times 10^7$

No.	Histem. bindw.%	Nevenbestanddelen			Bacteriosc. klasse	Aeroob kiemgetal
		Dierlijk	Plantaardig	Zetmeel		
21	28,3	zenuwweefsel	-	-	-	1,6x10 <sup>7</sup>
		kraakbeen				
22	34,5	klierweefsel	-	-	-	4,0x10 <sup>7</sup>
		(mogelijk kopvlees)				
		bot, kraak- been, zenuw- weefsel, lever				
23	16,3	-	-	-	++	5,7x10 <sup>8</sup>
24	22,3	zenuwweefsel	-	-	+	8,4x10 <sup>7</sup>
		kraakbeen				
25	26,3	zenuwweefsel	-	-	+	3,3x10 <sup>7</sup>
26	22,0	zenuwweefsel	-	-	+	1,1x10 <sup>8</sup>
		lymfatisch weefsel				
27	30,3	zenuwweefsel	-	-	-	2,6x10 <sup>6</sup>
28	32,8	bot, kraak- been, lever	-	-	-	7,6x10 <sup>7</sup>
29	25,0	zenuwweefsel	weinig kruiden	-	-	5,0x10 <sup>5</sup>
30	28,3	lever, zenuw- weefsel, kraakbeen, zweetklier	kruiden	-	±	n.b.***
31	25,0	lymfatisch weefsel, zenuwweefsel speekselklier (mogelijk kopvlees)	-	-	±	n.b.
32	4,5	-	weinig kruiden	-	±	n.b.
33	15,5	zenuwweefsel	-	-	-	n.b.
		lymfatisch weefsel				
34	32,5	runderhuid	-	-	+	n.b.
		zenuwweefsel				
35	29,8	zenuwweefsel	-	-	-	n.b.
36	32,5	lymfatisch weefsel	veel kruiden	-	-	n.b.
37	34,0	bot, zenuw- weefsel	veel kruiden	-	-	n.b.
38	35,0	klierweefsel	kruiden	-	-	n.b.
		(mogelijk kopvlees)				
		speekselklier				
39	25,8	zenuwweefsel	kruiden	-	±	n.b.
40A*	9,8	-	-	-	-	n.b.
40B**	24,0	zenuwweefsel	kruiden	-	±	n.b.
		kraakbeen				

No.	Histom. bindw.%	Dierlijk	Nevenbestanddelen Plantaardig	Zetmeel	Bacteriosc. klasse	Aeroob kiemgetal
41	32,8	klierweefsel (mogelijk kopvlees), lever, zenuwweefsel	veel kruiden, tarweprodukt	aanwezig	+	n.b.
42	34,8	meerlagig verhoornd plaveisel epitheel, klierweefsel (mogelijk kopvlees), lever, zenuw- weefsel	veel kruiden	-	+	n.b.
43	29,8	zenuwweefsel	-	-	-	n.b.
44	27,5	klierweefsel (mogelijk kopvlees), speekselklier lever, zenuw- weefsel	-	-	-	n.b.
45	12,8	zenuwweefsel	-	-	-	n.b.

- \* = rundergehakt  
 \*\* = varkensgehakt  
 \*\*\* = niet bepaald

Histom. bindw. % = histometrisch bepaald collageen/bindweefsel/dwarsgestreept spierweefsel

- = zeer kiemarm  
 ± = kiemarm  
 + = kiemrijk  
 ++ = zeer kiemrijk  
 +++ = overmatig kiemrijk

#### 4. Conclusies

Uit het onderzoek blijkt dat het gehakt met behulp van histologisch, histometrisch en bacterioscopisch onderzoek kwalitatief te beoordelen is.

Door middel van histologisch onderzoek kan men nevenbestanddelen naast de hoofdbestanddelen (spierweefsel, bindweefsel en vet) goed aantonen. Vaststelling van de diersoort (rund of varken) waaruit het gehakt is bereid, bleek vooralsnog door histologisch onderzoek niet mogelijk.

Door middel van histometrisch onderzoek kan men de verhouding bindweefsel/spierweefsel vaststellen. Er blijkt een positieve correlatie te bestaan (0,6) tussen het bindweefsel-volumepercentage (histometrisch bepaald) en het chemisch bepaalde bindweefselgehalte (uit het hydroxyprolinegehalte en uitgedrukt als percentage van het totaal eiwit). Deze correlatiecoëfficiënt geeft wel een positief verband aan, maar is nog niet de gewenste factor. Dit wordt o.m. veroorzaakt doordat het aantal monsters zeer groot was (46), waardoor het onderzoek per monster beperkt moest blijven tot 4 coupes met ieder slechts 100 treffers.

In de duitse literatuur (9) wordt een correlatiecoëfficiënt van 0,9 gevonden. Hierbij werden b.v. 9 coupes onderzocht per monster en per coupe werden gemiddeld 357 treffers gescoord.

Door middel van bacterioscopisch onderzoek is het mogelijk om een indicatie te geven over de deugdelijkheid (microbiologische gesteldheid) van het gehakt. Het blijkt echter dat tevens een microbiologische bepaling van het kiemgetal noodzakelijk is om de kwaliteit juist te kunnen vaststellen.

Uit het onderzoek kan men concluderen dat het in het algemeen van goede kwaliteit is.

## 5. Literatuur

1. Bentler, W. Beurteilung des Fett- und Bindegewebsgehaltes in Hackfleisch. Fleischwirtschaft, 3, 206-208, 1965.
2. Bentler, W. Einfluss der Zerkleinerung von Rohfleisch auf das histometrisch ermittelbare Bindegewebsvolumen und die Bedeutung der Mischfarben. Fleischwirtschaft, 5, 440-445, 1964.
3. Borm, P.J., Steijaert, C.E.L.M. en Rijnberg-De Waal, L. Bacterioscopisch-histologische controle van gehakt in slagersbedrijven. Tijdschr. Diergeneesk., deel 105, afl. 13, 526-528, 1980.
4. Burck, H.C. Histologische Technik. G. Thieme Verlag Stuttgart 1973.
5. Fey, R. Über die Erfassung des Bindegewebsgehaltes von Fleischwaren mit der Hydroxyprolinmethode. Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 164, 233-238, 1977.

6. Franssen, J.G. Bacterioscopisch-histologisch gehaktonderzoek als hulpmiddel bij de bedrijfscontrole. Tijdschr. Diergeneesk., deel 90, afl. 15, 1035-1040, 1965.
7. Hennig, A. Zwei neue Messokulare für die mikroskopische Volum- und Oberflächenmessung. Forsch. Ing.-Wes. 23, 71-73, 1957.
8. Hildebrandt, G. Stellungnahme zu den "Richtlinien für die einheitliche Durchführung der histologischen Untersuchung von Fleischerzeugnissen". Fleischwirtschaft, 59, 521-528, 1979.
9. Horn, D. en Seidler, D. Histometrische Brühwurstuntersuchung. Fleischwirtschaft, 58, 279-288, 1978.
10. De Jong, W.J.H.J. Handleiding Microscopie deel III.B.
11. Kelch, F. en Gerigk, K. Beitrag zur histologischen quantitativen Wurstuntersuchung mit dem Integrationstisch der Fa. Leitz, Wetzlar. Fleischwirtschaft 12, 279-285, 1960.
12. Kerstens, C.J.A. Microscopisch onderzoek van vleeswaren. Proefschrift. Schotanus en Jens, Utrecht, 1935.
13. Klein, H. Zum Fett- und Bindegewebsanteil in Schabefleisch und Hackfleisch. Archiv für Lebensmittelhygiene, 13, 54-56, 1962.
14. Koolmees, P.A. en Bijker, P.G.H. Histometrisch onderzoek van vleeswaren. V.V.D.O. Rapport H 8103.
15. Koolmees, P.A. en Bijker, P.G.H. Histometrisch onderzoek van vleeswaren. Tijdschr. Diergeneesk., deel 108, afl. 9, 339-344, 1983.
16. Kotter, L., Degenkolb, E. en Elfert, E. Zum Nachweis kollagener Substanzen bei der histologischen Wurstuntersuchung. Tierärztl. Umsch. 11, 140-141, 1956.
17. Matthies, K. Zur Stellung des histometrischen Wertes in den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse. Arch. Lebensmittelhyg. 28, 107-108, 1977.
18. Prändl, O. Die histologische Analyse von Wurstwaren. G. Röttger Verlag München, 1961.
19. Rohen, J.W. Anleitung zur Differentialdiagnostik histologischer Präparate. F.K. Schattauer Verlag Stuttgart-New York, 1977.
20. Romeis, B. Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg Verlag München-Wien, 1968.
21. Seidler, D. Technologisch bedingte Einflüsse auf das Ergebnis der histometrischen Untersuchung von Brühwurst. Die Fleischerei 30, 546-550, 1980.

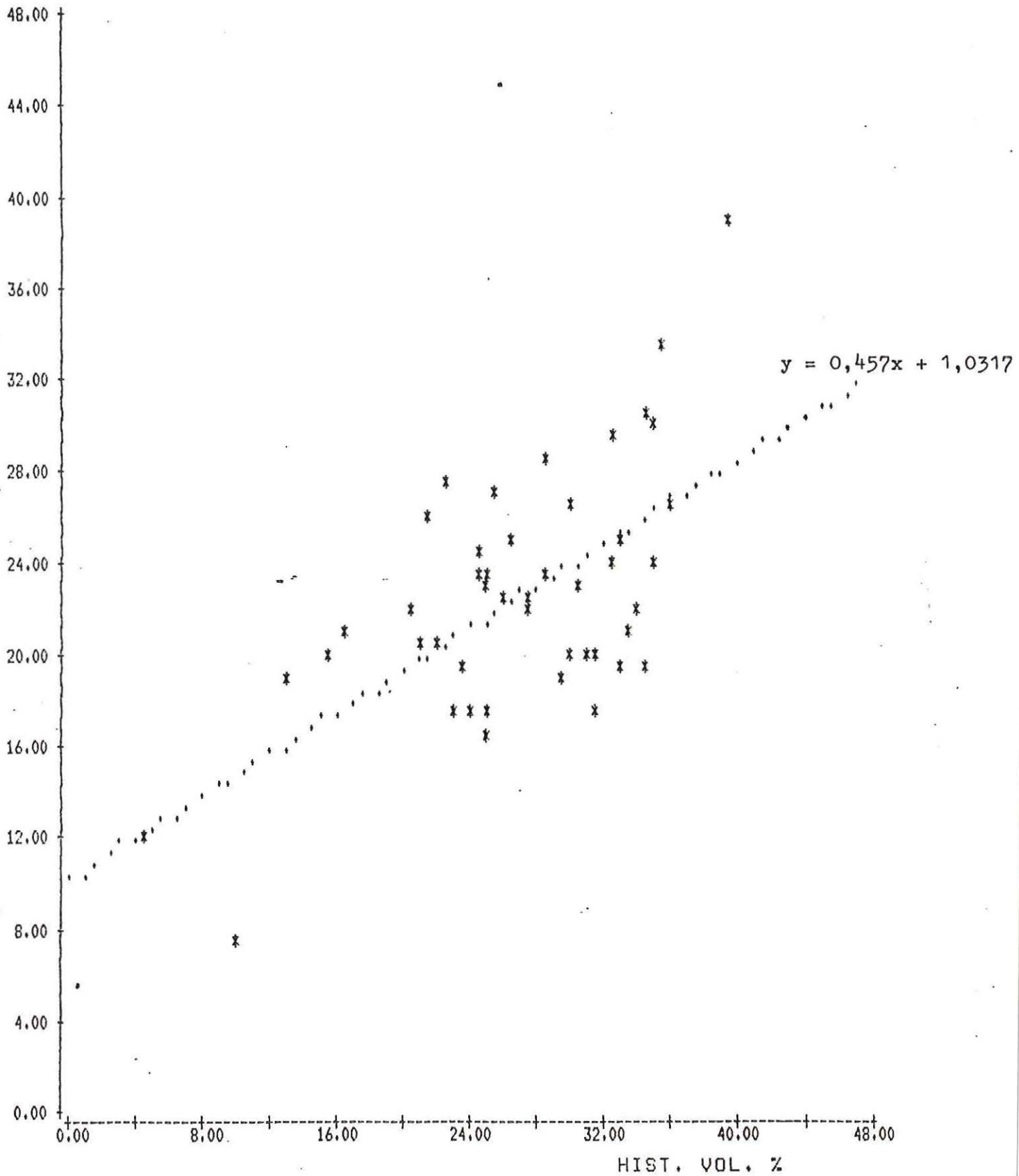
22. Sinell, H.J. en Höpke, H.U. Zum Kollagengehalt in Schabe- und Hackfleisch. Arch. Lebensmittelhyg. 14, 97-102, 1963.
23. Smit, M.P. Histometrisch onderzoek van gehakt. Tijdschr. Diergeneesk., deel 95, afl. 1, 3-11, 1970.
24. Smit, M.P. Ervaringen met het histobacterioscopisch onderzoek van rauw gehakt en overeenkomstige vleesprodukten, met betrekking tot de bepaling van het aëroob kiemgetal. Tijdschr. Diergeneesk., deel 97, afl. 11, 653-662, 1972.
25. Vlees- Vleeswarenbesluit (Warenwet), 16 juli 1981, uit het Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden.
26. Vleeskeuringswet, K.B. van 14 febr. 1958, Stb. 92, betreffende het verwerken van vlees tot vleeswaren (C I-2).
27. Wijvekate, M.L. Methoden van onderzoek. Uitgeverij Het Spectrum N.V. Utrecht Antwerpen, 1971.
28. "De blauwe map" van de Veterinaire Dienst van het Ministerie van Landbouw en Visserij.



Bijlage

GRAFIEK II: Verband tussen het histometrisch bindweefselvolumepercentage en het chemisch bindweefsel percentage.

CHEMISCH GEHALTE



BINDWEEFSEL IN GEHAKT JUNI 1983

TASKNR 1  
BINDWEEFSEL IN GEHAKT JUNI 1983

\*\*\* LINEAR REGRESSION \*\*\*  
\*\*\* Y=A+B\*X \*\*\*

VARIABLES:  
X =HIST. VOL. %  
Y =CHEMISCH GEHALTE

N analysed : 46  
N missing : 0

MEAN OF X AND Y: 26.8261 22.587

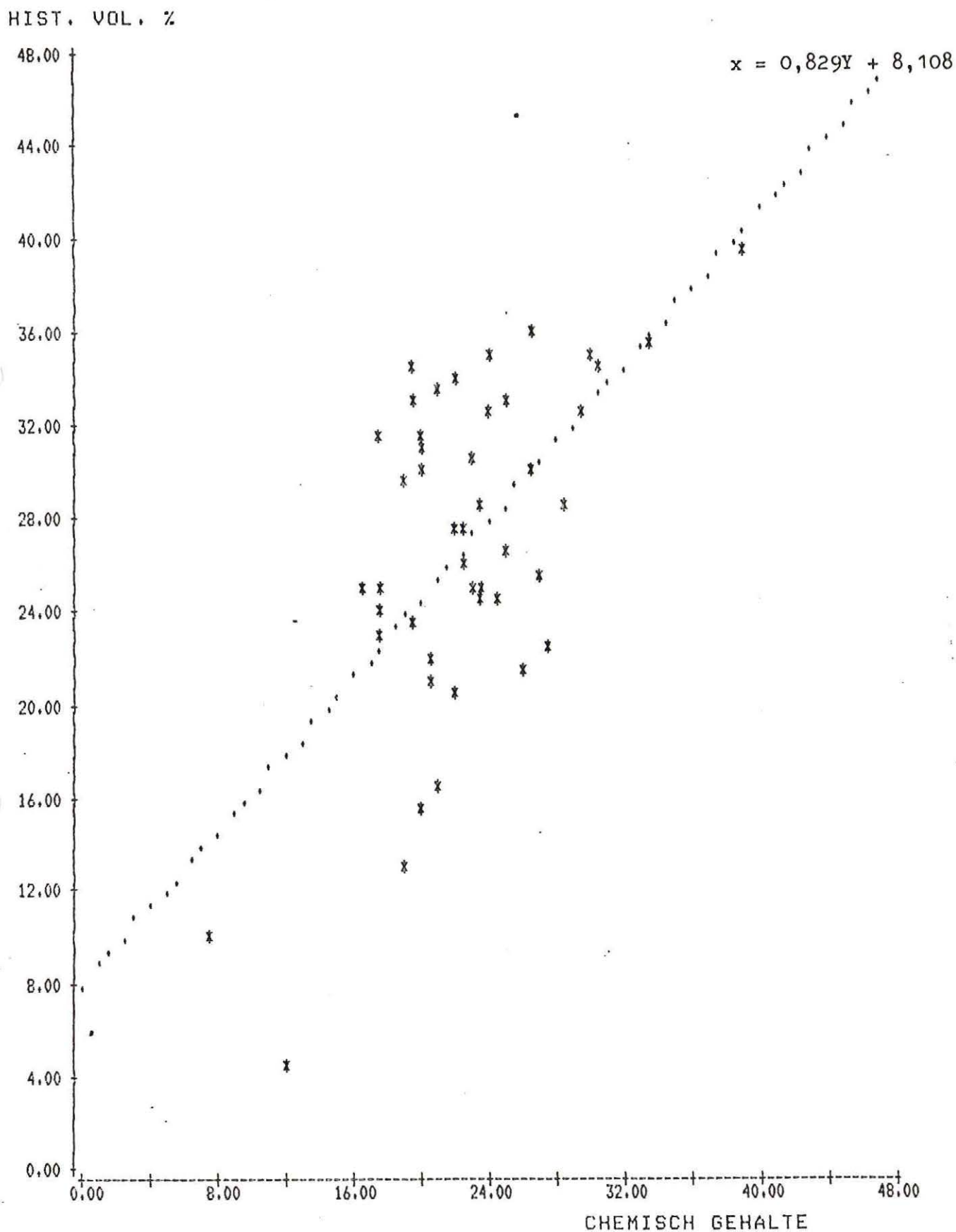
STD DEVIATIONS : 7.20078 5.34971

REGRESSION COEFFICIENTS:	STD. ERRORS:	T-VALUES:
A 10.3166	2.44962	4.2115
B .457404	.0882574	5.18262

RESIDUAL ST. ERROR : 4.26322  
CORRELATION COEFF. : .615673  
DEGREES OF FREEDOM : 44

SUM OF ERRORS<sup>2</sup> : 799.7  
EXPL. PART OF S.S. : .379053

GRAFIEK III: Verband tussen het chemisch bindweefselpercentage en het histometrisch bindweefselvolumepercentage.



BINDWEEFSEL IN GEHAKT JUNI 1983

TASKNR 2  
BINDWEEFSEL IN GEHAKT JUNI 1983

\*\*\* LINEAR REGRESSION \*\*\*  
\*\*\* Y=A+B\*X \*\*\*

VARIABLES:  
X =CHEMISCH GEHALTE  
Y =HIST. VOL. %

N analysed : 46  
N missing : 0

MEAN OF X AND Y: 22.587 26.8261

STD DEVIATIONS : 5.34971 7.20078

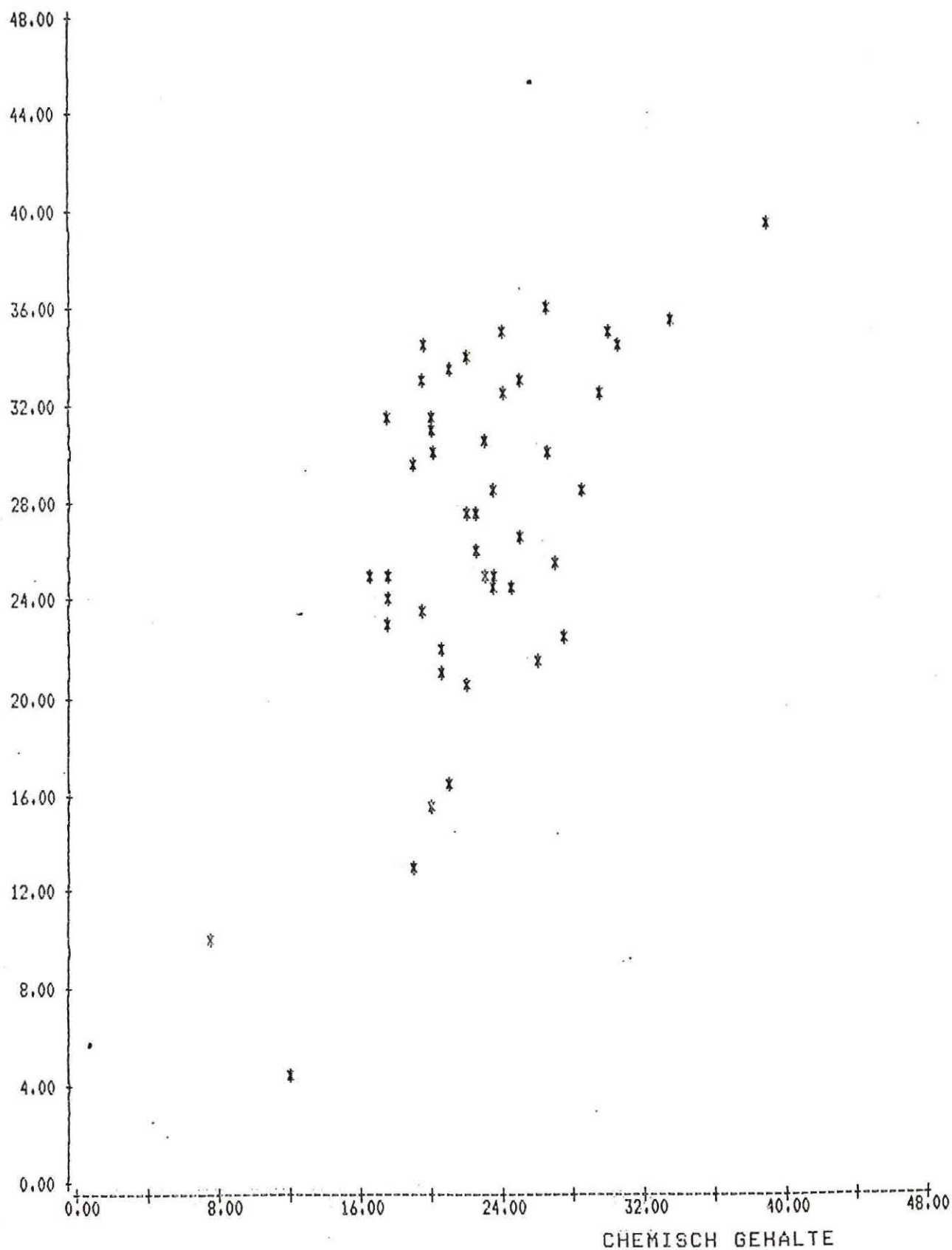
REGRESSION COEFFICIENTS:	STD. ERRORS:	T-VALUES:
A 8.10817	3.70945	2.18582
B .828705	.159901	5.18262

RESIDUAL ST. ERROR : 5.73835  
CORRELATION COEFF. : .615673  
DEGREES OF FREEDOM : 44

SUM OF ERRORS<sup>2</sup> : 1448.86  
EXPL. PART OF S.S. : .379053

GRAFIEK IV: als Grafiek III.

HIST. VOL. %



BINDWEEFSEL IN GEHAKT JUNI 1983