



**WETENSCHAPPELIJK COMITÉ
VAN HET FEDERAAL AGENTSCHAP VOOR DE VEILIGHEID
VAN DE VOEDSELKETEN**

ADVIES 23-2015

Betreft: Methodologie voor de verificatie en de validatie van alternatieve parameters voor de hittebehandeling van centrifuge- en separatorslib afkomstig van de verwerking van melk (dossier SciCom nr. 2015/01).

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 20 november 2015.

Samenvatting

Verordening (EU) 142/2011 vermeldt de procesparameters voor de hittebehandeling van centrifuge- en separatorslib afkomstig van de verwerking van melk (categorie 3-materiaal) en bestemd voor diervoeding. Aan het Wetenschappelijk Comité wordt gevraagd om een methodologie voor te stellen voor de verificatie en de validatie van alternatieve procesparameters die minstens leiden tot een gelijkaardige verlaging van het risico als de reglementaire parameters.

Het Wetenschappelijk Comité heeft dit dossier in drie luiken behandeld:

- Luik 1: Nagaan of de reglementaire parameters voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen;
- Luik 2: Alternatieve verhittingsparameters formuleren equivalent aan een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C en van 60 minuten bij 70 °C;
- Luik 3: Labotesten voorstellen om de verhitte te verifiëren.

Besluit van luik 1

Het mond-en-klauwzeer virus, de niet-sporenvormende bacteriën *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Coxiella burnetii* en de sporenvormende bacteriën *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* zijn de meest relevante pathogenen voor de diergezondheid die na hittebehandeling aanwezig zouden kunnen zijn in centrifuge- en separatorslib.

Op basis van de literatuurstudie kunnen we besluiten dat het niet zeker is dat het mond-en-klauwzeer virus volledig geïnactiveerd zou worden door hittebehandeling bij de reglementaire parameters van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven. Als richtsnoer voor het afdoden van het mond-en-klauwzeer virus stelt het Wetenschappelijk Comité voor om dezelfde behandelingen te volgen als deze van de wetgeving voor melkpoeder bestemd voor diervoeding. Deze behandelingen omvatten onder andere één van deze behandelingen:

- een sterilisatie met een F_0 -waarde van ten minste 3,
- een HTST-behandeling (*High Temperature Short Time*) die tweemaal toegepast wordt, of
- een HTST- of UHT-behandeling gecombineerd met:

- o een droogproces gecombineerd met een bijkomende hittebehandeling van minstens 72 °C,
- o een verlaging van de pH tot onder 6,0 gedurende ten minste één uur, of
- o de voorwaarde dat in de 21 dagen vóór verzending geen enkele haard van mond-en-klauwzeer in de lidstaat van oorsprong vermeld is.

Hittebehandeling volgens de reglementaire parameters (30 minuten bij 80 °C of 60 minuten bij 70 °C) is wel voldoende voor de afdoding van *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Coxiella burnetii*.

Hittebehandeling volgens de reglementaire parameters is niet voldoende voor de afdoding van de sporen van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum*. Na verhitting kunnen deze sporen ontkiemen en verder uitgroeien wanneer de externe omstandigheden deze groei toelaten. Om alle risico's op overdracht van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* uit te sluiten, zou de groei van deze pathogenen dienen beperkt te worden na het verhittingsproces. Dit kan door het slib na verhitting te koelen, te verzuren, te drogen of de bewaartijd te beperken vooraleer ze aan de dieren worden toegediend.

Besluit van luik 2

Het Wetenschappelijk Comité stelt voor om de equivalentie van tijd x temperatuurscombinaties met betrekking tot de vernietiging van niet-sporenvormende bacteriën te onderzoeken op basis van de vernietiging van *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en van *Coxiella burnetii*, welke de meest pasteurisatieresistente ziekverwekkende bacteriën zijn, gebruik makende van de in dit advies aangeraden D- en z-waarden.

Er wordt opgemerkt dat een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C niet leidt tot eenzelfde microbiologische afdoding als een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C.

In het advies worden tijd (minuten) x temperatuurs (°C)-combinaties weergegeven die leiden tot een log-reductie die equivalent is aan een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C en van 30 minuten bij 80 °C voor *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC 19698-stam). Tevens worden, als bijkomende informatie, behandelingen gegeven die equivalent zijn aan een behandeling van 25 seconden bij 95 °C.

De toe te passen temperatuur die door de sector wordt voorgesteld om centrifuge- en separatorslib te behandelen is 72 °C. Bij 72 °C is een behandeltijd van 35 minuten noodzakelijk voor een inactivatie van de drie beschouwde micro-organismen en equivalent aan een hittebehandeling voor 60 minuten bij 70 °C uitgaande van de beschikbare kennis in de literatuur. Een behandeling van 17 seconden bij 90 °C zorgt voor een equivalente inactivatie.

De tijd x temperatuurscombinaties die in dit advies als equivalent worden voorgesteld zijn theoretische parameters. Bij toepassing in de praktijk kan men rekening houden met een opwarmings- en afkoelingsperiode die de veiligheid van het product nog zal verhogen door de bijkomende hittebelasting op het product. Deze opwarmings- en afkoelingsperiodes kunnen sterk verschillen naargelang de gebruikte installatie en het proces (bv. batch of continu).

Besluit van luik 3

De belangrijkste parameters met betrekking tot de microbiologische risicobeheersing zouden in het HACCP-plan van de operator moeten worden geïntegreerd. Het is belangrijk de temperatuur en de tijd van de hittebehandeling en de verdere bewaaromstandigheden te controleren wanneer de wijze waarop het behandelde slib bewaard wordt het mogelijk maakt dat sporenvormende bacteriën uitgroeien. Hiervoor geeft het Wetenschappelijk Comité als aanbeveling om de "Good Manufacturing en Good Agricultural Practices" toe te passen voor de verwerking en de bewaring van het gepasteuriseerde product.

Teneinde het eindproduct te verifiëren en het proces te valideren, wordt aangeraden om *Enterobacteriaceae* als indicatorkiem te gebruiken. Om de verhitting te verifiëren zou ook een chemische (bio)indicator kunnen worden gebruikt. Mogelijkheden zijn de verhouding van lactulose op lactose en de bepaling van de lactoperoxidase-activiteit. Vooral deze indicatoren kunnen toegepast worden, zouden de indicatoren dienen gevalideerd te worden in functie van de te behandelen matrix en de verhittingscondities die worden gehanteerd.

Belangrijk te noteren is dat de gegevens beschikbaar in de literatuur die werden gehanteerd in dit advies betrekking hebben op de thermische weerstand van pathogenen in melk en niet in centrifuge- en separatorslib. Rekening houdende met het feit dat slib minder rijk is aan water dan melk, kan aangenomen worden dat de micro-organismen waarschijnlijk hitteresistenter zijn in slib dan in melk.

Summary

Advice 23-2015 of the Scientific Committee on a methodology for the verification and validation of alternative parameters for heat treatment of centrifuge and separator sludge from the processing of milk

Regulation (EU) No. 142/2011 specifies the process parameters for the heat treatment of centrifuge and separator sludge from the processing of milk (category 3 material) and intended for animal feed. The Scientific Committee is asked to propose a methodology for the verification and validation of alternative process parameters resulting at least in an equal reduction of the risk reduction as the regulatory parameters.

The Scientific Committee has treated the dossier in three parts:

- Part 1: Verify whether the regulatory parameters are sufficient to ensure animal health;
- Part 2: Formulate alternative heating parameters equivalent to a heat treatment of 30 minutes at 80 °C and 60 minutes at 70 °C;
- Part 3: Suggest laboratory tests to verify the heat treatment.

Conclusion part 1

The more relevant pathogens for animal health that may be present in centrifuge and separator sludge after heat treatment are the foot and mouth disease virus, the non sporulating bacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Coxiella burnetii* and the sporulating bacteria *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*.

We can conclude, based on literature studies, that it is not certain that the foot and mouth disease virus is completely inactivated by a heat treatment according to the regulatory parameters of 30 minutes at 80 °C or 60 minutes at 70 °C for centrifuge or separator sludge produced on milk industry. The Scientific Committee proposes as a guideline for the destruction of the foot and mouth disease virus to follow the same treatments as those given in the legislation for milk powder for animal feed. These treatments contains, among others one of these treatments:

- a sterilization with an F_0 value of at least 3,
- a HTST (*High Temperature Short Time*) treatment applied 2 times, or
- a HTST or UHT treatment combined with:
 - o a drying process combined with an additional heating to at least 72 °C,
 - o a pH decrease below 6.0 for at least one hour, or
 - o the condition that no outbreak of foot and mouth disease has been declared in the member state of origin at least 21 days before shipping.

Heat treatment according to the regulatory parameters (30 minutes at 80 °C or 60 minutes at 70 °C) is sufficient for the destruction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Coxiella burnetii*.

Heat treatment according to regulatory parameters is not sufficient to destroy spores of *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*. After the heat treatment, these spores can germinate and continue to grow when external conditions permit such growth. To exclude any risk of transmission of *Clostridium perfringens* and *Clostridium botulinum*, the growth of these pathogens should be limited after the heat treatment. This can be done by cooling, acidifying, drying the sludge after heating, or by limited the storage time before distributing to animals.

Conclusion part 2

The Scientific Committee proposes to verify the equivalence of time x temperature combinations for the destruction of non-sporulating bacteria based on the destruction of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Coxiella burnetii*, the most resistant pathogens to pasteurization, by applying the D and z value recommended in this advice.

It should be noted that a heat treatment of 30 minutes at 80 °C does not lead to the same microbial destruction as a heat treatment of 60 minutes at 70 °C.

Time (minutes) x temperature (°C) combinations leading to equivalent logarithmic reduction to a heat treatment of 60 minutes at 70 °C or of 30 minutes at 80 °C for *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (strain ATCC 19698) are presented in this advice. In addition, equivalent treatments for a treatment of 25 seconds at 95 °C are given for extra information.

The applicable temperature, proposed by the sector to treat centrifuges and separators sludge, is 72 °C. At 72 °C, a heat treatment time of 35 minutes is needed to produce an inactivation of the three microorganisms considered equivalent to a heat treatment of 60 minutes at 70 °C on basis of knowledge available in the literature. Treatment of 17 seconds at 90 °C produces also an equivalent inactivation.

Time x temperature combinations which are proposed as equivalent in this advice are theoretical parameters. For application in practice, a period of heating and cooling could be considered which will further increase the safety of the product by the additional heat load on the product. This heating and cooling time can vary considerably depending on the used installation and the process (eg. batch or continuous process).

Conclusion part 3

The most important parameters for the control of microbiological risks should be included in the HACCP plan of the operator. It is important to control the temperature and time during heat treatment and subsequent storage conditions if the circumstances in which the treated sludge is stored allow the growth of spore forming bacteria. To this end, the Scientific Committee recommends to apply the good manufacturing and good agricultural practices for the treatment and conservation of pasteurized product.

To verify the end product and validate the method, it is recommended to use *Enterobacteriaceae* as hygiene indicator. A (bio)chemical indicator could also be used to verify the heating. Possibilities include lactulose lactose ratio and the determination of lactoperoxidase activity. Before these indicators can be applied, they should be validated for the matrix to be treated and the heating conditions that are applied.

It is important to note that the data available in the literature that were used in this advice refer to the thermal resistance of pathogens in milk and not in centrifuge or separator sludge. Taking into account the fact that sludge are less rich in water than milk, it can be assumed that the micro-organisms are likely more resistant in sludge than in milk.

Sleutelwoorden

Hittebehandeling - centrifuge- en separatorslib - melk - dierenvoeding - methodologie

1. Referentietermen

1.1. Vragen

Kan een praktische methode worden toegepast voor de beoordeling (verificatie en validatie van het proces) van een hittebehandeling voor de verlaging van het risico verbonden aan centrifuge- en separatorslib uit de melkverwerkende industrie, die vergelijkbaar is met een standaard hittebehandeling (30 minuten bij 80 °C of 60 minuten bij 70 °C)?

Wat is de minimum temperatuur om een aanvaardbaar eliminatie-effect te verkrijgen?

Indien zou blijken dat er gegevens ontbreken om een advies te formuleren, wordt gevraagd dat het Wetenschappelijk Comité zou aanduiden welke bijkomende gegevens (o. a. voor welke referentieorganismen) de melkindustrie moet verschaffen?

1.2. Wettelijke context

Verordening (EG) nr. 1069/2009 van het Europees Parlement en de Raad van 21 oktober 2009 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten en tot intrekking van Verordening (EG) nr. 1774/2002 (verordening dierlijke bijproducten).

Verordening (EU) nr. 142/2011 van de Commissie van 25 februari 2011 tot uitvoering van Verordening (EG) nr. 1069/2009 van het Europees Parlement en de Raad tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten en tot uitvoering van Richtlijn 97/78/EG van de Raad wat betreft bepaalde monsters en producten die vrijgesteld zijn van veterinaire controles aan de grens krachtens die richtlijn.

Verordening (EU) 2015/9 van de Commissie van 6 januari 2015 tot wijziging van Verordening (EU) nr. 142/2011 tot uitvoering van Verordening (EG) nr. 1069/2009 van het Europees Parlement en de Raad tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften inzake niet voor menselijke consumptie bestemde dierlijke bijproducten en afgeleide producten en tot uitvoering van Richtlijn 97/78/EG van de Raad wat betreft bepaalde monsters en producten die vrijgesteld zijn van veterinaire controles aan de grens krachtens die richtlijn.

1.3. Definitie

Pasteurisatie: Pasteurisatie is gericht op de inactivatie van alle niet-sporenvormende micro-organismen. Pasteurisatie kan op twee manieren uitgevoerd worden: een behandeling bij een lage temperatuur gedurende een lange tijd (*Low Temperature – Long Time* (LTLT) – bv. 62,7 °C gedurende 30 minuten) of een behandeling bij een hoge temperatuur gedurende een korte tijd (*High Temperature – Short Time* (HTST) – bv. 71,7 °C gedurende 15 seconden).

D-Waarde (of decimale reductietijd): De D-waarde wordt gedefinieerd als de tijd die nodig is om 90% van het micro-organisme af te doden bij een gegeven temperatuur.

z-waarde: De z-waarde wordt gedefinieerd als de verandering van temperatuur (in °C) die nodig is om de D-waarde met een factor 10 te wijzigen.

Gelet op de besprekingen tijdens de vergaderingen van de werkgroep van 16 maart 2015, 13 mei 2015 en 22 juni 2015 en de plenaire zittingen van 23 januari 2015, 22 mei 2015, 3 juli 2015, 23 oktober 2015 en 20 november 2015,

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :

2. Inleiding

De rauwe melk die door de melkverwerkende industrie wordt opgehaald, wordt vóór de pasteurisatie gecentrifugeerd voor het verwijderen van zware deeltjes en vreemde lichamen (grond, zand, fecale contaminatie, celweefsel van de koe en de grootste caseïnemicellen), en wordt centrifuge- en separatorslib genoemd. Dit slib wordt in kleine hoeveelheden geproduceerd aan het begin van het melkverwerkingsproces.

Volgens het Nederlands Instituut voor ZuivelOnderzoek (NIZO)-rapport (2012), opgemaakt op vraag van de sector, was het gehalte aan totale micro-organismen, *Enterobacteriaceae*, gist en somatische cellen in monsters van onbehandeld centrifugeslib afkomstig van 6 melkfabrieken ongeveer gelijk aan dat in monsters van rauwe melk. Het gehalte aan mesofiele sporen daarentegen was 17 maal hoger in centrifugeslib dan in rauwe melk.

De wetgeving met betrekking tot dierlijke bijproducten (Verordeningen (EG) nr. 1069/2009 en (EU) nr. 142/2011) legt een hittebehandeling op van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven, alvorens dit slib in de riolering wordt geloosd of wanneer dit slib voor dierenvoeding is bestemd.

Na hittebehandeling kan het centrifuge- en/of separatorslib aan dieren (hoofdzakelijk runderen en varkens) worden gegeven als nat voer of na droging.

Een aanpassing van de wetgeving betreffende dierlijke bijproducten (Verordening (EU) nr. 9/2015) geeft meer flexibiliteit aan de lidstaten voor de hittebehandeling van centrifuge- en separatorslib. Op die manier kunnen door de bevoegde overheid alternatieve parameters worden toegestaan voor zover aangetoond wordt dat deze het risico minstens op een gelijkaardige manier verlagen als een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C.

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd om een methodologie voor te stellen voor de verificatie en de validatie van alternatieve parameters waardoor het mogelijk is het risico minstens gelijkaardig te verlagen zoals met de parameters vermeld in Verordening (UE) nr. 142/2011 voor de hittebehandeling van centrifuge- en separatorslib afkomstig van de verwerking van melk (categorie 3-materiaal) en bestemd voor dierenvoeding.

Het Wetenschappelijk Comité (SciCom) is van mening dat vooreerst moet worden nagegaan of de reglementaire parameters, namelijk een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C, opgenomen in de wetgeving betreffende de dierlijke bijproducten, voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen en een antwoord te geven op de vraag "Vernietigt één van deze behandelingen de op dieren overdraagbare pathogenen die aanwezig kunnen zijn in het slib en die de dieren kunnen besmetten (voornamelijk kalveren en varkens) wanneer deze het slib opeten?".

3. Methodologie

Het Wetenschappelijk Comité heeft dit dossier in drie luiken behandeld:

- Luik 1: Nagaan of de reglementaire parameters voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen;
- Luik 2: Alternatieve verhittingsparameters formuleren equivalent aan een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C en van 60 minuten bij 70 °C;
- Luik 3: Labotesten voorstellen om de verhitte te verifiëren.

Om na te gaan of de reglementaire parameters van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen, heeft het SciCom een reeks vragen gesteld aan externe deskundigen om de dierlijke pathogenen (virussen, bacteriën (met inbegrip van sporen), enz.) in kaart te brengen die via rundermelk kunnen worden overgedragen op runderen en op varkens. Er werd in de wetenschappelijke literatuur informatie verzameld met betrekking tot de tijd x temperatuurscombinaties voor de inactivatie van bacteriën (sporen) en virussen in centrifugeslib en in melk.

Teneinde een methode voor te stellen om na te gaan of alternatieve parameters een verlaging van het risico mogelijk kunnen maken dat ten minste gelijkaardig is aan een verlaging van het risico bij een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C en van 60 minuten bij 70 °C, werden referentiepathogenen in kaart gebracht op basis van hun relevantie voor de diergezondheid.

D-waarden en z-waarden van de in kaart gebrachte referentiepathogenen werden onderzocht om de equivalentie van alternatieve parameters te onderzoeken.

4. Advies

4.1. Luik 1: Nagaan of de reglementaire parameters voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen

4.1.1. Relevante pathogenen voor de diergezondheid via consumptie van bijproducten van melk volgens EFSA (2006)

De EFSA (2006) heeft een lijst opgesteld met ziekten of pathogenen die relevant kunnen zijn voor de diergezondheid via consumptie van bijproducten van melk. Het kwalitatief risico voor runderen om besmet te worden door inname van deze bijproducten van melk werd geraamd en voor elke ziekte of pathogeen uitgedrukt in scores (0-1-2 stemt respectievelijk overeen met “negligible to extremely low – very low to low – moderate to high”). Door HTST-pasteurisatie (*High Temperature – Short Time*, d.w.z. 71,7 °C gedurende 15 seconden (s)) van de beschouwde melk en bijproducten van melk is het mogelijk de concentratie van besmettelijke agentia te verlagen tot een verwaarloosbaar of zeer laag niveau, met uitzondering van het mond-en-klauwzeer virus en *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. De bacteriële sporen als oorzaak van dierenziekten worden niet vermeld in het advies van de EFSA.

4.1.2. Identificatie van relevante virussen en hun hittebestendigheid

Uit een literatuurstudie en het advies van deskundigen blijkt dat de meeste virussen die aanwezig kunnen zijn in melk door directe of indirecte contaminatie hittegevoelig zijn en geïnactiveerd worden na een hittebehandeling van 30 min. bij 80 °C of van 60 min. bij 70 °C. Volgens het OIE (2013) wordt het bluetongue virus geïnactiveerd na een hittebehandeling van 15 min. bij 60 °C.

Het mond-en-klauwzeer virus is het meest hittebestendige virus onder de virussen die in de context van dit advies relevant zijn. Daarnaast is het mond-en-klauwzeer virus een meldingsplichtige besmettelijke ziekte waarvoor er inderdaad adequate

voorzorgsmaatregelen moeten getroffen worden om de invoering ervan in België te voorkomen. In Verordening (EU) nr. 142/2011 zijn vereisten opgenomen om de verspreiding van het mond-en-klauwzeer virus via zuivelproducten (melkpoeder bestemd voor kalveren) te vermijden. Eens het mond-en-klauwzeer virus aangetroffen wordt, moeten maatregelen getroffen worden overeenkomstig de wetgeving.

Volgens Tomasula *et al.* (2007) wordt het mond-en-klauwzeer virus in de melk uitgescheiden 33 uur voordat ziekte tekens bij melkkoeien verschijnen. In extreme gevallen verschijnen de ziekte tekens pas na 14 dagen. In die tijd kunnen de rauwe melk en de zuivelproducten als vector voor de ziekte fungeren. Om alle risico's uit te sluiten zou er dus een veilige methode moeten toegepast worden om de overdracht van het virus via centrifuge- en separatorslib te voorkomen.

Het mond-en-klauwzeer virus wordt niet volledig geïnactiveerd na pasteurisatie (71,7 °C/15 s). De verlaging van de besmettelijkheid, gerapporteerd door Donaldson (1997) bedraagt een factor 10^4 - 10^5 (EFSA, 2006). Ook laat het opwarmen van melk tot een temperatuur van 138 °C gedurende 2-3 seconden niet toe om het virus volledig te inactiveren. Volgens Tomasula *et al.* (2007) wordt het mond-en-klauwzeer virus volledig geïnactiveerd na 2 of 3 seconden bij een temperatuur van 148 °C. Een continue pasteurisatie maakt een betere eliminatie van het virus mogelijk dan de batch methodes. Het feit dat pasteurisatie niet alle viruspartikels kan inactiveren wordt verklaard door het feit dat het virus zich hecht aan de vetbolletjes en op celafval omwille van de verminderde wateractiviteit in het vet tijdens het verhitten (Condrón *et al.*, 2015). De tijd nodig om de virale titer te verlagen is lager bij pH 6,7 dan bij pH 7,6 (Tomasula *et al.*, 2007). Met een pH <7 valt het virus in 12 pentameren uiteen, waardoor het viraal RNA vrijkomt. Een risicobeoordeling uitgevoerd door het "United States Department of Agriculture" (USDA) wijst erop dat het risico op infectie bij runderen of varkens door de inname van gepasteuriseerde melk of kaas laag is.

Op basis van de literatuurstudie kunnen we besluiten dat het niet zeker is dat het mond-en-klauwzeer virus volledig geïnactiveerd zou worden door de reglementaire parameters van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven.

In Verordening (EU) nr. 142/2011 worden in de bijlage X, hoofdstuk II, afdeling 4, de specifieke vereisten vermeld betreffende de hittebehandeling van melkpoeder bestemd voor kalveren, meer bepaald ter voorkoming van de overdracht van mond-en-klauwzeer. Melk uit een lidstaat officieel vrij van mond-en-klauwzeer virus, moet vóór de verwerking één van de volgende behandelingen ondergaan:

- een sterilisatie met een F_0 -waarde van ten minste 3,
- een HTST-behandeling (*High Temperature Short Time*) die tweemaal toegepast wordt, of
- een HTST of UHT-behandeling gecombineerd met:
 - o een droogproces gecombineerd met een bijkomende hittebehandeling van minstens 72 °C,
 - o een verlaging van de pH tot onder 6,0 gedurende ten minste één uur, of
 - o de voorwaarde dat in de 21 dagen vóór verzending geen enkele haard van mond-en-klauwzeer in de lidstaat van oorsprong gemeld is.

Voor melkpoeder enkele bestemd voor de Belgische markt zijn meer mogelijkheden beschikbaar.

4.1.3. Identificatie van relevante niet-sporenvormende bacteriën en hun hittebestendigheid

Aan het begin van de 20e eeuw waren tuberculose en brucellose zeer verontrustende ziekten die kunnen overgebracht worden door melk (ILSI, 2012). Aanvankelijk werd *Mycobacterium tuberculosis* beschouwd als de meest hittebestendige pathogeen van melk (Hammer, 1948);

Echter, sinds 1956 wordt *Coxiella burnetii* als meer hittebestendig dan *Mycobacterium tuberculosis* beschouwd.

Pasteurisatie (71,7 °C/ 15 s) is een maatregel die toereikend is om de in melk aanwezige bacteriën onder vegetatieve vorm, met inbegrip van *Coxiella burnetii*, af te doden (SciCom, 2010a, b; advies 25-2010, advies 24-2010). Volgens Cerf en Condron (2006), wordt een 6,8 log₁₀ verlaging bereikt na pasteurisatie (71,7 °C/ 15 s).

De meeste literatuurstudies bevestigen dat *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) hittebestendiger is dan andere *Mycobacterium* spp. Melk en biest kunnen door MAP besmet zijn via fecaliën of door excretie van de bacterie in de melk. Onderzoek naar fecale besmetting van de melk door MAP toont aan dat het gehalte 10⁵ kve per mL kan bedragen (Rademaker *et al.*, 2007). Tot op heden is de kennis van de besmettelijke dosis van MAP beperkt. Uit experimenten met inoculatie bij kalveren blijkt dat de kleinste concentratie die een infectie kan uitlokken 10⁵ kve MAP zou bedragen (Begg en Whittington, 2008; Eisenberg *et al.*, 2010). Volgens het literatuuroverzicht uitgevoerd door Eltholth *et al.* (2009), maakt HTST (*High Temperature Short Time*) pasteurisatie bij 72 °C gedurende 15 s een inactivatie van MAP mogelijk, variërend van 4 log₁₀ tot 7 log₁₀. Sommige auteurs hebben de vaststelling gerapporteerd van een klein aantal MAP-cellen dat in bepaalde monsters van gepasteuriseerde melk overleefden (Foddai *et al.*, 2010). Volgens het "National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods" (NACMCF, 2010) leidt een dubbele pasteurisatie van volle melk tot een verlaging van 5-7 log₁₀ waarbij een klein aantal cellen de behandeling overleeft.

Indien de initiële concentratie hoger is dan 10⁵ kve MAP per mL, zal MAP ten dele het pasteurisatieproces overleven.

Agglutinatie van bacteriën zou een hogere resistentie aan het pasteurisatieproces tot gevolg hebben (Foddai *et al.*, 2010). Homogenisering van melk voor pasteurisatie kan een deel van de celagglomeraten vernietigen en zo de pasteurisatie verbeteren (Grant *et al.*, 2005).

We kunnen besluiten dat verhitting volgens de reglementaire parameters van 30 minuten bij 80 °C of 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven voldoende zijn om MAP en *Coxiella burnetii* af te doden (zie luik 2 hieronder).

4.1.4. Identificatie van relevante sporevormende bacteriën en hun hittebestendigheid

De sporevormende bacteriën *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* kunnen ziekten veroorzaken bij runderen en varkens. De minimale infectieuze dosis voor sporen is niet gekend. Sommige bacteriën kunnen toxines produceren. Dit is het geval bij *Clostridium perfringens*. Silovoer kan een besmettingsbron zijn. De inname van besmet voeder kan leiden tot de vrijgave van sporen in feces. Sporen van Clostridia kunnen ook de spenen besmetten en besmetting van de melk bij het melken bevorderen (Pahlow *et al.*, 2003).

Pasteurisatiecondities zijn onvoldoende om de sporen van bacteriën te vernietigen (vb. sporen van *Clostridium botulinum* en *Clostridium perfringens*). De thermische schok van deze behandeling kan overigens de ontkieming van de sporen veroorzaken waarna er mogelijk groei kan optreden.

Dubbele pasteurisatie werd getest door Premaratne en Cousin (1991), Kim *et al.* (2012), Løvdal *et al.* (2011) en Samapundo *et al.* (2009) om de eliminatie van sporen van *Bacillus cereus* te bestuderen. Uit deze studies blijkt dat de duopasteurisatie een verlaging van het aantal sporen mogelijk maakt, maar niet leidt tot sterilisatie van het product. Het effect van duopasteurisatie wordt sterk bepaald door het niveau van ontkieming van de sporen dat kan worden bereikt; dit blijkt vooral afhankelijk te zijn van het natuurlijk gehalte aan ontkiemingsbevorderende componenten zoals inosine en vrije aminozuren (L-alanine) in het product.

Een UHT-behandeling of klassieke sterilisatie (aan temperaturen hoger dan 100 °C) is noodzakelijk om de bacteriële sporen te vernietigen (SciCom, 2011; advies 15-2011). Er moet

worden opgemerkt dat melkpoeder sporen kan bevatten, omdat het droogproces niet gekoppeld is aan een voldoende verhitting om de sporen af te doden. Ter herinnering, volgens een rapport van het NIZO (2012) bevat centrifugeslib 17 keer meer mesofiele sporen dan melk (NIZO-report E 2012/125).

In the Europese wetgeving zijn er geen criteria voor dierenziekten vermelden die veroorzaakt worden door sporen. Het risico bestaat dat sporen (vb. van *Clostridium perfringens* of van *Clostridium botulinum*) in centrifuge- en separatorslib teruggevonden worden.

Een hittebehandeling van 30 min. bij 80 °C of van 60 min. bij 70 °C is dus niet voldoende om de sporen van bacteriën te vernietigen. Integendeel, na verhitting kunnen deze sporen ontkiemen en verder uitgroeien wanneer de externe omstandigheden groei toelaten. Om alle risico's op overdracht van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* uit te sluiten, zou de groei van deze pathogenen dienen beperkt te worden na het hitteproces. Dit kan door het slib na verhitting te koelen, te verzuren, te drogen of na een beperkte bewaartijd aan de dieren toe te dienen.

4.1.5. Besluit van luik 1

Vanwege hun thermosresistentie zijn het mond-en–klauwzeer virus, de niet-sporenvormende bacteriën *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en *Coxiella burnetii* alsook de sporenvormende bacteriën *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* de meest relevante pathogenen voor de diergezondheid die na hittebehandeling aanwezig zouden kunnen zijn in centrifuge- en separatorslib.

Op basis van de literatuurstudie kunnen we besluiten dat het niet zeker is dat het mond-en-klauwzeer virus volledig geïnactiveerd zou worden door de reglementaire condities van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven. Als richtsnoer voor het afdoden van het mond-en-klauwzeer virus stelt het Wetenschappelijk Comité voor om dezelfde behandelingen te volgen als deze van de wetgeving voor melkpoeder bestemd voor diervoeding. Deze behandelingen omvatten één van deze behandelingen:

- een sterilisatie met een F_0 -waarde van ten minste 3,
- een HTST-behandeling (*High Temperature Short Time*) die tweemaal toegepast wordt, of
- een HTST- of UHT-behandeling gecombineerd met:
 - o een droogproces gecombineerd met een bijkomende hittebehandeling van minstens 72 °C,
 - o een verlaging van de pH tot onder 6,0 gedurende ten minste één uur, of
 - o de voorwaarde dat in de 21 dagen vóór verzending geen enkele haard van mond-en-klauwzeer in de lidstaat van oorsprong vermeld is.

De hittebehandeling volgens de reglementaire parameters van 30 minuten bij 80 °C of 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven is voldoende om *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* en *Coxiella burnetii* af te doden.

De hittebehandeling volgens de reglementaire parameters is niet voldoende voor de afdoding van de sporen van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum*. Na verhitting kunnen deze sporen ontkiemen en verder uitgroeien wanneer de externe omstandigheden groei toelaten. Om alle risico's op overdracht van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* uit te sluiten, zou de groei van deze pathogenen dienen beperkt te worden na het hitteproces. Dit kan door het slib na verhitting te koelen, te verzuren, te drogen of de bewaartijd te beperken vooraleer ze aan de dieren worden toegediend.

4.2. Luik 2: Alternatieve verhittingsparameters formuleren die equivalent zijn aan een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C en van 60 minuten bij 70 °C

Er moet worden opgemerkt dat een hittebehandeling van 30 min. bij 80 °C niet leidt tot eenzelfde microbiologische afdoding als een hittebehandeling van 60 min. bij 70 °C (zie tabellen 2, 3 en 4).

Het NIZO heeft in 2012 een risicoanalyse van centrifugeslib uitgevoerd. Figuur 2 van het verslag van deze studie (NIZO-report E 2012/125) geeft de combinatie van tijd x temperatuur weer die equivalent is aan een referentiecombinatie van tijd x temperatuur van 30 minuten bij 80 °C voor een activeringsenergie tussen 200 à 400 kJ/mol, berekend met het Premiamodel. Voor wat de vernietiging van bacteriën onder vegetatieve vorm betreft, is volgens deze figuur een behandeling van 25 s bij 95 °C gelijk aan een behandeling van 30 min. bij 80 °C in geval van een activeringsenergie (Ea) van 300 kJ/mol.

Het Wetenschappelijk Comité stelt voor om de equivalentie van tijd x temperatuurscombinaties met betrekking tot de vernietiging van niet-sporenvormende bacteriën na te gaan op basis van de vernietiging van MAP en *Coxiella burnetii*, welke de meest pasteurisatieresistente bacteriën zijn, gebruik makende van de meest ongunstige D- en z-referentiewaarden. In tabel 1 worden de meest ongunstige D- en z-waarden uit de literatuur voor *Coxiella burnetii* en MAP in melk opgenomen.

Tabel 1: De meest ongunstige (conservatieve) D- en z-referentiewaarden uit de literatuur voor *Coxiella burnetii*, MAP en MAP-stam ATCC 19698

	Dref. bij Tref.	z-waarde	Referenties
<i>Coxiella burnetii</i>	2,21s bij 71,7 °C	4,34 °C	Cerf en Condron 2006
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	4,2 s bij 72 °C	6,9 °C	Foddai <i>et al.</i> , 2010
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> stam ATCC 19698	<2,03s bij 72 °C	8,6 °C	NACMCF (2010)

Op basis van de D en z-referentiewaarden voor de bijhorende referentietemperatuur (Tref) weergegeven in tabel 1, werd de microbiële inactivatie (aantal log-reducties) vastgesteld voor vier combinaties van tijd x temperatuur (60 min bij 70 °C, 30 min bij 80 °C, 25 s bij 95 °C en 15 s bij 72 °C).

In eerste instantie (zie eerste lijn in tabellen 2, 3, en 4) werden de D-waarden bij temperaturen van 70 °C, 72 °C, 80 °C en 95 °C bepaald volgens de volgende formule:

$$D = D_{ref} \cdot 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}}$$

Vervolgens werd het aantal log-reducties berekend voor de 4 combinaties tijd x temperatuur aan de hand van de volgende formule: $\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D}$

waarbij T de temperatuur is en t de tijd.

Deze resultaten worden weergegeven in de tweede lijn van tabellen 2, 3 en 4.

Tabel 2: Aantal log-reducties van *Coxiella burnetii* voor verschillende "tijd x temperatuur"scombinaties.

	Tijd x temperatuurs-combinatie #1: 60 minuten bij 70 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #2: 30 minuten bij 80 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #3: 25 s bij 95 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #4: 15 s bij 72 °C
D-waarde (s) berekend met Tref=71,7°C, Dref=2.21s en Z=4,34 °C	5,45 bij 70 °C	0,027 bij 80 °C	9,5E-06 bij 95 °C	1,88 bij 72 °C
Het aantal log-reducties (log ₁₀) voor de tijd x temperatuurs-combinatie	661	66 576	2 643 694	8,0

Tabel 3: Aantal log-reducties van MAP voor verschillende "tijd x temperatuur"scombinaties.

	Tijd x temperatuurs-combinatie #1: 60 minuten bij 70 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #2: 30 minuten bij 80 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #3: 25 s bij 95 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #4: 15 s bij 72 °C
D-waarde (s) berekend met Tref=72°C, Dref=4,2s en Z=6,9 °C	8,19 bij 70 °C	0,29 bij 80 °C	0,002 bij 95 °C	4,20 bij 72 °C
Het aantal log-reducties (log ₁₀) voor de tijd x temperatuurs-combinatie	439	6 186	12 824	3,6

Tabel 4: Aantal log-reducties van de MAP-stam ATCC19698 voor verschillende "tijd x temperatuur"scombinaties

	Tijd x temperatuurs-combinatie #1: 60 minuten bij 70 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #2: 30 minuten bij 80 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #3: 25 s bij 95 °C	Tijd x temperatuurs-combinatie #4: 15 s bij 72 °C
D-waarde (s) berekend met Tref=72°C, Dref=2,03s en Z= 8,6 °C	3,47 bij 70 °C	0,24 bij 80 °C	0,004 bij 95 °C	2,03 bij 72 °C
Het aantal log-reducties (log ₁₀) voor de tijd x temperatuurs-combinatie	1 038	7 551	5 819	7,4

Op basis van de D- en z-waarden die gekend zijn voor *Coxiella burnetii* in melk (tabel 1) blijkt uit de berekening van het aantal log-reducties voor vier tijd x temperatuurscombinaties (tabel 2) dat:

- de behandeling van 25 s bij 95 °C tot de meeste log-reducties van *Coxiella burnetii* leidt;
- de drie combinaties 60 min. bij 70 °C, 30 min. bij 80 °C en 25 s bij 95 °C leiden tot een zeer hoog aantal log-reducties van *Coxiella burnetii*;
- de behandeling van 15 s bij 72 °C, algemeen gebruikt voor een HTST-pasteurisatie van melk, leidt tot een veel lager aantal theoretische log-reducties van *Coxiella burnetii*.

Op basis van de gekende D- en z-waarden voor MAP in melk (tabel 1) blijkt uit de berekening van het aantal log-reducties voor vier tijd x temperatuurscombinaties (tabel 3) dat:

- de behandeling van 25 s bij 95 °C ook tot het hoogste aantal log-reducties van MAP leidt;
- de drie combinaties 60 min. bij 70 °C, 30 min. bij 80 °C en 25 s bij 95 °C leiden tot een zeer hoog aantal log-reducties;
- de behandeling van 15 s bij 72 °C, algemeen gebruikt voor een HTST-pasteurisatie van melk, leidt tot een veel lager aantal log-reducties van MAP.

Op basis van de gekende D- en z-waarden voor de MAP-stam ATCC 19698 in melk (tabel 1) blijkt uit de berekening van het aantal log-reducties voor vier tijd x temperatuurscombinaties (tabel 4) dat:

- de behandeling van 30 min. bij 80 °C tot het hoogste aantal log-reducties van de MAP-stam ATCC 19698 leidt;
- de drie combinaties 60 min. bij 70 °C, 30 min. bij 80 °C en 25 s bij 95 °C leiden tot een zeer hoog aantal log-reducties;
- de behandeling van 15 s bij 72 °C, algemeen gebruikt voor een HTST-pasteurisatie van melk, leidt tot een veel lager aantal log-reducties.

De hittebehandelingen (combinaties tijd x temperatuur), die leiden tot een equivalente log-reductie die gelijkwaardig is aan deze bij een hittebehandeling van 60 min. bij 70 °C en van 30 min. bij 80 °C, evenals de hittebehandeling van 25 s bij 95 °C voor *Coxiella burnetii*, MAP en de MAP-stam ATCC 19698, zijn opgenomen in tabel 5.

Tabel 5: Tijd (minuten) x temperatuurs (°C)-combinaties, die leiden tot een log-reductie die equivalent is aan een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C en van 30 minuten bij 80 °C, evenals van 25 seconden bij 95 °C voor *Coxiella burnetii*, MAP en MAP (ATCC 19698-stam)

T [°C]	<i>Coxiella burnetii</i>			<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>			<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> strain ATCC 19698		
	t[min] – equivalent aan 70°C/ 60 min	t[min] - equivalent aan 80°C/ 30 min	t[min] - equivalent met 95°C/ 25s	t[min] - equivalent aan 70°C/ 60 min	t[min] - equivalent aan 80°C/ 30 min	t[min] equivalent aan 95°C/ 25s	t[min] equivalent aan 70°C/ 60 min	t[min] equivalent aan 80°C/ 30 min	t[min] equivalent aan 95°C/ 25 s
63	2 461	247 840	9 841 485	620	8 727	18 091	391	2 844	2 191
64	1 448	145 800	5 789 565	444	6 251	12 958	299	2 176	1 677
65	852	85 771	3 405 894	318	4 477	9 281	229	1 665	1 283
66	501	50 458	2 003 625	228	3 207	6 648	175	1 274	981
67	295	29 683	1 178 696	163	2 297	4 762	134	974	751
68	173	17 462	693 405	117	1 645	3 411	103	746	575
69	102	10 273	407 917	84	1 178	2 443	78	570	440
70	60	6 043	239 970	60	844	1 750	60	436	336
71	35	3 555	141 170	43	605	1 253	46	334	257
72	21	2 091	83 048	31	433	898	35	255	197
73	12	1 230	48 855	22	310	643	27	195	151
74	7,2	724	28 741	16	222	461	21	150	115
75	4,2	426	16 908	11	159	330	16	114	88
76	2,5	250	9 946	8,1	114	236	12	88	67
77	1,5	147	5 851	5,8	82	169	9,2	67	52
78	0,86	87	3 442	4,2	58	121	7,0	51	39
79	0,51	51	2 025	3,0	42	87	5,4	39	30
80	0,30	30	1 191	2,1	30	62	4,1	30	23
81	0,18	18	701	1,5	21	45	3,2	23	18

82	0,10	10	412	1,1	15	32	2,4	18	14
83	0,06	6,1	243	0,78	11	23	1,8	13	10
84	0,04	3,6	143	0,56	7,9	16	1,4	10	7,9
85	0,02	2,1	84	0,40	5,7	12	1,1	7,9	6,1
86	0,01	1,2	49	0,29	4,1	8,4	0,83	6,0	4,6
87	0,01	0,73	29	0,21	2,9	6,0	0,63	4,6	3,5
88	0,004	0,43	17	0,15	2,1	4,3	0,48	3,5	2,7
89	0,003	0,25	10	0,11	1,5	3,1	0,37	2,7	2,1
90	0,001	0,15	5,9	0,08	1,1	2,2	0,28	2,1	1,6
91	0,001	0,09	3,5	0,05	0,76	1,6	0,22	1,6	1,2
92	0,001	0,05	2,0	0,04	0,55	1,1	0,17	1,2	0,93
93	0,0003	0,03	1,2	0,03	0,39	0,81	0,13	0,92	0,71
94	0,0002	0,02	0,71	0,02	0,28	0,58	0,10	0,71	0,54
95	0,0001	0,01	0,42	0,01	0,20	0,42	0,07	0,54	0,42

Legende:

- De temperatuur van 72 °C is de toe te passen temperatuur die door de sector wordt voorgesteld om centrifuge- en separatorslib te behandelen. Bij een temperatuur van 90 °C is de behandelingstijd 17 seconden. Deze tijd ligt dichtbij de behandelingstijd die gewoonlijk toegepast wordt bij een HTST-pasteurisatie (15 seconden).

Besluit van luik 2

In tabel 5 worden tijd (minuten) x temperatuur (°C) combinaties weergegeven die leiden tot een log-reductie die equivalent is aan een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C en van 30 minuten bij 80 °C voor *Coxiella burnetii*, MAP en MAP-stam ATCC 19698. Tevens worden, als bijkomende informatie, behandelingen gegeven die equivalent zijn aan een behandeling van 25 seconden bij 95 °C.

De toe te passen temperatuur die door de sector wordt voorgesteld om centrifuge- en separator-slib te behandelen is 72 °C. Op basis van tabel 5 (zie bovenste lijn in vet) kan bij 72 °C een behandelingsduur van 35 minuten afgeleid worden als zijnde equivalent aan een hittebehandeling van 60 minuten bij 70°C voor de inactivatie van de drie beschouwde micro-organismen uitgaande van de beschikbare kennis in de literatuur. Een behandeling van 17 seconden bij 90 °C (zie tabel 5 onderste lijn in vet) is eveneens equivalent.

De tijd x temperatuurscombinaties die in dit advies als equivalent worden voorgesteld zijn theoretische parameters. Bij toepassing in de praktijk kan men rekening houden met een opwarmings- en afkoelingsperiode die de veiligheid van het product nog zal verhogen door de bijkomende hittebelasting op het product. Deze opwarmings- en afkoelingsperiode kunnen sterk verschillen naargelang de gebruikte installatie en proces (bv. batch of continu proces). Het is echter belangrijk te noteren dat de gegevens beschikbaar in de literatuur die werden gehanteerd in dit advies betrekking hebben op de thermische weerstand van pathogenen in melk en niet in centrifuge- en separator-slib. Rekening houdende met het feit dat slib minder rijk is aan water dan melk, kan aangenomen worden dat de micro-organismen waarschijnlijk hitteresistenter zijn in slib dan in melk. De toepassing in de praktijk moet worden gevalideerd om een voldoende afdoening van micro-organismen in het slib te waarborgen.

4.3. Luik 3: Voorstellen van labotesten om de verhitting te verifiëren

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat het niet pertinent is om een microbiologische test voor te stellen waarmee de effectiviteit van de pasteurisatiebehandeling aangetoond kan worden. De temperatuur en de tijd tijdens de pasteurisatie alsook de bewaaromstandigheden van het gepasteuriseerde product zijn de belangrijkste parameters in relatie tot de microbiologische risicobeheersing. Het zijn deze parameters die via het autocontrolesysteem als kritische controlepunten dienen opgevolgd te worden.

Om het eindproduct te verifiëren en het proces te valideren, wordt aangeraden een microbiologische test te gebruiken. In dit verband beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om de *Enterobacteriaceae* (hygiëne-indicator) te tellen in het slib na behandeling door middel van de ISO 21528-1 methode. Het criterium uit de Verordening (EU) nr. 142/2011 voor dierlijke bijproducten bestemd voor diervoeding is:

$n = 5$, $c = 2$, $m = 10$, $M = 300$ in 1 g

met n = aantal te testen monsters;

m = de drempel voor het aantal bacteriën. Het resultaat wordt als toereikend beschouwd als het aantal bacteriën in het totaal aantal monsters m niet overschrijdt;

M = de maximum waarde van het aantal bacteriën. Het resultaat wordt als ontoereikend beschouwd als het aantal bacteriën in een of meerdere monsters hoger of gelijk is aan M ;

c = het maximum aantal monsters waarin het aantal bacteriën zich situeert tussen m en M , waarbij de monsternamen eenheid steeds als aanvaardbaar wordt beschouwd als het aantal bacteriën in de andere monsters lager of gelijk is aan m .

Als *Enterobacteriaceae* worden geteld, dienen de doeltreffendheid van de hittebehandeling en de procedures voor de preventie van herbesmetting (onderzoek naar de bronnen van de kruisbesmetting na pasteurisatie) geverifieerd te worden.

De chemische (bio)indicatoren die normaal gezien aangewend worden om de efficiëntie van de hittebehandeling van melk na te gaan, zijn:

- alkalische-fosfataseactiviteit (conventionele pasteurisatie),
- lactoperoxidase-activiteit ("hoge" pasteurisatie),
- lactulose / lactose

In het kader van de hittebehandeling van centrifuge-/separatorslib zou men de verhitting aan de hand van een indicator kunnen verifiëren. De verhouding van lactulose op lactose kan hiervoor gebruikt worden. De tolerantiecriteria van consumptiemelk mogen evenwel niet zomaar overgenomen worden omdat de fysisch-chemische eigenschappen van centrifugeslib te veel verschillen met deze van melk. Om over de juiste criteria te kunnen beschikken, is het te adviseren de vorming van lactulose vast te leggen voor de standaardverhittingen van 60 min. bij 70 °C en 30 min. bij 80 °C. Een lactulose/lactoseverhouding die minstens zo hoog is als bij de standaardverhittingen kan dan uitsluitend geven voor een veilige hittebehandeling. De nadelen van deze methode zijn evenwel dat de analyses slechts in een goed uitgerust laboratorium kunnen uitgevoerd worden en tijdrovend zijn. Een interessant alternatief zou de bepaling van de lactoperoxidase (LPO)-activiteit kunnen zijn. Een tienvoudige reductie van de LPO-activiteit (in melk) wordt bekomen door de melk gedurende 100 min. bij 70 °C te verhitten. De verhitting voor inactivatie van LPO is dus van dezelfde grootteorde als deze die dient gebruikt te worden voor de standaardverhitting van centrifugeslib. Deze analyse kan snel en eenvoudig uitgevoerd worden. Ook hier zal bijkomend onderzoek nodig zijn om na te gaan welke mate van LPO-denaturatie de nodige garanties kan geven voor de veilige hittebehandeling van centrifugeslib.

Besluit van luik 3

De belangrijkste parameters in relatie tot de microbiologische risicobeheersing zouden in het HACCP-plan van de operator moeten worden geïntegreerd. Hiervoor is het belangrijk de temperatuur en de tijd bij de hittebehandeling en de verdere bewaaromstandigheden te controleren wanneer de wijze waarop het behandelde slib bewaard wordt het mogelijk maakt dat sporenvormende bacteriën groeien. Hiervoor geeft het Wetenschappelijk Comité als aanbeveling om de "Good Manufacturing en Good Agricultural Practices" toe te passen voor de verwerking en de bewaring van het gepasteuriseerde product.

Om het eindproduct te verifiëren en het proces te valideren wordt aangeraden om *Enterobacteriaceae* als indicatorkiem te gebruiken.

Om de verhitting te verifiëren zou ook een chemische (bio)indicator kunnen worden gebruikt. Mogelijkheden zijn de verhouding van lactulose op lactose en de bepaling van de LPO-activiteit. Vooraleer deze indicatoren kunnen toegepast worden, dienen de indicatoren gevalideerd te worden voor de te behandelen matrix en voor de verhittingscondities die worden gehanteerd.

5. Onzekerheden

De gegevens met betrekking tot de resistentie van bepaalde pathogenen aan hittebehandelingen zijn zeer onvolledig en bijkomend onderzoek is nodig.

De gegevens beschikbaar in de literatuur hebben betrekking op de thermische weerstand van pathogenen in melk en niet in centrifuge- en separatorslib. Rekening houdende met het feit dat slib minder rijk is aan water dan melk, kan aangenomen worden dat de micro-organismen waarschijnlijk hitteresistenter zijn in slib dan in melk.

De inactiveringscurven gerapporteerd door de studie van Foddai *et al.* (2010) zijn niet log-lineair, maar concaaf. Dit betekent dat de inactivatie vermindert met de behandelingstijd en dat de D-waarde geen constante is in de tijd. Echter, de D- en z-waarden vermeld door Foddai *et al.* (2010) zijn de meest ongunstige waarden gerapporteerd in de literatuur en werden daarom toch weerhouden voor gebruik in dit advies.

6. Besluit

Verordening (EU) 142/2011 vermeldt de procesparameters voor de hittebehandeling van centrifuge- en separatorslib afkomstig van de verwerking van melk (categorie 3-materiaal) en bestemd voor diervoeding. Aan het Wetenschappelijk Comité wordt gevraagd om een methodologie voor te stellen voor de verificatie en de validatie van alternatieve procesparameters die minstens leiden tot een gelijkaardige verlaging van het risico als de reglementaire parameters.

Het Wetenschappelijk Comité heeft dit dossier in drie luiken behandeld:

- Luik 1: Nagaan of de reglementaire parameters voldoende zijn om de diergezondheid te garanderen;
- Luik 2: Alternatieve verhittingsparameters formuleren equivalent aan een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C en van 60 minuten bij 70 °C;
- Luik 3: Labotesten voorstellen om de verhitting te verifiëren.

Besluit van luik 1

Het mond-en-klauwzeer virus, de niet-sporenvormende bacteriën *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Coxiella burnetii* en de sporenvormende bacteriën *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* zijn de meest relevante pathogenen voor de diergezondheid die zouden kunnen aanwezig zijn in centrifuge- en separatorslib na de hittebehandeling ervan.

Op basis van de literatuurstudie kunnen we besluiten dat het niet zeker is dat het mond-en-klauwzeer virus volledig geïnactiveerd zou worden bij de reglementaire condities van 30 minuten bij 80 °C of van 60 minuten bij 70 °C voor centrifuge- en separatorslib geproduceerd in melkbedrijven. Daarnaast is het mond-en-klauwzeer virus een meldingsplichtige besmettelijke ziekte waarvoor er inderdaad adequate voorzorgsmaatregelen moeten getroffen worden om de invoering ervan in België te voorkomen. Als richtsnoer voor het afdoden van het mond-en-klauwzeer virus stelt het Wetenschappelijk Comité voor om dezelfde behandelingen te volgen als deze van de wetgeving voor melkpoeder bestemd voor diervoeding. Deze behandelingen bevatten één van deze behandelingen:

- een sterilisatie met een F_0 -waarde van ten minste 3,
- een HTST-behandeling (*High Temperature Short Time*) die tweemaal toegepast wordt, of
- een HTST- of UHT-behandeling gecombineerd met:
 - o een droogproces gecombineerd worden met een bijkomende hittebehandeling van ten minste 72 °C,
 - o een verlaging van de pH tot onder 6,0 gedurende ten minste één uur, of;
 - o de voorwaarde dat in de 21 dagen vóór verzending geen enkele haard van mond- en klauwzeer in de lidstaat van oorsprong vermeld is.

Hittebehandeling volgens de reglementaire parameters (30 minuten bij 80 °C of 60 minuten bij 70 °C) is wel voldoende voor de afdoding van *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Coxiella burnetii*.

Hittebehandeling volgens de reglementaire parameters is niet voldoende voor de afdoding van de sporen van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum*. Na verhitting kunnen deze sporen ontkiemen en verder uitgroeien wanneer de externe omstandigheden groei toelaten. Om alle risico's op overdracht van *Clostridium perfringens* en *Clostridium botulinum* uit te sluiten, zou de groei van deze pathogenen dienen beperkt te worden na het hitteproces. Dit kan door het slib na verhitting te koelen, te verzuren, te drogen of de bewaartijd te beperken vooraleer ze aan de dieren worden toegediend.

Besluit van luik 2

Het Wetenschappelijk Comité stelt voor om de equivalentie van tijd x temperatuurscombinaties met betrekking tot de afdoding van niet-sporenvormende bacteriën te onderzoeken op basis van de afdoding van *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Coxiella burnetii*, welke de meest pasteurisatieresistente bacteriën zijn, gebruik makende van de vermeld in de literatuur meest ongunstige D- en z-referentiewaarden.

Er wordt opgemerkt dat een hittebehandeling van 30 minuten bij 80 °C niet leidt tot eenzelfde microbiologische afdoding als een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C.

In het advies worden tijd (minuten) x temperatuurs (°C)-combinaties weergegeven die leiden tot een log-reductie die equivalent is aan een hittebehandeling van 60 minuten bij 70 °C en van 30 minuten bij 80 °C voor *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC 19698-stam). Tevens worden, als bijkomende informatie, behandelingen gegeven die equivalent zijn aan een behandeling van 25 seconden bij 95 °C.

De toe te passen temperatuur die door de sector wordt voorgesteld om centrifuge- en separatorslib te behandelen is 72°C. Bij 72°C is een behandeltime van 35 minuten equivalent voor de inactivatie van de drie beschouwde micro-organismen als een hittebehandeling voor 60 minuten bij 70°C uitgaande van de beschikbare kennis in de literatuur. Een behandeling van 17 seconden bij 90 °C is eveneens equivalent.

De tijd x temperatuurscombinaties die in dit advies als equivalent worden voorgesteld zijn theoretische parameters. Bij toepassing in de praktijk kan men rekening houden met een opwarmings- en afkoelingsperiode die de veiligheid van het product nog zal verhogen door de bijkomende hittebelasting op het product. Deze opwarmings- en afkoelingsperiode kunnen sterk verschillen naargelang de gebruikte installatie en proces (bv. batch of continu proces). Het is echter belangrijk te noteren dat de gegevens beschikbaar in de literatuur die werden gehanteerd in dit advies betrekking hebben op de thermische weerstand van pathogenen in melk en niet in centrifuge- en separatorslib. Rekening houdende met het feit dat slib minder rijk is aan water dan melk, kan aangenomen worden dat de micro-organismen waarschijnlijk hitteresistentier zijn in slib dan in melk. De toepassing in de praktijk moet worden gevalideerd om een voldoende afdoding van micro-organismen in het slib te waarborgen.

Besluit van luik 3

De belangrijkste parameters met betrekking tot de microbiologische risicobeheersing zouden in het HACCP-plan van de operator moeten worden geïntegreerd. Het is belangrijk de temperatuur en de tijd bij de hittebehandeling en de verdere bewaaromstandigheden te controleren wanneer de wijze waarop het behandelde slib bewaard wordt het mogelijk maakt dat sporenvormende bacteriën uitgroeien. Hiervoor geeft het Wetenschappelijk Comité als aanbeveling om de "Good Manufacturing en Good Agricultural Practices" toe te passen voor de verwerking en de bewaring van het gepasteuriseerde product.

Teneinde het eindproduct te verifiëren en het proces te valideren, wordt aangeraden om *Enterobacteriaceae* als indicatorkiem te gebruiken. Om de verhitte te verifiëren zou ook een chemische (bio)indicator kunnen worden gebruikt. Mogelijkheden zijn de verhouding van de lactulose op lactose en de bepaling van de lactoperoxidase-activiteit. Vooraleer deze indicatoren kunnen toegepast worden, zouden de indicatoren dienen gevalideerd te worden voor de te behandelen matrix en voor de verhittingscondities die worden gehanteerd.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)

Brussel, 01/12/2015

Referenties

- Begg D.J., Whittington R.J. 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *The Veterinary Journal*, 176, 129–145.
- Cerf O., Condron R. 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle. *Epidemiology & Infection*, 134, 94-951.
- Condron R., Farrokh C., Jordan K., McClure P., Ross T., Cerf O. 2015. Guidelines for experimental design protocol and validation procedure for the measurement of heat resistance of microorganisms in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 192, 20–25.
- Donaldson A. I., Gibson, C. F., Oliver R., Hamblin C., Kitching R. P. 1987. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains. *Research in Veterinary Science*, 43, 339–346.
- EFSA. 2006. Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to "The animal health risks of feeding animals with ready-to-use dairy products without further treatment. *The EFSA Journal*, 347, 1-21.
- Eltholth M.M., Marsh V.R, Van Winden S., Guitian F.J. 2009. Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1061–1071.
- Eisenberg S.W.F., Koets A.P., Nielen M., Heederik D., Mortier R., De Buck J., Orsel K. 2011. Intestinal infection following aerosol challenge of calves with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Veterinary Research*, 42, 117-125.
- Foddai A., Elliott C. T., Grant I.R. 2010. Rapid assessment of the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells after heat treatment, using an optimized phage amplification assay. *Applied and environmental microbiology*, 76 (6), 1777–1782.
- Grant I.R., Williams A.G., Rowe M.T., Muir D.D. 2005. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2853–2861.
- ILSI (International Live Sciences Institute) 2012. Risk assessment approaches to setting thermal processes in food manufacture.
- Kim H., Kim H., Bang J. et al. 2012. Reduction of *Bacillus cereus* spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. *Letters in applied microbiology*, 55(3), 218-223.
- LeAF. 2008. Inventarisatie van het risico van transmissie van pathogenen uit biogas. beschikbaar via <http://www.rvo.nl/sites/default/files/bijlagen/Inventarisatie%20van%20het%20risico%20van%20transmissie%20van%20pathogenen%20uit%20biogas%20-%20Van%20biogas%20naar%20Groen%20Gas.pdf>
- Løvdaal I. S., Hovda M. B., Granum P. E. et al. 2011. Promoting *Bacillus cereus* spore germination for subsequent inactivation by mild heat treatment. *Journal of food protection*, 74 (12), 2079-2089.
- NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods). 2010. Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *Journal of Food Protection*, 73 (7), 1357-1397.

OIE, 2013. Bluetongue. OIE Technical Disease Cards. Disponible via http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/BLUETONGUE.pdf

Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H., Spoelstra S.F. 2003. Microbiology of ensiling. In: Silage science and technology. Buxton, D.R., Muck, R.E., & Harrison, J.H., pp. 31-93, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, US.

Premaratne R.J., Cousin M.A. 1991. Microbiological analysis and starter culture growth in rementales. Journal of Dairy Science, 74 (10), 3284-3292.

Rademaker J.L.W., Vissers M.M.M. te Giffel M. 2007. Effective heat inactivation of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in raw milk contaminated with naturally infected feces. Applied and Environmental Microbiology, 73, 4185-4190.

Samapundo S., Heyndrickx M., Devlieghere F. 2009. Verlenging van de microbiologische houdbaarheid; WP3: Psychrotrofe pathogene sporevormers. Eindrapport Flanders Food project 2006-2009. 163 p.

SciCom (Wetenschappelijk Comité), 2010a. Advies 25-2010: Bewaking, preventie en bestrijding van *Coxiella burnetii* in rundveebedrijven (dossier Sci Com 2010/12). Beschikbaar via http://www.favv-afsva.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES25-2010_NL_DOSSIER2010-12.pdf.

SciCom (Wetenschappelijk Comité), 2010b, Advies 24-2010: Evaluatie van een programma voor de bewaking, de preventie en de bestrijding van *Coxiella burnetii* bij kleine herkauwers. Beschikbaar via http://www.favv-afsva.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES24-2010_NL_DOSSIER2010-11.pdf.

SciCom (Wetenschappelijk Comité), 2011. Advies 15-2011: Evaluatie van de risico's en baten van de consumptie van rauwe koemelk en het effect van thermische behandeling van rauwe melk op deze risico's en baten (dossier Sci Com 2010/25, eigen initiatief). Beschikbaar via http://www.favv-afsva.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES15-2011_NL_DOSSIER2010-25.pdf.

Tomasula P.M., Konstance R.P. 2004. The survival of Food-and-Mouth disease virus in raw and pasteurized milk and milk products. Journal of Dairy Science, 87 (4), 1115-1121.

Tomasula P.M., Kozempel M.F., Konstance R.P., Gregg D., Boettcher S., Baxt B., Rodriguez L.L. 2007. Thermal inactivation of foot-and-mouth disease virus in milk using high-temperature, short-time pasteurization. Journal of Dairy Science, 90 (7), 3202-3211.

Van Renterghem R. & Hendrickx M. 2001. "Intrinsieke indicatoren voor de authenticiteit van hittebehandelde consumptiemelk" Eindverslag van project NP/43/033 en NP/01/034 van de Federale Diensten voor Wetenschappelijke, Technische en Culturele Aangelegenheden (DWTC).

Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden :

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, S. De Saeger, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg.

Belangenconflict

Er werd geen belangenconflict vastgesteld.

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor risicobeoordeling en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies.

Samenstelling van de werkgroep

De werkgroep was samengesteld uit:

Leden van het Wetenschappelijk Comité	A. Clinquart (verslaggever), L. De Zutter, L. Herman, M. Sindic, M. Uyttendaele
Externe experts	J. De Block (ILVO), A. Geeraerd (KU Leuven), F. Boyen (UGent)

Het Wetenschappelijk Comité dankt G. Daube voor de peer review van het advies.

Wettelijk kader van het advies

Wet van 4 februari 2000 houdende oprichting van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, inzonderheid artikel 8;

Koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen;

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 9 juni 2011.

Disclaimer

Het Wetenschappelijk Comité behoudt zich, te allen tijde, het recht voor dit advies te wijzigen indien nieuwe informatie en gegevens ter beschikking komen na de publicatie van deze versie.