

ADVIES 09-2016

Betreft:

**Groei van *Listeria monocytogenes* in
rauwmelkse hoeveboter**

(SciCom 2016/06)

Wetenschappelijk advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 20 mei 2016

Sleutelwoorden:

Listeria monocytogenes, rauwmelkse hoeveboter, groei, provocatietest, houdbaarheidstest

Key terms:

Listeria monocytogenes, raw milk homestead butter, growth, challenge test, durability study

Inhoudstafel

Samenvatting	3
Summary	4
1. Referentietermen	5
1.1. Vraagstelling	5
1.2. Wettelijke bepalingen	5
1.3. Methodologie	5
2. Context	5
3. Evaluatie van de aangeleverde gegevens	7
3.1. Provocatietesten	7
3.2. Houdbaarheidstesten	9
3.3. Bijkomende informatie	12
4. Resultaten van het controleprogramma van het FAVV	13
5. Literatuurstudie met betrekking tot <i>Listeria monocytogenes</i> in boter	13
6. Provocatietesten en houdbaarheidstesten van <i>Listeria monocytogenes</i> in boter	15
7. Conclusie	16
8. Aanbevelingen	17
Referenties	18
Leden van het Wetenschappelijk Comité	20
Belangenconflict	20
Dankbetuiging	20
Samenstelling van de werkgroep	21
Wettelijk kader	21
Disclaimer	21

Tabellen

Tabel 1. Voedselveiligheidscriteria voor <i>Listeria monocytogenes</i> volgens Verordening (EG) Nr. 2073/2005	6
Tabel 2. Resultaten van een Belgische studie van provocatietesten met <i>Listeria monocytogenes</i> op rauwmelkse hoeveboter (zonder toevoeging van fermenten of zout)	8
Tabel 3. <i>Listeria monocytogenes</i> in natuurlijk gecontamineerde hoeveboter (elf loten van acht producenten) .	10
Tabel 4. Voorspelling van de groei van <i>Listeria monocytogenes</i> in een laboratoriummedium met eigenschappen overeenkomend met die van de boter van lot 10 (pH 6,23 en a_w 0,980) na 4 dagen bewaring bij 7 °C	11

Figuren

Figuur 1. 68,2 % en 95,0 % betrouwbaarheidsinterval rond de ComBase Predictor modelvoorspelling (zonder lagfase en gebaseerd op de onzekerheid geassocieerd met de groeisnelheid) van de groei van <i>Listeria monocytogenes</i> in een laboratoriummedium met eigenschappen overeenkomend met die van de boter van lot 10 (pH 6,23 en a_w 0,980) na 4 dagen bewaring bij 7 °C	12
--	----

Bijlagen

Bijlage 1: Resultaten van houdbaarheidstesten van <i>Listeria monocytogenes</i> in rauwmelkse hoeveboter voor de periode 2014-2015 in Wallonië	22
Bijlage 2: Resultaten van het controleprogramma van het FAVV van <i>Listeria monocytogenes</i> in rauwmelkse hoeveboter voor de periode 2008-2015	23

Samenvatting

Advies 09-2016 van het Wetenschappelijk Comité over de groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter

Context & Vraagstelling

Voor boter bestaat er geen eenduidig wetenschappelijk bewijs of er groei van *Listeria monocytogenes* mogelijk is. Een adviesaanvraag werd ingediend bij het Wetenschappelijk Comité teneinde te evalueren of *Listeria monocytogenes* groeit in rauwmelkse hoeveboter.

Methodologie

Het Wetenschappelijk Comité heeft de aangeleverde studies met betrekking tot *Listeria monocytogenes* in boter geëvalueerd, evenals de resultaten van het controleprogramma van het FAVV. Daarnaast werden resultaten uit de internationale wetenschappelijke literatuur geëvalueerd. Het Wetenschappelijk Comité heeft vervolgens op basis van de resultaten uit de studies, uit het controleprogramma en uit de wetenschappelijke literatuur alsook op basis van expertopinie, een risico-inschatting gemaakt. Daarnaast worden aanbevelingen gemaakt betreffende het uitvoeren van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten van *Listeria monocytogenes* in boter teneinde de voedselveiligheid te verzekeren.

Resultaten

Er bestaat een grote variatie in de productieprocessen en de types boter. De kans op groei van *Listeria monocytogenes* is vooral afhankelijk van de sterkte, de snelheid en de stabiliteit van de verzuring en bijgevolg het natuurlijk voorkomen of het toevoegen van fermenten alsook van het zoutgehalte (en de a_w) van de boter. Over het algemeen blijkt uit de aangeleverde studies de kans op groei van *Listeria monocytogenes* in boter eerder nihil is. Echter, uit de aangeleverde studies en de wetenschappelijke literatuur blijkt eveneens dat er een grote variabiliteit bestaat in de pH- en a_w -waarden van hoeveboter en dat deze fysicochemische parameters kunnen variëren binnen een lot en blijven evolueren tijdens de bewaring van dit lot. De *worst case* omstandigheden van productie en bewaring van hoeveboter worden niet steeds afgedekt door de voorhanden zijnde studies of door de wetenschappelijke literatuur ter beoordeling van het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes*.

Conclusie

Het Wetenschappelijk Comité besluit dat rauwmelkse hoeveboter een laag risicoproduct is met betrekking tot het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* indien natuurlijke of toegevoegde fermenten zorgen voor een voldoende sterke, snelle en stabiele verzuring (tijdens de volledige houdbaarheidsperiode) en/of indien de boter een voldoende lage a_w -waarde of hoog zoutgehalte heeft. Echter, gezien de vastgestelde grote variabiliteit in de productieprocessen en de types hoeveboter, is het niet mogelijk een uitspraak te doen over het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* in alle types hoeveboter in België op basis van de voorhanden zijnde gegevens. Vandaar dat het Wetenschappelijk Comité de vraag niet eenduidig kan beantwoorden of groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter mogelijk is. Daarom wordt aanbevolen om onderzoek uit te voeren naar de grenswaarden voor groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter bij verschillende combinaties van pH en a_w (of zoutgehalte). Dit dient uitgevoerd te worden met behulp van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten waarbij rekening gehouden wordt met *worst case* scenarios. Indien dergelijke randvoorwaarden vanaf de productie vastgelegd worden en behouden worden tot het einde van de houdbaarheidstermijn (onder voorwaarden van een bepaalde tijd/temperatuur-combinatie), kan binnen de grenzen van deze randvoorwaarden een uitspraak gedaan worden voor alle types hoeveboter.

Summary

Advice 09-2016 of the Scientific Committee on the growth of *Listeria monocytogenes* in raw milk homestead butter

Background & Terms of reference

There is no clear scientific evidence if growth of *Listeria monocytogenes* is possible in butter. A request for advice has been submitted to the Scientific Committee to evaluate whether *Listeria monocytogenes* grows in raw milk homestead butter.

Methodology

The Scientific Committee has evaluated the provided studies concerning *Listeria monocytogenes* in butter, as well as the results of the control program of the FASFC. In addition, results from the international scientific literature were evaluated. Subsequently, the Scientific Committee has, based on the results from the studies, from the control program and from the scientific literature as well as based on expert opinion, made a risk estimation. Also, recommendations are made on performing challenge tests and/or durability tests for *Listeria monocytogenes* in butter in order to ensure the food safety.

Results

There exists a great variation in the production processes and the types of butter. The probability of growth of *Listeria monocytogenes* is primarily dependent on the strength, the speed and the stability of the acidification and consequently, on the natural occurrence or the addition of ferments as well as on the salt content (and the a_w) of the butter. In general, it appears from the supplied studies that the probability of growth of *Listeria monocytogenes* in butter is rather zero. However, from the submitted studies and the scientific literature it also seems that there exists a great variability in the pH and a_w values of the homestead butter and that these physicochemical parameters can vary within a batch and keep evolving during the storage of this batch. The worst case conditions of production and storage of homestead butter are not always covered by the available studies or by the scientific literature to assess the growth potential of *Listeria monocytogenes*.

Conclusion

The Scientific Committee concludes that raw milk homestead butter is a low risk product with regard to the growth potential of *Listeria monocytogenes* if natural or added ferments provide a sufficiently strong, fast and stable acidification (during the entire shelf-life period) and/or if the butter has a sufficiently low a_w value or high salt level. However, given the observed high variability in the production processes and the types of homestead butter, it is not possible to make a statement about the growth potential of *Listeria monocytogenes* in all types of homestead butter in Belgium based on the available data. Hence, the Scientific Committee cannot unambiguously answer the question if growth of *Listeria monocytogenes* in raw milk homestead butter is possible. Therefore, it is recommended to conduct research on the limits of growth of *Listeria monocytogenes* in raw milk homestead butter under various combinations of pH and a_w (or salt content). This should be realized with the aid of challenge tests and/or durability tests taking into account the worst case scenarios. If such conditions are set from the production and are maintained until the end of the shelf-life (under conditions of a specific time/temperature combination), a statement can be made for all types of homestead butter within the limits of those conditions.

1. Referentietermen

1.1. Vraagstelling

De volgende vragen worden gesteld aan het Wetenschappelijk Comité:

- Is er groei mogelijk van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter?
- Kunnen houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter volstaan om aan te tonen of er al dan niet groei mogelijk is? Wat zijn de specifieke vereisten van deze houdbaarheidstesten en voor welke types boter zijn de resultaten van deze testen geldig?

1.2. Wettelijke bepalingen

Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen.

1.3. Methodologie

Het Wetenschappelijk Comité heeft de aangeleverde studies met betrekking tot *Listeria monocytogenes* in boter geëvalueerd, evenals de resultaten van het controleprogramma van het FAVV. Daarnaast werden resultaten uit de internationale wetenschappelijke literatuur geëvalueerd. Het Wetenschappelijk Comité heeft vervolgens op basis van de resultaten uit de studies, uit het controleprogramma en uit de wetenschappelijke literatuur alsook op basis van expertopinie, een risico-inschatting gemaakt. Daarnaast worden aanbevelingen gemaakt betreffende het uitvoeren van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten van *Listeria monocytogenes* in boter teneinde de voedselveiligheid te verzekeren.

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 3 maart 2016 en 25 april 2016 en de plenaire zitting van het Wetenschappelijk Comité van 20 mei 2016,

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgend advies:

2. Context

In Verordening (EG) Nr. 2073/2005 van de Commissie van 15 november 2005 inzake microbiologische criteria voor levensmiddelen¹ worden o.a. microbiologische criteria vooropgesteld met betrekking tot kant-en-klare levensmiddelen die wel of niet als voedingsbodem voor *Listeria monocytogenes* kunnen dienen (zie tabel 1).

¹ <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20140601&qid=1447775099953&from=NL>

Tabel 1. Voedselveiligheidscriteria voor *Listeria monocytogenes* volgens Verordening (EG) Nr. 2073/2005

Levensmiddelen-categorie	Bemonsterings-schema ^a		Grenswaarden ^b		Stadium waarvoor het criterium geldt
	n	c	m	M	
Kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor <i>L. monocytogenes</i> kunnen dienen, met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik	5	0	100 kve/g ^c		Producten die in de handel zijn gebracht, voor de duur van de houdbaarheidstermijn
			Afwezig in 25 g ^d		Voordat het levensmiddel de directe controle van de exploitant van een levensmiddelenbedrijf die het geproduceerd heeft, heeft verlaten
Kant-en-klare levensmiddelen die niet als voedingsbodem voor <i>L. monocytogenes</i> kunnen dienen, met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik ^e			100 kve/g		Producten die in de handel zijn gebracht, voor de duur van de houdbaarheidstermijn
^a n = aantal deelmonsters waaruit het monster bestaat; c = aantal deelmonsters met waarden tussen m en M. ^b De grenswaarden m en M zijn de waarden waartussen een bepaald aantal deelmonsters ('c') van het totaal aantal deelmonsters waaruit het monster bestaat ('n') mag liggen. ^c Dit criterium is van toepassing als de producent tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. De exploitant kan intermediaire grenswaarden tijdens het proces vaststellen, die zo laag moeten zijn dat de grenswaarde van 100 kve/g aan het eind van de houdbaarheidstermijn niet wordt overschreven. ^d Dit criterium geldt voor producten voordat zij de directe controle van de exploitant van het levensmiddelenbedrijf die ze geproduceerd heeft, hebben verlaten, indien die exploitant niet tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. ^e Producten met pH ≤ 4,4 of a _w ≤ 0,92, producten met pH ≤ 5,0 en a _w ≤ 0,94 en producten met een houdbaarheidstermijn korter dan vijf dagen worden zonder meer in deze categorie ingedeeld. Andere categorieën producten kunnen ook in deze categorie worden ingedeeld indien daar wetenschappelijke redenen voor zijn.					

In België zijn er ongeveer 380 producenten van rauwmelkse hoeveboter. Er bestaat geen eenduidig wetenschappelijk bewijs of er al dan niet groei van *Listeria monocytogenes* mogelijk is in dit type product. Uit voorzorg wordt er tijdens officiële controles door het FAVV van uitgegaan dat rauwmelkse hoeveboter als voedingsbodem voor *Listeria monocytogenes* kan dienen en bijgevolg wordt het criterium van afwezigheid in 25 gram gehanteerd. Het Wetenschappelijk Comité wordt gevraagd te evalueren of *Listeria monocytogenes* groeit in rauwmelkse hoeveboter. Hiertoe werden resultaten van provocatietesten en houdbaarheidstesten bijgevoegd in de adviesaanvraag, evenals resultaten van het controleprogramma van het FAVV.

3. Evaluatie van de aangeleverde gegevens

3.1. Provocatietesten

In een eerste studie uitgevoerd in een laboratorium in België werden provocatietesten voor *Listeria monocytogenes* uitgevoerd waarbij drie types producties van hoeveboter werden bestudeerd:

- “boter 1” geproduceerd op de hoeve en als dusdanig na productie toegeleverd aan het laboratorium voor inoculatie met *Listeria monocytogenes* onmiddellijk na productie, dus bij de start van de houdbaarheidstermijn
- “boter 2” geproduceerd op pilotschaal in het laboratorium startende van room aangeleverd door de hoeve en waarbij de inoculatie met *Listeria monocytogenes* plaatsvond na de productie, dus bij de start van de houdbaarheidstermijn
- “boter 3” geproduceerd op pilotschaal in het laboratorium startende van room aangeleverd door de hoeve en waarbij de inoculatie met *Listeria monocytogenes* plaatsvond in de room waardoor het gedrag van *Listeria monocytogenes* tijdens de productie in rekening werd gebracht (inclusief enige stress die hierbij mogelijks gepaard gaat)

De provocatietesten werden op deze drie types boter uitgevoerd. Er werd boter geproduceerd zonder fermenten en zonder zout teneinde de eventuele groei van *Listeria monocytogenes* te faciliteren. Daarnaast werden twee blanco types boter geanalyseerd (“boter a” afkomstig van de hoeve en “boter b” geproduceerd op pilotschaal). De drie types boter werden 21 dagen bewaard: bij 4 °C tot 1/3 van de houdbaarheidstermijn (7 dagen – T1/3), vervolgens bij 8 °C tot 2/3 van de houdbaarheidstermijn (7 dagen – T2/3) en vervolgens bij 21 °C tot het einde van de houdbaarheidstermijn (7 dagen – T3/3). De bemonstering vond plaats in drievoud vlak na de productie (T0), op T1/3, T2/3 en T3/3 en tellingen van *Listeria monocytogenes* werden uitgevoerd. De resultaten van de provocatietesten bevinden zich in tabel 2.

Tabel 2. Resultaten van een Belgische studie van provocatietesten met *Listeria monocytogenes* op rauwmelkse hoeveboter (zonder toevoeging van fermenten of zout)

	Boter 1		Boter 2		Boter 3		Boter a	Boter b
	<i>Listeria monocytogenes</i> (kve/g)	pH	<i>Listeria monocytogenes</i> (kve/g)	pH	<i>Listeria monocytogenes</i> (kve/g)	pH	pH	pH
T0	40	5,70	10	5,65	30	5,30	6,45	5,85
T0	10	5,65	10	5,95	30	5,65	6,35	6,10
T0	10	6,45	10	5,35	30	5,95	6,45	5,65
T1/3	20		< 10		60			
T1/3	10		20		50			
T1/3	30		30		60			
T2/3	5*		6*		15*			
T2/3	5*		2*		14*			
T2/3	9,6*		7*		8*			
T3/3	7*	6,25	5*	5,75	8*	5,30	5,00	5,75
T3/3	2*	5,70	8*	5,20	11*	5,20	5,10	6,30
T3/3	10*	5,25	6*	5,50	5*	5,40	5,25	4,95

T0: dag 0 vlak na productie; T1/3: bewaring bij 4 °C tot 1/3 van de houdbaarheidstermijn (7 dagen); T2/3: bijkomende bewaring bij 8 °C tot 2/3 van de houdbaarheidstermijn (7 dagen); T3/3: bijkomende bewaring bij 21 °C tot het einde van de houdbaarheidstermijn (7 dagen).

*Analyse van 1 mL moedersuspensie verdund tot 10 mL (via uitplating van 0,5 mL op 20 petriplaten met 90 mm diameter en samentellen van alle verdachte kolonies op de 20 platen als aantal kolonies per mL) in plaats van in 1 mL moedersuspensie (via uitplating van 0,3 mL (of 0,4 mL) op 3 petriplaten met 90 mm diameter).

Er blijkt in deze specifieke provocatietesten geen groei mogelijk te zijn van *Listeria monocytogenes* in boter. Daarnaast zijn er geen verschillen te merken in het gedrag van *Listeria monocytogenes* tussen de drie types boter die op een verschillende manier geïnoculeerd werden (hetzij tijdens de productie in de room hetzij na de productie in de boter).

Het Wetenschappelijk Comité merkt echter op dat het initieel contaminatieniveau in het begin van de houdbaarheidstermijn niet altijd 100 kve/g bedraagt. In het [advies 02-2016](#) van het Wetenschappelijk Comité (SciCom, 2016), dat zich tevens baseert op het "EURL *Lm* technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food²", wordt gesteld dat bij het uitvoeren van een provocatietest met het oog op het inschatten van het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* tijdens de houdbaarheidstermijn het laboratorium dient te streven naar een initieel contaminatieniveau van ca. 100 kve/g waarbij het meetresultaat zich mogelijks zal situeren tussen ca. 30 kve/g en 300 kve/g. In de studie is het laboratorium zich bewust van deze te lage initiële contaminatieniveaus. Om voor deze monsters geschatte aantallen van *Listeria monocytogenes* te kunnen rapporteren voor verwachte lage contaminatieniveaus, werd de te analyseren moedersuspensie tien maal verdund (aangeduid met * in tabel 2). Het Wetenschappelijk Comité stelt zich vragen over de correctheid van deze aanpak en de berekening voor de telling van lage aantallen. Conform het [advies 02-2016](#) (SciCom, 2016) zijn enkel de resultaten van de provocatietest op boter 3 geldig, aangezien dit de enige provocatietest is waarbij het initieel contaminatieniveau van de drie stalen zich tussen 30 en 300 kve/g bevindt.

Het Wetenschappelijk Comité merkt ook op dat er een grote variabiliteit bestaat in de pH-waarden van de boter naargelang de verschillende producties ondanks het feit dat de room van dezelfde hoeve afkomstig is en het productieproces op pilotschaal dit van de hoeve simuleerde. Deze variatie is ook merkbaar in de evoluties van de pH tijdens de bewaring binnen de drie herhalingen van

² http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/technical_guidance_listeria_en.pdf

eenzelfde boter. De pH-waarden variëren van 4,95 tot 6,45 en zijn soms relatief hoog. Er wordt verwacht dat tijdens de productie en bewaring van boter de pH daalt door de verzuring van de room die plaatsvindt door de activiteit van natuurlijke fermenten, maar dit wordt niet steeds waargenomen. De pH van de boter 3 (met inoculum ca. 100 kve/g) varieert van 5,20 tot 5,95. Binnen deze studie blijkt deze boter 3 echter geen *worst case* scenario voor te stellen in termen van pH. Immers bij boter a en boter 1 worden soms hogere pH-waarden vastgesteld onmiddellijk na de productie ($> \text{pH } 6,0$) dan bij boter 3. Bij boter b en boter 2 worden op het einde van de houdbaarheidstermijn ook hogere pH-waarden vastgesteld ($> \text{pH } 6,0$) dan bij boter 3. Ook uit de tweede studie aangeleverd door de aanvragers van het advies (zie sectie 3.2.) is te zien dat de pH van hoeveboter kan oplopen tot 6,78. Echter, noch de a_w , noch het zoutgehalte van de boter in deze provocatietesten wordt weergegeven in het rapport van deze testen terwijl dit, samen met de pH, een belangrijke groeibepalende factor is voor *Listeria monocytogenes*. De test van boter 3 is dus één provocatietest en kan niet gezien worden als representatief voor alle rauwmelkse hoeveboter in België. Conform het [advies 02-2016](#) (SciCom, 2016) dienen ten minste twee bijkomende provocatietests uitgevoerd te worden om de afwezigheid van groei van *Listeria monocytogenes* aan te kunnen tonen in rauwmelkse hoeveboter.

3.2. Houdbaarheidstesten

In een tweede studie werden houdbaarheidstesten uitgevoerd op monsters rauwmelkse hoeveboter in Wallonië in de periode 2014-2015. Het betreft hier loten waarin initieel *Listeria monocytogenes* werd gedetecteerd per 25 gram (waar bij minstens één op vijf geanalyseerde monsters aanwezigheid per 25 gram werd vastgesteld). In totaal werden elf loten van acht operatoren bemonsterd in tienvoud (subunits van eenzelfde lot), waarbij vijf monsters geanalyseerd werden vlak na de monsternamen en de andere vijf monsters op het einde van de houdbaarheidstermijn (zie bijlage 1). De houdbaarheidstermijn voor rauwmelkse hoeveboter ligt volgens de adviesaanvrager standaard tussen 21 en 28 dagen (dus de bemonstering van één lot na 102 dagen is uitzonderlijk en ligt buiten de reële houdbaarheidsdatum). De bewaring gedurende de houdbaarheidsperiode gebeurde deels bij 7 °C (indien bewaard bij de producent) en deels bij 8 °C (indien bewaard in het laboratorium). Op de monsters werden tellingen van *Listeria monocytogenes* uitgevoerd (met een detectielimiet van 10 kve/g) zowel op vijf subunits van het lot genomen in het begin van de houdbaarheidstermijn als op vijf andere subunits van het lot die bewaard werd tot op het einde van de houdbaarheidstermijn. De resultaten van de houdbaarheidstesten bevinden zich in bijlage 1.

Terug wordt opgemerkt dat er een grote variabiliteit bestaat in de diverse types hoeveboter, zowel qua productiewijze (al dan niet gezouten, al dan niet met gebruik van zuursels/fermenten) en dit uit zich ook in diverse uitkomsten bij metingen van pH en a_w . Heterogeniteit in de waarden van deze fysico-chemische parameters van de hoeveboter werd vastgesteld zowel na productie alsook na de bewaring van de monsters. De laagste pH bedraagt 3,98 en de hoogste pH bedraagt 6,78. De gemeten a_w varieert van 0,851 tot 0,985. Volgens Verordening (EG) Nr. 2073/2005 worden producten met $\text{pH} \leq 4,4$ of $a_w \leq 0,92$ en producten met $\text{pH} \leq 5,0$ en $a_w \leq 0,94$ ingedeeld in de categorie van levensmiddelen die geen groei toelaten van *Listeria monocytogenes*. De types boter met dergelijke combinaties van pH en a_w die per definitie geen groei toelaten zijn aangeduid in vet in bijlage 1. In het begin van de houdbaarheid zijn er drie van de elf types boter die per definitie geen groei toelaten. Van deze drie types boter zijn er twee die ook op het einde van de houdbaarheid per definitie geen groei toelaten en één boter waarvoor de analyses van pH en a_w op het einde van de houdbaarheid niet werden uitgevoerd. Verder is er één type boter die in het begin van de houdbaarheid per definitie groei toelaat en op het einde van de houdbaarheid per definitie geen groei meer toelaat. De overige types boter vertonen combinaties van pH en a_w die per definitie wel groei toelaten.

Gezien de monsternamen verschillende subunits betreft in het begin en op het einde van de houdbaarheidstermijn en wetende dat er heterogeniteit kan zijn betreffende contaminatie met *Listeria monocytogenes* in een lot, zijn vijf subunits te beperkt om met voldoende zekerheid een uitspraak te formuleren over het groeipotentieel. Wel kunnen reflecties gemaakt worden over de totaliteit van de verzamelde resultaten weergegeven in bijlage 1. Een analyse van de resultaten bevindt zich in tabel 3.

Tabel 3. *Listeria monocytogenes* in natuurlijk gecontamineerde hoeveboter (elf loten van acht producenten)

<i>Listeria monocytogenes</i>	Eerste analyse (begin houdbaarheid)	Tweede analyse (einde houdbaarheid)	p-waarde van χ^2 -test
Aantal "aanwezig in 25 g"/totaal aantal	44/55	36/59	0,0268
Aantal "aanwezig in 25 g" in % (95 % BI)	80 (69-91)	61 (49-73)	
Aantal "telbare resultaten"/totaal aantal	8/46	10/47	0,6354
Aantal "telbare resultaten" in % (95 % BI)	17 (6-28)	21 (10-33)	

Bij de detecties wordt een **significant lager** percentage niet-conforme resultaten (proportie van aantal aanwezig in 25 g) aangetroffen bij de tweede analyse dan bij de eerste analyse (p-waarde 0,0268) met een betrouwbaarheidsniveau van 95 %. Gezien de kans op aantreffen van *Listeria monocytogenes* in deze types hoeveboter niet significant stijgt, wijst dit er indirect op dat globaal *Listeria monocytogenes* van nature occasioneel in deze hoeveboter aanwezig is en over het algemeen niet uitgroeit tijdens de houdbaarheidstermijn. Bij de tellingen wordt een **niet-significant** hoger percentage niet-conforme resultaten (proportie van aantal telbare resultaten) aangetroffen bij de tweede analyse dan bij de eerste analyse (p-waarde 0,6354) met een betrouwbaarheidsniveau van 95 %. Hierbij dient opgemerkt te worden dat er bij de eerste analyse vier maal **geen** telling werd uitgevoerd terwijl de detectie de aanwezigheid van *Listeria monocytogenes* in 25 g aantoonde. In het *worst case* geval was de prevalentie bij de eerste analyse dus 12/46 en gedaald naar 10/47 bij de tweede analyse (en blijft het eindresultaat een niet-significant lager percentage telbare resultaten op het einde van de houdbaarheid met p-waarde 0,5852). Dit geeft ook indirect aan dat globaal *Listeria monocytogenes* van nature occasioneel in deze hoeveboter aanwezig is en over het algemeen niet uitgroeit tijdens de houdbaarheidstermijn.

Het Wetenschappelijk Comité merkt op dat dit globaal beschouwd is en dat hoeveboter geen homogene populatie is. Uit bijlage 1 blijkt dat er binnen de types hoeveboter een sterke variabiliteit is in de productiewijze (gezouten/niet-gezouten, met/zonder fermenten) en er heterogeniteit is in de gemeten pH- en a_w -waarden zowel na productie als na de bewaring van de monsters. Het is dus wel mogelijk dat in een individueel geval van een hoeveboter toch groei optreedt, ook al is dit in deze studie niet het geval geweest. Bijvoorbeeld, als uitzondering op de andere loten, was lot 7 relatief homogeen besmet in het begin van de houdbaarheidstermijn met de vijf subunits positief voor *Listeria monocytogenes* en relatief hoge aantallen (tussen 90 en 210 kve/g), maar de combinatie van pH en a_w liet per definitie geen groei toe van *Listeria monocytogenes*. De afwezigheid van groei werd ook bevestigd door de analyses op het einde van de houdbaarheidstermijn waarbij nog steeds de vijf andere subunits positief werden bevonden voor *Listeria monocytogenes* met opnieuw dezelfde (relatief hoge) aantallen (tussen 80 en 360 kve/g) als bij de start van de houdbaarheidstermijn. Lot 7 was dus niet conform bij het begin van de houdbaarheidstermijn en blijft dit ook op het einde van de houdbaarheidstermijn, maar het risico nam niet toe tijdens de bewaring (geen groeipotentieel zoals

te verwachten was uit de fysico-chemische parameters). Echter, indien een dergelijke besmetting met *Listeria monocytogenes* had opgetreden bij een lot met een hogere pH of een hogere a_w die theoretisch wel groei toelaat in de hoeveboter, had zelfs een lagere besmetting aanleiding kunnen geven tot (relatief) hoge (niet conforme) aantallen van *Listeria monocytogenes*.

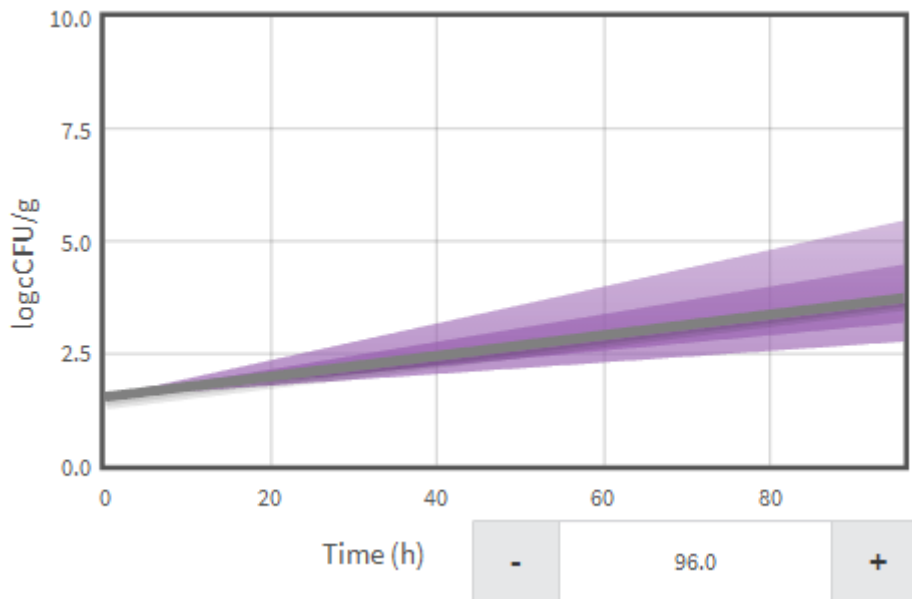
Ter illustratie wordt in tabel 4 een voorspelling weergegeven van de groei van *Listeria monocytogenes* bij een pH van 6,23 en een a_w van 0,980 (zoals lot 10 uit de studie in bijlage 1) na 4 dagen bewaring bij 7 °C. Deze voorspelling werd uitgevoerd met de ComBase Predictor, een programma waarmee aan de hand van wiskundige modellen de maximum groeisnelheid en de verdubbelingstijd van een micro-organisme in functie van intrinsieke factoren (zoals pH en a_w) en extrinsieke factoren (zoals temperatuur) berekend kunnen worden. Teneinde een *worst case* scenario na te bootsen, werd bij de simulatie verondersteld dat er geen lagfase is. Deze voorspellingen zijn gebaseerd op gegevens in laboratoriummedia (Buchanan & Phillips, 1990; Duh & Schaffner, 1993; Le Marc, 2001), gecorrigeerd voor pH, a_w en temperatuur, en werden dus niet in boter verzameld.

Tabel 4. Voorspelling van de groei van *Listeria monocytogenes* in een laboratoriummedium met eigenschappen overeenkomend met die van de boter van lot 10 (pH 6,23 en a_w 0,980) na 4 dagen bewaring bij 7 °C

	Toename (log kve/g)
Na 1 dag	0,56
Na 2 dagen	1,12
Na 3 dagen	1,69
Na 4 dagen	2,25

Uit deze modelvoorspelling blijkt dat indien lot 10 gecontamineerd was met *Listeria monocytogenes*, er groei tot hoge aantallen zou kunnen optreden. Het feit dat dit niet werd waargenomen op het einde van de houdbaarheid kan te wijten zijn aan de heel heterogene en lage besmetting van lot 10 (slechts in één tot drie van de vijf subunits werd *Listeria monocytogenes* gedetecteerd en de aantallen bedroegen minder dan 10 kve/g). Om voldoende betrouwbaarheid te hebben over de besmettingsgraad en bijgevolg het groeipotentieel (of het niet optreden van groei) is het aanbevolen dat er meer dan vijf (verschillende) subunits geanalyseerd worden in het begin en op het einde van de houdbaarheidstermijn (zie ook aanbevelingen in het [advies 02-2016](#) van het Wetenschappelijk Comité (SciCom, 2016)).

Het is ook duidelijk dat modelvoorspellingen uit de Combase Predictor zoals voorgesteld in tabel 4 onderhevig zijn aan onzekerheid. In figuur 1 wordt een indicatie gegeven van deze onzekerheid: de banden geven de voorspellingen van uitgroei van *Listeria monocytogenes* weer met een betrouwbaarheidsinterval van 95,0 % (buitenste band) en 68,2 % (binnenste band) weer.



Figuur 1. 68,2 % en 95,0 % betrouwbaarheidsinterval rond de ComBase Predictor modelvoorspelling (zonder lagfase en gebaseerd op de onzekerheid geassocieerd met de groeisnelheid) van de groei van *Listeria monocytogenes* in een laboratoriummedium met eigenschappen overeenkomend met die van de boter van lot 10 (pH 6,23 en a_w 0,980) na 4 dagen bewaring bij 7 °C

De onzekerheid rond de modelvoorspelling, welke gebaseerd is op gegevens afkomstig van laboratoriummedia, is hoog en kan zowel een onderschatting als een overschatting geven van de werkelijke uitgroei van *Listeria monocytogenes* omdat in laboratoriummedia niet alle groeibevorderende of groeiremmende factoren zijn in rekening gebracht alhoewel ze mogelijk aanwezig zijn in voedingsproducten zoals hoeveboter. Er wordt bijgevolg aanbevolen om een validatie uit te voeren met behulp van een provocatietest in rauwmelkse boter waarbij lot 10 een *worst case* scenario zou voorstellen in termen van pH (6,23) en a_w (0,980).

3.3. Bijkomende informatie

Tijdens een studiedag georganiseerd door DiversiFerm in België op 27 januari 2016 werd door Actalia, een technisch onderzoeksinstituut ter ondersteuning van de voedingssector in Frankrijk, een presentatie gegeven over provocatietests voor *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse boter die werden uitgevoerd in hun onderzoeksinstituut (Actalia, 2016). Gezien niet het volledige rapport van deze Franse studie beschikbaar werd gesteld, kon het Wetenschappelijk Comité enkel een aantal afleidingen maken met betrekking tot de overleving en groei van *Listeria monocytogenes* in boter op basis van de figuren uit deze presentatie.

Het betrof pilootproducties van enerzijds zachte en anderzijds halfgezouten rauwmelkse boter waarbij telkens *Listeria monocytogenes* werd geïnoculeerd in de room en waarbij telkens het gedrag van *Listeria monocytogenes* werd opgevolgd tijdens de productie en bewaring. De productie en inoculatie werden zesmaal herhaald voor de twee types boter. De pH van de room bedroeg ca. 6,63. Het zoutgehalte van de halfgezouten boter bedroeg ca. 1,85 %. Bij de start van het productieproces werd de room opgewarmd tot 30 °C, geïnoculeerd met fermenten en *Listeria monocytogenes* (500 tot 1.000 kve/mL) en bij 15 °C geplaatst gedurende ca. 10 uren. Vervolgens werd de room koud gerijpt bij 4 °C gedurende ca. 68 uren. Daarna werd de room terug bij 15 °C geplaatst en gekarnd, gewassen, gepekeld, gemengd en verpakt wat ongeveer 8 uren in beslag nam. Voor lot 1 werd een duidelijke pH-daling waargenomen zijnde vanaf ca. 6,5 bij de start van het productieproces tot ca. 4,9 bij het begin van de koude rijping. Verdere verzuring tot ca. 4,6 werd geobserveerd na 17 uren vanaf

de start vanaf het productieproces waarna de pH quasi constant bleef op ca. 4,6 tijdens de verdere productie alsook de rijping (ca. 4 dagen). Gemiddeld varieerde de pH van de zachte boter tussen 4,5 tot 4,8 en van de halfgezouten boter tussen 4,3 en 4,7.

Wanneer men het gedrag van *Listeria monocytogenes* tijdens de productie bekijkt, merkt men een lichte toename van *Listeria monocytogenes* van initieel 2,7 log kve/mL tot 3,2 log kve/mL in de room tijdens de koude rijping, vóór het karnen. Vervolgens neemt een sterke afname plaats door het karnen, wassen, pekelen en mengen. Vanaf het begin van de houdbaarheid (ongeveer 4 dagen na de start van het productieproces) neemt een geleidelijke daling plaats tot *Listeria monocytogenes* niet meer detecteerbaar is na 21 dagen (= 2/3 van de houdbaarheidstermijn). In de presentatie wordt vermeld dat deze resultaten niet extrapoleerbaar zijn naar andere types boter aangezien de specificiteit van de productie in rekening gebracht dient te worden. Het is aldus zo dat de productiewijze in deze test niet noodzakelijk representatief is voor de productiewijze bij de 380 producenten die rauwmelkse hoeveboter produceren in België. De sterke pH-daling die vastgesteld is in deze studie is waarschijnlijk het gevolg van het gebruik van fermenten bij de productie van deze boter.

4. Resultaten van het controleprogramma van het FAVV

De resultaten van tellingen of detecties van *Listeria monocytogenes* op rauwmelkse boter in het kader van het controleprogramma van het FAVV zijn beschikbaar voor de periode 2008-2015 en bevinden zich in bijlage 2. De stalen zijn afkomstig uit de sector van de primaire productie, de transformatie en de distributie. Het gaat dus om types rauwmelkse boter maar niet altijd om types boter geproduceerd op de hoeve. Hierbij werd door de controleur van het FAVV beslist of een telling of een detectie van *Listeria monocytogenes* werd uitgevoerd, afhankelijk van het feit of de operator kon aantonen dat *Listeria monocytogenes* de grenswaarde van 100 kve/g op het einde van de houdbaarheid niet kon overschrijden. Volgens Verordening (EG) Nr. 2073/2005 is het criterium van 100 kve/g van toepassing als de producent tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. Het criterium van afwezigheid in 25 gram is geldig voor producten voordat zij de directe controle van de exploitant van het levensmiddelenbedrijf die ze geproduceerd heeft, hebben verlaten, indien die exploitant niet tot tevredenheid van de bevoegde autoriteiten kan aantonen dat het product gedurende de hele houdbaarheidstermijn aan de grenswaarde van 100 kve/g zal voldoen. Bij deze data is echter niet geweten op hoeveel dagen na de productie van de boter de analyses werden uitgevoerd.

In totaal wordt een prevalentie van *Listeria monocytogenes* van 19,09 % gevonden op 309 stalen waarop een detectie werd uitgevoerd (indien het criterium van afwezigheid in 25 g wordt gehanteerd) en een prevalentie van *Listeria monocytogenes* van 0 % op 880 stalen waarop een telling werd uitgevoerd (indien het criterium van 100 kve/g wordt gehanteerd).

5. Literatuurstudie met betrekking tot *Listeria monocytogenes* in boter

In de internationale wetenschappelijke literatuur werd één uitbraak teruggevonden ten gevolge van de consumptie van met *Listeria monocytogenes* gecontamineerde gepasteuriseerde boter (Lyytikäinen *et al.*, 2000; Maijala *et al.*, 2001). De uitbraak vond plaats in Finland in 1999 en van de 25 gevallen zijn er 6 overleden. De meerderheid van de gevallen waren immunodeficiënt en gehospitaliseerd. Maijala *et al.* (2001) heeft naar aanleiding van deze uitbraak een blootstellingstudie uitgevoerd. In het kader van deze studie kon men *Listeria monocytogenes* detecteren in 25 g in alle 3 gepoolde boterstalen (10 verpakkingen van 7 g) uit de keuken van de verzorgingsinstelling. Van de 5 loten afkomstig uit de groothandel met verpakkingen van 7 g waren er via gepoolde stalen 4 positief

voor *Listeria monocytogenes* in 25 g en 3 positief in 1 g. De positieve boterstalen waren 13 tot 120 dagen oud. De aantallen *Listeria monocytogenes* in de verpakkingen van 7 g waren lager dan 2 log kve/g en varieerden van 0,8 tot 1,8 log kve/g (weliswaar met een uitschieter van 4,0 log kve/g); in verpakkingen van 10 g van log -0,8 tot 2,5 kve/g; en in verpakkingen van 500 g van log 0,7 tot 1,2 kve/g. De stalen van verpakkingen van 7 g werden gepoold en bewaard bij 6,5-7,2 °C tot 120 dagen. Tijdens de bewaring van de gepoolde stalen afkomstig van verpakkingen van 7 g varieerden de aantallen van *Listeria monocytogenes* tussen 4,3 en 5,1 log kve/g. In de gepoolde stalen afkomstig van de verpakkingen van 10 g, namen de aantallen van *Listeria monocytogenes* lichtjes toe tot aantallen van 1,8 tot 2,9 log kve/g. Een duidelijke toename in de mediane aantallen van *Listeria monocytogenes* in de gepoolde stalen afkomstig van verpakkingen van 500 g van 0,8 tot 3,6 log kve/g werd waargenomen. De individuele variatie was echter hoog, variërende van 0,8 tot 4,3 log kve/g. Dit toont dus aan dat in de boter betrokken bij deze uitbraak in Finland, er occasioneel groei kon optreden van *Listeria monocytogenes* tijdens verlengde bewaring onder gekoelde omstandigheden.

Verder werd in 2005 in Zwitserland een uitbraak van *Listeria monocytogenes* in zachte kaas gerapporteerd met 10 gevallen waarvan 8 gevallen immunodeficiënt waren (3 gevallen overleden) en 2 gevallen zwangere vrouwen waren (met septische abortus tot gevolg). Bij verder onderzoek in het productiebedrijf vond men aantallen *Listeria monocytogenes* in kaas van 1.000 tot 10.000 kve/g en van 10 tot 100 kve/g in boter dat in ditzelfde bedrijf geproduceerd werd (het type werd niet vermeld). Er werden geen gevallen gerapporteerd ten gevolge van de consumptie van de boter (Bille *et al.*, 2006).

Voor wat betreft de frequentie van voorkomen van *Listeria monocytogenes* in boter, zijn enkele publicaties te vinden in de wetenschappelijke literatuur. In 1987-1988 vond men in Bologna geen enkel staal boter positief voor *Listeria monocytogenes* op een totaal van 20 stalen, echter op één staal werd *Listeria innocua* aangetroffen. Het type boter werd niet gespecificeerd (Massa *et al.*, 1990). Lewis *et al.* (2006) hebben in 2004 3.229 boterstalen uit de productie, retail en catering in het Verenigd Koninkrijk getest op *Listeria* spp. en vonden *Listeria monocytogenes* in 0,4 % van de stalen, echter de aantallen bevonden zich onder 10 kve/g. Er werd geen informatie gegeven over het type boter. De auteurs besluiten dat boter een laag risicoproduct is voor *Listeria monocytogenes*.

In de korte keten in België werd *Listeria monocytogenes* gedetecteerd in boter (o.a. rauwmelkse hoeveboter) in 160 van de 616 onderzochte stalen. Voor 107 stalen bedroegen de aantallen lager dan 10 kve/g; voor 52 stalen tussen 10 en 100 kve/g en voor 1 staal hoger dan 100 kve/g (SciCom, 2014). Een onderzoek uitgevoerd door het ILVO vond dat de prevalentie van *Listeria monocytogenes* op hoeveboter in 2002-2008 in België varieerde tussen 8 en 20 %. Echter, in geen enkel van de boterstalen die positief waren voor *Listeria monocytogenes* konden hetzij kort na staalname hetzij op de vervaldatum aantallen aangetroffen worden van 100 kve/g of hoger. De positieve boterstalen hadden op de vervaldatum een contaminatiegraad van lager dan 0,03 kve/g, bepaald met de methode van het meest waarschijnlijke aantal (De Reu *et al.*, 2008; De Reu *et al.*, 2007, 2006; De Reu & Herman, 2004). Verder heeft het ILVO in België in 2003-2004 de overleving van deze pathogeen in kunstmatig besmette rauwmelkse boter gedurende 4 weken opgevolgd. Er werd geen substantiële groei vastgesteld bij de verschillende bewaartemperaturen (4, 10 en 20 °C) bij de vier geëvalueerde contaminatieniveaus. Het verlies van levensvatbaarheid van de pathogeen bij 20 °C lag significant hoger ten opzichte van bewaring bij 10 en 4 °C. Tevens werd de overleving van *Listeria monocytogenes* in acht stalen van natuurlijk besmette rauwmelkse boter met een initieel contaminatieniveau van 0,23 tot 15 kve/g opgevolgd. Na een bewaring tussen 4 en 5 weken bij 4 en 10 °C daalde het aantal en deze daling was gelijk of hoger bij een bewaring bij 10 °C ten opzichte van deze geobserveerd bij 4 °C (De Reu *et al.*, 2008; De Reu *et al.*, 2007, 2006; De Reu & Herman, 2004). Het zoutgehalte en de waarden van pH en a_w van de onderzochte boterstalen werden niet gegeven.

Over de groei van *Listeria monocytogenes* in boter zijn in de wetenschappelijke literatuur verschillende resultaten te vinden. *Listeria monocytogenes* verkiest (zoals alle bacteriën) de waterfase voor groei en niet de vetfase (Olsen *et al.*, 1988). Olsen *et al.* (1988) vonden dat *Listeria monocytogenes* kon groeien in boter tijdens de eerste weken van bewaring bij 4-6 °C (tot 1,9 log kve/g boven het initieel contaminatieniveau), gevolgd door enkele weken met een tragere groei. Na 6-8 weken werden de hoogste aantallen gevonden. Bij 13 °C was de groei sneller dan bij 4-6 °C en de hoogste aantallen werden na 6-7 weken gevonden en waren 2,7 keer hoger dan deze waargenomen bij 4-6 °C. De waarden van pH en a_w van de onderzochte boterstalen werden niet gegeven in de publicatie.

Adler & Beuchat (2002) vonden geen groei in types ongezoeten boter met of zonder look wanneer deze bewaard werd bij 4,4 °C, 21 °C of 37 °C gedurende 48 uren. De waarden van pH en a_w van de onderzochte boterstalen werden niet gegeven in de publicatie.

Holliday *et al.* (2003) voerden een oppervlakte-inoculatie uit van *Listeria monocytogenes* op verschillende types boter en de groei tijdens bewaring bij 4,4 °C en 21 °C werd gedurende 21 dagen opgevolgd. Op gezouten boter op basis van zoete opgeklopte room (pH 6,40) kon *Listeria monocytogenes* groeien zowel bij 4,4 °C als bij 21 °C. Bij 4,4 °C vond eerst een reductie in aantallen plaats van initieel 5,6 log kve/g op dag 0 tot 4,7 log kve/g op dag 7, gevolgd door terug een toename tot 5,8 log kve/g op dag 14 en tot 6,3 log kve/g op dag 21. Bij 21 °C vond een toename plaats van initieel 5,6 log kve/g tot 6,6 log kve/g op dag 3. Op ongezoeten boter op basis van zoete opgeklopte room (pH 4,51), gezouten *light* boter (pH 4,58), geel vetsmeersel (pH 4,05 en 5,37) en *light* margarine (pH 5,34), werd geen groei waargenomen gedurende 21 dagen bij 4,4 °C of 21 °C. Een snellere inactivatie vond plaats bij 21 °C dan bij 4,4 °C en wanneer conserveringsmiddelen of zuurteregelaars werden toegevoegd.

Lanciotti *et al.* (1992) vond dat *Listeria monocytogenes* kon groeien in *light* boter bewaard bij zowel 4 °C als bij 20 °C. De maximale groeisnelheid bedroeg gemiddeld 0,1 log kve/g/dag zowel bij 4 °C als bij 20 °C.

Voysey *et al.* (2009) onderzochten eveneens groei van *Listeria monocytogenes* in boter op basis van gepasteuriseerde room. De groei was sneller in ruwe dan in fijne boter en in boter zonder zout. De groei was vergelijkbaar bij 8 °C en bij 21 °C. De maximale celdensiteit werd bereikt na 14 dagen.

Samenvattend kan gesteld worden dat de resultaten uit de wetenschappelijke literatuur variabel zijn. Soms is groei mogelijk en soms is geen groei mogelijk. Er is echter niet altijd duidelijk vermeld over welk type boter het gaat en vaak werden de fysico-chemische eigenschappen niet vermeld.

6. Provocatietesten en houdbaarheidstesten van *Listeria monocytogenes* in boter

Uit de evaluatie van de aangeleverde gegevens en de uitgevoerde literatuurstudie blijkt dat globaal de kans op groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter klein is. Niettegenstaande kan de groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter in België, met een brede variatie in productie en bijgevolg met verschillen in fysico-chemische eigenschappen (pH en a_w -waarde), niet worden uitgesloten. Indien men meer zekerheid wenst te bekomen over de groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter kan men provocatietesten en/of houdbaarheidstesten van *Listeria monocytogenes* in boter uitvoeren.

Bij voorkeur worden provocatietesten uitgevoerd op pilotschaal en waarbij de melk of de room geïnoculeerd wordt. Immers, boter is een emulsie van waterige druppels in melkvet en bacteriën

zoals *Listeria monocytogenes* zullen enkel groeien in de waterfase. Bij inoculatie van boter na het productieproces is het niet evident om de pathogene kiem in contact te brengen met de waterfase. Wanneer *Listeria monocytogenes* geïnoculeerd wordt in de melk/room, komt ze in de waterfractie van de boter terecht waar de impact van de pH en de a_w in deze waterdruppels mede bepalend zal zijn of al dan niet groei mogelijk is. Het initieel contaminatieniveau dient na de boterproductie (en na de rijping) op dag 0 van de houdbaarheidstermijn (het tijdstip waarop de boter klaar wordt geacht om op de markt gebracht te worden) ca. 100 kve per gram boter te bedragen. Provocatietesten dienen uitgevoerd te worden onder *worst case* condities van pH en a_w die vastgesteld worden en representatief zijn voor de rauwmelkse hoeveboter in België.

Houdbaarheidstesten dienen uitgevoerd te worden met goed gekarakteriseerde hoeveboter (met een gekend productieproces, een gekende pH en a_w , een gekend zoutgehalte en een gekende houdbaarheidstermijn) waar aangetoond werd dat *Listeria monocytogenes* aanwezig was. Indien het gaat over een heterogene besmetting met erg lage aantallen (vb. zoals vermeld in sectie 3.2. voor lot 10 in bijlage 1) is het aanbevolen dat er meer dan vijf verschillende subunits geanalyseerd worden in het begin en op het einde van de houdbaarheid om voldoende betrouwbaarheid te hebben over de besmettingsgraad en bijgevolg het groeipotentieel (of het niet optreden van groei).

Richtlijnen voor het uitvoeren van provocatietests en/of houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* vindt men terug in het "EURL *Lm* technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food²" van het Europees referentielaboratorium voor *Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*). Verder heeft het Wetenschappelijk Comité een advies uitgebracht over provocatietesten en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas (SciCom, 2016). De vereisten vermeld in dit advies zijn eveneens geldig voor boter.

In het geval van de provocatietesten die besproken werden in sectie 3.1., is enkel de provocatietest uitgevoerd op boter 3 geldig volgens de bovenvermelde richtlijnen. Aangezien deze boter geen *worst case* scenario voorstelt in termen van pH en a_w en aangezien er een grote variabiliteit bestaat in de waarden van de pH en de a_w , is het noodzakelijk dat er voor dergelijke boter twee bijkomende provocatietests worden uitgevoerd op types boter met pH- en a_w -waarden die meer *worst case* zijn en dus representatief zijn voor het ganse gamma aan types rauwmelkse hoeveboter dat vermarkt worden in België.

7. Conclusie

De aangeleverde studies (provocatietesten en houdbaarheidstesten) geven momenteel niet voldoende garantie om te bevestigen dat er over het geheel van types rauwmelkse hoeveboter in België, in geval van occasionele besmetting met *Listeria monocytogenes*, nooit groei zal zijn tot aantallen meer dan 100 kve/g op het einde van de houdbaarheid. Immers, uit de aangeleverde studies blijkt dat er een grote variabiliteit bestaat in het produceren van rauwmelkse hoeveboter in België en dat de pH- en a_w -waarden van hoeveboter variëren binnen een lot maar ook evolueren tijdens de bewaring (soms is er verzuring, maar soms is er een toename van de pH-waarden).

Er bestaat een grote variatie in de productieprocessen en de types boter. De kans op groei van *Listeria monocytogenes* is vooral afhankelijk van de sterkte, de snelheid en de stabiliteit van de verzuring en bijgevolg het natuurlijk voorkomen of het toevoegen van fermenten alsook van het zoutgehalte (en de a_w) van de boter.

In Europa heeft er in het verleden één bevestigde uitbraak plaatsgevonden ten gevolge van met *Listeria monocytogenes* gecontamineerde boter. In de wetenschappelijke literatuur zijn een aantal

studies terug te vinden met betrekking tot mogelijke groei van *Listeria monocytogenes* in boter, echter met variabele proefopzetten qua tijd- en temperaturomstandigheden van bewaring, types boter, enz. De resultaten zijn bijgevolg zeer variabel en groei is dus niet uit te sluiten. Indien fermenten worden toegevoegd met het oog op een gecontroleerde en snelle verzuring van de boter, blijkt dat *Listeria monocytogenes* niet groeit en zelfs geleidelijk afsterft. Echter uit de aangeleverde data blijkt dat bij hoeveboter in België de verzuring niet steeds goed gecontroleerd verloopt en bijgevolg de pH en a_w van boter een grote variatie kent. Ook de gemeten waarden variëren voor subunits van eenzelfde lot die geanalyseerd worden in het begin en op het einde van de houdbaarheid.

Het Wetenschappelijk Comité besluit dat rauwmelkse hoeveboter een laag risicoproduct is met betrekking tot het groeipotentieel van *Listeria monocytogenes* indien natuurlijke of toegevoegde fermenten zorgen voor een voldoende sterke, snelle en stabiele verzuring (tijdens de volledige houdbaarheidsperiode) en/of indien de boter een voldoende lage a_w -waarde of hoog zoutgehalte heeft.

8. Aanbevelingen

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan dat producenten van hoevezuivelproducten bij de productie van rauwmelkse hoeveboter bij voorkeur fermenten gebruiken die een voldoende snelle verzuring teweegbrengen tijdens het productieproces en een voldoende lage pH van het eindproduct waarborgen tijdens de houdbaarheidsperiode wat de kans op groei van *Listeria monocytogenes* aanzienlijk zal reduceren.

Ten slotte wordt aanbevolen om onderzoek uit te voeren naar de grenswaarden voor groei van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter bij verschillende combinaties van pH en a_w (of zoutgehalte). Dit dient te gebeuren met behulp van provocatietesten en/of houdbaarheidstesten waarbij rekening gehouden wordt met *worst case* scenarios. Indien dergelijke randvoorwaarden vanaf de productie vastgelegd worden en behouden worden tot het einde van de houdbaarheidstermijn (onder voorwaarden van een bepaalde tijd/temperatuur-combinatie), kan binnen de grenzen van deze randvoorwaarden een uitspraak gedaan worden voor alle hoeveboter.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)
Brussel, 26/05/2016

Referenties

Actalia, 2016. Challenge-test sur *Listeria monocytogenes* : L'exemple concret du beurre au lait cru. <http://www.actalia.eu/challenge-test/>.

Adler, B. B., Beuchat, L. R., 2002. Death of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in Garlic Butter as Affected by Storage Temperature. *Journal of Food Protection* 65(12), 1976-1980.

Bille, J., Blanc, D. S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H. H., Tritten, M. L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J. M., Malinverni, R., Genné, D., Erard, P., Waespi, U., 2006. Outbreak of human listeriosis associated with tome cheese in northwest Switzerland, 2005. *Eurosurveillance* 11(6), 633.

Buchanan, R. L., Phillips, J. G., 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53, 370-376.

De Reu, K., Herman, L., De Ville, W., 2008. Rapport 2008 'Aanwezigheid en aantallen van *Listeria monocytogenes* in Belgische hoeveboter'. Rapport *Listeria* in hoeveboter, ILVO-T&V.

De Reu, K., Herman, L., De Boosere, I., De Ville, W., 2007. Rapport 2007 'Aanwezigheid en aantallen van *Listeria monocytogenes* in Belgische hoeveboter'. Rapport *Listeria* in hoeveboter, ILVO-T&V.

De Reu, K., Herman, L., De Boosere, I., De Ville, W., 2006. Rapport 2006 'Aanwezigheid en aantallen van *Listeria monocytogenes* in Belgische hoeveboter'. Rapport *Listeria* in hoeveboter, ILVO-T&V.

De Reu, K., Herman, L., 2004. Rapport 2003-2004 'Aanwezigheid en overleving van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter'. ILVO-T&V.

Duh, Y. H., Schaffner, D. W., 1993. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 56, 205-210.

Holliday, S. L., Adler, B. B., Beuchat, L. R., 2003. Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. *Food Microbiology* 20, 159-168.

Lanciotti, R., Massa, S., Guerzoni, M. E., Di Fabio, G., 1992. Light butter: natural microbial population and potential growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *Letters in Applied Microbiology* 15, 256-258.

Le Marc, Y., 2001. Developpement d'un modele modulaire decrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. These de doctorat. Université de Bretagne Occidentale, France.

Lewis, H. C., Little, C. L., Elson, R., Greenwood, M., Grant, K. A., McLauchlin, J., 2006. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Butter from United Kingdom Production, Retail, and Catering Premises. *Journal of Food Protection* 69(7), 1518-1526.

Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V.-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., Siitonen, A., 2000. An Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland. JID 181.

Maijala, R., Lyytikäinen, O., Johansson, T., Autio, T., Aalto, T., Haavisto, L., Honkanen-Buzalski, T., 2001. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. International Journal of Food Microbiology 70, 97-109.

Massa, S., Cesaroni, D., Poda, G., Trovatielli, L. D., 1990. The incidence of *Listeria* spp. in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. Journal of Applied Bacteriology 68, 153-156.

Olsen, J. A., Yousef, A. E., Marth, E. H., 1998. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. Milchwissenschaft 43, 487-489.

SciCom, 2016. Advies 02-2016 betreffende provocatietesten en houdbaarheidstesten voor *Listeria monocytogenes* in kaas (dossier SciCom 2015/17). Beschikbaar online: http://www.favv-afsca.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2016/ documents/Advies02-2016Listeriamonocytogenes_website.pdf.

SciCom, 2014. Advies 05-2014 betreffende de voedselveiligheid van de korte keten (SciCom 2013/01: eigen initiatief). Beschikbaar online: http://www.favv-afsca.fgov.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2014/ documents/ADVIES05-2014_NL_DOSSIER2013-01_website_000.pdf.

Voysey, P. A., Anslow, P. A., Bridgwater, K. J., Lavender, B., Watson, L., 2009. The effects of butter characteristics on the growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Dairy Technology 62(3), 326-330.

Voorstelling van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV

Het Wetenschappelijk Comité is een adviesorgaan van het Belgisch Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) dat **onafhankelijk wetenschappelijk advies** verschaft met betrekking tot risicobeoordeling en risicobeheer in de voedselketen en dit op vraag van de gedelegeerd bestuurder van het FAVV, de Minister die bevoegd is voor de voedselveiligheid of op eigen initiatief. Het Wetenschappelijk Comité wordt administratief en wetenschappelijk ondersteund door de Stafdirectie voor Risicobeoordeling van het Agentschap.

Het Wetenschappelijk Comité bestaat uit 22 leden die benoemd zijn bij koninklijk besluit op basis van hun wetenschappelijke expertise in domeinen die te maken hebben met de veiligheid van de voedselketen. Het Wetenschappelijk Comité kan bij de voorbereiding van een advies beroep doen op externe deskundigen die geen lid zijn van het Wetenschappelijk Comité. Net als de leden van het Wetenschappelijk Comité dienen zij in staat te zijn om onafhankelijk en onpartijdig te kunnen werken. Om de onafhankelijkheid van de adviezen te waarborgen worden potentiële belangenconflicten transparant beheerd.

De adviezen zijn gebaseerd op een wetenschappelijke beoordeling van de vraagstelling. Zij vertolken het standpunt van het Wetenschappelijk Comité dat in consensus is genomen op basis van risicobeoordeling en de bestaande kennis over het onderwerp.

De adviezen van het Wetenschappelijk Comité kunnen **aanbevelingen** bevatten voor het controlebeleid van de voedselketen of voor de belanghebbende partijen. De opvolging van de aanbevelingen voor het beleid behoort tot de verantwoordelijkheid van de risicomangers.

Vragen over een advies kunnen gericht worden aan het secretariaat van het Wetenschappelijk Comité: Secretariaat.SciCom@favv.be.

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

Omwille van een belangenconflict namen G. Daube en M. Sindic niet deel aan de beraadslagingen bij de goedkeuring van het advies.

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:	M. Uyttendaele (verslaggever), L. Herman, L. De Zutter
Externe experts:	V. Delcenserie (ULg), A. Geeraerd (KUL), M. Polet (WIV-NRL)
Dossierbeheerder:	C. Verraes

De activiteiten van de werkgroep werden opgevolgd door het volgende lid van de administratie (als waarnemer): V. Cantaert (FAVV)

Wettelijk kader

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.

Bijlage 1: Resultaten van houdbaarheidstesten van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter voor de periode 2014-2015 in Wallonië

Producent	Lot	Gezouten	Fermenten	Eerste analyse				Tweede analyse					
				Dag	Detectie <i>Listeria monocytogenes</i> in 25 g (aantal positief/totaal aantal)	Telling <i>Listeria monocytogenes</i> in kve/g (aantal/totaal aantal)	pH	a _w	Dag	Detectie <i>Listeria monocytogenes</i> in 25 g (aantal positief/totaal aantal)	Telling <i>Listeria monocytogenes</i> in kve/g (aantal/totaal aantal)	pH	a _w
1	1	ja	neen	2	5/5	10 (1/5); < 10 (4/5)	4,83	0,970	21	5/5	< 10 (5/5)	4,94	0,983
1	2	neen	neen	1	1/5	< 10 (1/5); / (4/5)	4,96	0,972	28	0/5	/ (5/5)	4,76	0,951
1	3	neen	neen	1	5/5	< 10 (5/5)	-	-	21	3/5	< 10 (5/5)	5,07	0,927
2	4	ja	ja	1	5/5	< 10 (1/5); / (4/5)	-	-	102	8/10	10 (2/10); < 10 (6/10); / (2/10)	-	-
3	5	ja	ja	3	5/5	10 (1/5); < 10 (4/5)	3,98	0,958	21	4/5	10 (1/5); < 10 (4/5)	4,71	0,851
4	6	-	neen	1	5/5	10 (1/5); < 10 (4/5)	5,36	0,911	24	4/4	< 10 (4/4)	-	-
5	7	-	neen	2 tot 8	5/5	150, 210, 90, 170, 130	5,05	0,926	21 tot 27	5/5	110, 330, 360, 80, 100	5,40	0,902
6	8	-	neen	2 tot 7	2/5	< 10 (5/5)	4,66	0,985	21	0/5	/ (5/5)	4,54	0,970
3	9	ja	neen	1	3/5	< 10 (5/5)	4,12	0,950	21	1/5	< 10 (5/5)	4,53	0,940
7	10	neen	neen	0	3/5	< 10 (4/5); / (1/5)	4,77	0,980	21	1/5	< 10 (5/5)	6,23	0,980
8	11	ja	neen	13	5/5	< 10 (5/5)	6,78	-	22	5/5	10 (2/5); < 10 (3/5)	5,56	-

/ = geen telling uitgevoerd.

Bijlage 2: Resultaten van het controleprogramma van het FAVV van *Listeria monocytogenes* in rauwmelkse hoeveboter voor de periode 2008-2015

	Detectie			Telling			Telbaar resultaat (10-100 kve/g)	Totaal
	Aanwezig in 25 g	Afwezig in 25 g	Totaal	< 10 kve/g	< 40 kve/g	< 100 kve/g		
2008				195	2	2	5	204
2009				176	2	5	2	185
2010	4	43	47	102	1	13		116
2011	1	24	25	94	1	8		103
2012	8	38	46	83		9		92
2013	4	15	19	98	2	9		109
2014	30	102	132	13		1		14
2015	12	28	40	53		4		57
Totaal	59	250	309	814	8	51	7	880

Telbare resultaten waren 10, 10, 20, 20 en 25 kve/g in 2008 en 10 en 10 kve/g in 2009.