

ADVIES 26-2017

Betreft:

**Risico van de verspreiding van mest en
mestdigestaten gecontamineerd door
*Clostridium botulinum***

(SciCom N°2017/04)

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 15 december 2017

Sleutelwoorden: Botulisme, intoxicatie, toxi-infectie, botulinetoxine, spore, runderen, mest, gier, biomethanisatie, digestaat, hygiëniseren/pasteuriseren, bemesting, beweiding

Key terms: botulism, intoxication, toxico-infection, botulinum toxin, spore, cattle, manure, liquid manure, biomethanisation, digestate, hygienisation/pasteurization, spreading, grazing

Inhoud

Samenvatting	3
Summary	4
1. Referentietermen	5
1.1. <i>Specifieke vraagstelling</i>	5
1.2. <i>Wettelijke bepalingen</i>	5
2. Definities & Afkortingen	6
3. Inleiding	8
3.1. <i>Context van de adviesaanvraag</i>	8
3.2. <i>Clostridium botulinum</i>	9
3.2.1. Microbiologische eigenschappen	9
3.2.2. Omgevingsresistentie, meer in het bijzonder resistentie aan hitte	10
3.2.3. Pathologie en klinische aspecten bij dieren, in het bijzonder bij herkauwers	10
3.2.4. Diagnostiek	11
3.3. <i>Biomethanisatieproces</i>	11
3.4. <i>Potentiële biologische gevaren van het biomethanisatieproces en gegevens met betrekking tot C. botulinum</i>	12
3.5. <i>Wetgevende aspecten betreffende (vloeibare) mest en mestdigestaten</i>	12
4. Risicobeoordeling	13
4.1. <i>Risico-traject</i>	13
4.2. <i>Gevarenidentificatie</i>	14
4.3. <i>Gevarenkarakterisering</i>	14
4.3.1. Inschatting van de insleep	14
4.3.2. Inschatting van de blootstelling.....	15
4.3.3. Inschatting van de gevolgen	16
4.3.4. Kwalitatieve risicobeoordeling	16
5. Antwoorden op de specifieke vragen.....	17
6. Onzekerheden	22
7. Conclusie	23
8. Aanbevelingen	23
Referenties	26
Voorstelling van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV	29
Leden van het Wetenschappelijk Comité	29
Belangenconflict.....	29
Samenstelling van de werkgroep	30
Wettelijk kader	30
Disclaimer.....	30
Bijlagen.....	31
<i>Tabel I: Karakteristieken inzake overleven, groei en toxicogenese van de verschillende toxinotypes van Clostridium botulinum.</i>	31
<i>Tabel II: Incidentiepercentage van de gevallen van runderbotulisme afgeleid van de notificatiegegevens aan het FAVV en van de gegevens van de monsters die positief waren na diagnose in het Nationaal referentielaboratorium (Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid)</i>	32
<i>Figuur 1: Model van risicotraject voor rundermest gecontamineerd met Clostridium botulinum, die eventueel een vergisting kan ondergaan</i>	33
<i>Figuur 2: Identificatie in het model in figuur 1 van de belangrijkste besmettingswegen.</i>	34

Samenvatting

Context & Vraagstelling

Naar aanleiding van een haard van botulisme in een rundveebedrijf dat mest gebruikt als grondstof voor zijn biomethanisatie-installatie, wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd om de risico's voor de diergezondheid te beoordelen die gepaard gaan met de verspreiding van mest en mestdigestaten besmet met *Clostridium botulinum* toxinotype D. Er worden in dit verband ook een aantal concrete vragen gesteld.

Methodologie

Het advies is opgesteld op basis van literatuurgegevens, een kwalitatieve risicobeoordeling en expertopinie.

Resultaten

Uit de literatuurgegevens met betrekking tot de insleep, de blootstelling en de gevolgen blijkt dat het voornaamste risico bij het verspreiden van mest of mestdigestaat besmet met *C. botulinum* toxinotype D verband houdt met een potentiële verhoogde sporenconcentratie in de omgeving. Deze verhoogde sporenconcentratie geeft aanleiding tot een verhoogd risico op intoxicatie (inname van reeds gevormd botulinetoxinen). Dit risico werd door het Wetenschappelijk Comité echter beoordeeld als zeer laag in de twee beschouwde scenario's (verspreiding van mest of mestdigestaten).

Conclusies

Hoewel het risico van rechtstreekse intoxicatie van runderen door *Clostridium botulinum* type D via mest of mestdigestaten als zeer laag wordt ingeschat, beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om maatregelen te nemen die een zo laag mogelijke besmetting van het milieu beogen. Het Wetenschappelijk Comité heeft een antwoord geformuleerd op de specifieke vragen. Er worden algemene en specifieke aanbevelingen geformuleerd.

De aanbevelingen zijn enkel van toepassing op *Clostridium botulinum* toxinotypes C of D. Het risico dient opnieuw te worden beoordeeld voor andere toxinotypes van *Clostridium botulinum*.

Summary

Risk associated to the spreading of manure and digestate contaminated by *C. botulinum*

Background & Terms of reference

An outbreak of botulism in cattle has occurred in a holding using manure in its biomethanisation plant. The Scientific Committee has been requested to evaluate the animal health risks associated with the spreading of manure or digestates contaminated with *Clostridium botulinum* toxinotype D. Specific questions have been formulated.

Methodology

Answers to the specific questions have been provided based on data from the literature, on a risk assessment and expert opinion.

Results

The literature data concerning emission, exposure and consequences suggest that spreading of manure and digestate contaminated by *C. botulinum* can potentially increase the spore concentration in the environment. This higher spore concentration can lead to an increased risk of intoxication (ingestion of already formed botulin toxins). This risk was however assessed by the Scientific Committee as very low within the two considered scenarios (spreading of either manure or digestate).

Conclusion

The Scientific Committee responded to the specific questions. Although the risk associated with manure or digestates contaminated by *C. botulinum* has been assessed as 'very low' by the Scientific Committee, recommendations based on measures minimizing the environmental contamination should prevail. Responses to the specific questions have been formulated. General and specific recommendations have also been presented.

The conclusions and recommendations formulated in this Advice are only valid for *C. botulinum* toxinotype C or D. The risk should be re-evaluated in the case of any other toxinotype of *C. botulinum*.

1. Referentietermen

1.1. Specifieke vraagstelling

Naar aanleiding van een haard van botulisme in een rundveebedrijf dat mest gebruikt heeft als grondstof in zijn biomethanisatie-installatie, wordt gevraagd aan het Wetenschappelijk Comité om de risico's voor de diergezondheid te beoordelen van de verspreiding van mest (vaste mest en mestdigestaat) besmet met *Clostridium botulinum* toxinotype D.

De volgende specifieke vragen worden eveneens gesteld aan het Wetenschappelijk Comité:

- Wat is het natuurlijk contaminatieniveau van rundmest met *Clostridium botulinum* in een gezond rundveebedrijf?
- Kan met *Clostridium botulinum* gecontamineerde mest direct op weilanden verspreid worden? Wordt het risico van deze gecontamineerde mest verlaagd of weggeremd door biomethanisatie?
- Wordt gecontamineerde mest bij voorkeur behandeld in een biomethanisatie-installatie?
- Hoelang moet het digestaat beschouwd worden als gecontamineerd door *Clostridium botulinum*?
- Kan door middel van injectie van mestdigestaat in de bodem van weiden het risico op botulisme bij runderen worden beperkt rekening houdende met de microbiologische antagonisten in de bodem en het ubiquitair voorkomen van *Clostridium botulinum*? Dient er een sanitaire termijn te worden in acht genomen vóór beweiding en hoelang?
- Welke alternatieve oplossingen kunnen worden overwogen: behandeling, andere gebruiksmethoden?
- Hoe dienen verschillende analyseresultaten afkomstig van verschillende laboratoria te worden geïnterpreteerd?"

1.2. Wettelijke bepalingen

Wet van 24 maart 1987 betreffende de diergezondheid.

Koninklijk besluit van 3 februari 2014 tot aanwijzing van de dierenziekten die vallen onder de toepassing van hoofdstuk III van de diergezondheidswet van 24 maart 1987 en tot regeling van de aangifteplicht.

Koninklijk besluit van 22 mei 2005 houdende maatregelen voor de bewaking van en de bescherming tegen bepaalde zoönoses en zoönoseverwekkers.

Koninklijk besluit van 28 januari 2013 betreffende het in de handel brengen en het gebruiken van meststoffen, bodemverbeterende middelen en teeltsubstraten

Koninklijk Besluit van 14 november 2003 betreffende autocontrole, meldingsplicht en traceerbaarheid in de voedselketen, met inbegrip van de wijzigingen.

Richtlijn van de raad van 12 juni 1986 (86/278/EC) betreffende de bescherming van het milieu, in het bijzonder de bodem, bij het gebruik van zuiverings-slib in de landbouw.

Verordening 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.

2. Definities & Afkortingen

WIV-ISP	Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid
NRL	Nationaal referentielaboratorium (WIV-ISP voor de diagnostiek van <i>Clostridium botulinum</i> in België)
MBA	<i>Mouse bio-assay, in vivo</i> -test op muizen voor diagnose van <i>Clostridium botulinum</i>
DBP	Dierlijke bijproducten

Biomethanisatie: Biologisch proces waarbij organische stof (= grondstof) door anaerobe vergisting onder specifieke thermische omstandigheden kan omgezet worden in enkelvoudige elementen (meer bepaald methaan en koolstofdioxide). Digestaat is het residu van de vergisting (waarvan de microbiologische samenstelling gewoonlijk gewijzigd is t.o.v. de microbiologische samenstelling van de grondstof). Het proces kadert in de behandelingsmogelijkheden voor valorisatie van landbouwafval.

Digestaat: Residu van het biomethanisatieproces. Dit kan in de landbouw gevaloriseerd worden door bemesting van akkerland of weilanden.

Anaerobe vergisting: Biologisch anaeroob fermentatieproces van de grondstoffen bij biomethanisatie, dat voortvloeit uit de thermische behandeling. De vergisting kan mesofiel (30-38°C) of thermofiel (50-60°C) zijn. Hieruit volgt een wijziging van de bacteriële flora en de productie van gas.

Hygiënisatie: Fase in de pasteurisatie volgens Verordening 1069/2009 in het kader van de biomethanisatie van dierlijke bijproducten. De referentiebehandeling gebeurt aan 70°C gedurende minstens één uur. Andere behandelingen of uitzonderingen zijn mogelijk in bepaalde situaties (zie punt 3.5 hierna).

Intoxicatie (door botulisme): Intoxicatie na inname van het botulinetoxine dat zich in een voedingsmiddel, in drinkwater of in een eiwithoudende matrix (vb. kadaver, ingekuuld gras of bierbostel) gevormd heeft.

Grondstof: Materiaal dat in de biomethanisatieinstallatie ingebracht wordt: landbouwafval afkomstig van fokkerijen (gier of drijfmest), bijproducten van de agrovoedingsindustrie, plantaardig afval, vaste organische fracties uit huishoudelijk afval en slib afkomstig van zuiveringsstations.

Mest: uitwerpselen met of zonder urine van landbouwhuisdieren, vermengd met strooisel.

Toxi-infectie (door botulisme): klinische aandoening die ontstaat na *in vivo* ontkieming van *Clostridium botulinum* sporen in de darm (“infantiel botulisme” en “intestinaal botulisme” bij de mens) of in een wonde, gevolgd door groei van vegetatieve vormen en productie van toxinen.

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 15 juni 2017 en 7 juli 2017 en de plenaire zittingen van 20 oktober 2017 en 15 december 2017,

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgend advies:

3. Inleiding

3.1. Context van de adviesaanvraag

In oktober 2016 werd in een rundveebedrijf hoge sterfte vastgesteld. Op basis van klinische symptomen werd botulisme vermoed en verschillende monsters werden door het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV-ISP, NRL voor de diagnose van *C. botulinum* in België) geanalyseerd. De resultaten van de *in vivo* test op muizen (*mouse bioassay*, MBA, referentietest voor diagnose van botulisme) hebben de aanwezigheid van toxinogene *C. botulinum* (toxintype D) aangetoond in verschillende monsters (pensinhoud, veevoeder, rundermest). Het botulinetoxine werd eveneens via MBA aangetoond in de pensinhoud. Het botulinetoxine dat via moleculaire analyse (real time PCR) werd geïdentificeerd was een hybride type D-C. Andere mogelijke oorzaken voor de hoge sterfte werden uitgesloten.

Op basis van het beslissingsmodel, voorgesteld in advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité kon botulisme redelijkerwijs bevestigd worden. Dit beslissingsmodel is gebaseerd op: (i) anamnese en typische klinische symptomen, (ii) identificatie van het botulinetoxine, (iii) geen identificatie van andere mogelijke oorzaken (SciCom 2006b). In het koninklijk besluit van 22 mei 2005 is botulisme vermeld als een bacteriële zoönose die onderworpen is aan de toepassing van hoofdstuk III van de dierengezondheidswet van 24 maart 1987 en dus aan een meldingsplicht. Botulisme komt eveneens voor in het koninklijk besluit van 3 februari 2014 tot aanwijzing van de dierenziekten die vallen onder de toepassing van hoofdstuk III van de dierengezondheidswet van 24 maart 1987 en tot regeling van de aangifteplicht en dit zowel voor bacteriële zoönosen als meer specifiek voor rundvee.

Het rundveebedrijf beschikt over een biomethanisatie-installatie met twee vergistingsapparaten en een post-vergistingsapparaat die met verschillende grondstoffen werken. Het fermentatieproces verloopt in de drie opeenvolgende vergistingsapparaten. De fermentatie wordt verdergezet in het post-vergistingsapparaat waar ook methaan gerecupereerd wordt. De tijd tijdens dewelke de grondstoffen hierin verblijven varieert tussen 40 en 75 dagen. Het digestaat wordt gehygiëniseerd (1u aan 70°C) na verlaten van het post-vergistingsapparaat. Het digestaat gaat door verschillende tanks, waarna het afgekoeld wordt in één van de opslagtanks. Mest gecontamineerd met *C. botulinum* werd in de biomethanisatie-installatie gebracht vooraleer botulisme werd gediagnosticeerd op het rundveebedrijf. Monsters afkomstig van de vergistingsapparaten en de opslagtanks bleken positief te zijn voor de vegetatieve vormen en sporen van *C. botulinum* wanneer ze in het WIV-ISP geanalyseerd werden, maar negatief wanneer ze later in twee andere referentielaboratoria in Europa geanalyseerd werden (alle testen werden op dezelfde monsters uitgevoerd).

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd om zich uit te spreken over de risico's voor de diergezondheid van de verspreiding van mest en mestdigestaten die met *C. botulinum* (toxintype D) gecontamineerd zijn.

Er worden tevens verschillende specifieke vragen gesteld aan het Wetenschappelijk Comité:

- Wat is het natuurlijk contaminatieniveau met *Clostridium botulinum* van mest afkomstig van een gezond rundvee bedrijf?
- Kan gecontamineerde mest direct op weilanden gevaloriseerd worden? Wordt het risico van gecontamineerde mest verlaagd of weggewerkt door biomethanisatie?
- Wordt gecontamineerde mest bij voorkeur behandeld in een biomethanisatie-installatie?
- Hoelang moet het digestaat beschouwd worden als gecontamineerd door *Clostridium botulinum*?
- Kan door middel van injectie van mestdigestaat in de bodem van weiden het risico op botulisme bij runderen worden beperkt rekening houdende met de microbiologische antagonisten in de bodem en het ubiquitair voorkomen van *Clostridium botulinum*? Dient er een sanitaire termijn worden in acht genomen vóór beweiding en hoelang? Welke alternatieve oplossingen kunnen worden overwogen: behandeling, andere gebruiksmethoden?
- Hoe dienen verschillende analyseresultaten afkomstige van verschillende laboratoria geïnterpreteerd te worden?

3.2. *Clostridium botulinum*

3.2.1. Microbiologische eigenschappen

Clostridium botulinum is een gram positieve, anaerobe bacterie, die sporen kan vormen die lang kunnen overleven onder zeer ongunstige omstandigheden. *C. botulinum* veroorzaakt botulisme. Botulisme is een zeldzame ziekte (intoxicatie) die tot zenuwverlamming en sterfte kan leiden. De bacteriën en sporen komen ubiquitair voor, onder meer in de bodem, in slib, in zee- of rivierafzettingen en in planten in ontbinding. Ze kunnen ook voorkomen in het maag-darmkanaal van dieren en mensen. Als gevolg van een verontreiniging kan *C. botulinum* in de voedselketen terecht komen, voornamelijk onder de vorm van sporen. Kieming van de sporen vindt plaats onder anaerobe omstandigheden en de afgifte van het toxine vindt voornamelijk plaats aan het einde van de groeifase, samenvallend met bacteriële lysis (Siegel et al., 1979).

C. botulinum wordt onderverdeeld in 7 serotypes of types op basis van de serologische specificiteit van het aangemaakte neurotoxine: A, B, C, D, E, F en H (het type G werd onlangs geklasseerd als geproduceerd door een aparte soort, *Clostridium argentinense*) (EC, 2006 ; WRAP, 2015).

C. botulinum is onderverdeeld in vier groepen (I, II, III, IV) gebaseerd op fylogenetische karakteristieken en virulentie. Bacteriën van de groepen I en II produceren A, B, E en F -type toxines die botulisme bij mensen veroorzaken. Type B komt het meeste in Europa voor en geeft aanleiding tot mildere vormen t.o.v. type A. Er zijn ook gevallen beschreven van runderen die klinische tekenen vertoonden en stierven na inname van *C. botulinum* type B toxinen (Notermans et al., 1979, 1981). Groep III bestaat uit de types C en D die enkel botulisme bij dieren veroorzaken en niet bij mensen (ACMSF, 2006 ; AFSSA, 2002 ; Lindström et al., 2010 ; SciCom, 2006a). Tot groep IV behoort *Clostridium argentinense*.

3.2.2. Omgevingsresistentie, meer in het bijzonder resistentie aan hitte

C. botulinum sporen hebben een cellulaire weerstand aan extreme omgevingsomstandigheden, waaronder hitte. Zij overleven zeer lang in het milieu en zijn bestand tegen invriezen en dehydratatie. Het botulinetoxine daarentegen wordt vrij snel geïnactiveerd in het milieu en is gevoelig aan hitte (30 minuten aan 80°C). De kenmerken voor overleving en groei van (vegetatieve) *C. botulinum* variëren in functie van hun toxinotype en van hun groep. Hiervan wordt een synthese gegeven in Bijlage (Tabel I). De vegetatieve cellen van *C. botulinum* worden vernietigd door pasteurisatie.

3.2.3. Pathologie en klinische aspecten bij dieren, in het bijzonder bij herkauwers

Bij runderen, paarden en kleine herkauwers wordt botulisme hoofdzakelijk veroorzaakt door de toxinen B, C en D. In sommige gebieden van de Verenigde Staten werden eveneens gevallen van botulisme bij paarden aangetoond die te wijten waren aan het toxine A. Botulisme komt zelden voor bij honden en katten. Varkens zijn eveneens weinig vatbaar. Kippen en watervogels zijn hoofdzakelijk vatbaar voor toxine C en de hybride vorm C-D. Sporadische epidemieën door toxinen A en E werden respectievelijk bij kippen en watervogels beschreven.

Ziekte kan voorkomen bij:

- Een toxi-infectie (inname van vegetatieve vormen en/of sporen van *C. botulinum* en de daaropvolgende productie van toxinen, onder andere in het spijsverteringsstelsel van de geïnfecteerde gastheer);
- Een intoxicatie (inname van reeds gevormde botulinetoxinen in voeding, drinkwater of in het milieu dat rechtstreeks in contact is met voeding of drinkwater).

Het botulinetoxine grijpt onder andere in op de neuromusculaire junctie waar het de productie van acetylcholine afremt en zo een verlamming van de motorische zenuwen veroorzaakt.

Klinisch gezien komen intoxicaties vaker voor bij runderen (Seyboldt et al., 2015) dan toxi-infecties. De incubatieperiode hangt onder andere af van de hoeveelheid ingenomen toxine en varieert van 18 uur tot 16 dagen bij runderen. Over het algemeen zijn meerdere dieren van het bedrijf getroffen op een zeer korte tijd. Bij de gevoelige diersoorten worden de intoxicaties met C en D toxinen gekarakteriseerd door een algemene spierzwakte en, in een verder gevorderd stadium, door progressieve en symmetrische verlamming van de motorische spieren. Een eerste klinisch teken bij runderen is vaak een onvaste gang (slepende achterpoten) met een toenemende neiging te gaan liggen en moeite met rechtstaan. Ook de staart kan verlamd zijn. Het dier verliest gewicht (verlamming van de kauwspieren en de tong). Bij type B intoxicatie van runderen en paarden worden over het algemeen in het eerste stadium maagdarmstoornissen vastgesteld: slikken, trommelzucht, kolieken, constipatie of diarree. Daarna kan er verlamming optreden. Er kunnen zich eveneens gevallen voordoen met enkelvoudige verlamningsverschijnselen zonder klinische tekenen in het spijsverteringskanaal. Over het algemeen volgt de dood na verlamming van de ademhalingspijpen.

Bij pluimvee werden toxi-infecties beschreven die te wijten waren aan kiemgroei en productie van toxinen in het spijsverteringsstelsel (gelijkaardig aan “infantiel botulisme” bij de mens). Bij veulens spreekt men van het “shaker foal syndroom”. Deze aandoening wordt voornamelijk gekarakteriseerd door spierzwakte en spiertrekkingen. Bovendien zou volgens sommige auteurs, “grasziekte” bij paarden verband houden met een toxi-infectie door de productie van het botulinetoxine in het distale maagdarmkanaal, maar dit werd nooit duidelijk aangetoond. Bij runderen spreekt men van “de visceraal vorm van botulisme” (Bohnel et al., 2001; Krüger et al.,

2014b). Dit zou zelden voorkomen en staat ter discussie in de literatuur (EC, 2006 ; Popoff, 1989 ; Seyboldt et al., 2015 ; Van Huffel et al., 2008). De meest voorkomende klinische tekens zijn hoger sterftcijfer, constipatie afgewisseld door diarree, hoefbevangenheid, ataxie, stramme tred, apathie, gezwollen halsaders, oedeem van de poten, aan de kaak en de uier, dyspneu.

3.2.4. Diagnostiek

Clostridium neurotoxines (botulinetoxines) zijn zeer krachtige stoffen en een snelle diagnose is dus essentieel. De diagnose bij mens en dier is in de eerste plaats klinisch (klinische symptomatologie) en wordt bevestigd in het laboratorium. De diagnose in het laboratorium is gebaseerd op de detectie van botulineneurotoxines in een klinisch monster (organen, serum, ontlasting). Bijkomende bevestiging van de diagnose bestaat uit de opsporing van genen die coderen voor deze botulinetoxines en/of het isoleren van neurotoxine producerende clostridia. Bij uitbraken van intoxicaties worden meer diepgaande onderzoeken uitgevoerd om de bron van de intoxicatie te vinden en worden de hieronder beschreven analyses uitgevoerd in het laboratorium.

Opsporing van botulinetoxines

De standaardprocedure voor de opsporing van botulinetoxines is de bioassay op muizen (*mouse bioassay*, MBA). Deze test bestaat uit de intraperitoneale injectie van minstens twee muizen met een extract van het monster en/of een supernatans van een bacteriecultuur. Indien (een) botulinetoxine(s) aanwezig is (zijn), zullen de geïnjecteerde muizen typische symptomen vertonen (abdominale hypotonie, wespentaille als gevolg van een verlamming van de ademhalingspijpen, moeilijke ademhaling, verlamming) die de dood kunnen veroorzaken. Het kan meerdere dagen duren voordat deze symptomen zich manifesteren en de observatie wordt daarom uitgevoerd gedurende vier dagen. Om het type toxine(s) dat aanwezig is (zijn) te bepalen, wordt vervolgens een neutralisatietest uitgevoerd met behulp van specifieke antitoxines. Het antitoxine zal specifiek het toxine neutraliseren dat aanwezig is en zal de muizen in leven houden, waardoor het type van het aanwezige toxine kan worden bepaald. Dit laat ook toe om een specifieke dood bij muizen uit te sluiten.

Alternatieve methodes voor de opsporing van toxines, zoals bijvoorbeeld immunologische testen, zijn ontwikkeld en/of worden momenteel gevalideerd. Deze methodes vereisen echter het gebruik van antilichamen van goede kwaliteit en vertonen een lagere gevoeligheid, met name voor klinische monsters.

Opsporen en isoleren van de botulinetoxine-producerende kiem

De conventionele methodes gebruikt voor de opsporing van *C. botulinum* bestaan uit het beënten van een vloeibaar aanrijkmingsmedium gevolgd door de opsporing van toxines in het supernatans van de cultuur d.m.v. MBA. De fysiologische diversiteit van de *C. botulinum*-groepen bemoeilijkt de diagnose. Er kunnen diverse niet-selectieve milieus worden gebruikt, wetende dat deze milieus de groei van andere organismen mogelijk maken, alsook uiteenlopende incubatietemperaturen (van 30°C tot 37°C). Een incubatie van minstens 5 tot 7 dagen wordt aanbevolen. Als alternatief kan een opsporing worden uitgevoerd aan de hand van een moleculaire methode. De moleculaire methodes zijn gebaseerd op de opsporing van het DNA van de genen van de toxines die aanwezig zijn bij neurotoxische *C. botulinum* na een aanrijking in een vloeibaar milieu. Deze methodes kunnen dus noch de toxines detecteren noch de activiteit van de toxines aantonen, maar het voordeel is dat ze snel zijn en dat het gebruik van proefdieren vermeden wordt.

3.3. Biomethanisatieproces

(Bio)methanisatie is een natuurlijk biologisch proces dat toelaat om organisch materiaal (biomassa = koolhydraten, lipiden, eiwitten) om te zetten naar enkelvoudige elementen (CH₄, CO₂,

NH₃, H₂S, H₂) met behulp van anaerobe bacteriën. Deze anaerobe biomethanisatie of vergisting is een complex biologisch proces en kan worden beschreven in 4 degradatiefases: hydrolyse, acidogenese, acetogenese en methanogenese. In iedere fase spelen specifieke bacteriën en/of Archaea een rol. Alle moleculen die niet worden gedegradeerd door deze methode om biogas te produceren (lignine bijvoorbeeld) en het afval van deze anaerobe reacties vormen het digestaat. Het proces verloopt in opeenvolgende vergistingsinstallaties waarin omstandigheden zoals temperatuur, pH en andere indicatoren perfect beheerst moeten worden om een optimaal rendement te verzekeren. Biomethanisatie produceert energie onder de vorm van gas waardoor nevenproducten van de plantaardige en dierlijke productie, de agrovoedingsindustrie of grootkeukens gevaloriseerd worden. Het nevenproduct van biomethanisatie, het digestaat, kan zelf worden gevaloriseerd in de landbouw als meststof. Het digestaat is een hoogwaardige meststof dankzij de hoge biobeschikbaarheid van nutriënten gecombineerd met een organische matrix die voedingsstoffen vasthoudt in de bodem en hierdoor de kwaliteit van het oppervlaktewater vrijwaart.

3.4. Potentiële biologische gevaren van het biomethanisatieproces en gegevens met betrekking tot *C. botulinum*

De biologische gevaren van het biomethanisatieproces hebben te maken met de oorsprong van de gebruikte grondstof. Pathogene micro-organismen die zich in het spijsverteringskanaal bevinden, houden potentieel risico's in voor de valorisatie van mest via rechtstreekse bemesting of via het biomethanisatieproces: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, andere *Enterobacteriaceae* (waaronder de soorten die bèta-lactamasen met uitgebreid spectrum produceren), *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., sommige *Clostridium* en *Bacillus*, *Coxiella burnetti*, *Staphylococcus* spp. (o.a. de soorten die resistent zijn tegen methicilline), *Yersinia* spp., hepatitis E virus, *Coccidia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* spp., *Ascaris* spp. en *Trichostrangyilidae* spp.

Terwijl werd vastgesteld dat het biomethanisatieproces een groot effect had op de hygiënisatie van niet-sporenvormende bacteriën (bijvoorbeeld *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Yersinia* spp.), is dit effect op bacteriële sporen kleiner en kwantitatief minder uitgesproken (i.e. *Bacillus*, spp., *Clostridium* spp.) Ook op bepaalde virussen is dit effect kleiner (Bagge 2009 ; EC, 2001 ; RIVM, 2014 ; Sahlström, 2006). Recente studies zijn tegenstrijdig. Sommige studies wijzen op een hygiëniserend effect op het merendeel van de pathogene clostridia, vooral in het geval van thermofiele biomethanisatiereactoren, met uitzondering van *Clostridium difficile* waarvoor werd vastgesteld dat die resistent is tegen het proces (Fröschle *et al.*, 2015). Andere studies wijzen op een toename van het risico in vergelijking met onvergist dierlijk landbouwfal (Neuhaus *et al.*, 2015). In dit laatste geval heeft een methodologische bias de detectie van *C. botulinum* in digestaten vergemakkelijkt in vergelijking met de detectie ervan in de mest: het digestaatmonster werd vooraf verrijkt.

3.5. Wetgevende aspecten betreffende (vloeibare) mest en mestdigestaten

Verordening (EG) nr. 1069/2009 en Verordening (EU) nr.142/2011 (verordeningen over dierlijke bijproducten, DBP) bepalen de regels inzake de valorisatie van onverwerkte of verwerkte mest. Deze verordeningen zijn ook van toepassing op biomethanisatie-installaties waarin mest of andere dierlijke bijproducten verwerkt worden.

Mest

In de verordeningen betreffende DBP wordt mest gedefinieerd als “uitwerpselen en/of urine van landbouwhuisdieren, met uitzondering van gekweekte vissen, met of zonder strooisel”. Mest wordt geclassificeerd als categorie 2-materiaal (Verordening (EG) 1069/2009). Mest valt onder de definitie van “organische meststoffen en bodemverbeteraars” van Verordening (EG) 1069/2009.

De bijzonderheid van mest ten opzichte van andere organische meststoffen en bodemverbeteraars op basis van dierlijke bijproducten is dat mest is vrijgesteld van heel wat regels voor verwerking en gebruik. Mest kan worden gebruikt voor de vervaardiging van organische meststoffen of bodemverbeteraars. Mest kan worden omgezet in compost of biogas met of zonder voorafgaande verwerking. Mest kan worden gebruikt in de bodem zonder voorafgaande verwerking en zonder sanitaire termijn voor beweiding of oogst van groenvoer. In dat geval wordt mest beschouwd als “onverwerkt”.

Mest mag worden uitgewisseld tussen landbouwbedrijven via een vereenvoudigd systeem. Voor de uitwisseling tussen Lidstaten moet mest “gehygiëniseerd” zijn. Tussen buurlanden mag mest “onverwerkt” uitgewisseld worden onder bepaalde voorwaarden.

Om als “gehygiëniseerd” te worden beschouwd en om geëxporteerd te kunnen worden moet mest een behandeling van minstens 60 minuten aan 70°C ondergaan (hygiënisatie). De Lidstaten (in België: de Gewesten) kunnen alternatieve verwerkingsmethodes valideren. In dat geval moet verwerkte mest aan bepaalde biologische criteria voldoen.

Digestaten van biomethanisatie

Over het algemeen moet digestaat dat dierlijke bijproducten bevat de regels volgen die Verordening (EG) 1069/2009 voorschrijft. Enerzijds, mag de omvang van de partikels maximaal 12 mm bedragen wanneer ze in de biomethanisatie-installatie worden binnengebracht en, anderzijds, moet de input of het digestaat gedurende 1 uur worden onderworpen aan een behandeling bij 70°C. Enkel bijproducten van categorie 2 (mest) of van categorie 3 (keukenafval, gezonde eieren, gezonde rauwe melk) mogen worden gebruikt als grondstof voor biomethanisatie. Het digestaat mag ook plantaardige grondstoffen bevatten. Uitzonderingen buiten beschouwing gelaten, is een sanitaire termijn van 21 dagen van toepassing tussen het uitstrooien van het digestaat en de beweiding of de oogst van het groenvoer.

De Lidstaten (in België: de Gewesten) kunnen ook alternatieve verwerkingsmethodes valideren of, al naargelang de input (mest, melk, keukenafval) andere specifieke vereisten toepassen.

4. Risicobeoordeling

4.1. Risico-traject

Op basis van de verschillende elementen die voor de risicobeoordeling in aanmerking moeten worden genomen werd een risicotraject¹ opgemaakt (SciCom, 2017; Fig. 1 in bijlage) voor de verspreiding van rundermest of mestdigestaat, gecontamineerd met *C. botulinum*.

¹ Het risico-traject model is een instrument om structuur te geven aan het proces en om de uitwisseling tussen experts te vergemakkelijken om het probleem beter te begrijpen, om de parameters die in acht moeten worden genomen worden alsook de vereiste informatie en gegevens te identificeren, om de aanpak voor het beantwoorden van de gestelde vragen efficiënt te organiseren, om hypothesen te formuleren, enz. Het model maakt gebruik van de elementen die geïdentificeerd werden in de vorige fase van het voorbereidend proces van de risicobeoordeling. Het risico-traject model is een beschrijving en/of een schematische weergave van gekende of van vermoedelijke relaties tussen de verschillende geïdentificeerde elementen, in overeenstemming met de beschreven of relevant beschouwde scenario's. In dit dossier is het gevaar dat bestaat uit de vegetatieve vormen van *C. botulinum*, hun sporen en de aanwezigheid van botulinetoxinen geïntegreerd sinds hun emissie door geïnfecteerd rundvee totdat ze opnieuw worden opgenomen door gezond rundvee, en dit volgens twee scenario's.

4.2. Gevarenidentificatie

Botulisme is een ziekte die het zenuwstelsel aantast bij mens en dier ten gevolge van het botulinetoxine geproduceerd door *C. botulinum*. Het botulinetoxine is het meest krachtige gif dat tot op heden gekend is: de minimale dodelijke dosis voor muizen bedraagt 0,0003 µg/kg (Popoff, 1989) en runderen zouden tot 13 keer gevoeliger zijn dan muizen (gegevens voor de C-toxine ; WRAP, 2015). Verschillende toxinotypes (A tot H) en specifieke gevoeligheden van de gastheer worden beschreven. Bij runderen met botulisme komen de toxinotypes C en D en hun chimeren D-C en C-D het meest voor. Deze types worden nooit aangetroffen bij botulisme bij de mens (ACMSF, 2006 ; AFSSA 2002 ; Lindström *et al.*, 2010 ; SciCom 2006a).

C. botulinum is een sporenvormende bacterie en de sporen ervan kunnen worden teruggevonden in dierlijke mest.

In het huidige landbouwsysteem kunnen twee valorisatietypes van dierlijke mest potentieel een gevaar vormen voor runderen en voor dieren die gevoelig zijn voor de toxinotypes B, C en D van *C. botulinum*:

- het verspreiden van besmette onverwerkte mest op weiden (of onrechtstreeks op gronden gelegen in de nabijheid van weidegebieden);
- het verspreiden van digestaat verkregen op basis van besmette mest.

4.3. Gevarenkarakterisering

4.3.1. Inschatting van de insleep

De insleep van *C. botulinum* wordt door het Wetenschappelijk Comité gedefinieerd als de waarschijnlijkheid om *C. botulinum* (onder vegetatieve vorm of onder de vorm van sporen) en/of botulinetoxine terug te vinden in mest of mestdigestaat.

Voor mest werden de volgende gegevens voor de studie van de insleep in aanmerking genomen:

- Bepaalde publicaties vermelden de aanwezigheid van *C. botulinum* (bacteriën en/of botulinetoxine) in mest (Bagge *et al.*, 2010; Dohrmann *et al.*, 2015; Neuhaus *et al.*, 2015) terwijl in andere studies *C. botulinum* niet werd aangetroffen (Fröschle *et al.*, 2015). In een studie die werd uitgevoerd in landbouwbedrijven verdacht van botulisme, was het botulinetoxine aanwezig in 16,7% van de vloeibare mest monsters (n=24) terwijl de sporen aanwezig waren in 16,8% van de gevallen (Neuhaus *et al.*, 2015). In een andere studie uitgevoerd in een bedrijf dat een biomethanisatie verwerkingsproces toepaste (Dohrmann *et al.*, 2015), werden 4 fylogenetische groepen van *C. botulinum* (groepen I, II III en IV) aangetroffen in substraten/grondstof (ingekuuld voeder en mest) in lage concentraties (in het bijzonder voor mest). De 4 fylogenetische groepen kunnen potentieel aanwezig zijn op basis van de aanwezigheid van genetische informatie aangetoond via moleculaire detectie, maar hun toxiciteit kon via deze methodologie niet worden aangetoond (analyses uitgevoerd op een selectie van 3 monsters).
- Herkauwers besmet met *C. botulinum* scheiden bacteriën (sporen, vegetatieve vormen) uit in hun mest aan hoge concentraties (Notermans *et al.*, 1978). Het NRL heeft bij uitbraken van botulisme-intoxicaties bij runderen al meermaals mest onderzocht die positief testte op het botulinetoxine en op *C. botulinum* bacteriën. De uitscheiding van deze bacteriën kan vrij lang duren: tot 8 weken nadat het voederen van besmet voeder werd

stopgezet (Notermans *et al.*, 1981). Bovendien werden hoge hoeveelheden bacteriën teruggevonden in de uitwerpselen (10^5 /kg uitwerpselen).

- Sporen van *C. botulinum* toxinotype B werden aangetroffen in mest van gezonde runderen (Lindström *et al.*, 2010).

Voor digestaat werden de volgende gegevens in aanmerking genomen:

- De nefaste impact van anaerobe vergisting op de ontwikkeling van *C. botulinum* (Fröschle *et al.*, 2015). De studie werd uitgevoerd op een stam van groep II waarvan de sporen meer warmtegevoelig zijn. De competitie met andere bacteriën die aanwezig zijn in organisch materiaal zou ook een essentiële factor zijn voor de verminderde groei van *C. botulinum* (Krüger *et al.* 2013a, 2013b; Rodgers *et al.* 2003; Shehata *et al.* 2013; Sullivan *et al.* 1988).
- Het hygiëniseringsproces bij een temperatuur van 70°C laat geen totale vernietiging toe van *C. botulinum* sporen die eventueel aanwezig zijn in organisch materiaal dat dienst doet als grondstof voor biomethanisatie-installaties (Bagge *et al.*, 2005, 2010; Neuhaus *et al.*, 2015). De sporenconcentraties in de digestaten zijn niet hoger dan de concentraties in mest (WRAP, 2015).

4.3.2. *Inschatting van de blootstelling*

De blootstelling werd door het Wetenschappelijk Comité gedefinieerd als de waarschijnlijkheid dat een rund of een groep runderen blootgesteld is aan een voldoende hoeveelheid toxines om ziek te worden.

Voor mest werden de volgende gegevens voor de studie van de blootstelling in aanmerking genomen:

- Sporen zijn resistent in mest en/of in het milieu (Notermans *et al.*, 1981).
- Het botulinetoxine is meest stabiel bij pH tussen 3,5 tot 6,8 en gevoelig voor licht.
- Er bestaat een competitie tussen omgevings- en intestinale microbiota (Krüger *et al.*, 2014a).
- Fosfortekorten komen zelden voor bij dieren in onze veehouderijen. Ook likgedrag op kadavers (afwijkend voedingsgedrag omwille van tekort aan mineralen) wordt zelden vastgesteld bij runderen ook al omdat in België runderen zelden in contact komen met kadavers van andere runderen.
- Een toename met een factor 1000 van de concentratie van sporen in het milieu heeft niet geleid tot een parallelle toename van de incidentie van botulismegevallen (Notermans *et al.*, 1981).
- *C. botulinum* toxinotype D bacteriën kunnen zich niet vermenigvuldigen op plantaardige eiwitten. Besmet ingekuuld gras is dus geen gunstige omgeving voor de groei van deze bacterie wanneer er geen andere eiwitbronnen (dierlijke eiwitten zoals kadavers) aanwezig zijn.

- De hoge verdunningsfactor in het milieu tijdens bemesting, zelfs in het geval van hoge sporenconcentraties in de uitwerpselen van één of meerdere besmette runderen.

Voor digestaat werden dezelfde gegevens in aanmerking genomen.

4.3.3. *Inschatting van de gevolgen*

De gevolgen voor de humane gezondheid werden niet beoordeeld aangezien *C. botulinum* toxintype D tot op heden nog nooit in verband werd gebracht met menselijke gevallen van botulisme (ACMSF, 2006; AFSSA, 2002; Lindström *et al.*, 2010; SciCom, 2006a). Er werd ook aangetoond dat menselijke neuronale cellen *in vitro* een lagere gevoeligheid voor toxine D vertonen dan voor andere types van toxines (Pellett *et al.*, 2015).

Voor de inschatting van de economische gevolgen en de gevolgen voor de diergezondheid werden drie componenten geïdentificeerd:

- De economische en sanitaire gevolgen voor één enkel bedrijf waar runderbotulisme voorkomt;
- De geografische verspreiding na de uitbraak van runderbotulisme in dit bedrijf;
- De economische en sanitaire gevolgen op nationaal en internationaal niveau.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat de sanitaire en economische gevolgen vooral belangrijk zijn voor het rundveebedrijf waar gevallen van botulisme voorkomen wegens de hoge mortaliteit bij besmette dieren en wegens het verbod voor het op de markt brengen van de melk.

4.3.4. *Kwalitatieve risicobeoordeling*

De literatuurgegevens met betrekking tot de insleep, de blootstelling en de gevolgen werden toegepast op het risicotraject van Fig. 1 om zodoende de meest belangrijke risico's in kaart te brengen (Fig. 2 in bijlage). Hieruit blijkt dat het voornaamste risico bij het verspreiden van mest of mestdigestaat besmet met *C. botulinum* toxintype D verband houdt met een verhoogde sporenconcentratie in de omgeving. Deze verhoogde sporenconcentratie geeft aanleiding tot een verhoogd risico op intoxicatie (inname van reeds gevormd botulinetoxinen). Deze intoxicatie is te wijten aan de mogelijke inname van kadavers die in deze omgeving besmet zullen zijn met sporen en waarin de condities optimaal zijn voor hun ontkieming en voor de productie van het botulinetoxine. Op basis van de inschatting van de kans op insleep (nul tot zeer laag) en de blootstelling (zeer laag) werd de waarschijnlijkheid van optreden als “zeer laag” ingeschat. De gevolgen voor de diergezondheid, beperkt tot het enige besmette bedrijf, werden als “incidenteel” beoordeeld. Het risico werd daarom door het Wetenschappelijk Comité ingeschat als “zeer laag” (zie ook Figuur 2 van het SciCom-richtsnoerdocument SciCom, 2017) in de twee beschouwde scenario's (verspreiding van mest of mestdigestaat).

Hoewel mogelijks niet alle gevallen van botulisme op het terrein gemeld of gediagnosticeerd worden, tonen incidentiecijfers aan dat klinisch botulisme bij rundvee zeldzaam is, ondanks het intensieve gebruik van mest en mestdigestaat voor de bemesting van landbouwgronden of weiland. De maximale incidentiepercentages van klinische verdenkingen van runderbotulisme opgetekend in Engeland (ongeveer 5,5 miljoen runderen) en Wales (ongeveer 250.000 runderen), liggen in de grootteorde van $1,8 \times 10^{-5}$ verdenkingen/jaar (103 geregistreerde verdenkingen) en $1,35 \times 10^{-5}$ verdenkingen/jaar (78 geregistreerde verdenkingen), respectievelijk in 2003 en 2004 (ACMSF, 2006). Er wordt een verband verondersteld met het bemesten met pluimveemest (dat soms nog pluimveekarkassen bevat), naar analogie met hetgeen werd vastgesteld in Frankrijk, Noord-Ierland en Nederland (Payne *et al.*, 2011; Souillard *et al.*, 2015). Door het inperken van het

gebruik van pluimveemest op weiden waar runderen grazen en als strooisel voor runderen is de incidentie van botulisme gedaald (ACMSF, 2006; WRAP, 2015). De meldingen van runderbotulisme aan het FAVV (Tabel II in bijlage) geven incidentieniveaus weer die gelijkaardig zijn aan of tien keer lager zijn dan de hoger vermelde cijfers, al naargelang het jaar dat wordt beschouwd.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat door het vermijden van bemesting met pluimveemest (die pluimveekarkassen kan bevatten) en het toepassen van goede praktijken tijdens de bewaring en het voederen van kuilvoerders (zodat ze niet door karkassen worden besmet) risico's op runderbotulisme kunnen worden verminderd.

5. Antwoorden op de specifieke vragen

- Wat is het natuurlijk contaminatieniveau met *C. botulinum* van mest afkomstig van een gezond rundveebedrijf?

Volgens het beslissingsmodel, voorgesteld in advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité, wordt een rundveebedrijf als gezond beschouwd indien er zich geen typische klinische gevallen van botulisme (progressieve zenuwverlamming) voordoen.

Verschuillende gegevens uit de literatuur tonen een variabele (nul tot extreem laag) en seizoensgebonden besmetting aan van rundermest van gezonde bedrijven via detectiemethodes die worden toegepast op de grondstof van biomethanisatie-installaties (Bagge *et al.*, 2005, 2010; Fohler *et al.*, 2016; Fröschle *et al.*, 2015; Neuhaus *et al.*, 2015; Souillard *et al.*, 2015). Door de diversiteit aan bemonsterings- en detectiemethoden die in de verschillende publicaties worden gebruikt, is het echter niet mogelijk om een nauwkeurig en betrouwbaar interval te bepalen. Voor wat betreft de oorsprong van het gevaar trekt het Wetenschappelijk Comité de aandacht op het feit dat de vegetatieve vormen en de sporen van *C. botulinum* van nature aanwezig zijn in de bodem, het water, de sedimenten van meren, rivieren en de vegetatie, d.w.z. in de omgeving van de runderen.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat *C. botulinum* tijdelijk voorkomt in de darm microbiota van het rund (onder de vorm van sporen) en zich eventueel kan vestigen in het spijsverteringskanaal (ontkieming van de sporen en vermenigvuldiging) in het geval van dysbacteriose veroorzaakt door voeding, ziekte of door iatrogene oorzaken (bv. behandeling met antibiotica) (Fohler *et al.*, 2016).

- Kan met *Clostridium botulinum* besmette mest rechtstreeks op weiland worden verspreid?

In haar antwoord houdt het Wetenschappelijk Comité rekening met de volgende literatuurgegevens:

- *C. botulinum* toxinotype D gebruikt niet-plantaardige substraten om te groeien (enkel toxinotypes A en B kunnen toxines produceren op basis van een plantaardige matrix als ingekuuld gras (Notermans *et al.*, 1979));
- *Clostridium botulinum* toxinotype D werd nog nooit in verband gebracht met gevallen van botulisme bij de mens (ACMSF, 2006; AFSSA, 2002; Lindström *et al.*, 2010; SciCom, 2006a). *In vitro* vertonen de menselijke neuronale cellen een lagere gevoeligheid voor het toxine D dan voor de andere types van toxines (Pellett *et al.*, 2015). Op basis van de

huidige gegevens kan dus redelijkerwijs worden aangenomen dat *C. botulinum* toxinotype D enkel een risico inhoudt voor de diergezondheid;

- De klinische vormen van runderbotulisme kunnen grotendeels in verband worden gebracht met intoxicaties (Lindström *et al.*, 2010) en de gevallen van visceraal botulisme lijken zeldzaam bij runderen (Seyboldt *et al.*, 2015). Het risico in verband met rechtstreekse inname van sporen is dus laag;
- In botulismehaarden zelfs met hoge sterfte, worden zeer zelden secundaire gevallen vastgesteld (d.w.z. gevallen die niet in verband kunnen worden gebracht met de rechtstreekse opname van het voorgevormde toxine). Zo werd in een recent geval van aviaire botulisme te wijten aan *C. botulinum* toxinotype C-D, geen enkele secundaire sterfte vastgesteld in het bedrijf, hoewel meer dan 5 maanden na het incident een sterke milieubesmetting door sporen van *C. botulinum* kon worden aangetoond. (Souillard *et al.*, 2017). De opvolging van rundveebedrijven die dicht bij aviaire botulismehaarden gelegen zijn, heeft aangetoond dat er verschillende toxinotypes kunnen teruggevonden worden in de omgeving van de runderen of zelfs bij de dieren (toxinotype C, D, C-D, D-C en E) zonder dat er klinische gevallen voorkomen en zonder dat de epidemiologische link met de circulerende stammen duidelijk kon worden vastgesteld (Souillard *et al.*, 2015). De opvolging van de omgeving en van runderen op rundveebedrijven die dichtbij een haard van runderbotulisme gelegen zijn toonde aan dat sporen van *C. botulinum* gedurende meer dan een jaar kunnen gedetecteerd worden, zowel in graskuilen als in uitwerpselen van dieren, zonder dat er klinische gevallen voorkwamen.

Op basis van deze gegevens besluit het Wetenschappelijk Comité dat door het verspreiden van besmette mest de milieuconcentratie aan sporen van *C. botulinum* toxinotype D toeneemt (hoewel de basale niveaus van deze milieucontaminatie slecht gedocumenteerd is, zie sectie 6, hieronder). Maar deze praktijk vormt geen rechtstreeks intoxicatierisico voor de runderen, d.w.z. voor de inname van reeds gevormde botulinetoxinen. Het risico voor de diergezondheid heeft louter te maken met de ingestie van sporen door knaagdieren, vogels, enz. Wanneer deze dieren sterven, kunnen ze, onder gunstige omstandigheden voor de groei van *C. botulinum*, een potentiële bron van botulinetoxines vormen. Runderen zouden dan het botulinetoxine kunnen opnemen via voeder of water besmet met deze kadavers.

Echter, gezien de zeer lage dosis die nodig is om een intoxicatie door het botulinetoxine te veroorzaken en om de milieucontaminatie te beperken, raadt het Wetenschappelijk Comité aan om mest niet zonder voorafgaande behandeling te verspreiden (vb. biomethanisatie of een alternatieve behandeling) indien deze afkomstig is van een bedrijf waar gevallen van botulisme zijn bevestigd aan de hand van laboratoriumtesten. Er wordt een wachtermijn van 21 dagen voorgesteld na het laatste klinische geval. Dit tijdsverloop komt overeen met de maximale prepatente periode die werd vastgesteld bij botulisme in het Verenigd Koninkrijk (ACFMS, 2006). De gangbare aanbevelingen met betrekking tot de productie, het beheer en de verspreiding van ingekuuld voeder op het landbouwbedrijf zouden moeten toelaten om de risico's te beperken. Deze risico's lijken echter minimaal te zijn.

- Wordt het risico van met *C. botulinum* besmette mest verlaagd of weggewerkt door vergisting?

In haar antwoord houdt het Wetenschappelijk Comité rekening met de volgende vaststellingen:

- De behandelingsparameters voor hygiënisatie (1 uur bij 70 ° C) zijn niet voldoende om de sporen van *C. botulinum* te elimineren (advies 23-2015 van het Wetenschappelijk Comité).

- Een recente uitgebreide studie over de log D-waarde met betrekking tot niet-proteolytische stammen van de groep II van *C. botulinum* (toxintype B, E, F), die meer vatbaar zijn voor warmte dan de stammen van de groep III (toxintype C, D), toont dat thermofiele biomethanisatieprocessen theoretisch niet voldoende zijn om alle sporen van *C. botulinum* te elimineren. Bovendien dient te worden opgemerkt dat er een bepaalde variabiliteit bestaat in de thermische resistentie tussen de stammen binnen de groep III zelf (Anses, 2011).
- In België gebruikt het merendeel van de biomethanisatie installaties een mesofiele methode voor de anaerobe vergisting. De verblijftijd van de grondstof varieert tussen 40 en 75 dagen (persoonlijke mededeling door A. Generet en P. Delfosse).
- In de literatuur worden resultaten gemeld over de efficiëntie van biomethanisatie om sporen van *Clostridium botulinum* te reduceren (gedeeltelijke of gehele reductie). Deze reductie hangt af van de temperatuur: de reductie (gemeten door de log D-waarde) is logischerwijs belangrijker voor thermofiele processen en is eveneens afhankelijk van de stam. Fröschle *et al.* (2015) hebben de log D-waarde beoordeeld in een stam van de groep II voor een mengsel van vegetatieve cellen en sporen. Deze waarde was respectievelijk 34,6 +/- 11,2 dagen (men observeerde een reductie van 97,7% ± 2,2 van de initiële lading na 63 dagen) bij mesofiele omstandigheden (38°C). Bij thermofiele omstandigheden (55°C) was de D-waarde 1 ± 0,2 dag (men observeerde een niet log-lineaire reductie van ongeveer 99.9 % van de initiële lading na 3 dagen).
- Het botulinetoxine alleen kan relatief temperatuurbestendig zijn (Tabel I) maar is zeer gevoelig voor pH-veranderingen (Rasooly *et al.*, 2010, Sugii *et al.*, 1977) en de werking van temperatuurafhankelijke proteasen. Hoewel de expressie van genen betrokken bij de toxinogenese voor *C. botulinum* toxintype A vergelijkbaar is bij 37 °C en 44 °C, is de resterende toxiciteit (geanalyseerd door MBA) van de toxinen lager na een 24-uurs incubatie bij 44 °C. Dit wordt verklaard door de werking van proteasen waarvan de expressiegenen worden gestimuleerd bij deze temperatuur (Coesnon *et al.*, 2006)². Er wordt daarnaast gesuggereerd dat de oraal ingenomen hoeveelheden van botulinetoxine aanzienlijk groter zouden moeten zijn (factor 10⁶) in vergelijking met intraperitoneale injectie gezien het effect van de lage maag-pH en de defensie-mechanismen in de darm (Rasooly *et al.*, 2010).

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat:

- het botulinetoxine niet bestand is tegen het biomethanisatieproces en dat het directe intoxicatierisico van runderen via de verspreiding van het digestaat dus nihil is;
- daarentegen kan de reductie van het aantal sporen tijdens het biomethanisatieproces onvoldoende zijn. Rekening houdende met de gemiddelde verblijftijd van de grondstof in

² Er dient opgemerkt te worden dat de relatie tussen de resterende toxiciteit en de temperatuur niet gevonden werd voor *C. botulinum* toxintype E. Deze stam heeft echter een genomische architectuur met betrekking tot de toxinogenese die erg verschilt van die van andere toxintypes (Coesnon *et al.*, 2006) en de bacterie kan in een koudere omgeving groeien.

de vergistingsinstallatie is het echter mogelijk om de initiële besmetting te reduceren op voorwaarde dat de omstandigheden die gunstig zijn voor het ontluiken van de sporen, en daaropvolgend een nieuwe sporulatie, niet in de hand worden gewerkt. Dit kan zich bijvoorbeeld voordoen ingeval een hygiëniserende plaatsvindt in de post-vergisting, die de sporulatie en de daaropvolgende ontluiking van *C. botulinum* sporen kan bevorderen omdat er minder andere concurrerende micro-organismen zijn. Er wordt dus aanbevolen om de hygiëniserende uit te voeren vóór de anaerobe vergisting.

- Wordt met *C. botulinum* besmette mest het best via een vergistingsinstallatie behandeld?

Rekening houdende met de hiervoor vermelde wetenschappelijke elementen uit de literatuur is het Wetenschappelijk Comité van mening dat met *C. botulinum* besmette mest het best via een vergistingsinstallatie wordt verwerkt voor zover deze op het bedrijf aanwezig is. In afwezigheid van een vergistingsinstallatie op een besmet bedrijf beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om, rekening houdend met de resistentie van de sporen, de gecontamineerde mest niet te vervoeren naar een andere biomethanisatie-installatie zodat deze of zijn omgeving niet gecontamineerd raakt. Er wordt aanbevolen in dat geval de mest via een alternatieve methode te behandelen (zie hierna).

- Hoelang moet het digestaat beschouwd worden als gecontamineerd door *C. botulinum*?

Rekening houdend met de gekende hoge thermostabiliteit van de sporen van *C. botulinum* onder experimentele omstandigheden en de onzekerheden voor wat betreft de levensduur van een spore in verschillende omgevingsomstandigheden kan geen eenduidig antwoord gegeven worden. Idealiter zou de aanwezigheid van sporenvormende bacteriën door middel van een kwantitatieve indicator moeten worden opgevolgd op het substraat of op het verdachte bijproduct. Voor wat betreft het toxine: dit is niet resistent tegen een behandeling, zoals hoger reeds vermeld is.

- Kan door injectie van mestdigestaat in de bodem van weiden het risico op botulisme bij runderen worden beperkt rekening houdende met de microbiologische antagonisten in de bodem en het ubiquitair voorkomen van *Clostridium botulinum*? Dient er een sanitaire termijn te worden in acht genomen vóór beweiding en hoelang?

Injectie van mestdigestaat besmet met sporen van *C. botulinum* beperkt de kans op indirecte verspreiding van de sporen (door wind, insecten of dieren) naar andere weiden, alsook de blootstelling van grazende dieren en wilde fauna. Deze techniek bevordert eveneens de competitie met de bacteriële flora in de bodem die interfereert met de groei van *C. botulinum*. Injectie kan echter het risico op overdracht van *C. botulinum* naar ondergrondse waterlagen verhogen. Bovendien bestaat er een onzekerheid betreffende de overlevingstijd van *C. botulinum* sporen in de bodem. Idealiter worden mestdigestaten geïnjecteerd via voren die lichtjes in de bodem zijn ingetrokken of verspreid via buizen die snel over de bodem versleept worden en waarbij vervuiling van de planten beperkt blijft. De sanitaire termijn die momenteel aanbevolen wordt en die empirisch is vastgesteld bedraagt minimum drie weken wachttijd voor beweiding. Een termijn die gelijk of langer is dan drie weken kan hier voor de besmette digestaten worden voorgesteld, met een bemestingsbeurt in het begin van de lente rekening houdende met het weideseizoen van runderen in België. Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan om de besmette digestaten alleen op akkers te verspreiden.

- Welke alternatieve oplossingen kunnen er worden overwogen: behandeling van de mest, andere toepassingen?

Het Wetenschappelijk Comité heeft verschillende alternatieve oplossingen overwogen. De toepassing van deze verschillende alternatieve behandelingen stuit op praktische bezwaren (de hoeveelheid te behandelen afval bedraagt honderden tonnen) voornamelijk omwille van economische overwegingen, de technische haalbaarheid, de mogelijkheden voor het beheersen van de parameters, de doeltreffendheid of de aanvaardbaarheid (bestraling).

Op deze basis beveelt het Wetenschappelijk Comité aan de residuele mest (en indien nodig ook het gecontamineerde digestaat) chemisch te behandelen met ongebluste kalk (calciumoxide, CaO).

De volgende alternatieve oplossingen werden overwogen:

- Verbranding (weinig realistisch voor een biomassa die 70 à 90 % water bevat);
- Chemische behandeling door verzuring of alkalisatie;
- Tyndallisatie: stapsgewijze verwarming bij lage temperatuur gedurende slechts enkele minuten (ongeveer een dertigtal) om de 24 uur en niet hoger dan 60 °C. Verwarmen is voldoende om de vegetatieve vormen te elimineren en veroorzaakt een thermische shock, waardoor de ontkieming van de sporen in gang gezet wordt en op die manier vegetatieve vormen oplevert. In de tussenpozen zonder verwarming kunnen sporen dus vegetatieve cellen afgeven die worden geëlimineerd bij de volgende verhoging van de temperatuur. Dit proces is evenwel moeilijk te beheersen wanneer het moet worden toegepast op honderden zelfs duizenden tonnen landbouwafval van dieren;
- Electrocracking (gebruik van elektrische stroom binnenin het substraat). De doeltreffendheid voor de reductie van sporen is zeer onzeker;
- Drogen: door middel van warmte opgewekt door elektriciteit (70 à 80°C). Het product wordt gestabiliseerd door een verlaagde wateractiviteit $A_w < 0.85$. Er bestaan verschillende droogsystemen. De bereikte temperatuur van de materie is niet gekend maar heel wat droogsystemen ligt dit in de buurt van een pasteurisatie en is dit onvoldoende om alle sporen af te doden. Drogen wordt gevolgd door granulatie om het bemesten te vergemakkelijken.
- Hygiënisatie volgens de Europese regels (vochtige warmte aan 70° gedurende 1u) om de vegetatieve vormen te elimineren en herintroductie van de behandelde massa in een actief anaerobe vergistingsproces teneinde de stockering van gehygiëniseerde digestaten in tanks te vermijden waar de microbiële competitie door deze behandeling teniet zou gedaan worden;
- Bestraling: methode waarbij men moet beschikken over mobiele eenheden die aangepast zijn aan grote hoeveelheden dierlijk landbouwafval.

- Hoe kunnen verschillende analyseresultaten afkomstig van verschillende laboratoria geïnterpreteerd worden?

In haar antwoord houdt het Wetenschappelijk Comité rekening met de volgende vaststellingen:

- Er bestaan verschillende analysemethoden: MBA, klassieke PCR of real time PCR-methode teneinde het patroon van het genoom van de bacterie en/of van het toxine vast te stellen of ook nog de ELISA-test. MBA blijft momenteel nog de referentietechniek en wordt als de meest gevoelige techniek beschouwd. Echter, literatuurgegevens tonen een goede specificiteit (minder vals positieve resultaten) aan

maar een lagere gevoeligheid (meer vals negatieve resultaten) ten opzichte van andere testen. Voor wat betreft monsters van paardachtigen wordt immers maar een gevoeligheid van ongeveer 30% gerapporteerd (Johnson *et al.*, 2016).

- Alle testen die in het NRL worden uitgevoerd zijn kwalitatieve analyses en de kwantificering van de aanwezige contaminatie is dus niet mogelijk. De MBA-test die rechtstreeks of na verrijking van het monster wordt uitgevoerd laat hoogstens toe om te bepalen of de lading infectueus agens (sporen of gevormd botulinetoxine) laag of hoog is. De toxische dosis voor botulinetoxine is de laagste die momenteel gekend is (runderen zijn bovendien zeer gevoelig hieraan) en het gehalte aan sporen in de monsters is vaak zeer laag (deze moeten overigens een aanrijking ondergaan).
- Als de MBA-test de referentietechniek blijft, dan kunnen de condities (zoals bijvoorbeeld aanrijkingmilieu en/of aangewende incubatieperiodes en het gebruikte muizengeslacht) tussen de labo's verschillen (net zoals de condities gaan verschillen van andere soorten tests die er kunnen worden uitgevoerd). Optimale condities verschillen naargelang het toxinotype. Bovendien wordt in het ISP-WIV naast detectie van sporen ook systematisch een detectie van het toxine uitgevoerd. Andere labo's voeren mogelijks slechts 1 van beide onderzoeken uit om de diagnose te stellen.
- Het toxine vertoont een veel minder grote tijdsgebonden resistentie dan de sporen.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat verschillende resultaten kunnen te wijten zijn aan verschillen in relatieve gevoeligheid van de tests die in verschillende laboratoria worden gebruikt. Een negatief analyseresultaat van *C. botulinum* kan de aanwezigheid van *C. botulinum* niet met zekerheid uitsluiten.

6. Onzekerheden

Er zijn verschillende onzekerheden die bij dit advies moeten in acht genomen worden.

Onzekerheden met betrekking tot de infectiedosis in geval van toxi-infectie (verhouding dosering-respons, gastheer variabiliteit, andere factoren)

Botulinetoxine is het meest krachtige toxine dat op dit moment gekend is. In het geval van een toxi-infectie bij runderen is het minimum aantal sporen die nodig zijn om een dodelijke dosis botulinetoxine te produceren na ontkieming niet gekend. Bij de mens heeft de toxinogenese betrekking op een concentratie van 10^5 - 10^6 kve *C. botulinum* toxinotypes A en B per gram levensmiddel (hoewel een inoculatie-dosis van 5×10^2 sporen volstond om dit te veroorzaken) (Daifas *et al.*, 1999).

De toxinogenese in *Clostridium botulinum* groep III wordt gestuurd door de werking van bacteriofagen op deze bacteriën; dit proces is de zogenaamde "lysogene conversie" (Pellett *et al.*, 2015; Sakaguchi *et al.*, 2015). Er blijven tal van hiaten m.b.t. de kennis over het mechanisme en de specifieke gastheerfactoren die leiden tot de lysogene conversie bij bacteriën (via bacteriofagen, plasmiden) en meer bepaald in het species *Clostridium botulinum*.

Onzekerheden over en variabiliteit van het besmettingsniveau van de bodem

Het initiële besmettingsniveau van de bodem met *C. botulinum* is onvoldoende gekend. Overigens is deze verontreiniging niet homogeen en zou deze kunnen variëren naargelang het toxinotype. Er wordt een concentratievork vermeld gaande van 50 tot 1050 sporen/kg (WRAP, 2015).

Onzekerheden betreffende de omgevingsresistentie

De sporen van *C. botulinum* worden als zeer resistent beschouwd onder experimentele omstandigheden. Verschillende studies werden uitgevoerd om hun warmteresistentie in voedingsmatrices te kennen, maar weinig studies werden uitgevoerd met betrekking tot hun omgevingsresistentie: competitie met residentiele flora, resistentie tegen UV of een combinatie van de pH, temperatuur en vochtigheid (Gould, 2006).

Onzekerheden over de log D-reductiewaarden, meer in het bijzonder met betrekking tot het biomethanisatieproces.

De doeltreffendheid (exacte kwantificering) van het biomethanisatieproces om het aantal bacteriële sporen te verlagen is nagenoeg niet bestudeerd. De gegevens die momenteel beschikbaar zijn voor de log D-reductiewaarden werden verkregen onder experimentele omstandigheden en vaak op niet-representatieve stammen voor *C. botulinum* toxinotype D (Diao *et al.*, 2014 ; Fröschle *et al.*, 2015 ; Wachnicka *et al.*, 2016).). Bovendien is de D-waarde waarschijnlijk niet de meeste geschikte parameter om de resistentie weer te geven omdat de reductie op niet log-lineaire wijze lijkt te verlopen.

Onzekerheden en variabiliteit bij de diagnose- en kwantificeringsmethoden

De opspoorbaarheid van de sporen via moleculaire amplificatietechnieken hangt af van het extractierendement en de gebruikte PCR. Bovendien is het niet altijd mogelijk het toxigene karakter van de moleculair opgespoorde stammen aan te tonen. De detectie- en kwantificeringscapaciteit van de sporen door de moleculaire techniek is niet gekend.

7. Conclusie

Het Wetenschappelijk Comité heeft een antwoord geformuleerd op de specifieke vragen. Hoewel het risico van rechtstreeks intoxicatie door mest of mestdigestaten besmet door *C. botulinum* voor de diergezondheid zeer laag is, is het Wetenschappelijk Comité van mening dat, maatregelen zouden moeten worden genomen die een zo laag mogelijke besmetting van het milieu beogen. Er worden algemene en specifieke aanbevelingen geformuleerd.

De aanbevelingen zijn enkel van toepassing op *Clostridium botulinum* toxinotypes C of D. Het risico dient opnieuw te worden beoordeeld voor stammen van *Clostridium botulinum* toxinotype B (of ieder ander toxinotype dan C of D).

8. Aanbevelingen

In deze botulisme haard beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om alle potentieel gecontamineerde mest (mest verzameld tot 21 dagen na de laatste klinische symptomen vastgesteld bij de dieren, deze tijdspanne stemt overeen met de maximum prepatente periode vastgesteld bij gevallen in het Verenigd Koninkrijk en in Brazilië; ACFMS, 2006 ; Ortolani *et al.*, 1997) ter plaatse te behandelen door middel van biomethanisatie. Het Comité beveelt een hygiëniseringsfase aan vóór de anaerobe vergisting. Het Comité beveelt eveneens aan om gecontamineerde mest en mestdigestaten van besmette beslagen niet te gebruiken op weilanden of in de onmiddellijke nabijheid van weilanden voor runderen. De digestaten worden bij voorkeur in het begin van de lente verspreid door middel van injectie in de bodem. Behandeling met ongebluste kalk (CaO) is de beste alternatieve behandeling voor zowel mest als mestdigestaat op het vlak van rendabiliteit en haalbaarheid.

Voor toekomstige verdenkingen van botulisme haarden, beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om de afvoer van alle dierlijke bijproducten te blokkeren in afwachting van het resultaat van de identificatie en typering van de kiem.

- In het geval van toxinotype B mag geen potentieel gecontamineerde mest, noch mestdigestaat verspreid worden, en dit noch op weilanden als op akkerland aangezien deze stam plantaardige eiwitten kan gebruiken voor zijn groei en toxines kan produceren.
- In het geval van toxinotypes C, D, C-D of D-C, moet de gecontamineerde mest bij voorkeur via verbranding vernietigd worden indien de hoeveelheid ervan en de vochtigheidsgraad dit toelaat of een kalkbehandeling ondergaan alvorens deze te verspreiden. Indien het bedrijf over een biomethanisatie-installatie beschikt en indien hygiënisatie toegepast wordt voor de vergisting, dan kan de mest als grondstof worden gebruikt. Gecontamineerde mest en mestdigestaten kunnen verspreid worden door middel van injectie op akkers. Verspreiding op grasweiden of weiden die bestemd zijn om kuilvoeder te produceren is niet aangewezen.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan de sectoren te herinneren aan de toepassing van goede praktijken met betrekking tot de productie, het beheer en het vervoederen van ingekuuld gras aan runderen. Er dient vooral grote voorzichtigheid aan de dag gelegd worden ingeval van gebruik van pluimveemest in gebieden met een hoge rundveedensiteit, meer specifiek met betrekking tot de aanwezigheid van kadavers die zich in de mest kunnen bevinden en met betrekking tot de maaïhoogte bij de productie van het kuilvoer teneinde contaminatie met grond en/of kadavers te beperken. Het Wetenschappelijk Comité beveelt bovendien aan om de landbouwers te herinneren aan de toepassing van goede opslagomstandigheden van kuilvoerders waarbij hoge vochtigheid maximaal moet vermeden worden.

Aangezien hygiënisatie een kritisch impact heeft op de totale microbiële flora (die de ontwikkeling van *C. botulinum* remt door competitieve exclusie), en bovendien een risico is voor hittegeïnduceerde ontkieming van de sporen, beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om de hygiënisatie in het biomethanisatieproces voor de vergistingsfase uit te voeren.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan een kwantitatieve gezondheidsindicator van de behandelingsproducten voor landbouwafval of dierlijke bijproducten te ontwikkelen en te valideren met betrekking tot het percentage sporevormende organismen (bv. *Bacillus* spp. of *Clostridium* spp.). Voor deze indicator zou het nodig kunnen zijn een specifiek onderzoek uit te werken of te baseren op het voorstel van het Europees research programma WRc Ref: CO5026/1/12787-0 (EC, 2001). Deze indicator zou aldus minder dan 3000 sporen van *Clostridium perfringens* per gram droge stof kunnen bedragen.

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan de grootste waakzaamheid in acht te nemen met betrekking tot klinische symptomen van botulisme bij runderen (samenvattingen voor de verschillende diersoorten bij Hogg *et al.*, 2008). Er zou een bericht aan de dierenartsen moeten gericht worden om hen eraan te herinneren systematisch botulisme op te nemen in de differentiële diagnose van progressieve en ascendente volledige paralyse, indigestie of plotse sterfte van runderen. Het Wetenschappelijk Comité benadrukt het belang om alle klinische verdenkingen bij dieren te notificeren, alle actoren van de bedrijfskolom te sensibiliseren en de mogelijke besmetting van dierlijke bijproducten in overweging te nemen bij het epidemiologisch onderzoek uitgevoerd bij uitbraken van runderbotulisme. Het Comité raadt aan rekening te houden met het toxinotype van de mogelijke stam bij het beheer van dierlijke producten en bijproducten in haarden

(zie advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité) evenals bij het risicobeheer voor de volksgezondheid in geval een toxinotype A, B, E of F stam betrokken is.

Voor het Wetenschappelijk Comité,
De Voorzitter,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)
Brussel, 22/12/2017

Referenties

- ACMSF (2006).** Advisory committee on the microbiological safety of food *Ad Hoc* group on botulism in cattle. UK Food Standards Agency. Report on Botulism in Cattle. Food Standards Agency.
- AFSSA (2002).** Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine.
- Anses (2011).** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments. *Clostridium botulinum*, *Clostridium neurotoxigenes*.
- Bagge (2009).** Hygiene Aspects of the Biogas Process with Emphasis on Spore-Forming Bacteria. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Bagge, E., Persson, M. & Johansson, K. -E. (2010).** Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *J Appl Microbiol* **109**, 1549–1565.
- Bagge, E., Sahlström, L. & Albin, A. (2005).** The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res* **39**, 4879–4886.
- Bohnel, H., Schwagerick, B. & Gessler, F. (2001).** Visceral Botulism - A New Form of Bovine *Clostridium botulinum* Toxication. *J Vet Med Ser A* **48**, 373–383.
- Couesnon, A., Raffestin, S. & Popoff, M. R. (2006).** Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. *Microbiology* **152**, 759–770.
- Daifas, D. P., Smith, J. P., Blanchfield, B. & Austin, J. W. (1999).** Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in English-style crumpets packaged under modified atmospheres. *J Food Prot* **62**, 349–55.
- Diao, M. M., André, S. & Membré, J.-M. (2014).** Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Int J Food Microbiol* **174**, 23–30.
- Dohrmann, A. B., Walz, M., Löwen, A. & Tebbe, C. C. (2015).** *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 3585–3598.
- EC (2001).** Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction. Final report. Study contract No B4-3040/2001/322179/MAR/A2 for the European Commission Directorate-General Environment.
- EC (2006).** European Commission Concerted Action project “Pathology and Ecology of the Genus *Clostridium* in Humans, Animals and Foodstuffs: Identification, Epidemiology and Prophylaxis (Genus *Clostridium*)”. Project funded under the EU Quality of Life programme. Disponible en ligne : http://cordis.europa.eu/project/rcn/58992_en.html
- Fohler, S., Discher, S., Jordan, E., Seyboldt, C., Klein, G., Neubauer, H., Hoedemaker, M., Scheu, T., Campe, A. & other authors. (2016).** Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin genes (A–F) in dairy farms from Northern Germany using PCR: A case-control study. *Anaerobe* **39**, 97–104.
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C. & Lebuhn, M. (2015).** Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. *J Appl Microbiol* **119**, 936–947.
- Gould, G. W. (2006).** History of science – spores. *J Appl Microbiol* **101**, 507–513.
- Hogg, R., Livesey, C. & Payne, J. (2008).** Diagnosis and implications of botulism. *In Pract* **30**, 392–397.
- Johnson, A. L., McAdams-Gallagher, S. C. & Aceto, H. (2016).** Accuracy of a Mouse Bioassay for the Diagnosis of Botulism in Horses. *J Vet Intern Med* **30**, 1293–1299.
- Krüger, M., Shehata, A.A., Schrödl, W., Rodloff, A. (2013a).** Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* **20**, 74–78.
- Krüger, M., Skau, M., Shehata, A.A., Schrödl, W. (2013b).** Efficacy of *Clostridium botulinum* types C and D toxoid vaccination in Danish cows. *Anaerobe* **23**, 1–5.

- Krüger, M., Shehata, A. A., Grosse-Herrenthey, A., Ständer, N. & Schrödl, W. (2014a).** Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe* **27**, 100–105.
- Krüger, M., Neuhaus, J., Herrenthey, A. G., Gökce, M. M., Schrödl, W. & Shehata, A. A. (2014b).** Chronic botulism in a Saxony dairy farm: Sources, predisposing factors, development of the disease and treatment possibilities. *Anaerobe* **28**, 220–225.
- Lindström, M., Myllykoski, J. & Sivelä, S. (2010).** *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **50**, 281-304.
- Neuhaus, J., Schrödl, W., Shehata, A. A. & Krüger, M. (2015).** Detection of *Clostridium botulinum* in liquid manure and biogas plant wastes. *Folia Microbiol (Praha)* **60**, 451–456.
- Notermans, S., Breukink, H. J., Wensing, T. & Wagenaar, G. (1978).** [Incidence of *Clostridium botulinum* in the rumen contents and faeces of cattle fed brewers' grains naturally contaminated with *Clostridium botulinum* (author's transl)]. *Tijdschr Diergeneeskd* **103**, 1327–1333.
- Notermans, S., Kozaki, S. & van Schothorst, M. (1979).** Toxin production by *Clostridium botulinum* in grass. *Appl Environ Microbiol* **38**, 767–771.
- Notermans, S., Dufrenne, J. & Oosterom, J. (1981).** Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism. *Appl Environ Microbiol* **41**, 179–183.
- Ortolani E.L., Brito L.A., Mori C.S., Schalch U., Pacheco J., Baldacci L. (1997).** Botulism outbreak associated with poultry litter consumption in three Brazilian cattle herds. *Vet Hum Toxicol* **39**, 89-92.
- Payne, J. H., Hogg, R. A., Otter, A., Roest, H. I. J. & Livesey, C. T. (2011).** Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Vet Rec* **168**, 640.
- Pellett, S., Tepp, W. H., Scherf, J. M., Pier, C. L. & Johnson, E. A. (2015).** Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons. *Toxicon* **101**, 63–69.
- Popoff (1989).** Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec le botulisme aviaire. *Rev sci tech Off int Epiz*, **8**, 129-145.
- RIVM (2014).** Feitenrelaas rond de aspecten 'Gezondheid en Veiligheid' van biovergisting. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu briefrapport 2014-0162.
- Rasooly, R. & Do, P. M. (2010).** *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type B Is Heat-Stable in Milk and Not Inactivated by Pasteurization. *J Agric Food Chem* **58**, 12557–12561.
- Rodgers, S., Peiris, P., Casadei, G. (2003).** Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *J Food Prot* **66**, 674–678.
- Sahlström (2006).** Recycled Biowaste as a Source of Infection. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, A. & Oguma, K. (2015).** Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains. *Res Microbiol* **166**, 318–325.
- SciCom (2006a).** Advies 33-2006 van het Wetenschappelijk Comité van 18 september 2006. *Clostridium botulinum* type D in honing (dossier SciCom 2006/38). Online beschikbaar: http://www.afsca.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2006/_documents/ADVIES33-2006_NL.pdf
- SciCom (2006b).** Advies 45-2006 van het Wetenschappelijk Comité van 29 januari 2007. Voorstellen voor mogelijke maatregelen bij (vermoeden van) botulisme in een melkveebedrijf gebaseerd op een evaluatie van het risico voor de gezondheid van mens en dier (dossier SciCom 2006/54). Online beschikbaar: http://www.afsca.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2006/_documents/ADVIES45-2006_nl.pdf
- SciCom (2015).** Advies 23-2015 van het Wetenschappelijk Comité van 20 november 2015. 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 2015/01). Online beschikbaar: http://www.afsca.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/2015/_documents/Advies23-2015_melkslib.pdf

SciCom (2017). Leidraad voor de adviezen van het Wetenschappelijk Comité. Online beschikbaar:

<http://www.afsca.be/wetenschappelijkcomite/publicaties/brochures/leidraadadviezen/>

Seyboldt, C., Discher, S., Jordan, E., Neubauer, H., Jensen, K. C., Campe, A., Kreienbrock, L., Scheu, T., Wichern, A. & other authors. (2015). Occurrence of *Clostridium botulinum* neurotoxin in chronic disease of dairy cows. *Vet Microbiol* **177**, 398–402.

Shehata, A.A., Schrödl, W., Neuhaus, J., Krüger, M. (2013). Antagonistic effect of different bacteria on *Clostridium botulinum* types A, B, C, D and E in vitro. *Vet Rec* **12**, 47.

Siegel, L. S. & Metzger, J. F. (1979). Toxin production by *Clostridium botulinum* type A under various fermentation conditions. *Appl Environ Microbiol* **38**, 606–11.

Souillard, R., Maréchal, C. L., Hollebecque, F., Rouxel, S., Barbé, A., Houard, E., Léon, D., Poëzevara, T., Fach, P. & other authors. (2015). Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms. *Vet Microbiol* **180**, 142–145.

Souillard, R., Le Maréchal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Léon, D., Balaine, L., Poëzevara, T., Houard, E., Robineau, B. & other authors. (2017). Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France. *Avian Pathol* **46**, 195–201.

Sullivan, N.M., Mills, D.C., Riepmann, H.P., Arnon, S.S. (1988). Inhibition of growth of *Clostridium botulinum* by intestinal microflora isolated from healthy infants. *Microb Ecol Health Dis* **1**, 179–192.

Sugii, S., Ohishi, I. & Sakaguchi, G. (1977). Correlation between oral toxicity and in vitro stability of *Clostridium botulinum* type A and B toxins of different molecular sizes. *Infect Immun* **16**, 910–4. American Society for Microbiology (ASM).

Van Huffel, X., Cardoen, S., Vanholme, L., Imberechts, H., Dierick, K., Debevere, J. Daube, G. Herman, L., Deprez, P., Haesebrouck, F. (2008). (Verdenking van) botulisme bij melkvee: voedselveiligheidsaspecten en maatregelen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **78**, 81-89.

Wachnicka, E., Stringer, S. C., Barker, G. C. & Peck, M. W. (2016). Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance. *Appl Environ Microbiol* **82**, 6019–29.

WRAP (2015). An introduction to *Clostridium botulinum* and its presence in UK soils and soils amendments. Waste & Resources Action Programme, Banbury. Disponible en ligne : <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/The%20fate%20of%20C.bot%20in%20AD.pdf>

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:

S. Bertrand, M. Buntinx, A. Clinquart, P. Delahaut, B. De Meulenaer, N. De Regge, S. De Saeger, J. Dewulf, L. De Zutter, M. Eeckhout, A. Geeraerd, L. Herman, P. Hoet, J. Mahillon, C. Saegerman, M.-L. Scippo, P. Spanoghe, N. Speybroeck, E. Thiry, T. van den Berg, F. Verheggen, P. Wattiau

Belangenconflict

Er werden geen belangenconflicten vastgesteld bij de leden van het Wetenschappelijk Comité. Er werd een belangenconflict vastgesteld voor P. Delfosse (LIST) en L. Delbrassinne (WIV-ISP). Zij namen als 'gehoorde experts' deel aan de werkzaamheden van de werkgroep. Voor deze laatste betrof dit enkel de bespreking van de specifieke vraag over de laboratoriumdiagnose van *C. botulinum*.

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor Risicobeoordeling, de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies en de twee *deep readers* van het advies (L. Herman en A. Clinquart).

Samenstelling van de werkgroep

De werkgroep was samengesteld uit:

Leden van het Wetenschappelijk Comité:	J. Mahillon (verslaggever), A. Geeraerd, P. Wattiau
Externe experts:	F. Haesebrouck (UGent), M. Heyndrickx (ILVO/UGent), K. Rabaey (UGent)
Aangehoorde experts:	L. Delbrassinne (WIV-ISP), P. Delfosse (Luxembourg Institute of Science and Technology, Luxembourg)
Dossierbeheerders:	A. Mauroy

De activiteiten van de werkgroep werden opgevolgd door de volgende leden van de administratie (als waarnemer): A. Generet (FOD Volksgezondheid en Voedselketen veiligheid), H. De Norre (FOD Volksgezondheid en Voedselketen veiligheid), J. Van Autreve (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.

Bijlagen

Tabel I: Karakteristieken inzake overleven, groei en toxicogenese van de verschillende toxinotypes van *Clostridium botulinum*.

(aangepast aan fiche met de omschrijving van de door voeding overdraagbare biologische gevaren, beschikbaar op de website: <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010SA0234Fi.pdf> ; ontbrekende gegevens voor *C. botulinum* toxinotype H).

	<i>C. botulinum</i> Groep I Proteolytische			<i>C. botulinum</i> Groep II Niet-proteolytische			<i>C. botulinum</i> Groep III Niet-proteolytische			<i>C. botulinum</i> Groep IV Proteolytische		
Toxinen	A, B, F			B, E, F			C, D			G		
Groei vegetatieve cellen	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.	Min.	Opt.	Max.
Temperatuur (°C)	10	35-40	48	3	18-25	45	15	37-40		/	37	/
pH	4,6	/	9,0	5,0	7,0	9,0	5,1	6,1-6,3	9,0	4,6	7,0	/
Minimum temperatuur (°C) voor de productie van toxinen	10			3			15			/		
Stabiliteit en inactivering van toxinen	Toxinen zijn bestand tegen invriezen (door invriezen onverminderde activiteit van de voorgevormde toxine in de voeding). Vernietigd na 10 min à 100°C of 30 min à 80°C.											
D waarde^a voor sporen	D _{121,1°C} =0,21 min			D _{80°C} =0,6-1,25 min ^b			D _{104°C} =0,1-0,9 min ^b			D _{104°C} =0,8-1,12 min ^b		

^a Uitgedrukt als decimale reductietijd, de tijd die vereist is bij de aangegeven temperatuur om de sporenconcentratie met een logaritme (90%) te verlagen.

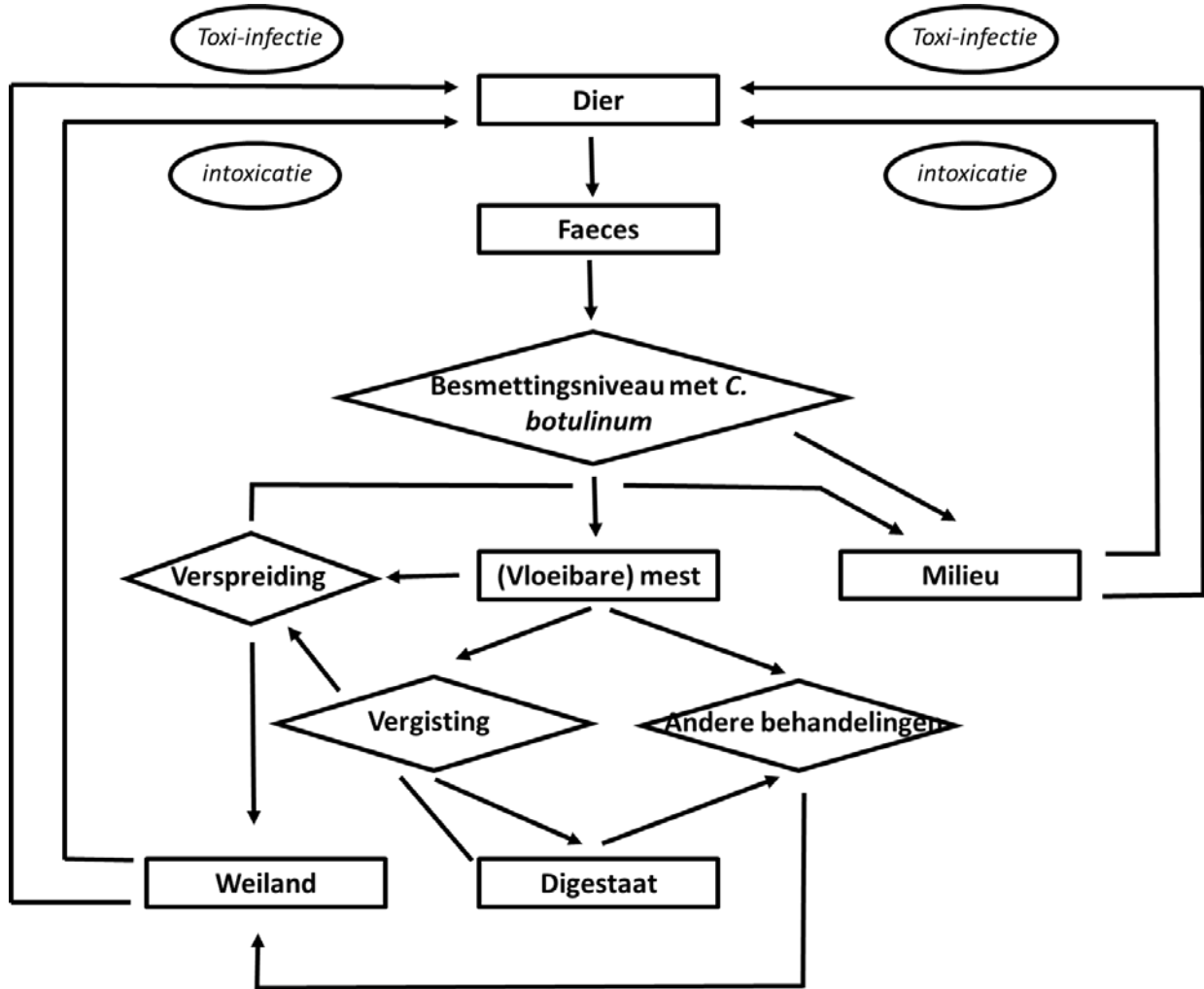
^b Variabel volgens de stammen

Tabel II: Incidentiepercentage van de gevallen van runderbotulisme afgeleid van de notificatiegegevens aan het FAVV en van de gegevens van de monsters die positief waren na diagnose in het Nationaal referentielaboratorium (Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid).

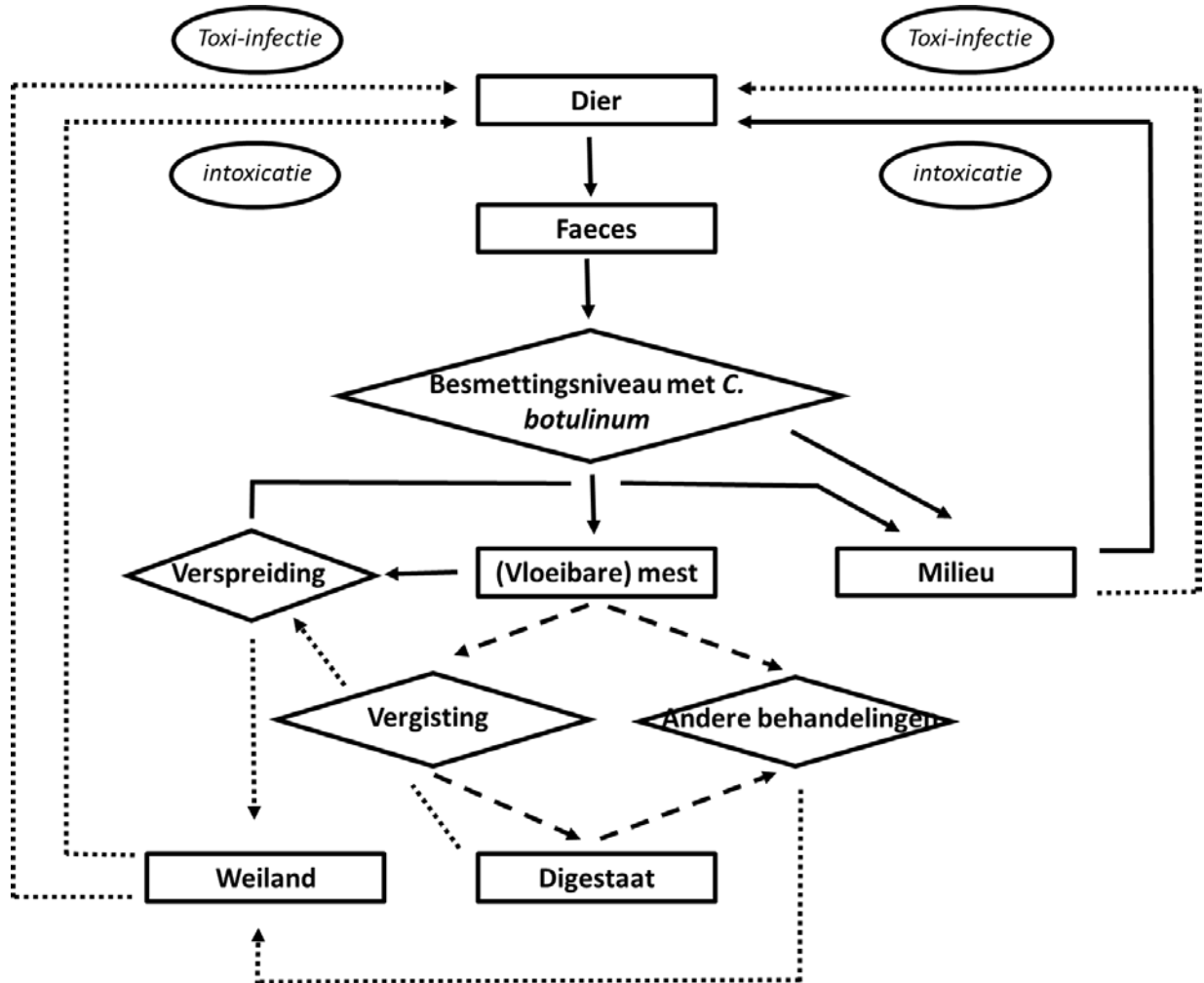
	Jaar							Referentie
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	
Aantal runderen in België	2509540	2471600	2438180	2441320	2477240	2503260	2501350	Eurostat
Aantal rundveebeslagen in België	37000	35062	32856	31680	30354	29468	28486	Query in de gegevensbank van het FAVV
Genotificeerde gevallen van runderbotulisme bij het FAVV (# dieren)	13	11	10	34	50	33	105	Gegevens van het FAVV
Genotificeerde gevallen van runderbotulisme bij het FAVV (# haarden = # besmette beslagen)	4	1	2	7	2	8	5	Gegevens van het FAVV
Positieve monsters onderworpen aan diagnose voor runderbotulisme bij het WIV (NRL) ^a	20	20	24	25	11	18	5	Trends and Source 2012-2013
Incidentiepercentage van botulisme / rund (gebaseerd op de notificaties van het FAVV)	5,1802 $\times 10^{-6}$	4,4506 $\times 10^{-6}$	4,1014 $\times 10^{-6}$	1,3927 $\times 10^{-5}$	2,0184 $\times 10^{-5}$	1,3183 $\times 10^{-5}$	4,1977 $\times 10^{-5}$	
Incidentiepercentage van botulisme / rund (gebaseerd op de positieve monsters van het WIV)	7,9696 $\times 10^{-6}$	8,0919 $\times 10^{-6}$	9,8434 $\times 10^{-6}$	1,0240 $\times 10^{-5}$	4,4404 $\times 10^{-5}$	7,1906 $\times 10^{-5}$	1,9989 $\times 10^{-5}$	
Incidentiepercentage van botulisme / rundveebeslag	1,0811 $\times 10^{-4}$	2,8521 $\times 10^{-5}$	6,0872 $\times 10^{-5}$	2,2096 $\times 10^{-4}$	6,5889 $\times 10^{-5}$	2,7148 $\times 10^{-4}$	1,7552 $\times 10^{-4}$	

^a meerdere monsters kunnen van een enkel dier afkomstig zijn

Figuur 1: Model van risicotraject voor rundermest gecontamineerd met *Clostridium botulinum*, die eventueel een vergisting kan ondergaan.



Figuur 2: Identificatie in het model in figuur 1 van de belangrijkste besmettingswegen.



Volle lijn: besmettingswegen die als het meest waarschijnlijk geïdentificeerd zijn.

Gestreepte lijn: besmettingswegen die als intermediair geïdentificeerd zijn.

Stippellijn: besmettingswegen die als het minst waarschijnlijk geïdentificeerd zijn.