



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 23-2015

Concerne: Méthodologie pour la vérification et la validation de paramètres alternatifs pour le traitement thermique de boues de centrifugeuses et de séparateurs issues de la transformation du lait (dossier SciCom N°2015/01).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 20 novembre 2015.

Résumé

Le Règlement (UE) N°142/2011 mentionne les paramètres de procédés pour le traitement thermique des boues de centrifugeuses et de séparateurs provenant de la transformation du lait (matières de catégorie 3) et destinées à l'alimentation des animaux. Il est demandé au Comité scientifique de proposer une méthodologie pour la vérification et la validation de paramètres de procédés alternatifs permettant une réduction du risque au moins équivalente aux paramètres réglementaires.

Le Comité scientifique a traité ce dossier en trois volets:

- Volet 1: Vérifier si les paramètres réglementaires sont suffisants pour garantir la santé animale;
- Volet 2: Formuler des paramètres alternatifs de chauffage équivalents à un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C et de 60 minutes à 70 °C;
- Volet 3: Proposer des tests en laboratoire pour vérifier le traitement thermique.

Conclusion du volet 1

Les agents pathogènes pour la santé animale les plus pertinents qui pourraient être présents dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs après un traitement thermique sont le virus de la fièvre aphteuse, les bactéries non sporulantes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii* et les bactéries sporulantes *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

Nous pouvons conclure, sur base des études de la littérature, qu'il n'est pas certain que le virus de la fièvre aphteuse soit complètement inactivé par un traitement thermique selon les paramètres réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C pour les boues de centrifugeuses ou de séparateurs produites dans les industries laitières. Le Comité scientifique propose comme ligne directrice pour la destruction du virus de la fièvre aphteuse de suivre les mêmes traitements que ceux repris dans la législation pour le lait en poudre destiné à l'alimentation animale. Ces traitements comprennent, entre autres, l'un de ces traitements:

- une stérilisation avec une valeur F_0 d'au moins 3,
- un traitement HTST (*High Temperature Short Time*) appliqué 2 fois, ou
- un traitement HTST ou UHT combiné à:

- un procédé de dessiccation combiné à un traitement thermique supplémentaire à au moins 72 °C,
- un abaissement de pH en dessous de 6,0 pendant une heure au moins, ou
- la condition qu'aucun foyer de fièvre aphteuse ne peut avoir été déclaré dans l'état membre d'origine dans les 21 jours avant expédition.

Un traitement thermique selon les paramètres réglementaires (30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C) est suffisant pour la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*.

Un traitement thermique selon les paramètres réglementaires n'est pas suffisant pour la destruction des spores de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*. Après le traitement thermique, ces spores peuvent germer et continuer à croître lorsque les conditions externes permettent cette croissance. Pour exclure tout risque de transmission de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*, la croissance de ces pathogènes devrait être limitée après le traitement thermique. Ceci peut être effectué en refroidissant, acidifiant, séchant les boues après le chauffage, ou en limitant le temps de conservation avant de les distribuer aux animaux.

Conclusion du volet 2

Le Comité scientifique propose de vérifier l'équivalence des combinaisons temps x température en matière de destruction des bactéries non sporulantes sur base de la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*, bactéries pathogènes les plus résistantes à la pasteurisation, en utilisant les valeurs D et z préconisées dans l'avis.

Il est à noter qu'un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C ne conduit pas à une même destruction microbienne qu'un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C.

Des combinaisons temps (minutes) x température (°C) conduisant à une réduction logarithmique équivalente à un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C et de 30 minutes à 80 °C pour *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (souche ATCC 19698) sont présentées dans l'avis. En outre, des traitements équivalents à un traitement de 25 secondes à 95 °C sont donnés à titre d'information supplémentaire.

La température applicable, proposée par le secteur pour traiter les boues de centrifugeuses et de séparateurs, est de 72 °C. Sur base des connaissances disponibles dans la littérature, une durée de traitement de 35 minutes à 72 °C est nécessaire pour une inactivation des trois micro-organismes considérés équivalente à celle d'un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C. Un traitement de 17 secondes à 90 °C produit également une inactivation équivalente.

Les combinaisons temps x température qui sont proposées comme équivalentes dans le présent avis sont des paramètres théoriques. Lors de l'application dans la pratique, on peut tenir compte d'une période d'échauffement et de refroidissement qui va encore accroître la sécurité du produit par l'apport supplémentaire de chaleur au produit. Ce temps de chauffage et de refroidissement peut varier considérablement en fonction de l'installation et du procédé utilisé (par ex. procédé en batch ou continu).

Conclusion du volet 3

Les paramètres les plus importants pour la maîtrise des risques microbiologiques devraient être intégrés au plan HACCP de l'opérateur. Il est important de contrôler la température et le temps pendant le traitement thermique et les conditions de conservation ultérieures si la forme sous laquelle les boues traitées sont conservées permet la croissance des bactéries sporulantes. A cet effet, le Comité scientifique recommande d'appliquer les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques agricoles pour le traitement et la conservation du produit pasteurisé.

Pour vérifier le produit fini et valider le procédé, il est recommandé d'utiliser les *Enterobacteriaceae* comme indicateur d'hygiène. Un indicateur (bio)chimique pourrait également être utilisé pour vérifier le chauffage. Les possibilités incluent le rapport lactulose sur lactose et la détermination de l'activité de la lactoperoxydase. Avant que ces indicateurs puissent être appliqués, ils devraient être validés pour la matrice à traiter et pour les conditions de chauffage qui sont appliquées.

Il est important de noter que les données disponibles dans la littérature qui ont été utilisées dans cet avis concernent la résistance thermique des agents pathogènes dans le lait et non dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs. Tenant compte du fait que les boues sont moins riches en eau que le lait, il est supposé que les micro-organismes sont probablement plus résistants dans les boues que dans le lait.

Summary

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

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

The Scientific Committee has treated the dossier in three parts:

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

Conclusion part 1

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

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

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

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

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

Conclusion part 2

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

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

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

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

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

Conclusion part 3

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

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

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

Mots clés

Traitement thermique – boue de centrifugeuses et de séparateurs– lait – alimentation animale
- méthodologie

1. Termes de référence

1.1. Questions

Une méthode pratique peut-elle être appliquée pour l'évaluation (la vérification et la validation du procédé) d'un traitement thermique pour la réduction du risque lié aux boues de centrifugeuses et de séparateurs issues de l'industrie de transformation du lait qui soit comparable au traitement thermique standard (30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C)?

Quelle est la température minimale pour obtenir un effet d'élimination acceptable?

S'il apparaît que des données manquent pour formuler un avis, il est demandé que le Comité scientifique identifie quelles données supplémentaires (e.a. pour quels organismes de référence) l'industrie laitière devrait fournir?

1.2. Contexte législatif

Règlement (CE) N°1069/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le Règlement (CE) n°1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux).

Règlement (UE) N°142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du Règlement (CE) N°1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la Directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive.

Règlement (UE) N° 9/2015 de la Commission du 6 janvier 2015 modifiant le règlement (UE) N°142/2011 portant application du Règlement (CE) N°1069/2009 du Parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la Directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive.

1.3. Définitions

Pasteurisation: La pasteurisation vise à inactiver tous les micro-organismes non sporulants. La pasteurisation du lait peut être réalisée de deux manières: un traitement à une température faible pendant une longue durée (*Low Temperature – Long Time* (LTLT) – ex. 62,7 °C pendant 30 minutes) ou un traitement à une température élevée pendant une courte durée (*High Temperature – Short Time* (HTST) – ex. 71,7 °C pendant 15 secondes).

Valeur D (ou temps de réduction décimale): la valeur D est définie comme le temps nécessaire pour tuer 90% d'un micro-organisme à une température donnée.

Valeur z: la valeur z est définie comme le changement de température nécessaire (en °C) pour modifier la valeur D d'un facteur 10.

Vu les discussions durant les réunions du groupe de travail du 16 mars 2015, 13 mai 2015 et 22 juin 2015 et la séance plénière du 23 janvier 2015, 22 mai 2015, 3 juillet 2015, 23 octobre 2015 et 20 novembre 2015,

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Le lait cru collecté par l'industrie de transformation du lait est centrifugé, avant pasteurisation, pour retirer les particules lourdes et les corps étrangers (terre, sable, contamination fécale, tissu cellulaire de la vache et les plus grandes micelles de caséines), appelés boues de centrifugeuses et de séparateurs. Ces boues sont produites en petites quantités au début du processus de transformation du lait.

D'après le rapport du «Nederlands Instituut voor ZuivelOnderzoek (NIZO)» (2012), réalisé à la demande du secteur, les nombres de micro-organismes totaux, d'Enterobacteriaceae, de levures, et de cellules somatiques dans des échantillons de boues de centrifugeuses non traitées provenant de 6 industries laitières, étaient environ comparables à ceux qu'on observe dans les échantillons de lait cru. Par contre, les spores mésophiles étaient 17 fois plus nombreuses dans les boues de centrifugeuses que dans le lait cru.

La législation relative aux sous-produits animaux (Règlements (CE) N°1069/2009 et (UE) N°142/2011) impose un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C ou de 60 minutes à 70 °C aux boues de centrifugeuses et de séparateurs produites dans les établissements laitiers, avant que ces boues ne puissent être déversées dans les égouts ou être destinées à l'alimentation des animaux.

Après traitement thermique, les boues de centrifugeuses et/ou de séparateurs peuvent être distribuées aux animaux (principalement bovins et porcins) sous forme humide ou après avoir subi un traitement de séchage.

Une adaptation de la législation relative aux sous-produits animaux (Règlement (UE) N°9/2015) donne plus de flexibilité aux états membres pour le traitement thermique des boues de centrifugeuses et de séparateurs. Ainsi, des paramètres alternatifs peuvent être autorisés par l'autorité compétente pour autant qu'il soit démontré que ceux-ci permettent une réduction du risque au moins équivalente à un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C ou de 60 minutes à 70 °C.

Il est demandé au Comité scientifique de proposer une méthodologie pour la vérification et la validation de paramètres alternatifs permettant une réduction du risque au moins équivalente à ceux repris dans le Règlement (UE) N°142/2011 pour le traitement thermique des boues de centrifugeuses et de séparateurs provenant de la transformation du lait (matières de catégorie 3) et destinées à l'alimentation des animaux.

Le Comité scientifique (SciCom) estime qu'il faudrait, dans un premier temps, vérifier si les paramètres réglementaires, à savoir un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C ou de 60 minutes à 70 °C, repris dans la législation relative aux sous-produits animaux sont suffisants pour garantir la santé animale et répondre à la question «les agents pathogènes transmissibles aux animaux qui pourraient être présents dans les boues et contaminer les animaux (principalement veaux et porcs) qui consomment ces boues sont-ils détruits par ces traitements?».

3. Méthodologie

Le Comité scientifique a traité ce dossier en trois volets:

- Volet 1: Vérifier si les paramètres réglementaires sont suffisants pour garantir la santé animale;
- Volet 2: Formuler des paramètres alternatifs de chauffage équivalents à un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C et de 60 minutes à 70 °C;
- Volet 3: Proposer des tests en laboratoire pour vérifier le traitement thermique.

Pour vérifier si les paramètres réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou de 60 minutes à 70 °C sont suffisants pour garantir la santé animale, le SciCom a adressé une série de questions à des experts externes afin d'identifier les agents pathogènes animaux (virus, bactéries (y compris spores), etc.) pouvant être transmis via le lait d'origine bovine aux bovins et aux porcs. Des informations sur les combinaisons temps x température pour l'inactivation des bactéries (spores) et des virus dans les boues de centrifugation et dans le lait ont été collectées dans la littérature scientifique.

Afin de proposer une méthode pour vérifier si des paramètres alternatifs permettent une réduction du risque au moins équivalente à un traitement thermique de 30 min. à 80 °C et de 60 min. à 70 °C, des agents pathogènes de référence ont été identifiés sur base de leur pertinence pour la santé animale.

Les valeurs D et z des agents pathogènes de référence identifiés ont été recherchées pour vérifier l'équivalence des paramètres alternatifs.

4. Avis

4.1. Volet 1: Vérifier si les paramètres réglementaires sont suffisants pour garantir la santé animale

4.1.1. Agents pathogènes pertinents pour la santé animale via la consommation de sous-produits du lait suivant l'EFSA (2006)

L'EFSA (2006) a établi une liste des maladies ou agents pathogènes qui peuvent être pertinents pour la santé des animaux via la consommation de sous-produits laitiers. Le risque qualitatif pour les bovins d'être infectés par l'ingestion de ces sous-produits laitiers a été estimé et exprimé pour chaque maladie ou agent pathogène sous forme de scores (0-1-2 correspondant respectivement à «*negligible to extremely low – very low to low – moderate to high*»). La pasteurisation HTST (*High Temperature – Short Time*, c-à-d. 71,7 °C durant 15 secondes) du lait et des sous-produits laitiers considérés permet de réduire la concentration des agents infectieux à un niveau négligeable ou extrêmement bas, excepté pour le virus de la fièvre aphteuse et pour *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Les spores de bactéries ne sont pas mentionnées comme une cause de maladies animales dans l'avis de l'EFSA.

4.1.2. Identification des virus pertinents et résistance de ceux-ci à la chaleur

Il ressort d'une étude de la littérature et de l'avis d'experts que la plupart des virus susceptibles d'être présents dans le lait par contamination directe ou indirecte sont sensibles à la chaleur et sont inactivés suite à un traitement thermique de 30 min. à 80 °C ou de 60 min. à 70 °C. Suivant l'OIE (2013), le virus de la fièvre catarrhale ovine est inactivé suite à un traitement thermique de 15 min. à 60°C.

Le virus de la fièvre aphteuse est le virus le plus résistant à la chaleur parmi les virus qui sont pertinents dans le contexte de l'avis. De plus, la fièvre aphteuse est une maladie contagieuse à déclaration obligatoire pour laquelle il convient en effet de prendre les précautions

adéquates pour éviter son introduction en Belgique. Des exigences sont reprises dans le Règlement (UE) N°142/2011 pour éviter la propagation du virus de la fièvre aphteuse via les produits laitiers (lait en poudre destiné aux veaux). Une fois que le virus de la fièvre aphteuse est détecté, des mesures doivent être prises conformément à la législation.

D'après Tomasula *et al.* (2007), le virus de la fièvre aphteuse est excrété dans le lait 33 heures avant que les signes de la maladie apparaissent chez les vaches laitières. Dans des cas extrêmes, des signes de la maladie n'apparaissent que 14 jours après. Pendant ce temps, le lait cru et les produits laitiers peuvent servir de vecteur de la maladie. Pour exclure tous risques, une méthode sûre devrait donc être appliquée pour éviter la transmission du virus via les boues de centrifugeuses/séparateurs.

Le virus de la fièvre aphteuse n'est pas complètement inactivé après une pasteurisation (71,7 °C/15 s). La réduction de l'infectivité rapportée par Donaldson (1997) est d'un facteur 10^4 - 10^5 (EFSA, 2006). Le chauffage du lait à une température de 138 °C pendant 23 secondes ne permet pas une inactivation complète du virus. D'après Tomasula *et al.* (2007), le virus de la fièvre aphteuse est complètement inactivé après 2 ou 3 secondes à 148 °C. La pasteurisation continue permet une meilleure élimination du virus que les méthodes en batch. L'échec de la pasteurisation pour inactiver toutes les particules du virus est expliqué par l'attachement du virus aux globules gras et aux débris cellulaires en raison de l'activité de l'eau réduite dans la graisse pendant le chauffage (Condron *et al.*, 2015). Le temps pour réduire le titre viral est plus court au pH de 6,7 qu'au pH de 7,6 (Tomasula *et al.*, 2007). A un pH <7, le virus est dissocié en 12 pentamères, libérant l'ARN viral. Une évaluation des risques conduite par l'«United States Department of Agriculture» (USDA) indique que le risque d'infection pour les bovins ou les porcs à partir de la consommation de lait ou fromage pasteurisé est faible.

Nous pouvons conclure, sur base des études de la littérature, qu'il n'est pas certain que le virus de la fièvre aphteuse soit complètement inactivé par les paramètres réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C pour les boues de centrifugeuses ou de séparateurs produites dans les industries laitières.

Le Règlement (UE) N°142/2011 mentionne à l'annexe X, chapitre II, section 4 les exigences spécifiques relatives au traitement thermique que doit subir le lait en poudre destiné aux veaux, notamment pour éviter la transmission de la fièvre aphteuse. Le lait provenant d'un état membre officiellement indemne de fièvre aphteuse doit, avant sa transformation, être soumis à l'un de ces traitements:

- une stérilisation à une valeur F_0 de 3 ou plus,
- un traitement HTST (*High Temperature Short Time*) appliqué 2 fois, ou
- un traitement HTST ou UHT combiné à :
 - o un procédé de dessiccation combiné à un traitement thermique supplémentaire à au moins 72 °C,
 - o un abaissement de pH en dessous de 6,0 pendant une heure au moins, ou
 - o la condition qu'aucun foyer de fièvre aphteuse ne peut avoir été déclaré dans l'état membre d'origine dans les 21 jours avant expédition.

Pour le lait en poudre uniquement destiné au marché belge, un plus grand nombre de possibilités sont offertes.

4.1.3. Identification des bactéries non-sporulantes pertinentes et résistance de celles-ci à la chaleur

Au début du 20ème siècle, la tuberculose et la brucellose étaient des maladies très préoccupantes pouvant être transmises par le lait (ILSI, 2012). Dans un premier temps, *Mycobacterium tuberculosis* a été considéré comme le pathogène du lait le plus résistant à la chaleur (Hammer, 1948); Cependant, depuis 1956, *Coxiella burnetii* est considéré comme étant plus résistant à la chaleur que *Mycobacterium tuberculosis*.

La pasteurisation (71,7 °C/ 15 s) est une mesure suffisante par laquelle les bactéries présentes sous forme végétative dans le lait, y compris *Coxiella burnetii*, sont tuées (SciCom, 2010a, b; avis 25-2010, avis 24-2010). D'après Cerf et Condron (2006), une réduction de 6,8 log₁₀ est atteinte suite à une pasteurisation (71,7 °C/ 15 s).

La plupart des études de la littérature confirment que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) est plus résistante à la chaleur que d'autres *Mycobacterium* spp. Le lait et le colostrum peuvent être contaminés par MAP via les matières fécales ou par excrétion de la bactérie dans le lait. Les recherches sur la contamination fécale du lait par MAP montrent que le taux peut atteindre 10⁵ ufc par mL (Rademaker *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, les connaissances sur la dose infectieuse de MAP sont limitées. Il ressort d'expérimentations par inoculation chez les veaux que la concentration la plus faible pouvant induire une infection serait de 10⁵ ufc MAP (Begg et Whittington, 2008; Eisenberg *et al.*, 2010). Selon la revue de la littérature faite par Eltholth *et al.* (2009), la pasteurisation HTST (*High Temperature Short Time*) à 72 °C pendant 15 s permet une inactivation de MAP variant de 4 log₁₀ à 7 log₁₀. Certains auteurs ont rapporté la détection d'un faible nombre de cellules de MAP survivant dans certains échantillons de lait pasteurisé (Foddai *et al.*, 2010). D'après le «National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods» (NACMCF, 2010), une double pasteurisation du lait entier produit une réduction de 5-7 log₁₀, avec un faible nombre de cellules survivant au traitement.

Si la concentration initiale est plus élevée que 10⁵ ufc MAP par mL, MAP survivra en partie au processus de pasteurisation.

L'agglutination des bactéries pourrait avoir pour conséquence une résistance plus élevée au processus de pasteurisation (Foddai *et al.*, 2010). L'homogénéisation du lait avant pasteurisation peut détruire une partie des agglomérats de cellules et ainsi améliorer la pasteurisation (Grant *et al.*, 2005).

Nous pouvons conclure qu'un traitement thermique selon les paramètres réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C est suffisant pour la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii* (voir le volet 2 ci-dessous).

4.1.4. Identification des bactéries sporulantes pertinentes et résistance de celles-ci à la chaleur

Les bactéries sporulantes *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum* peuvent provoquer des maladies chez les bovins et les porcins. La dose minimale infectieuse n'est pas connue pour les spores. Certaines bactéries peuvent produire des toxines. C'est le cas de *Clostridium perfringens*. Les ensilages peuvent être une source de contamination. L'ingestion d'aliments contaminés peut conduire à la libération de spores dans les fèces. Les spores de Clostridia peuvent aussi contaminer les trayons et faciliter la contamination du lait pendant la traite (Pahlow *et al.*, 2003).

Les conditions de pasteurisation ne sont pas suffisantes pour détruire les spores de bactéries (ex. spores de *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*). Le choc thermique associé à ce traitement peut par ailleurs induire la germination des spores après quoi la croissance peut éventuellement se produire.

La double pasteurisation a été testée par Premaratne et Cousin (1991), Kim *et al.* (2012), Løvdal *et al.* (2011) et Samapundo *et al.* (2009) pour étudier l'élimination des spores de *Bacillus cereus*. Il ressort de ces études que la double pasteurisation permet une réduction du nombre de spores mais ne conduit pas à une stérilisation du produit. L'effet de la double pasteurisation est fortement déterminé par le niveau de germination des spores qui peut être atteint; ceci semble principalement dépendre de la quantité naturelle de composés stimulant la germination comme l'inosine et les acides aminés libres (L-alanine) dans le produit.

Un traitement UHT ou de stérilisation classique (à des températures supérieures à 100 °C) est nécessaire pour détruire les spores de bactéries (SciCom, 2011; avis 15-2011). Il est à noter que le lait en poudre peut contenir des spores car le processus de séchage n'est pas associé à un chauffage suffisant pour tuer les spores.

Pour rappel, d'après un rapport du NIZO (2012), les boues de centrifugation contiennent 17 fois plus de spores mésophiles que le lait (NIZO-report E 2012/125).

Dans la législation européenne, on ne mentionne pas de critères pour les maladies animales provoquées par des spores. Un risque existe de retrouver des spores (ex. de *Clostridium perfringens* ou de *Clostridium botulinum*) dans les boues de centrifugeuses/séparateurs.

Un traitement thermique de 30 min. à 80 °C ou de 60 min. à 70 °C n'est donc pas suffisant pour détruire les spores de bactéries. Au contraire, après le traitement thermique, ces spores peuvent germer et continuer à croître lorsque les conditions externes permettent cette croissance. Pour exclure tout risque de transmission de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*, la croissance de ces pathogènes devrait être limitée après le processus de chauffage. Ceci peut être effectué en refroidissant, acidifiant, séchant les boues après le chauffage, ou en les distribuant aux animaux après un temps de conservation limité.

4.1.5. Conclusions du volet 1

Les agents pathogènes pour la santé animale les plus pertinents qui, en raison de leur thermorésistance, pourraient être présents dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs après un traitement thermique sont le virus de la fièvre aphteuse, les bactéries non sporulantes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*, ainsi que les bactéries sporulantes *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

Nous pouvons conclure, sur base des études de la littérature, qu'il n'est pas certain que le virus de la fièvre aphteuse soit complètement inactivé par les conditions réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C pour les boues de centrifugeuses ou de séparateurs produites dans les industries laitières. Le Comité scientifique propose comme ligne directrice pour la destruction du virus de la fièvre aphteuse de suivre les mêmes traitements que ceux repris dans la législation pour le lait en poudre destiné à l'alimentation animale. Ces traitements comprennent, entre autres, l'un de ces traitements:

- une stérilisation avec une valeur F_0 d'au moins 3,
- un traitement HTST (*High Temperature Short Time*) appliqué 2 fois, ou
- un traitement HTST ou UHT combiné à:
 - o un procédé de dessiccation combiné à un traitement thermique supplémentaire à au moins 72 °C,
 - o un abaissement de pH en dessous de 6,0 pendant une heure au moins, ou
 - o la condition qu'aucun foyer de fièvre aphteuse ne peut avoir été déclaré dans l'état membre d'origine dans les 21 jours avant expédition.

Le traitement thermique selon les paramètres réglementaires (30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C) est suffisant pour la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*.

Le traitement thermique selon les paramètres réglementaires n'est pas suffisant pour la destruction des spores de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*. Après le traitement thermique, ces spores peuvent germer et continuer à croître lorsque les conditions externes permettent cette croissance. Pour exclure tout risque de transmission de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*, la croissance de ces pathogènes devrait être limitée après le traitement thermique. Ceci peut être effectué en refroidissant, acidifiant, séchant les boues après le chauffage ou en limitant le temps de conservation avant de les distribuer aux animaux.

4.2. Volet 2: Formuler des paramètres alternatifs de chauffage équivalents à un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C et de 60 minutes à 70 °C

Il est à noter qu'un traitement thermique de 30 min. à 80 °C ne conduit pas à une même destruction microbienne qu'un traitement thermique de 60 min. à 70 °C (voir tableaux 2, 3 et 4).

Le NIZO a réalisé en 2012 une analyse des risques des boues de centrifugeuses. La figure 2 du rapport de cette étude (NIZO-report E 2012/125) présente les combinaisons temps x température qui sont équivalentes à une combinaison temps x température de référence de 30 minutes à 80 °C pour des énergies d'activation comprises entre 200 à 400 kJ/mol, calculées avec le modèle Premia. D'après cette figure, un traitement de 25 s à 95 °C est équivalent en termes de destruction de bactéries sous forme végétative à un traitement de 30 min. à 80 °C pour une énergie d'activation (Ea) de 300 kJ/mol.

Le Comité scientifique propose de vérifier l'équivalence des combinaisons temps x température en matière de destruction des bactéries non-sporulantes sur base de la destruction de MAP et *Coxiella burnetii*, bactéries les plus résistantes à la pasteurisation, en utilisant les valeurs D et z de référence les plus défavorables. Les valeurs D et z les plus défavorables rapportées dans la littérature pour *Coxiella burnetii* et MAP dans le lait sont reprises au tableau 1.

Tableau 1: Valeurs D et z de référence les plus défavorables (conservatives) rapportées dans la littérature pour *Coxiella burnetii*, MAP et MAP souche ATCC 19698

	Dref. à Tref.	Valeur z	Références
<i>Coxiella burnetii</i>	2,21 s à 71,7 °C	4,34 °C	Cerf et Condron 2006
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	4,22 s à 72 °C	6,9 °C	Foddai <i>et al.</i> , 2010
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> souche ATCC 19698	< 2,03 s à 72 °C	8,6 °C	NACMCF (2010)

Sur base des valeurs D et z de référence pour les températures de référence (Tref.) correspondantes, présentées au tableau 1, l'inactivation microbienne (nombre de réductions logarithmiques) a été déterminé pour quatre combinaisons de temps x température (60 min. à 70 °C, 30 min. à 80 °C, 25 s à 95 °C et 15 s à 72 °C).

Dans un premier temps (voir première ligne des tableaux 2, 3 et 4), les valeurs D aux températures de 70 °C, 72 °C, 80 °C et 95 °C ont été déterminées par la formule suivante:

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

Ensuite, le nombre de réductions logarithmiques a été calculé pour les 4 combinaisons temps x température par la formule suivante: $\log \frac{N}{N_0} = -\frac{t}{D}$

où T est la température et t le temps.

Ces résultats sont présentés à la deuxième ligne des tableaux 2, 3 et 4.

Tableau 2: Nombre de réductions logarithmiques de *Coxiella burnetii* pour les différentes combinaisons «temps x température»

	Combinaison temps x température #1: 60 min. à 70 °C	Combinaison temps x température #2: 30 min. à 80 °C	Combinaison temps x température #3: 25 s à 95 °C	Combinaison temps x température #4: 15 s à 72 °C
Valeur D (s) calculée avec Tref=71,7°C, Dref=2,21 s et z=4,34 °C	5,45 à 70 °C	0,027 à 80 °C	9,5E-06 à 95 °C	1,88 à 72 °C
Nombre de réductions logarithmiques (log ₁₀) pour la combinaison temps x température	661	66 576	2 643 694	8,0

Tableau 3: Nombre de réductions logarithmiques de MAP pour les différentes combinaisons «temps x température»

	Combinaison temps x température #1: 60 min. à 70°C	Combinaison temps x température #2: 30 min. à 80°C	Combinaison temps x température #3: 25 s à 95°C	Combinaison temps x température #4: 15 s à 72°C
Valeur D (s) calculée avec Tref=72°C, Dref=4,2 s et z=6,9 °C	8,19 à 70 °C	0,29 à 80 °C	0,002 à 95 °C	4,20 à 72 °C
Nombre de réductions logarithmiques (log ₁₀) pour la combinaison temps x température	439	6 186	12 824	3,6

Tableau 4: Nombre de réductions logarithmiques de MAP souche ATCC19698 pour les différentes combinaisons «temps x température»

	Combinaison temps x température #1: 60 min. à 70 °C	Combinaison temps x température #2: 30 min. à 80 °C	Combinaison temps x température #3: 25 s à 95 °C	Combinaison temps x température #4: 15 s à 72 °C
Valeur D (s) calculée avec Tref=72°C, Dref=2,03 s et z=8,6 °C	3,47 à 70 °C	0,24 à 80 °C	0,004 à 95 °C	2,03 à 72 °C
Nombre de réductions logarithmiques (log ₁₀) pour la combinaison temps x température	1 038	7 551	5 819	7,4

Sur base des valeurs D et z connues pour *Coxiella burnetii* dans le lait (tableau 1), il ressort du calcul du nombre de réductions logarithmiques pour quatre combinaisons temps x température (tableau 2) que:

- le traitement de 25 s à 95 °C conduit au plus grand nombre de réductions logarithmiques de *Coxiella burnetii*,
- les trois combinaisons 60 min. à 70 °C, 30 min. à 80 °C et 25 s à 95 °C conduisent à un nombre de réductions logarithmiques très élevé de *Coxiella burnetii*,
- le traitement de 15 s à 72 °C, généralement utilisée pour la pasteurisation HTST du lait, conduit à un nombre de réductions logarithmiques théorique de *Coxiella burnetii* beaucoup plus faible.

Sur base des valeurs D et z connues pour MAP dans le lait (tableau 1), il ressort du calcul du nombre de réductions logarithmiques pour quatre combinaisons temps x température (tableau 3) que:

- le traitement de 25 s à 95 °C conduit également au plus grand nombre de réductions logarithmiques de MAP,
- les trois combinaisons 60 min. à 70 °C, 30 min. à 80 °C, 25 s à 95 °C conduisent à un nombre de réductions logarithmiques très élevé,
- La combinaison 15 s à 72 °C généralement utilisée pour la pasteurisation HTST du lait, conduit à un nombre de réductions logarithmiques de MAP beaucoup plus faible.

Sur base des valeurs D et z connues pour MAP souche ATCC 19698 dans le lait (tableau 1), il ressort du calcul du nombre de réductions logarithmiques pour les quatre combinaisons temps x température (tableau 4) que:

- le traitement de 30 min. à 80 °C conduit au plus grand nombre de réductions logarithmiques de MAP souche ATCC 19698,
- les trois combinaisons 60 min. à 70 °C, 30 min. à 80 °C 25 s à 95 °C conduisent à un nombre de réductions logarithmiques très élevé,
- la combinaison 15 s à 72 °C généralement utilisée pour la pasteurisation HTST du lait, conduit à un nombre de réductions logarithmiques beaucoup plus faible.

Les traitements thermiques (combinaisons temps x température) conduisant à une réduction logarithmique équivalente à un traitement thermique de 60 min. à 70 °C, de 30 min. à 80 °C, ainsi qu'un traitement thermique de 25 s à 95 °C pour *Coxiella burnetii*, MAP et MAP souche ATCC 19698 sont repris au tableau 5.

Tableau 5: Combinaison temps (minutes) x température (°C) conduisant à une réduction logarithmique équivalente à un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C, de 30 minutes à 80°C ainsi que de 25 secondes à 95 °C pour *Coxiella burnetii*, MAP et MAP souche ATCC 19698

T [°C]	<i>Coxiella burnetii</i>			<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>			<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> strain ATCC 19698		
	t[min] - équivalent à 70°C/ 60 min	t[min] - équivalent à 80°C/ 30 min	t[min] - équivalent à 95°C/ 25s	t[min] - équivalent à 70°C/ 60 min	t[min] - équivalent à 80°C/ 30 min	t[min] équivalent à 95°C/ 25s	t[min] équivalent à 70°C/ 60 min	t[min] équivalent à 80°C/ 30 min	t[min] équivalent à 95°C/ 25 s
63	2 461	247 840	9 841 485	620	8 727	18 091	391	2 844	2 191
64	1 448	145 800	5 789 565	444	6 251	12 958	299	2 176	1 677
65	852	85 771	3 405 894	318	4 477	9 281	229	1 665	1 283
66	501	50 458	2 003 625	228	3 207	6 648	175	1 274	981
67	295	29 683	1 178 696	163	2 297	4 762	134	974	751
68	173	17 462	693 405	117	1 645	3 411	103	746	575
69	102	10 273	407 917	84	1 178	2 443	78	570	440
70	60	6 043	239 970	60	844	1 750	60	436	336
71	35	3 555	141 170	43	605	1 253	46	334	257
72	21	2 091	83 048	31	433	898	35	255	197
73	12	1 230	48 855	22	310	643	27	195	151
74	7,2	724	28 741	16	222	461	21	150	115
75	4,2	426	16 908	11	159	330	16	114	88
76	2,5	250	9 946	8,1	114	236	12	88	67
77	1,5	147	5 851	5,8	82	169	9,2	67	52
78	0,86	87	3 442	4,2	58	121	7,0	51	39
79	0,51	51	2 025	3,0	42	87	5,4	39	30
80	0,30	30	1 191	2,1	30	62	4,1	30	23
81	0,18	18	701	1,5	21	45	3,2	23	18
82	0,10	10	412	1,1	15	32	2,4	18	14
83	0,06	6,1	243	0,78	11	23	1,8	13	10

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

Légende:

- La température de 72°C est la température applicable, proposée par le secteur pour traiter les boues de centrifugeuses et de séparateurs.
- A une température de 90°C, le temps de traitement est de 17 secondes. Ce temps est proche du temps de traitement généralement appliqué pour une pasteurisation HTST (15 secondes).

Conclusion du volet 2

Des combinaisons temps (minutes) x température (°C) conduisant à une réduction logarithmique équivalente à un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C et de 30 minutes à 80 °C pour *Coxiella burnetii*, MAP et MAP souche ATCC 19698 sont présentés au tableau 5. En outre, des traitements équivalents à un traitement de 25 secondes à 95 °C sont donnés à titre d'information supplémentaire.

La température applicable, proposée par le secteur pour traiter les boues de centrifugeuses et de séparateurs est de 72 °C. Sur base du tableau 5 (voir la ligne supérieure indiquée en gras), une durée de traitement de 35 minutes peut être proposée à 72 °C comme équivalente pour l'inactivation des trois micro-organismes considérés qu'un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C sur base des connaissances disponibles dans la littérature. Un traitement de 17 secondes à 90 °C (voir tableau 5 ligne inférieure en gras) est également équivalent.

Les combinaisons temps x température qui sont proposées comme équivalentes dans le présent avis sont des paramètres théoriques. Lors de l'application dans la pratique, on peut tenir compte d'une période d'échauffement et de refroidissement qui va encore accroître la sécurité du produit par l'apport supplémentaire de chaleur au produit. Ce temps de chauffage et de refroidissement peut varier considérablement en fonction de l'installation et du procédé utilisé (par ex. procédé en batch ou continu).

Cependant, il est important de noter que les données disponibles dans la littérature qui ont été utilisées concernent la résistance thermique des agents pathogènes dans le lait et non dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs. Tenant compte du fait que les boues sont moins riches en eau que le lait, il est supposé que les micro-organismes sont probablement plus résistants dans les boues que dans le lait. L'application en pratique doit donc faire l'objet d'une validation pour s'assurer d'un niveau de destruction suffisant des microorganismes dans les boues.

4.3. Volet 3: Proposer des tests en laboratoire pour vérifier le traitement thermique

Le Comité scientifique estime que proposer un test microbiologique de référence pour se prononcer sur l'efficacité du traitement de pasteurisation alternatif n'est pas pertinent. La température et le temps pendant la pasteurisation ainsi que les conditions de conservation du produit pasteurisé sont les paramètres les plus importants pour la maîtrise des risques microbiologiques. Ces paramètres doivent être suivis comme points critiques de contrôle via le système d'autocontrôle.

Pour vérifier le produit fini et valider le procédé, il est recommandé d'utiliser un test microbiologique. À cet égard, le Comité scientifique recommande de dénombrer les *Enterobacteriaceae* (indicateur d'hygiène) dans les boues après traitement par la méthode ISO 21528-1. Le critère repris dans le Règlement (UE) N°142/2011 pour les sous-produits animaux destinés à l'alimentation animale est le suivant:

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

avec n = nombre d'échantillons à tester;

m = la valeur-seuil pour le nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme satisfaisant si le nombre de bactéries dans la totalité des échantillons n'excède pas m ;

M = la valeur maximale du nombre de bactéries. Le résultat est considéré comme non satisfaisant si le nombre de bactéries dans un ou plusieurs échantillons est supérieur ou égal à M ;

c = le nombre maximum d'échantillons dans lesquels le nombre de bactéries se situe entre m et M , l'unité d'échantillonnage étant toujours considérée comme acceptable si le nombre de bactéries dans les autres échantillons est inférieur ou égal à m .

Si des *Enterobacteriaceae* sont dénombrées, il faut vérifier l'efficacité du traitement thermique et les procédures pour la prévention des recontaminations (investiguer les sources de contamination croisée post-pasteurisation).

Les indicateurs (bio)chimiques habituellement utilisés pour vérifier l'efficacité du traitement thermique du lait sont:

- activité de la phosphatase alcaline (pasteurisation conventionnelle),
- activité de la lactoperoxydase (pasteurisation «haute»),
- lactulose /lactose.

Dans le cadre du traitement thermique des boues de centrifugeuses/séparateurs, le chauffage appliqué peut être vérifié à l'aide d'un indicateur. Le rapport entre le lactulose et le lactose peut être utilisé à cette fin. Les critères de tolérance du lait de consommation ne peuvent, toutefois, pas être repris tels quels, parce que les propriétés physico-chimiques des boues de centrifugeuses sont très différentes de celles du lait. Pour pouvoir disposer de critères corrects, il est recommandé de définir la formation de lactulose pour un traitement thermique standard de 60 min. à 70 °C et de 30 min. à 80 °C. Un rapport lactulose/lactose qui est au moins aussi élevé que lors du traitement thermique standard peut alors donner une réponse définitive pour un traitement thermique sûr. Les inconvénients de cette méthode sont que les analyses peuvent seulement être réalisées dans un laboratoire bien équipé et qu'elles prennent du temps. Une alternative intéressante pourrait être la détermination de l'activité de la lactoperoxydase (LPO). Une réduction de dix fois de l'activité LPO (dans le lait) est obtenue en chauffant le lait pendant 100 min. à 70 °C. Ainsi, le traitement thermique pour l'inactivation de la LPO est du même ordre de grandeur que ce qui doit être utilisé pour le traitement thermique standard des boues de centrifugeuses. Cette analyse peut être effectuée rapidement et facilement. Ici aussi, des recherches complémentaires sont nécessaires pour examiner dans quelle mesure la dénaturation de la LPO peut donner les garanties nécessaires en termes de sécurité pour le traitement thermique des boues de centrifugeuses/séparateurs.

Conclusion du volet 3

Les paramètres les plus importants pour la maîtrise des risques microbiologiques devraient être intégrés au plan HACCP de l'opérateur. A cet égard, il est important de contrôler la température et le temps pendant le traitement thermique et les conditions de conservation ultérieures si la forme sous laquelle les boues traitées sont conservées permet la croissance des bactéries sporulantes. A cet effet, le Comité scientifique recommande d'appliquer les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques agricoles pour le traitement et la conservation du produit pasteurisé.

Pour vérifier le produit fini et valider le procédé, il est recommandé d'utiliser les *Enterobacteriaceae* comme indicateur d'hygiène.

Pour vérifier le chauffage, un indicateur (bio)chimique pourrait également être utilisé. Les possibilités incluent le rapport lactulose sur lactose et la détermination de l'activité de la LPO. Avant que ces indicateurs puissent être appliqués, ils devraient être validés pour la matrice à traiter et pour les conditions de chauffage qui sont appliquées.

5. Incertitudes

Les données concernant la résistance de certains agents pathogènes aux traitements thermiques sont très partielles et des recherches supplémentaires sont nécessaires.

Les données disponibles dans la littérature concernent la résistance thermique des agents pathogènes dans le lait et non dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs. Tenant compte que les boues sont moins riches en eau que le lait, les microorganismes y sont très probablement plus résistants que dans le lait.

Les courbes d'inactivation rapportées dans l'étude de Foddai *et al.* (2010) ne sont pas log-linéaires mais concaves. Ceci implique que l'inactivation diminue avec le temps de traitement et que la valeur D n'est pas constante au cours du temps. Cependant, les valeurs D et z rapportées par Foddai *et al.* (2010) sont parmi les valeurs les plus défavorables rapportées dans la littérature et ont donc été retenues pour être utilisées dans le présent avis.

6. Conclusions

Le Règlement (UE) N°142/2011 mentionne les paramètres de procédés pour le traitement thermique des boues de centrifugeuses et de séparateurs provenant de la transformation du lait (matières de catégorie 3) et destinées à l'alimentation des animaux. Il est demandé au Comité scientifique de proposer une méthodologie pour la vérification et la validation de paramètres de procédés alternatifs permettant une réduction du risque au moins équivalente aux paramètres réglementaires.

Le Comité scientifique a traité ce dossier en trois volets:

- Volet 1: Vérifier si les paramètres réglementaires sont suffisants pour garantir la santé animale;
- Volet 2: Formuler des paramètres alternatifs de chauffage équivalents à un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C et de 60 minutes à 70 °C;
- Volet 3: Proposer des tests en laboratoire pour vérifier le traitement thermique.

Conclusion du volet 1

Les agents pathogènes pour la santé animale les plus pertinents qui pourraient être présents dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs après un traitement thermique sont le virus de la fièvre aphteuse, les bactéries non sporulantes *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii* ainsi que les bactéries sporulantes *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

Nous pouvons conclure, sur base des études de la littérature, qu'il n'est pas certain que le virus de la fièvre aphteuse soit complètement inactivé par les conditions réglementaires de 30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C pour les boues de centrifugeuses ou de séparateurs produites dans les industries laitières. La fièvre aphteuse est une maladie contagieuse à déclaration obligatoire pour laquelle il convient en effet de prendre les précautions adéquates pour éviter son introduction en Belgique. Le Comité scientifique propose comme ligne directrice pour la destruction du virus de la fièvre aphteuse de suivre les mêmes traitements que ceux repris dans la législation pour le lait en poudre destiné à l'alimentation animale. Ces traitements comprennent, entre autres, l'un de ces traitements:

- une stérilisation avec une valeur F_0 d'au moins 3,
- un traitement HTST (*High Temperature Short Time*) appliqué 2 fois, ou
- un traitement HTST ou UHT combiné à:
 - o un procédé de dessiccation combiné à un traitement thermique supplémentaire à au moins 72 °C,
 - o un abaissement de pH en dessous de 6,0 pendant une heure au moins, ou
 - o la condition qu'aucun foyer de fièvre aphteuse ne peut avoir été déclaré dans l'état membre d'origine dans les 21 jours avant expédition.

Un traitement thermique selon les paramètres réglementaires (30 minutes à 80 °C ou 60 minutes à 70 °C) est suffisant pour la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*.

Un traitement thermique selon les paramètres réglementaires n'est pas suffisant pour la destruction des spores de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*. Après le traitement thermique, ces spores peuvent germer et continuer à croître lorsque les conditions externes permettent cette croissance. Pour exclure tout risque de transmission de *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*, la croissance de ces pathogènes devrait être limitée après le traitement thermique. Ceci peut être effectué en refroidissant, acidifiant, séchant les

boues après le chauffage ou en limitant le temps de conservation avant de les distribuer aux animaux.

Conclusion du volet 2

Le Comité scientifique propose de vérifier l'équivalence des combinaisons temps x température en matière de destruction des bactéries non sporulantes sur base de la destruction de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Coxiella burnetii*, bactéries les plus résistantes à la pasteurisation, en utilisant les valeurs D et z de référence les plus défavorables citées dans la littérature.

Il est à noter qu'un traitement thermique de 30 minutes à 80 °C ne conduit pas à une même destruction microbienne qu'un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C.

Des combinaisons temps (minutes) x température (°C) conduisant à une réduction logarithmique équivalente à un traitement thermique de 30 min. à 80 °C et de 60 min. à 70 °C pour *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* et *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (souche ATCC 19698) sont présentés dans l'avis. En outre, des traitements équivalents à un traitement de 25 secondes à 95 °C sont donnés à titre d'information supplémentaire.

La température applicable, proposée par le secteur pour traiter les boues de centrifugeuses et de séparateurs, est de 72 °C. Sur base des connaissances disponibles dans la littérature, un traitement de 35 minutes à 72 °C est équivalent pour l'inactivation des trois micro-organismes considérés à un traitement thermique de 60 minutes à 70 °C. Un traitement de 17 secondes à 90 °C est également équivalent.

Les combinaisons temps x température qui sont proposées comme équivalentes dans le présent avis sont des paramètres théoriques. Lors de l'application dans la pratique, on peut tenir compte d'une période d'échauffement et de refroidissement qui va encore accroître la sécurité du produit par l'apport supplémentaire de chaleur au produit. Ce temps de chauffage et de refroidissement peut varier considérablement en fonction de l'installation et du procédé utilisé (par ex. procédé en batch ou continu).

Cependant, il est important de noter que les données disponibles dans la littérature qui ont été utilisées dans cet avis concernent la résistance thermique des agents pathogènes dans le lait et non dans les boues de centrifugeuses et de séparateurs. Tenant compte du fait que les boues sont moins riches en eau que le lait, il est supposé que les micro-organismes sont probablement plus résistants dans les boues que dans le lait. L'application en pratique doit donc faire l'objet d'une validation pour s'assurer d'un niveau de destruction suffisant des microorganismes dans les boues.

Conclusion du volet 3

Les paramètres les plus importants pour la maîtrise des risques microbiologiques devraient être intégrés au plan HACCP de l'opérateur. Il est important de contrôler la température et le temps pendant le traitement thermique et les conditions de conservation ultérieures si la forme sous laquelle les boues traitées sont conservées permet la croissance des bactéries sporulantes. A cet effet, le Comité scientifique recommande d'appliquer les bonnes pratiques de fabrication et les bonnes pratiques agricoles pour la transformation et la conservation du produit pasteurisé.

Pour vérifier le produit fini et valider le procédé, il est recommandé d'utiliser les *Enterobacteriaceae* comme indicateur d'hygiène. Un indicateur (bio)chimique pourrait également être utilisé pour vérifier le chauffage. Les possibilités incluent le rapport lactulose sur lactose et la détermination de l'activité de la lactoperoxydase. Avant que ces indicateurs puissent être appliqués, ils devraient être validés pour la matrice à traiter et pour les conditions de chauffage qui sont appliquées.

Pour le Comité scientifique,

Prof. Dr. E. Thiry (Sé.)
Président

Bruxelles, le 01/12/2015

Références

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

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

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

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

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

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

SciCom (Comité scientifique), 2010a. Avis 25-2010: Surveillance, prévention et lutte contre *Coxiella burnetii* dans les exploitations bovines. Disponible via http://www.favv-afsca.be/santeanimale/fievreq/_documents/AVIS25-2010_FR_DOSSIER2010-12_001.pdf.

SciCom (Comité scientifique), 2010b, Avis 24-2010 Evaluation d'un programme de surveillance, de prévention et de lutte contre *Coxiella burnetii* chez les petits ruminants. Disponible via http://www.favv-afsca.be/santeanimale/fievreq/_documents/AVIS24-2010_FR_DOSSIER2010-11_001.pdf.

SciCom (Comité scientifique), 2011. Avis 15-2011: Evaluation des risques et bénéfices de la consommation de lait cru de bovins, et de l'effet du traitement thermique du lait cru sur ces risques et bénéfices (dossier SciCom 2010/25, auto-saisine). Disponible via http://www.favv-afsca.fgov.be/comitescientifique/avis/_documents/AVIS15-2011_FR_DOSSIER2010-25.pdf.

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

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

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

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

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

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts n'a été constaté.

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de:

Membres du Comité scientifique	A. Clinquart (rapporteur), L. De Zutter, L. Herman, M. Sindic, M. Uyttendaele
Experts externes	J. De Block (ILVO), A. Geeraerd (KU Leuven), F. Boyen (UGent)

Le Comité scientifique remercie G. Daube pour le peer review de l'avis.

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 09 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.