



Risico Analyse: *Mycobacterium avium paratuberculosis* in gepasteuriseerde melk

In Nederland dronk men in 2018 975 miljoen liter melk. Het grootste aandeel hiervan is gepasteuriseerde melk. Van rauwe melk is bij mensen bekend dat dit risico's met zich meedraagt, omdat bacteriën zoals Campylobacter, Listeria en E. coli hierin goed gedijen. De hedendaagse consument gaat er daarentegen vanuit dat gepasteuriseerde melk volledig veilig is. Over *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (MAP) wordt gezegd dat de bacterie pasteurisatie kan overleven. Daarbij wordt MAP wel eens beschreven als oorzaak voor de ziekte van Crohn bij mensen. Vandaar deze risico analyse, met de vraag: Is *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in gepasteuriseerde koemelk een risico is voor de volksgezondheid in Nederland? Om deze vraag te beantwoorden is eerst gekeken hoeveel en hoe vaak MAP voorkomt in Nederlandse melk, daarna of MAP pasteurisatie overleeft en als laatste wat MAP in de mens doet volgens onderzoek.

MAP in de Nederlandse melkveehouderij

MAP is een bacterie die voorkomt in koeien, schapen en geiten. Infectie komt veelal voor kort na de geboorte van een dier, vooral feco-oraal, maar ook via biest en melk¹. Na een lange incubatietijd ontwikkelt bij volwassen koeien een chronische progressieve diarree met emaceratie en een verminderde melkgift¹. Dit geeft een jaarlijkse klinische incidentie

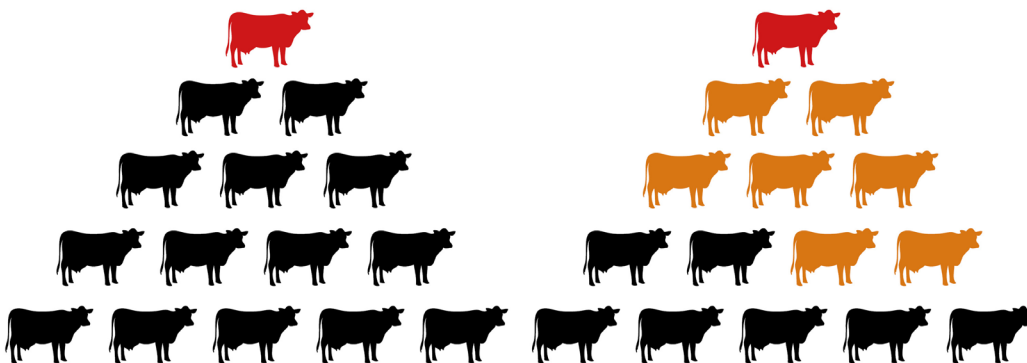
in een koppel van ongeveer 1%. Koeien kunnen MAP al uitscheiden voor dat klinische verschijnselen zichtbaar worden.

Door de lange incubatietijd en de daarmee gepaard gaande lage sensitiviteit van aanvullende diagnostiek (veel vals negatieven) is het lastig om MAP geïnfecteerde dieren op te sporen (zie figuur 1, verschil tussen klinisch en verborgen



Clinical perception

Actual herd problem



Figuur 1 - Het verschil tussen de klinische zieke MAP geïnfecteerde en de daadwerkelijk geïnfecteerde dieren op een bedrijf



dieren). Dit maakt dat ondanks een monitoringsprogramma voor paratuberculose dat al sinds 1997 loopt, nog steeds 24% van de melkveebedrijven in Nederland geen onverdacht-status heeft².

Ondanks een monitoringsprogramma voor paratuberculose heeft nog steeds 24% van de melkveebedrijven in Nederland geen onverdacht status

**Marina
Meester
Masterstudent
Landbouwhuisdieren**

Ook op de bedrijven met een onverdacht-status is mogelijk dat een klein percentage van de koppel besmet is met paratuberculose, vanwege de detectiegrens.

Uit de melk van met paratuberculosegeïnfecteerde dieren, zowel klinisch als niet klinisch, kan paratuberculose gekweekt worden¹. De hoeveelheid MAP organismen per milliliter (ml) melk wisselt erg per dier. Daarom is ook van tankmelk van besmette bedrijven niet bekend hoeveel MAP organismen per ml gemiddeld aanwezig zijn. Hier is dan ook weinig over beschreven in literatuur³. In een studie naar MAP kwantificatie in tankmelk in een regio in Italië (gemeten door twee sequenties op te sporen middels qPCR) kwam naar voren dat 26,9%

(789/2934) van de bedrijven positief testten op MAP. Echter, maar 3,1% (90/2934) van de tankmelksamples bevatte zoveel MAP dat het kon worden gekwantificeerd (boven een detectielimiet van $1,5 \cdot 10^1$ MAP cellen/ml). De mediane MAP load van die 90 tankmelksamples was 32,4 MAP cellen/ml⁴.

MAP komt dus voor in Nederlandse melk. Máár 97% van de melk in Nederland wordt gepasteuriseerd gedronken. Daarom is een belangrijke tweede vraag of MAP pasteurisatie overleeft.

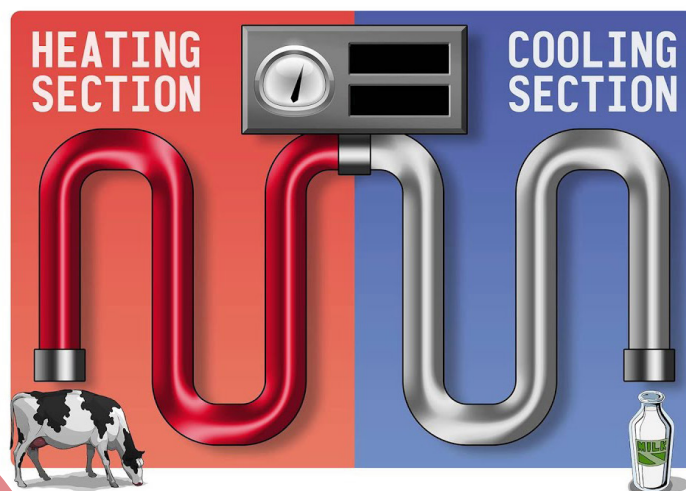
MAP en pasteurisatie

Pasteuriseren is het voor korte tijd met hoge temperatuur verhitten van voedselproducten, om (een deel van de) schadelijke micro-organismen te vernietigen, zonder dat het product onacceptabel verandert qua eigenschappen zoals smaak. Het is dus een middel om het product veilig te maken, mits het op de juiste manier wordt bewaard en voor de vervaldatum wordt genuttigd⁵. Vaak wordt melk gedurende 15 seconden, op 71,7°C verhit om goed te pasteuriseren⁶ (figuur 2).

MAP is in het verleden gevonden tijdens monitoring van commercieel gepasteuriseerde melk⁷. Dus er kan gesteld worden dat MAP pasteurisatie overleeft. Dit zou daarentegen kunnen

komen doordat de pasteurisatie niet goed gegaan is, bijvoorbeeld door tijdelijke schade aan apparatuur. Bovendien, is het vinden van een zeer lage hoeveelheid MAP direct onveilig?

Om te kunnen zeggen of pasteurisatie goed werkt om MAP te doden, moet bepaald



Figuur 2 - Pasteurisatie van melk



worden bij welke decimale reductie van MAP de melk ook echt veilig is. Dit getal noemt men het Performance Criterion⁸. Wanneer het veilig is hangt uiteraard af van factoren zoals de pathogeniteit van MAP, de minimale infectieuze dosis, en of bacteriën die het proces overleven daarna kunnen multipliceren in de melk⁵. Veel hiervan is onbekend. Wat men wel weet, is dat de groeisnelheid van MAP zeer laag is in koeling en niet significant kan multipliceren in 15 dagen beneden 8 graden celsius⁵. Verder is het Performance Criterion voor pasteurisatie in geval van MAP afhankelijk van mensen hun oordeel over veiligheid.

De gerapporteerde mate van reductie van MAP in melk na pasteuriseren (72 graden, 15 sec.) verschilt per studie. Lund et al. (2002) heeft negen studies vergeleken die dit bekijken. In vijf van deze studies werd een 4 decimale reductie of meer gemeten. De vier andere studies rapporteerden een decimale reductie van 1 tot 3,75. Dit is een goede mate van reductie.

In de studie van Cerf et al. (2007) is een kwantitatieve analyse gedaan naar de waarschijnlijkheid op het vinden van MAP in gepasteuriseerde melk in geïndustrialiseerde landen⁹. Uit hun simulaties kwam naar voren dat de kans op MAP detecteren in 50 ml samples lager is dan 1%. De auteurs stellen dat in het verleden gevonden hogere kansen hierop kunnen komen door onjuiste en onhygiënische pasteurisatie of cross-contaminatie in de laboratoria⁹.

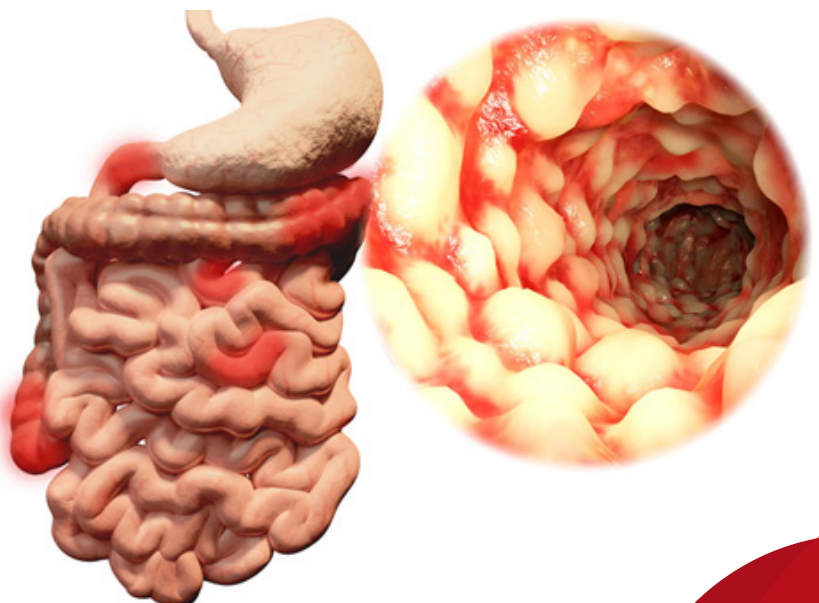
Alles bij elkaar genomen lijkt MAP pasteurisatie niet goed te overleven. De kans op het vinden van MAP in commerciële melksamples is laag. Om te beoordelen of commercieel gepasteuriseerde melk wat betreft MAP veilig genoeg is, gaan we nu kijken of MAP echt een zoönose is.

MAP in de mens

Al ten minste dertig jaar wordt gesuggereerd dat MAP potentieel zoönotisch is¹⁰. Deze hypothese komt voort uit de analogie tussen de ziekte van Johne en van Crohn. De ziekte van Crohn geeft namelijk een chronische ontsteking van de dunne darm op dezelfde plekken als Johne bij koeien (figuur 3). Onderzoek naar associatie tussen MAP en de ziekte van Crohn geeft zeer heterogene resultaten¹⁰. Hieronder zullen vier artikelen waarin deze associatie bestudeerd is, kort worden besproken.

De eerste studie is van Bernstein et al. (2004). Het doel van de studie is om een associatie aan te tonen tussen de ziekte van Crohn en serologisch bewijs voor MAP. Dit is gedaan met een case-control studie in Manitoba, Canada (zie figuur 4 voor hoe een case-control studie werkt). De studie heeft vier groepen: mensen met aangetoond ziekte van Crohn (cases) en drie verschillende controlegroepen die gezond zijn, of een andere darmaandoening hebben. In totaal zijn 967 mensen onderzocht op antilichamen tegen MAP. Uit de resultaten kwam dat iedere groep een seroprevalentie had van ongeveer 35%, zonder significant

Figuur 3- Darmlesies bij de ziekte van Crohn





verschil tussen de groepen¹¹.

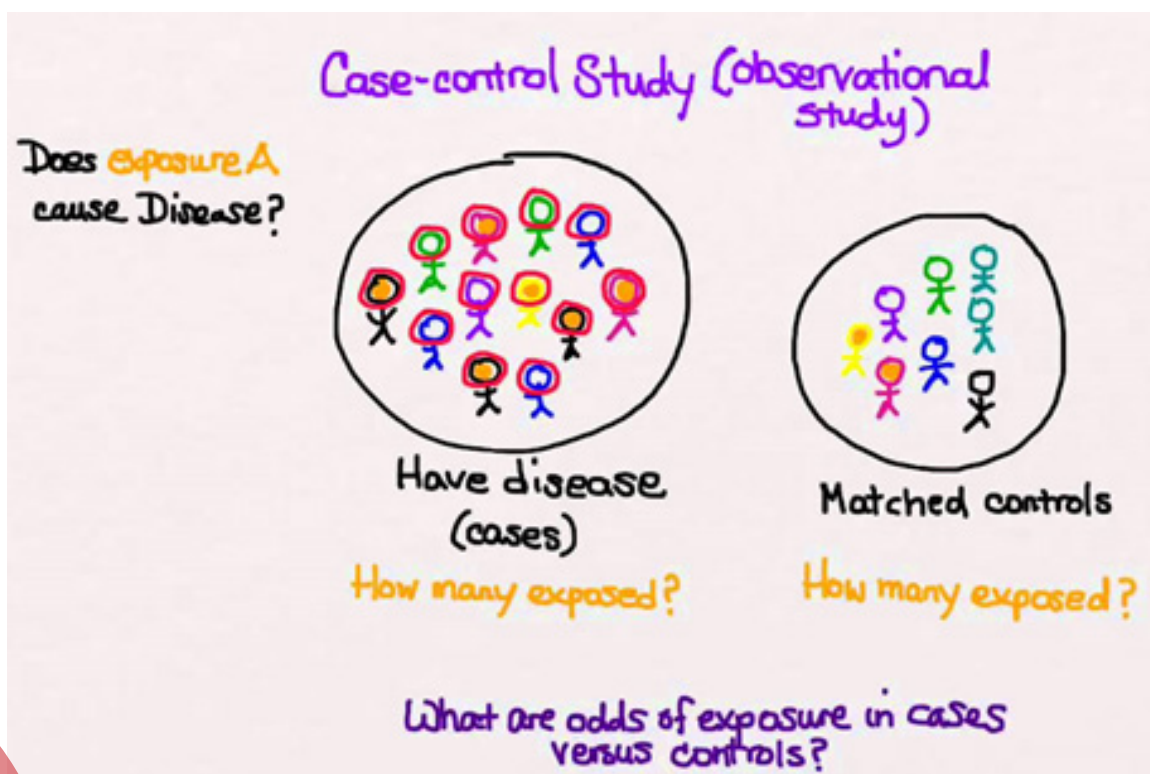
Met zo een grote studiepopulatie zou gesteld kunnen worden dat het duidelijk is dat MAP niet geassocieerd is met de ziekte van Crohn. Echter, zoals men ook weet bij onderzoek naar MAP middels antilichamen bij koeien, zit er een lange tijd tussen het moment van infectie tot het moment dat antilichamen kunnen worden aangetoond. Wellicht zijn bij de cases veel meer mensen geïnfecteerd dan antilichamen hebben. Een studie die kijkt naar antigeen in plaats van antilichaam kan hier meer over zeggen.

In de studie van Sechi et al. (2005) wordt gekeken naar MAP aanwezigheid in bipten van de darm¹². Hier wordt dus naar een actieve infectie gekeken, in plaats van antilichamen tegen MAP. Ook dit is een case-control studie, maar met veel kleinere groepen – 30 cases (Crohn) – 29 controles (geen Crohn, wel een andere darmafwijking, zoals adenocarcinoom/prikkelbaar darmsyndroom). De bipten werden op aanwezigheid van MAP gecontroleerd middels PCR en een ingezette kweek. Het verschil tussen de cases en controls is enorm, met

25/30 cases waar MAP kon worden aangetoond, en 3/29 controls waar dit kon! Dit geeft een odds ratio van 43,3 met een p-waarde van 0.00000112.

Een dusdanig verschil tussen de controles en cases draagt bij aan het wetenschappelijke vermoeden dat MAP wel degelijk een risicofactor is voor het ontwikkelen van de ziekte van Crohn. In de studie ontbreken de demografische gegevens van de deelnemers. Bijvoorbeeld, hoeveel van deze mensen woont op of in de buurt van een melkveebedrijf? Als die verhouding groter is in de case groep, zou dat de resultaten kunnen beïnvloeden. Toch is lastig voor te stellen dat demografische gegevens zo'n hoge odds ratio kunnen veroorzaken.

Echter, het is óók lastig voor te stellen dat andere studies deze resultaten niet kunnen repeteren. Dat is wel het geval. Een case-control studie gedaan in India, van Sasikala et al. (2009) heeft ook bipten genomen van patiënten met de ziekte van Crohn, en van mensen die colonoscopie ondergingen als screening voor darmkanker¹³. De bipten zijn genomen van dezelfde plekken als bij de studie van Sechi



Figuur 4 - Het design van een case-control studie



et al, en getest met een PCR gericht op hetzelfde stukje DNA. In totaal werden 81 cases en 85 controls onderzocht en bij nul mensen werd MAP aangetoond¹³. Nu wordt in India minder melk gedronken dan in veel Europese landen¹⁴ en wordt vrijwel geen koeienvlees gegeten, maar toch is het opmerkelijk dat MAP niet werd aangetoond.

Dit is gelijk het lastige aan de vraag of MAP een risico is voor de volksgezondheid. Er wordt geen oorzakelijk verband aangetoond, alleen een associatie in sommige studies. De volledige etiologie van Crohn is onbekend. Wellicht kan MAP alleen beter aangrijpen in de darm bij mensen die de ziekte van Crohn hebben, waardoor MAP bij deze mensen vaker wordt aangetoond. Op basis van de gedane studies is geen definitieve conclusie te maken.

Dat de inschatting van het risico lastig is, blijkt ook uit de opinie van specialisten op dit gebied over de hele wereld. Waddell et al. (2015) heeft middels een online vragenlijst aan 156 academici, ambtenaren werkzaam bij de overheid, en mensen uit de industrie gevraagd of en in welke mate MAP een volksgezondheidsrisico is¹⁵. Van de ondervraagden vindt 33,8% MAP een risico, 44,8% geeft aan dat het waarschijnlijk een risico is maar dat hier onvoldoende bewijs voor is, en 18,8% geeft aan dat het een laag of geen risico is. Op de vraag hoe belangrijk MAP is voor de volksgezondheid, geeft 24,2% aan het zeer belangrijk te vinden, 40,1% medium, 23,6% laag en 12,1% niet. Hieruit wordt dus duidelijk dat verschillende experts er anders tegenaan kijken. Toch is het wel interessant te zien dat het merendeel van de ondervraagden MAP een medium tot hoog risico acht. De vragenlijst werd ingevuld door 57% van de totaal aantal benaderde experts¹⁵. Het is mogelijk dat mensen

die geloven dat MAP bijdraagt aan het ontwikkelen van Crohn, eerder geneigd zijn de vragenlijst in te vullen. Mijn inschatting is dat dit meevalt, omdat ook veel studies aangeven dat er geen relatie is tussen Crohn en MAP, dus verwacht ik dat er ook genoeg benaderden zijn die juist de enquête willen invullen omdat ze het er niet mee eens zijn.

Al met al kan uit de literatuur geen eenduidig antwoord worden gevonden op de vraag of MAP een risico is voor de volksgezondheid in het algemeen. Sommige studies tonen geen associatie aan en andere studies een zeer duidelijke associatie. Wetenschappers en andere experts op dit gebied zijn het niet met elkaar eens. Het is ook zeer lastig dit juist in te schatten, omdat Crohn een multifactorieel probleem is, en MAP dus sowieso niet één op één Crohn veroorzaakt en omdat MAP een bacterie is die zeer langzaam groeit en pas laat antilichaamproductie opwekt.

Conclusie

Uit deze risico analyse blijkt ten eerste dat MAP wel degelijk voorkomt in melk van Nederlandse melkveebedrijven. Er treedt echter een verdunningseffect op omdat alleen oudere koeien op paratuberculose verdachte bedrijven MAP uitscheiden en omdat een deel van de Nederlandse bedrijven vrij is. Daarnaast blijkt dat conventioneel toegepaste pasteurisatie niet alle MAP bacteriën kan doden, maar wel een reductie van 104 of meer kan bewerkstelligen, waardoor zeer weinig bacteriën overblijven. Na pasteurisatie neemt MAP niet of nauwelijks meer toe in de melk. Vrijwel alle melk die Nederlanders drinken is gepasteuriseerd of gesteriliseerd. Als laatste blijkt dat het onduidelijk is of MAP wel of geen ziekte van Crohn kan helpen veroorzaken. Wel lijkt het zo te



zijn dat mensen de ziekte van Crohn kunnen hebben met én zonder MAP aanwezigheid en/of antilichamen. In zijn totaliteit schat ik het risico van MAP in melk voor de Nederlandse volksgezondheid in als klein tot zeer klein.

Referenties

1. Radostits O. (2006). 'Diseases associated with bacteria V' in Radostits (ed.) Veterinary Medicine. Saunders Ltd. Chapter 19.
2. GD (2018). Monitoringsflyer vierde kwartaal 2018, retrieved from: <https://www.gddiergezondheid.nl/diergezondheid/monitoring/hoofdpunten-monitoring-rundvee-op-24-5-2019>.
3. Okura H, Toft N, Nielsen SS. (2012). Occurrence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk at dairy cattle farms: a systematic review and meta-analysis. *Vet Microbiol.* 15;157(3-4):253-63
4. Ricchi M, Savi R, Bolzoni L, Pongolini S, Grant IR, De Cicco C, Cerutti G, Cammi G, Garbarino CA, Arrigoni N (2016). Estimation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis load in raw bulk tank milk in Emilia-Romagna Region (Italy) by qPCR. *Microbiologyopen.* 5(4):551-9.
5. Lund BM, Gould GW, Rampling AM (2002). Pasteurization of milk and the heat resistance of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: a critical review of the data. *Int J Food Microbiol.* 25;77(1-2):135-45.
6. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0028702/2010-10-10#Paragraaf1>
7. Grant IR, Rowe MT, Dundee L, Hitchings E (2001). Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 54, 2 – 13.
8. van Schothorst M. (1998). Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures. *Food Control* 9, 379-84.
9. Cerf O, Griffiths M, Azizia F (2007). Assessment of the prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in commercially pasteurized milk. *Foodborne Pathog Dis.* 4(4):433-47.
10. Waddell L, Rajic A, Stärk K, McEwen S (2015). The zoonotic potential of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: A systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiology and Infection*, 143(15), 3135-3157. doi:10.1017/S095026881500076X
11. Bernstein C, Blanchard J, Rawsthorne P, Collins M. (2004). Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiology* 42(3):1129-35.
12. Sechi L, Scanu A, Mollicotti P, Cannas S, Mura M, Dettori G, Fadda G, Zanetti S. (2005). Detection and Isolation of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis from Intestinal Mucosal Biopsies of Patients with and without Crohn's Disease in Sardinia. *Am. J. Gastroenterol.* 100:1529-36.
13. Sasikala M, Reddy DN, Pratap N, Sharma S, Balkumar P, Sekaran A, Banerjee R, Reddy DB (2009). Absence of Mycobacterium avium ss paratuberculosis-specific IS900 sequence in intestinal biopsy tissues of Indian patients with Crohn's disease. *Indian J. Gastroenterol.* 28(5):169-174.
14. Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Lim S, et al. (2019) Correction: Global, Regional, and National Consumption of Sugar-Sweetened Beverages, Fruit Juices, and Milk: A Systematic Assessment of Beverage Intake in 187 Countries. *PLOS ONE* 14(3): e0214344.
15. Waddell L, Rajic A, Stärk K, McEwen S (2015). The potential Public Health Impact of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis: Global Opinion Survey of Topic Specialists. *Zoonoses and Public Health* 63:212-22