



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

ADVIES 07-2013

Betreft: Aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen van endogene oorsprong bij voedselproducerende dieren (Dossier SciCom 2012/07)

Advies goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 22 februari 2013.

Samenvatting

De volgende vragen werden gesteld aan het Wetenschappelijk Comité in verband met de aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen van endogene oorsprong bij voedselproducerende dieren:

- Vraag 1 : Voor de stoffen die onderzocht worden door het FAVV, welke zijn degene waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong een endogene oorsprong hebben (stofwisseling, diervoeding, ...)?
- Vraag 2 : In welke matrices¹ en voor welke diersoorten² (categorieën) kan de aanwezigheid van stoffen van endogene oorsprong worden vastgesteld?
 - o Kan men een residuconcentratie bepalen waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de aanwezigheid van stoffen van endogene oorsprong en afkomstig van een illegale behandeling voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort?
- Vraag 3 : Kan de aanwezigheid van prednisolone en thiouracil in andere matrices dan urine ook van endogene oorsprong zijn ?
 - o Indien ja, kan een residuconcentratie worden vastgelegd waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorsprong (endogeen versus illegale behandeling) voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort ?

Vraag 1

Om op de eerste vraag te antwoorden, heeft het Wetenschappelijk Comité de stoffen opgelijst in de adviesaanvraag in drie groepen ingedeeld:

- groep 1: stoffen waarvan bekend is of wordt vermoed dat de endogene oorsprong te maken heeft met de stofwisseling en/of de voeding;
- groep 2: stoffen waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong kan worden gerelateerd aan een accidentele verontreiniging of een milieuverontreiniging;
- groep 3: stoffen waarvoor er geen reden is om een endogene oorsprong te vermoeden.

De stoffen waarvoor de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong bekend is of waarvan er wordt vermoed dat ze van endogene oorsprong zijn en die men kan indelen in groep 1 zijn : 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenon, 17 α -boldenon, progesteron, 17 β -testosteron, 17 α -testosteron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortison), cortison, prednison, prednisolone en thiouracil.

¹ Voor de volgende matrices : urine, feces, vet, spier, lever en haar

² Voor de volgende soorten : runderen, varkens, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen, pluimvee, vissen

Vraag 2

Om op de tweede vraag te antwoorden, werden de stoffen van groep 1 meer in detail bestudeerd voor een aantal combinaties van stoffen/diersoorten/matrices. De stoffen van groep 2 en 3 werden niet in detail bestudeerd.

Uit een uitgebreide literatuurstudie is gebleken dat bij de volgende stoffen een endogene oorsprong kan worden vastgesteld:

- in urine van runderen: 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenone en 17 α -boldenone
- in bloed bij runderen, varkens, pluimvee, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen en vissen: progesteron, testosteron, estradiol, cortisol en cortison
- in urine van meerdere diersoorten: zeranol en taleranol
- in urine van runderen, varkens en paarden: prednisolone
- in urine van runderen, varkens en schapen: thiouracil.

Meerdere methoden zijn in ontwikkeling voor het bepalen van het onderscheid tussen endogene en exogene oorsprong van bepaalde anabole en/of verboden stoffen. Het belang van een aantal technieken zoals de detectie van biomerkers en de bepaling van de isotopenverhouding neemt gestaag toe.

De in de literatuur beschreven methoden voor het maken van een onderscheid tussen endogene aanwezigheid en illegale toediening zijn weergegeven voor nortestosteron (nandrolon), boldenon, natuurlijke hormonen (testosteron, estradiol, progesteron, hydrocortisone), zeranol en taleranol, prednisolone en thiouracil. Het onderzoek naar de endogene oorsprong van prednison is nog maar weinig gevorderd en de huidige kennis biedt niet de mogelijkheid om met zekerheid een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en illegale behandeling.

De preliminaire resultaten van experimentele studies laten toe om pistes aan te reiken om een onderscheid te kunnen maken bij varkens tussen prednisolone van endogene oorsprong of als gevolg van een illegale behandeling.

Vraag 3

De aanwezigheid van prednisolone en thiouracil van endogene oorsprong in andere matrices dan urine werd onderzocht om vraag 3 te beantwoorden. Preliminaire experimentele studies hebben aangetoond dat de lever een interessante matrix kan zijn om illegale behandeling met prednisolone aan te tonen.

Thiouracil is endogeen aanwezig in de schildklier. Het Wetenschappelijk Comité beschikt thans niet over voldoende elementen om voor thiouracil een onderscheid te kunnen maken tussen endogene aanwezigheid en illegale behandeling in andere matrices dan urine.

Samengevat beveelt het Wetenschappelijk Comité aan om de nodige voorzichtigheid in acht te nemen bij het interpreteren van de resultaten van aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen met mogelijke endogene oorsprong in matrices van nutsdieren zolang de drempelwaarden niet eenduidig werden vastgelegd.

Het Wetenschappelijk Comité moedigt verder onderzoek aan zoals naar de ontwikkeling van analysemethoden (bijvoorbeeld GC-C-IRMS), biomerkers en verhoudingen tussen stoffen om een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en exogene toediening.

Summary

Advice 07-2013 of the Scientific Committee of the FASFC on the presence of endogenous anabolics and or prohibited substances in food producing animals

The following questions were asked to the Scientific Committee on the presence of endogenous anabolic and/or prohibited substances in food-producing animals:

- Question 1: Among the substances being examined by the FASFC, which are those whose presence in a matrix of animal origin is suspected to have an endogenous origin (metabolism, feed, ...)?
- Question 2: In which matrices and in which animal species (categories), the presence of substances of endogenous origin can be observed?
 - o Can a residue concentration be determined differentiating an endogenous origin from an illegal treatment for combinations substance/matrix/species?
- Question 3: Can the presence of prednisolone and thiouracil in matrices other than urine also have an endogenous origin?
 - o If this is the case, can a residue concentration be determined which can differentiate the origin (endogenous versus illegal treatment) for combinations of substance/matrix/species?

Question 1

To answer question 1, the Scientific Committee has subdivided the substances listed in the request into three groups:

- group 1: substances with known or suspected endogenous origin at a certain level via metabolism and/or food;
- group 2: substances whose presence in a matrix of animal origin may be related to environmental or accidental contamination;
- group 3: substances for which there is no reason to suspect an endogenous origin.

Substances whose presence in an animal matrix is known or suspected to have an endogenous origin and which can be classified in group 1 are: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone and thiouracil.

Question 2

To answer question 2, substances in group 1 were studied more in detail for combinations substances/species/matrices. Substances of group 2 and group 3 were not studied in detail.

An extended literature study has shown that for the following substances an endogenous origin can be observed:

- in bovine urine: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone and 17 α -boldenone
- in blood of bovine, pigs, poultry, sheep, goats, horses, deer and fish: progesterone, testosterone, estradiol, cortisol and cortisone
- in bovine, porcine and equine urine: prednisolone
- in bovine, porcine and sheep urine: thiouracil.

Several approaches are under development to distinguish endogenous origin and exogenous administration for certain anabolic and/or prohibited substances. The importance of a number of techniques such as the detection of biomarkers and the determination of the isotopic ratio is growing.

Approaches reported in the literature to differentiate endogenous presence from illegal treatment are presented for nortestosterone (nandrolone), boldenone, natural hormones (testosterone, estradiol, progesterone, hydrocortisone), zeranol and taleranol, prednisolone and thiouracil. Few progress is made in the study of the endogenous origin of prednisone and

the actual knowledge does not allow to differentiate with certitude an endogenous origin versus an illegal treatment origin.

Preliminary results of experimental studies enable to provide clues for the differentiation between prednisolone from endogenous origin or as consequence of an illegal treatment in pigs.

Question 3

The presence of prednisolone and thiouracil of endogenous origin in matrices other than urine was investigated to answer question 3. Preliminary experimental studies have shown that the liver could be an interesting matrix to show illegal treatment of prednisolone.

Thiouracil is endogenously present in the thyroid gland. Presently, the Scientific Committee does not have sufficient evidence to be able to differentiate thiouracil from endogenous origin from illegal treatment in a matrix other than urine.

In summary the Scientific Committee recommends to be careful with the interpretation of results of the presence of anabolic and/or prohibited substances with a possible endogenous origin in livestock matrices as long as threshold values are not clearly established.

The Scientific Committee encourages further research i.e. towards the development of analytical methods (eg GC-C-IRMS), biomarkers, and ratio's of substances to distinguish between endogenous origin and exogenous administration.

Sleutelwoorden

Anabole stoffen, verboden stoffen, endogene oorsprong, diersoorten, matrices.

1. Referentietermen

1.1. Vraagstelling

Er wordt aan het Wetenschappelijk Comité gevraagd om een aantal vragen te beantwoorden met betrekking tot de aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen van endogene oorsprong bij voedselproducerende dieren.

Vraag 1 : Voor de stoffen die onderzocht worden, welke zijn degene waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong een endogene oorsprong hebben (stofwisseling, diervoeding, ...)?

Vraag 2 : In welke matrices³ en voor welke dierlijke soorten⁴ (categorieën) kan de aanwezigheid van stoffen van endogene oorsprong worden vastgesteld?

- o Kan men een residuconcentratie bepalen waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de aanwezigheid van endogene oorsprong en illegale behandeling voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort?

Vraag 3 : Kan de aanwezigheid van prednisolone en thiouracil in andere matrices dan urine ook van endogene oorsprong zijn ?

- o Indien ja, kan een residuconcentratie worden vastgelegd waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorsprong (endogeen versus illegale behandeling) voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort ?

1.2. Wettelijke context

Richtlijn 96/23/EG van de Raad van 29 april 1996 inzake controlemaatregelen ten aanzien van bepaalde stoffen en residuen daarvan in levende dieren en in producten daarvan en tot intrekking van de Richtlijnen 85/358/EEG en 86/469/EEG en de Beschikkingen 89/187/EEG en 91/664/EEG.

Richtlijn 96/22/EG van de Raad van 29 april 1996 betreffende het verbod op het gebruik, in de veehouderij, van bepaalde stoffen met hormonale werking en van bepaalde stoffen met thyreostatische werking, alsmede van β -agonisten en tot intrekking van de Richtlijnen 81/602/EEG, 88/146/EEG en 88/299/EEG.

Verordening (EU) nr. 37/2010 van de Commissie van 22 december 2009 betreffende farmacologisch werkzame stoffen en de indeling daarvan op basis van maximumwaarden voor residuen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong.

Overwegende de besprekingen tijdens de werkgroepvergaderingen van 16 maart 2012, 27 augustus 2012, 25 oktober 2012 en 07 december 2012 en de plenaire zitting van 22 februari 2013;

geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :

2. Inleiding

Een resultaat wordt als niet-conform beschouwd als een concentratie wordt aangetoond die groter is dan de beslissingsgrens van de analysemethode (CCalfa) of groter dan of gelijk aan de minimaal vereiste prestatielimiet (MRPL) (voor stoffen met een MRPL). De Europese referentielaboratoria leggen in bepaalde gevallen «drempelwaarden» vast om een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en externe toediening (bijvoorbeeld : thiouracil, 17β -testosteron).

³ Voor de volgende matrices : urine, feces, vet, spier, lever en haar

⁴ Voor de volgende soorten : runderen, varkens, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen, pluimvee, vissen

Onlangs toonden nieuwe wetenschappelijke gegevens over prednisolone en thiouracil aan dat de door de Europese Commissie aanbevolen benadering opnieuw zou moeten worden geëvalueerd.

3. Antwoorden

De antwoorden op de gestelde vragen zijn gegeven in functie van de lijst van de stoffen die werd overgemaakt door de vraagsteller.

3.1. Antwoord op vraag 1 : Voor de stoffen die onderzocht worden, welke zijn degene waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong een endogene oorsprong hebben (stofwisseling, diervoeding)?

Om vraag 1 te beantwoorden definieerde het Wetenschappelijk Comité drie groepen:

- Groep 1: stoffen waarvan bekend is of wordt vermoed dat de endogene oorsprong in zekere mate te maken heeft met de stofwisseling en/of de voeding;
- Groep 2: stoffen waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong kan worden gerelateerd aan een accidentele verontreiniging of een milieuverontreiniging;
- Groep 3: stoffen waarvoor er geen reden is om een endogene oorsprong te vermoeden.

Het Wetenschappelijk Comité deelde de stoffen in één van die drie groepen in, op basis van hun moleculaire structuur, gegevens uit de literatuur en de mening van de deskundigen van de werkgroep.

3.1.1. Stoffen waarvan bekend is of wordt vermoed dat de endogene oorsprong te maken heeft met de stofwisseling en/of de voeding (groep 1)

De stoffen waarvoor de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong bekend is of wordt vermoed van endogene oorsprong te zijn en die men kan indelen in groep 1 zijn : 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenon, 17 α -boldenon, progesteron, 17 β -testosteron, 17 α -testosteron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortison), cortison, prednison, prednisolone en thiouracil.

Deze lijst is niet limitatief. Men kan nog andere natuurlijke hormonen toevoegen zoals estron, dihydroxytestosteron (DHT), en zelfs precursoren zoals DHEA (dehydroepiandrosteron), enz.

Het Wetenschappelijk Comité merkt op dat hogere planten (bijvoorbeeld bloeiende planten) steroïden (bv. androgeen, estrogeen, progesteron) kunnen bevatten. Bladeren van notelaars (*Juglans regia*) die progesteron bevatten werden gebruikt als bijvoeder voor paarden. Het eten van bladeren van een notelaar (*Juglans regia*) zou mede aan de oorsprong kunnen liggen van de aanwezigheid van progesteron bij voedselproducerende dieren. Andere hogere planten kunnen progesteron aanmaken en zouden kunnen worden gebruikt in geneesmiddelen op basis van planten. Bijlage 1 geeft een bondige beschrijving van in planten aanwezige dierlijke hormonen.

3.1.2. Stoffen waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong kan worden gerelateerd aan een accidentele verontreiniging of een milieuverontreiniging (groep 2)

De stoffen ingedeeld in groep 2 zijn: norgestrel, 17 β -ethinylestradiol en chloramfenicol. Norgestrel en 17 β -ethinylestradiol zijn moleculen aanwezig in humane contraceptiva waarvan residuen terug te vinden zijn in het milieu, in het bijzonder in water. Chloramfenicol is een breed spectrum antimicrobiële stof die wordt aangemaakt door sommige bodembacteriën, namelijk *Streptomyces venezuelae* (De Brabander *et al.*, 2009). De aanwezigheid van chloramfenicol (CAP) werd door Stolker *et al.* (2012) vastgesteld in stro in een concentratie van 0,1 tot 11 μ g/kg. Er werd ook CAP aangetroffen in een aantal grasmonsters van diverse geografische oorsprong, in concentraties tot 450 μ g/kg (Berendsen *et al.*, 2010). Men veronderstelt dat de in de bodem door *Streptomyces venezuelae* en andere Actinomycetes aangemaakte CAP via het wortelstelsel door de planten wordt opgenomen.

CAP valt onder tabel 2 van Verordening (EU) nr. 37/2010⁵ (verboden stoffen). Het Wetenschappelijk Comité wijst erop dat de andere stoffen uit tabel 2, namelijk *Aristolochia spp.* en alle bereidingen daarvan, chloroform, chloorpromazine, colchicine, dapson, dimetridazol, metronidazol, nitrofuranen (inclusief furazolidon) en ronidazol eveneens in groep 2 zouden kunnen worden ingedeeld. Het gaat om geneesmiddelen waarvoor men verontreinigingen zou kunnen terugvinden die verband houden met een vroeger medicamenteus gebruik. Die stoffen worden in het kader van dit advies niet bestudeerd

Malachietgroen en leucomalachiet kunnen eveneens in groep 2 worden vermeld. Het Wetenschappelijk Comité bracht reeds een advies uit over de aanwezigheid van malachietgroen en leucomalachiet in gekweekte vis (Advies 22-2007 http://www.favv-afsa.be/wetenschappelijkcomite/adviezen/_documents/ADVIES22-2007_NL_DOSSIER2007-31_000.pdf).

3.1.3. Stoffen waarvoor er geen reden is om een endogene oorsprong te vermoeden (groep 3)

Er zijn geen redenen om een endogene oorsprong te vermoeden voor volgende stoffen: stanozolol en zijn metabooliet 16 β -hydroxy stanozolol, methylboldenon, 17 β -trenbolon, 17 α -trenbolon, ethylestraandiol, methandriol, methylandrostaandiol, 17 β -methyltestosteron, norethandrolon, methylestraandiol, dexamethason, flumethason, fluocinolone acetonide, isoflupredon, methylprednisolone, triamcinolon acetonide, beclomethason, betamethason, clobetasol, cortexon, acetoxypogesteron, caproxyprogesteron, melengestrolacetaat (MGA), altrenogest, delmadinonacetaat, algestonacetofenide, mestranol, dimethylthiouracil, ethylthiouracil, mercaptobenzimidazol, methylthiouracil, propylthiouracil, tapazol, phenylthiouracil, dienestrol, hexestrol en diethylstilbestrol.

De lijst van stoffen in groep 3 is niet volledig. Het bevat alleen de stoffen vermeld in de adviesaanvraag.

3.2. Antwoord op vraag 2a: In welke matrices⁶ en voor welke diersoorten⁷ (categorieën) kan de aanwezigheid van de stoffen van endogene oorsprong worden vastgesteld?

Het Wetenschappelijk Comité rangschikte de volgende stoffen met endogene of vermoedelijke endogene oorsprong in groep 1 (zie vraag 1): 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenon, 17 α -boldenon, progesteron, 17 β -testosteron, 17 α -testosteron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortison), cortison, prednison, prednisolone en thiouracil.

Voor de stoffen van groep 1 werd de literatuur doorgenomen om na te gaan in welke matrix en welke diersoort de aanwezigheid van die stoffen kan worden vastgesteld. De resultaten hiervan worden weergegeven in bijlage 2.

De tabel in bijlage 3 vermeldt de concentraties die werden teruggevonden voor de combinaties van stoffen/diersoorten/matrices. Uit die tabel blijkt dat de meeste stoffen worden opgespoord in urine.

⁵ Verordening (EU) nr. 37/2010 van de Commissie van 22 december 2009 betreffende farmacologisch werkzame stoffen en de indeling daarvan op basis van maximumwaarden voor residuen in levensmiddelen van dierlijke oorsprong

⁶ Voor de volgende matrices : urine, feces, vet, spier, lever

⁷ Voor de volgende diersoorten : runderen, varkens, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen, pluimvee, vissen

3.3. Antwoord op vraag 2b: Kan men een residuconcentratie bepalen waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen aanwezigheid van endogene oorsprong en illegale behandeling voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort ?

3.3.1. Inleiding

Er werden of worden meerdere methoden uitgewerkt om het onderscheid tussen endogene oorsprong en illegale behandeling te bepalen. Het gaat daarbij onder meer om het gebruik van kwalitatieve merkermetabolieten, het vaststellen van drempelconcentraties, de bepaling van steroïdesters, het gebruik van gaschromatografie in combinatie met elementaire koolstofanalyse en opsporing met behulp van isotopenratiomassapectrometrie (GC-C-IRMS), het uitvoeren van longitudinaal onderzoek⁸ en de ontwikkeling van biomerkers met «omics» profiling (Scarth *et al.*, 2012).

Het concept van de methoden die gebruik maken van **merkermetabolieten** bestaat erin een verbinding op te sporen die alleen wordt vastgesteld na toediening van steroïden en niet wordt aangetroffen bij niet behandelde dieren. Voor dergelijke verbindingen volstaat een eenvoudige kwalitatieve bevestigingsanalyse om het illegaal gebruik aan te tonen (Scarth *et al.*, 2012).

De idee om gebruik te maken van **een drempelwaarde** impliceert het meten van de concentratie van een stof waarboven een statistisch significant verschil bestaat tussen de resultaten die worden verkregen bij niet behandelde dieren en de resultaten die worden verkregen bij dieren die wel werden behandeld. Het doel bestaat erin geen hoog percentage « *valse niet-conforme* » resultaten te verkrijgen.

Er zijn heel wat factoren die in rekening moeten worden gebracht om een drempelwaarde te bepalen waarbij een onderscheid kan worden gemaakt tussen endogene oorsprong en illegale behandeling, zoals:

- de diersoort,
- het ras,
- de fysiologische toestand van het dier, de leeftijd, het geslacht, drachtig of niet drachtig zijn,
- de voeding,
- ...

Steroïdesters

De meeste steroïden worden onder de vorm van esters geïnjecteerd en die vorm komt niet van nature voor. De detectie van esters bij dieren is een bewijs van een illegale behandeling (Scarth *et al.*, 2012).

GC-C-IRMS (Gas Chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry)

De meest veelbelovende benadering voor de controle op natuurlijke steroïden bestaat erin het relatieve verschil te meten tussen de verhouding C^{13}/C^{12} van endogene steroïden en die te vergelijken met de C^{13}/C^{12} verhouding van de daarmee overeenstemmende synthetische verbindingen door middel van GC-C-IRMS (Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry) (Balizs *et al.*, 2005; Le Bizec *et al.*, 2009; Janssens *et al.*, 2013). De koolstofisotopensamenstelling van de steroïden hangt sterk af van de oorsprong ervan. Op natuurlijke wijze door het organisme aangemaakte estrogenen en androgenen zijn afgeleid van cholesterol waarbij de C^{13}/C^{12} verhouding ervan rechtstreeks afhangt van de voeding van het dier (Noppe *et al.*, 2008). Die verhouding is in vergelijking met de endogene verbindingen veel kleiner na toediening van steroïden. Bijgevolg kan GC-C-IRMS worden gebruikt om

⁸ Longitudinaal onderzoek is een correlatieve onderzoeksmethode die betrekking heeft op herhaalde observaties van dezelfde variabelen over een langere tijdsperiode. Het longitudinale onderzoek, ook bekend als profilering op basis van subject, werd geïntroduceerd in de sport op basis van de observatie dat intra-individuele variatie lager is dan de inter-individuele variatie. Het longitudinale onderzoek is gebaseerd op de toepassing van een Bayesiaanse statistische benadering waarbij elk individu zijn eigen drempel heeft voor een bepaalde variabele die afhangt van de eerder bepaalde resultaten.

dergelijke verschillen in de C^{13}/C^{12} verhouding vast te stellen (Scarth *et al.*, 2012; Janssens *et al.*, 2013).

Benadering aan de hand van target biomerkers en niet target biomerkers.

De idee achter de «omics» benadering bestaat er in om de cumulatieve biologische effecten (biomerkers) in een dier te kunnen vaststellen via een doelgerichte (predefined profiling) of niet-doelgerichte (algemene profiling of fingerprinting) methode (Scarth *et al.*, 2012). De stof wordt dus niet rechtstreeks opgespoord.

Profiling van biologische matrices met het oog op het aantonen van de biologische effecten van een stof kan worden gerealiseerd door zich doelgericht toe te spitsen op bijzondere verbindingklassen of op niet-doelgerichte wijze door gebruik te maken van algemene strategieën op basis van transcriptomics (mRNA), proteomics (proteïnen) of metabolomics- (metabolieten). Het belangrijkste doel van die methoden bestaat erin de biomerkers te identificeren die samenhangen met het gebruik van anabole stoffen door de profielen van behandelde dieren en onbehandelde controledieren met elkaar te vergelijken. Daarbij zijn biostatistische methoden vereist om de informatie te verwerken (Pinel *et al.*, 2010).

Volgens Nebbia *et al.* (2011) moet nog meer onderzoek worden uitgevoerd voordat potentiële biomerkers op grote schaal kunnen worden ingezet voor screening op het gebruik van illegale groeibevorderaars.

3.3.2. Differentiëring tussen endogene oorsprong en illegale behandeling voor combinaties van stoffen/matrices/diersoort

De in de literatuur vermelde methoden om endogene oorsprong te onderscheiden van illegale behandeling zijn hierna nader omschreven voor nortestosteron (nandrolon), boldenon, natuurlijke hormonen (testosteron, progesteron, oestradiol, hydrocortison), zeranol en taleranol, prednisolone en thiouracil.

Voor prednison is het onderzoek naar de endogene oorsprong nog niet ver gevorderd en is het nog niet mogelijk (een concentratie vast te stellen) een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en illegale behandeling.

Nortestosteron (nandrolon)

Runderen

Pinel *et al.* (2010) suggereerden dat de *abb* (5 α -estrane-3 β ,17 β -diol) en *bab* (5 β -estrane-3 α ,17 β -diol) isomeren zouden kunnen worden beschouwd als biomerkers om het illegale gebruik van nandrolon bij runderen aan te tonen.

Scarth *et al.* (2011) stelden drempelconcentraties in urine voor om illegaal gebruik van nandrolon bij stieren van 7 tot 30 maand oud en vaarzen van meer dan 1 jaar oud te screenen en te bevestigen. Bij die methode worden merkers (17 α -nandrolon, *aba*-estrane-3 α ,17 β -diol) met specifieke concentraties opgespoord.

Kennedy *et al.* (2009) toonden aan dat hoge concentraties nandrolon en 17 α -nandrolon kunnen worden aangetroffen bij runderen die een noodslachting ondergaan na een breuk of tijdens de dracht.

Varkens

Roig *et al.* (2007) toonden aan dat de belangrijkste metabolieten van nandrolon na exogene toediening aan beren worden uitgescheiden in de gebonden fractie (sulfon- en glucorongebonden), terwijl Debruyckere en Van Peteghem (1991) aantoonde dat de in cyclus A gereduceerde metabolieten alleen kunnen worden opgespoord na toediening van nandrolon. Het kan dus mogelijk zijn om een drempelwaarde voor nandrolonsulfaat of een in cyclus A gereduceerde metaboliet vast te leggen als indicator van de exogene toediening van nandrolon bij varkens (bron : Scarth *et al.*, 2009).

Scarth *et al.* (2010) stelden voor om 19-noretiocholanolon als biomarker te gebruiken met drempelwaarden in urine van 7,5 ng/ml voor beren en van 19,2 ng/ml voor zeugen.

De drempelwaarde is niet bruikbaar voor hermafrodiete varkens. De endogene aard van 19-noretiocholanolon bij lage concentraties wijst erop dat eerder een drempelmethode dan een gewoon kwalitatief aantonen van de aanwezigheid van die verbinding noodzakelijk is om de verbinding te kunnen gebruiken als biomarker voor de exogene toediening van nandrolon.

Paardachtigen

Houghton *et al.* (2007) suggereerden dat een drempelwaarde voor nandrolonsulfaat bij paarden efficiënt kan zijn om een onderscheid te maken tussen een illegale behandeling met nandrolon en endogene uitscheiding.

De aanwezigheid van estraandiol bij runderen en paarden zou gebruikt kunnen worden als een methode om te screenen op de toediening van nandrolon (Pinel *et al.*, 2010).

Een drempelwaarde van 45 ng/ml werd vastgesteld voor vrij en gebonden 5 α -estrane-3 α , 17 α -diol, zijnde een metaboliet van nadrolone in urine van mannelijke paarden, met uitzondering van ruinen (Dehennin *et al.*, 2007; IFHA, 2012).

Boldenon

Runderen

Het vaststellen van een verschil tussen de gebonden en vrije vormen van 17 β -boldenon (17 β -Bol) in de urine van runderen is een eerste aanwijzing om een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en illegale behandeling (De Brabander *et al.*, 2004). De aanwezigheid van gebonden vormen van 17 β -Bol in urine van kalveren bewijst dat een illegale behandeling werd toegepast. 17 β -Bol-sulfaat kan worden gebruikt als merker in de urine van kalveren voor het aantonen van een illegale toediening van boldenon, boldenonesters of boldione (Destrez *et al.*, 2009). Dat criterium kan echter niet worden uitgebreid naar andere diersoorten omdat de zwavelgebonden vorm werd aangetroffen in "blanco" urinemonsters van mannelijke paarden door Ho *et al.* (2004) en door Grace *et al.* (2008).

Tabel 1 vat de gegevens over de endogene oorsprong van boldenon samen en geeft de strategie weer die door het laboratorium (LABERCA, Frankrijk) voor de studie van residuen en verontreinigingen in levensmiddelen wordt toegepast om het gebruik van boldenon bij runderen te controleren.

Tabel 1: Endogene oorsprong van boldenon en controlestrategie betreffende het gebruik van boldenon bij runderen (bron : De Brabander *et al.*, 2004)

	Normale situatie	Strategie voor de controle van boldenon
Urine	Sporen* van 17 α -Bol	Gebonden 17 α -Bol > 2 ng/ml Verdenking van illegale behandeling
	Geen 17 β -Bol	Aanwezigheid van gebonden 17 β -Bol op ieder niveau Bevestiging van illegale behandeling
Feces	Vrij niet gebonden 17 α -Bol Vrij niet gebonden 17 β -Bol (in droge feces)	?

*Door middel van GC-MS (Gas Chromatography- Mass Spectrometry)

De belangrijkste metaboliet van boldenon in urine na exogene toediening is 17 α -boldenon.

Paardachtigen

De endogene oorsprong van boldenon werd aangetoond bij hengsten. Er werd voor hengsten een drempelwaarde aangenomen van 15 ng/ml vrij en gebonden 17 β -Bol in de urine (Ho *et al.*, 2004; IFHA, 2012).

Natuurlijke hormonen

Een aantal auteurs (Arts *et al.* (1991), Biddle *et al.* (2007), Scarth *et al.* (2011) en Schmidt *et al.* (2012)) stelden drempelwaarden voor endogene steroïden voor. Heitzmann (1992) legde richtwaarden vast voor de controle op natuurlijke hormonen (progesteron, estradiol, testosteron) bij runderen.

Wat endogene steroïden betreft is het moeilijk om een onderscheid te maken tussen de aanwezigheid van endogene oorsprong ervan en de aanwezigheid die een gevolg is van een illegaal gebruik als groeibevorderaar, omdat thans geen enkel kwantitatief criterium (bijvoorbeeld een drempelwaarde) bestaat op basis waarvan op betrouwbare wijze een dergelijk onderscheid kan worden gemaakt (Schmidt *et al.*, 2012). Er werden verscheidene methoden ontwikkeld om het aantonen van illegale behandeling in het geval van endogene steroïden te vergemakkelijken waarbij kwalitatieve criteria worden gebruikt. Er wordt daarbij onder meer gebruik gemaakt van GC-C-IRMS (Buisson *et al.*, 2005) en van de opsporing van intacte steroïdesters in de haren (Stolker *et al.*, 2009).

Testosteron

Schmidt *et al.* (2012) stelden voorlopige drempelwaarden voor 17 α -testosteron (17 α -T) en 17 β -testosteron (17 β -T) voor in urine en plasma van mannelijke kalveren en meststieren, en voor 17 α -T in plasma van vrouwelijke kalveren.

Scarth *et al.* (2011) stelden drempelconcentraties in urine voor, voor het screenen en bevestigen van het illegale gebruik van testosteron bij stieren van 7 tot 30 maand oud en bij vaarzen ouder dan 1 jaar. De strategie bestaat in het opsporen van de merker *bab*-androstaandiol (5 β -Androstaan-3 α , 17 β -diol) in specifieke concentraties.

Het is belangrijk erop te wijzen dat de testosterongehalten in het bloed verschillen al naargelang de leeftijd (puberteit), het ras en het tijdstip van staalname gedurende de dag (nycthemerale variatie).

In de USA zijn de toegelaten endogene testosterongehalten bij vaarzen gelijk aan 0,64 μ g/kg in de spieren, 2,6 μ g/kg in het vet, 1,9 μ g/kg in de nieren en 1,3 μ g/kg in de lever (EFSA, 2007).

De door Heitzman (1992) voorgestelde bovengrenzen voor testosteron in plasma van runderen zijn gelijk aan 0,5 ng/ml voor niet-drachtige vrouwelijke dieren, 10 ng/ml voor mannelijke dieren jonger dan 6 maand en 30 ng/ml voor mannelijke dieren ouder dan 6 maand.

Bij paarden (ruinen en merries) konden op basis van de bestudeerde populaties voor vrij en gebonden testosteron drempelwaarden in de urine worden vastgesteld van respectievelijk 20 en 55 ng/ml met het oog op de controle op exogene toediening van dit steroïd (IFHA, 2012). Er bestaat geen drempelwaarde voor niet-gecastreerde mannelijke paarden omdat de door die dieren aangemaakte concentraties hoog en veranderlijk zijn (Scarth *et al.*, 2009).

Progesteron

Scarth *et al.* (2011) stelden drempelconcentraties in urine voor, voor het screenen en bevestigen van illegaal gebruik van progesteron bij stieren van 7 tot 30 maand oud en voor vaarzen van meer dan 1 jaar oud. De strategie bestaat in het opsporen van de merker *aba*-pregnaandiol in specifieke concentraties.

In de USA zijn de maximumwaarden voor residuen (MRL) voor endogeen progesteron bij stieren en kalveren gelijk aan 3 μ g/kg in de spieren, 12 μ g/kg in het vet, 9 μ g/kg in de nieren en 6 μ g/kg in de lever. Voor lammeren bedraagt de MRL respectievelijk 3 μ g/kg in de spieren en 15 μ g/kg in het vet, de nieren en de lever (EFSA, 2007).

Estradiol

Biddle *et al.* (2007) stelden op basis van een niet-parametrische statistische evaluatie actiegrenzen (met een kans op vals positieve resultaten van 1 op 1000) voor van 1,6 en 2,7 ng/ml voor 17 α -estradiol in urine van mannelijke en vrouwelijke runderen, en van 0,04 en 0,044 ng/ml voor 17 β -estradiol in urine van mannelijke en vrouwelijke runderen. Er werd een actiegrens van 0,020 ng/ml voorgesteld voor 17 α - en 17 β -estradiol in serum van mannelijke runderen. Voor serum van vrouwelijke runderen werd een actiegrens voorgesteld van respectievelijk 0,04 en 0,02 ng/ml voor 17 α - en 17 β -estradiol.

Scarth *et al.* (2011) stelden drempelconcentraties in urine voor, voor het screenen en bevestigen van het illegaal gebruik van estradiol bij stieren van 7 tot 30 maand oud en vaarzen van meer dan 1 jaar oud. De strategie bestaat in het opsporen van de merker 17 α -estradiol in specifieke concentraties.

Het is belangrijk erop te wijzen dat de concentratie van estradiol in plasma verschilt naargelang het geslacht, de leeftijd en de fysiologische toestand van het dier (oestrus, anoestrus, dracht).

Hydrocortison

De IFHA (International Federation of Horseracing Authorities, 2012) legde een drempelwaarde van 1 μ g/ml vast voor de aanwezigheid van hydrocortison in de urine van paarden.

Zeranol/taleranol

Zeranol kan *in vivo* worden gevormd vanuit zearalenon en α -zearalenol. Dit zijn oestrogene mycotoxines geproduceerd door door *Fusarium spp.*. *Fusarium graminearum* veroorzaakt fusariumrot in maïs, tarwe en gerst en ook in voedergrassen. De aanwezigheid van residuen van zeranol kan een gevolg zijn van de inname van diervoeder of gras dat verontreinigd is met *Fusarium* schimmels (Dickson *et al.*, 2009).

Kennedy *et al.* (1998) veronderstelden dat de gelijktijdige vaststelling van zeranol, taleranol en toxinen van *Fusarium ssp.* een criterium zou kunnen zijn voor een milieuverontreiniging met toxinen van *Fusarium ssp.*. Volgens Launay *et al.* (2004) kan de hoeveelheid zeranol/taleranol samenhangen met de totale hoeveelheid toxinen van *Fusarium ssp.* volgens een rechtlijnige regressie met een voorspellingsinterval van 99%. Dat doet veronderstellen dat de aanwezigheid van zeranol in de monsters een gevolg kan zijn van de *in vivo* metabolisatie van toxinen van *Fusarium ssp.*

De MRL's voor zeranol bij runderen vastgelegde door het JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) zijn 2 μ g/kg in de spieren en 10 μ g/kg in de lever. Diezelfde MRL-waarden werden vastgelegd in Canada en Japan. In de USA is de MRL gelijk aan 20 μ g/kg in eetbare weefsels van schapen en is er geen tolerantie voor weefsels van runderen. In Australië is de MRL voor vlees gelijk aan 5 μ g/kg en 20 μ g/kg voor eetbaar slachtafval (EFSA, 2007).

Prednisolone

Runderen

Volgens Dusi *et al.* (2012) is het thans moeilijk om een onbetwistbare drempelconcentratie vast te stellen voor prednisolone van endogene oorsprong in de urine van runderen. Dat is te wijten aan de zeer grote variatie in het gehalte aan glucocorticoïden, dat samenhangt met het welzijn van het dier en met het 24-uursritme van de ACTH-afscheiding. De auteurs stellen voor een bijkomende parameter, namelijk de aanwezigheid van bepaalde metabolieten of de verhouding tussen cortisol (of cortison) en prednisolone, te bestuderen om de officiële controlediensten in staat te stellen de juiste beslissingen te nemen met betrekking tot de oorsprong van de aanwezigheid van prednisolone in urine (endogeen of als gevolg van een behandeling).

Volgens Vincenti *et al.* (2012) is meer onderzoek vereist om het verband tussen stresstoestanden, de afscheiding van cortisol en de aanwezigheid van prednisolone in de

urine van runderen te bevestigen. Het gebruik van de prednisolone/cortisol verhouding in urine als mogelijk middel om een onderscheid te maken tussen exogene toediening en endogene aanwezigheid zou een veelbelovende ontwikkeling zijn in het onderzoek.

Sterk *et al.* (2012) stellen voor om bij de reglementaire controle een drempelwaarde van 5 µg/L te gebruiken voor detectie van illegale aanwezigheid van prednisolone in de urine van runderen (kalveren en volwassen runderen). Er wordt opgemerkt dat Andersen *et al.* (2008) de aanwezigheid van prednisolone in urine vaststelden in een concentratie van 13 µg/L.

Volgens Leporati *et al.* (2012) kan de opsporing en kwantificering van 20β-dihydroprednisolone een mogelijk middel zijn om het vraagstuk van de endogene versus exogene oorsprong van prednisolone bij runderen op te lossen. De metabooliet kan een nieuwe merker worden waarmee alle illegale behandelingen kunnen worden opgespoord.

Het is belangrijk dat verder onderzoek zou worden uitgevoerd om merkers of andere middelen (bijvoorbeeld verhoudingen) te identificeren om het herhaald illegaal toepassen van kleine dosissen te kunnen opsporen.

Varkens

Het FAVV voerde in 2012 een controleactie uit (PREDPIG) op de aanwezigheid van prednisolone in varkensurine in het slachthuis. Daarbij werden 393 urinemonsters geanalyseerd. De aanwezigheid van prednisolone werd vastgesteld in 73% van de in het slachthuis verzamelde urinemonsters. 9,9% van de monsters hadden een concentratie boven 2 ng/ml. De prednisoloneconcentraties varieerden van <0,5 ng/ml tot 7,8 ng/ml. Er kon na evaluatie van de verschillende parameters (slachthuis, verdovingswijze duur van het traject, geslacht, slachtgewicht, gemiddeld gewicht van de partij en maagvulling) geen enkel statistisch significant effect worden aangetoond. Alle levermonsters (van varkens waarvoor prednisolone was gevonden in de urine) waren negatief.

Uit een beperkte ringtest, uitgevoerd op initiatief van het FAVV in 2012 met vijf laboratoria, voor de kwantitatieve bepaling van prednisolone in varkensurine is gebleken dat de bepaling van prednisolone gepaard gaat met een grote meetonzekerheid (gemiddeld 50%) en dat er aanzienlijke bias (van -17% tot +18%) bestaat voor sommige methoden. Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan dat de analysemethoden worden gestandaardiseerd en dat referentiemateriaal wordt aangemaakt.

Een beperkte experimentele studie op 10 varkens (van ongeveer 100 kg) werd recent uitgevoerd in het Centre d'Economie Rurale (CER, Marloie). Urinemonsters werden meerdere malen per dag verzameld bij onbehandelde dieren gedurende een aanpassingsperiode van 2 weken. Daarna werden de varkens verdeeld in 2 groepen. Vijf dieren werden intramusculair behandeld met 100 mg prednisolone (2,5% van VMD) per dier terwijl aan de andere 5 dieren een intramusculaire injectie met 5 mg van een analoog van ACTH (Synacthen®) per dier werd toegediend. De bedoeling van deze laatste groep was om de bijnierschors te stimuleren en aldus een situatie van stress na te bootsen. De varkens werden sequentieel geslacht na de behandeling, als volgt beschreven. In elke groep werd een dier gedood 2 u, 26 u, 50 u, 74 u en 98 u na behandeling. Urine- en levermonsters werden verzameld en geanalyseerd door UPLC-MS/MS na extractie en zuivering van de residuen met immunoaffiniteit.

In alle urinemonsters van onbehandelde varkens (n = 125) werd prednisolone aangetoond aan een concentratie van 0,01 tot 2,8 ng/ml en cortisol aan een concentratie van 1,8 tot 352 ng/ml. Een goede correlatie (correlatiecoëfficiënt van 0,81) tussen de concentratie van prednisolone en cortisol werd vastgesteld bij niet-behandelde dieren. Er werd ook vastgesteld dat de concentratie van cortisol gerelateerd is met het niveau van stress (Möstl *et al.*, 2002). Prednisolone werd niet gedetecteerd in levermonsters van onbehandelde dieren. Daarentegen werden lage cortisol waarden in de grootte orde van 0,27 tot 3,6 ng/g gemeten in lever.

Bij dieren behandeld met prednisolone, werd een zeer hoge prednisolone concentratie gemeten in urine (in de orde van µg/ml) en dit kort (2 uur) na behandeling. Deze hoge prednisolone waarde gaat vergezeld met een laag niveau van cortisol. In de daaropvolgende dagen, daalt de concentratie van prednisolone, terwijl vanaf de tweede dag, het gehalte aan

cortisol toeneemt. Prednisolone wordt nog aangetroffen 4 tot 5 dagen na de behandeling met een concentratie in de grootte orde van ng/ml.

Levermonsters van dieren behandeld met ACTH vertonden lage concentraties van prednisolone (maximum waargenomen: 0,18 ng/g) en een cortisol concentratie in de grootteorde van 2 tot 5 ng/g. Bij dieren behandeld met prednisolone werd prednisolone tot 8 ng/g en cortisol minder dan 2 ng/g waargenomen.

Vastleggen van een drempelwaarde voor prednisolone in urine van varkens

Het is niet eenvoudig om, op basis van de huidige kennis, een onbetwistbare drempelwaarde voor prednisolone in urine van varkens vast te leggen.

Er worden geregeld lage concentraties prednisolone gemeten in de urine van geslachte varkens. De stimulatie van de bijnierschors als gevolg van stress en de excretie van cortisol zouden hier aan de basis kunnen liggen evenals de illegale toediening van lage dosissen prednisolone. Meer onderzoek is vereist om dit uit te klaren.

Een drempelwaarde van 2 ppb (ng/ml) werd destijds aangenomen in het kader van de harmonisatie van de dunne laag chromatografie methode (TLC - Thin layer chromatography) en was van algemene toepassing voor de detectie van exogene stoffen.

Het referentielaboratorium van de Europese Unie (European Union Reference Laboratory – EURL) stelt sinds 2012 een (voorlopige) drempelwaarde voor prednisolone voor van 5 ng/ml in varkensurine. Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat deze waarde van 5 ng/ml als uitgangspunt kan gebruikt worden voor het vastleggen van een drempelwaarde in urine bij varkens, in acht genomen dat deze waarde wordt bevestigd door wetenschappelijke studies die op grotere schaal worden uitgevoerd. Evenwel raadt het Wetenschappelijk Comité aan om bij het vastleggen van een drempelwaarde eveneens rekening te houden met de meetonzekerheid die kan oplopen tot 50% zoals werd aangetoond door een ringtest georganiseerd door het FAVV.

Een andere methode voor het interpreteren van de oorsprong van de aanwezigheid van prednisolone in urine van varkens bestaat erin om de verhouding van prednisolone/cortisol te bepalen en aldus rekening te houden met de gevolgen van stress op de uitscheiding van corticosteroiden in de urine. Inderdaad, uit de beperkte experimenten uitgevoerd aan het CER (zie hoger) is een hoge correlatie gebleken tussen concentratie van prednisolone en cortisol in urine bij onbehandelde dieren alsook bij met prednisolone behandelde dieren die bemonsterd werden tot 2 dagen na de behandeling. Nadien was deze correlatie minder betrouwbaar als gevolg van een sterke toename van het cortisol gehalte (wegens feed-back effect van de bijnier) terwijl nog steeds prednisolone kon worden gedetecteerd aan lage dosis als gevolg van de behandeling. De praktische toepassing van de gelijktijdige meting van prednisolone en cortisol in de urine ter opsporing van illegaal prednisolone gebruik bij varkens waarvan de historiek niet gekend is, blijkt aldus moeilijk.

Het Wetenschappelijk Comité is daarentegen van mening dat lever een betrouwbaarder doelorgaan is dan urine voor opsporing van illegale prednisolone toediening. Uit de beperkte proeven aan CER is immers gebleken dat prednisolone niet wordt gedetecteerd in de lever bij niet behandelde dieren terwijl het wel wordt gedetecteerd in kleine hoeveelheden in de lever bij behandelde dieren (zie punt 3.4).

Het Wetenschappelijk Comité is tevens van mening dat het belangrijk is om onderzoek naar biomerkers voort te zetten om het herhaald illegaal gebruik van kleine dosissen prednisolone te kunnen opsporen.

Thiouracil

Volgens het guidance paper (2007) van de CRL (Community Reference Laboratories) werd een voorlopige 'recommended value' van 10 µg/L voorgesteld voor thiouracil (TU) in urine en in de schildklier. Aanwezigheid van hogere concentraties TU werd vastgesteld in de urine van kalveren (tot 34 µg/L) en in urine van schapen (tot 14 µg/L).

Le Bizec *et al.* (2011) stelden drempelwaarden voor om het onderscheid tussen conforme en verdachte monsters te maken op basis van de natuurlijke distributie van TU. De voorgestelde waarden, met een betrouwbaarheidsniveau van 95% en 99%, zijn gelijk aan 5,7 en 9,1 µg/L voor mannelijke volwassen runderen (6-24 maand), 3,1 en 8,1 µg/L voor vrouwelijke volwassen runderen (6-24 maand), 7,3 en 17,7 µg/L voor kalveren (<6 maand), 3,9 en 8,8 µg/L voor vrouwelijke runderen (>24 maand), 2,9 en 4,1 µg/L voor varkens en 12,9 en 14,3 µg/L voor schapen. Men moet voorzichtig omgaan met die voorgestelde waarden omdat de resultaten voor thiouracil in de studie van Le Bizec *et al.* (2011) geen normale distributie vertonen (advies 12-2011 van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV).

Het Wetenschappelijk Comité raadde in zijn advies 12-2011 aan om voor analyseresultaten van meer dan 10 µg/L TU aan te geven dat het resultaat niet conform is en stelde voor om een grondig onderzoek te doen bij de andere dieren (urinemonsters nemen) en naar de voeders in het bedrijf. Bij analyseresultaten voor TU van meer dan 100 µg/L moet worden aangenomen dat het dier op illegale wijze werd behandeld (Advies 12-2011 van het Wetenschappelijk Comité van het FAVV).

Tevens moet worden onderstreept dat de robuustheid van de methode om TU te kwantificeren en de controle op de stabiliteit van de residuen ervan de belangrijkste twee problemen zijn die eerst moeten worden opgelost voordat een referentiepunt voor actie efficiënt en ondubbelzinnig kan worden toegepast (Le Bizec *et al.*, 2011). De studie van Le Bizec *et al.* (2011) wijst op de dringende nood aan een bevestigingscriterium dat steunt op de ontdekking van een discriminerende biomarker of de meting van de isotopenverhouding. Er zouden twee strategieën moeten worden bekeken voor de ontdekking van biomarkers, al naargelang de oorsprong van TU, namelijk oorsprong vanuit de voeding of oorsprong na illegale behandeling. De biomarkers die hiervoor van nut zijn, zouden dan respectievelijk plantaardige precursoren van TU of directe metabolieten (fase I of II) van exogeen toegediend TU betreffen.

EURL stelde vast dat de endogene TU-gehalten kunnen verschillen naargelang de leeftijd en de voeding. Voorzichtigheid bij het interpreteren van de resultaten is aan te raden.

3.4. Vraag 3 : Kan de aanwezigheid van prednisolone en thiouracil in andere matrices dan urine ook van endogene oorsprong zijn ? Indien ja, kan een residuconcentratie worden vastgelegd waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorsprong (endogene versus illegale behandeling) voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort?

Experimentele studies op de aanwezigheid van prednisolone in varkenslevers werden recent uitgevoerd in het CER. Prednisolone werd gemeten in de lever 2 uur (eerste bemonstering) na toediening van prednisolone. Prednisolone was nog aanwezig tot 98 uur (laatste bemonstering) na toediening. Prednisolone werd niet gedetecteerd in levermonsters (n = 22) bij controle dieren.

Lever wordt meer gebruikt in Europa dan urine voor de controle van het gebruik van corticosteroiden. Recente experimenten in CER hebben aangetoond dat de lever een zeer interessante matrix lijkt te zijn om illegale behandeling van prednisolone aan te tonen.

Thiouracil is ook endogeen aanwezig in de schildklier. Er wordt aangestipt dat het correct bemonsteren van de schildklier niet eenvoudig is. Sporadisch werd ook thiouracil gevonden in vlees.

Het Wetenschappelijk Comité beschikt thans niet over voldoende elementen om voor thiouracil een onderscheid te kunnen maken tussen endogene aanwezigheid en illegale behandeling in een andere matrix dan urine.

4. Conclusies

Drie vragen werden gesteld aan het Wetenschappelijk Comité in verband met de aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen van endogene oorsprong bij voedselproducerende dieren, met name:

- vraag 1 : Voor de stoffen die onderzocht worden door het FAVV, welke zijn degene waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong een endogene oorsprong hebben (stofwisseling, diervoeding, ...)?
- vraag 2 : In welke matrices⁹ en voor welke dierlijke soorten¹⁰ (categorieën) kan de aanwezigheid van stoffen van endogene oorsprong worden vastgesteld?
 - o Kan men een residuconcentratie bepalen waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de aanwezigheid van stoffen van endogene oorsprong en afkomstig van een illegale behandeling voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort?
- vraag 3 : Kan de aanwezigheid van prednisolone en thiouracil in andere matrices dan urine ook van endogene oorsprong zijn ?
 - o Indien ja, kan een residuconcentratie worden vastgelegd waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de oorsprong (endogeen versus illegale behandeling) voor een aantal combinaties van stof/matrix/diersoort ?

Het Wetenschappelijk Comité nam de literatuur door om de gestelde vragen te beantwoorden.

Om op de eerste vraag te beantwoorden, heeft het Wetenschappelijk Comité de stoffen uit de adviesaanvraag in in drie groepen ingedeeld:

- groep 1: stoffen waarvan bekend is of wordt vermoed dat de endogene oorsprong in zekere mate te maken heeft met de stofwisseling en/of de voeding;
- groep 2: stoffen waarvan de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong kan worden gerelateerd aan een accidentele verontreiniging of een milieuverontreiniging;
- groep 3: stoffen waarvoor er geen reden is om een endogene oorsprong te vermoeden.

De stoffen waarvoor de aanwezigheid in een matrix van dierlijke oorsprong bekend is of waarvan er wordt vermoed dat ze van endogene oorsprong zijn en die men kan indelen in groep 1 zijn : 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenon, 17 α -boldenon, progesteron, 17 β -testosteron, 17 α -testosteron, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortison), cortison, prednison, prednisolone en thiouracil.

Om op de tweede vraag te beantwoorden, werden de stoffen van groep 1 meer in detail bestudeerd voor een aantal combinaties van stoffen/diersoorten/matrices. De stoffen van groep 2 en 3 werden niet in detail bestudeerd.

Uit een uitgebreide literatuurstudie is gebleken dat bij de volgende stoffen een endogene oorsprong kan worden vast gesteld:

- in urine van runderen: 17 β -nortestosteron, 17 α -nortestosteron, 17 β -boldenone en 17 α -boldenone
- in bloed bij runderen, varkens, pluimvee, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen en vissen: progesteron, testosteron, estradiol, cortisol en cortison
- in urine van meerdere diersoorten: zeranol en taleranol
- in urine van runderen, varkens en paarden: prednisolone
- in urine van runderen, varkens en schapen: thiouracil.

Er zijn meerdere methoden in ontwikkeling om een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en exogene toediening. Het belang van een aantal technieken zoals onderzoek naar biomerkers en methoden die gebruik maken van de isotopenverhouding neemt gestaag toe.

⁹ Voor de volgende matrices : urine, feces, vet, spier, lever en haar

¹⁰ Voor de volgende soorten : runderen, varkens, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen, pluimvee, vissen

De in de literatuur beschreven methoden voor het discrimineren tussen endogene oorsprong en illegale toediening werden gerapporteerd voor nortestosteron (nandrolon), boldenon, natuurlijke hormonen (testosteron, progesteron, oestradiol, hydrocortison), zeranol en taleranol, prednisolone en thiouracil. Het onderzoek naar de endogene oorsprong van prednisone is nog maar weinig gevorderd en de huidige kennis biedt niet de mogelijkheid om met zekerheid een onderscheid te maken tussen endogene oorsprong en illegale behandeling.

De preliminaire resultaten van een experimentele studie uitgevoerd bij varkens laten toe om pistes aan te reiken om een onderscheid te kunnen maken tussen de aanwezigheid van prednisolone van endogene oorsprong of als gevolg van een illegale behandeling.

De aanwezigheid van prednisolone en thiouracil van endogene oorsprong in andere matrices dan urine werd onderzocht om vraag 3 te beantwoorden. Preliminaire experimentele studies hebben aangetoond dat de lever een interessante matrix kan zijn om illegale behandeling met prednisolone aan te tonen.

Thiouracil is endogeen aanwezig in de schildklier. Het Wetenschappelijk Comité beschikt thans niet over voldoende elementen om voor thiouracil een onderscheid te kunnen maken tussen endogene aanwezigheid en illegale behandeling in andere matrices dan urine.

5. Aanbevelingen

Het Wetenschappelijk Comité beveelt aan om voorzichtig te zijn bij het interpreteren van de resultaten van aanwezigheid van anabole en/of verboden stoffen met mogelijke endogene oorsprong in matrices van nutsdieren zolang drempelwaarden niet eenduidig werden vastgelegd.

Het Wetenschappelijk Comité moedigt de ontwikkeling aan van analysemethoden (bijvoorbeeld GC-C-IRMS), de opsporing van biomerkers en de bepaling van de verhoudingen van de concentraties tussen stoffen waarmee een onderscheid kan gemaakt worden tussen endogene oorsprong en exogene toediening.

Het Wetenschappelijk Comité raadt aan om referentiemateriaal te ontwikkelen voor prednisolone.

Voor het Wetenschappelijk Comité,

Prof. Em. Dr. Pharm. C. Van Peteghem (Get.)
Voorzitter

Brussel, 13/03/2013

Referenties

- Andersen J. H., Hansen L. G., Pedersen M. 2008. Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 617, 216–224.
- Arts C. J., van Baak M.J., den Hartog J. M. 1991. Control system for detection of the illegal use of naturally occurring steroids in calves. *Journal of chromatography*, 564 (2), 429-444.
- Balitz G., Jainz A., Horvatovich P. 2005. Investigation of the feeding effect on the ¹³C/¹²C isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067, 323–330.
- Berendsen B., Stolker L., de Jong J., Nielen M., Tserendorj E., Sodnomdarjaa R., Cannavan A., Elliott C. 2010. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1955–1963.
- Biddle S., Teale P., Robinson A., Bowman J., Houghton E. 2007. Gas chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry analysis to determine natural and post-administration levels of oestrogens in bovine serum and urine. *Analytica Chimica Acta*, 586, 115-121.
- Buisson C.C., Hebestreit M., Preiss Weigert A., Heinrich K., Fry H., Flenker U., Banneke S., Prevost S., Andre F., Schaenzer W., Houghton E., Le Bizec B. 2005. Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17β-estradiol administration to cattle. *Journal of Chromatography A*, 1093 69–80.
- De Brabander H. F., Poelmans S., Schilt R., Stephany R. W., Le Bizec B., Draisci R., Sterk S. S., van Ginkel L. A., Courtheyn D., Van Hoof N., Macri A., De Wasch K. 2004. Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21 (6), 515–525.
- De Brabander H. F., Noppe H., Verheyden K., Vanden Bussche J., Wille K., Okerman L., Vanhaecke L., Reybroeck W., Ooghe S., Croubels S. 2009. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7964-7976.
- Debruyckere G., Van Peteghem C. 1991. Detection of 19-nortestosterone and its urinary metabolites in miniature pigs by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 564, 393–403.
- Dehennin L., Bonnaire Y., Plou P. 2007. Detection of nandrolone administration to the entire male horse by a provisional concentration threshold for urinary oestradiol determined by gas chromatography–mass spectrometry. *Equine Veterinary Journal*, 39, 186–188.
- Destrez B., Bichon E., Rambaud L., Courant F., Monteau F., Pinel G., Antignac J.-P., Le Bizec B. 2009. Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle 2. Direct measurement of 17b-boldenone sulpho-conjugate in calf urine by liquid chromatography–high resolution and tandem mass spectrometry. *Steroids*, 74, 803–808.
- Dickson L. C., Costain R., McKenzie D., Fesser A. C. E., Macneil J. D. 2009. Quantitative Screening of Stilbenes and Zeranol and Its Related Residues and Natural Precursors in Veal Liver by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6536–6542.
- Dusi G., Arioli F., Ghidelli V., Casati A., Hathaway T., Pompa G., Bertocchi L. 2012. Investigation on the origin of prednisolone residue in cow urine. *Proceedings of EuroResidue VII*, 297-302.

EFSA, 2007. Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission related to hormone residues in bovine meat and meat product. The EFSA Journal, 510, 1-62.

Grace P., Drake E., Teale P., Houghton E. 2008. Quantification of 19-nortestosterone sulphate and boldenone sulphate in urine from male horses using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 22, 2999–3007.

Heitzman R. J. 1992. Residues in food-producing animals and their products: Reference materials and methods. Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture, Veterinary drug residues. EUR 14126.

Ho E.N.M., Yiu K.C.H., Tang F.P.W., Dehennin L., Plou P., Bonnaire Y., et al. 2004. Detection of endogenous boldenone in the entire male horses. Journal of Chromatography B, 808, 287–294.

Houghton E., Teale P., Dumasia M.C. 2007. Studies related to the origin of C18 neutral steroids isolated from extracts of urine from the male horse: the identification of urinary 19-oic acids and their decarboxylation to produce estr- 4-ene-17_β-ol-3-one (19-nortestosterone) and ester-4-ene-3,17-dione (19-norandrost-4-ene-3,17-dione) during sample processing. Analytica Chimica Acta, 586, 196–207.

IFHA (International Federation of Horseracing Authorities) 2012. International agreement on breeding racing and wagering. http://www.horseracingintfed.com/resources/2012_choose_eng.pdf

Kennedy D. G., Hewitt S. A., McEvoy J. D. G., Currie J. W., Cannavan A., Blanchflower W. J., Elliot C. T. 1998, Zeranol is formed from *Fusarium spp.* toxins in cattle *in vivo*. Food Additives and Contaminants, 15, 393–400.

Kennedy D. G., Shortt H. D., Crooks S. R.H., Young P. B., Price H. J., Smyth W. G., Hewitt S. A. 2009. Occurrence of α - and β -nortestosterone residues in the urine of injured male cattle. Food Additives and Contaminants, 26 (5), 683–691.

Janssens G., Courtheyn D., Mangelinckx S., Prévost S., Bichon E., Monteau F., De Poorter G., De Kimpe N., Le Bizec B. 2013. Use of Isotope Ratio Mass Spectrometry to differentiate between endogenous steroids and synthetic homologues in cattle: a review. Analytica Chimica Acta, *article in press*

Launay F.M., Ribeiro L., Alves P., Vozikis V., Tsitsamis S., Alfredsson G., Sterk S. S., Blokland M., Iltia A., Lövgren T., Tuomola M., Gordon A., Kennedy D. G. 2004. Prevalence of zeranol, taleranol and *Fusarium spp.* toxins in urine: implications for the control of zeranol abuse in the European Union. Food Additives and Contaminants, 21 (9), 833–839.

Le Bizec B., Pinel G., Antignac J.-P. 2009. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1216, 8016–8034.

Le Bizec B., Bichon E., Deceuninck Y., Prévost S., Monteau F., Antignac J.-P., Dervilly-Pinel G. 2011. Toward a criterion for suspect thiouracil administration in animal husbandry. Food additives and Contaminants, 28 (7), 840-847.

Leporati M., Capra P., Cannizzo F.T., Vincenti M., Biolatti B. 2012. Evaluation of prednisolone metabolism in calves. Proceedings of EuroResidue VII, 883-888.

Möstl E., Palme R. 2002. Hormones as indicators of stress. Domestic Animal Endocrinology 23, 67–74.

Nebbia C., Urbani A., Carletti M., Gardini G., Balbo A., Bertarelli D., Girolami F. 2011. Novel strategies for tracing the exposure of meat cattle to illegal growth-promoters The Veterinary Journal 189, 34–42.

Pinel G., Weigel S., Antignac J.-P., Mooney M.H., Elliott C., Nielen M.W.F., Le Bizec B. 2010. Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. Trends in analytical chemistry, 29 (11), 1269-1280.

Roig M., Segura J., Ventura R. 2007. Quantitation of nandrolone metabolites in boar and horse urine by gas chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 586, 184–195.

Scarth J., Akre C., van Ginkel L., Le Bizec B., De Brabander H., Korth W., Points J., Teale P., Kay J. 2009. Presence and metabolism of endogenous androgenic–anabolic steroid hormones in meat producing animals: a review. Food Additives and Contaminants, 26 (5), 640–671.

Scarth J. P., Clarke A., Hands J., Teale P., Mill A. C., Macarthur R., Kay J., De Brabander H. 2010. Validation of an Analytical Biomarker Approach for the Detection of Nandrolone Abuse in the Porcine. Chromatographia, 72 (3/4), 2097-305.

Scarth J., Clarke A., Teale P., Mill A., Macarthur R., Kay J. 2011. Detection of endogenous steroid abuse in cattle: results from population studies in the UK. Food Additives and Contaminants, 28 (1), 44-61.

Scarth J. P., Kay J., Teale P., Akre C., Le Bizec B., De Brabander H.F., Vanhaecke L., Van Ginkel L., Points J. 2012. A review of analytical strategies for the detection of 'endogenous' steroid abuse in food production. Drug Testing and Analysis, 4 (S1), 40-49.

Schmidt K. S., Stachel C. S., Kunath K., Uhlig S., Gowik P. 2012. Statistical evaluation of levels of endogenous steroids in bovine animals. Proceedings of EuroResidue VII, 149-154.

Sterk S.S., de Rijke E., Rijk C. W., Zoontjes P. W., Samson D., van Ginkel L.A. 2012. Prednisolone a new natural occurring steroid? Proceedings of EuroResidue VII, 401-408.

Stolker A. A. M., Groot M. J., Lasaroms J. J. P., Nijrolder A. W. J. M., Blokland M. H., Riedmaier I., Becker C., Meyer H. H. D., Nielen M. W. F. 2009. Detectability of testosterone esters and estradiol benzoate in bovine hair and plasma following pour-on treatment Analytical Bioanalytical Chemistry 395, 1075–1087.

Vincenti M., Leporati M., Capra P., Gatto S., Attucci A., Barbarino G., Nebbia C. 2012. A field survey on the presence of prednisolone and prednisole in urine samples from untreated cows. Food Additives and contaminants, 29 (12), 1893-1900.

Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden:

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, 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, C. Van Peteghem

Belangenconflict

Er werden geen belangenconflicten vastgesteld.

Dankbetuiging

Het Wetenschappelijk Comité dankt de Stafdirectie voor risicobeoordeling en de leden van de werkgroep voor de voorbereiding van het ontwerpadvies. De werkgroep was samengesteld uit de volgende leden :

Leden van het Wetenschappelijk Comité	Delahaut P. (verslaggever), Scippo M.-L., Van Peteghem C., Daeseleire E. (Sci Com 2009-2013), Maghuin-Rogister G. (Sci Com 2009-2013)
---------------------------------------	---

Externe experts	De Backer P. (Ugent), Vanhaecke L. (Ugent)
-----------------	--

Wettelijk kader van het advies

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

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

Huishoudelijk reglement, bedoeld in artikel 3 van het koninklijk besluit van 19 mei 2000 betreffende de samenstelling en de werkwijze van het Wetenschappelijk Comité ingesteld bij het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen, goedgekeurd door de Minister op 09 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.