



### **Amendement aan het ADVIES 07-2013**

**Betreft: Aanwezigheid van residuen van prednisolone van endogene oorsprong in urine van varkens (Dossier SciCom 2012/07)**

Amendement goedgekeurd door het Wetenschappelijk Comité op 21 november 2014.

### **Samenvatting**

Het amendement aan het advies 07-2013 heeft als doel om de gegevens over de aanwezigheid van residuen van prednisolone van endogene oorsprong in varkensurine te actualiseren en een drempelwaarde voor te stellen om een onderscheid te maken tussen de conforme urinemonsters en monsters verdacht voor illegale toediening van prednisolone.

De resultaten van recente studies hebben bevestigd dat prednisolone van endogene oorsprong aanwezig kan zijn in de urine van niet-behandelde varkens. Deze studies hebben een beter inzicht opgeleverd van de excretie van prednisolone bij varkens die met zekerheid niet behandeld zijn.

Op basis van resultaten van deze studies, is het Wetenschappelijk Comité van mening dat de drempelwaarde van 5 ng/ml voor de prednisolone concentratie in varkensurine, voorgesteld door het EURL (2014), aanvaardbaar is om een onderscheid te maken tussen niet-behandelde dieren en verdachte dieren.

Verder blijkt dat de afwezigheid van detectie van prednisolone in de lever een definitieve bevestiging is voor afwezigheid van behandeling met prednisolone.

### **Summary**

#### **Amendment to advice 07-2013 of the Scientific Committee of the FASFC on the presence of prednisolone residues of endogenous origin in pig's urine**

The amendment to advice 07-2013 aims to update the data on the presence of prednisolone residues of endogenous origin urine of pigs and proposes a threshold value to differentiate compliant urine samples from suspected samples for an illegal administration of prednisolone.

Results of recent studies have confirmed that prednisolone could be endogenously present in the urine of pigs.

Based on the results of these studies, the Scientific Committee consider that the threshold value of 5 ng/ml for the prednisolone concentration in pig's urine proposed by the EURL (European Union Reference Laboratory) is acceptable to discriminate untreated pigs from suspected pigs .

Furthermore, the absence of prednisolone in the liver is a final confirmation of the absence of treatment with prednisolone.

**Sleutelwoorden**

Prednisolone, endogene oorsprong, varkens, urine, lever.

## 1. Inleiding

Het advies 07-2013 had als doel om een antwoord te geven op drie vragen 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 matrices<sup>1</sup> en voor welke diersoorten<sup>2</sup> (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 ?

Om op de eerste vraag te antwoorden, had 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 $\beta$ -nortestosteron, 17 $\alpha$ -nortestosteron, 17 $\beta$ -boldenon, 17 $\alpha$ -boldenon, progesteron, 17 $\beta$ -testosteron, 17 $\alpha$ -testosteron, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -estradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortison), cortison, prednison, prednisolone en thiouracil.

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. Een uitgebreide literatuurstudie had aangetoond dat voor de volgende stoffen een endogene oorsprong kan worden vastgesteld:

- in urine van runderen: 17 $\beta$ -nortestosteron, 17 $\alpha$ -nortestosteron, 17 $\beta$ -boldenone en 17 $\alpha$ -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.

De in de literatuur beschreven methoden voor het maken van een onderscheid tussen endogene aanwezigheid en illegale toediening waren weergegeven voor nortestosteron (nandrolon), boldenon, natuurlijke hormonen (testosteron, estradiol, progesteron, hydrocortisone), zeranol en taleranol, prednisolone en thiouracil.

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

---

<sup>1</sup> Voor de volgende matrices : urine, feces, vet, spier, lever en haar

<sup>2</sup> Voor de volgende soorten : runderen, varkens, schapen, geiten, paardachtigen, hertachtigen, pluimvee, vissen

Verder toonden deze preliminaire experimenten aan dat prednisolone van endogene oorsprong aanwezig kan zijn in urine van varkens. Sinds de publicatie van het advies 07-2013 werden nieuwe studies op de uitscheiding van prednisolone bij varkens uitgevoerd. Deze laten toe op het advies 07-2013 te actualiseren.

## **2. Doelstelling**

Dit amendement heeft tot doel om het advies 07-2013 te actualiseren, meer bepaald met betrekking tot de interpretatie van de aanwezigheid van residuen van prednisolone in de urine van varkens en de drempelwaarde om niet-behandelde dieren van verdachte dieren te onderscheiden.

Overwegende de besprekingen tijdens de plenaire zitting van 12 september 2014, 17 oktober 2014 en 21 november 2014;

**geeft het Wetenschappelijk Comité het volgende advies :**

### **3. Stand van zaken van de kennis over de aanwezigheid van prednisolone van endogene oorsprong in urine en lever van varkens**

De laatste jaren werd de aanwezigheid van prednisolone in lage concentraties in urinemonsters van varkens regelmatig gerapporteerd. Uit de controleresultaten van het FAVV in 2012 is gebleken dat 73% van de 393 urinemonsters verzameld in slachthuizen prednisolone bevatten met een concentratie hoger dan 0,5 ng/ml en een gemiddelde van 0,96 ng/ml. Geen enkel levermonster bevatte prednisolone.

In 2012 voerde het CER groupe (Marloie) onderzoek uit bij varkens behandeld met prednisolone (enerzijds behandeling met één enkele dosis in hoge concentraties en anderzijds behandeling met lage doses gedurende één maand) en met een bijnier-stimulerend preparaat met lange werkingsduur (Synacthen depot®) en bij niet-behandelde varkens (Advies-07-2013; Delahaut *et al.*, 2014). De resultaten van deze studies toonden aan dat prednisolone wordt uitgescheiden in de urine van niet-behandelde varkens in concentraties van 0,01 tot 2,8 ng/ml (n = 125). De cortisol concentraties in urine van varkens schommelden tussen 1,8 en 352 ng/ml. Een hoge 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 aan cortisol gerelateerd was met het niveau van stress (Möstl et Palme, 2002). Prednisolone werd niet gedetecteerd in levermonsters van niet-behandelde dieren. Daarentegen werden lage cortisol waarden in de grootteorde van 0,27 tot 3,6 ng/g gemeten in de lever. Bij dieren behandeld met prednisolone werd een zeer hoge prednisolone concentratie (tot 25 µg/ml) gemeten in urine en dit kort (2 uur) na behandeling. Deze hoge prednisolone waarde was vergezeld met een laag niveau van cortisol. In de daaropvolgende dagen, daalde de concentratie aan prednisolone, terwijl vanaf de tweede dag, het gehalte aan cortisol toenam. Prednisolone werd nog aangetroffen tot 4 à 5 dagen na de behandeling aan een concentratie in de grootteorde van ng/ml. Bij dieren behandeld met Synacthen depot® namen prednisolone concentraties in urine licht toe na injectie (tot 35 ng/ml) en bereikten de concentraties aan cortisol waarden tot 900 ng/ml 12 uur na injectie. Levermonsters van dieren behandeld met Synacthen depot® vertoonden lage concentraties aan 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 lager dan 2 ng/g waargenomen.

CER Groupe heeft in 2014 een nieuwe studie uitgevoerd met als doel een betere kennis te hebben van de excretie van prednisolone van endogene oorsprong bij met zekerheid niet-behandelde varkens.

Uit kwantitatieve analyse van prednisolone en cortisol en kwalitatieve analyses van 3 metabolieten (prednisone, 20 $\alpha$ -en 20 $\beta$ -hydroxyprednisolone) in 100 urinemonsters en 50 levermonsters van niet-behandelde varkens (n=100) verzameld na het slachten blijkt dat:

- prednisolone en cortisol aanwezig zijn in urine van niet-behandelde varkens in concentraties tussen 0,12 en 3,98 ng/ml en tussen 42,4 en 842 ng/ml, respectievelijk;
- de metabolieten prednisone, 20 $\alpha$ -hydroxyprednisolone, 20 $\beta$ -hydroxyprednisolone aanwezig kunnen zijn in urine van niet-behandelde varkens;
- prednisolone en metabolieten van prednisolone niet gedetecteerd worden in lever van niet-behandelde varkens.

Verschillende studies hebben het mechanisme van vorming van prednisolone onderzocht in urine van runderen, varkens en paarden. Deze mechanismen omvatten de *in vitro* omzetting van cortisol door bacteriën afkomstig van feces en bodem, en de *in-vivo* vorming van prednisolone geïnduceerde door stress.

De huidige kennis over de aanwezigheid van prednisolone in urine bij varkens kan als volgt worden samengevat:

- prednisolone, vroeger alleen beschouwd als een exogene stof, wordt endogeen geproduceerd bij niet-behandelde varkens en kan worden teruggevonden in de urine;
- stress speelt een rol bij de endogene vorming van prednisolone (correlatie tussen cortisol en prednisolone in urine na stimulatie van de bijnier door Synacthen depot®, stimulus die een stress simuleren);
- metabolieten van prednisolone kunnen gedetecteerd worden in de urine van niet-behandelde en behandelde varkens. Er wordt opgemerkt dat de methode voor de opsporing van metabolieten van prednisolone een semi-kwantitatieve methode is;
- de verhouding prednisolone/cortisol in varkensurine laat niet toe om een onderscheid te maken tussen behandelde en niet-behandelde dieren, vermits na 3-4 dagen, de verhouding in behandelde dieren dezelfde is als deze bij niet-behandelde dieren;
- prednisolone wordt niet gedetecteerd in de lever van niet-behandelde varkens, maar wordt daarentegen wel gedetecteerd in de lever van behandelde varkens. De afwezigheid van prednisolone in de lever is een bewijs dat er geen behandeling is geweest.

#### **4. Vastleggen van een drempelwaarde voor prednisolone van endogene oorsprong in urine van varkens**

Het referentielaboratorium van de Europese Unie (European Union Reference Laboratory – EURL) stelt een drempelwaarde voor prednisolone voor van 5 ng/ml in varkensurine.

Het Wetenschappelijk Comité is van mening dat de drempelwaarde van 5 ng/ml voor de prednisolone concentratie in varkensurine, voorgesteld door het EURL (2014), aanvaardbaar is om een onderscheid te maken tussen niet-behandelde dieren en verdachte dieren.

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.

Een meer recente ringtest, uitgevoerd met 7 laboratoria, voor de kwantitatieve bepaling van prednisolone en cortisol in varkensurine heeft verschillen in analyseresultaten aangetoond tussen laboratoria voor een zelfde staal.

In het advies 07-2013 raadde 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.

## 5. Aanwezigheid van prednisolone van endogene oorsprong in andere matrices dan urine

Experimenten uitgevoerd in het CER Groupe hebben aangetoond dat prednisolone niet gedetecteerd wordt in lever van niet-behandelde dieren, terwijl dat wel het geval is in lage concentratie in lever van behandelde dieren.

De lever blijkt een betrouwbaarder doelwitorgaan te zijn dan urine voor de detectie van illegale toediening van prednisolone. De afwezigheid van detectie van prednisolone in de lever is een bewijs dat er geen behandeling geweest is.

In andere Lidstaten wordt de lever meer gebruikt dan de urine bij de controle op het illegaal gebruik van corticosteroiden.

## 6. Addendum aan bijlagen 2 en 3 van het advies 07-2012

De volgende paragraaf dient toegevoegd worden aan punt 2.10 Prednisolone van de bijlage 2 van het advies 07-2013 (Presence of substances with an endogenous origin or suspected to a certain level through the metabolism and/or feed different matrices of animal species producing food).

### “Porcine

Prednisolone residues have recently been found in porcine urine samples collected at slaughterhouses. The Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) has conducted in 2012 a survey focused on the analysis of prednisolone residues in urine and liver samples from pigs. Among the 393 urine samples collected at slaughterhouses, 73% were found to contain prednisolone at a level above 0.5 ng/ml with a mean of 0.96 ng/ml. None of the liver samples contained prednisolone.

Delahaut *et al.* (2014) have investigated the possible endogenous origin of prednisolone residues in porcine urine. They found prednisolone concentrations in porcine urine up to 2.8 ng/ml related with cortisol concentrations up to 352.0 ng/ml. Higher levels of prednisolone (as high as 25 µg/ml and 35 ng/ml, respectively) were found in porcine urine just after prednisolone or tetracosactide hexaacetate administration, decreasing quickly to within the range detected in non-treated animals. In liver, prednisolone was only found after administration of prednisolone or tetracosactide hexaacetate. A good correlation (correlation coefficient: 0.81) was established between prednisolone and cortisol concentrations in urine of untreated pigs. This may suggest that stress plays a role in the formation of prednisolone. A survey conducted in 2014 (unpublished results), focusing on the analysis of prednisolone, cortisol and metabolites (prednisone, 20 $\alpha$ -hydroxyprednisolone, 20 $\beta$ -hydroxyprednisolone) in urine and liver of untreated pigs, showed the presence of prednisolone in concentration up to 3.98 ng/ml in urine, the presence of metabolites in urine and the absence of prednisolone and metabolites in liver.”

Onder punt “other species”, dient de zin «No information was found for porcine, poultry, ovine, caprine, cervine and fish» vervangen te worden door “No information was found for poultry, ovine, caprine, cervine and fish».

In bijlage 3 (Concentration of substances on group one in different matrices of animals species producing food), moet de concentratie van prednisolone bij varkens vervangen te worden door «0.01 to 3.98 ng/ml».

Voor het Wetenschappelijk Comité,

Prof. Dr. E. Thiry (Get.)  
Voorzitter

Brussel, 28/11/2014

## Referenties

Delahaut P., Demoulin L., Gillard N., Fichanta E., Courtheyn D. 2014. Preliminary study on the presence of prednisolone in porcine urine and liver – How to distinguish endogenous from therapeutically administered prednisolone. *Drug Testing and Analysis*, 6 (4), 325–335.

EURL (European Union Reference Laboratory). 2014. EURL Reflection paper: Natural growth promoting substances in biological samples. Presence – and formation – of hormones and other growth promoting substances in food producing animals. Current approaches for enforcement and research needs for full implementation in residue control. Rikilt Wageningen UR.

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

## Leden van het Wetenschappelijk Comité

Het Wetenschappelijk Comité is samengesteld uit de volgende leden:

D. Berkvens, A. Clinquart, G. Daube, P. Delahaut, B. De Meulenaer, S. De Saeger\*, L. De Zutter, J. Dewulf, P. Gustin, L. Herman, P. Hoet, H. Imberechts, A. Legrève, C. Matthys, C. Saegerman, M.-L. Scippo, M. Sindic, N. Speybroeck, W. Steurbaut, E. Thiry, M. Uyttendaele, T. van den Berg, C. Van Peteghem†

\*: uitgenodigde expert

## 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  
Externe experts

Delahaut P. (verslaggever), Scippo M.-L.  
Daeseleire E. (ILVO), Maghuin-Rogister G.  
(ULg), 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.