



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

Amendement à l'AVIS 07-2013

Objet: Présence de résidus de prednisolone d'origine endogène dans l'urine de porcs (Dossier SciCom 2012/07)

Amendement approuvé par le Comité scientifique le 21 novembre 2014.

Résumé

L'amendement à l'avis 07-2013 a pour objectif d'actualiser les données sur la présence de résidus de prednisolone d'origine endogène dans l'urine de porcs et proposer une valeur seuil pour différencier les échantillons d'urines conformes et suspects pour une administration illégale de prednisolone.

Les résultats d'études récentes ont permis de confirmer que la prednisolone pouvait être présente de façon endogène dans l'urine des porcs non traités. Ces études ont permis d'avoir une meilleure connaissance sur l'excrétion de la prednisolone chez les porcs dont il était certain qu'ils n'étaient pas traités.

Sur base des résultats de ces études, le Comité scientifique estime que la valeur seuil de 5 ng/ml pour la concentration en prednisolone dans l'urine de porcs, proposée par l'EURL (European Union Reference Laboratory) est acceptable pour discriminer les porcs non traités des porcs suspects.

En outre, il apparaît que l'absence de détection de prednisolone dans le foie est une confirmation finale de l'absence de traitement avec de la 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 in pig's urine and propose 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 untreated pig urine. These studies have permitted to have a better knowledge on the excretion of prednisolone by pigs for which it was sure that they were not treated.

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'surine proposed by the EURL

(European Union Reference Laboratory) is acceptable to discriminate untreated pigs from suspected pigs .

Furthermore, it appears that the absence of prednisolone detection in the liver is a final confirmation of the absence of treatment with prednisolone.

Mots clés

Prednisolone, origine endogène, porcs, urine, foie.

1. Introduction

L'avis 07-2013 avait pour objectif de répondre à trois questions relatives à la présence d'origine endogène de substances anabolisantes et/ou interdites chez les animaux producteurs de denrées alimentaires.

- Question 1: Parmi les substances recherchées par l'AFSCA, quelles sont celles dont la présence dans une matrice d'origine animale est susceptible d'avoir une origine endogène (métabolisme, alimentation animale, ...)?
- Question 2: Dans quelles matrices¹ et pour quelles espèces² (catégories) animales, la présence d'origine endogène des substances peut-elle être constatée?
 - o Peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier une présence d'origine endogène et un traitement illégal pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?
- Question 3: La présence de prednisolone et de thiouracil dans d'autres matrices que l'urine peut-elle également avoir une origine endogène?
 - o Si oui, peut-on fixer une concentration de résidus qui permet de différencier l'origine (endogène versus traitement illégal) pour des combinaisons de substance/matrice/espèce animale?

Pour répondre à la première question, le Comité scientifique avait classé les substances, listées dans la demande d'avis, en trois groupes:

- groupe 1: substances avec une origine endogène connue ou suspectée à un certain niveau via le métabolisme et/ou l'alimentation;
- groupe 2: substances dont la présence dans une matrice d'origine animale peut être liée à une contamination accidentelle ou environnementale;
- groupe 3: substances pour lesquelles il n'y a pas de raison de suspecter une origine endogène.

Les substances dont la présence dans une matrice d'origine animale est connue ou suspectée d'avoir une origine endogène et que l'on peut classer dans le groupe 1 sont: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone, 17 α -boldenone, progesterone, 17 β -testosterone, 17 α -testosterone, 17 β -œstradiol, 17 α -œstradiol, zeranol, taleranol, cortisol (hydrocortisone), cortisone, prednisone, prednisolone et thiouracil.

Pour répondre à la deuxième question, les substances du groupe 1 avaient été étudiées plus en détail pour des combinaisons substances/espèces animales/matrices. Une étude étendue de la littérature avait montré que pour les substances suivantes une origine endogène pouvait être observée:

- dans l'urine de bovins: 17 β -nortestosterone, 17 α -nortestosterone, 17 β -boldenone et 17 α -boldenone
- dans le sang chez les bovins, porcs, volailles, ovins, caprins, chevaux, cervidés et poissons: progesterone, testosterone, œstradiol, cortisol et cortisone
- dans l'urine de plusieurs espèces animales: zeranol et taleranol
- dans l'urine de bovins, porcs et chevaux: prednisolone
- dans l'urine de bovins, porcs et ovins: thiouracil.

Les approches rapportées dans la littérature pour différencier une présence endogène d'un traitement illégal avaient été présentées pour la nortestostérone (nandrolone), la boldenone, les hormones naturelles (testostérone, œstradiol, progesterone, hydrocortisone), le zeranol et taleranol, la prednisolone et le thiouracil.

Pour répondre à la question 3, la présence de prednisolone et de thiouracil d'origine endogène dans d'autres matrices que l'urine avait été investiguée. Des résultats d'études expérimentales préliminaires suggéraient que le foie pouvait être une matrice intéressante pour démontrer un traitement illégal de prednisolone.

¹ Pour les matrices suivantes : urine, fèces, graisse, muscle, foie et poils

² Pour les espèces suivantes : bovins, porcs, ovins, caprins, équins, cervidés, volailles, poissons

Les études expérimentales préliminaires indiquaient que la prednisolone pouvait être présente de façon endogène dans l'urine de porcs. Depuis la publication de l'avis 07-2013, des nouvelles études ont été réalisées sur l'excrétion de la prednisolone chez le porc. Celles-ci ont permis d'actualiser l'avis 07-2013.

2. Objectif

Cet amendement a pour objectif d'actualiser l'avis 07-2013, et plus particulièrement ce qui concerne l'interprétation de la présence de résidus de prednisolone dans l'urine de porcs et la valeur seuil pour différencier les animaux non traités des animaux suspects.

Considérant les discussions menées lors des séances plénières du 12 septembre 2014, 17 octobre 2014 et 21 novembre 2014;

le Comité scientifique émet l'amendement suivant :

3. Etat des choses des connaissances sur la présence de prednisolone d'origine endogène dans l'urine et le foie des porcs

Ces dernières années, la présence de prednisolone dans des échantillons d'urines de porcs en faible concentration a été régulièrement rapportée. Il ressort des résultats des contrôles de l'AFSCA effectués en 2012 que parmi 393 échantillons d'urines collectés à l'abattoir, 73% contenaient de la prednisolone à des concentrations supérieures à 0,5 ng/ml avec une moyenne de 0,96 ng/ml. Aucun des échantillons de foie ne contenait de la prednisolone.

En 2012, le CER Groupe (Marloie) a mené des recherches sur des porcs traités avec de la prednisolone (d'une part traitement avec une seule dose en concentration élevée et d'autre part administration de faibles doses pendant un mois) et une préparation stimulant la surrénale avec une longue durée d'action (Synacthen depot®) et sur des porcs non traités (Avis-07-2013; Delahaut *et al.*, 2014). Les résultats de ces études ont montré que la prednisolone était excrétée de façon naturelle dans l'urine des porcs non traités en concentration de 0,01 à 2,8 ng/ml (n = 125). Les concentrations en cortisol dans l'urine de porcs variaient de 1,8 à 352 ng/ml. Une bonne corrélation (coefficient de corrélation de 0,81) avait été constatée entre les concentrations de prednisolone et de cortisol chez les animaux non traités.

Il avait également été constaté que le taux de cortisol était lié au niveau de stress (Möstl et Palme, 2002). La prednisolone n'avait pas été détectée dans les échantillons de foie des animaux non traités. Par contre, de faibles teneurs de cortisol de l'ordre de 0,27 à 3,6 ng/g avaient été mesurées dans le foie. Chez les animaux traités à la prednisolone, un taux très élevé de prednisolone (jusque 25 µg/ml) avait été mesuré dans les urines et ce rapidement (2 h) après le traitement. Ces teneurs élevées en prednisolone étaient accompagnées d'un faible taux de cortisol. Dans les jours qui suivaient, le taux de prednisolone diminuait tandis qu'à partir du 2ème jour, le taux de cortisol augmentait. La prednisolone était encore retrouvée, 4 à 5 jours après le traitement, à des concentrations de l'ordre du ng/ml. Chez les animaux traités au Synacthen depot®, les concentrations en prednisolone dans l'urine augmentaient légèrement après injection (jusque 35 ng/ml) et les concentrations en cortisol augmentaient jusque 900 ng/ml 12 heures après injection. Les échantillons de foie des animaux traités au Synacthen depot® présentaient des teneurs faibles en prednisolone (maximum observé: 0,18 ng/g) et un taux de cortisol de l'ordre de 2 à 5 ng/g. Les échantillons de foie des animaux traités à la prednisolone présentaient des concentrations en prednisolone allant jusqu'à 8 ng/g et un taux de cortisol inférieur à 2 ng/g.

Le CER Groupe a réalisé une nouvelle étude en 2014 dont l'objectif était d'avoir une meilleure connaissance de l'excrétion de la prednisolone d'origine endogène chez les porcs dont il était certain qu'ils n'étaient pas traités.

Il ressort des analyses quantitatives de prednisolone et de cortisol et qualitatives de 3 métabolites (prednisone, 20 α -hydroxyprednisolone et 20 β -hydroxyprednisolone) sur 100 échantillons d'urine et 50 échantillons de foie de porcs non traités (n=100) prélevés après abattage que:

- la prednisolone et le cortisol sont présents dans l'urine des porcs non traités en concentrations de 0,12 à 3,98 ng/ml et de 42,4 à 842 ng/ml, respectivement;
- les métabolites prednisone, 20 α -hydroxyprednisolone, 20 β -hydroxyprednisolone peuvent être présents dans l'urine des porcs non traités;
- la prednisolone et les métabolites de la prednisolone ne sont pas détectés dans le foie des porcs non traités.

Plusieurs études ont investigué le mécanisme de formation de prednisolone dans l'urine des bovins, porcins et équins. Ces mécanismes incluent la conversion *in-vitro* de cortisol par des bactéries provenant des fèces et du sol, et la formation *in-vivo* de prednisolone due au stress.

L'état des connaissances actuelles sur la présence de prédnisolone dans l'urine chez le porc peut être résumé de la façon suivante:

- la prednisolone, anciennement considérée comme une substance uniquement exogène, est produite de façon endogène chez des porcs non traités et peut être retrouvée dans l'urine;
- Le stress joue un rôle dans la formation endogène de prednisolone (corrélation entre le cortisol et la prednisolone dans l'urine des porcs après stimulation de la glande surrénale par du Synacthen depot®, stimulus simulant un stress);
- Les métabolites de la prednisolone peuvent être détectés dans l'urine des porcs traités et non traités. Il est à noter que la méthode pour la détection des métabolites est une méthode semi-quantitative;
- Le ratio prednisolone/cortisol dans l'urine des porcs ne permet pas de faire une distinction entre les animaux traités et non traités, car, après 3-4 jours, le ratio chez les animaux traités est au même niveau que chez les animaux non traités;
- La prednisolone n'est pas détectée dans le foie des animaux non traités mais bien dans le foie des animaux traités. L'absence de prednisolone dans le foie est une preuve qu'il n'y a pas eu de traitement.

4. Etablissement d'une valeur seuil pour la prednisolone d'origine endogène dans l'urine des porcs

Le laboratoire de référence de l'Union Européenne (European Union Reference Laboratory – EURL) propose une valeur seuil de 5 ng/ml pour la prednisolone dans l'urine de porc.

Le Comité scientifique estime que la valeur seuil de 5 ng/ml pour la concentration en prednisolone dans l'urine de porcs, proposée par l'EURL (2014) est acceptable pour discriminer les porcs non traités des porcs suspects.

Il ressortait d'une étude collaborative (ring test) limitée à 5 laboratoires, réalisée à l'initiative de l'AFSCA en 2012, pour la détermination quantitative de prednisolone dans l'urine de porcs que la détermination de prednisolone est liée à une incertitude de mesure élevée (moyenne 50%) et qu'il existe un biais important (-17% à + 18%) pour certaines méthodes.

Une étude collaborative plus récente, réalisée avec 7 laboratoires, pour la détermination quantitative de prednisolone et de cortisol dans l'urine de porcs a montré des différences dans les résultats d'analyses entre laboratoires pour un même échantillon.

Dans l'avis 07-2013, le Comité scientifique recommandait, pour la détermination d'une valeur seuil, de tenir compte de l'incertitude de mesure qui peut s'élever à 50% comme montré lors d'une étude collaborative organisée par l'AFSCA.

5. Présence d'origine endogène de prednisolone dans d'autres matrices que l'urine

Les expériences menées au CER Groupe ont montré que la prednisolone n'est pas détectée dans le foie des animaux non traités, alors qu'elle est détectée en faibles quantités dans le foie des animaux traités.

Le foie apparaît être un organe cible plus fiable que l'urine pour la détection de l'administration illégale de prednisolone. L'absence de détection de prednisolone dans le foie est une preuve qu'il n'y a pas eu de traitement.

Le foie est plus utilisé que l'urine dans d'autres Etats membres pour le contrôle de l'usage illégal des corticostéroïdes.

6. Addendum aux annexes 2 et 3 de l'avis 07-2012

Le paragraphe ci-dessous doit être ajouté au point 2.10 Prednisolone de l'annexe 2 de l'avis 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 α -hydroxyprednisolone, 20 β -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.”

Sous le point “other species”, la phrase «No information was found for porcine, poultry, ovine, caprine, cervine and fish» doit être remplacée par “No information was found for poultry, ovine, caprine, cervine and fish».

A l'annexe 3 (Concentration of substances on group one in different matrices of animals species producing food), les concentrations en prednisolone chez le porc doivent être remplacées par «0.01 to 3.98 ng/ml».

Pour le Comité scientifique,

Prof. Dr. E. Thiry (Sé.)
Président

Bruxelles, le 28/11/2014

Références

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.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

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

*: Expert invité

Conflits d'intérêts

Aucun conflit d'intérêts n'a été constaté.

Remerciements

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

Membres du Comité scientifique
Experts externes

Delahaut P. (Rapporteur), Scippo M.-L.
Daeseleire E. (ILVO), De Backer P. (Ugent),
Maghuin-Rogister G. (ULg), Vanhaecke L.
(Ugent)

Cadre juridique de l'avis

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

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

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

Disclaimer

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