

Project 412.0002

Onderzoek naar het effect van de behandeling van vleesstieren met (illegale)
dierbehandelingsmiddelen

Projectleider: dr. M.J. Groot

Rapport 95.11

augustus 1995

EFFECTEN VAN CLENBUTEROL BIJ VLEESSTIEREN: PILOT STUDY

M.J. Groot, P.L.M. Berende, J.S. Ossenkuppele, P. Stouten, W. Haasnoot, R. Schilt, H. Bannink en
J.F. Labrijn

afdelingen: Risico-analyse en Toxicologie

Levensmiddelen- en Milieuchemie

Kwaliteitsbewaking & Kwaliteitssystemen

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1995, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

in - en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek

Directie Milieu, Kwaliteit en Gezondheid

Veterinaire Hoofdinspectie

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne (RIVM)

ID-DLO (vestiging Runderweg)

PR, mw. ir. J. Heeres-van Tol

PR, mw. ing. M.Plomp

IKC-Landbouw, ing. J. van Vliet

Wolff Vlees Twello

SKV

VOORWOORD

De medewerkers van het vroegere IVVO-DLO (nu ID-DLO) J. Truin en J.H.M. ter Heerdt worden bedankt voor de goede verzorging van de dieren. Wij zijn de medewerkers van het PR en de Waiboerhoeve erkentelijk voor het beschikbaar stellen van het materiaal en de gegevens van de 10 controledieren.

INHOUD	<u>blz.</u>
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	5
2 MATERIAAL EN METHODEN	6
3 ZOÖTECHNIEK	10
4 HISTOLOGIE	16
5 ANALYTISCHE RESULTATEN	21
6 LACTAAT- EN CREATINEGEHALTEN IN URINE	25
7 DISCUSSIE	30
LITERATUUR	32
BIJLAGE	
Individuele waarnemingen histologie	

SAMENVATTING

Om inzicht te krijgen in de effecten van clenbuterol bij vleesstieren wat betreft dosering, zoötechnische resultaten, histologische veranderingen, residuen en lactaat-creatineverhouding (L/C ratio) in de urine is een oriënterende dierproef gedaan met 4 vleesstieren. Van deze vleesstieren hebben twee dieren gedurende vier weken oraal een lage i.c. curatieve dosering clenbuterol (0,8 µg/kg l.g.) gekregen en hebben twee dieren oraal een hoge dosering (8 µg/kg l.g.) gekregen, gedurende eveneens vier weken. Onmiddellijk na beëindigen van de medicatie zijn deze vier dieren geslacht.

Het zoötechnisch gedeelte van de proef is goed verlopen. Het kostte nogal wat inspanning om de hoogste dosering clenbuterol door de dieren te laten consumeren. Maar na een kleine week aten alle dieren de hun aangeboden hoeveelheid clenbuterol geheel op. Het gewichtsverloop van de dieren was grillig. Dit werd mede veroorzaakt door de gebruikte proefopzet, waarbij geen voer werd onthouden voor het wegen, en het verschil in eetpatroon tussen de dieren van beide proefgroepen. Bij het slachten werd een grote spreiding van de gewichten van de thymus en testikels geconstateerd. Wat betreft de histologie werd atrofie van het kiemepitheel van de testikels waargenomen met geremde spermatogenese, met name bij de hoog gedoseerde dieren. De prostaat vertoonde geringe veranderingen, maar geen vacuolisatie zoals bij met clenbuterol behandelde kalveren. Screening door middel van prostaatonderzoek lijkt dan ook niet zinvol. De levers van de behandelde dieren vertoonden wat meer fibrose, bevatten wat meer koper en duidelijk meer vet dan de controles. Daarnaast was de endogene peroxidaseactiviteit sterker.

Residuen van clenbuterol konden met EIA screening worden aangetoond in urine, plasma, faeces, retina, lever, nier, vet, en spieren. Met GC-MS zijn residuen aangetoond in lever, retina/choroid en faeces. Opvallend waren de hoge gehalten in de retina/choroid vergeleken met de andere matrices. Voor de bepaling van de lactaat- en creatinegehalten zijn urinemonsters genomen vóór het instellen van de medicatie, tijdens de proef op drie tijdstippen van de dag, en bij het slachten. Er waren geen systematische verschillen m.b.t. beide stoffen tussen de drie tijdstippen van de dag. De lactaatgehalten waren gemiddeld lager dan die bij vleeskalveren. De proefbehandeling heeft weinig effect gehad op het lactaatgehalte. Het creatinegehalte en de daarvan afgeleide L/C-ratio werden duidelijk beïnvloed. Het creatinegehalte daalde flink na behandeling en bij drie van de vier dieren bleven de gehalten laag tijdens de gehele proefperiode en ook in de urine verzameld op het slachthuis. Het creatinegehalte bleek het beste onderscheidende vermogen te hebben d.w.z. het is de beste indicatie voor het gebruik van β-agonisten.

1 INLEIDING

Het gebruik van groeibevorderende middelen is een steeds terugkerend probleem in de vleesveehouderij. Van de groeibevorderaars zijn de β -agonisten in korte tijd populair geworden. Deze middelen hebben een herverdelende werking, wat resulteert in een afname van de hoeveelheid vet en een toename van de spiermassa, zodat een grotere opbrengst aan mager vlees en een gunstiger voederbenutting wordt verkregen.

Op basis van indicaties zou met name clenbuterol op grote schaal in de stierenmesterij worden toegepast. Bij onderzoek van urine van vleesstieren verzameld op het slachthuis, komen bij de analyse door het Centraal laboratorium van de Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees (CLRVV) niet veel positieve uitslagen voor. Bij gericht onderzoek door de Algemene Inspectie Dienst (AID) worden echter wel positieve monsters gevonden (Jaarverslag AID 1993).

Een mogelijke oorzaak hiervoor kan zijn dat de mesters een voldoende lange wachttijd tussen de behandeling en het slachten aanhouden, of dat combinaties van stoffen in lage dosering gebruikt worden.

Vanwege het ontbreken van gegevens voor vleesstieren is de relatie tussen de hoeveelheid toegediende β -agonist en de gehalten in diverse matrices (urine, bloed, faeces, vlees en organen) onbekend.

Uit onderzoek bij geitebokjes en vleeskalveren kwam naar voren dat behandeling met β -agonisten duidelijke veranderingen aan de geslachtsorganen, met name de prostaat veroorzaakte. Ook waren er aanwijzingen dat de verhouding lactaat en creatine (L/C ratio) in de urine bij de behandelde dieren verhoogd was. Het histologisch onderzoek en de L/C ratio in de urine zijn goedkope indirecte screeningsmethoden die gebruikt zouden kunnen worden om verdachte dieren op te sporen.

Om inzicht te krijgen in de effecten van clenbuterol bij vleesstieren wat betreft dosering, residuen, histologische veranderingen en L/C ratio in de urine is een oriënterende dierproef gedaan met 4 vleesstieren. Twee stieren zijn behandeld met de curatieve dosering clenbuterol en twee met de dubbele hoeveelheid van de voor vleeskalveren als optimaal beschouwde groeibevorderende dosering. Voor vleesstieren zijn weinig proeven gedaan om de optimale dosering aan clenbuterol vast te stellen.

In dit rapport worden de resultaten beschreven van de dierproef. Het betreft de zootechniek, het histologisch onderzoek, onderzoek met de gangbare screenings- en bevestigingsmethoden voor clenbuterol, lactaat- en creatinegehalten en de daaruit afgeleide L/C ratio.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Proefopzet

Dieren 1700 en 1750: 0,8 μg clenbuterolchloride per kg lichaamsgewicht gedurende 28 dagen, tweemaal per dag

Dieren 2470 en 3032: 8 μg clenbuterolchloride per kg lichaamsgewicht gedurende 28 dagen, tweemaal per dag

Controledieren: als controlegroep dienden 10 willekeurige stieren afkomstig uit dezelfde koppel van het Proefstation voor de Rundveehouderij als de behandelde dieren

Clenbuterol is betrokken bij Boehringer Ingelheim te Alkmaar als Ventipulmin paard (concentratie 0,016 mg/g) als granulaat.

De dosering 0,8 en 8 μg clenbuterol komt overeen met 5 en 50 gram Ventipulmin per 100 kg lichaamsgewicht, oraal verstrekt.

2.2 Zoötechniek

Proefdieren

Voor deze proef werden stieren betrokken bij de Waiboerhoeve van het Proefstation voor de Rundveehouderij (PR). Van deze dieren was precies bekend wat er gedurende hun leven aan diergeneesmiddelen is verstrekt. De gebruikte dieren hebben nooit een β -agonist toegediend gekregen en de laatste twee maanden voor aanvang van de proefperiode ook geen antibiotica.

De dieren waren afkomstig van een zwarbonte moeder en een Piemontese vader (Piemontese kruislingen). De geboortedatum lag rond oktober 1991, het gewicht op 1 februari 1993, dit was één dag voor de aanvoer van de dieren op het IVVO-DLO en 16 dagen voor de aanvang van de behandeling, bedroeg voor dier 1700: 552 kg, dier 1750: 547 kg, dier 2470: 580 kg en dier 3032: 530 kg. De gewichten van de controle dieren lagen in de zelfde orde van grootte.

Voeding

Als rantsoen werd 2x per dag 1 kg geperste pulp, waarin de clenbuterol gemengd was, gegeven en zodra dit geconsumeerd was werd 3 kg krachtvoer (stierenbrok) en maissilage ad libitum verstrekt. De dieren hadden de beschikking over volop drinkwater (automatische drinkbakjes).

De dieren met de lage dosering clenbuterol aten dit voer goed op, maar de dieren met de hoge dosering weigerden de pulp met clenbuterol volledig op te eten. Om toch de gewenste hoeveelheid clenbuterol te laten eten werd voor deze twee dieren de hoeveelheid pulp teruggebracht naar 0,5 kg per keer en werd deze hoeveelheid pulp opgemengd met een beetje maissilage. In de loop van de

dag werd steeds iets verse maissilage toegevoegd en gemengd met het restant pulp. Als dit volledig geconsumeerd was werd een zodanige hoeveelheid maissilage aangeboden dat er geen resten overbleven. Dit om zeker te zijn dat alle aangeboden clenbuterol geconsumeerd zou worden. Dit is goed gelukt. Na 1 week is een kleine hoeveelheid rest (maissilage, iets pulp met zeer weinig clenbuterol) weggegooid omdat dit te sterk verontreinigd was. Daarna zijn geen resten meer overgebleven, zodat aangenomen kan worden dat alle aangeboden clenbuterol gegeten is. Met deze werkwijze was de maissilage verstrekking niet ad libitum maar bijna ad libitum.

Door dit verschillend eetgedrag zullen de dieren 1700 en 1750 de clenbuterol tussen 5.00 en 5.15 uur en 15.15 en 15.30 uur geconsumeerd hebben, terwijl de dieren 2470 en 3032 het grootste deel van de clenbuterol tussen 5.00 en 9.00 uur en tussen 15.15 en 18.00 uur gegeten hebben. De rest zullen deze twee dieren in de tussenliggende uren geconsumeerd, waarbij de consumptie 's nachts tussen 21.00 en 5.00 laag zal zijn geweest.

In tabel 3-1 wordt de samenstelling van de stierenbrok gegeven en in tabel 3-2 de gehalten van de 3 gebruikte voeders, berekend op grond van bepaalde geanalyseerde componenten. De stierenbrok bevatte flavophospholipol (vanaf 2 februari). De controledieren kregen 3 kg vleesstierenbrok met monensin en ad libitum maissilage.

Huisvesting

De 4 stieren werden individueel, aangebonden gehuisvest in de stierenstal van het Instituut voor Veevoedingsonderzoek (thans ID-DLO) te Lelystad. De dieren waren zodanig opgesteld dat de plaats tussen de dieren niet bezet was, zodat het niet mogelijk was elkaars voer te eten. De volgorde in de stal was van voren naar achteren: dier 1700, 1750, 3032 en 2470.

Tijdschema

- Uitzoeken stieren Waiboerhoeve: december 1992
- Aanvoer 4 stieren op het IVVO: 2 februari 1993
- Verstrekking Ventipulmin: vanaf 17 februari 's avonds t/m 17 maart 1993 's morgens
- Slachten behandelde stieren: 17 maart 1993
- Slachten 10 controlestieren Waiboerhoeve: 16 februari 1993.

Waarnemingen

- Wegen van de dieren vanaf 2 februari elke 14 dagen
- Bemonsteren van de voeders (stierenbrok, maissilage en pulp) voor eventueel onderzoek op stoffen die clenbuterolbepaling beïnvloeden
- Vaststellen van de voeropname per dier per dag
- Beoordelen van de gezondheidstoestand dagelijks
- Urine verzamelen voor onderzoek op clenbuterol (GC-MS)(100 ml) op de volgende dagen en

tijdstippen na het begin van de proefperiode: 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21 en 27 dagen om ca. 6.00 uur (dier1700 op dag 1 en 2 om 8.30 uur)

- Urine verzamelen voor onderzoek op clenbuterol en eventuele metabolieten (immunoassay) op dezelfde dagen en tijdstippen
- Urine verzamelen voor onderzoek op lactaat en creatine (L/C ratio op -6, 0, 7, 14 en 21 dagen, p 3 tijdstippen nl. 6.00 uur, 11.00 en 16.00 uur en op het slachthuis (zie tabel 3-4)
- Faeces verzamelen voor onderzoek op clenbuterol (GC-MS) op 0, 7, 14 en 27 dagen om 6.00 uur (dier 2470 op dag 7 rectaal verzameld om 8.00)
- Faeces verzamelen voor onderzoek op clenbuterol en metabolieten (immunoassay) op dezelfde dagen en tijdstippen
- Bloed (plasma) verzamelen voor onderzoek op clenbuterol (GC-MS) op de bij het faeces-onderzoek genoemde dagen om 9.00 uur
- Bloed (plasma) verzamelen voor onderzoek op clenbuterol en metabolieten op dezelfde tijden
- Bij het slachten verzamelen voor histologisch onderzoek: hypofyse, thymus, schildklier, bijnier, pancreas, lever, hart, longen, testikel, prostaat, retina en blaas.
- Wegen van hypofyse, thymus, schildklier, bijnier, pancreas, lever, testikel en nier en de 3 spieren m. quadriceps, m. longissimus dorsi en m. triceps brachii
- Bij het slachten verzamelen voor bepaling op clenbuterol (GC-MS) gal, urine, lever, nier, niervet, 3 spieren (m. quadriceps, longissimus dorsi en triceps brachii caput longus)
- Bij het slachten hetzelfde materiaal verzamelen voor bepaling op clenbuterol en metabolieten (immunoassay)
- Bij het slachten verzamelen voor borging de hele lever (vriesdrogen)
- Naast het verzamelen van materiaal van de 4 behandelde dieren is hetzelfde materiaal van de 10 controledieren, welke 16 februari 1993 werden geslacht, verzameld voor histologisch onderzoek Door praktische bezwaren en de daarmee samenhangende hoge kosten zijn niet alle organen en weefsels gewogen, zoals die bij de behandelde dieren zijn bepaald

2.3 Histologie

Bij het slachten zijn de hypofyse, thymus, schildklier, bijnier, pancreas, lever, hart, testikel, prostaat, retina en blaas verzameld en gefixeerd in 4 % gebufferde formaldehyde. De hypofyse is gefixeerd in Bouin. Van de lever en de prostaat zijn ook monsters ingevroren bij - 20 ° Celsius om vriescoupes te maken. Vriescoupes 5 μ m dik zijn gesneden met een cryostaat (Bright).

De formaline gefixeerde monsters zijn routinematig verwerkt tot paraffinecoupes van 5 μ m dik. De coupes zijn gekleurd met haematoxyline-eosine (HE) voor de morfologie, met Weigert-van Gieson

(WVG) voor bindweefsel en Alian Blauw-Periodic Acid Schiff (ABPAS) voor mucines.

De levercoupes zijn tevens gekleurd met Fouchet voor gal, met 5-p-dimethylaminobenzylideenrhodamine (DMABR) voor koper, met Perls Prussian Blue (PPB) voor ijzer, met Diaminobenzidine (DAB) voor endogene peroxidaseactiviteit, en met de zilverkleuring volgens Gomori voor reticuline. Daarnaast zijn vriescoupes van de lever gekleurd met Oil Red O (ORO) voor vet. Vriescoupes van de prostaat zijn gekleurd met HE en immunohistochemisch met de monoclonaal RCK 103 voor basale cellen (Groot, 1990).

2.4 Analytiek

Alle analyses zijn door het RIKILT-DLO uitgevoerd. De levers zijn op het IVVO-DLO gevriesdroogd. Alle materiaal is op 19 maart 1993 op het RIKILT-DLO bezorgd.

Monstervoorbewerking

Urine:

De urine monsters werden op pH 7 ± 0.5 gebracht en op drie niveaus verdund met buffer.

Bloedplasma:

Aan 1 ml bloedplasma werd 0,5 ml buffer (di-Natriumtetraboraat 0,1 M; pH 8) en 4 ml tetrabutylmethylether; TBME) toegevoegd. Na vortexen (1 min) en het scheiden van de twee fasen werd 2 ml TBME afgepipetteerd en ingedampt. Het residu werd opgenomen in 200 μ l PBST. De concentratie plasma in het eindextract is dan 2,5 ml plasma per ml PBST.

Faeces, lever, nier, vlees en niervet:

Aan 1 g van het gehomogeniseerde monster werd 5 ml 0,1 M HCl toegevoegd en na schudden en 15 min in een ultrasoonbad werd 1 ml buffer (0,1 M di-natrium-tetraboraat; pH 8) en 1,2 ml 0,5 M NaOH toegevoegd. Na schudden, pH controle (pH 9) en zonodig bijstellen met 0,5 M NaOH of 0,5 M HCl werd gecentrifugeerd (10 min. 15.000 rpm en 4°C). Aan 2 ml van het supernatant werd 4 ml TBME toegevoegd. Na schudden werd 2 ml tBME afgepipetteerd en ingedampt. Het residu werd opgenomen in 250 μ l PBST. De concentratie monster in het eindextract is dan 0,5 g per ml PBST.

Analysetechniek

De monsters en extracten werden onderzocht met de clenbuterol-EIA (RSV A-0688).

Lever werd tevens onderzocht met GC-MS. Retina met solid-phase extractie en GC-MS.

Faeces met methode immuno-affiniteitschromatografie en GC-MS.

2.5 Lactaat- en creatinebepalingen

Voor de monstervoorbereiding en de analysemethoden van lactaat en creatine in urine wordt verwezen naar Intern IVVO-DLO rapport 388.

3 ZOOTECHNIEK

3.1 Resultaten

De gezondheidstoestand van de dieren was uitstekend. Dier 3032 had echter na een week last van jeuk. Alle dieren zijn daarom op 26 februari uitwendig behandeld met stomoxin M.O. (is een permethrin bevattend preparaat). Vlak voor en na de behandeling lieten 3 van de 4 dieren veel haaruitval zien. Na de behandeling hebben ze weinig last meer van jeuk gehad.

De onverwachte problemen met de voeropname zijn reeds genoemd bij de voeding. In tabel 3-2 wordt de voer- en clenbuterolopname tijdens de proefperiode weergegeven. Het valt op dat vooral dier 2470 duidelijk minder gegeten heeft dan de overige dieren. Deze mindere voeropname blijkt ook uit de mindere gewichtsverandering bij dit dier vergeleken met de andere dieren (tabel 3-3).

In deze tabel is de gewichtsverandering vermeld en niet de groei omdat, door het verschillend eetgedrag van de dieren van de twee proefgroepen, de vulling van het maagdarmkanaal op het tijdstip van wegen verschillend was. De gewichtsveranderingen kunnen zeker niet alleen aan groei worden toegeschreven omdat de dieren de laatste week voor de aanvang van de proefperiode wat minder gegeten hadden dan tijdens de proef. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de overgang van voer, huisvesting e.d. Opvallend zijn ook de grote verschillen in gewichtsveranderingen tussen de eerste 14 dagen t.o.v. de laatste 14 dagen bij de dieren 1700 en 3032. Door dit soort grote onregelmatigheden kan ook geen uitspraak gedaan worden over de voederbenutting, behalve dat het vergeleken met de praktijkgegevens zeer gunstige cijfers zijn (praktijk geeft tussen 7-10 VEVI/kg groei).

Ondanks de grote afwijkingen van de werkelijke groei van de te verwachten groei, waarop de dosering clenbuterol gebaseerd was, is het redelijk gelukt de gewenste hoeveelheid clenbuterol toe te dienen. In tabel 3-4 worden bijzonderheden over het slachten vermeld. De dieren waren erg onrustig bij het laden, het transport en het lossen. Het slachten had een ongestoord verloop en vrijwel alle monsters konden worden verzameld. Het verzamelen van speeksel van geslachte dieren lukte niet. Het uitsnijden van de rugspier is niet geheel naar wens verlopen, de m. longissimus dorsi is niet volledig uitgesneden.

In tabel 3-5 worden de gewichten van het levende en het geslachte dier, en van een aantal organen weergegeven. Opvallend is het zeer hoge aanhoudingspercentage. Oorzaken van het hoge aanhoudingspercentage van de behandelde dieren zijn een mindere vulling van het maagdarmkanaal op het tijdstip van wegen van de levende dieren en het feit dat de karkassen niet zijn getrimd (niervet en losliggend vet is niet verwijderd). Het aanhoudingspercentage van de controledieren kan als goed en normaal beschouwd worden.

Met betrekking van de gewichten van de organen en weefsels is de grote spreiding van de gewichten van de thymus en testikels opvallend. Dit verschijnsel is ook in andere proeven waargenomen.

3.2 Discussie en conclusies

Het zoötechnisch gedeelte van de proef is goed verlopen. Het was aanvankelijk moeilijk de hoogste dosering clenbuterol door de dieren te laten consumeren. Door extra maatregelen zoals het steeds opmengen met een kleine hoeveelheid "verse" snijmaissilage werd dit probleem opgelost. Binnen een week na het begin van de proef werd de clenbuterol door alle dieren volledig geconsumeerd. De minder vlotte opname kan veroorzaakt zijn door clenbuterolchloride of door de drager (lactose). Mindere voeropname bij dieren die gevoerd worden met clenbuterolhoudend voer wordt in de literatuur vaker genoemd (Brockway et al., 1987).

Het gewichtsverloop van de dieren was grillig. Dit werd mede veroorzaakt door de gebruikte proefopzet, waarbij geen voer werd onthouden voor het wegen, en het verschil in eetpatroon tussen de dieren van beide proefgroepen.

Opvallend was de onrust van de dieren tijdens het laden, lossen en het transport. Iers onderzoek (Elliott, 1993) meldt dat clenbuterol zich ophoopt in de retina, wat visusstoornissen kan geven. Of het gezichtsvermogen van de dieren ook minder was is niet vastgesteld.

Het slachten en de daarbij behorende werkzaamheden zijn naar tevredenheid verlopen.

Tabel 3-1. Samenstelling krachtvoer (vleesstierenbrok)

Ingrediënt	Gehalte in %
Kokosschilfers	20.00
Maisglutenvoermeel	21.63
Vet destructie NTF	1.00
Lucerne (16-18 % re)	4.18
Zout	0.92
Melasse	5.00
Vinasse	3.00
Duitse pulp	5.00
Citruspulp	9.27
Palmpitschilfers	3.90
Geslibt krijt	2.08
Lupinen	11.02
Zonnebloemzaadschroot	12.50
Mervit conc. stieren 48*	0.50
* Met 20 mg/kg flavophospholipol	

Tabel 3-2. Voer- en clenbuterolopname per 14 dagen, totale energie- en clenbuterolopname

Voer	dier 1700 (0.8 µg)		dier 1750 (0.8 µg)		dier 2470 (8 µg)		dier 3032 (8 µg)	
	kg	kVEVI	kg	kVEVI	kg	kVEVI	kg	kVEVI
Maissilage**								
17/2-2/3	266.5	85.0	228.6	72.9	127.1	40.5	158.8	50.6
3/3-16/3	260.5	83.1	239.3	76.4	166.4	52.8	225.7	72.0
Pulp								
17/2-2/3	28.0	6.6	28.0	6.6	15.0	4.0	20.0	4.7
3/3-16-3	28.0	6.6	28.0	6.6	14.0	3.3	14.0	3.3
Krachtvoer								
17/2-2/3	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0
3/3-16/3	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0
Totaal VEVI								
17/2-2/3		133.6		121.5		86.5		97.3
3/3-16/3		<u>131.7</u>		<u>125.0</u>		<u>98.0</u>		<u>117.2</u>
17/2-16/3		265.3		246.5		184.5		214.5
Clenbuterol****	mg		mg		mg		mg	
17/2-2/3	12.90		12.86		130.42		123.92	
3/3-17/3	<u>13.71</u>		<u>13.53</u>		<u>130.46</u>		<u>122.55</u>	
17/2-17/3	26.61		26.39		260.88		246.47	

* VEVI is voedereenheid vleesvee (is een energiemaat)

** Berekende i.c. geanalyseerde gehalten:maissilage: ds 34.1 %, VEVI 319 en DVE*** 15

*** DVE is darm verteerbaar eiwit; is een maat voor de waarde van een voedermiddel als eiwitbron

**** De clenbuterol werd verstrekt vanaf 17/2 's avonds t/m 17/3 's morgens

Tabel 3-3. Gewichten, gewichtsverandering, voederbenutting en clenbuterolopname per kg lichaamsgewicht *

	Dier 1700 (0.8 µg)	Dier 1750 (0.8 µg)	Dier 2470 (8 µg)	Dier 3032 (8 µg)
Gewicht op				
16/2	568 kg	566 kg	574 kg	545 kg
2/3	604 kg	596 kg	584 kg	548 kg
16/3	617 kg	624 kg	600 kg	585 kg
Gewichts- verandering				
16/2-2/3	36 kg	30 kg	10 kg	3 kg
2/3-16/3	<u>13 kg</u>	<u>28 kg</u>	<u>16 kg</u>	<u>37 kg</u>
16/2-16/3	49 kg	58 kg	26 kg	40 kg
Voederbenutting				
16/2-2/3	3.71 VEVI/kg**	4,05 VEVI/kg	8.65 VEVI/kg	32.43 VEVI/kg
2/3-16/3	<u>10.13 VEVI/kg</u>	<u>4.46 VEVI/kg</u>	<u>6.12 VEVI/kg</u>	<u>3.17 VEVI/kg</u>
16/2-16/3	5.41 VEVI/kg	4.25 VEVI/kg	7.19 VEVI/kg	5.36 VEVI/kg
Clenbuterol				
17/2-2/3	0.79 µg/kg***	0.79 µg/kg	8.04 µg/kg	8.10 µg/kg
3/3-17/3	<u>0.80 µg/kg</u>	<u>0.79 µg/kg</u>	<u>7.87 µg/kg</u>	<u>7.73 µg/kg</u>
17/2-17/3	0.80 µg/kg	0.79 µg/kg	7.94 µg/kg	7.79 µg/kg

* Opname per keer voeren, de dieren worden 2 maal per dag gevoerd

** Normaal is de uitdrukking VEVI per kg groei, maar omdat de vulling van het maagdarmkanaal zo'n grote rol gespeeld heeft in deze proef is het beter te spreken van kVEVI per kg lichaamsverandering

*** per kg lichaamsgewicht. Het lichaamsgewicht is het gemiddelde voor de betreffende periode zoals deze berekend is uit de werkelijke gewichten. De clenbuterolopname vond plaats vanaf 17/2 's avonds t/m 17/3 's morgens.

Tabel 3-4. Enkele gegevens rondom het slachten, welke mogelijk invloed hebben op de analyseresultaten en de orgaangewichten

Wegen (één dag voor het slachten)	9.00 uur
Voeren (pulp + clenbuterol + iets silage)	5.00 uur
Transport Lelystad-Harderwijk	7.10-7.40 uur
Gedrag dieren	zeer onrustig, stress!
Slachtvolgorde dieren	3032, 2470, 1750 en 1700
Slachttijdstippen tussen	9.15-10.30 uur
Materiaal verzameld op het slachthuis tussen	9.30-11.30 uur
Spiers uit het karkas gesneden tussen	11.00 en 11.30 uur
Bereiding en fixatie histologische preparaten	9.30 en 11.00 uur
Transport materiaal Harderwijk-Lelystad	11.45-12.15 uur
Urine, gal en oorsmeer in diepvries	12.30 uur
Lever voor vriesdrogen in diepvries bij - 40 °C.	13.30-13.50 uur
Overig materiaal uitprepareren, wegen en bemonsteren in de diepvries bij - 20 ° C.	13.50-16.00 uur 16.00 uur

Tabel 3-5. Gewichten van organen en weefsels (in g en % van het warm geslacht gewicht)

	Dier 1700 (0.8 µg)		Dier 1750 (0.8 µg)		Dier 2470 (8 µg)		Dier 3032 (8 µg)		Controledieren*	
Levend gewicht (kg)	617		624		600		585		638	
Warm geslacht gewicht (kg)	406		406		404		380		381	
Aanhoudingspercentage	65.8		65.1		67.3		65.0		59.7	
Lever Vriesdrogestofgehalte (%)	abs 6563	rel** 1.59	abs 5773	rel 1.42	abs 5552	rel 1.37	abs 5242	rel 1,38	abs	rel
	29.2		29.5		27.2		28.2			
Nier***	500	0.12	432	0.11	409	0.10	422	0.11		
Pancreas	432	0.11	571	0.14	593	0.15	370	0.10		
Thymus	433	0.11	incompleet		190	0.05	310	0.08		
Schildklier [∨]	34.2	8.4	incompleet		incompleet		22.8	6.0		
Bijnier [∨]	8.0	2.0	6.8	1.7	9.7	2.4	7.6	2.0	8.5	2.2
Testikel***	311	0.08	245	0.06	400	0.10	272	0.07	334	0.09
Hypofyse [∨]									2.49	0.75
M. q. fem.	6817	1.68	7442	1.83	7686	1.90	8015	2.11		
M. long. d.	16400	4.04	15606	3.84	14663	3.63	12690	3.34		
M. tri. br.	5030	1.24	4976	1.23	5200	1.29	4612	1.21		

* Gemiddelde van 10 dieren

** Het relatieve gewicht is uitgedrukt in het geslacht gewicht omdat de maagdarmvulling bij de individuele dieren grote verschillen vertoonden

*** Gemiddelde van twee

[∨] Relatief gewicht x 10⁻³

M. q. fem. musculus quadriceps femoris, exclusief vet en knieschijf

M. long. d. Musculus longissimus dorsi (thoracis et lumborum), is niet geheel correct uitgesneden wat het verschil in gewichten tussen de dieren kan verklaren

M. tri. br. Musculus triceps brachii caput longum, inclusief peesplaat

Tabel 3-6. Bijzonderheden m.b.t het vriesdrogen van de levers (zie ook tabel 3-4)

17 maart om 13.45 uur	Plaatsing 12 roestvrijstalen bakken (3 per dier) in de vrieskast bij - 40 °C.
18 maart om 9.00 uur	Plaatsing bakken met levers van de dieren 1700, 1750, en 2470 in de vriesdroger bij ca - 12 °C. Geleidelijke stijging van de temperatuur tot ca 28 °C om +/- 18.00 uur
22 maart om 8.00 uur	Bakken uit de vriesdroger, levers met de papiersnijder verkleind en elke lever verdeeld over 2 plastic zakken, vacuum verpakt en zakken gesealed
22 maart om 8.30 uur	Lever van dier 3032 in vriesdroger, verder als 18 maart bij andere levers
25 maart om 8.00 uur	Lever van dier 3032 uit vriesdroger. Verpakking etc. zie 18 maart

Het vriesdrogestofgehalte van de levers bedroeg voor de dieren 1700, 1750, 2470 en 3032 respectievelijk 29,2, 29,5, 27,2 en 28,2 %

4 HISTOLOGIE

4.1 Inleiding

Bij eerdere proeven met β -agonisten bij geiten en kalveren waren kenmerkende verschillen tussen wel en niet behandelde dieren naar voren gekomen. Met name in de prostaat en de lever waren afwijkingen waargenomen (proefschrift Groot, 1992). Doel van dit onderzoek was de door clenbuterol geïnduceerde veranderingen bij stieren in kaart te brengen en te beoordelen of deze eventueel voor de screening gebruikt kunnen worden.

4.2 Resultaten en discussie

De waarnemingen bij de afzonderlijke dieren zijn weergegeven in Bijlage 1.

Prostaat De controledieren vertoonden zowel in de vries-als de paraffinecoupes het normale beeld van de volwassen stier. Veel uitgerijpt muceus epitheel. Het stroma bestond uit fibromusculair weefsel.

De urethra was bekleed met overgangsepitheel. Een dier had gering verwijde tubuli, en een ander dier vertoonde een ontstekingsreactie rond de urethra, gering verwijde tubuli, wat hyperplasie en enkele vacuolen.

De dieren van de hoge-doseringgroep vertoonden matige tot sterke fibromusculaire hypertrofie, geringe hyperplasie van het klierweefsel, en wat minder uitgerijpt epitheel. Eén dier vertoonde enkele vacuolen.

De dieren van de lage-doseringgroep vertoonden ook matige tot sterke fibromusculaire hypertrofie, geringe hyperplasie en een wisselende hoeveelheid uitgerijpt epitheel. Daarnaast vertoonden de dieren gering verwijde tubuli. Met de immunohistochemische kleuring met RCK 103 viel de sterke aankleuring van het klierweefsel bij de behandelde dieren op in vergelijking met de controles. Fibromusculaire hypertrofie, hyperplasie, een geplooid urethra en sterke aankleuring met RCK 103 zijn verschijnselen die op oestrogene invloed kunnen wijzen. Duidelijke metaplastische woekeringen, zoals bij met oestrogenen behandelde dieren (Groot, 1990), werden niet waargenomen. Duidelijke vacuolisatie zoals bij met clenbuterol behandelde kalveren werd niet waargenomen. Een samenvatting van de resultaten is weergegeven in tabel 4-1.

Lever De controledieren vertoonden nauwelijks afwijkingen. Er werden enkele lymfocyttaire infiltraatjes waargenomen en bij enkele dieren was periportaal geringe fibrose aanwezig. De levers bevatten in het algemeen weinig vet, geringe hoeveelheid ijzer, geen aantoonbaar koper, nauwelijks glycogeen en geen of zeer geringe peroxidase activiteit.

De hoog gedoseerde dieren vertoonden een verschillend beeld. Een dier gaf geringe veranderingen te zien bestaande uit geringe fibrose, wat kernveranderingen (anisokaryosis, dubbelkernen), een matige hoeveelheid vet en geringe koper aankleuring, wat wijde structuur rond de eindplaat en een geringe peroxidase activiteit. Het andere dier vertoonde ernstiger afwijkingen bestaande uit midzonale necrose, matige fibrose periportaal, kernafwijkingen, een matige hoeveelheid vet, een geringe hoeveelheid koper en een matige peroxidaseactiviteit.

De laag gedoseerde dieren vertoonden geringe tot matige fibrose, wat lymfocyttaire infiltraatjes, wat centrolobulaire degeneratie, wat kernveranderingen, een matige hoeveelheid vet, geringe hoeveelheid koper, wat meer glycogeen, wat wijde structuur bij eindplaat en een geringe peroxidaseactiviteit.

Een verhoogd gehalte aan vet en koper en een verhoogde peroxidaseactiviteit is ook bij met clenbuterol behandelde kalveren aangetroffen (Groot, 1992). Veranderingen van de eindplaat is een verschijnsel dat ook bij met beta-agonisten behandelde kalveren is waargenomen, bij kalveren treedt echter activatie van de eindplaat op, terwijl bij deze stieren verwijding van de celbalkjes waarneembaar was. Een samenvatting van de resultaten is weergegeven in tabel 4-2.

Testis en epididymis De controledieren waren op twee dieren na normaal en vertoonden normale spermatogenese. Een dier vertoonde een wat ongelijke ontwikkeling van de kiembuisjes, plaatselijk

hypoplasie met slechts met steuncellen beklede tubuli, naast normaal ontwikkelde tubuli. een ander dier vertoonde plaatselijk wat degeneratie van het kiemepitheel met reuscellen, wijde lumina en fibrose. In de epididymis waren enkele ontstekingshaardjes waarneembaar. Een ander dier had een normale testikel naast een testikel met ontsteking, necrose en dystrofische verkalking. De afwijkende dieren zijn in dit geval niet als controles beschouwd.

De hoog gedoseerde dieren vertoonden degeneratie van het kiemepitheel met wijde tubuli, syncytiale reuscellen, veel fibrillair materiaal en fibrose. De epididymis bevatte weinig sperma en vacuolen in het epitheel. Het epitheel was laag kubisch in plaats van hoog cilindrisch zoals bij de controledieren. Ook de borstelzoom ontbrak en in de lumina was celdebris aanwezig.

De laag gedoseerde vertoonden in de testis wat wijdere lumina en fibrose. De epididymis had laag epitheel zonder borstelzoom en bevatte weinig sperma. Deze verschijnselen kunnen duiden op een direct toxisch effect op de testis of een indirect effect door centrale remming via het hypothalamus/hypofyse systeem.

Pancreas, long, hypofyse, blaas en schildklier De pancreas van de controle dieren en de behandelde dieren toonden geen duidelijke verschillen. Dit gold ook voor longen, hypofyse, blaas en schildklier.

Bijnier De controledieren gaven het normale histologische beeld.

De hoog gedoseerde dieren vertoonden hypertrofie van de zona glomerulosa met vacuolisatie. Daarnaast was wat fibrose aanwezig. Een dier vertoonde ook pyknotische kernen in de zona glomerulosa en wat lymfocyten in de zona fasciculata.

De laag gedoseerde dieren vertoonden ook hypertrofie en vacuolisatie van de zona glomerulosa en wat fibrose. Een dier vertoonde tevens wat pyknotische kernen en wat lymfocyttaire infiltraatjes in de zona fasciculata. De dieren waren bij vervoer erg onrustig wat op stress wijst. Dit kan van invloed zijn op de morfologie van de bijnier.

Retina De controledieren vertoonden het normale histologische beeld.

De hoog gedoseerde dieren vertoonden een versmalling van de korrellagen. Van de laag gedoseerde dieren was van één dier de retina niet goed aangesneden zodat deze niet beoordeeld kon worden, het andere dier had geen afwijkingen. Clenbuterol wordt opgeslagen in de retina, met name in het epitheel. Het is niet duidelijk of de waargenomen veranderingen hiermee verband houden.

Thymus De thymus van de controledieren vertoonde geen afwijkingen.

Bij de hoog gedoseerde dieren vertoonde een dier wat fibrose, terwijl de laag gedoseerde dieren wat vervetting lieten zien. Door het geringe aantal dieren is het moeilijk een trend in de veranderingen te zien en een uitspraak te doen over de betekenis van de waargenomen veranderingen. Opvallend waren de leverafwijkingen en de testisdegeneratie.

Tabel 4-1. Veranderingen in de prostaat

Diernummer histologie	urethra geïnvagineerd	verwijde tubuli	hyperplasie klier-epitheel	vacuolisatie klier-epitheel	fibromusculaire hypertrofie	veel mucus klierweefsel
Controledieren						
R1	-	+	-	-	++	++
R2	-	+	-	-	+	++
R3	-	-	-	-	-	++
R4	-	-	-	-	+	+
R5	-	-	-	-	++	++
R6	-	-	-	-	++	++
R7	-	+	-	-	++	++
R8	-	+	-	+/-	+	++
R9	-	-	-	-	++	++
R10	-	-	+	+/-	++	++
(8 µg) clenbuterol						
R11 (2470)	-	+	-	-	+++	+
R12 (3032)	+	+	+	+	+++	+
(0.8 µg) clenbuterol						
R13 (1700)	+	-	+	-	+++	++
R14 (1750)	++	+	++	-	+++	++

- afwezig
- +/- op een enkele plaats aanwezig
- + in geringe mate
- ++ matig
- +++ in sterke mate

Tabel 4-2. Veranderingen in de lever

Diernummer histologie	zonering	necrose	ontsteking	fibrose	koper	vet	kernafwijkingen	verwijding eindplaat
Controledieren								
R1	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-
R2	+	-	-	+	-	+/-	-	-
R3	+/-	-	+	-	-	+/-	-	-
R4	-	-	-	+/-	-	+	-	-
R5	-	-	-	+	-	+/-	-	-
R6	+	-	+	+	-	-	-	-
R7	-	-	-	-	-	-	-	-
R8	-	-	+/-	+	-	+	-	-
R9	+/-	-	-	+	-	+/-	-	-
R10	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-
(8 µg) clenbuterol								
R11 (2470)	+/-	-	+/-	+	+/-	++	++	-
R12 (3032)	-	++	+/-	+/+++	+	+/+++	+	+
(0.8 µg) clenbuterol								
R13 (1700)	+	-	+/-	+	+	+/+++	+	+
R14 (1750)	+	-	+	+/+++	+/-	++	++	+

5 ANALYTISCHE RESULTATEN

5.1 Inleiding

Het merendeel van de controles op gebruik van β -agonisten vindt plaats in de urine en de lever. Als gevolg van de MRL van clenbuterol in de lever is er onderscheid tussen onderzoek in de bedrijfsfase (urine) en in de slachtfase (lever voor clenbuterol en urine of lever voor andere β -agonisten).

Voor een effectieve controle op toepassing is het nodig die matrix te gebruiken waarin de mogelijk gebruikte stof in hoge concentraties voorkomt. Van clenbuterol is bekend dat er accumulatie in een aantal structuren van het oog optreedt. Door verschillende onderzoeksgroepen zijn in de retina en het pigmenthoudend chorioid van met clenbuterol behandelde kalveren sterk verhoogde concentraties aangetroffen.

Voor de bedrijfsfase is bemonstering van de mest een interessant alternatief voor urine, in verband met de grotere eenvoud van de monsternamen.

Van de bij dit dierexperiment verkregen monsterstroom is een groot aantal onderzocht met een op clenbuterol toegesneden enzymimmunoassay (EIA) als screeningsmethode. De EIA is niet volledig geoptimaliseerd voor de kwantificering.

In dit hoofdstuk worden de resultaten beschreven welke zijn verkregen met de biochemische screeningsmethode (Enzyme Immuno Assay [EIA]) en de bevestiging met GC-MS van het onderzoek van de diverse matrices.

5.2 Resultaten

In de onderstaande tabellen zijn de met de EIA bepaalde waarden samengevat. Om een indruk te geven van de gehalten in vergelijking tot die van Rinke (1990) zijn indicatieve gemiddelden en spreidingen weergegeven.

De gehalten aan clenbuterol in de urine van de stieren vóór de behandeling, tijdens de proefperiode en bij het slachten zijn weergegeven in tabel 5-1.

De gehalten aan clenbuterol in het plasma van de stieren vóór de behandeling, tijdens de proefperiode en bij het slachten zijn weergegeven in tabel 5-2.

De gehalten aan clenbuterol in de faeces van de stieren vóór de behandeling, tijdens de proefperiode en voor het slachten zijn weergegeven in tabel 5-3.

De gehalten aan clenbuterol in spieren, lever, nier en niervet van de stieren zijn weergegeven in tabel 5-4.

De gehalten aan clenbuterol gemeten met GC-MS in de lever, retina/choiroid en faeces zijn weergegeven in tabel 5-5.

Tabel 5-1. Gehalten clenbuterol ($\mu\text{g/l}$, bepaald met de EIA) in urine van met clenbuterol behandelde vleesstieren.

Dagen van behandeling	Dier 1700 (0.8 μg)	Dier 1750 (0.8 μg)	Dier 2470 (8 μg)	Dier 3032 (8 μg)
0*	1.0	1.3	1.0	0.6
1	7.9	6.8	94	90
2	15	8.4	155	45
4	8.2	24	110	119
7	11	16	190	123
14	13	25	105	172
21	14	22	110	177
27	16	38	290	130
28**	13	10	45	36
gemiddeld***	12.3	18.8	137	112
stand. afw.	3.0	10.6	75	52
var. coeff.	24.3 %	56.2 %	55.0 %	47.0 %

* dag voor behandeling

** dag van slachten, urine verzameld op het slachthuis

*** gemiddelde tijdens behandeling

Tabel 5-2. Gehalten clenbuterol ($\mu\text{g/l}$, bepaald met de EIA) in plasma van met clenbuterol behandelde vleesstieren.

Dagen van behandeling	Dier 1700 (0.8 μg)	Dier 1750 (0.8 μg)	Dier 2470 (8 μg)	Dier 3032 (8 μg)
0*	<0.04	<0.04	0.15	<0.04
7	0.21	0.26	3.7	3.0
14	0.28	0.56	2.3	3.5
27	0.26	0.56	4.1	3.6
gemiddeld***	0.25	0.46	3.3	3.4
stand. afw.	0.04	0.17	0.93	0.32
var. coeff.	14.4 %	37.7 %	28.2 %	9.5 %

* dag voor behandeling

** gemiddelde tijdens de behandeling

Tabel 5-3. Gehalten clenbuterol ($\mu\text{g}/\text{kg}$, bepaald met de EIA) in faeces van met clenbuterol behandelde vleesstieren.

Dagen van behandeling	Dier 1700 (0.8 μg)	Dier 1750 (0.8 μg)	Dier 2470 (8 μg)	Dier 3032 (8 μg)
0*	0.50	0.48	0.27	0.44
7	2.6	2.3	27	37
14	2.4	2.8	30	43
27	2.5	3.3	41	42
gemiddeld***	2.5	28	32.7	40.7
stand. afw.	0.10	0.50	7.4	3.2
var. coeff.	4.0 %	17.9 %	22.5 %	7.9 %

* dag voor behandeling

** gemiddelde tijdens de behandeling

Tabel 5-4 Gehalten clenbuterol ($\mu\text{g}/\text{kg}$, bepaald met de EIA) in spieren, lever, nier en niervet van met clenbuterol behandelde vleesstieren.

Materiaal	Dier 1700 (0.8 μg)	Dier 1750 (0.8 μg)	Dier 2470 (8 μg)	Dier 3032 (8 μg)
M. long. d.	0.76	1.21	5.9	12.2
M. tri. br.	0.72	0.77	5.0	9.7
M. q. fem.	0.84	0.94	7.8	14.4
niervet	0.38	0.35	0.56	1.7
lever	3.0	8.5	66	154
nier	0.3	5.5	86	147

Tabel 5-5. Gehalten aan clenbuterol ($\mu\text{g}/\text{kg}$) gemeten met GC-MS

Monstermateriaal	Dier 1700 (0.8 μg)	Dier 1750 (0.8 μg)	Dier 3032 (8 μg)	Dier 2470 (8 μg)
Lever	5.5	11	74	72
Retina/choroid	19	18	170	237
Faeces 0 dagen behandeld	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Faeces 7 dagen behandeld	4.6	2.2	48	74
Faeces 14 dagen behandeld	2.6	4.6	75	73
Faeces 27 dagen behandeld	2.6	6.9	88	81

Een vergelijking van de gehalten verkregen met de screeningsmethode en de GC-MS bevestigingsmethode laat zien dat de gehalten verkregen bij de screening vaak wat lager zijn. Dit komt omdat hier de recovery correctie wat minder is doorgevoerd.

5.3 Discussie

Er is een duidelijk waarneembaar verschil tussen de met de EIA-schermingsmethode waargenomen gehalten in de materialen afkomstig van die dieren behandeld met een lage (0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ l.g.) en een hoge (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ l.g.) dosering clenbuterol.

In tabel 5-6 worden de gemiddelde tijdens de behandeling gevonden gehalten, vergeleken met in de literatuur beschreven gehalten (Rinke, 1990) gevonden tijdens de behandeling van kalveren.

De met de EIA gevonden gehalten komen in redelijke mate overeen met de gehalten gevonden door Rinke in materiaal van behandelde kalveren.

Vanwege de lage gehalten aan clenbuterol in bloedplasma en vlees zijn deze matrices minder geschikt voor de controle. Meer geschikte matrices zijn urine, faeces, lever, nier en retina/chorioid.

Tabel 5-6. Vergelijking van gehalten clenbuterol gevonden in de stierenproef met in de literatuur beschreven waarden bij behandelde kalveren (Rinke, 1990)

Monstermateriaal	Rinke* 0.8 µg/kg l.g.	RIKILT-DLO* 0.8 µg/kg l.g.	Rinke* 5 µg/kg l.g.	RIKILT-DLO* 8 µg/kg l.g.
Urine	5.3	14.7	47	124
Plasma	0.11	0.36	1.0	3.4
Nier	2.7	7.4	33	116
Lever	6.4	5.8	46	110
Spier	0.4	0.9	5.3	9.2

* gemiddeld gehalte clenbuterol (µg/l of kg)

6 LACTAAT- EN CREATINEGEHALTEN IN URINE

6.1 Inleiding

Uit eerder onderzoek kwam naar voren dat de verhouding tussen het lactaat- en creatinegehalte in de urine bij vleeskalveren indicatief zou kunnen zijn voor het gebruik van groeibevorderaars (Rikilt-DLO rapport 91.56). In deze proef is onderzocht of ook bij vleesstieren het lactaat- en/of creatinegehalte beïnvloed wordt door behandeling met clenbuterol.

6.2 Resultaten en discussie

In tabel 6-1 zijn alle bepaalde lactaatgehalten van de vier stieren weergegeven. Tevens zijn de gehalten gemiddeld voor de twee gelijk behandelde dieren per bepalingstijdstip en ook gemiddeld per bepalingstijdstip voor de gehele proefperiode en voor de voorperiode (dieren nog niet behandeld) weergegeven.

Er kan geen invloed van de behandelingen op het lactaatgehalte worden vastgesteld. En in tegenstelling tot de proef met kalveren (RIKILT-DLO rapport 94.22) werd er geen duidelijke invloed van het tijdstip van monsternamen waargenomen. Dit is ook niet zo verwonderlijk want de voeropname en zeker de wateropname is veel meer over de dag verspreid dan bij de vleeskalveren. Daardoor zal de concentratie van de in de urine opgeloste stoffen over de dag gezien minder variëren. Wel vallen de grote individuele verschillen op, zie bijv. dier 1750 met de hoogste waarden op bijna alle meetpunten. De hoeveelheid water die de dieren drinken heeft invloed op de concentratie.

Tabel 6-2 is op soortgelijke wijze samengesteld als tabel 6-1 maar dan voor creatine. Ook hier zijn

geen systematische verschillen tussen de tijdstippen van de dag waarneembaar. Alle dieren reageerden scherp na clenbuterol toediening door een significante daling van de creatinegehalten. Alleen dier 1700 had na drie weken duidelijk hogere gehalten dan in de voorafgaande drie weken. Ook vier weken na behandeling was dit beeld hetzelfde. Verder vallen de zeer lage gehalten na behandeling op t.o.v. de vleeskalveren. Om dit beter te kunnen interpreteren zou men voor beide diercategorieën de 24 uren uitscheiding van creatine moeten kennen, alsmede de omzetting door het dier van creatine in creatinine.

Om de vergelijking met voorafgaande proeven beter te kunnen maken zijn de tabellen 6-3 en 6-4 samengesteld. De gemiddelden in tabel 6-3 worden sterk beïnvloed door enkele zeer hoge L/C-ratio's. De L/C-verhoudingen werden door de clenbuterol-behandeling duidelijk verhoogd. Dier 1700 week hier weer af van de andere drie dieren.

Voor een vergelijking met de dierproef met vleeskalveren (Rikilt-DLO rapport 94.22) zijn ook hier de L/C waarden onderverdeeld in drie klassen nl 0-25, 26-50 en >51. Bij de verdeling over de drie L/C-klassen bleek dat de meeste dieren vóór de behandeling in de klasse 0-25 vielen en na de behandeling in de klasse boven de 50. Ook hier bleek het creatinegehalte meer onderscheidend te zijn dat de L/C-verhouding.

Als het creatinegehalte als criterium zou worden genomen om een verdachte koppel aan te kunnen tonen zullen bij een redelijk aantal vleesstieren creatinewaarden moeten worden gemeten. Ook zal een waarde vastgesteld moeten worden waaronder dieren als verdacht worden beschouwd. Deze waarde zal zeer waarschijnlijk anders liggen dan voor vleeskalveren, althans bij de hier gebruikte doseringen clenbuterol. Het is gewenst bij oudere dieren (vleesstieren) ook het creatininegehalte te bepalen. Het grote voordeel van de vleesstieren is dat het tijdstip van urine verzamelen niet zo kritisch is als voor vleeskalveren, omdat vleesstieren vrijwel de hele dag kunnen eten en drinken.

Tabel 6-1. Lactaatgehalte van de individuele dieren op alle onderzochte tijdstippen en gemiddeld per tijdstip (mg/l).

Diernr.	1700 (0.8 µg)	1750 (0.8 µg)	2470 (8 µg)	3032 (8 µg)	Gem. (0.8 µg)	Gem. (8 µg)
Datum Tijd (dag) (uur)						
11/2 (-6)* 9.00 12.00 15.00	8 6 0.5	29 34 26	3 7 9	0.5 1 0.5	18 20 13	2 4 5
16/2 (0) 9.00 12.00 15.00	32 19 4	12 127 6	3 19 18	6 4 4	22 73 5	4 12 11
24/2 (7) 9.00 12.00 15.00	1 5 2	18 72 32	9 12 10	0.5 0.5 2	10 38 17	5 6 6
3/3 (14) 9.00 12.00 15.00	4 4 2	19 81 52	8 0.5 10	5 8 7	12 42 27	6 4 8
10/3 (21) 9.00 12.00 15.00	5 1 2	7 28 21	6 12 15	4 10 4	6 14 11	5 11 10
16/3 (27) 9.00 12.00 15.00	1 0.5 0.5	9 26 6	0.5 7 3	4 5 0.5	5 13 3	2 6 2
17/3 (28) slachthuis	6	40	5	80	23	42
Gem.** Voorper. Proefper. 9.00 12.00 15.00 Slachthuis	12 3 3 3 6	39 13 52 28 40	10 6 8 10 5	3 7 6 4 80	26 8 28 16 23	6 6 7 7 42

* Aantal dagen na het begin van de behandeling met clenbuterol

** Gemiddelde van alle tijdstippen in de voorperiode (dag -6 en 0) en van de drie tijdstippen in de proefperiode

Tabel 6-2. Creatinegehalte van de individuele dieren op alle onderzochte tijdstippen en gemiddeld per tijdstip (mg/l).

Diernr.	1700 (0.8 µg)	1750 (0.8 µg)	2470 (8 µg)	3032 (8 µg)	Gem. (0.8 µg)	Gem. (8 µg)
Datum Tijd (dag) (uur)						
11/2 (-6)* 9.00 12.00 15.00	1022 634 596	700 1310 674	995 517 958	150 428 93	861 972 635	572 472 526
16/2 (0) 9.00 12.00 15.00	932 1179 849	890 1329 1187	912 1128 978	813 797 1073	911 1254 1018	862 962 1026
24/2 (7) 9.00 12.00 15.00	30 0.5 17	33 39 26	35 28 38	40 36 55	32 20 22	38 32 46
3/3 (14) 9.00 12.00 15.00	10 0.5 81	19 115 19	24 18 26	10 31 14	14 58 50	17 24 20
10/3 (21) 9.00 12.00 15.00	325 276 107	33 248 17	7 192 25	0.5 0.5 0.5	179 150 62	4 10 13
16/3 (27) 9.00 12.00 15.00	49 158 148	17 35 17	27 21 9	18 8 15	33 96 82	22 15 12
17/3 (28) slachthuis	142	22	13	10	82	12
Gem.** Voorper. Proefper. 9.00 12.00 15.00 Slachthuis	869 104 109 88 142	1015 26 53 20 22	915 23 22 24 13	559 17 19 21 10	942 65 81 54 82	737 20 20 22 12

* Aantal dagen na het begin van de behandeling met clenbuterol

** Gemiddelde van alle tijdstippen in de voorperiode (dag -6 en 0) en van de drie tijdstippen in de proefperiode

Tabel 6-3. Lactaat/creatineverhouding van de individuele dieren op alle onderzochte tijdstippen en gemiddeld per tijdstip (ppb/ppm).

Diernr.	1700 (0.8 µg)	1750 (0.8 µg)	2470 (8 µg)	3032 (8 µg)	Gem. (0.8 µg)	Gem. (8 µg)
Datum Tijd (dag) (uur)						
11/2 (-6)* 9.00 12.00 15.00	8 9 1	41 26 39	3 14 9	3 2 5	24 18 20	3 8 7
16/2 (0) 9.00 12.00 15.00	34 16 5	13 96 5	3 17 18	7 5 4	24 56 5	5 11 11
24/2 (7) 9.00 12.00 15.00	33 10000 118	545 1846 1231	257 428 263	12 14 236	289 5923 674	134 221 150
3/3 (14) 9.00 12.00 15.00	400 8000 25	1000 704 2737	333 28 385	500 258 500	700 4352 1381	416 143 429
10/3 (21) 9.00 12.00 15.00	15 4 19	212 1167 1235	847 63 600	8000 20000 10000	114 386 627	4428 10316 5300
16/3 (27) 9.00 12.00 15.00	20 3 3	529 743 353	19 333 333	222 625 33	274 373 178	120 479 183
17/3 (28) slachthuis	42	1818	384	8000	930	4192
Gem.** Voorper. Proefper. 9.00 12.00 15.00	12 117 4502 41	37 572 1115 1389	11 366 355 395	4 2184 5224 2642	24 344 2808 715	8 1275 2789 1518

* Aantal dagen na het begin van de behandeling met clenbuterol

** Gemiddelde van alle tijdstippen in de voorperiode (dag -6 en 0) en van de drie tijdstippen in de proefperiode

Tabel 6-4. Dieren verdeeld over drie L/C klassen (ppb/ppm) in aantallen

Perioden/klassen	0-25	26-50	≥ 51
Voorperiode	13	4	1
Proefperiode 0.8 µg groep	7	2	17
Proefperiode 8 µg groep	3	3	20

7 DISCUSSIE

In een pilotexperiment zijn vleesstieren behandeld met clenbuterol in twee doseringen. Gezien het geringe aantal dieren is het moeilijk definitieve uitspraken te doen over de effecten bij de dieren. Het zoötechnisch gedeelte van de proef is goed verlopen. Het was moeilijk de hoogste dosering clenbuterol door de dieren te laten consumeren. Maar na een kleine week werden na de nodige inspanning ook clenbuterol door de dieren van deze groep volledig geconsumeerd. De mindere vlotte opname kan veroorzaakt zijn door clenbuterolchloride of door de drager (lactose). Mindere voeropname bij dieren die gevoerd worden met clenbuterolhoudend voer wordt in de literatuur vaker genoemd (Brockway et al., 1987).

Het gewichtsverloop van de dieren was grillig. Dit werd mede veroorzaakt door de gebruikte proefopzet, waarbij geen voer werd onthouden voor het wegen, en het verschil in eetpatroon tussen de dieren van beide proefgroepen.

Opvallend was de onrust van de dieren tijdens het laden, lossen en het transport. Iers onderzoek meldt dat clenbuterol zich ophoopt in de retina, wat visusstoornissen kan geven. Een verminderd gezichtsvermogen is hier echter bij de dieren niet vastgesteld.

Histologie In de prostaat waren bij de behandelde dieren geringe veranderingen waarneembaar ten opzichte van de controledieren wat betreft fibromusculaire hypertrofie. Ook leek er wat meer hyperplasie op te treden en was de urethra sterker geplooid. Deze verschijnselen lijken op oestrogene invloed wijzen. De aankleuring met RCK 103, welke basale cellen aankleurt, was sterker dan bij de controles, wat ook kan wijzen op oestrogene invloed. Vacuolisatie zoals bij het kalf wordt gezien (Groot, 1992) was niet waarneembaar. Screening naar gebruik van β -agonisten door prostaatonderzoek bij stieren lijkt met de hier gebruikte methoden niet zinvol.

De levers van de behandelde dieren vertoonden wat meer fibrose, wat meer koper en duidelijk meer vet. De peroxidase activiteit was sterker dan bij de controledieren. Bij de behandelde dieren waren kernveranderingen waarneembaar zoals anisokaryose en dubbelkernen. Een verhoogd gehalte aan

vet en koper en een verhoogde peroxidaseactiviteit is ook bij met clenbuterol behandelde kalveren aangetroffen (Groot, 1992).

De testis van de controledieren vertoonden op twee dieren na een normaal beeld. Van de twee afwijkende dieren vertoonde er één ontsteking in de epididymis, terwijl van de ander één bal verkalkt was en de andere normaal. De behandelde dieren vertoonden alle degeneratie van het kiemepitheel en geremde spermatogenese. De hoge dosering dieren vertoonden sterkere afwijkingen dan de lage dosering dieren. De epididymis vertoonde atrofie van het epitheel van de zaadbuisjes. Dit kan duiden op een direct toxisch effect op de testis of een indirect effect door centrale remming via het hypothalamus/hypofyse systeem.

De bijnieren van de behandelde dieren vertoonden vacuolisatie en hypertrofie van de zona glomerulosa met pyknose en lymfocyttaire infiltratie. Vacuolisatie van de glomerulosa kwam in geringe mate ook bij enkele controledieren voor. De dieren waren bij vervoer erg onrustig wat op stress wijst. Dit kan van invloed zijn op de morfologie van de bijnier.

De retina van de behandelde dieren vertoonden een versmalling van de korrellagen t.o.v. de controles. Clenbuterol wordt opgeslagen in de retina, met name in het epitheel. Het is niet duidelijk of de waargenomen veranderingen hiermee verband houden.

De overige organen vertoonden weinig duidelijke verschillen. Door het geringe aantal dieren is het moeilijk een trend in de veranderingen te zien en een uitspraak te doen over de betekenis van de waargenomen veranderingen. Opvallend waren de leverafwijkingen en de testisdegeneratie.

Analytiek Wat betreft de analytiek was een duidelijk waarneembaar verschil tussen de met de screeningsmethode waargenomen gehalten in de materialen afkomstig van die dieren behandeld met een lage (0,8 µg/kg l.g.) en een hoge (8 µg/kg l.g.) dosering clenbuterol.

De door het RIKILT-DLO met de EIA gevonden gehalten in divers monstermateriaal afkomstig van behandelde stieren komen goed overeen met de gehalten gevonden door Rinke in materiaal van behandelde kalveren. De door het RIKILT-DLO ontwikkelde screeningsmethode voor clenbuterol is toepasbaar voor de controle van andere matrices dan urine. Vanwege de lage gehalten aan clenbuterol in bloedplasma en spiervlees is dit materiaal minder geschikt voor de controle. Geschikte matrices zijn urine, faeces, lever en nier.

Wat betreft het bevestigingsonderzoek met GC-MS waren de hoge gehalten in de retina/choroid opvallend.

Lactaat en creatine en hun ratio Er kon geen invloed van de behandelingen op het lactaatgehalte worden vastgesteld. In tegenstelling tot de proef met kalveren (Rikilt-DLO rapport 94.22) was er geen duidelijke invloed van het tijdstip van monsternamen waarneembaar. De voeropname en zeker de wateropname bij vleesstieren is veel meer over de dag verspreid dan bij de vleeskalveren. Daardoor zal de concentratie van de in de urine opgeloste stoffen over de dag gezien minder variëren. Wel

vallen de grote individuele verschillen op.

Voor creatine zijn ook geen systematische verschillen tussen de tijdstippen van de dag vastgesteld. Alle dieren reageerden scherp na clenbuterol toediening door een significante daling van de creatinegehalten. Alleen dier 1700 had na drie weken duidelijk hogere gehalten dan in de voorafgaande drie weken. Ook vier weken na behandeling was dit beeld hetzelfde. Verder vallen t.o.v. de vleeskalveren de zeer lage gehalten na behandeling op . Om dit beter te kunnen interpreteren zou men voor beide diercategorieën de 24 uren uitscheiding van creatine moeten kennen, alsmede de omzetting door het dier van creatine in creatinine.

De L/C-verhoudingen werden door de clenbuterol-behandeling duidelijk verhoogd. Dier 1700 week hier weer af van de andere drie dieren. Bij de verdeling over de drie L/C-klassen bleek dat de meeste dieren voor de behandeling in de klasse 0-25 vielen en na de behandeling in de klasse boven de 50. Het creatinegehalte bleek meer onderscheidend te zijn dat de L/C-verhouding.

Als het creatinegehalte en eventueel creatinine als criterium zou worden gebruikt om een verdacht koppel aan te kunnen tonen zullen bij een redelijk aantal vleesstieren creatine- en creatinewaarden moeten worden gemeten. Ook zal een waarde vastgesteld moeten worden waaronder dieren als verdacht worden beschouwd. Deze waarde zal zeer waarschijnlijk anders liggen dan voor vleeskalveren, althans bij de hier gebruikte doseringen clenbuterol. Het grote voordeel van de vleesstieren is dat het tijdstip van urine verzamelen niet zo kritisch is als voor vleeskalveren.

LITERATUUR

- Berende, P.L.M.
Zoötechnisch verslag van proef 455.0/01 (clenbuterol bij vier vleesstieren).
Intern IVVO-DLO rapport 365, Lelystad 1993.
- Brockway, J.M., J.C. McRae and P.E.V. Williams
Side effects of clenbuterol as repartitioning agent.
Vet. Rec. 1987; 120: 381-383.
- Elliott, C.T., S.R.H. Crooks, J.G.D. McEvoy, W.J. McCaughey, S.A. Hewitt, D. Patterson and D. Kilpatrick
Observations on the effects of long-term withdrawal on carcass composition and residue concentrations in clenbuterol medicated cattle.
Vet. Res. Comm. 1993; 17:459-468.

- Groot, M.J.
Histological screening for illegal administration of growth promoting agents in veal calves.
Proefschrift Utrecht, 1992.
- Groot, M.J., J.M.P den Hartog, C.J.M. Arts, J.S. Ossenkoppele and E. Gruys
Histological changes in the prostate of veal calves after the administration of natural hormones.
Arch. Lebensmittelhyg. 1990; 41: 37-42.11
- Groot, M.J., P.L.M. Berende, R. Schilt, W. Haasnoot, H. Hooijerink en J.S. Ossenkoppele
De effecten van lage doseringen beta-agonisten al of niet gecombineerd met oestradiol, methylthiouracil en dexamethason bij vleeskalveren: resultaten van de dierproef. RIKILT-DLO rapport 94.22, Wageningen 1994.
- Jaarverslag Algemene Inspectiedienst, 1993.
- Lommen, A., F.A. Huf, M.J. Groot en P.L.M. Berende
Ontwikkeling van fysiologische screenings- en monitoringsmethoden via metaboliet profilering met NMR. RIKILT-DLO rapport 91.56, Wageningen 1991.
- Rinke, L.
Entwicklung analytischer Methoden zur Rückstandkontrolle von β -agonisten und Modellversuche an Mastkälbern zur Beurteilung von Clenbuterolrückständen.
Inauguraal Dissertation München, 1990

BIJLAGE 1

Individuele waarnemingen histologie.

R 1-10: controledieren

R 11 en R 12: hoog gedoseerd

R 13 en R 14: laag gedoseerd

Prostaat

Controledieren:

R 1: matige fibrose, veel slijmbekercellen, RCK 103 -

R 2: geringe fibromusculaire hypertrofie, gering verwijde tubuli, veel slijmbekercellen, RCK 103 -

R 3: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, RCK 103 -

R 4: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, geringe fibromusculaire hypertrofie, RCK 103 -

R 5: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, matige fibromusculaire hypertrofie, RCK 103 -

R 6: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, RCK 103 -

R 7: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, urethra sterk geplooid, gering verwijde tubuli, bacteriën, RCK 103 -

R 8: urethra geplooid, gering verwijde tubuli, enkele vacuolen, geringe fibromusculaire hypertrofie, RCK 103 -

R 9: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, matige fibromusculaire hypertrofie, RCK 103 -

R 10: veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, wat hyperplasie, enkele vacuolen, matige fibromusculaire hypertrofie, ontsteking rond urethra, RCK 103 vrij veel aankleuring

Hoge dosering clenbuterol

R 11: gering verwijde tubuli, matig tot sterke fibromusculaire hypertrofie

, normaal epitheel en veel uitgerijpte muceuze cellen in het epitheel, RCK 103 veel aankleuring

R 12: Urethra geplooid, gering verwijde tubuli, geringe hyperplasie, enkele vacuolen, rare cel*, matige tot sterke fibromusculaire hypertrofie, normaal epitheel en muceuze cellen, RCK 103 veel aankleuring

Lage dosering clenbuterol

R 13: geplooide urethra, geringe hyperplasie, matige tot sterke fibromusculaire hypertrofie

R 14: sterk geplooid onstoken urethra, gering verwijde tubuli, geringe tot matige hyperplasie, sterke fibromusculaire hypertrofie, veel slijmbeker cellen, RCK 103 veel aankleuring

Lever

Controles

R 1: enkele lymfocyttaire infiltraatjes, iets vet, PAS -, DAB-, GR -, LF -

R 2: geringe zonering, geringe fibrose, iets vet, wijde CV, PAS +/-, DAB -, GR +, LF -

R 3: iets zonering, enkel haardje, iets vet, PAS +/-, DAB -, LF -

- R 4: iets fibrose, gering ijzer, gering vet, PAS +/-, DAB -, GR +, LF -
R 5: geringe fibrose, iets vet, wat dubbelkernen, PAS +/-, DAB-, GR +/-, LF -
R 6: geringe zonering, wat lymfocyttaire infiltraatjes, raar haardje*, PAS +/-, DAB -, GR +/-, LF -
R 7: gb, PAS +, DAB -, GR +, LF -
R 8: wat lymfo's en pmk's verspreid, gering vet, PAS +/-, DAB -, GR +, LF -
R 9: iets zonering, geringe fibrose, iets vet, PAS +/-, DAB -, GR ++, LF -
R10: enkele haardjes, geringe fibrose, gering vet, iets koper, PAS +, DAB -, GR ++, LF +/-

Hoge dosering clenbuterol

R11: iets zonering, enkele haardjes, geringe fibrose, iets koper, matig vet, grote kernen dubbelkernen anisokaryosis, wijd rond eindplaat, PAS +/-, DAB +, rond cv, GR ++, LF +

R12: matige degeneratie, matige fibrose, gering koper, matig vet, anisokaryosis, necrose, veel lymfo's, bloedrijk, PAS +/-, DAB ++ (rond cv), GR ++, LF +/-

Lage dosering clenbuterol

R13: geringe zonering, iets ontstekingshaardjes, iets galgangproliferatie, geringe fibrose, gering koper, matig vet. Wijdte ruimte v disse, pl. grote kernen, PAS ++/+, DAB + (cv), GR +++, LF +/-

R14: geringe zonering, gering ontstekingshaardjes, gering-matige fibrose, iets koper, matig vet, wijdte ruimte v Disse bij eindplaat, bloedrijk, pl. grote kernen dubbelkernen, PAS ++/+, DAB +, GR ++, LF +/-.

Testis en epididymis

R1: een bijzonderheden (gb)

R2: plaatselijk degeneratie met lege tubuli, naast normale tubuli

R3: gb

R4: gb

R5: gb

R6: wat wijde lumina en in de epididymis wat weinig sperma

R7: plaatselijk degeneratie, wijde lumina, celklonten (syncytiale reuscellen), fibrose. Epididymis bevat plaatselijk ontstekingshaardjes, celklonten in sperma.

R8: gb, de andere bal was ontstoken met degeneratie en dystrofische verkalking, E: weinig sperma.

R9: gb

R10: gb

R11: degeneratie van het kiemepitheel, wijde tubuli, met celklonten, veel fibrillair materiaal, fibrose.

E: weinig sperma, vacuolen in het epitheel, epitheel laag kubisch i.p.v. hoog cilindrisch..

R12: degeneratie kiemepitheel, wijde lumina, celklonten, fibrose.

E: plat epitheel, geen bortselzoom, celklonten.

R13: wat wijdere lumina, fibrose

E: plat epitheel, weinig sperma.

R14: wijde lumina, celklonten, fibrose

E: plat epitheel geen bortselzoom.

Pancreas

R1: deels beschadigd, deels normaal

R2: idem, rode insluitsels

R3: gb

R4: groot deel beschadigd

R5: deels beschadigd, deels normaal

R6: beschadigd

R7: idem

R8: ontbreekt

R9: idem

R10: deels beschadigd, deels normaal

R11: deels beschadigd, deels normaal

R12: idem

R13: idem

R14: gb

Long

R1: plaatselijk verdikte septa

R2: idem

R3: idem

R4: ontbreekt

R5: als R1

R6: ontbreekt

R7: als R1

R8: ontbreekt

R9: als R1

R10: gb

R11: verdikte septa, fibrine (oedeem)

R12: verdikte septa

R13: idem

R14: sterk verdikte septa, fibrine

Bijnier

R1: ontbreekt

R2: gb

R3: gb

R4: ontbreekt

R5: gb

R6: gb, wat gaterige reticularis

R7: geringe vacuolisatie glomerulosa

R8: idem

R9: gb

R10: geringe vacuolisatie glomerulosa, wat fibrose

R11: geringe vacuolisatie en hypertrofie glomerulosa

R12: vacuolisatie en hypertrofie glomerulosa, fibrose. Pyknose in glomerulosa, lymfocyten en pyknose in fasciculata.

R13: vacolisatie en hypertrofie glomerulosa, donkere cellen onder glomerulosa, wat lymfocyttaire infiltraatjes, pyknose, fibrose.

R14: vacuolisatie en hypertrofie glomerulosa, erg veel zenuwweefsel, fibrose.

Hypofyse

R1: ontbreekt

R2: gb

R3: gb

R4: gb

R5: cystes, verder gb

R6: gb

R7: gb

R8: gb

R9: ontbreekt

R10: gb

R11: veel donkere cellen, fibrose

R12: veel vaten en cysten

R13: gb

R14: cystes, wat fibrose

Retina

R1: gb

R2: gb

R3: gb

R4: gb

R5: gb

R6: gb

R7: gb

R8: gb

R9: gb

R10: gb

R11: versmalling van de korrellagen

R12: idem

R13: ontbreekt

R14: gb

blaas

R1: ontstoken

R2: gb

R3: gb

R4: gb

R5: gb

R6: gb

R7: gb

R8: epitheel ontbreekt

R9: idem

R10: gb

R11: ontbreekt

R12: dun epitheel

R13: matig dun epitheel

R14: matig dik epitheel

Schildklier

R1-6: ontbreekt

R7: inactief beeld, grote follikels plat epitheel

R8-10: ontbreekt

R11: inactief, maar ook kleine follikels aanwezig

R12: gb

R13: vrij actief beeld, veel kleine follikels

R14: gb

Thymus

R1-2: ontbreekt

R3: vrij veel vet

R4: ontbreekt

R5: gb, weinig vet

R6: gb

R7: gb

R8: ontbreekt

R9: gb

R10: gb

R11: gb

R12: gb, wat fibrose

R13: vervet, gb

R14: vervet