

Natuurlijke androgenen, oestrogenen en progestagenen  
in bloed, urine en faeces van jonge runderen

Een literatuurstudie



Bornsesteeg 45  
6708 PD WAGENINGEN  
Postadres: Postbus 230  
6700 AE WAGENINGEN  
Telefoon 08370 - 19110  
Telex 75180 RIKILT



Antonie van Leeuwenhoeklaan 9  
Postbus 1 - 3720 BA Bilthoven  
Telex 47215 rivm nl Telefax 030 - 74 29 71



Postbus 360  
3700 AJ Zeist  
Utrechtseweg 48  
3704 HE Zeist

Natuurlijke androgenen, oestrogenen en progestagenen  
in bloed, urine en faeces van jonge runderen

Een literatuurstudie

Rapport 88.29

April 1988

P.L.M. Berende\*

L.A. van Ginkel\*\*

R. Schilt\*

C.J.M. Arts\*\*\*

R.W. Stephany\*\*

J.M.P. den Hartog\*

\* RIKILT

Postbus 230

6700 AE Wageningen

\*\* RIVM

Postbus 1

3720 BA Bilthoven

\*\*\* CIVO-TNO

Postbus 360

3700 AJ Zeist

rund.0

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur RIKILT

sectorhoofden

hoofd afdeling Biofarmaceutische Analyse

produktcoördinator

EXTERN:

directie DLO

directie VKA

directie VD

RVV

VHI

RIVM

ILOB-TNO

CIVO-TNO

IVVO

IVO

VVDO

Produktschap voor Vee en Vlees

Produktschap voor Veevoeder

voorzitter Begeleidingscommissie Kalvermelkonderzoek

leden van de Werkgroep Hormooncontrole

prof. dr B. Hoffmann, Universität Giessen

INHOUD	blz.
INLEIDING	1
ANDROGENEN IN BLOED	3
OESTROGENEN IN BLOED	7
PROGESTAGENEN IN BLOED	10
ANDROGENEN IN URINE EN FAECES	11
OESTROGENEN IN URINE EN FAECES	11
PROGESTAGENEN IN URINE EN FAECES	17
SAMENVATTING	17
LITERATUUR	21
TABELLEN 1 t/m 11	
BIJLAGEN	
I Totaal steroid oestrogeengehalte in kalver- en runderurine: een evaluatie	
II Resultaten van de bepaling (HPLC/RIA) van vrij oestradiol-17 $\beta$ , progesteron en testosteron in bloedplasma van mannelijke en vrouwelijke vleeskalveren (pilot study)	

## INLEIDING

Sinds 1 januari 1988 is het Nationaal Plan Hormooncontrole in uitvoering. Met dit controleprogramma wordt beoogd, in het kader van onder andere EG verplichtingen, te controleren op het verboden gebruik van hormonen voor mestdoeleinden. Onderdeel van het huidige programma vormt een groot aantal exogene hormonen en thyreostatica. In het Nationaal Plan wordt eveneens melding gemaakt van de van nature voorkomende hormonen, het oestradiol-17 $\beta$ , het progesteron en het testosteron. Voor deze stoffen moet nog worden aangegeven welke normen gehanteerd zullen worden om aan te geven wanneer men met een verboden behandeling te maken heeft.

Het is van belang om over goede controleprogramma's te kunnen beschikken en deze internationaal te kunnen presenteren.

Naast de overheid wordt dit belang heel duidelijk onderschreven door de bedrijfssector. In samenwerking tussen ministeries van L en V en WVC is op instituutsniveau (ILOB/TNO, RIVM en RIKILT) samen met de Begeleidingscommissie Kalvermelkonderzoek van het PvV onderzoek geformuleerd om met name genoemde problematiek bij de vleeskalveren op te helderen. Voordat echter tot concrete invulling van experimenten kon worden overgegaan, was het noodzakelijk naast een gedegen studie van de gemakkelijk toegankelijke literatuur te verrichten ook de grijze literatuur te bestuderen.

In deze literatuurstudie is gebruik gemaakt van de hierna te noemen bronnen met betrekking tot de gehalten aan androgenen, oestrogenen en progestagenen in bloed, urine en faeces bij vleeskalveren. Omdat er niet voldoende gegevens beschikbaar waren voor genoemde hormonen in de 3 genoemde matrices bij vleeskalveren zijn ook literatuurgegevens van mannelijke en vrouwelijke fokkalveren in de leeftijdscategorie van ca. 7 tot ca. 11 maanden verwerkt. De volgende bronnen zijn gebruikt:

- vrij toegankelijke literatuur, welke gepubliceerd is in gerenomeerde tijdschriften,
- gegevens weergegeven in interne rapporten van het RIV(M),
- gegevens uit het laboratorium documentatiemateriaal van het RIV(M), (bijlage I),
- gegevens uit interne rapporten van het ILOB,

- gegevens uit verslagen van proeven zoals deze verstuurd zijn aan de leden van de Begeleidingscommissie Kalvermelkonderzoek van het PvW,
- onderzoekgegevens van ILOB/CIVO-TNO (drs Arts), die binnen afzienbare tijd gepubliceerd worden,
- resultaten van een zeer recent door het ILOB uitgevoerde pilot studie (bijlage II). Het betreft hier onderzoek, waarbij concentraties van vrij oestradiol-17 $\beta$ , testosteron en progesteron in bloedplasma van ca. 170 vleeskalveren en 40 fokkalveren werden bepaald. Alle dieren zijn afkomstig uit instituten en proefbedrijven, dus met bekende achtergrond.

De meeste analyses zijn uitgevoerd met een radioimmunochemische methode (RIA). Als er andere bepalingsmethoden gebruikt zijn dan zal dit steeds nadrukkelijk vermeld worden.

Immunologische bepalingen, waaronder de RIA, zijn goed toepasbare methoden, die naast een hoge gevoeligheid de mogelijkheid bieden grote aantallen monsters in korte tijd te analyseren.

Een belangrijke beperking is vaak de mate van specificiteit van de bepaling voor één component. Op grond van het principe van de methode kunnen altijd kruisreacties optreden. Dit betekent dat stoffen die wat betreft hun chemische structuur (zeer) sterk lijken op de te meten component een vergelijkbare respons kunnen veroorzaken. Vooral bij steroidanalyses, waarbij naast de te bepalen component een aantal sterk lijkende en derhalve kruisreagerende verbindingen aanwezig zijn, moeten hoge eisen aan de monstervoorbewerking (b.v. HPLC) worden gesteld om een betrouwbaar resultaat te kunnen verkrijgen.

In de geraadpleegde literatuur blijkt dat een aantal auteurs met name de kwaliteitsaspecten (kruisreacties en monstervoorbewerking) niet of onvoldoende beschrijft, hetgeen betekent dat niet alle gepubliceerde concentraties op hun juistheid kunnen worden beoordeeld.

In het algemeen kan worden gesteld dat bepalingsmethoden, waarbij zowel een extractie als een chromatografische stap worden uitgevoerd het meest betrouwbaar zijn. Wel speelt de kwaliteit van de chromatografische stap een rol. Een eenvoudige opzuivering met behulp van een sephadex kolom geeft een minder opgezuiverd extract in vergelijking tot een volgens de regelen der kunst uitgevoerde HPLC-opzuivering.

In tabel 11 wordt een samenvatting gegeven van de belangrijkste parameters van de bepalingen welke uitgevoerd zijn door onderzoekers die in dit rapport geciteerd worden. Er is in dit rapport alleen gebruik gemaakt van gegevens van laboratoria, die veel ervaring op dit gebied hebben.

#### ANDROGENEN IN BLOED

Testosteron is kwantitatief de belangrijkste androgene stof. Daarnaast moeten androsteendion en dehydroepiandrosteron genoemd worden. Bij herkauwers is  $17\alpha$ -testosteron de belangrijkste metaboliet (Rico, 1983). Het gehalte in het bloed van een tweede metaboliet namelijk  $5\alpha$ -dihydrotestosteron zou volgens Karg et al. (1976) laag zijn. Bij de door hen gebruikte analysemethode (RIA) voor testosteron was er een hoge kruisreactiviteit met  $5\alpha$ -dihydrotestosteron, maar omdat de gehalten zo laag waren werd hun bijdrage aan de gemeten testosterongehalten verwaarloosd. Uit de gegevens van Arts (CIVO-TNO) blijkt dat deze gehalten bij mannelijke vleeskalveren van ongeveer 5 maanden oud tot ongeveer 10 procent (8-100 pg/ml) van die van testosteron bedragen. In dit overzicht wordt de aandacht voornamelijk gericht op testosteron. Alvorens factoren te noemen die het testosterongehalte in bloedplasma (en/of -serum) beïnvloeden wordt eerst een tabel met (gemiddelde) testosterongehalten bij jonge stiertjes weergegeven (tabel 1). De vermelde concentraties zijn alle met een RIA verkregen en in bijna alle gevallen is de bepaling in plasma uitgevoerd. Desondanks zijn deze waarden onderling moeilijk vergelijkbaar omdat bepaalde cijfers betrekking hebben op een (beperkt) aantal dieren, waarbij slechts éénmaal per week of maand bloed verzameld is op één tijdstip van de dag, terwijl andere cijfers berekend zijn voor 8 à 10 waarnemingen per dier per dag. De laatste kolom is toegevoegd om de cijfers beter te kunnen wegen. In tabel 1 vallen de grote verschillen op die er tussen de gemiddelde gehalten van de verschillende onderzoekers bestaan. Globaal kan men stellen dat de gehalten tot een leeftijd van ca. 4 maanden langzaam toenemen. Van ca. 4 tot ca. 7 maanden nemen ze sneller toe en vanaf een leeftijd van 7 maanden treedt een grote variatie op. Het betreft niet alleen variaties in gemiddelde testosterongehalten tussen dieren, maar ook bij één dier van dag tot dag en zelfs binnen

24 uur. Enkele richtgetallen die in de literatuur genoemd worden zijn < 1 ng/ml tot een leeftijd van 4 maanden, 1 tot 4 ng/ml van 4 tot 7 maanden en 1 tot 10 ng/ml (en nog hoger) bij dieren van 7 maanden en ouder. Door Karg et al. (1976) werden deze perioden duidelijk waargenomen. Zij wezen er op dat dit sterk diergebonden is. Zoals bekend zijn niet alle dieren op dezelfde leeftijd geslachtsrijp. Tot deze leeftijd zijn de testosterongehalten laag, ze nemen langzaam toe tot het moment van geslachtsrijpheid onder invloed van de toenemende testisontwikkeling.

Vanaf de puberteit is de testosteronproduktie sterk verhoogd. Dit houdt nog niet in dat er vanaf dat moment constant hoge testosterongehalten in het bloed aanwezig zijn. De afgifte van testosteron aan het bloed vindt pulsgewijs plaats gedurende het etmaal (Thibier, 1976). Dit verklaart voor een groot deel de grote variabiliteit in de gevonden waarden.

Bij vergelijking van gehalten van verschillende rassen moet rekening gehouden worden met het feit dat bepaalde rassen eerder geslachtsrijp zijn dan andere. Daardoor zullen op een bepaalde leeftijd de testosterongehalten van het ene ras anders zijn dan van het andere ras. Dit betekent dat moet worden uitgegaan van een representatieve monsternamen bij alle rassen. Bijvoorbeeld door op een bepaald (vast) tijdstip bij een groot aantal dieren bloedmonsters te nemen of bij een beperkt(er) aantal frequent per etmaal te bemonsteren, bijvoorbeeld om de 15 à 20 minuten (Hoffmann et al. (1986 en 1987), Lacroix en Pelletier (1979), Renaville et al. (1983) en Sunby en Velle (1980)). Bij éénmaal per dag bemonsteren bestaat de mogelijkheid dat dieren van de betreffende koppelpaar eenzelfde hormoonprofiel zouden kunnen laten zien. Er kan een zogenaamde synchronisatie per koppel optreden. De gemiddelde gehalten van de groepen dieren bij Hoffmann et al. (1986) en Renaville et al. (1983) wijzen in die richting. Hoffmann en haar collega's vonden bij alle rassen de laagste waarden om 15.00 uur, Lacroix en Pelletier (1977) om ca. 12.00 uur en bij Renaville tussen 9 en 12 uur. In het onderzoek van Hoffmann daarentegen werden hoge waarden vastgesteld tussen 9 en 12 uur. Renaville en zijn medeonderzoekers vonden de hoogste waarden tussen 12.30 en 14.30 uur.



In tegenstelling tot laatstgenoemde onderzoekers vonden Karg et al. (1976) 2 pieken bij kalveren van 20 tot 40 weken oud, namelijk tussen 8 en 10 uur en tussen 14 en 16 uur. Het is niet precies bekend wat de oorzaak is van het verschijnen van een piek op een bepaald tijdstip van de dag. Factoren die mede de afgifte van testosteron aan het bloed kunnen beïnvloeden zijn: tijdstip van licht worden, lengte van (dag)-licht, tijdstip van voeren en onrust zoals het verschijnen van de verzorger of stress zoals mogelijk bij bloedprikken plaatsvindt. Daarnaast worden door verschillende auteurs nog andere factoren genoemd die direct of indirect (via beïnvloeding van het tijdstip van het bereiken van de geslachtsrijpheid) invloed hebben. Bamberg et al. (1978) wezen er op dat het testosterongehalte bij Fleckvieh gedurende het eerste levensjaar van de dieren niet zo sterk steeg in vergelijking met Braunvieh. Het verstrekken van een energierijker voer gaf bij de dieren zeker geen hogere gehalten te zien. Uit hun publicatie valt echter niet op te maken of de stiertjes die een energiearm voer kregen, hiervan meer opnamen. Dit kan betekenen dat de verschillen in energieopname tussen de beide groepen niet zo groot hoeven te zijn. Wel wordt de voeding aangemerkt als een factor die het hormoongehalte kan beïnvloeden (Hemaida et al., 1985). Of dit ook geldt voor West-europese omstandigheden is twijfelachtig. Onder extreme omstandigheden zal dit zeker invloed hebben op het tijdstip waarop de puberteit intreedt. De invloed van het ras op het tijdstip van intreden van de puberteit wordt door Lunstra et al. (1978) duidelijk geïllustreerd. Verschillende vleesrassen en kruisingen daarvan werden onder dezelfde condities gehouden voor wat betreft voeding, huisvesting, verzorging, behandeling enz. In de leeftijdsperiode 7 tot 13 maanden werden significante verschillen in testosterongehalten in het serum aangetoond. Ook het seizoen heeft een duidelijke invloed op genoemde gehalten (Hoffmann et al., 1986). Aangenomen wordt dat dit voornamelijk bepaald wordt door het licht-donker ritme, i.c. de lengte van de dag. Secchiari et al. (1976) konden echter geen invloed van het seizoen vaststellen. Kozumplik (1981) vermeldde nog de invloed van sexuele stimulatie. De grote individuele verschillen, waarop eerder in dit rapport reeds gewezen is, komen ook duidelijk naar voren in de proef van Renaville et al. (1983) met dikbilstieren. Deze dieren werden op dezelfde wijze

gevoerd en onder gelijke omstandigheden gehouden. Zij werden op grond van het tijdstip waarop testosteronpieken in het bloed werden aangetoond ingedeeld in diverse groepen (130, 140 enz. t/m 190 en 191 dagen leeftijd en ouder). De dieren van de eerste groep hadden op een leeftijd van 130 dagen al een gemiddeld gehalte van 1,5 ng/ml, terwijl dit gehalte bij de 190 dagen groep pas na 190 dagen bereikt was. Het beperkt aantal gegevens van vleeskalveren laat zien dat de testosterongehalten bij deze categorie in dezelfde orde van grootte liggen als de gehalten bij fokstiertjes van dezelfde leeftijd. Tegenwoordig worden vleeskalveren langer aangehouden dan de vleeskalveren waarvan de gegevens in tabel 1 vermeld staan.

In tabel 2 (zie ook bijlage II) worden de belangrijkste analyseresultaten samengevat van het recent uitgevoerde ILOB-TNO onderzoek. Het betreft dieren van de proefstallen van genoemde firma's, waarvan door een der auteurs (Berende) bloed verzameld is op de bedrijven en op het slachthuis. Van een grote koppel dieren (Trouw Intern.) is een gedeelte van de monsters verzameld in de bedrijfsfase en een kleiner deel, van dezelfde koppel, verzameld bij het slachten. In deze monsters werden vrij oestradiol-17 $\beta$ , vrij testosteron en progesteron bepaald. Met betrekking tot de testosterongehalten bij mannelijke vleeskalveren valt de grote variatie tussen de individuen op. Verder valt op dat het gemiddeld testosterongehalte bij de dieren in de slachthuisfase drastisch verlaagd is en dat de extreem hoge waarden niet of althans veel minder voorkomen. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat dieren bij het transport naar het slachthuis en tijdens het verblijf in het slachthuis aan stress onderhevig zijn. In de literatuur wordt stress vaak genoemd als zijnde een van de oorzaken voor de schommelingen in testosterongehalte. Hierbij wordt niet vermeld in welke richting het gehalte wordt beïnvloed. De invloed op de bepaling door mogelijke verschillen tussen veneusbloed (bedrijfsfase) of gemengd arterieel en veneusbloed wordt door de auteurs niet groot geacht.

Bij vrouwelijke vleeskalveren was testosteron in het bloedplasma goed aantoonbaar. De gehalten waren uiteraard belangrijk lager dan die bij stierkalveren. De gemiddelde gehalten van de dieren van de twee proefbedrijven lagen in dezelfde orde van grootte van die van fokkalveren

die iets ouder waren. Bij de vleeskalveren kwamen bij enkele dieren iets meer hoge waarden voor.

Uit ILOB onderzoek (proeven 25.30 en 25.040) kwam naar voren dat het gemiddelde testosterongehalte daalt na een implantatie met oestradiol/testosteron. Deze daling veroorzaakte 4 weken na implanteren een halvering van de waarde van dag 0 (daling van ca. 1,0 - 1,7 naar 0,4 - 0,7 ng/ml). Het testosterongehalte van de controlegroep bedroeg 4 weken na implantatie van de proefgroepen 2,4 ng/ml met een hoogste en laagste waarde van respectievelijk 0,2 en 6,0 ng/ml.

#### OESTROGENEN IN BLOED

Van mannelijke (fok)kalveren is over oestrogenen minder literatuur beschikbaar dan over androgenen. Echter ook mannelijke dieren produceren oestrogenen.

Oestrogenen komen in het bloed in vrije en gebonden vorm (conjugaat) voor. De oestrogenen bij runderen zijn oestradiol-17 $\beta$ , oestradiol-17 $\alpha$ , oestron en oestriol. Verschillende auteurs (Boursier et al., 1983; Rattan en Riis, 1982; Richou-Bac et al., 1976; Silberzahn et al., 1982) vonden waarden van minder dan 10 pg/ml vrij oestradiol-17 $\beta$  in bloedplasma. Dit komt overeen met de resultaten van ILOB proeven (25.25; 25.30 en 25.35). In ILOB proef 25.040 kon in bloedplasma van mannelijke vleeskalveren geen vrij oestradiol-17 $\beta$  aangetoond worden. De analyses werden uitgevoerd met een HPLC/RIA techniek met een detectielimiet van kleiner dan 10 pg/ml. Genoemde analysetechniek is ook gebruikt in de eerder genoemde pilot studie, waarvan de resultaten in bijlage II genoemd worden. Alle vrij oestradiol-17 $\beta$  waarden voor mannelijke vleeskalveren lagen beneden genoemde detectiegrens. Bij vrouwelijke vleeskalveren kwam slechts één dier royaal boven deze grens (21 pg/ml). Omdat ook het progesteron en testosteron gehalte bij dit dier hoog was, is navraag verricht naar gedrag, uiterlijk en eventueel behandeling met diergeneesmiddelen. Genoemde factoren konden geen verklaring geven van deze hoge gehalten. Ook de gehalten van de iets oudere fokkalveren bleven beneden de 10 pg/ml, behalve twee dieren die op de dag van bloedmonstername tochtig waren (16 pg/ml). In tegenstelling tot genoemde auteurs vond Schopper (1981) bij vleeskalveren uit ILOB proeven wel waarden boven de 10 pg/ml. Hij gaf in zijn dissertatie een gemiddelde van 11 pg/ml op met een spreiding van

0 tot 80 pg/ml. De hoge waarden worden waarschijnlijk veroorzaakt door het ontbreken van een voorzuivering. Ook Richou-Bac et al. (1976) vermeldden waarden van boven de 100 pg/ml bij enkele procenten van de door hen onderzochte bloedmonsters van vleeskalveren. Het betrof hier praktisch monsters van dieren die vrijwel zeker met anabole stoffen behandeld waren. Als dieren met een combinatie van anabole stoffen behandeld worden is de kans heel groot dat dit preparaat o.a. oestradiol-17 $\beta$  bevat. Na behandeling met een combinatie preparaat, bijvoorbeeld oestradiol/trenbolon-acetaat\* is een duidelijk hoger gehalte aan vrij oestradiol-17 $\beta$  aan te tonen. Hoffmann (1983) vond waarden tussen de 13 en 20 pg/ml. Richou-Bac et al. (1978) vonden bij behandeling met hetzelfde preparaat veel hogere waarden nl. tussen 50 en 150 pg/ml. Maar ook de gehalten bij de controledieren lagen echter veel hoger dan bij de controledieren van Hoffmann, nl. tussen < 30 tot 60 pg/ml. Bij de ILOB proeven met mannelijke vleeskalveren die op 11 weken leeftijd met oestradiol/trenbolon geïmplanteerd werden stegen de gehalten niet tot zulke hoge waarden (tabel 4). Eén, 3 en 5 weken na implantatie varieerden de gemiddelde gehalten in de proeven 25.30, 25.039 en 25.040 tussen resp. 29-33, 20 en 15-43 pg/ml. De waarden van de controledieren bedroegen enkele picogrammen per ml of lagen beneden de detectiegrens. Wel was er een grote individuele variatie, die ook sterk tot uitdrukking kwam in de cijfers van ILOB-proef 25.25, zoals deze door Schopper bepaald zijn (tussen 80 en 320 pg/ml enkele weken na implantatie). Hogere waarden werden gevonden door Boursier et al. (1983), 250 pg/ml 6 dagen na een i.m. injectie met oestradiol-benzoaat, terwijl de gehalten van de controledieren slechts enkele picogrammen per ml bedroegen. Na een injectie kunnen de stoffen mogelijk sneller aan het bloed worden afgegeven dan na een implantatie met tabletten. De gehalten zullen derhalve na injectie na het bereiken van een hoger maximum (kort na de injectie) dan ook sneller dalen.

\* Alle oestradiolhoudende implantatiepreparaten gebruikt in de Nederlandse, Duitse en Franse proeven bevatten vrij oestradiol-17 $\beta$ . Als het in een vorm van een ester gebruikt is wordt dit vermeld. In het vervolg wordt deze combinatie aangegeven als oestradiol/trenbolon. Verder zullen de volgende afkortingen gebruikt worden voor de implantatiepreparaten: E = 200 mg oestradiol-17 $\beta$ , E/Te = 20 mg oestradiol-17 $\beta$ /200 mg testosteron, E/Pr = 20 mg oestradiol-17 $\beta$ /200 mg progesteron en E/Tr = 20 mg oestradiol-17 $\beta$ /140 mg trenbolon-acetaat.

Voor vrouwelijke fokkalveren werden door Heitzman et al. (1979) lage waarden voor oestradiol-17 $\beta$  vermeld. Tot een leeftijd van 30 weken zouden deze minder dan 10 pg/ml bedragen. Behandeling met oestradiol/trenbolon resulteerde in een sterke stijging van de gehalten. Maximale waarden, tussen 110 en 170 pg/ml, werden 4 weken na implantatie gevonden.

Naast het oestradiol-17 $\beta$  komen een aantal metabolieten in de verschillende lichaamsvloeistoffen en weefsels voor. Hoffmann (1983) en Schopper (1981) hebben onderzoek gedaan naar de geconjugeerde en vrije vorm van oestradiol-17 $\beta$ , oestradiol-17 $\alpha$  en oestron. Het onderzoek betrof onder andere onbehandelde en met anabole stoffen behandelde vleeskalveren. Vijf weken na behandeling werden de volgende waarden gevonden (in pg/ml):

	Hoffmann		Schopper	
	Controle	Behandeld*	Controle	Behandeld**
oestradiol-17 $\beta$ vrij	13	20	19	78
oestradiol-17 $\beta$ geconjugeerd	6	7	6	18
oestradiol-17 $\alpha$ vrij	47	8	47	37
oestradiol-17 $\alpha$ geconjugeerd	87	157	87	273
oestron vrij	13	17	13	18
oestron geconjugeerd	8	80	8	37

\* implantatie met oestradiol/trenbolon

\*\* continu-infuus met oestradiol-17 $\beta$

In ILOB proef 25.039 werden voor vrij en geconjugeerd oestradiol-17 $\beta$  de volgende waarden gevonden, < 3 respectievelijk 3 voor controle-dieren en 32 respectievelijk 12 pg/ml, 5 weken na een implantatie met oestradiol/trenbolon. Meyer et al. (1985) hebben het totaal steroid oestrogeengehalte in bloed bij mannelijke en vrouwelijke vleeskalveren van 0 tot 18 weken leeftijd bepaald. Het betrof zowel controle, alsook met oestradiol bevattende preparaten behandelde dieren. Hun conclusie luidde dat het totaal steroid oestrogeengehalte in bloed een betere maatstaf is dan genoemde gehalten in faeces, omdat de spreiding in de gehalten in bloed minder is.

Het is echter niet mogelijk op grond van het totaal steroid oestrogeengehalte in bloedplasma een individueel behandeld dier eenduidig aan te wijzen. Indien in een koppel kalveren meerdere dieren met hoge waarden ( $> 1000$  pg/ml plasma) voorkomen dan geeft dit een redelijke indicatie dat de kalveren waarschijnlijk behandeld kunnen zijn.

#### PROGESTAGENEN IN BLOED

De belangrijkste progestatieve stoffen zijn progesteron en in mindere mate  $17\alpha$ -hydroxyprogesteron. De belangrijkste metaboliet bij deze diersoort is pregnaandiol (Rico, 1983). In de humane endocrinologie is pregnaandiol de belangrijkste metaboliet van progesteron. Pregnaandiol en aetiocholanolon worden ook nog genoemd. Er is zeer weinig gepubliceerd over progesterongehalten bij mannelijke kalveren. Er zijn wel publicaties beschikbaar over progesterongehalten bij vrouwelijke (fok)kalveren. Hoffmann et al. (1976), Hoffmann en Karg (1975) en Hoffmann (1983) kwamen op grond van eigen onderzoek en op grond van literatuurgegevens tot de conclusie dat het progesterongehalte beneden de  $0,1$  ng/ml ligt. De gehalten bij vergelijkbare met progesteron behandelde dieren varieerden, 5 tot 8 weken na implantatie, tussen  $< 0,1$  en  $0,5$  ng/ml plasma (gemiddeld  $0,15$  ng/ml). Bij vrouwelijke vleeskalveren (leeftijd?) varieerde het progesterongehalte tussen  $< 0,1$  en  $0,35$  ng/ml. In ILOB proef 25.038 bedroeg het gehalte bij mannelijke vleeskalveren van 18 en 22 weken oud respectievelijk  $0,05$  en  $0,08$  ng/ml. De gehalten van de groepen dieren op een leeftijd van 16 weken geïmplant met oestradiol/progesteron bedroeg op genoemde tijdstippen respectievelijk  $0,23$  en  $0,28$  ng/ml.

De gehalten in bloed van de mannelijke en vrouwelijke vleeskalveren van de recente ILOB/TNO studie lagen gemiddeld hoger dan de literatuurgegevens. In tegenstelling tot testosteron lagen de gehalten van zowel de mannelijke als de vrouwelijke vleeskalveren hoger in de monsters verzameld op het slachthuis (tabel 2). De progesterongehalten in plasma van de fokkalveren (7-11 maanden oud) kwamen goed overeen met de verwachte waarden (tabel 3). Hierbij moet opgemerkt worden dat de pinken tot 23 dagen na bloedmonstername dagelijks op tochtigheidsverschijnselen gecontroleerd zijn. (Opm. de dieren liepen in een loopstal). Met betrekking tot de gevonden en de te verwachten waarden

waren er twee uitzonderingen, namelijk volgnummer 37 (stille bronst ?) en volgnummer 38 die een lage waarde zou moeten hebben 3 dagen na tochtigheid.

#### ANDROGENEN IN URINE EN FAECES

Testosteron en epi-testosteron (=  $17\alpha$ -testosteron) worden bij herkauwers voornamelijk via de faeces uitgescheiden (Rico et al. 1981 en Schopper, 1981). Testosteron zou volgens Schopper voornamelijk in de vrije vorm via de faeces uitgescheiden worden. Hij beschrijft een proef met ossen, waarbij testosteron werd toegediend. Het bleek dat in deze proef 90% via de faeces uigescheiden werd en 8,4% via de urine. Voor vleeskalveren zijn nagenoeg geen literatuurgegevens beschikbaar. Wel zijn bij onderzoek  $17\alpha$ -testosteron en tetrahydrotestosteron in urine van vleeskalveren aangetoond (afd. Biofarmaceutische Analyse, RIKILT).

#### OESTROGENEN IN URINE EN FAECES

Oestrogenen komen, evenals in het bloed, in de urine en in de faeces voor in vrije en gebonden vorm. Ook hier zijn de belangrijkste verbindingen oestradiol- $17\alpha$ , oestradiol- $17\beta$ , oestron en oestriol. Volgens Velle (1963 en 1972) is het oestradiol- $17\alpha$  in urine bij herkauwers kwantitatief de belangrijkste metaboliet. Dit geldt volgens Bouffault en Willemart (1987) ook voor vleeskalveren. Van Erb et al. (1977) toonden aan dat bij volwassen melkgevende koeien ten minste 70% van de totale hoeveelheid oestrogenen in de urine uit oestradiol- $17\alpha$  bestaat. Deze cijfers komen overeen met die van ILOB proef 25.34 met mannelijke vleeskalveren. Hier werden de volgende percentages oestrogenen gevonden: oestron 15%, oestradiol- $17\beta$  5% en de rest (80%) zal mogelijk wel oestradiol- $17\alpha$  geweest zijn. Bij de dieren die met oestradiol/testosteron geïmplanteerd waren veranderden de verhoudingen niet wezenlijk, namelijk respectievelijk 16,5, 7,5 en 76%. Volgens Rico (1983) komen 30 tot 50% van genoemde oestrogenen in urine in glucuronide of sulfaatvorm voor. Bij een proef waarbij radiogelabeld oestradiol bij jonge kalveren werd geïmplanteerd, bleek dat ongeveer 90% van de totale activiteit in de urine als ongeconjugeerde steroïden voorkwam (Riis en Suresh (1977)).

Deze cijfers kloppen niet met het onderzoek van het ILOB-TNO met ossen en vaarzen (Arts, niet gepubliceerde gegevens). Zo kwam vrij oestradiol-17 $\beta$  niet voor in urine van controledieren en van dieren die met oestradiol/trenbolone behandeld waren. Ook vrij oestradiol-17 $\alpha$  kwam bij controledieren niet voor, wel kon vrij oestradiol-17 $\alpha$  aangetoond worden in urine bij behandelde dieren met een zeer hoog geconjugeerd oestradiol-17 $\alpha$  gehalte.

In de faeces echter worden oestrogenen voornamelijk in de vrije vorm uitgescheiden (Velle, 1976). Volgens Velle (1963) is bij herkauwers de uitscheiding via de faeces kwantitatief even belangrijk als via de urine. Bij het onderzoek van Huis in 't Veld et al. (1976) met (slechts 2) vleeskalveren kwam dit ook naar voren. Zij stelden echter dat bij vleeskalveren de oestrogeenuitscheiding via de urine kwantitatief het belangrijkste is, ofschoon er van dier tot dier grote verschillen bestaan. Bij dit onderzoek was de uitscheiding van oestrogenen via de faeces bij enkele dieren bijna evengroot als via de urine. Ook Bouffault en Willemart (1987) wezen op de onregelmatige uitscheiding via de urine van oestradiol-17 $\alpha$  door vleeskalveren, dat wil zeggen grote variatie binnen en tussen de dieren. Riis en Suresh (1977) behandelden kalveren tussen de 6 en 12 weken leeftijd met radioactief gemerkt oestradiol. Van het gelabelde materiaal werd 1/3 via de urine en 2/3 via de faeces uitgescheiden.

Ivie et al. (1986) vonden bij hun proeven met ossen, waarbij radioactief gelabeld oestradiol via een injectie werd toegediend, dat 42% via de urine en 58% via de faeces uitgescheiden werd. In ILOB proef 25.32 werd in de faeces en urine alleen naar oestradiol-17 $\beta$  gekeken. Hier bleek in de faeces van onbehandelde mannelijke vleeskalveren 3 maal zoveel oestradiol-17 $\beta$  aanwezig te zijn in vergelijking tot de urine (gemiddeld respectievelijk 0,17 en 0,05 ng/ml).

Eén van de centra die ook bepalingen in faeces uitgevoerd heeft is de groep van Karg in München (Meyer et al., 1985). Deze groep kwam op grond van de analyseresultaten van 799 monsters faeces van "vlees"-kalveren (m en v) van 0 tot 18 weken leeftijd tot de conclusie, dat het totaal steroid oestrogeengehalte geen goede maatstaf is om clandestien gebruik van oestrogeenbevattende preparaten aan te tonen. De eerste weken na behandeling is dit gehalte wel verhoogd, maar er zijn ook controledieren die een hoog steroid oestrogeengehalte hebben.



Als grens kan het voorkomen van hoge waarden (bijvoorbeeld > 300 ng/g faeces) bij meer dan 5% van een bepaalde koppel als waarschijnlijke maat voor het behandeld zijn van de dieren worden gesteld. Op grond van één individuele waarde kan geen uitspraak worden gedaan. Opmerkelijk is dat bij pasgeboren kalveren in het meconium zeer hoge waarden voorkomen (15.800 tot 67.000 ng/g).

De gehalten van de diverse hormonen in de urine kunnen variëren afhankelijk van de wijze van monsternamen. Men heeft in principe te maken hebben met 3 soorten urines:

- a. Urinemonsters verkregen uit een hoeveelheid spontaan geloosde urine die op een bepaald moment van de dag geproduceerd is of urinemonsters uit de blaas verkregen op het slachthuis.
- b. Urinemonsters verkregen uit een hoeveelheid urine welke gedurende 12 of 24 uur geproduceerd is. Voor deze monsternamen moeten de dieren in een balansopstelling staan.
- c. Urinemonsters rechtstreeks genomen uit de blaas van de dieren. Dit monster kan verkregen worden via een blaaskatheter.

Volgens Vogt et al. (1972) en Huis in 't Veld en Both-Miedema (1974) is de variatie in oestrogeengehalte van dag tot dag groter in spontaan verkregen urinemonsters dan in 24 uren urinemonsters. De spreiding in spontaan verkregen urinemonsters zou mogelijk minder kunnen worden als de gehalten gerelateerd worden aan het gehalte van de in de urine uitgescheiden creatinine. Volgens RIVM onderzoek (Stephany, ongepubliceerd werk) levert dit vaak onbevredigende resultaten op, mede tengevolge van de instabiliteit van creatinine in runderurine (zie ook bijlage I).

In de tabellen 5 t/m 10 worden de resultaten van onderzoek van urine op oestrogenen bij vleeskalveren weergegeven. De hier vermelde cijfers hebben betrekking op onderzoek met onbehandelde en met anabole stoffen behandelde mannelijke vleeskalveren van 11 tot 17 weken oud. Ondanks de overeenkomst in diersoort, leeftijd, voeding en huisvesting zijn de analyseuitkomsten niet zonder meer met elkaar te vergelijken. De resultaten in de tabellen 6 t/m 8 en 10 zijn gebaseerd op fluorimetrisch onderzoek, terwijl de cijfers vermeld in de andere tabellen met behulp van een RIA verkregen zijn. Ondanks het feit dat de cijfers in de tabellen 5 en 9 met eenzelfde analysetechniek verkregen zijn, zijn verschillen van een factor 10 aanwezig.

Op grond van onderzoek (tabel 5) kwamen Bouffault en Willemart (1987) tot de conclusie dat de door velen als maximaal geaccepteerd niveau van 10 ng/ml aan totaal steroid oestrogenen voor controledieren, te hoog is. Op drie tijdstippen overschreed een controledier zelfs de 20 ng/ml oestradiol-17 $\alpha$ . Bij het onderzoek van Schopper (1981) kwam dit niet voor. Bij het onderzoek van Huis in 't Veld en Both-Miedema werd de grens van 10 ng/ml zelden overschreden.

Laatstgenoemden berekenden de gemiddelde totaal steroid oestrogeengehalten op basis van een groot aantal (ILOB) proeven op 2,1; 3,9 en 5,0 ng/ml bij mannelijke vleeskalveren, van respectievelijk 11, 14 en 17 weken oud. De variatie was, ook bij 24 uren urine, groot en bedroeg 2 tot 15 ng/ml, met een tendens tot iets hogere waarden bij oudere dieren. Van een aantal andere ILOB proeven zijn ook de steroid oestrogeengehalten bepaald (zie tabel 1 in bijlage I). In deze tabel zijn de gemiddelde waarden van de onbehandelde dieren uit de controlegroepen berekend. Hiernaast zijn de gegevens van de met anabolica behandelde groepen vermeld waarvan de gemiddelde waarden en de spreiding gelijk waren aan die van de controlegroepen. De gemiddelde, minimum en maximum gehalten voor deze "onbehandelde" mannelijke vleeskalveren waren respectievelijk 9,5, 2,3 en 15,9 ng/ml. Deze waarden liggen hoger dan de eerder genoemde gehalten van Huis in 't Veld, mogelijk als gevolg van het feit dat laatstgenoemde gehalten jaren later zijn bepaald. Tot nu toe zijn de oestrogeengehalten in urines van "onbehandelde" controlekalveren besproken. In de tabellen 6 t/m 10 staan ook waarden vermeld van dieren die met anabole stoffen behandeld zijn. De eerste weken na behandeling is het totaal steroid oestrogeengehalte duidelijk verhoogd. Bij een implantatie met oestradiol/testosteron, oestradiol/progesteron en met oestradiol alleen, is vooral de eerste 2 à 3 weken na implantatie het totaal steroid oestrogeengehalte sterk verhoogd. Daarna treedt een snelle daling op naar waarden zoals bij onbehandelde dieren. Bij een implantatie met oestradiol/trenbolone worden minder hoge piekwaarden bereikt, maar de gehalten blijven langer hoger dan de waarden van de controledieren. Dit duidt op een geleidelijker vrijkomen van oestradiol uit de pellets, mogelijk in combinatie met een verminderd metabolisme.

Uit de resultaten van Huis in 't Veld en Both-Miedema (1974) komt dit ook naar voren. Uit andere proeven van deze auteurs, welke niet in de tabellen weergegeven zijn, komen de volgende gegevens naar voren (ILOB proeven):

Dagen na behandeling	Gehalten van totaal steroid oestrogenen (ng/ml)		
	3	21	40
oestradiol	5 - 40	< 10	<10
oestradiol/testosteron	5 - 75	1 - 70	<10
oestradiol/progesteron		5 - 40	<10
oestradiol/trenbolon		5 - 55	5 - 35

Bij een andere ILOB proef, waarbij 24 uren urine onderzocht werd, werden ca. 7 dagen na een implantatie met oestradiol de maximale waarden (ca. 15,5 ng/ml) bereikt. Voor een implantatie met oestradiol/testosteron en oestradiol/trenbolon waren deze respectievelijk na 7 dagen 93-133 ng/ml en 21 dagen 27-35 ng/ml. Deze laatste waarden liggen in dezelfde orde van grootte als de gemiddelde gehalten die bij vrouwelijke dieren van ILOB proef 25.20 gevonden werden, namelijk 6, 15, 20 en 15 ng/ml op 0, 2, 3 en 4 weken na implantatie met oestradiol/trenbolone. Bij deze dieren waren de gemiddelde, minimum en maximum gehalten op ca. 17 weken leeftijd i.c. 6 weken na implantatie met placebo, oestradiol, oestradiol/progesteron, oestradiol/testosteron en oestradiol/trenbolone respectievelijk 2 (1-2), 2 (1-3), 4,5 (1-11), 4 (1-14) en 11 (1-26) ng/ml. Deze cijfers kloppen redelijk met die van ILOB proeven welke in het begin van de tachtiger jaren uitgevoerd zijn (tabel 2 van bijlage I en in de tabellen 7 en 8). In de proeven vermeld in tabel 2 van bijlage I werden de dieren geïmplant met oestradiol/testosteron en oestradiol/progesteron. De urine, ca. 6 weken na implantatie bemonsterd, werden op steroid oestrogeengehalten onderzocht. De gemiddelde, maximum en minimum totaal steroid oestrogeengehalten waren respectievelijk 20,4, 28,3 en 9,2 ng/ml. Ondanks deze duidelijke verhoging, vooral de eerste weken na behandeling, stelden Bouffault en Willemart (1987) dat het oestradiol-17 $\alpha$  gehalte

in urine (en daardoor ook het totaal steroid oestrogeengehalte) geen goede maatstaf is om het gebruik van oestrogeen bevattende preparaten aan te tonen. Genoemde auteurs baseerden hun conclusie op onderzoek van urine verzameld 6 weken en later na implantatie. Dit komt overeen met de resultaten van andere onderzoekers. Een uitzondering moet gemaakt worden voor een implantatie met oestradiol/ trenbolone, waar langer dan 6 weken na toediening hogere gehalten in urine voorkomen. Uit het bovenstaande blijkt dat het totaal steroid oestrogeengehalte niet in alle gevallen een goede maatstaf is om een toediening met oestrogene stoffen aan te tonen. Daarom hebben verschillende auteurs eveneens gekeken naar het oestradiol-17 $\beta$  gehalte in urine. De gemiddelde waarden die Schopper (1981) berekende uit respectievelijk 48, 68 en 40 analyseresultaten van ILOB proeven waren voor onbehandelde mannelijke vleeskalveren van 11 tot 18 weken leeftijd 1,9, 1,0 en 1,3 ng/ml. De cijfers van Schopper hebben zowel betrekking op 24 uren urine, als op urine welke 's morgens onmiddellijk na het voeren is verzameld. Ook Hoffmann et al. (1976) vonden bij onbehandelde vrouwelijke vleeskalveren een grote variatie in oestradiol-17 $\beta$  gehalten. De met behulp van een RIA bepaalde gehalten varieerden van 4,6 tot 14,3 ng/ml en van 2,4 tot 12,6 ng/ml voor dieren van 12 respectievelijk 17 weken oud. Het betrof hier spontaan verkregen urinemonsters. Genoemde cijfers komen overeen met die van Kroes et al. (1977) verkregen bij vrouwelijke kalveren van ILOB proef 25.20. De fluorimetrisch verkregen waarden van onderzoek van monsters verkregen uit spontaan geloosde urine varieerden tussen 1 en 8 ng/ml voor dieren van 11 en 14 weken oud. Bij de bepaling van oestradiol-17 $\beta$  werd van de veronderstelling uitgegaan dat exogeen toegediend oestradiol-17 $\beta$  niet of slechts gedeeltelijk gemetaboliseerd wordt in 17 $\alpha$ -oestradiol en dat oestradiol-17 $\beta$  als zodanig in de urine wordt uitgescheiden. De gehalten die voor mannelijke en ook voor jonge vrouwelijke vleeskalveren gevonden zijn, zijn laag: < 0,1 (Boursier et al. 1983), 0,156 (0,111-0,199; Richou-Bac et al. 1979), 0,05 (0,03-0,08; ILOB) en altijd < 5 ng/ml (Bouffault in Willemart, 1987).

Bij Bouffault en Willemart (tabel 5) was het oestradiol-17 $\beta$  gehalte na een behandeling met een oestradiol-17 $\beta$  bevattend preparaat duidelijk verhoogd. Dit was eveneens het geval na een injectie met oestradiol-17 $\beta$  in de proef van Boursier et al. (1983).

Na 6 dagen varieerde het gehalte tussen 12 en 20 ng/ml, na 43 dagen was het nog 0,2 ng/ml (controle <0,1 ng/ml). Drie en veertig dagen na implantatie was het oestradiol-17 $\alpha$  gehalte gelijk aan dat van de controledieren. Bij Richou-Bac et al. (1979) daarentegen was het oestradiol-17 $\beta$  gehalte vanaf 3 weken na behandeling ongeveer gelijk aan de waarden van de controledieren. Zelfs 10 dagen na behandeling verschilden de oestradiol-17 $\beta$  gehalten al niet significant meer met die van de controledieren, ofschoon ze nog wel hoger waren (0,4 respectievelijk 0,2 ng/ml).

#### PROGESTAGENEN IN FAECES EN URINE

Bij herkauwers wordt progesteron voornamelijk als pregnaandiol via de faeces uitgescheiden (Rico et al., 1981 en Rico, 1983).

Over de uitscheiding van progesteron en metabolieten in faeces en urine bij vleeskalveren zijn voor zover ons bekend geen literatuurgegevens beschikbaar.

#### SAMENVATTING

Alvorens een samenvatting te geven van de gehalten van testosteron, oestrogenen en progesteron in bloed, urine en faeces moet hier nogmaals het volgende worden opgemerkt: Naast de grote individuele variaties in deze gehalten hebben onder andere de volgende factoren invloed op het niveau van de gehalten:

- bepalingsmethodiek met onder andere wijze van voorzuivering, eventuele pre-concentratie, specificiteit van de bepaling enz.
- wijze van monsternamen: frequentie, plaats van afname van het bloed (halsvene, staartvene, arterieel bloed), 24 uren urine en faeces of een éénmalig monster, mate van stress bij monsternamen, monsternamen op stal of op het slachthuis.
- transport en opslagcondities monstermateriaal.

#### Testosteron in bloed

Globaal kan gesteld worden dat bij stiertjes tot een leeftijd van 4 maanden het gehalte langzaam toeneemt (< 1 ng/ml). Van 4 tot 7 maanden neemt het gehalte sneller toe (van 1 tot 4 ng/ml) en bij stieren ouder dan 7 maanden van 1 tot 10 ng/ml en hoger.

Bij mannelijke kalveren vindt afgifte van testosteron aan het bloed pulsgewijs plaats. Hierdoor is er een grote variatie in gehalten binnen 24 uur. Dit is zelfs al het geval bij dieren van 20 weken oud (Karg, 1976).

Bij behandeling met testosteronhoudende preparaten vindt gemiddeld een daling van het testosterongehalte plaats. Gezien de grote variatie in testosterongehalten in bloed van onbehandelde vleeskalveren is het niet mogelijk een duidelijke, significante verandering van dit gehalte, als gevolg van een behandeling met testosteronbevattende preparaten, vast te stellen. Mogelijk kan naar analogie van de sportwereld gekeken worden naar bijvoorbeeld de verhouding van testosteron en epitestosteron. Voor vrouwelijke kalveren is nader onderzoek nodig om mogelijk gebruik van testosteron aan een veranderd testosterongehalte in het bloed vast te stellen.

#### Oestrogenen in bloed

De belangrijkste oestrogenen (kwantitatief) in bloed zijn oestradiol-17 $\beta$ , oestradiol-17 $\alpha$ , oestriol en oestron. Deze komen zowel in vrije als in geconjugeerde vorm voor. Het meeste onderzoek is gedaan naar oestradiol-17 $\beta$  en de gehalten die gevonden werden bedroegen meestal minder dan 10 pg/ml. Het oestradiol-17 $\alpha$  gehalte zou wat hoger zijn. De oestradiol-17 $\beta$  concentratie in bloed kan mogelijk als een goede parameter worden gebruikt om behandeling van mannelijke en mogelijk ook vrouwelijke kalveren met oestradiol bevattende preparaten aan te tonen. Dit geldt vooral voor de bedrijfsfase c.q. de eerste weken na behandeling. Het totaal steroid oestrogeengehalte is minder geschikt om individueel dieren, die met anabole stoffen behandeld zijn, aan te wijzen. Voor het opsporen van verdachte koppels lijkt dit gehalte wel geschikt te zijn, althans in de bedrijfsfase c.q. de eerste weken na behandeling.

#### Progesteron in bloed

Bij mannelijke vleeskalveren zouden de gehalten volgens enkele literatuurgegevens beneden de 100 pg/ml liggen en bij vrouwelijke vleeskalveren zouden ze tussen < 100 tot 350 pg/ml bedragen. Volgens het recent door het ILOB/TNO uitgevoerd onderzoek ligt het progesterongehalte bij mannelijke vleeskalveren tussen 10 en 675 pg/ml. Voor

vrouwelijke vleeskalveren varieerde het gehalte tussen 25 en 2400 pg/ml. Een implantatie met een progesteronbevattend preparaat liet de eerste weken na behandeling een duidelijke verhoging zien. Er zijn nog onvoldoende gegevens om aan te geven tot aan welk tijdstip na behandeling een statistisch significante verhoging vastgesteld kan worden. Er zijn onvoldoende gegevens beschikbaar om aan de hand van het progesterongehalte in het bloed een verdacht dier op te sporen. Dit geldt zowel voor de bedrijfs- als de slachthuisfase.

#### Testosteron in urine en faeces

Voor vleeskalveren zijn er nagenoeg geen literatuurgegevens beschikbaar over testosterongehalten in deze matrices. Mogelijk zijn de concentraties testosteron in urine en/of faeces òf de verhouding tussen de concentraties van testosteron en bijv. epi-testosteron in urine en/of faeces goede parameters om een behandeling aan te tonen.

#### Oestrogenen in urine en faeces

De in deze matrices gevonden verbindingen zijn oestradiol-17 $\alpha$ , oestradiol-17 $\beta$ , oestron en oestriol, waarvan oestradiol-17 $\alpha$  bij runderen kwantitatief de belangrijkste is. Alle genoemde verbindingen komen zowel in vrije als in geconjugeerde vorm voor. Met betrekking tot de totale steroiduitscheiding bij runderen zijn er een aantal tegenstrijdige opvattingen. Bepaalde auteurs vermelden dat er kwantitatief meer met de faeces uitgescheiden worden, terwijl andere beweren dat er meer met de urine het lichaam verlaat.

Er is vrij veel onderzoek gedaan naar de invloed van implantatie van oestrogeenbevattende preparaten op de totale steroid oestrogeenuitscheiding via de urine bij vleeskalveren. Bij mannelijke vleeskalveren geven de meeste onderzoekers aan dat bij onbehandelde dieren waarden van minder dan 10 ng/ml gevonden worden. Oudere vrouwelijke onbehandelde vleeskalveren zouden wat hogere waarden laten zien en de variatie zou ook toenemen. Een implantatie met oestrogeenbevattende preparaten geeft de eerste weken na behandeling bij mannelijke kalveren een duidelijk hogere steroid oestrogeengehalte te zien. De mate van verhoging en ook de tijdsduur waarin deze verhoging aangetoond kan worden is onder andere afhankelijk van de gebruikte stoffen, dragers en toedieningswijze. Mogelijk kan de bepaling van oestradiol-17 $\beta$  in

urine en in faeces in de eerste weken na behandeling gebruikt worden om verdachte dieren op te sporen (bedrijfsfase). Bij een voldoende aantal bemonsterde dieren (5%?) uit een koppel kan ook het totaal steroid oestrogeengehalte gehanteerd worden gedurende de eerste weken na behandeling.

Progesteron in urine en faeces

Voor zover ons bekend zijn er geen literatuurgegevens over vleeskalveren beschikbaar.



LITERATUUR

Bamberg, E., Kanout, A.G., Stöckl, W. Ceska, M. und Choi, H.S.  
Gehalt an Testosteron und Luteinisierungshormon im Blutplasma von  
Stieren während des ersten Lebensjahres.  
Zbl. Vet. Med. A 25 (1978) 773-780.

Bass, J.J., Peterson, A.J. and Payne, E.  
Plasma concentrations of luteinizing hormone, testosterone and andro-  
stenedione in castrated and adrenalectomized bull calves.  
J. Endocr. 79 (1978) 137-138.

Bass, J.J., Peterson, A.J., Payne, E. and Jarnet, M.P.  
The effect of neonatal estrogen treatment on plasma hormone levels and  
behaviour in pre- and post-pubertal bulls.  
Theriogenology 8 (1977) 59-71.

Bouffault, J.C. and Willemart, J.P.  
Excrétion urinaire d'estradiol après différents traitements anaboli-  
sants. Bull. Acad. Vét. de France 60 (1987) 81-87.

Boursier, B., Ledoux, M. et Richou-Bac, L.  
Teneurs plasmatiques et urinaires en estradiol 17 $\alpha$  et en estradiol 17 $\beta$   
chez le veau traité au benzoate d'estradiol (Applications au contro-  
le).  
Réc. Méd. Vét. 159 (1983) 419-423.

Erb, R.E., Chew, B.P. and Keller, H.F.  
Relative concentrations of estrogen and progesterone in milk and  
blood, and excretion of estrogen in urine.  
J. Anim. Sci. 46 (1977) 617-626.

Heitzman, R.J., Harwood, D.J., Kay, R.M., Little, W., Mallinson, C.B.  
and Reynolds, I.P.  
Effects of implanting prepubertal dairing heifers with anabolic ste-  
roids on hormonal studies, puberty and parturition.  
J. Anim. Sci. 48 (1979) 859-866.

Hemeida, N.A., El-Baghdady, Y.R. and El-Fadaly, M.A.  
Serum profiles of androstenedione, testosterone and LH from birth  
through puberty in buffalo bull calves.  
J. Reprod. Fert. 74 (1985) 311-316.

Hoffmann, B.  
Natural occurrence of steroids hormones in food producing animals.  
In: Public health aspects, analytical methods and regulation.  
Symposium O&E, Paris 15-17 February 1983.

Hoffmann, B., and Karg, H.  
Metabolic fate en anabolic agents in treated animals and residue  
levels in their meat.  
Anabolic Agents in Animal Production. FAO/WHO Symp. Rome, March 1975.  
Guest Editors: Frank C. Lu and Jan Rendel.

Hoffmann, B., Heinritzi, K.H., Kyrein, H.J., Oehrle, K.L., Oettle, G., Rattenberger, E., Vogt, K und Karg, H.  
Untersuchungen über Hormonkonzentrationen in Geweben, Plasma und Urin von Mastkälbern nach Behandlung mit hormonenerksamen Wirkstoffe Anabolika. Beihefte Z. Tierphys. Tierernähr und Futtermittelkunde, (1976) 80-90.

Hoffmann, S., Leuthold, G. und Reinecke, P.  
Untersuchungen zur Eignung der Plasmakonzentrationen von Testosteron, Insulin und der Schilddrüsenhormone als Hilfsmerkmal für die Selection auf Fleischleistung beim Rind.  
1. Mitt.: Die Abhängigkeit der Plasmahormonkonzentrationen von internen und externen Faktoren.  
Arch. Tierz., Berlin 29 (1986) 553-564.

Hoffmann, S., Leuthold, G. und Reinecke, P.  
Untersuchungen zur Eignung der Plasmakonzentrationen von Testosteron, Insulin und der Schilddrüsenhormone als Hilfsmerkmal für die Selection auf Fleischleistung beim Rind.  
2. Mitt.: Die Beziehungen zwischen den Plasmahormonkonzentrationen und Leistungsmerkmalen.  
Arch. Tierz., Berlin 30 (1987) 223-232.

Huis in 't Veld, L.G., Both-Miedema, R., Schuller, P.L., Stephany, R.W. Bosch, D. van de en Kroes, R.  
Onderzoek naar de invloed van combinatiepreparaten van mannelijke en vrouwelijke hormonen op mannelijke mestkalveren. (Een biologisch, chemisch en histologisch onderzoek). RIV-rapport nr. 18/73 Path, 16 april 1973.

Huis in 't Veld, L.G. en Both-Miedema, R.  
Onderzoek over het verloop van de uitscheiding van steroïdoestrogenen in de urine van kalveren, welke behandeld zijn met oestradiol-17 $\beta$  of oestradiol-17 $\beta$  bevattende combinatiepreparaten.  
Tijdschr. Diergen. 99 (1974) 155-165.

Huis in 't Veld, L.G., Both-Miedema, R., Smit, P.J. en Stekelenburg, P.  
Opsporing van exogene estrogenen bij levende dieren en bij slachting. Berichten uit het RIV, Utrecht (1975) Versl. Rapp. (1976) 183-187.

Huis in 't Veld, L.G., Berg, R.H. van de, Wieten C.A. en Kroonenberg, W.M.  
Radio-immunologische bepaling van estradiol-17 $\beta$  in bloedserum, musculatuur en organen van onbehandelde runderen en van runderen welke met estradiol-17 $\beta$  (al of niet in combinatie met andere hormonale stoffen) zijn behandeld. RIV-rapport nr. 152/76 Endo, september 1976.

ILOB proef 25.22  
Jong, J. de. Intern verslag December 1980.

ILOB proef 25.25  
Jong, J. de. Intern verslag 1980-08-25.

ILOB proef 25.30  
Intern verslag 1981.

ILOB proef 25.35  
Internverslag 1983-12-13.

ILOB proeven 25.30, 25-32, 25.34.  
Vries, P.H.U. Ontwikkeling van bepalingmethoden voor enkele anabool werkende verbindingen in dierlijke matrices.  
ILOB-rapport 510 (1982-10-12).

ILOB proef 25-38  
Intern verslag 22-5-1985.

ILOB proef 25.039.  
Arts, C.J.M., Baak, M.J. van, Huisman, J. en Weerden, E.J. van. Onderzoek met geïmplanteerd oestradiol/trenbolon bij mannelijke vleeskalveren.  
- Effecten op groei en voederconversie.  
- Residue niveaus.  
ILOB-rapport 579 (20 oktober 1986).

ILOB proef 25.040 (vertrouwelijke gegevens van C.J.M. Arts). Nog niet in rapport vastgelegd. Wordt gepubliceerd.

Ivie, G.W., Christopher, R.J., Munger, C.E. and Coppock, C.E.  
Fate and residues of [4-<sup>14</sup>C] estradiol-17 $\beta$  after intramuscular injection into Holstein steer calves.  
J. Anim. Sci. 62 (1986) 681-690.

Karg, H. Giménez, T., Hartl, M., Hoffmann, B., Schallenberger, E. and Schams, D.  
Testosterone, Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in peripheral plasma of bulls: levels from birth through puberty and short term variations.  
Zbl. Vet. Med. A 23 (1976) 793-803.

Kozumplik, J.  
The level of plasma testosterone during the prenatal and postnatal period of development in bulls.  
Acta Vet., Brno. 50 (1961) 27-32.

Kroes, R., Huis in 't Veld, L.G., Stephany, R.W., Berende, P.L.M. en Terluin, R.W.  
1 De invloed van anabole stoffen op vrouwelijke mestkalveren (een zoötechnisch en histologisch onderzoek).  
2 Bepaling van het uitscheidingspatroon van zeranol bij mannelijke kalveren.  
RIV-rapport no 88/77 Path (1977).

Kroes, R., Huis in 't Veld, L.G. en Stephany, R.W.  
Onderzoek naar de invloed van combinatie preparaten van mannelijke en vrouwelijke hormonen of hormonaal werkende stoffen op mannelijke mestkalveren (ILOB-proef 25.14, P 72/82) (Een biologisch, chemisch en histologisch onderzoek). RIV-rapport nr. 193/76 Path (1976).

- Kroes, R. en Huis in 't Veld, L.G.  
Onderzoek naar de invloed van combinatie-preparaten van mannelijke en vrouwelijke hormonen of hormonaal werkende stoffen op mannelijke mestkalveren (ILOB-proef 25.16, P 72/83) (Een biologisch, chemisch en histologisch onderzoek). RIV-rapport nr. 194/76 Path (1976).
- Kroes, R., Huis in 't Veld, L.G., Berg, R.H. van de, Both-Miedema, R. en Stephany, R.W.  
Onderzoek naar de invloed van het combinatie-preparaat 17 $\beta$  oestradiol/trenbolone acetaat op mannelijke mestkalveren, welke een verschillend eiwitrantsoen ontvingen (ILOB-proef 25.22). RIV-rapport nr. 213/76 Path (1976).
- Kroes, R., Huis in 't Veld, L.G. en Both-Miedema, R.  
Onderzoek naar het effect van het toedienen van het combinatie-preparaat 17 $\beta$ -oestradiol en trenbolone acetaat op mestkalveren gevoederd met verschillende eiwitrantsoenen (ILOB-proeven 25.18, 25.19 en 61.05) (Een histologisch en chemisch onderzoek). RIV-rapport nr. 199/76 Path (1976).
- Kroes, R., Huis in 't Veld, L.G. en Both-Miedema, R.  
Onderzoek naar de invloed van het combinatie-preparaat 17 $\beta$  oestradiol/trenbolone acetaat op mannelijke mestkalveren (ILOB-proef 25.21, P 74/58) (Een histologisch en chemisch onderzoek). RIV-rapport nr. 214/76 Path (1976).
- Lacroix, A. and Pelletier, J.  
Short-term variations in plasma LH and testosterone in bull calves from birth to 1 year of age.  
J. Reprod. Fert. 55 (1979) 81-85.
- Lacroix, A., Garnier, D.H. and Pelletier, J.  
Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in Charolais bull calves during the first year of life.  
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 17 (1977) 1013-1019.
- Lunstra, D.D., Ford, J.J. and Echterkamp, T.E.  
Puberty in beef bulls: Hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds.  
J. Anim. Sci. 46 (1978) 1054-1062.
- Meyer, H.H.D., Herges, C., Landwehr M. und Karg, H.  
Möglichkeiten der Erkennung des illegalen Einsatzes von Östradiol benzoat in der Kälbermast durch Steroid-Östrogenbestimmung in Kot und Blutplasma.  
Arch. Lebensmittelhyg. 36 (1985) 27-31.
- Pellegrini, S., Secchiari, P., Fassorra, C., Levanti, C. and Luisi, M.  
The determination of testosterone in the plasma of calves by radioimmunoassay.  
Zbl. Vet. Med. A 20 (1973) 556-566.

Rattan, P.J.S. and Riis, P.M.

Influence of estradiol and trienbolone acetate treatments on the circulating level of plasma estradiol in Jersey calves. J. Nuclear Agric. Biol. 11 (1982) 63-65.

Renavillea, R., Fabry, J., Halleux, V. and Buarny, A.

Testosterone plasma profiles, as a function of age in young bulls from the bovine double-muscled belgian white blue breed. A preliminary report.

Theriogenology 19 (1983) 159-168.

Richou-Bac, L., Pochard, M. L. et Boursier, B.

Niveaux plasmatiques et tissulaires en estradiol  $17\beta$ , estrone et D.E.S. chez des jeunes bovins traités aux anabolisants. Aspects zootechniques et qualitatifs (1).

Rec. Méd. Vét. 154 (1978) 441-450.

Richou-Bac, L., Mollel, M.F., Boursier, B. et Cumont, G.

Recherche des oestrogènes par radioimmunologie dans le plasma et les tissus des jeunes bovins. Premiers Resultats.

Bull. Acad. Vét. de France 49 (1976) 409-415.

Richou-Bac, L., Pochard, M.F. et Boursier, B.

Evolution des teneurs en estradiol  $17\beta$  du muscle, du foie, de l'urine de veaux traités au benzoate d'estradiol par injection intramusculaire.

Bull. Acad. Vét. de France 52 (1979) 173-180.

Rico, A.G.

Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. J. Anim. Sci. 57 (1983) 226-232.

Rico, A.G., Burgat-Sacaze, V., Braun, J.P. and Benard, P.

Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. In: Anabolic agents in beef and veal production. Proc. EC Workshop, Brussels, March 5th and 6th. (1981) pp. 45-56.

Riis, P.M. and Suresh, T.P.

The effect of a synthetic steroid (trenbolone) on the rate of release and excretion of subcutaneously administered estradiol in calves.

Steroids 27 (1977) 5-15.

Schams, D., Gombe, S., Schallenberger, E., Reinhardt, V. and Claus, R.

Relationships between short-term variations of LH, FSH, prolactin and testosterone in peripheral plasma of prepubertal bulls.

J. Reprod. Fert. 54 (1978) 145-148.

Schopper, D.

Messung von Rückständen von Östradiol- $17\beta$ , Testosteron und Progesteron im Plasma und Teilweise im Urin von Mastrindern nach Anabolikabehandlung sowie Untersuchungen zum Stoffwechsel von Trenbolonacetat<sup>R</sup>.

Dissertation (1981), München.

Secchiari, P., Martorana, F., Pellegrini, S. and Luisi, M.

Variation of plasma testosterone in developing friesland bulls.

J. Anim. Sci. 42 (1976) 405-409.

Silberzahn, P., Moreau, J., Chauvet, P., Dehennin, L. et Scholler, R.  
L'estradiol-17 $\beta$  plasmatique chez le veau traité par les anabolisants  
mesure par dosage radio-immunologique et par spectrométrie de masse.  
Rec. Méd. Vét. 158 (1982) 529-534.

Sundby, A. and Velle, W.  
Plasma concentration of testosterone in young bulls in relation to  
age, rate of weight gain and stimulation with human chorionic  
gonadotrophin.  
J. Endocr. 86 (1980) 465-469.

Thibier, M.  
Peripheral plasma testosterone concentration in bulls around puberty.  
J. Reprod. Fert. 42 (1975) 567-569.

Thibier, M.  
Diurnal testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in peripheral plasma  
of young post-pubertal bulls. A study by frequent sampling.  
Acta Endocr. 81 (1976) 623-634.

Velle, W.  
Metabolism of estrogenic hormones in domestic animals.  
Gen. and Compar. Endocr. 3 (1963) 621-635.

Velle, W.  
Levels and metabolism of oestrogenic hormones in domestic animals.  
Exposée d'une journée d'étude consacrée à l'utilisation des oestro-  
gènes en élevage.  
Paris 14 Mai 1972, 31-36.

Vogt, K., Waldschmidt, M. und Karg, H.  
Bestimmung von Ausscheidungsverlauf und Rückständen von Östradiol beim  
Kalb nach intramuskulärer bzw. subcutaner Implantation von Presslingen  
mit entsprechende Östrogengehalt.  
Arch. Lebensmittelhyg. 23 (1972) 70-76.

Zerobin, K. and Thun, R.  
Testosteron beim wachsenden Stierkalb.  
Wien. Tierärztl. Mschr. 70 (1983) 198-202.

Tabel 1: Gemiddelde testosterongehalten in bloedplasma bij jonge stiertjes (ng/ml)

Auteur	Leeftijd in maanden									Aantal bepalingen <sup>K</sup>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Bamberg et al. (1978)		± 0,5	± 1,0	± 2,0	± 2,0	± 3,0	± 4,0	± 4,5	± 5,0	39
Bass et al. (1978)	1,1	1,5	1,8	2,0	3,0	2,0				5
Bass et al. (1977)	0,1	0,1	0,2	0,4	5,5	2,5	2,0	1,3	1,5	5
Hoffmann et al. (1986 en 1987)						4,4	4,9	5,2	5,2	320 <sup>o</sup>
Karg et al. (1976)	± 0,3	± 0,3	± 0,3	± 0,5	± 0,5	1-2,5	1-3	2-4	2-4	12 <sup>o</sup>
Kozumplik (1981)		0,32	0,79				0,50-26,53	id*	id*	57
Lacroix en Pelletier (1979)	0,31	0,26	0,43	0,91	2,32	1,19		0,47	0,70	96 <sup>o</sup>
Lacroix et al. (1977)	± 0,2	± 0,2	± 0,3	± 0,6	± 1,2	± 1,8	± 1,2	± 2,2	± 3,0	10
Lunstra et al. (1978)							4,3	4,1	5,2	62
Renaville et al. (1983)				0,85	1,04	1,68				2610 <sup>oo</sup>
Secchiari et al. (1976)	0,1	0,2	0,3	0,6	1,0	0,9	0,8	1,8	3,5	18
Sunby en Velle (1980)			0,9	2,0	2,8	4,0	4,8	5,9	4,8	574 <sup>ooo</sup>
Zerobin en Thun (1983)										48 <sup>oooo</sup>
Hoffmann et al. (1976)**	0,60	0,60								5
ILOB (proef 25.30)**			0,50-0,90 <sup>v</sup>							4
ILOB (proef 25.35)**				0,41-0,56 <sup>vv</sup>						6
ILOB (proef 25.040)**					1,5-2,4 <sup>vvv</sup>					50 <sup>ooooo</sup>

\* Gem. in periode 7-13 maanden 6,65 ng/ml

\*\* Vleeskalveren

v In de periode van 11-17 weken leeftijd

vv In de periode van 15-19 weken leeftijd

vvv In de periode 17-22 weken leeftijd

K Globaal aantal bepalingen waarop cijfer gebaseerd is (aantal per dier x aantal dieren)

o 4 dieren

oo 29 dieren

ooo 82 dieren

oooo 6 dieren

ooooo 9 dieren

Tabel 2: Gemiddelde progesteron- en testosterongehalten bij mannelijke en vrouwelijke vleeskalveren (pg/ml)

Bedrijf	Sexe	Leeftijd (in weken)	Aantal	Progesteron		Testosteron	
				gem.	laagste-hoogste	gem.	laagste-hoogste
Trouw Intern. (bedrijf)	mann.	22	75	39	10 - 118	2812	141 - 9239
Trouw Intern.(slachthuis)	mann.	23	24	237	53 - 679	747	210 - 6961
Denkavit (slachthuis)	vrouw.	26	38	370	46 - 2412	36	12 - 262
Navobi (bedrijf)	vrouw.	24,5	35	62	28 - 339	22	1 - 70



Tabel 3: Progesteron- en testosterongehalten (pg/ml) van HF pinken  
(leeftijd in weken op 1987-12-10)

Vermoedelijk niet in oestrus				Onzeker				Wel in oestrus				
Volg nr.	Lft.	Prog.	Test.	Volg nr.	Lft.	Prog.	Test.	Volg nr.	Dagen rond oestrus	Lft.	Prog.	Test.
9	29	190	16	18	37	91	23	35	-12	38	50	35
13	30	45	20	8	37	72	22	22	+ 4	39	0	11
11	30	84	18	16	38	66	18	23	- 5	40	434	17
17	31	169	18	15	38	88	25	5	+ 5	40	109	13
1	31	90	24	26	38	62	36	28	-13	41	136	28
2	31	60	22	3	38	93	24	25	-10	41	4115	14
4	32	93	18	14	38	43	18	38	+ 3	42	3775	22
19	34	72	37	12	38	53	26	21 <sup>vv</sup>	0	42	326	26
7	34	155	21	36	39	51	21	34 <sup>vv</sup>	0	44	327	38
				10	39	67	16	24	-12	44	83	19
				6	39	188	18	40	-12	46	3114	22
				31	40	43	46	20	- 2	46	272	19
				27	40	43	31	30	-12	56	4887	29
				33	41	58	26					
				39	42	46	13					
				37	45	3463	24					
				29	45	83	28					
				32	46	569	29					
Gem. min./max. gehalte		106	22			288	25				1356	23
		60-190	16-37			43-3463	13-46				0-4887	11-38

Tabel 4: Gemiddelde oestradiolgehalten (17 $\beta$  vrij) in bloedplasma van mannelijke kalveren van ILOB proeven<sup>v</sup> (pg/ml)

Weken na be- handeling <sup>vv</sup>	Proef 25.23*		Proef 25.30			Proef 25.35		Proef 25.039		Proef 25.040	
	Controle**	E	Controle	E/Tr	E/Te	Controle	E/Te	Controle	E/Tr	Controle	E/Te
0	2	6	25	13	18					n.d.	n.d.
1	2	83	10	33	48	4	29	n.d.	11	n.d.	33 <sup>o</sup>
2	2	220	3	38	38					n.d.	39 <sup>oo</sup>
3	2	135	n.d.	20	20	2	11	n.d.	20	n.d.	20
4	2	85								n.d.	19
5	2	32	5	43	25	1	11	n.d.	32	n.d.	15 <sup>ooo</sup>
6	2	14	7	65	18					n.d.	-
7	2	4						n.d.	35	n.d.	

v resp. 6, 4, 6, 6 en 9 dieren per proefgroep  
 vv implantatie op een leeftijd van ca. 11 weken  
 \* geanalyseerd door dr Schopper (TU-München)  
 \*\* gemiddelde waarden van 64 monsters  
 n.d. niet detecteerbaar  
 o 3 dagen  
 oo 10 dagen  
 ooo 33 dagen

Tabel 5: Gemiddelde oestradiolgehalten (17 $\beta$  en 17 $\alpha$ ) in urine van mannelijke vleeskalveren in proef van Bouffault en Willemart (ng/ml)

Leeftijd	8 weken*			12 weken			17 weken		
	Controle	E/Pr	E/Tr	Controle	E/Pr	E/Tr	Controle	E/Pr	E/Tr
oestradiol-17 $\beta$	0,38	2,54	0,37**	0,64	1,81	2,21	0,63	0,97	2,07
oestradiol-17 $\alpha$	8,72	36,52	4,71**	10,68	30,41	49,79	11,78	12,99	28,98

\* E/Pr geïmplanteerd op 4 weken leeftijd, E/Tr geïmplanteerd op 8 weken leeftijd

\*\* kan op dit tijdstip als controlegroep beschouwd worden

v 4 dieren per groep

Tabel 6: Gemiddeld totaal steroid oestrogenen (ng/ml) in urine van mannelijke vleeskalveren in proef 25.14 van ILOB (Huis in 't Veld en Both-Miedema, 1974)

Leeftijd	Controle <sup>v</sup>	E*	E/Te	E/Tr
11 weken <sup>vv</sup>	4	17	37	13
11,5 week	5	40	62	15
12 weken	5	155	110	10
13 weken <sup>xx</sup>	3	64	33	19
14 weken	3	7	6	30
15 weken <sup>xxx</sup>	5	2	9	16
17 weken	6	3	6	20

3 dieren per groep

<sup>vv</sup> gemiddelde van 24-uurs urine, week 11 is dag 1

\* geïmplanteerd op 11 weken leeftijd

\*\* 12 dagen na implantatie

\*\*\* 30 dagen na implantatie

Tabel 7: Totaal steroid oestrogenen (ng/ml) in urine van mannelijke vleeskalveren op 11, 14 en 17 weken geïmplanteerd (2 dieren per groep)

Dagen na implantatie	E/Tr op 11 weken		E/Tr op 14 weken		E/Tr op 17 weken	
	Controle	Beh.	Controle	Beh.	Controle	Beh.
0	5	8	4	6	6	4
1	4	19	3	18	4	16
2	2	22	4	31	9	22
3	5	74	6	49	10	18
4	4	46	8	31	5	28
5	7	29	8	70	6	20
6	3	36	4	34	16	26
7	4	16	6	84	13	25
8	3	25	7	70	10	29
9	3	22	7	82	15	43
10	2	24	7	104	10	52
11	4	20	9	40	10	82
12	3	32	6	42	6	80
13	12	59	5	131	6	80
14	6	8	6	105	5	84
15	4	12	12	106	8	64
16	5	20	6	64	8	34
17	4	10	6	9	12	32
18	3	4	4	50	12	39
19	4	7	9	84	7	18
20	6	6	10	27	10	26
21	8	10	5	34		
22	8	8	6	17		
23	4	9	16	26		
24	6	5	13	26		
25	7	8	10	33		
26	7	8	15	44		
27	7	9	10	28		
28	9	6	10	22		
29	6	10	6	24		
30	5	14				
31	6	8	6	24		
32	12	7	5	24		
33	6	5	8	28		
34	6	6	8	8		
35	4	6	12	10		
36	9	-	12	10		
37	10	-	7	6		
38	5	5	10	7		
39	6	4				
40	16	5				
41	13	8				
42	10	7				
43	15	14				
44	10	9				
45	10	5				

Vervolg tabel 7.

Dagen na implantatie	E/Tr op 11 weken		E/Tr op 14 weken		E/Tr op 17 weken	
	Controle	Beh.	Controle	Beh.	Controle	Beh.
46	6	7				
47	6	7				
48	5	5				
49	8	10				
50	8	4				
51	12	6				
52	12	7				
53	7	10				
54	10	8				

Tabel 8: Gemiddeld totaal steroid oestrogenen (ng/ml)\* in urine van mannelijke vleeskalveren op verschillende tijdstippen na implantatie.

Proef	Behandeld	Aantal dieren	Weken na implantatie								Opmerking	
			0	2	3	4	5	6	7	9		12
25.18	cont.	3-1-2**						8(5-12)	4	5(3-8)		
	E/Tr	8-6-5						18(6-41)	16(4-31)	6(2-9)		
	E/Tr	9-7-1						18(9-38)	11(5-24)	5		
25.22	cont.	5	6(4-9)	7(2-17)	7(3-14)	2(2-4)						
	E/Tr	5	6(4-11)	21(12-36)	21(9-34)	6(5-9)						3,5 week 16
	cont.	5	5(2-11)	8(3-9)	8(3-12)	1						
	E/Tr	5	6(2-16)	15(3-29)	20(5-35)	15(6-31)						3,5 week 12
25.21	cont.	2										8(7-10)
	E/T3 5 w	2										3(2-4)
	E/Tr 8 w	2								2(2-3)		
	E/Tr 11 w	2							6(4-8)			
	cont.	2							16(16-17)			
25.16	cont.	2							0(0-1)			
	E/Tr	11							11(2-16)			
25.13	cont.	11	2(2-04) <sup>v</sup>		4(1-9)				5(1-14)			
	E	12	14(3-41) <sup>v</sup>		7(2-12)				3(0-8)			
	E/Te	11	24(4-74) <sup>v</sup>		19(5-70)				3(0-6)			
	E/Tr	11	-		3(5-56)				13(2-40)			
	E/Pr	12	-		17(4-38)				4(1-12)			

v na 3 dagen

\* gemiddelde, hoogste en laagste waarden

\*\* op 5, 6 en 7 weken na implantatie resp. 3, 1 en 2 dieren per groep

Tabel 9: Gemiddeld totaal steroid oestrogenen (ng/ml) in urine van mannelijke vleeskalveren in ILOB proeven 25.22, 25.23 en 25.25 (Schopper, 1981)

Behandeling leeftijd in weken	aantal dieren	Controle <sup>v</sup>		E/Tr*		E*	E inf.**	
		4	5(25.22)	6(25.25)	5	5(25.23)	4(25.25)	
11 weken <sup>vv</sup>		0,57	0,52	0,23	1,95	2,04	0,89	
12 weken		0,62	3,28	2,20	8,81	4,83	7,53	
13 weken		1,14	3,19	2,23	14,42	5,69	4,95	
14 weken		0,98	7,82	2,92	15,15	10,49	4,99	
15 weken		1,94	2,80	0,87 <sup>o</sup>	8,08	4,19	5,42	
16 weken		1,80	3,67	0,96 <sup>o</sup>	4,15	9,82	8,66	
17 weken		1,56	7,24	1,78 <sup>o</sup>	2,20	10,66	3,96***	
18 weken		1,72			2,71	2,20***	1,23***	
19 weken		2,38					1,98***	

v niet voor alle proefgroepen zelfde controlegroep

vv gemiddelde van 24-uurs urine, week 11 is dag 0

\* implantatie op 11 weken leeftijd

\*\* infuus met 1 mg oestradiol-17 $\beta$  per dag

\*\*\* na ophouden oestradiol infusie

o na verwijderen implant

Tabel 10: Gemiddeld totaal steroid oestrogenen bij mannelijke vleeskalveren  
(gewijzigde tabel 10 van bijlage 1)

Proef	Behandeling	Leeftijd bij behandeling (weken)	Leeftijd ver- zamelen urine* (weken)	Bijzonder- heden	Aantal dieren (n)	Gemiddeld gehalte (ng/ml)
25.23	controle	-	18,5		2	8,4
	E	10	id. (8,5)		4	7,8
	E inf.	10	id. (2,5)		5	6,4
25.24	controle	-	20		2	4,2
	E	11	id. (9)		4	5,3
	E inf.	11	id. (1)		5	3,9
25.25	controle	-	19		2	4,2
	E/Tr	10	id. (9)		2	12,6
	E/Tr	10	id. (6)	verw.	2	16,8
	E inf.	10	id. (3)		2	6,4
25.27	controle	-	17		6	14,0
	E/Tr	11	id. (6)		6	32,2
	E/Tr (n)	11	id. (2)	verw.	7	9,8
	E/Tr (n)	12	id. (2)	verw.	7	10,1
	E/Tr (n)	13	id. (2)	verw.	7	17,6
25.29	controle	-	18 en 22		6	5,0 en 7,8
	E/Te	11	18, 22 en 28 (7, 11 en 17)		6	16,5, 15,4 en 4,2
	E/Te	11	18 en 22 (3 en 7)	verw.	7	5,0 en 7,3
	E/Te (2x)	11	18, 22 en 28 (3, 11 en 17)	verw.	7	10,1, 17,6 en 12,6
81.24	controle	-	21 en 23		2	3,3 en 12,9
	E/Tr	12	id. (9 en 11)		14	12,6 en 16,4
81.25	controle	-	24 en 26		3	2,9 en 2,6
	E/Tr	12	id. (12 en 14)		16	10,0 en 8,8

\* tussen haakjes weken na implantatie, verwijderen implant of stoppen infuus

Noot: E is 20 mg oestradiol-17 $\beta$

E inf. is infuus met 1 mg oestradiol-17 $\beta$

Tr is 140 mg trenbolone acetaat

Te is 200 mg testosteron

E/Tr (n) is 40 mg oestradiol-17 $\beta$ /287,9 trenbolone acetaat als neusclip

verw. is verwijderd (chirurgisch of neusclip los gemaakt)

2x is dubbele dosering



Vervolg tabel 11: Testosteron RIA's

Matrix	Monster- voorb. 1)	Chromato- grafie	Int. st.2)	Immunogeen tegen	Kruisreacties	Opmerkingen	Literatuur
plasma	extractie	TLC LH-20	<sup>3</sup> H-T	T-3 CMO-BSA	?		Pellegrini et al. (1973)
plasma	extractie	geen	?	?	?	DHT invloed verwaarloosd ( < 0,1 ppb)	Renaville et al.(1983)
plasma	?	?	?	T-11-HS-BSA	te verwaarlozen voor androstanolone en androstendion		Schams et al. (1978)
plasma	extractie	geen	?	T-3-oxine RSA	ca. 70% 5α DHT		Secchiari et al. (1978)
plasma	?	?	?	?	?		Sundby et al. (1980)
plasma	extractie	LH-20	<sup>3</sup> H-T	T-3 CMO-BSA	DHT	DHT invloed verwaarloosd	Thibier (1976)
plasma	?	?	?	?	?		Zerobin et al. (1983)

Tabel 11: Estradiol RIA's

Matrix	Monster- voorb. 1)	Chromato- grafie	Int. st.2)	Immunogeen tegen	Kruisreacties	Opmerkingen	Literatuur
plasma	extractie	LH-20	$^3\text{H}-\beta\text{E}_2$	$\beta\text{E}_2$ CMO-BSA	0,3% $\alpha\text{E}_2$	$\beta\text{E}_2$	Boursier et al. (1983)
plasma	extractie	LH-20	$^3\text{H}-\alpha\text{E}_2$	$\alpha\text{E}_2$ CMO-BSA	0,5% $\beta\text{E}_2$	$\alpha\text{E}_2$	
urine	helix, extractie	LH-20	$^3\text{H}-\beta\text{E}_2$	$\beta\text{E}_2$ CMO-BSA	0,3% $\alpha\text{E}_2$	$\beta\text{E}_2$	
urine	helix, extractie	LH-20	$^3\text{H}-\alpha\text{E}_2$	$\alpha\text{E}_2$ CMO-BSA	0,5% $\beta\text{E}_2$	$\alpha\text{E}_2$	
spier lever nier vet	extractie	?	?	?		$\text{E}_1$ $\alpha\text{E}_2$	Hoffmann et al. (1976)
urine	helix, extractie	-	-	fluorimetrie/ dansylchlorite	$\alpha\text{E}_2$		
urine	?	?	?	?	totaal estrogenen		Huis in 't Veld et al. (1976)
plasma faeces	hydrolyse (plasma) extractie/ praecipitatie	C18	$^3\text{H}-\beta\text{E}_2$	vergelijkbare respons voor $\alpha$ en $\beta\text{E}_2$	$\alpha + \beta\text{E}_2$		Meyer et al. (1985)
plasma	extractie	LH-20	$^3\text{H}-\beta\text{E}_2$	$\text{E}_2$ CMO-BSA	?	$\beta\text{E}_2$	Richou-Bac et al. (1978)
plasma	hydrolyse/ extractie	LH-20	$^3\text{H}-\text{E}_1$	$\text{E}_1$ -17 hydrazo- benzoyl-BSA	?	$\text{E}_1$	

Vervolg tabel 11: Estradiol RIA's

Matrix	Monster- voorb. 1)	Chromato- grafie	Int. st.2)	Immunogeen tegen	Kruisreacties	Opmerkingen	Literatuur
plasma	?	?	?	?	?	$\beta E_2$	Richou-Bac et al. (1976)
plasma	extractie	geen	$3H-\beta E_2$	"specifiek" tegen $\beta E_2$	?	$\beta E_2$	Riis et al. (1977)
plasma	extractie	geen	geen	?	1,5% $\alpha E_2$ 3,3% $E_1$ 7% 6-oxo- $\beta E_2$	correlatie met GCMS	Silberzahn et al. (1982)
urine	extractie	-	fluor- metrie (Ittrich)			vergelijking met TLC	Vogt et al. (1972)

Progesteron en metaboliet

spier	?	?	?	?	?	P	Hoffmann et al. (1976)
plasma	extractie	LH-20	$3H-17\alpha OH-P$	$17\alpha OH-P-3$ CMO-BSA	?	$17\alpha OH-P$	Thibier et al. (1976)

- 1) Monstervoorbereiding
- 2) Interne standaard
- 3) Dihydrotestosteron
- 4) Sephadex LH-20

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE  
BILTHOVEN

Totaal steroid oestrogeengehalte in kalver- en  
runderurine: een evaluatie.

L.A. van Ginkel, P.L.M. Berende en R.W. Stephany  
april 1988

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van het  
Ministerie van Landbouw en Visserij en de Produktschappen voor Vee en  
Vlees respectievelijk Veevoeder en is beschreven als RIVM-project  
388709.

Totaal steroid oestrogeengehalte in kalver- en runderurine: een evaluatie.

L.A. van Ginkel, P.L.M. Berende en R.W. Stephany

#### Samenvatting

In dit rapport worden de resultaten geëvalueerd van analyse van een groot aantal monsters kalver- en runderurine op het totaal steroid oestrogeengehalte. Geconcludeerd wordt, dat bij monsternamen in de slachtsituatie, bij wachttijden van ca. 6 weken of langer, het in het algemeen niet mogelijk is een behandeling met een oestrogeenhoudend preparaat door onderzoek van urine aan te tonen. De belangrijkste oorzaak hiervan is de zeer grote spreiding in de individuele waarden. Bij kortere wachttijden ligt de situatie iets anders. In de periode tot 3 - 4 weken na behandeling is het in een aantal gevallen mogelijk statistisch significante verschillen tussen behandelde en onbehandelde groepen aan te tonen. Voor individuele dieren geldt ook nu dat in het algemeen een behandeling niet met voldoende statistische betrouwbaarheid kan worden aangetoond. Voor zeer korte wachttijden van 0,5 - 2 weken ("stal-situatie") zijn nog onvoldoende resultaten beschikbaar om tot enige conclusie te komen. Verwacht mag echter worden dat in deze situatie behandeling van individuele dieren statistisch significant kan worden aangetoond.

## Inleiding

In dit overzicht worden de resultaten van een groot aantal analyses van monsters runder- en kalverurine op het totaal gehalte aan steroid "oestrogenen" besproken. Het betreft hier de ILOB experimenten met vleeskalveren gecodeerd 25.33, 25.34, 25.35, 25.38 en 61.08. Na een statistische bespreking van de resultaten per experiment volgt een combinatie van deze gegevens. Ter vergroting van het aantal waarnemingen dat de blanco populatie betreft wordt het resultaat van de gecombineerde controlegroep op zijn beurt weer gecombineerd met resultaten verkregen voor niet ILOB experimenten. De resultaten verkregen bij een groot aantal ILOB experimenten, over het algemeen van oudere datum dan bovengenoemde proeven, worden met bovengenoemde resultaten vergeleken.

Na een korte beschrijving van de gehanteerde methoden worden in het hoofdstuk "Resultaten" achtereenvolgens besproken:

- A. Een aantal ILOB-proeven waarbij mannelijke kalveren werden behandeld met een oestrogeen-houdend (estradiol-17 $\beta$ ) preparaat.
- B. De combinatie van ILOB-gegevens met langs andere weg verkregen waarden.

Onder "langs andere weg verkregen" wordt verstaan die monsters die aangeboden zijn voor onderzoek op oestrogeengehalte, waarvan is aangenomen dat ze afkomstig zijn van dieren die niet behandeld waren. Deze aanname is natuurlijk discutabel, doch wordt ondersteund door de resultaten. Dit laatste geldt met name voor mannelijke kalveren.

- C. Vergelijking van behandelde en onbehandelde mannelijke kalveren en de bepaling van kritische waarden.
- D. Oestrogeengehalte in de urine van vrouwelijke runderen.
- E. Oestrogeengehalte in de urine van leden van een populatie waarvan de herkomst ten dele onbekend is.
- F. Invloed van een correctie voor het kreatininegehalte.
- G. Vergelijking resultaten overige ILOB experimenten

## Methoden

Gezien het relatief groot aantal jaren dat deze evaluatie beslaat is het niet te voorkomen dat de verzamelde gevens verkregen zijn met verschillende analysemethoden. Om de invloed hiervan op de verkregen gecombineerde resultaten zo klein mogelijk te houden zijn alleen die resultaten gebruikt die verkregen zijn met eenzelfde basis-methode, fluorimetrische detectie na de Kober-Ittrich reactie. Voor een overzicht en evaluatie van deze methoden wordt verwezen naar diverse RIV rapporten en publicaties (Huis in't Veld, 1976, 1977, 1978a, 1978b)

## Resultaten

### A. Het resultaat van een aantal ILOB-proeven.

#### 1. Proef ILOB 25.33

Mannelijke kalveren werden geïmplanteerd met 20 mg estradiol-17 $\beta$  en 200 mg testosteron. De dieren werden op de leeftijd van 20 weken geslacht. De dieren werden op een leeftijd van 2, 5, 8 respectievelijk 11 weken geïmplanteerd en werden 18, 15, 12 respectievelijk 9 weken na implantatie geslacht. Daarnaast was er een controle (onbehandelde) groep. Enkelzijdige variantie-analyse (Sokal & Rohlf) geeft een significant effect tussen groepen ( $P < 0,01$  (alle  $P$ -waarden hebben betrekking op de tweezijdige overschrijdingskans)). Door een orthogonale scheiding van de tussen-groepen kwadraatsom kan worden aangetoond dat het verschil voornamelijk wordt veroorzaakt door het verschil tussen de controle (onbehandelde) groep en de 4 behandelde groepen (geplande test). Uit een "niet geplande" test ( $T'$ -methode) moet geconcludeerd worden dat de 4 behandelde groepen onderling gelijk zijn. Deze methoden zijn, zoals iedere a posteriori methode, relatief ongevoelig. Bij een geplande test wijkt de groep "behandeling 18 weken voor monstername" wel significant van de overige behandelde groepen af. Gezien de lange tijdsduur tussen behandeling

en monsternamen is het niet "onredelijk" te stellen dat één van de vragen van het onderzoek is geweest; is het gebruik van estradiol-17 $\beta$  18 weken na behandeling nog aantoonbaar?, hetgeen het gebruik van een a priori test rechtvaardigt.

## 2. Proef ILOB 25.34

De experimentele opzet was gelijk aan die van ILOB proef 25.33 met dat verschil dat de dieren nu 5 of 6 weken na implantatie geslacht werden. Enkelzijdige variantie-analyse geeft nu echter géén significant effect tussen groepen. Oorzaak hiervan is de hoge waarde voor de controlegroep. Bij een t-test blijkt dat deze groep significant hoger is dan controlegroep uit proef ILOB 25.33 ( $P < 0,01$ ).

## 3. ILOB proef 25.35

Ook deze proef werd uitgevoerd op mannelijke kalveren. Van in totaal 60 dieren werd de helft op een leeftijd van 14 weken geïmplantéerd met 20 mg estradiol-17 $\beta$  en 200 mg testosteron. Na 1, 2, 3, 4 respectievelijk 5 weken werden 6 behandelde en 6 onbehandelde dieren geslacht. Bij een tweezijdige variantie-analyse blijkt dat er een significant effect is tussen de kolommen (behandeld en onbehandeld  $P < 0,06$ ) zowel als tussen de rijen (leeftijd,  $P < 0,001$ ). De interactie is niet significant. Dit laatste betekent dat de duur van de behandeling geen meetbare invloed heeft op het effect. Een enkelzijdige variantie-analyse op de controlegroepen geeft een significante tussen-groepen variantie ( $P < 0,002$ ). Uit een "niet-geplande" test volgt dat dit verschil uitsluitend toe te schrijven is aan de groep die op de leeftijd van 15 weken is geslacht ( $P < 0,05$ ). Om deze reden is deze groep bij verdere berekeningen buiten beschouwing gelaten. De geïmplantéerde groepen zijn onderling wel homogeen.



4. ILOB proef 25.38

Mannelijke kalveren werden geïmplanteerd met 20 mg estradiol-17 $\beta$  en 200 mg progesteron. Een enkelzijdige variantie-analyse gaf geen significante tussen-groepen spreiding.

5. ILOB proef 61.08

Mannelijke kalveren werden geïmplanteerd met zeranol (36mg)/Trenboloneacetaat (140 mg) of estradiol-17 $\beta$  (20 mg)/Trenboloneacetaat (140mg). Een enkelzijdige variantie-analyse gaf geen significante tussen-groepen spreiding.

Combinatie-gegevens ILOB proeven

In Tabel 1 zijn de gegevens van controlegroepen samengevat. De behandelde groepen waarbij geen toename werd aangetoond werden als onbehandeld beschouwd. Hierop zijn 2 uitzonderingen gemaakt. De controlegroep uit ILOB proef 25.35, verkregen na 15 weken (behorende bij 1 week behandeling) werd op basis van de uitgevoerde ongeplande test niet meegenomen. De controlegroep van ILOB 25.34 werd niet meegenomen i.v.m. het grote verschil ten opzichte van de controlegroep uit ILOB proef 25.33. Een enkelzijdige variantie-analyse toont aan dat de tussen-groepen variantie significant is ( $P < 0,001$ ). Ook na een log-transformatie zijn de gemiddelden heterogeen ( $P < 0,001$ ). De volgende berekeningen waarin gegevens van deze populatie ("onbehandelde" ILOB kalveren) gebruikt worden zijn dus benaderingen. In Tabel 2 zijn de basisgegevens samengevat van die behandelde groepen waarbij binnen de desbetreffende proef een significante verhoging van het oestrogeengehalte kan worden aangetoond. Een enkelzijdige variantie-analyse toont aan dat er geen verschil is tussen de groepen. Na log-transformatie is het verschil echter wel significant ( $P < 0,001$ ).

B. Combinatie met langs andere weg verkregen waarden

Van "langs andere weg" verkregen waarden is aangenomen dat deze betrekking hebben op onbehandelde dieren. Deze waarden werden onderverdeeld in 3 groepen:

1. mannelijke kalveren
2. mannelijke volwassen runderen
3. mannelijke kalveren/runderen waarvan de leeftijd onbekend is.

In Tabel 3 zijn de basisgegevens samengevat. Een enkelzijdige variantie-analyse, zonder log-transformatie, toont een significante tussen groepen spreiding aan. Een geplande vergelijking van groep "ILOB" en de groepen 1, 2 en 3 toont aan dat de groep "ILOB" een significant hoger oestrogeengehalte bezit ( $P < 0,001$ ). De groepen 1 t/m 3 zijn statistisch onderling gelijk.

C. Vergelijking van het oestrogeengehalte in urine van onbehandelde en behandelde runderen en bepaling van kritische waarden.

De gecombineerde gegevens van de onbehandelde groep (Tabel 3) en die van de behandelde groep (Tabel 2) zijn samengevat in Tabel 4. Er is dus, onafhankelijk van de gebruikte transformatie, een zeer duidelijk verschil tussen de beide groepen. Tot dusverre is niet duidelijk ingegaan op de vraag of een log-transformatie noodzakelijk is. Een belangrijke voorwaarde bij variantie-analyse is dat de varianties van de individuele groepen homogeen zijn. Om deze reden verdient de log-transformatie verreweg de voorkeur. De varianties van de niet getransformeerde waarden verschillen significant. De homogeniteit van de varianties na transformatie heeft als extra voordeel dat ze gecombineerd kunnen worden.

$$S_p^2 = (\sum x_1^2 + \sum x_2^2) / ((n_1-1) + (n_2-1))$$

waarin

$$\sum x_1^2 = S_1^2 \cdot (n_1 - 1) \quad S_1^2 \text{ is variantie onbehandelde groep}$$

$$\sum x_2^2 = S_2^2 \cdot (n_2 - 1) \quad S_2^2 \text{ is variantie behandelde groep}$$

Het uiteindelijke resultaat is samengevat in Tabel 5. Wat zijn de consequenties van deze voorwaarden voor de aantoonbaarheid van illegaal oestrogeengebruik?. In Tabel 6 is voor een aantal oestrogeenconcentraties de overschrijdingskans voor de beide populaties gegeven. De overschrijdingskans van 0.1% voor de onbehandelde populatie komt dus overeen met een overschrijdingskans van 4% voor de behandelde populatie. In de praktijk betekent dit dat het in de slachtsituatie vrijwel onmogelijk is om illegaal gebruik van oestrogeen-houdende preparaten, mits de dosering niet de 20 mg te boven gaat, door meting van het oestrogeengehalte in urine, met voldoende betrouwbaarheid aan te tonen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de verzamelde gegevens betrekking hebben op monsters enige weken na de behandeling genomen en dus zullen corresponderen met gehalten zoals deze aan het einde van de wachttijd te verwachten zijn. Oestrogeengehalten kort na behandeling worden elders in dit verslag besproken. De histogrammen behorend bij de besproken groepen zijn afgebeeld in Figuur 1 en Figuur 2.

#### D. Oestrogeengehalte in urine van vrouwelijke runderen.

De gegevens zijn afkomstig van monsters aangeboden voor onderzoek op oestrogeengehalte, niet afkomstig van ILOB proeven en hebben betrekking op volwassen dieren.

In Tabel 7 zijn de basisgegevens samengevat. Het bijbehorende histogram is afgebeeld in Figuur 3. Zowel aan de waarde voor de variantie als uit het histogram is te zien dat de spreiding binnen deze groep zeer groot is. Dit maakt conclusies over het al dan niet behandeld zijn nagenoeg onmogelijk. Een bijkomende complicatie is het feit dat onbekend is of ook drachtige dieren deel uitmaken van de onderzochte populatie. Die dieren die onderzocht zijn en waarvan zeker is dat ze drachtig waren op het moment van monsternamen (N = 8) gaven een respons > 350 nmol/l. Over met name het gebied van 125 nmol/l, zijnde de bovengrens van de populatie onbehandelde mannelijke dieren, tot aan 350 nmol/l is op dit moment geen gefundeerde uitspraak mogelijk. Hoewel de populatie de classificatie "onbehandeld" heeft

meegekregen, gebaseerd op het feit dat ondubbelzinnige aanwijzingen van een behandeling afwezig zijn, kan een behandeling met een oestrogeen-houdend preparaat beslist niet uitgesloten worden.

E. Oestrogeengehalte in urine afkomstig van een populatie waarvan de herkomst ten dele onbekend is.

Deze populatie, waarvan de basisgegevens zijn samengevat in Tabel 8, kan helaas weinig extra informatie leveren. Het bijbehorende histogram is afgebeeld in Figuur 4. De groep vormt een redelijke afspiegeling van de som van de beide "onbehandelde" populaties.

F. Invloed van een correctie voor het kreatininegehalte.

De tot nu toe besproken totaal gehalten aan "oestrogeen" zijn uitgedrukt als concentraties (mol per volume) en berekend in nanomol per liter (nmol/l). Een mogelijkheid om te corrigeren voor de variatie in het volume geproduceerde urine is het gemeten gehalte te delen door het kreatininegehalte uitgedrukt in mmol/l. De zo verkregen concentratie verhouding zou mogelijk een betere afspiegeling zijn van de per tijdseenheid uitgescheiden hoeveelheid oestrogenen. Om de waarde van deze correctie na te gaan werden de op de ongecorrigeerde waarden uitgevoerde berekeningen herhaald op de concentratie verhoudingen. Als criterium hierbij is het vermogen om een behandeling met een oestrogeen-houdend preparaat aan te tonen gehanteerd. In Tabel 9 zijn de resultaten van een aantal ILOB proeven samengevat. Opgenomen zijn de resultaten van variantie-analyses op oestrogeengehalten en concentratie verhoudingen, zowel met als zonder log transformatie. De resultaten geven aan dat verder onderzoek wenselijk is. Een eerste conclusie is echter dat een correctie voor het kreatininegehalte weinig extra informatie geeft. In een aantal gevallen gaat zelfs informatie verloren. Een aanvullend gegeven is dat kreatinine in kalver- en runderurine tamelijk instabiel is gebleken.

## G. Vergelijking resultaten overige ILOB experimenten

### Proef ILOB 61.05

Experiment waarbij de invloed van het percentage ruw eiwit op de effectiviteit van de combinatie estradiol-17 $\beta$  (20mg)/Trenboloneacetaat (140 mg) werd onderzocht bij kalveren. Onderzoek van urine vond plaats vier weken na implantatie. Significante tussen-groep effecten waren hierbij niet aantoonbaar.

### Proef ILOB 25.19

Een experiment met kalveren waarbij eveneens met estradiol-17 $\beta$  (20mg)/Trenboloneacetaat (140mg) geïmplanteerd werd. Onderzoek van urine vond op verschillende tijdstippen plaats. Kort na de implantatie waren significante effecten duidelijk aantoonbaar. De resultaten zijn in Tabel 11 samengevat. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen bij een experiment waarbij ossen werden geïmplanteerd met estradiol-17 $\beta$  (20mg) en Trenboloneacetaat (140mg) (proef ILOB 134.05) (Stephany & Huis in't Veld, 1978).

### Overige experimenten

In Tabel 10 zijn de behandelingen en statistische basisgegevens samengevat van de ILOB proeven 25.23, 25.24, 25.25, 25.27 en 25.29. Incidenteel zijn significante effecten binnen een experiment aantoonbaar. De conclusies zoals in het bovenstaande weergegeven worden door deze resultaten onderstreept.

Legenda

Figuur 1.

Frequentieverdeling van de totaal sterofd oestrogeengehalten zoals gemeten in monsters urine van mannelijke dieren niet met een oestrogeen houdend preparaat behandeld.

Figuur 2

Frequentieverdeling van de totaal sterofd oestrogeengehalten zoals gemeten in monsters urine van mannelijke kalveren behandeld met een oestrogeen houdend preparaat.

Figuur 3

Frequentieverdeling van de totaal sterofd oestrogeengehalten zoals gemeten in monsters urine van vrouwelijke runderen, niet behandeld met een oestrogeen houdend preparaat.

Figuur 4

Frequentieverdeling van de totaal sterofd oestrogeengehalten zoals gemeten in monsters urine van mannelijke en vrouwelijke runderen, waarvan wordt aangenomen dat geen behandeling met een oestrogeen houdend preparaat heeft plaatsgevonden.

Referenties

Huis in't Veld, L.G., Both-Miedema, R., Smit, P.J. en Stekelenburg, P.  
(1976)

Opsporing van exogene oestrogenen bij levende dieren en bij slachting.  
RIV, VAR 25, 183-187.

Huis in't Veld, L.G., Both-Miedema, R. en Laan, C.A. (1977)

Exploratie van de mogelijkheden om de bepaling van oestrogene stoffen  
in urine te automatiseren.

RIV, VAR 17, 180-183.

Huis in't Veld, L.G., Both-Miedema, Laan, C.A. en Blitterswijk, H. van  
(1978a)

Verder onderzoek over chemische oestrogeenbepalingen in urine.

RIV, VAR 40, 225-227.

Huis in't Veld, L.G., Both-Miedema, R. en Laan, C.A. (1978b)

Kwantitatieve bepaling van het gehalte aan endogene oestrogenen in  
urine van slachtdieren met 3 verschillende methoden.

RIV rapport nr. 32/78 Endo.

Stephany, R.W. en Huis in't Veld, L.G. (1978)

Analytisch-chemisch onderzoek naar residuen van anabolica in  
slachtvee.

Voordracht gehouden tijdens 152ste wetenschappelijke vergadering van  
het RIV. Bilthoven, 23 oktober 1978.

Sokal, R.R and Rohlf, F.J.

Biometry, second edition, 1981

W.H. Freeman and company, San Francisco.

ISBN 0-7167-1254-7

Lijst van gebruikte afkortingen

E2	estradiol-17 $\beta$
N	aantal waarnemingen
ns	niet significant
s	significant
sE	steroid oestrogenen
X	gemiddelde
S	standaarddeviatie
S <sup>2</sup>	variantie
P	overschrijdingskans
ppb	"parts per billion"
v	vrijheidsgraden
l	liter
nmol	nanomol
nh	niet homogeen
h	homogeen

Omrekeningsfactoren:

De in dit rapport gebruikte eenheid voor het totaal oestrogeen steroid gehalte is uitgedrukt in nmol/l en heeft betrekking op een zogenaamde mengstandaard oestron, estradiol-17 $\beta$  en oestriol. De gemiddelde molecuulmassa van een 1:1:1 mengsel bedraagt 277. Een veel gehanteerde eenheid echter is de ng/ml oftewel de  $\mu$ g/l oftewel de ppb. Resultaten uitgedrukt in nmol/l kunnen door vermenigvuldiging met 0,277 omgerekend worden in ppb terwijl resultaten in ppb door vermenigvuldiging met 3,61 omgerekend kunnen worden nmol/l.



Tabel 1

Samenvatting van basisgegevens van "onbehandelde" groepen mannelijke kalveren uit ILOB proeven

N	X (bereik) (nmol/l)	s <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
11	45,5 (12- 80)	472
11	51,8 (24- 98)	520
6	17,8 ( 3- 33)	133
6	12,0 ( 5- 29)	105
6	8,3 ( 3- 19)	36
6	12,3 ( 6- 19)	35
6	56,8 (44- 68)	95
10	48,9 ( 7-115)	926
10	47,0 ( 5- 99)	683
10	38,9 (15- 79)	753
Somgroep:		
82	37,4 ( 3-115)	688

Tabel 2

Samenvatting van basisgegevens behandelde groepen mannelijke kalveren uit ILOB proeven

N	X (bereik) (nmol/l)	s <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
12	84,9 (30-174)	1738
11	83,8 (24- 98)	1694
12	95,0 (12- 80)	1384
6	101 (62-165)	1626
6	79,8 (33-171)	3201
6	90,0 (39-297)	10794
6	85,8 (30-188)	3699
6	46,3 (20- 65)	554
6	37,3 (27- 65)	200
6	52,2 (12-125)	1743
6	32,7 (14- 53)	170
14	74,2 (41-161)	1079
6	85,8 (35-110)	954
-----		
Somgroep:		
103	75,6 (12-297)	2164

Tabel 3

Basisgegevens onbehandelde mannelijke dieren. Tevens is het gemiddelde van de gecombineerde controlegroepen "ILOB" gegeven.

Groep	N	X (nmol/l)	S <sup>2</sup> (nmol/l <sup>2</sup> )
1	7	21,9	139
2	19	25,6	235
3	55	25,7	163
"ILOB"	82	37,4	688
-----			
Somgroep:	163	31,4	466

Tabel 4

Statistische basisgegevens met betrekking tot het oestrogeengehalte in de urine van de somgroep van alle mannelijke dieren en de somgroep van behandelde mannelijke ILOB kalveren.

Groep	Geen transformatie			100 x log transformatie		
	X (nmol/l)	N	S <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>	X (nmol/l)	N	S <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
onbehandeld	31,4	163	466	138	163	1135
behandeld	75,6	103	2164	180	103	743

enkelzijdige variantie-analyse

	Geen transformatie	100 x log transformatie
Tussen groepen variantie	123624	108736
Binnen groepen variantie	1122	983
F	110	111
v;v	1;264	1;264
P	< 0,001	< 0,001

Tabel 5

Steekproef gemiddelde en standaarddeviatie (na 100 x log-transformatie) voor het oestrogeengehalte in urine van de somgroep van onbehandelde dieren en van de somgroep van met een oestrogeen-houdend preparaat behandelde kalveren.

Groep	N	X (nmol/l)	S (nmol/l)
onbehandeld	163	138	31
behandeld	103	180	31

Tabel 6

Overschrijdingskansen als functie van het gemeten totaal steroid  
gehalte voor de populaties onbehandelde respectievelijk behandelde  
dieren.

oestrogeen gehalte (Y) (nmol/l)	onbehandeld				behandeld			
	100.log Y	Z*	cumm.opp	% over- schrijdings- kans	Z	cumm.opp	% over- schrijdings- kans	
60	178	1,28	0,90	10	< 0	< 0,50	> 50	
78	189	1,65	0,95	5	< 0	< 0,50	> 50	
126	210	2,33	0,99	1	0,97	0,67	33	
219	234	3,10	0,999	0,1	1,74	0,96	4	

cumm. opp = cummatief oppervlak verdelingscurve

$$*Z = \frac{Y - \bar{Y}}{S}$$

Tabel 7

Basisgegevens met betrekking tot de uitscheiding van oestrogenen in de urine van vrouwelijke runderen.

N	X (nmol/l)	S <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
79	108	16886

Tabel 8

Basisgegevens met betrekking tot de uitscheiding van oestrogenen in urine, afkomstig van een populatie waarvan de herkomst ten dele onbekend is.

N	X (nmol/l)	s <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
437	73	9983



Tabel 9

Invloed correctie oestrogeengehalten voor het kreatininegehalte op het vermogen om een behandeling met een oestrogeen-houdend preparaat aan te tonen. Gegeven is de F-ratio van de tussen-groepen variantie over de binnen-groepen variantie.

Transformatie	oestrogeengehalte		concentratie verhouding		
		geen	log	geen	log
ILOB proef 25.33	F	4,68	3,99	1,48	1,87
	v;v	4;52	4;52	4;52	4;52
	P	0,006	0,014	ns	ns
ILOB proef 25.38	F	1,54	1,37	0,004	0,05
	v;v	2;23	2;23	2;23	2;23
	P	ns	ns	ns	ns
ILOB proef 25.35	F-kolommen		11,4		21,5
	v;v		1;4		1;4
	P		0,06		0,02
	F-rijen		6,52		7,42
	v;v		4;50		4;50
	P		<0,001		<0,001
	i		ns		s

Tabel 10

Samenvatting van de statistische basisgegevens van de ILOB experimenten 25.23, 25.24, 25.25, 25.27 en 25.29.

Proef ILOB 25.23 (leeftijd bij behandeling: 10 weken)

groep	weken na behandeling	N	X (nmol/l)	S <sup>2</sup> (nmol/l) <sup>2</sup>
controle	-	2	30	1.3
mg E2	8.5	4	28	13.
inf E2	8.5	5	23	142

Conclusie: geen significante effecten.

Proef ILOB 25.24 (leeftijd bij behandeling: 11 weken)

groep	weken na behandeling	N	X	S <sup>2</sup>
controle	-	2	15	14
20 E2	9	4	19	90
inf E2	1*	5	14	53

Conclusie: geen significante effecten.

Proef ILOB 25.25 (leeftijd bij behandeling: 10 weken, combinatie met Trenboloneacetaat)

groep	weken na behandeling	N	X	S <sup>2</sup>	opmerking
controle	-	2	15	689	
20mg E2	9	2	45	5,2	
20mg E2	6**	2	60	1313	verw. na 3 weken
Infuus E2	3*	2	23	104	

Conclusie: geen significante effecten.

Proef ILOB 25.27 (leeftijd bij behandeling: 11 weken, combinatie met Trenboloneacetaat)

groep	weken na behandeling	N	X	S <sup>2</sup>	opmerking
controle	-	6	50	325	
20mg E2	6	6	115	156	
40mg E2	2**	7	35	83	imp. verw. na 4 weken
40mg E2	2**	7	36	52	imp. verw. na 3 weken
40mg E2	2**	7	63	806	imp. verw. 2 weken

Conclusie: geen significante effecten.

vervolg Tabel 10

Proef ILOB 25.29 (leeftijd bij behandeling 11,5 weken, combinatie met Trenboloneacetaat)

Controle	-	6	18	83
	-	6	28	43
20mg E2	7	6	59	766
	11	6	55	1056
	17	5	15	43
20mg E2	3**	7	18	68
	7**	7	26	346 imp. verw. na 4 weken
40mg E2	3**	7	36	199
	7**	6	63	83 imp. verw. na 4 weken
	21	7	45	133

Conclusie: geen significante effecten.

\* na stopzetting infuus

\*\* na verwijdering implantaat

Tabel 11

Totaal oestrogeen gehalten als funktie van het aantal weken na behandeling (ILOB proef 25.19). Per week per groep zijn de gemiddelde waarde, de standaarddeviatie en het aantal waarnemingen gegeven. De waarden verkregen voor de behandelde groepen zijn vergeleken met de bijbehorende controlegroepen, het al dan niet homogeen zijn van de varianties en de P-waarde (tweezijdig) zijn vermeld. Groep I, controle; Groep II, 20mg E2 en 140mg Trenboloneacetaat op 11 weken; Groep III, 20mg E2 en 140mg Trenboloneacetaat op 11 en 15 weken. Gehalten in nmol/l.

	groep		
	I	II	III
week 1			
X	32,5	141.	144.
S <sup>2</sup>	65,0	559.	338.
		nh	nh
N	4	4	4
P		0,26	0,10
week 2			
X	36,1	339.	199.
S <sup>2</sup>	130.	780.	663.
		nh	nh
N	4	4	4
P		0,07	0,18
week 3			
X	13,7	112.	292.
S <sup>2</sup>	13,0	351.	832.
		nh	nh
N	4	4	4
P		0,13	0,09

week 4

X	15,9	101.	159.
s <sup>2</sup>	31,2	156.	286.
		nh	nh
N	4	4	4
P		0,03	0,04

week 5

X	19,8	65.	253.
s <sup>2</sup>	31,2	104.	546.
		nh	
N	4	4	4
P		0,02	0,05

week 6

X	23,5	30,7	68,6.
s <sup>2</sup>	58,5	48,1	195.
		h	h
N	4	4	4
P		0,52	0,16

week 7

X	19,9	21,6	94,9
s <sup>2</sup>	16,9	48,1	273.
		h	nh
N	4	4	4
P		0,80	0,15

week 8

X	25,3	39,7	46,9
s <sup>2</sup>	61,1	105.	247.
		h	nh
N	4	4	4
P		0,44	0,58

week 9

X	21,7	10,8	50,5
s <sup>2</sup>	33,8	18,2	156.
		h	h
N	4	4	4
P		0,10	0,32

week 10

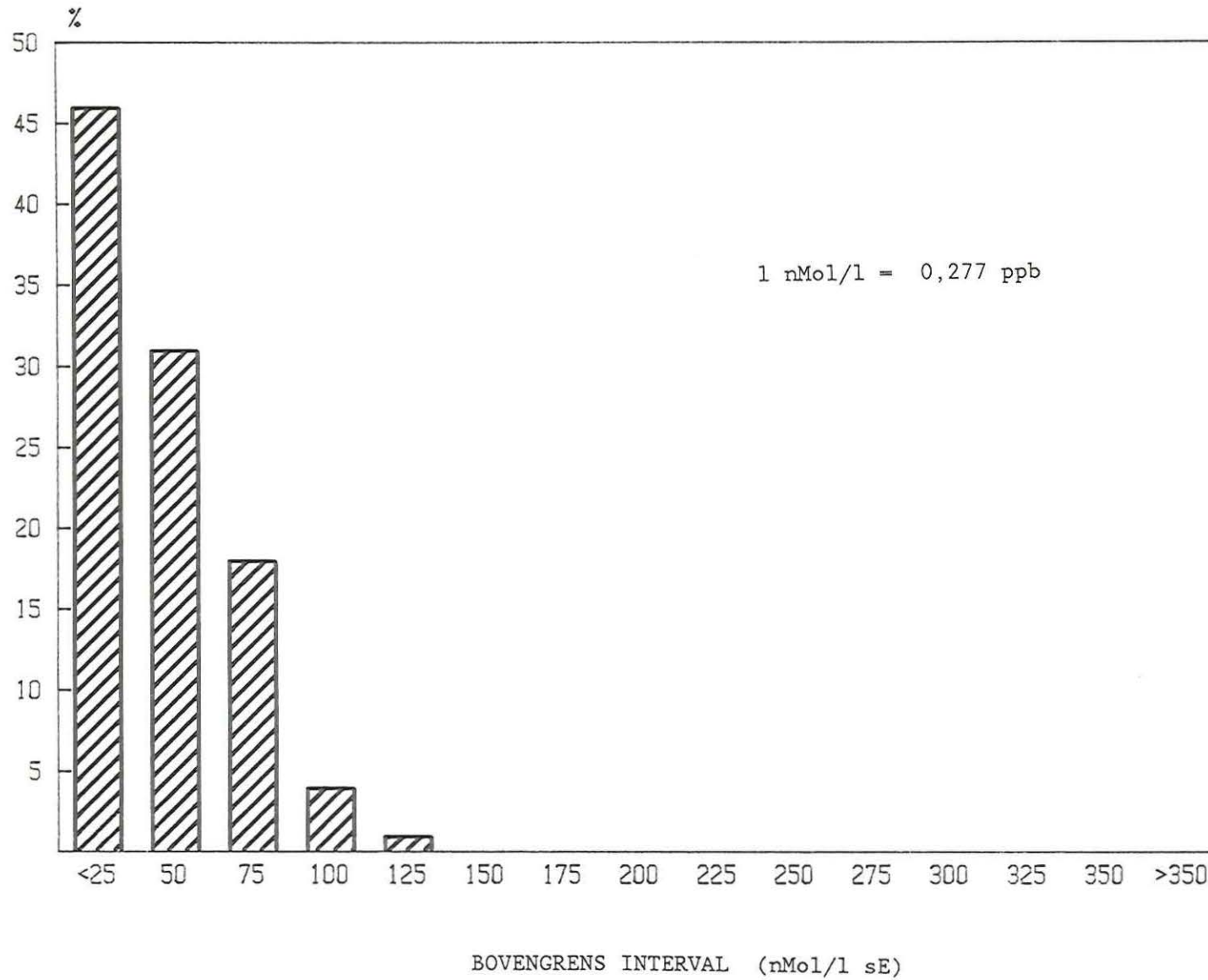
X	7,2	12,6	15,2
s <sup>2</sup>	10,4	22,1	58,5
		h	nh
N	4	4	4
P		0,16	0,41

week 11

X	15,9	16,2	19,5
s <sup>2</sup>	24,7	23,4	54,6
N	4	4	4
		h	h
P		0,95	0,68

SOMPOPULATIE ONBEHANDELDE MANNELIJKE DIEREN

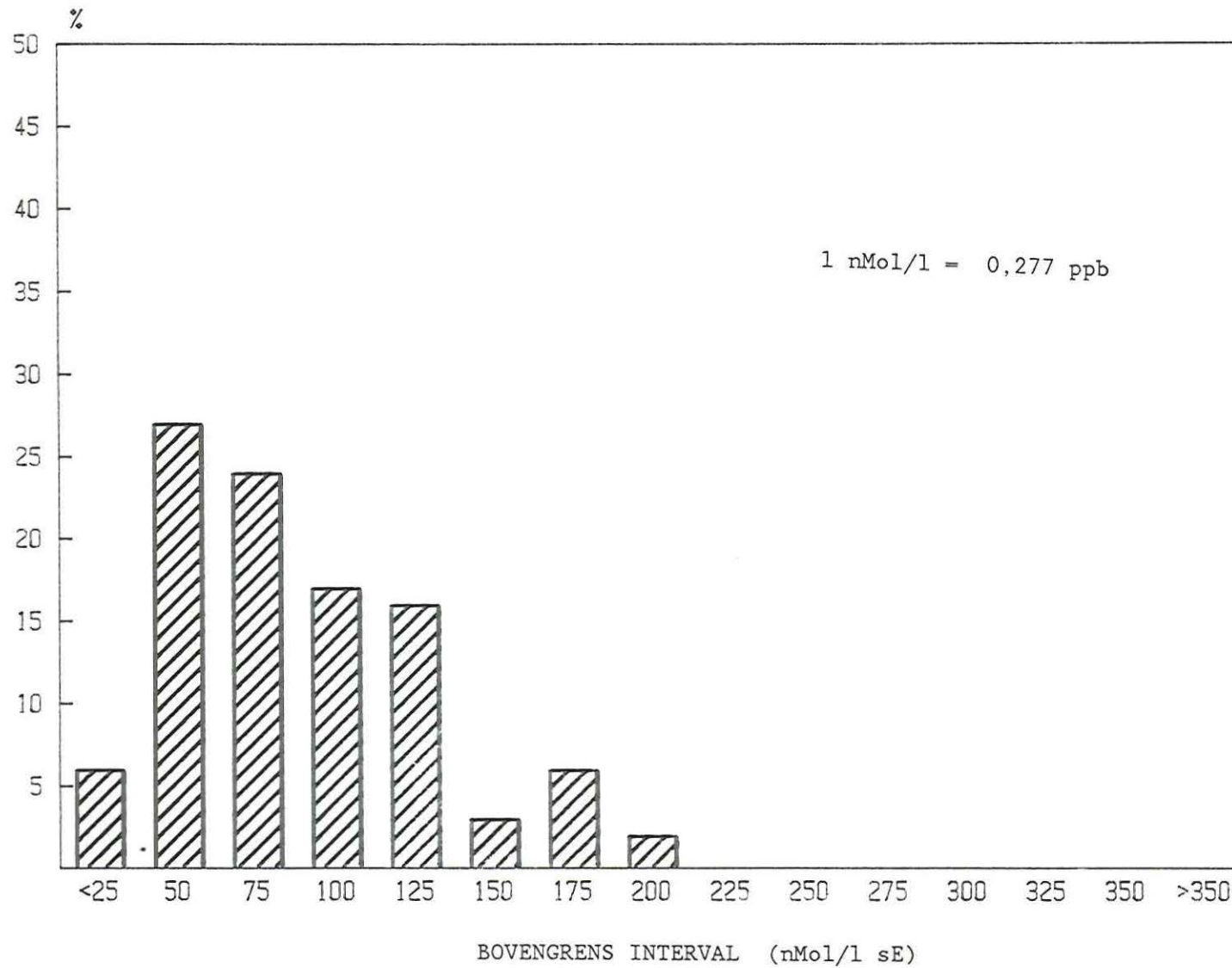
N = 163 (= 100%)



Figuur 1

SOMPOPULATIE BEHANDELDE MANNELIJKE KALVEREN

N = 103 (= 100%)

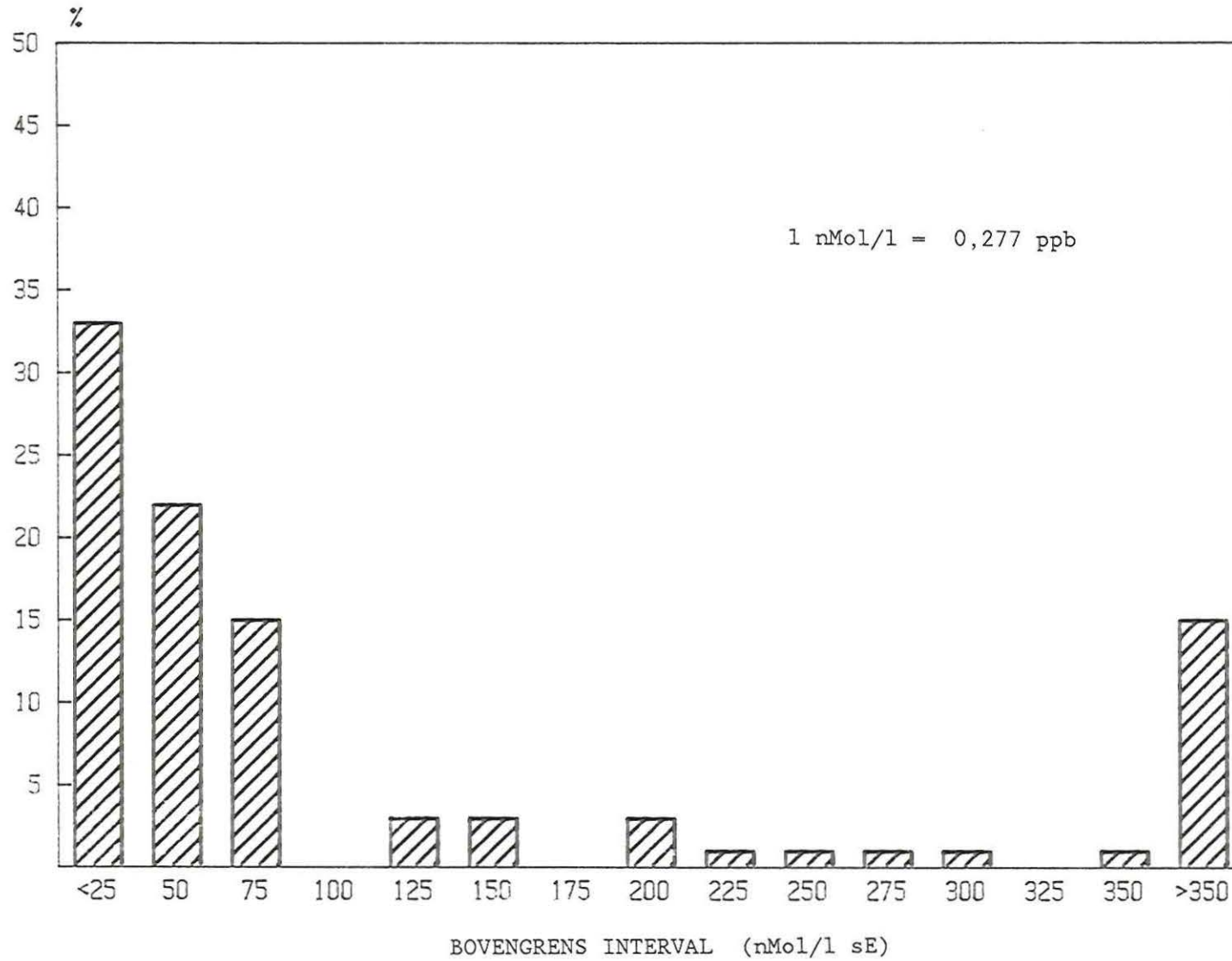


Figuur 2



VROUWELIJKE ONBEHANDELDE RUNDEREN

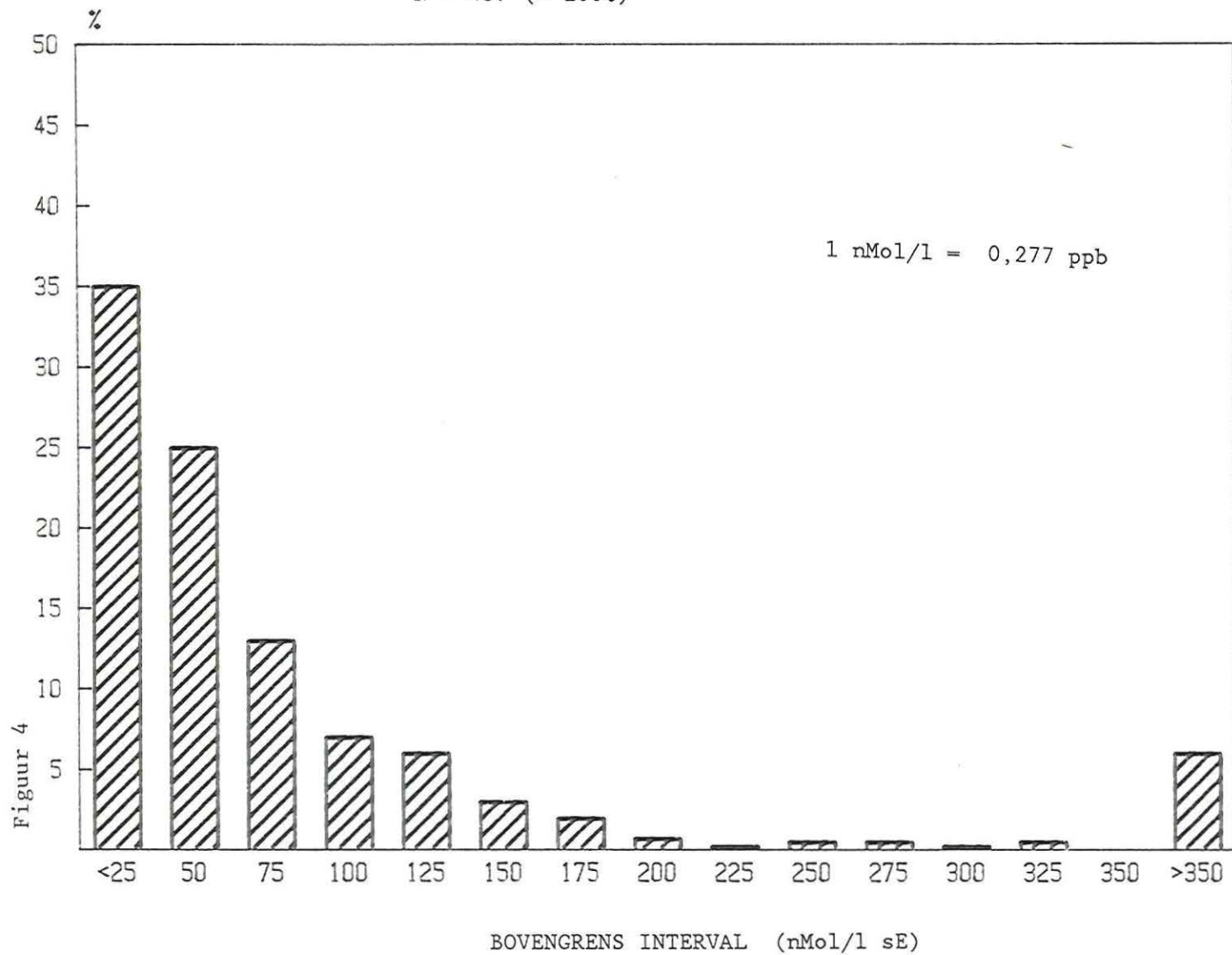
N = 79 (= 100%)



Figuur 3

MANNELIJKE/VROUWELIJKE ONBEHANDELDE RUNDEREN

N = 437 (= 100%)



- BIJLAGE II -

RESULTATEN VAN DE BEPALING (HPLC/RIA) VAN  
VRIJ OESTRADIOL-17 $\beta$  , PROGESTERON EN TESTOSTERON  
IN BLOEDPLASMA VAN MANNELIJKE EN VROUWELIJKE VLEESKALVEREN  
( PILOT STUDY ).

RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

STIERKALVEREN (TROUW & CO)  
 LEEFTIJD : 22 WEKEN  
 DATUM BLOEDAFNAME : 19.02.87

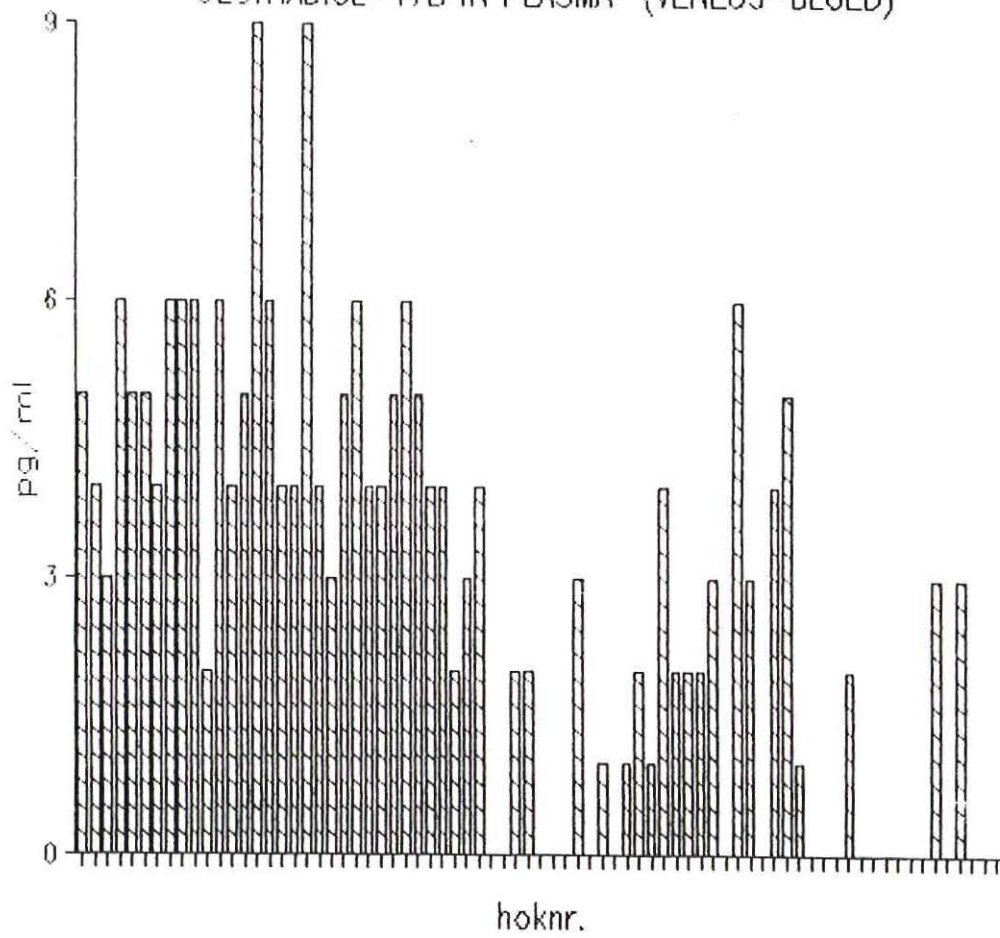
		OESTRADIOL-17 $\beta$		PROGESTERON		TESTOSTERON	
volgnr.	hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml	
101	80	5	80	19	80	553	
102	81	4	81	23	81	2659	
103	82	3	82	56	82	3657	
104	83	6	83	17	83	466	
105	84	5	84	25	84	408	
106	85	5	85	42	85	447	
107	86	4	86	22	86	254	
108	87	6	87	13	87	562	
109	88	6	88	23	88	597	
110	89	6	89	23	89	444	
111	90	2	90	*	90	6684	
112	91	6	91	44	91	551	
113	92	4	92	45	92	345	
114	93	5	93	45	93	7344	
115	94	9	94	28	94	1148	
116	95	6	95	19	95	6912	
117	96	4	96	68	96	7490	
118	97	4	97	19	97	816	
119	98	9	98	56	98	428	
120	99	4	99	35	99	439	
121	101	3	101	57	101	247	
137	116	2	116	40	116	613	
138	117	2	117	29	117	4397	
139	118	0	118	25	118	534	
140	119	0	119	28	119	4510	
141	120	0	120	39	120	4984	
142	121	3	121	18	121	141	
143	122	0	122	22	122	2888	
144	123	1	123	21	123	3246	
145	125	0	125	32	125	3174	
147	126	1	126	118	126	449	
148	127	2	127	38	127	393	
149	128	1	128	111	128	336	
150	129	4	129	30	129	8156	
151	130	2	130	24	130	5739	
152	131	2	131	67	131	465	
153	132	2	132	14	132	339	
154	133	3	133	22	133	3311	
155	134	0	134	20	134	4613	
156	135	6	135	36	135	3931	
157	136	3	136	31	136	766	
158	137	0	137	33	137	6774	
159	138	4	138	75	138	7290	
160	139	5	139	29	139	8896	
161	140	1	140	46	140	1544	
162	141	0	141	56	141	194	
163	142	0	142	42	142	5025	
164	143	0	143	51	143	381	
165	144	2	144	51	144	1746	
166	145	0	145	49	145	5934	
167	146	0	146	67	146	4048	
168	147	0	147	29	147	3565	
169	148	0	148	49	148	1153	
170	149	0	149	33	149	5416	
171	150	0	150	43	150	4903	
172	151	3	151	45	151	4270	
173	152	0	152	32	152	1835	
174	153	3	153	37	153	1274	
175	154	0	154	31	154	429	
176	155	0	155	29	155	3119	
177	156	0	156	34	156	393	

GEMIDDELDE (pg/ml) : 2.8  
 S.D. (n-1) : 2.4  
 RANGE : 0-9  
 n : 75  
 Classificatie niveau : 10

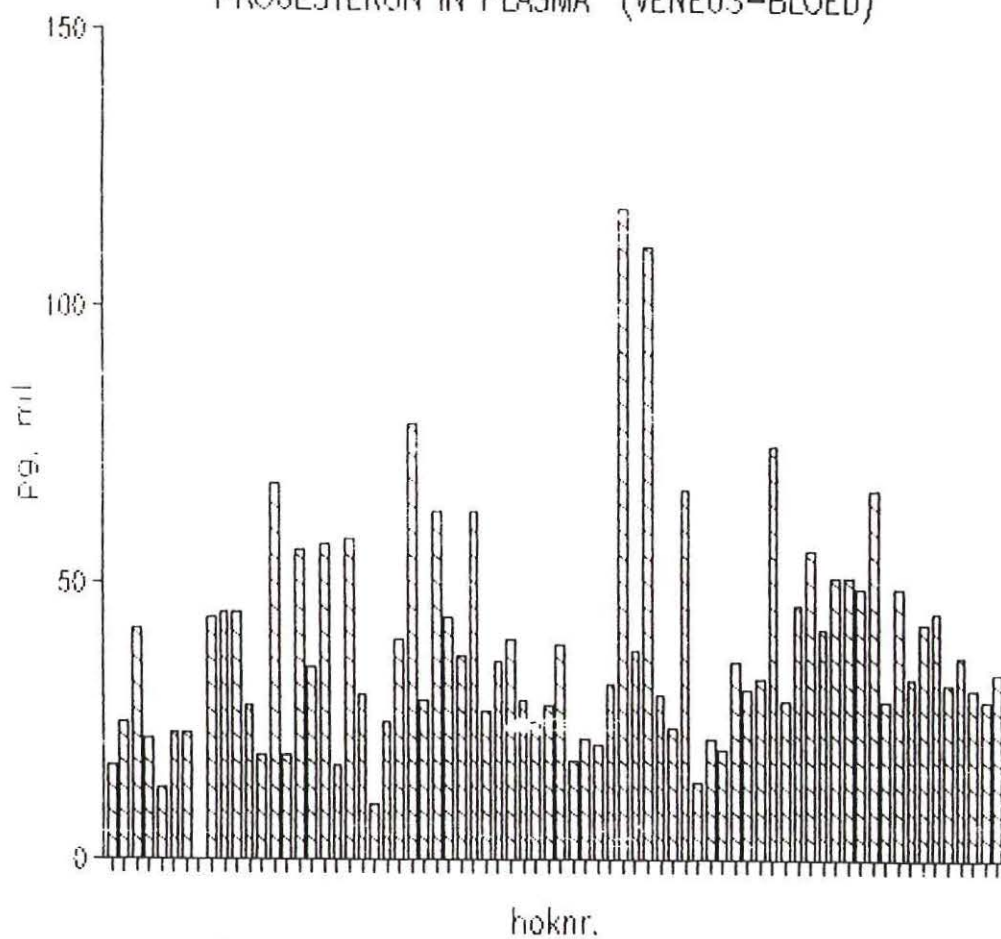
GEMIDDELDE (pg/ml) : 38.7  
 S.D. (n-1) : 20.1  
 RANGE : 10-118  
 n : 74  
 Classificatie niveau : 20

GEMIDDELDE (pg/ml) : 2812  
 S.D. (n-1) : 2708  
 RANGE : 141-9239  
 n : 75  
 Classificatie niveau : 20

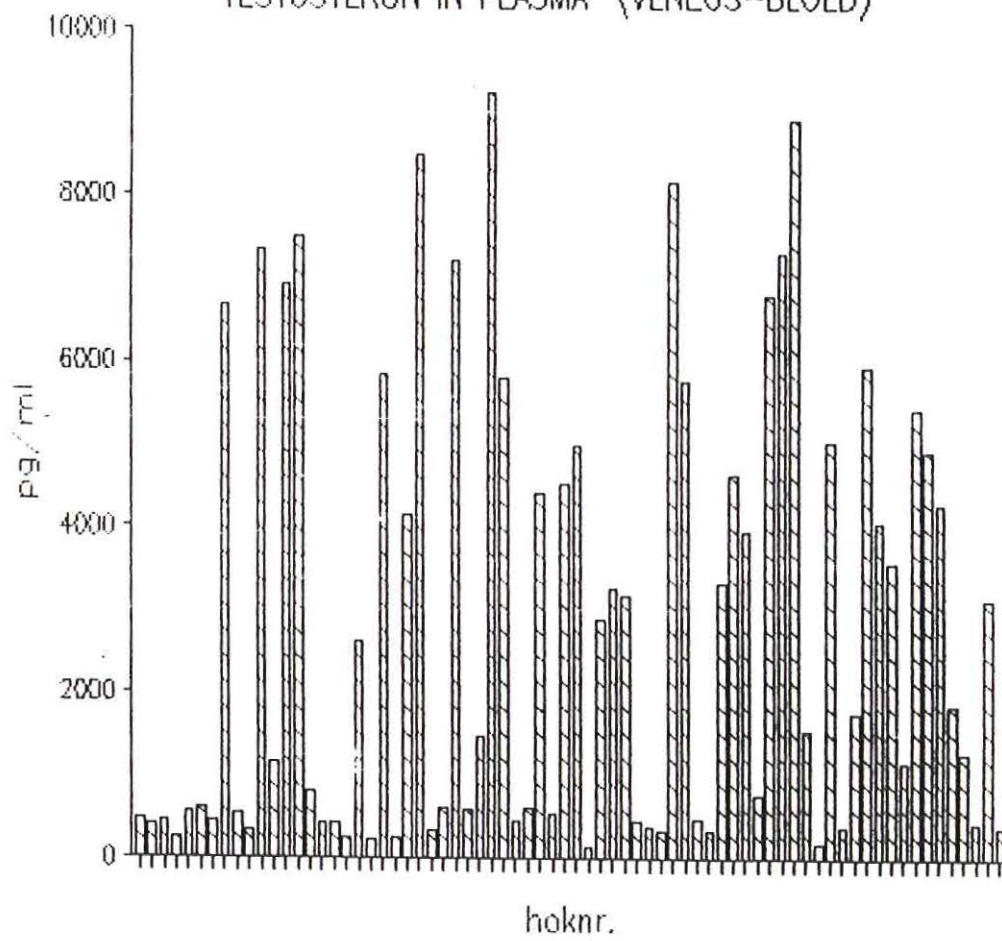
STIERKALVEREN , 22 WEKEN  
OESTRADIOL-17B IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



STIERKALVEREN , 22 WEKEN  
PROGESTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



STIERKALVEREN , 22 WEKEN  
TESTOSTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17 $\beta$  , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

STIERKALVEREN (TROUW & CO)  
 LEEFTIJD : 23 WEKEN  
 DATUM BLOEDAFNAME : 26.02.87 (SLACHTHUIS)

		OESTRADIOL-17 $\beta$		PROGESTERON		TESTOSTERON	
volgnr.	hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml	
1	4	4	4	496	4	450	
2	7	4	7	172	7	6961	
3	2	2	2	218	2	728	
4	5	1	5	1141hh	5	273	
5	3	5	3	169	3	622	
6	12	3	12	258	12	333	
7	10	4	10	679	10	563	
8	9	2	9	203	9	372	
9	1	4	1	178	1	499	
10	21	4	21	316	21	245	
11	25	2	25	266	25	493	
12	14	2	14	340	14	233	
13	20	3	20	187	20	705	
14	19	*	19	*	19	*	
15	18	4	18	197	18	876	
16	17	0	17	253	17	210	
18	6	1	6	83	6	276	
19	8	4	8	200	8	274	
22	23	2	23	58	23	252	
27	13	1	13	157	13	217	
31	16	3	16	192	16	485	
39	15	2	15	59	15	799	
40	11	1	11	53	11	484	
48	79	2	79	194	79	1252	
53	26	2	26	518	26	333	

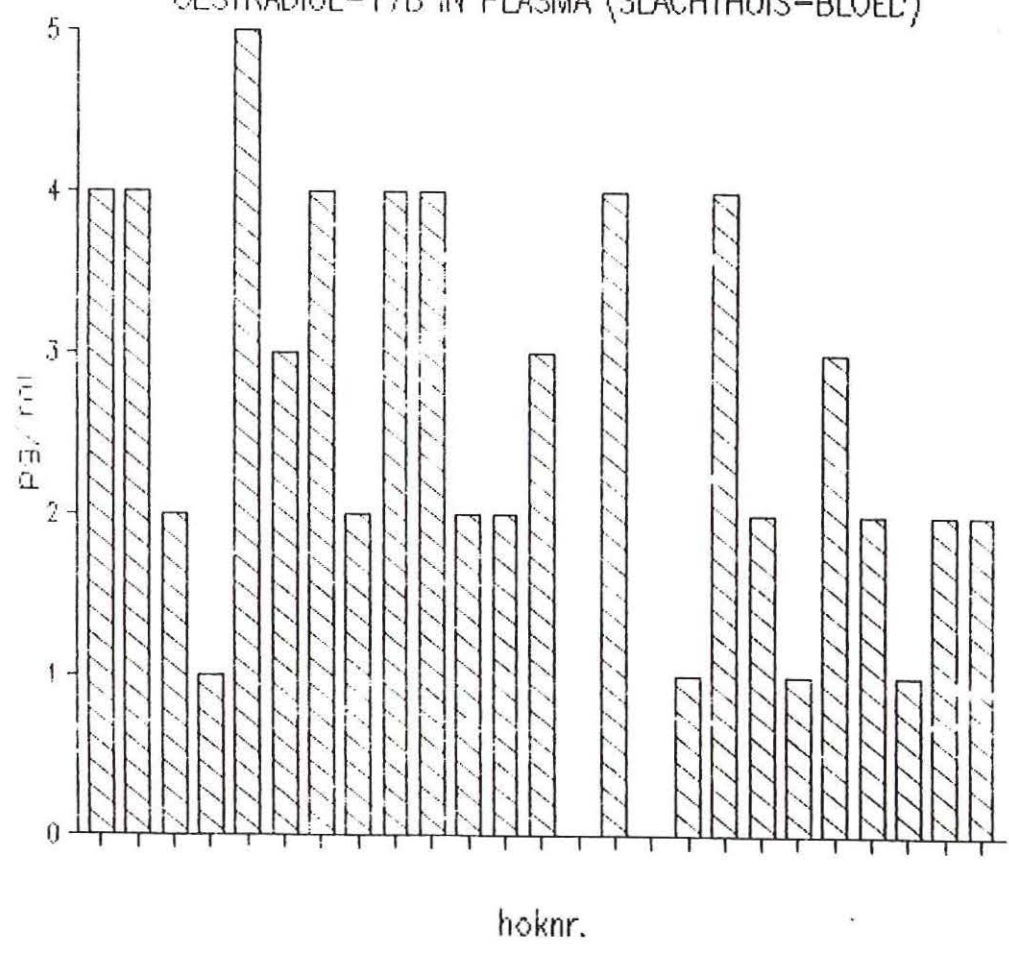
GEMIDDELDE (pg/ml) : 2.6  
 S.D. (n-1) : 1.3  
 RANGE : 0-5  
 n : 24  
 Classificatie niveau : 10

GEMIDDELDE (pg/ml) : 237  
 S.D. (n-1) : 152  
 RANGE : 53-679  
 n : 23  
 Classificatie niveau : 20

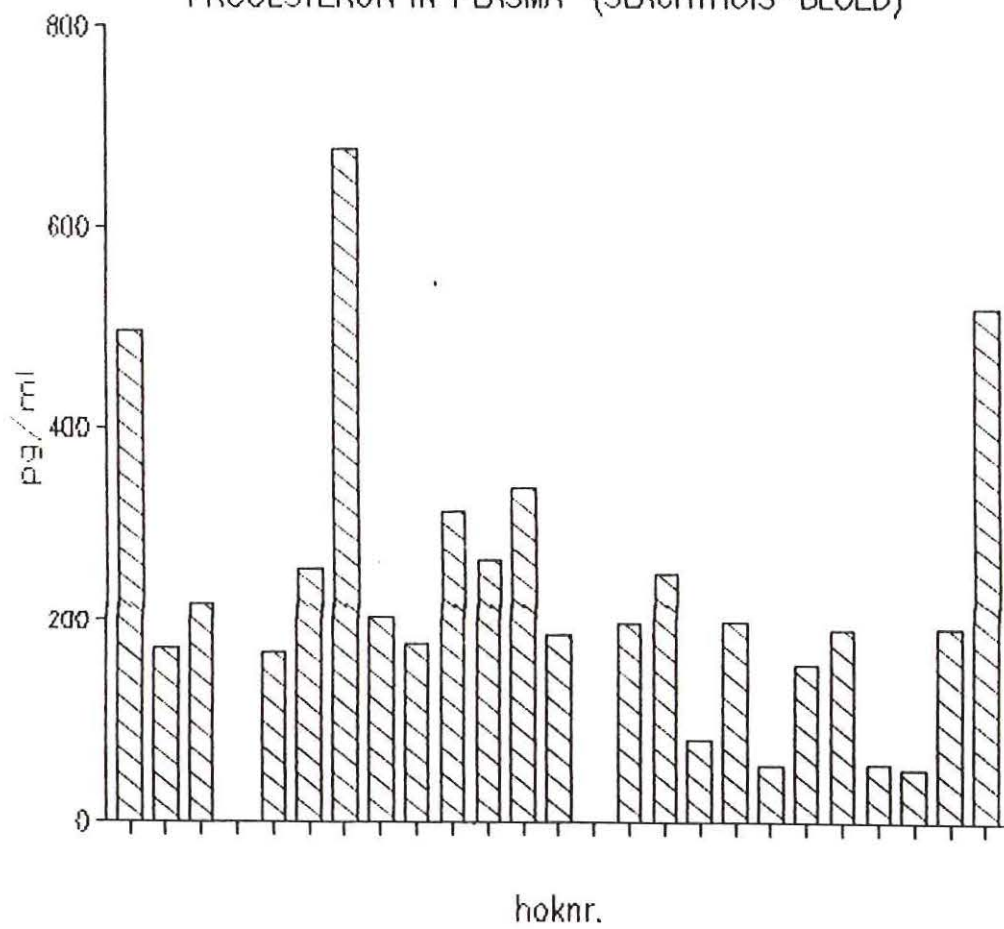
GEMIDDELDE (pg/ml) : 747  
 S.D. (n-1) : 1348  
 RANGE : 210-6961  
 n : 24  
 Classificatie niveau : 20



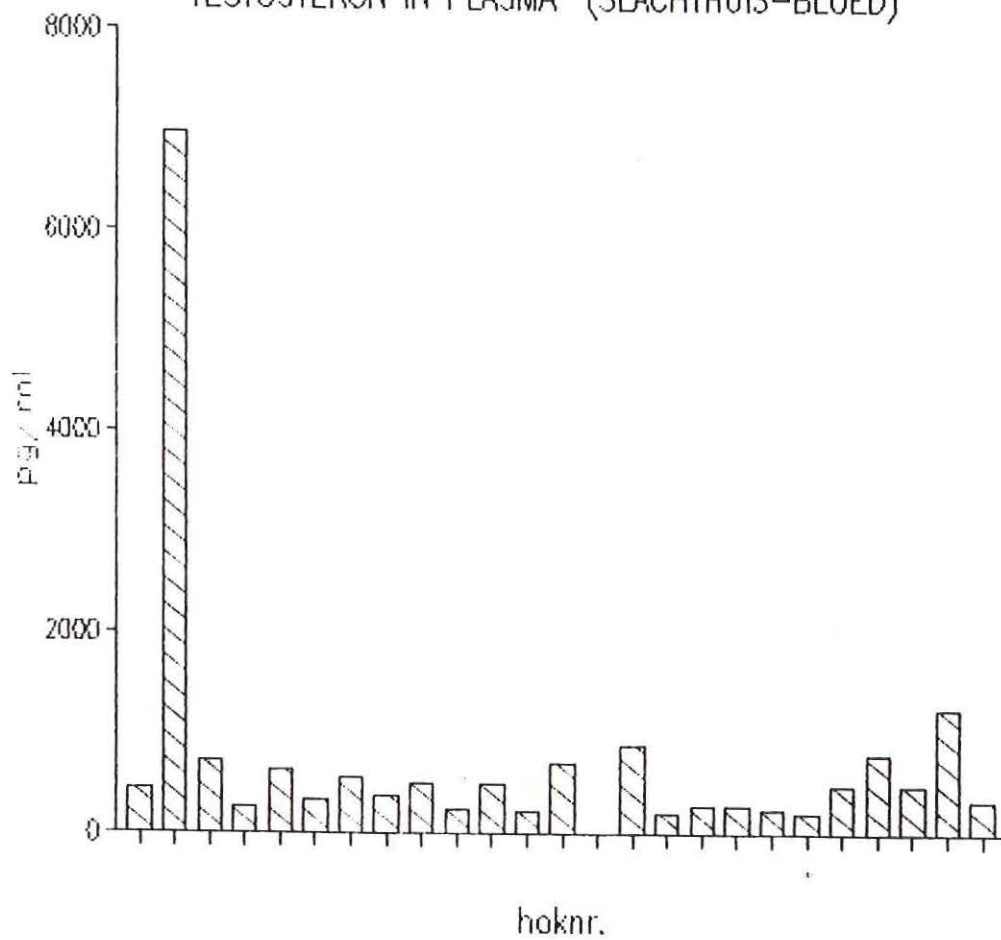
STIERKALVEREN , 23 WEKEN  
OESTRADIOL-17 $\beta$  IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



STIERKALVEREN , 23 WEKEN  
PROGESTERON IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



STIERKALVEREN , 23 WEKEN  
TESTOSTERON IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17B , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

VROUWELIJKE FOKKALVEREN (IVVO)  
 LEEFTIJD : 7 - 11 MAANDEN  
 DATUM BLOEDAFNAME : 10.12.87

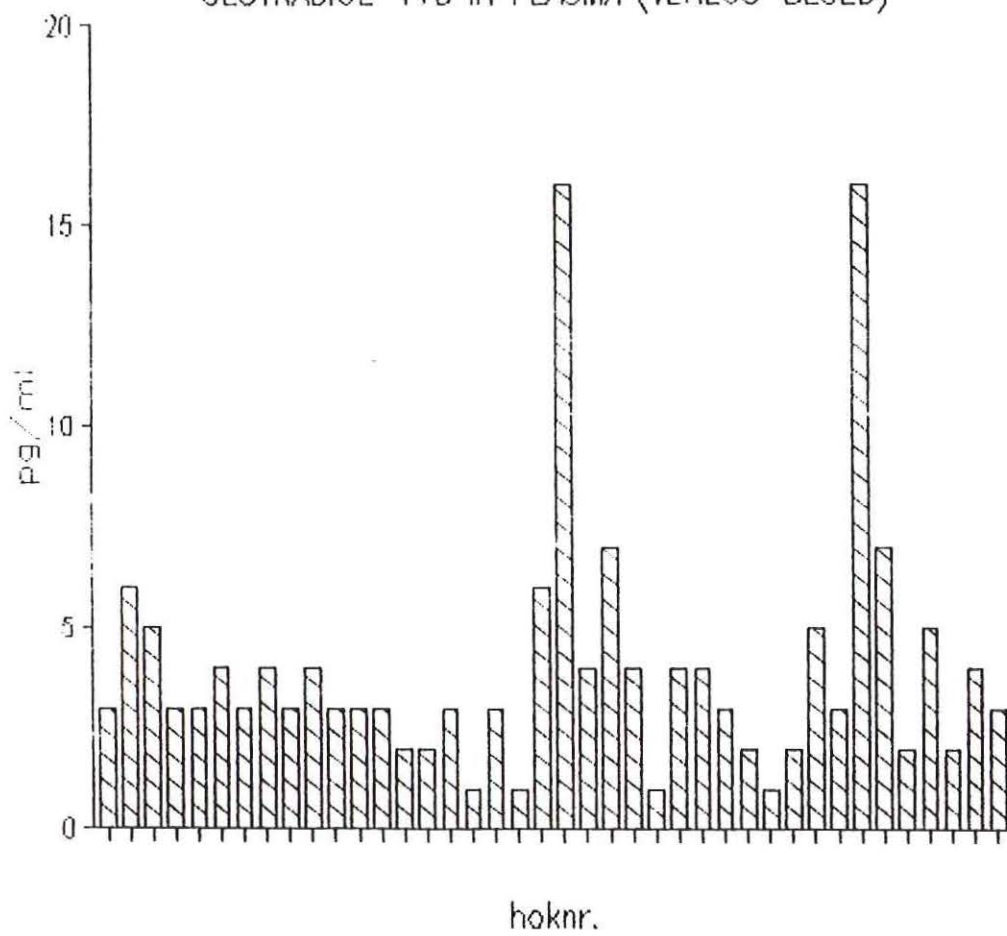
OESTRADIOL-17B		PROGESTERON		TESTOSTERON	
hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml	hoknr.	pg/ml
1	3	1	90	1	24
2	6	2	60	2	22
3	5	3	93	3	24
4	3	4	93	4	18
5	3	5	109	5	13
6	4	6	188	6	18
7	3	7	155	7	21
8	4	8	72	8	22
9	3	9	190	9	16
10	4	10	67	10	16
11	3	11	84	11	18
12	3	12	53	12	26
13	3	13	45	13	20
14	2	14	43	14	18
15	2	15	88	15	25
16	3	16	66	16	18
17	1	17	169	17	18
18	3	18	91	18	23
19	1	19	72	19	37
20	6	20	272	20	19
21	16	21	326	21	26
22	4	22	*	22	11
23	7	23	434	23	17
24	4	24	83	24	19
25	1	25	4115	25	14
26	4	26	62	26	36
27	4	27	43	27	31
28	3	28	136	28	28
29	2	29	83	29	28
30	1	30	4887	30	29
31	2	31	43	31	46
32	5	32	569	32	29
33	3	33	58	33	26
34	16	34	327	34	38
35	7	35	50	35	35
36	2	36	51	36	21
37	5	37	3463	37	24
38	2	38	3775	38	22
39	4	39	46	39	13
40	3	40	3114	40	22

GEMIDDELDE (pg/ml) : 4  
 S.D. (n-1) : 3.1  
 RANGE : 1-16  
 n : 40  
 Classificatie  
 niveau : 10

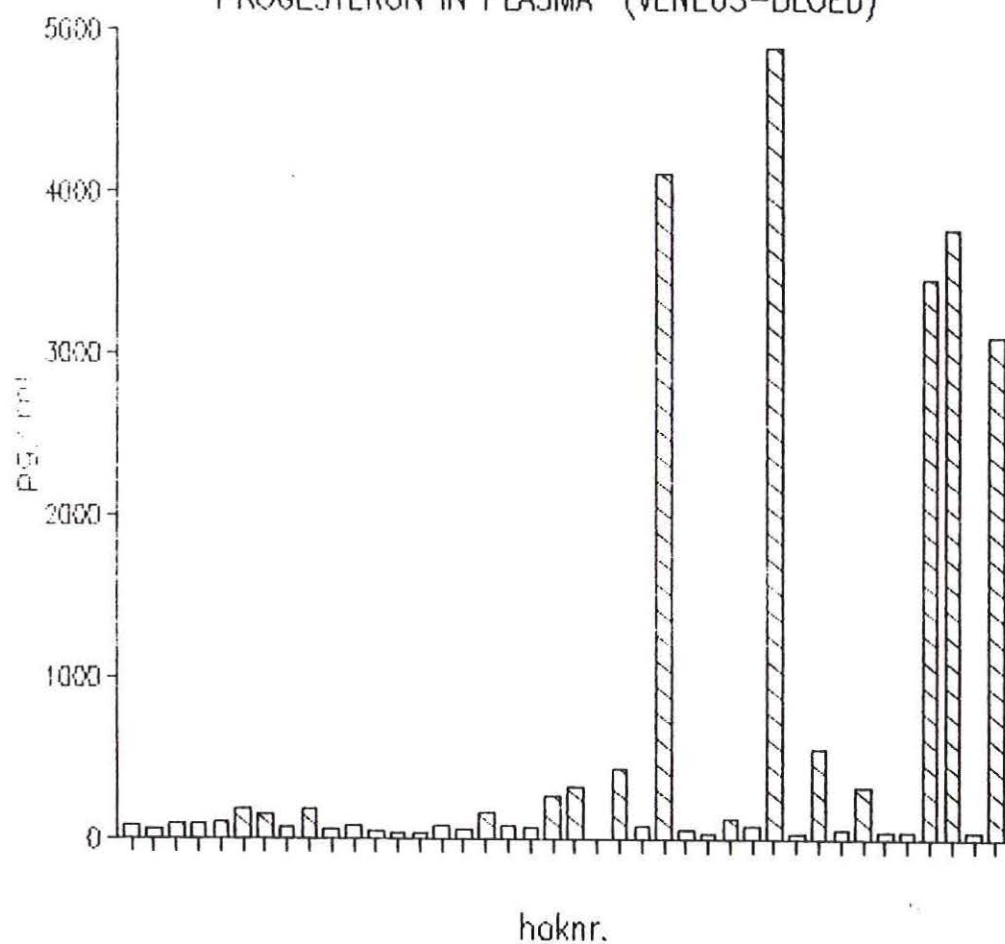
GEMIDDELDE (pg/ml) : 609  
 S.D. (n-1) : 1291  
 RANGE : 43-4887  
 n : 39  
 Classificatie  
 niveau : 20

GEMIDDELDE (pg/ml) : 23.3  
 S.D. (n-1) : 7.6  
 RANGE : 11-46  
 n : 40  
 Classificatie  
 niveau : 20

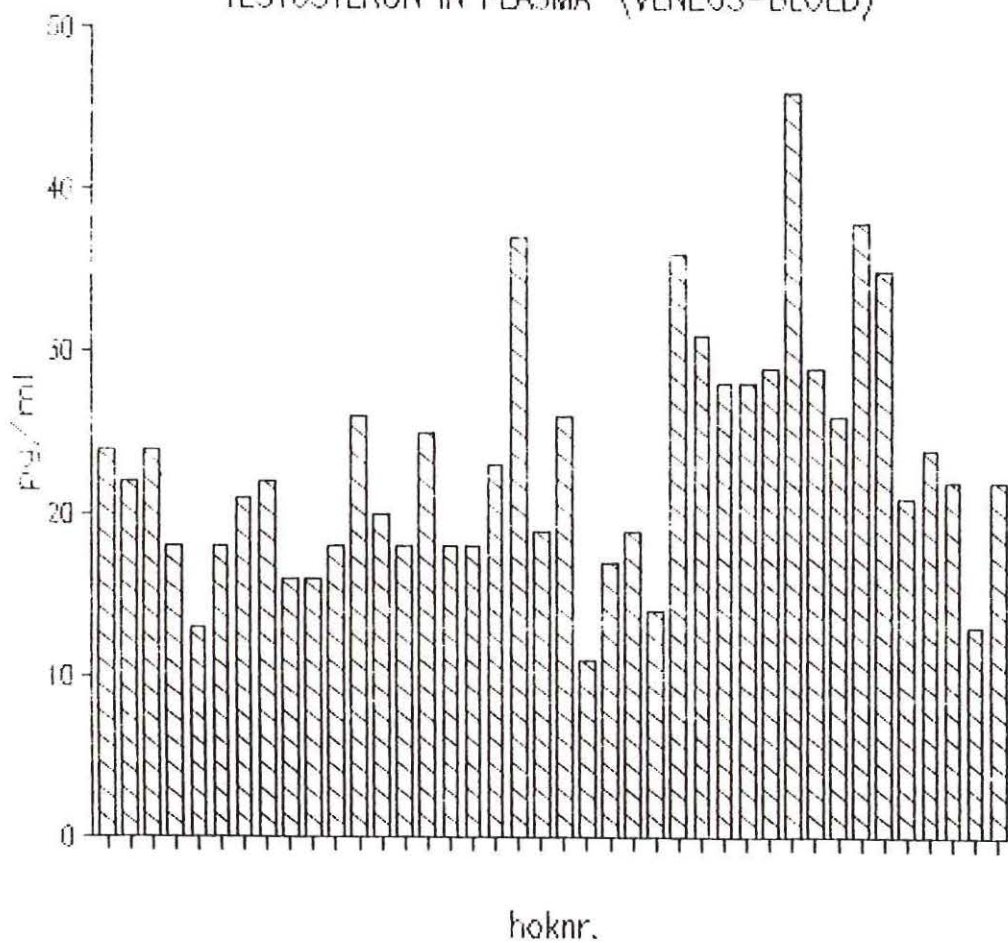
VROUWELIJKE FOKKALVEREN, 7 - 11 MAANDEN  
OESTRADIOL-17B IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



VROUWELIJKE FOKKALVEREN; 7 - 11 MAANDEN  
PROGESTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



VRUWELIJKE FOKKALVEREN, 7 - 11 MAANDEN  
TESTOSTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17B , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

VROUWELIJKE VLEESKALVEREN (DENKAVIT)

LEEFTIJD : 26 WEKEN

DATUM BLOEDAFNAME : 02.12.87 (SLACHTHUIS)

OESTRADIOL-17B		PROGESTERON		TESTOSTERON	
diernr.	pg/ml	diernr.	pg/ml	diernr.	pg/ml
1	4	1	233	1	34
2	3	2	295	2	44
3	3	3	64	3	28
4	3	4	382	4	26
5	2	5	80	5	37
6	0	6	2412	6	26
7	4	7	360	7	21
8	0	8	194	8	22
9	0	9	150	9	20
10	0	10	76	10	31
11	0	11	100	11	262
12	4	12	463	12	26
13	2	13	946	13	27
14	1	14	445	14	29
15	0	15	358	15	23
16	0	16	50	16	261
17	1	17	171	17	27
18	0	18	243	18	25
19	2	19	54	19	24
20	0	20	93	20	21
21	0	21	412	21	15
22	0	22	207	22	21
23	0	23	80	23	21
24	0	24	46	24	21
25	0	25	249	25	21
26	0	26	68	26	17
27	1	27	581	27	20
28	0	28	201	28	21
29	0	29	287	29	12
30	0	30	1562	30	18
31	0	31	105	31	22
32	0	32	131	32	23
33	0	33	581	33	23
34	1	34	458	34	28
35	0	35	1018	35	28
36	0	36	162	36	18
37	0	37	73	37	18
38	0	38	681	38	15

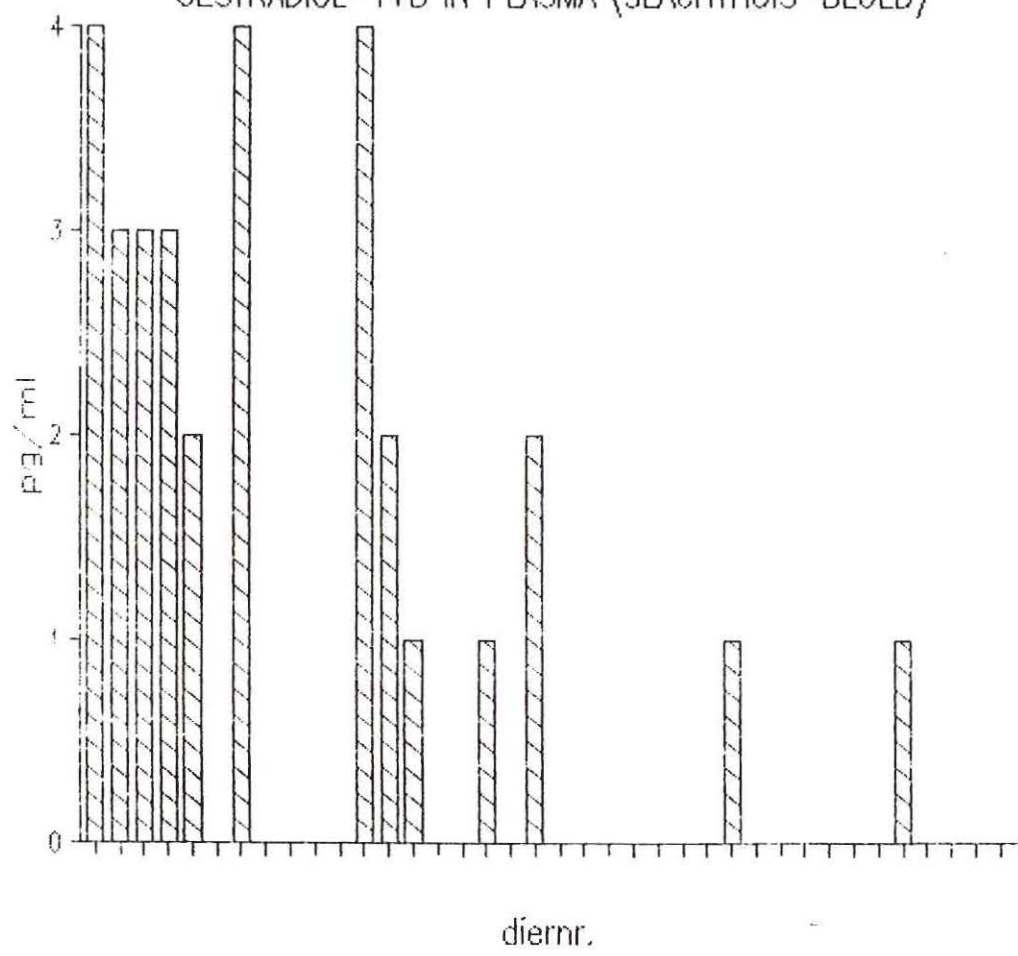
GEMIDDELDE (pg/ml) : .8  
 S.D. (n-1) : 1.3  
 RANGE : 0-4  
 n : 38  
 Classificatie  
 niveau : 10

GEMIDDELDE (pg/ml) : 370  
 S.D. (n-1) : 463  
 RANGE : 50-2412  
 n : 38  
 Classificatie  
 niveau : 20

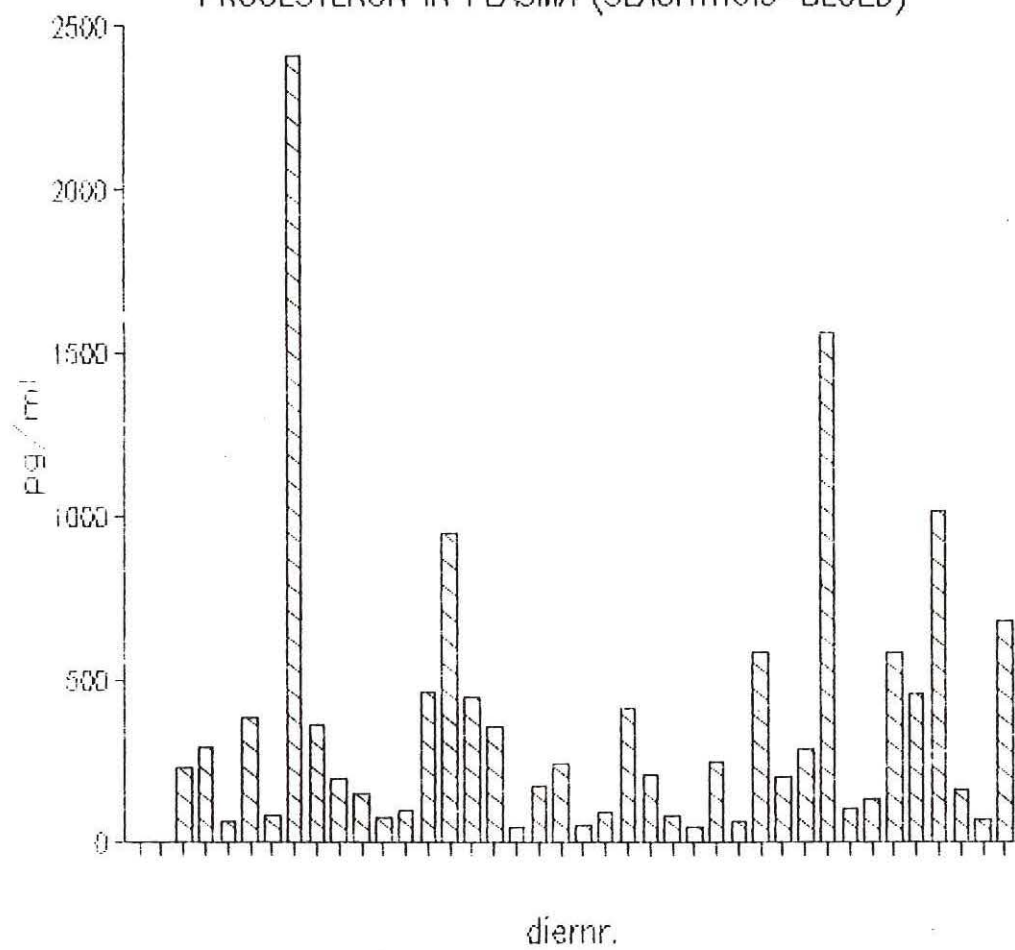
GEMIDDELDE (pg/ml) : 36.2  
 S.D. (n-1) : 54.2  
 RANGE : 12-262  
 n : 38  
 Classificatie  
 niveau : 20



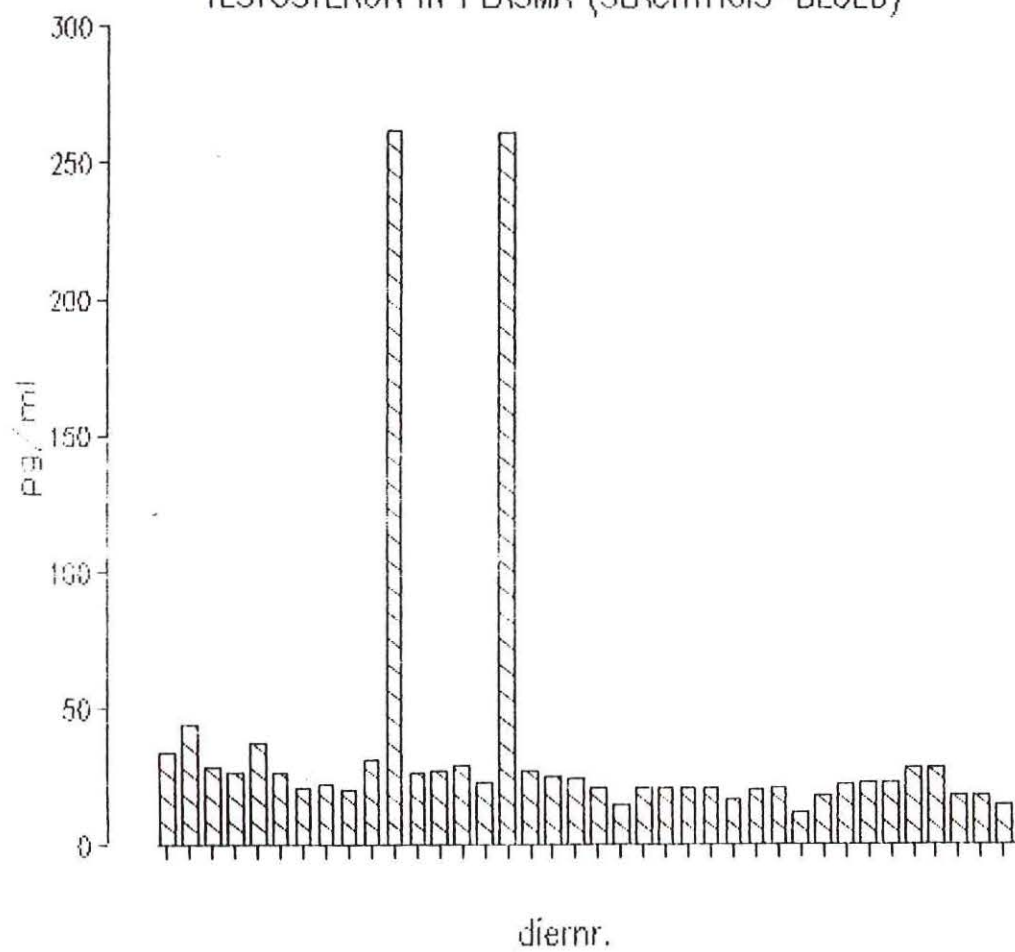
VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 26 WEKEN  
OESTRADIOL-17B IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 26 WEKEN  
PROGESTERON IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 26 WEKEN  
TESTOSTERON IN PLASMA (SLACHTHUIS-BLOED)



RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17 $\beta$  , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

VROUWELIJKE VLEESKALVEREN (NAVOBI)

LEEFTIJD : 24-25 WEKEN

DATUM BLOEDAFNAME : 29.12.87

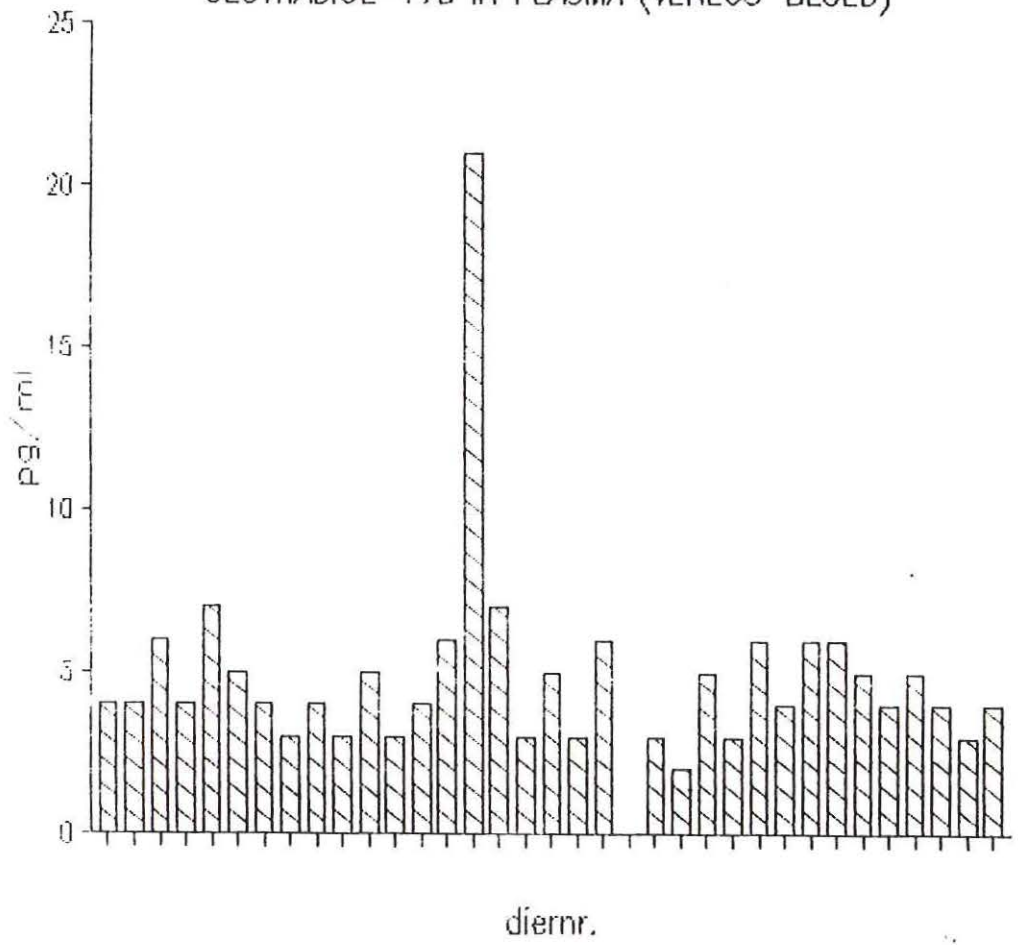
OESTRADIOL-17 $\beta$		PROGESTERON		TESTOSTERON	
diernr.	pg/ml	diernr.	pg/ml	diernr.	pg/ml
1	4	1	50	1	27
2	4	2	53	2	22
3	6	3	50	3	37
4	4	4	64	4	33
5	7	5	62	5	35
6	5	6	50	6	17
7	4	7	41	7	25
8	3	8	43	8	13
9	4	9	38	9	*
10	3	10	46	10	22
11	5	11	201	11	57
12	3	12	39	12	12
13	4	13	36	13	18
14	6	14	50	14	37
15	21	15	339	15	70
16	7	16	65	16	29
17	3	17	62	17	25
18	5	18	40	18	21
19	3	19	40	19	5
20	6	20	53	20	38
21	-	21	-	21	-
22	3	22	40	22	13
23	2	23	28	23	12
24	5	24	41	24	8
25	3	25	41	25	13
26	6	26	38	26	6
27	4	27	40	27	1
28	6	28	60	28	15
29	6	29	52	29	35
30	5	30	112	30	24
31	4	31	59	31	12
32	5	32	40	32	20
33	4	33	59	33	6
34	3	34	29	34	8
35	4	35	48	35	14

GEMIDDELDE (pg/ml) : 4.9  
 S.D. (n-1) : 3.1  
 RANGE : 2-21  
 n : 34  
 Classificatie niveau : 10

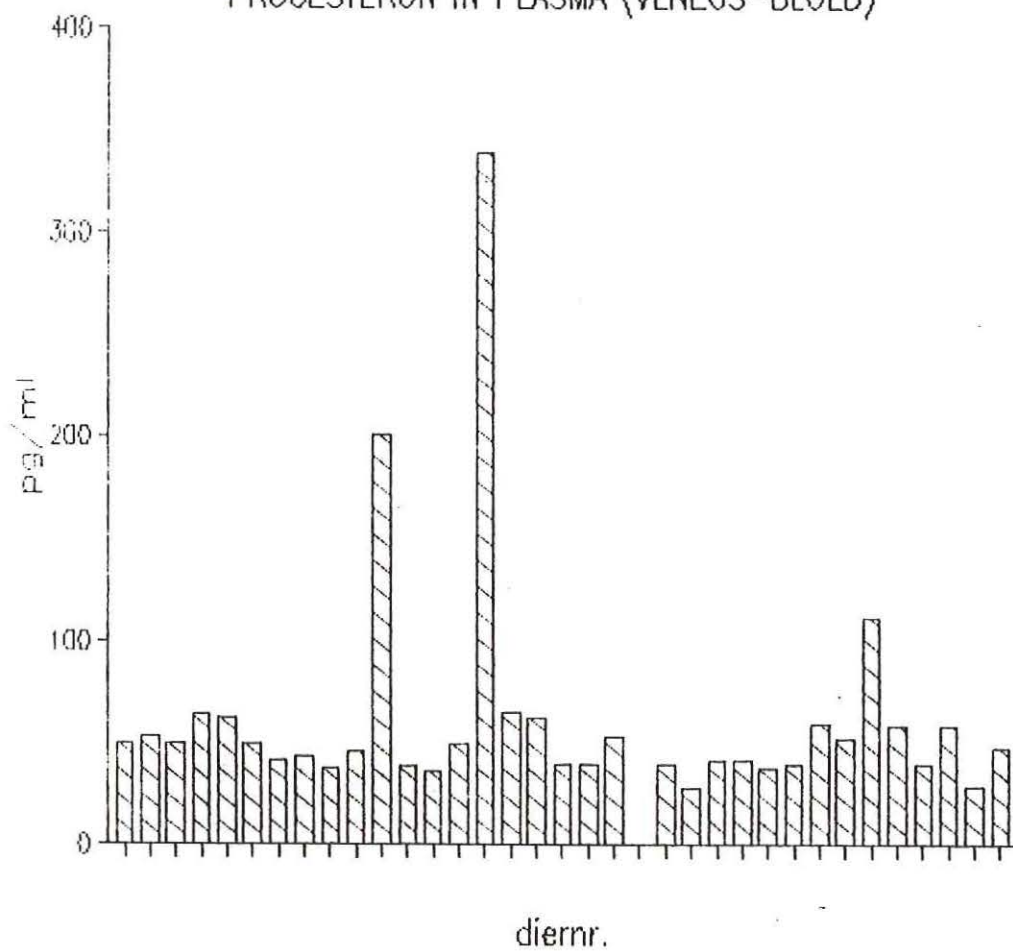
GEMIDDELDE (pg/ml) : 62  
 S.D. (n-1) : 57.4  
 RANGE : 28-339  
 n : 34  
 Classificatie niveau : 20

GEMIDDELDE (pg/ml) : 22.1  
 S.D. (n-1) : 14.9  
 RANGE : 1-70  
 n : 33  
 Classificatie niveau : 20

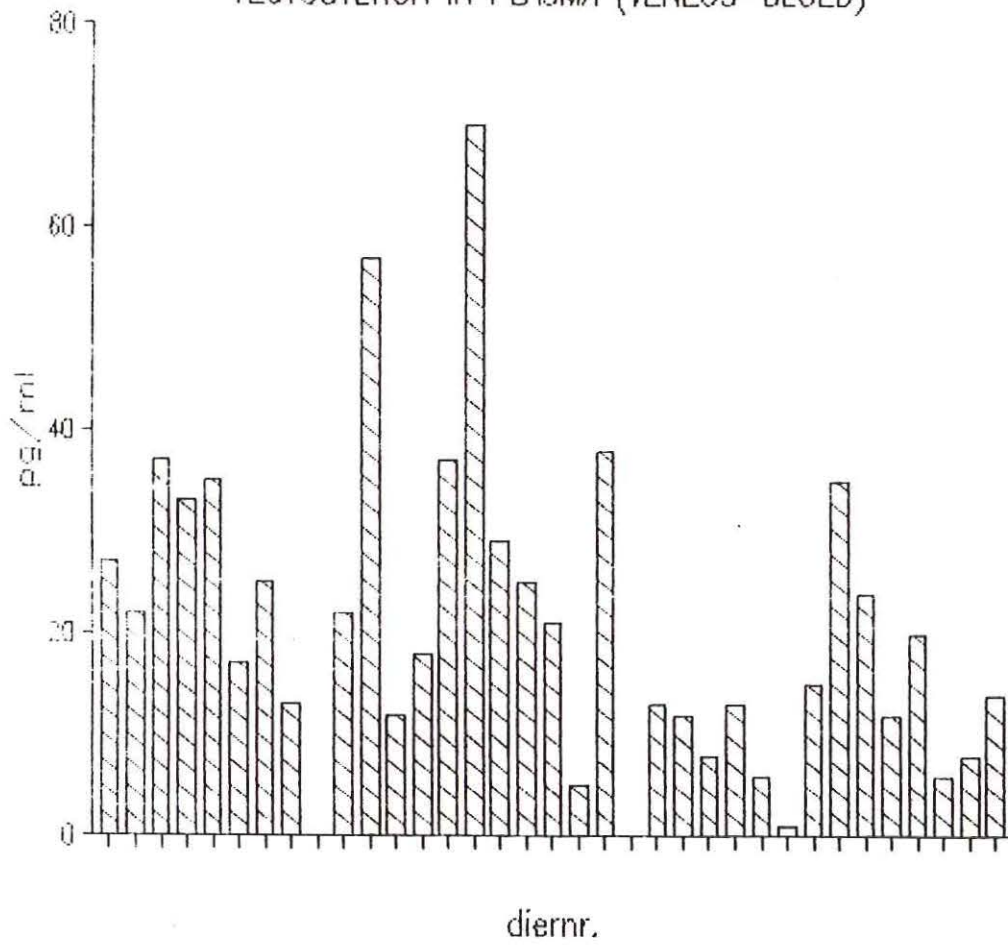
VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 24-25 WEKEN  
OESTRADIOL-17B IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 24-25 WEKEN  
PROGESTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



VROUWELIJKE VLEESKALVEREN , 24-25 WEKEN  
TESTOSTERON IN PLASMA (VENEUS-BLOED)



VERZAMELDE RESULTATEN PROJECT 673.307

GEHALTEN VAN OESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMA

I. STIERKALVEREN, LEEFTIJD 22 WEKEN, VENEUS-BLOED			
	OESTRADIOL-17 $\beta$	PROGESTERON	TESTOSTERON
GEMIDDELDE (pg/ml)	2.8	38.7	2812
S.D. (n-1)	2.4	20.1	2708
RANGE	0-9	10-118	141-9239
AANTAL DIEREN (n)	75	74	75
CLASSIFIC.NIVEAU	10	20	20

II. STIERKALVEREN, LEEFTIJD 23 WEKEN, SLACHTHUIS-BLOED			
	OESTRADIOL-17 $\beta$	PROGESTERON	TESTOSTERON
GEMIDDELDE (pg/ml)	2.6	237	747
S.D. (n-1)	1.3	152	1348
RANGE	0-5	53-679	210-6961
AANTAL DIEREN (n)	24	23	24
CLASSIFIC.NIVEAU	10	20	20

III. VROUWELIJKE FOKKALVEREN, 7 - 11 MAANDEN, VENEUS-BLOED			
	OESTRADIOL-17 $\beta$	PROGESTERON	TESTOSTERON
GEMIDDELDE (pg/ml)	4	609	23.3
S.D. (n-1)	3.1	1291	7.6
RANGE	1-16	43-4887	11-46
AANTAL DIEREN (n)	40	39	40
CLASSIFIC.NIVEAU	10	20	20

IV. VROUWELIJKE VLEESKALVEREN, 26 WEKEN, SLACHTHUIS-BLOED			
	OESTRADIOL-17 $\beta$	PROGESTERON	TESTOSTERON
GEMIDDELDE (pg/ml)	0.8	370	36.2
S.D. (n-1)	1.3	463	54.2
RANGE	0-4	50-2412	12-262
AANTAL DIEREN (n)	38	38	38
CLASSIFIC.NIVEAU	10	20	20

V. VROUWELIJKE VLEESKALVEREN, 24-25 WEKEN, VENEUS-BLOED			
	OESTRADIOL-17 $\beta$	PROGESTERON	TESTOSTERON
GEMIDDELDE (pg/ml)	4.9	62	22.1
S.D. (n-1)	3.1	57.4	14.9
RANGE	2-21	28-339	1-70
AANTAL DIEREN (n)	34	34	33
CLASSIFIC.NIVEAU	10	20	20



## VALIDATIE HPLC/RIA-METHODE (PROJEKT 673.307)

OESTRADIOL-17 $\beta$ , PROGESTERON EN TESTOSTERON IN BLOEDPLASMAO E S T R A D I O L - 1 7  $\beta$ 

	theor. gehalte	GEVONDEN GEHALTEN ( pg/ml )					
		assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.
		1	2	3	4	5	6
controle plasma A	--	-	0	3	-	4	2
controle plasma B	--	-	25	21	24	27	24
controle plasma C	--	-	12	15	14	15	14
ref.serum RIVM 8016	41	46	39	34	33	45	38
ref.serum RIVM 8017	197	219	180	180	204	194	193

## P R O G E S T E R O N

	theor. gehalte	GEVONDEN GEHALTEN ( pg/ml )					
		assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.
		1	2	3	4	5	6
controle plasma A	--	-	59	-	-	54	71
controle plasma B	--	-	213	-	289	302	385
controle plasma C	--	-	675	-	710	708	797
ref.serum RIVM 8016	700	821	666	-	749	792	924
ref.serum RIVM 8017	6800	7001	-	-	5464	5742	5996

## T E S T O S T E R O N

	theor. gehalte	GEVONDEN GEHALTEN ( pg/ml )					
		assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.	assaynr.
		1	2	3	4	5	6
controle plasma A	--	-	1798	1715	-	1758	1790
controle plasma B	--	-	616	639	654	620	642
controle plasma C	--	-	1384	1304	1148	1299	1385
ref.serum RIVM 8016	2900	2628	3059	2939	2950	2992	3117
ref.serum RIVM 8017	5000	5671	5432	6127	5074	7256	5212