

Project 7111104
Risico-analyse en advisering
Projectleider: M.J.B. Mengelers

Rapport 97.16

april 1997

CARBADOX - EEN EVALUATIE

A.J. Baars

afdeling: Kwaliteitsbewaking

Dit rapport werd samengesteld op verzoek van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Landbouw. De Engelstalige versie is beschikbaar onder rapport nummer 97.17

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon 08370-75400
Telefax 08370-17717

Copyright 1997, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

afdelingshoofden

PR, Marketing & Communicatie (3)

bibliotheek (3)

auteur (5)

dr. Ir. S. de Boer

dr. J.P. Hoogland

mr. H.J. Keukens

dr. J. de Jong

dr. M.J.B. Mengelers

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Landbouw (Ir. G. de Peuter, Ir. E.A. de Boer)

Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Milieu, Kwaliteit & Voeding (Ir. L.W.A. Vischer)

DLO-Instituut voor Dierhouderij en Diergezondheid (ID-DLO; Dr. L.P. Jager)

Informatie- en Kenniscentrum Landbouw (IKC-Landbouw; Ir. E. Maathuis)

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM; Dr. P. Wester)

ABSTRACT

Carbadox- een evaluatie

Carbadox- an evaluation

Report 97.16

April 1997

A.J. Baars

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

This report evaluates the pros and cons of using carbadox, a feed additive for pigs that has two claims: (1) growth promotion, (2) prevention against swine dysentery.

Carbadox is effective in the prevention of swine dysentery. As a growth promoter, however, its effectiveness is marginal (if farming conditions are optimal).

Carbadox is considered to be a genotoxic carcinogen. In addition it exerts adrenal toxicity in target animals. The compound has significant dusting properties.

Applying good agricultural and veterinary practice, residue formation of carbadox (and its metabolites) in edible products is negligible. Hence there is no risk for the consumer.

The applications of carbadox have hardly any alternative.

The benefits of carbadox need to be weighed carefully against its disadvantage, i.e. the principle of avoiding the use of carcinogenic compounds. Unfortunately, actual research data regarding the exposure of workers in the feeding industry and farms working with carbadox, that are needed for such a risk estimation, are currently lacking.

SAMENVATTING

Dit rapport evalueert de voor- en nadelen van het gebruik van carbadox, een veevoederadditief voor varkens met twee effecten: (1) groeibevordering, (2) preventie tegen varkensdysenterie.

Carbadox geeft goede preventie tegen varkensdysenterie. Onder optimale bedrijfsomstandigheden is de groeibevorderende werking echter marginaal.

Carbadox wordt als genotoxisch carcinogeen beschouwd. Daarnaast is het toxisch voor de bijnier van het doeldier. De stof heeft de eigenschap gemakkelijk te verstuiven.

Onder de condities van goede agrarische en veterinaire praktijk zijn de residuen van carbadox (en metabolieten) in eetbare producten verwaarloosbaar, zodat de consument geen risico loopt.

Met betrekking tot de toepassingen van carbadox zijn er nauwelijks alternatieven.

Er dient een afweging gemaakt te worden tussen enerzijds de voordelen van het gebruik van carbadox, en anderzijds het principe dat gebruik van carcinogene stoffen vermeden dient te worden. Helaas ontbreken de voor deze afweging noodzakelijke actuele gegevens met betrekking tot de blootstelling van werknemers in veevoederfabrieken en bedrijven waar met carbadox (bevattend voer) gewerkt wordt.

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	3
1 INLEIDING	7
2 EFFECTIVITEIT	7
- groeibevordering	7
- preventie varkensdysenterie	7
- alternatieven	8
3 METABOLISME	8
4 TOXICITEIT	9
5 CARCINOGENITEIT	10
- carbadox	10
- desoxycarbadox	10
- methylcarbazaat	11
- hydrazine	11
- quinoxaline-2-carbonzuur	11
- conclusies t.a.v. de carcinogeniteit	11
6 RESIDUEN	12
7 VERSTUIVINGSEIGENSCHAPPEN	14
8 CONCLUSIES	15
LITERATUUR	17
NASCHRIFT	22

1 INLEIDING

Carbadox (methyl-3-[2-quinoxalinylmethyleen]carbazaat-N¹,N⁴-dioxide, Mecadox®) is een veevoederadditief in gebruik bij varkens, met primair als doel groeibevordering c.q. verbetering van de voederconversie, en secundair preventie tegen anaerobe darminfecties, met name *Serpulina hyodysenteriae* (voorheen *Treponema hyodysenteriae*) - varkensdysenterie ofwel dysenterie Doyle. Het werd geïntroduceerd in 1971 (Gropp et al, 1971, 1972) en is in de toelating opgenomen als middel ter bevordering van de groei zonder dat een werkingsmechanisme wordt geclaimd ('groep K'). In de EU is het middel toegelaten voor toediening aan biggen in een dosering van 20 - 50 ppm (parts per million, mg per kg) in het voer vanaf enkele weken voor het spenen tot de leeftijd van 14 weken. Er dient een wachttermijn van 4 weken in acht te worden genomen alvorens tot slachten kan worden overgegaan (Schumer, 1990).

2 EFFECTIVITEIT

- groeibevordering

In de eerste periode na de introductie van carbadox werden verbeteringen van de voederconversie en dus groeibevorderingen tot 25 % geclaimd, in latere jaren zakte dit percentage tot een voederconversie-verbetering van maximaal 5 %. Naar alle waarschijnlijkheid moet dit fenomeen (in eerste instantie wél, later aanzienlijk minder tot geen groeibevorderend effect) worden toegeschreven aan een verbeterde bedrijfshygiene en een beter aan de behoeften van de dieren aangepast voederregime. Reeds in een vroeg stadium werd gesuggereerd dat carbadox een 'insuline-achtige' werking zou hebben; daarnaast is aangetoond dat er een verband bestaat tussen de groeibevorderende werking en het lysine-gehalte in het voer: bij een laag lysine gehalte in het voer is de groeibevorderende werking van carbadox optimaal, met andere woorden, carbadox heeft een lysine-sparend effect (Gropp & Wagner, 1990; Gropp et al, 1990). Onder optimale omstandigheden bleek het groeibevorderend effect van carbadox overigens nihil te zijn (Nabuurs & Van der Molen, 1989).

- preventie varkensdysenterie

In de toegelaten dosering biedt carbadox goede preventieve bescherming tegen anaerobe darminfecties, met name *Serpulina hyodysenteriae* (voorheen *Treponema hyodysenteriae*), ook wel bekend als varkensdysenterie of dysenterie Doyle. Carbadox is overigens niet werkzaam tegen een reeds aanwezige infectie: de bescherming is uitsluitend preventief. Ondanks het ruim 25-jarig gebruik van carbadox is tot dusverre geen resistentie tegen de genoemde anaerobe ziektekiemen waargenomen. Daarentegen is wel resistentie opgetreden tegen aerobe pathogenen zoals *Escherichia coli* (Kitai et al, 1979; Ohmae et al, 1981; Droumev, 1983; Baumgartner et al, 1985; Holá & Sevcik, 1990).

()

()

- alternatieven

Voor zover bekend heeft het diervoederadditief olaquinox (chemisch nauw verwant aan carbadox) vergelijkbare - zij het minder effectieve - groeibevorderende eigenschappen; als preventief middel tegen varkensdysenterie is het evenwel beduidend minder werkzaam: de MIC (minimum inhibitory concentration) voor *Serpulina hyodysenteriae* is tien maal hoger dan de MIC van carbadox voor deze pathogeen (Vijfhuizen et al., 1988).

Het middel tylosine is toegelaten als veevoederadditief én als diergeneesmiddel, in te zetten ter voorkoming en ter genezing van varkensdysenterie: tylosine is dus zowel een profylactisch alsook een therapeutisch middel (carbadox is uitsluitend profylactisch werkzaam). Helaas is tegen dit middel op grote schaal resistentie waargenomen: reeds in 1988 waren in Nederland alle 35 veldisolaten van *Serpulina hyodysenteriae* ongevoelig voor tylosine (Vijfhuizen et al., 1988).

In Zweden zijn carbadox (en olaquinox) niet langer als veevoederadditief toegelaten. Dit heeft enerzijds geleid tot een *de facto* even oncontroleerbaar gebruik op basis van voorschrift door de dierenarts, anderzijds is ten behoeve van zowel de groeibevordering alsook de preventie van varkensdysenterie de toepassing van grote tot zeer grote hoeveelheden zinkoxide (tot duizenden ppm in het voer) ervoor in de plaats gekomen (Best, 1996; Björnerot et al, 1996). De groeibevorderende effectiviteit van zinkpreparaten moet in hoge mate betwijfeld worden; over de effectiviteit als preventief middel tegen varkensdysenterie is nauwelijks literatuur te vinden. Zink is een essentiële micro-nutrient waarvan de opname -dus- fysiologisch gereguleerd is. Toediening van grotere dan homeostatisch verantwoorde hoeveelheden zal dus niet resulteren in grotere opname, maar slechts leiden tot directe en nagenoeg kwantitatieve uitscheiding. Afgezien van mogelijke welzijnseffecten op de dieren lijkt hiermee een nieuw milieuprobleem te worden gecreëerd dat mogelijk in ernst en omvang de gevolgen van het vroegere hoge kopergebruik in de varkenssector zou kunnen overtreffen.

Overigens, het gebruik van een preventief middel tegen varkensdysenterie is overbodig wanneer varkenshouderij onder SPF-(specific pathogen free)-condities plaatsvindt, zoals momenteel in bijvoorbeeld Denemarken het geval is.

3 METABOLISME

Het metabolisme van carbadox is bestudeerd in ratten, apen en varkens met ¹⁴C-carbadox, gelabeld in de fenyling of in de carbonylgroep van de zijketen. Het metabolisme van carbadox wordt gekarakteriseerd door snelle reductie van de N-oxide groepen en de afsplitsing van de methylcarbazaat-zijketen. De primaire metaboliet in de urine was quinoxaline-2-carbonzuur, die ook in geconjugeerde vorm werd uitgescheiden. In de weefsels konden tot 24 uur na de laatste toediening residuen van carbadox, desoxycarbadox, quinoxaline-1,4-di-N-oxide-2-carboxaldehyde en quinoxaline-2-carbonzuur worden aangetoond. Tevens werden sporen van hydrazine gevonden, maar hiervan

werd aangenomen dat deze slechts een korte levensduur zou kennen en snel verder zou worden gemetaboliseerd (SCAN, 1980, 1984, 1986; JECFA, 1990a, 199b, 1991).

4 TOXICITEIT

De orale LD_{50} ¹ voor de muis (♂) bedraagt 2810 mg per kg lichaamsgewicht, voor de muis (♀) bedraagt deze > 2810 mg per kg lichaamsgewicht. Intraperitoneaal is de LD_{50} voor de muis 1050 mg per kg lichaamsgewicht. Bij de rat is de LD_{50} oraal 850, en intraperitoneaal 810 mg per kg lichaamsgewicht. Op grond van deze gegevens kan carbadox geclassificeerd worden als 'matig toxisch' (SCAN, 1980, 1984, 1986; JECFA, 1990a, 1990b, 1991).

Toediening van carbadox gedurende 5 weken aan varkens van 5 weken oud in doseringen van 0 tot 200 ppm in het voer leidde tot schade aan de zona glomerulosa² van de bijnier in de doseringsgroepen > 50 ppm, die na 11 weken nog niet was hersteld. Dit ging gepaard met een significante daling van de aldosteronspiegel³ in het bloed (Van der Molen et al, 1986). In een vergelijkbare experimentele opzet werd waargenomen dat secundair aan de daling van de bloed-aldosteronspiegel, ook het renine-angiotensine⁴ systeem was aangetast: de bloedspiegels waren significant verhoogd in alle doseringsgroepen (Van der Molen et al, 1989).

De daling van de aldosteron-bloedspiegel als gevolg van de toediening van carbadox werd bevestigd in *in vitro* experimenten (Baars et al, 1988). In voortgezet onderzoek kon worden vastgesteld dat niet alleen de aldosteron bloedspiegel daalt, maar ook die van glucocorticosteroiden corticosteron en cortisol, terwijl tegelijkertijd de afgifte van progesteron en analoga stijgt (Jager et al, 1994; Jager et al, 1996). Er kan dus gesproken worden van een substantiële verstoring van de steroidhuishouding, die tot gevolg heeft dat het dier niet meer reageert op zoutbelasting en stress, wat weliswaar onder omstandigheden waarin sprake is van stress gunstig kan zijn voor de voederconversie maar overigens natuurlijk ernstige consequenties heeft voor de fysiologie in het algemeen.

¹ De LD_{50} is die éénmalige dosis waarbij 50 % der proefdieren binnen 24 uur sterft. Ter illustratie kan worden vermeld dat de toxiciteit van het 'matig toxische' carbadox inligt tussen de toxiciteit van lood (met een LD_{50} van 120 mg/kg) en die van keuzenzout (met een LD_{50} van 4000 mg/kg).

² De zona glomerulosa in de bijnier is, populair gezegd, de cellaag tussen merg en schors. Met name in deze cellaag vindt de aanmaak van aldosteron plaats.

³ Aldosteron is één van de mineralocorticosteroiden, en in belangrijke mate verantwoordelijk voor de hormonale regulering van de water- en zouthuishouding van het organisme.

⁴ Renine is een glycoproteïne hormoon geproduceerd door de nieren; het stimuleert het vrijkomen van angiotensine, een glycoproteïne hormoon geproduceerd door de lever. Angiotensine werkt vaatvernauwend en bloeddrukverhogend. Het speelt tevens een rol bij de regulering van de aldosteronspiegel.

Afgezien van de experimentele aanwijzingen voor de carcinogeniteit van carbadox (zie hierna) zijn er inmiddels tevens aanwijzingen dat ook de verstoring van de steroïdhuishouding als zodanig, zoals veroorzaakt door carbadox (daling van circulerende corticosteroiden en stijging van circulerende progestagenen), aanleiding kan zijn voor een toename van de tumorincidentie (Zumoff et al, 1981; Labrie et al, 1987; Gomes et al 1988; Najid & Habrioux, 1990).

Recent onderzoek heeft bovendien duidelijk gemaakt dat niet alleen olaquinox fototoxisch is (dat was reeds eerder bekend), maar dat ook carbadox bij mensen die daaraan zijn blootgesteld een zekere mate van fototoxiciteit c.q. foto-allergeniteit lijkt te hebben (Dawson & Scott, 1972; De Vries et al, 1990).

Aanvullend kan nog melding gemaakt worden van het gegeven dat een drie-generatie studie in ratten en een ontwikkelingsstudie in konijnen met quinoxaline-2-carbonzuur niet leidden tot positieve bevindingen die zouden kunnen duiden op teratogeniteit en embryotoxiciteit van deze eindmetaboliet (JECFA 1990a, 1990b, 1991).

5 CARCINOGENITEIT

- *carbadox*

In verscheidene chronische voederproeven met ratten werd een dosis-afhankelijke toename van benigne en maligne tumoren waargenomen bij doseringen ≥ 1 mg carbadox per kg lichaamsgewicht per dag. Doseringen van meer dan 25 mg per kg lichaamsgewicht per dag waren uitgesproken toxisch, zodanig dat de experimenten niet verder konden worden voortgezet. In 14 van 15 uitgevoerde verschillende zoogdier- en niet-zoogdier genotoxiciteitsstudies werden positieve resultaten gerapporteerd. Op grond van deze bevindingen werd geconcludeerd dat carbadox kennelijk genotoxisch en carcinogeen is (SCAN 1980, 1984, 1986; JECFA, 1990a, 1990b, 1991).

- *desoxycarbadox*

De chronische toediening van desoxycarbadox had in een studie met ratten eveneens een toename van de tumorincidentie tot gevolg. In alle doseringsgroepen (5 tot 25 mg per kg lichaamsgewicht per dag) steeg de incidentie, het meest in de lever, maar ook in de huid en de melkklieren (SCAN 1980, 1984, 1986; JECFA 1990a, 1990b, 1991). Hoewel desoxycarbadox in de meeste mutageniteitstesten negatief scoorde, werden positieve bevindingen gerapporteerd in de cel transformatietest en de Ames test met levermicrosomen van met PCB's voorbehandelde ratten. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat desoxycarbadox waarschijnlijk een grotere tumorigene potentie heeft dan de moederverbinding, zodat desoxycarbadox mogelijk een significante bijdrage levert aan de tumorigene

activiteit van carbadox in ratten. Naar de mening van de JECFA (1990a, 1990b, 1991) wordt evenwel de bijdrage van desoxycarbadox aan de carcinogeniteit weer gelimiteerd doordat desoxycarbadox een kortlevende intermediaire metaboliet is die snel wordt omgezet in quinoxaline-2-carbonzuur (zie echter de paragraaf 'Residuen' voor bevindingen die deze aanname nuanceren).

- methylcarbazaat

De beschikbare informatie betreffende de zijketenmetaboliet van carbadox, methylcarbazaat, was beperkt. Met deze kanttekening werd geconcludeerd dat noch de chronische studies in ratten, noch de bruikbare mutageniteitstesten tot positieve bevindingen hadden geleid. Met andere woorden, deze onderzoeken duiden niet op enige carcinogene en/of mutagene potentie van methylcarbazaat (SCAN 1980, 1984, 1986; JECFA 1990a, 1990b, 1991).

- hydrazine

De structuur van carbadox suggereert dat hydrazine mogelijk een verdere metaboliet van methylcarbazaat is. Op grond van de in de literatuur bekende farmacokinetische eigenschappen van hydrazine en de chemische reactiviteit ervan werd aangenomen dat deze metaboliet snel geëlimineerd zal worden. Derhalve werd geconcludeerd dat, ondanks de bekende carcinogeniteit en mutageniteit ervan, de bijdrage van hydrazine tot de carcinogeniteit (en toxiciteit in het algemeen) van carbadox op zijn hoogst marginaal zal zijn (JECFA 1990a, 1990b, 1991).

- quinoxaline-2-carbonzuur

Ten aanzien van quinoxaline-2-carbonzuur hebben geen van de uitgevoerde chronische studies aanwijzingen opgeleverd voor enige verdenking van toxische, carcinogene dan wel mutagene eigenschappen van deze metaboliet (SCAN 1980, 1984, 1986; JECFA 1990a, 1990b, 1991)

- conclusies ten aanzien van de carcinogeniteit

De bovenstaande gegevens brachten zowel de SCAN (1980, 1984, 1986) als de JECFA (1990a, 1990b, 1991) tot de conclusie dat het risico van het gebruik van carbadox op basis van de carcinogeniteit van de moederverbinding en de primaire metaboliet desoxycarbadox zodanig klein was dat gebruik ervan (onder zekere voorwaarden) kon worden toegestaan. Sindsdien is de gedachtenvorming omtrent het omgaan met carcinogene en verdacht carcinogene chemicaliën echter geëvolueerd. Het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) kwam in 1989 tot het oordeel dat carbadox als een carcinogene en genotoxische stof beschouwd moet worden. De Arbeidsinspectie heeft in 1991 carbadox als carcinogene stof op de lijst van registratieplichtige stoffen geplaatst (Arbeidsinspectie, 1991). Mede op grond van adviezen van de Gezondheidsraad (1979, 1988) en de vigerende regelgeving in de EU is men momenteel algemeen van oordeel dat gebruik van geno-

toxische carcinogene stoffen waar mogelijk vermeden moet worden, dan wel niet moet worden toegestaan.

6 RESIDUEN

Na een gift van 55 mg ^{14}C -gelabeld carbadox per kg voer gedurende 5 dagen aan varkens met een lichaamsgewicht van ca. 30 kg was 30 dagen na beëindiging van dit voederregime de concentratie van het totaal aan carbadox-residuen in spierweefsel gedaald tot 5 μg per kg; na 45 dagen was het gehalte 3 μg per kg, en na 70 dagen was het gehalte 2 μg per kg. Voor de lever waren de gehalten respectievelijk 74, 20 en 13, en voor de nier 15, 5 en 4 μg per kg. In vetweefsel was het gehalte na 30 dagen 2 μg per kg, na 45 dagen 1, en na 70 dagen < 1 μg per kg. Ook andere residustudies leidden tot vergelijkbare resultaten. In de lever van varkens waren zeer kleine hoeveelheden onbekende metabolieten waarneembaar, ook na het staken van de toediening zeven of meer dagen eerder. Door alkalische hydrolyse van de lever konden deze residuen gedeeltelijk worden vrijgemaakt en omgezet in quinoxaline-2-carbonzuur (JECFA, 1990a, 1990b, 1991).

Residuvorming van quinoxaline-2-carbonzuur werd bestudeerd in varkens met een lichaamsgewicht van ca. 12 kg die gedurende 47 dagen werden gevoerd met voer dat 50 ppm carbadox bevatte. Onmiddellijk na beëindiging van dit voederregime was het gehalte van quinoxaline-2-carbonzuur in lever, nier en spierweefsel respectievelijk 345, 211 en < 30 μg per kg. Na 7 dagen waren de gehalten respectievelijk 169, < 30 en < 30 μg per kg. Na 14 dagen resteerde in de lever nog 83, en na 21 dagen nog 46 μg per kg (JECFA 1990a, 1990b, 1991).

In de hierboven genoemde onderzoeken waren carbadox en desoxycarbadox slechts gedurende de eerste 72 uur na beëindiging van de toediening van carbadox meetbaar; hierbij moet echter nadrukkelijk worden aangetekend dat men in de periode vóór 1990 in het algemeen niet gevoeliger dan tot een niveau van ca. 5 ppb (parts per billion, μg per kg) in plasma, urine, weefsels en organen kon analyseren. Men nam derhalve aan dat de gehalten in eetbare delen na 28 dagen verwaarloosbaar klein zullen zijn. Hoewel twee van de drie residuen van carbadox in eetbare delen van varkens verdachte carcinogenen zijn (carbadox en desoxycarbadox), werd dan ook geconcludeerd dat bij goede agrarische praktijkvoering carbadox gebruikt kan worden in doseringen tot 50 ppm in het voer, onder toepassing van een wachttermijn van 28 dagen (JECFA 1990a, 1990b, 1991).

Men tekende aan dat de - overigens niet-carcinogene - (eind)metaboliet quinoxaline-2-carbonzuur als marker kan dienen: deze metaboliet kan gedurende tenminste 28 dagen in weefsels en organen gemeten worden (JECFA 1990a, 1990b, 1991), zij het dat in de tachtiger jaren de detectielimiet 30 μg per kg bedroeg, wat niet buitengewoon gevoelig is.

Onderzoek met meer gevoelige analysemethodes heeft enerzijds het eerdere onderzoek betreffende waargenomen gehalten tijdens en kort na toedieningen van carbadox aan varkens bevestigd, anderzijds is duidelijk geworden dat de biologische halfwaardetijd van de metabolieten desoxycarbadox en quinoxaline-2-carbonzuur in lever en nier langer is dan eerst werd aangenomen. Het bedoelde onderzoek omvatte 75 biggen van 3 weken oud, die gedurende 94 dagen 50 ppm carbadox in het voer kregen toegediend. Na staken van de toediening werden met regelmatige tussenpozen dieren geslacht. Reeds één dag na staken van de toediening konden geen residuen van de moederverbinding meer worden aangetoond tot op het niveau van 2 µg per kg. Desoxycarbadox daalde tot 1 µg per kg in de lever na 14 dagen, in de nier na 7 dagen, en in spierweefsel na 3 dagen. Quinoxaline-2-carbonzuur bereikte 3 dagen na het staken van de toediening in spierweefsel een niveau van 2 µg per kg; de MRL van 30 µg per kg in lever en nier werd echter pas na 4 tot 5 weken bereikt (Baars et al, 1990).

In een recente voederproef met volwassen vleesvarkens, die gedurende 7 dagen voer kregen verstrekt dat 50 ppm carbadox bevatte, waren 8 uur na voeronthouding in spierweefsel geen residuen van moederstof en metabolieten meer aantoonbaar, gemeten tot op het niveau van 1 µg per kg (Keukens & Tomassen, 1995).

Zeer recent werd eveneens onderzoek uitgevoerd naar de mogelijke residuvorming als gevolg van versleping⁵. Een aantal vleesvarkens kreeg voer met een carbadox-gehalte variërend van 0,5 tot 5,4 ppm verstrekt, en vervolgens werden dieren geslacht na wachttijden van 0, 3 en 12 uur. In de groep gevoerd met 5,4 ppm carbadox in het voer bedroeg het carbadox-residu in vlees na 3 uur wachttijd 1 µg per kg, na 12 uur wachttijd was het gehalte gedaald tot < 0,5 µg per kg. In levers en nieren van deze dieren werd geen carbadox boven het niveau van 0,5 µg per kg aangetroffen. Na 3 uur wachttijd werd 3 µg desoxycarbadox in het vlees aangetroffen, terwijl de desoxycarbadox-gehalten in lever en nier respectievelijk 2 en 25 µg per kg bedroegen. Na 12 uur wachttijd waren de gehalten desoxycarbadox in vlees gedaald tot < 1, in lever tot 1, en in nier eveneens tot 1 µg per kg. In de lager gedoseerde groepen werd geen carbadox (tot het niveau van 0,5 µg per kg) en desoxycarbadox (tot het niveau van 1 µg per kg) aangetroffen (Keukens, 1997).

Hoewel ten aanzien van het vlees het risico voor residuen van carbadox en/of desoxycarbadox, bij normaal gebruik van carbadox en inachtneming van de voorgeschreven wachttermijn, dus nagenoeg nihil is, is dit voor lever en nier minder zeker.

⁵ De bereiding van veevoer met additieven kan leiden tot verontreiniging van het voer dat ná het eerdere voer wordt gemaakt. Dit fenomeen wordt 'versleping' genoemd, en kan vooral optreden bij gebruik van hoge doseringen van de additieven en indien de meng- en persinstallaties en bijbehorende leidingen niet goed gereinigd worden. Ook op de veehouderijbedrijven kan deze contaminatie optreden als de silo en/of de voerbak niet helemaal leeg zijn voordat het 'schone' voer er in komt.

7 VERSTUIVINGSEIGENSCHAPPEN

Gedurende het vervoederen van carbadox-bevattende voeders alsmede gedurende het productieproces van carbadox-bevattende concentraten, premixen en voeders bestaat er een zeker risico van humane blootstelling. Deze blootstelling kan plaatsvinden door direct huidcontact, door inhalatie van stof gegenereerd tijdens het productie- en/of vervoederingsproces, door huidcontact met uitscheidingsproducten van behandelde dieren en door residuen in dierlijke producten. Ten aanzien van de als tweede genoemde mogelijkheid is binnen de EU de eis gesteld dat monsters concentraten in de analyse volgens de Stauber-Heubach procedure (Stauber & Beutel, 1984) niet meer dan $0,1 \mu\text{g}$ carbadox in het gegenereerde stof mag bevatten.

In het begin van de jaren tachtig zijn praktijkexperimenten uitgevoerd met werknemers die belast waren met de bereiding van een 50 ppm carbadox bevattend voer uit een 10 % premix, en het vervoederen van dit voer aan varkens. Er werden nadrukkelijk geen maatregelen genomen om stofvorming tegen te gaan. Hun actuele blootstelling alsmede die van de varkens werd gedurende 15 dagen met behulp van filters gemeten. Gemiddeld bleek de 24-uurs inhalatoire blootstelling $50 \mu\text{g}$ carbadox per kg lichaamsgewicht te bedragen (SCAN, 1984). Helaas wordt uit de rapportage niet duidelijk of het hier gaat om een blootstelling gedurende 24 uur of een 24-uurs gemiddelde op basis van een (bijvoorbeeld) 8-urige werkdag.

Experimenteel onderzoek heeft voorts uitgewezen dat in een aantal willekeurig genomen praktijkmonsters veelal niet aan de eis met betrekking tot verstuiving werd voldaan. In 25 monsters waarin het gehalte carbadox varieerde van 0,5 % tot 10 % bleken de hoeveelheden vrijkomend stof, zoals bepaald volgens de voorgeschreven methode, uiteen te lopen van 0,34 tot $14374 \mu\text{g}$, met een overall gemiddelde van $2818 \mu\text{g}$ en een mediaan van $1610 \mu\text{g}$ (Aerts & Roozendaal, 1985). Oriënterend onderzoek wees tevens uit dat voorbehandeling van het concentraat om de stuifeigenschappen te verbeteren geen effect heeft op de stuifeigenschappen van het uit dit concentraat bereide voormengsel (Aerts & Roozendaal, 1985). Zelfs indien wordt aangenomen dat dankzij arbeidshygiënische maatregelen sinds die tijd het risico van blootstelling tijdens het productieproces is gereduceerd, dan blijft nog het risico van blootstelling bij het wisselen van de in het productieproces toegepaste stoffilters bestaan. Voor zover bekend is onderzoek met deze vraagstelling nooit verricht.

Om tot een goede beoordeling te komen van het risico van verstuiving voor werknemers in de veevoederbereiding en van mensen die met carbadox (al dan niet verwerkt in veevoeders) omgaan, is een herhaling - in bredere opzet - van het onderzoek naar de verstuivingseigenschappen van carbadox in de praktijk in hoge mate gewenst.

Uitgaande van de door de EU gestelde eis ten aanzien van de maximaal toelaatbare concentratie carbadox in stof zoals bepaald met de Stauber-Heubach methode, kan overigens ook een schatting worden gemaakt van de theoretische blootstelling. De Stauber-Heubach methode (Stauber & Beutel, 1984) meet de hoeveelheid carbadox die in stofvorm wordt gegenereerd uit een monster van 50 g. Dit monster wordt gedurende 5 min op gestandaardiseerde wijze in heftige werveling gebracht, terwijl er per min 4 l lucht langs wordt gezogen. Het totaal wordt op een filter afgevangen. Het aldus opgevangen stof is dus afkomstig uit 20 l lucht, en mag conform de binnen de EU geldende regels niet meer dan $0,1 \mu\text{g}$ carbadox bevatten, ofwel $5 \mu\text{g}$ per m^3 . Bij een verblijfstijd van 8 uur en een ademvolume van 7 liter per minuut (rustsituatie) zal een volwassen persoon dan inhalatoir zijn blootgesteld aan $7 \times 60 \times 8 \times 0,005 = 16,8 \mu\text{g}$ carbadox per werkdag, ofwel $0,28 \mu\text{g}$ per kg lichaamsgewicht per 8-urige werkdag. Op jaarbasis (200 werkdagen) leidt dit derhalve tot een totale inhalatoire opname van 3,36 mg.

8 CONCLUSIES

1. Hoewel carbadox zekere groeibevorderende eigenschappen heeft voor varkens (en mogelijk ook andere landbouwhuisdieren), is onder goede bedrijfshygienische omstandigheden, het gebruik van optimale voeders en een optimaal voederregime het nuttig effect marginaal zo niet geheel afwezig.
2. Carbadox is een goed preventief (niet curatief) middel om infecties met *Serpulina hyodysenteriae* (voorheen *Treponema hyodysenteriae*), het agens dat varkensdysenterie veroorzaakt, te voorkomen.
3. Carbadox en zijn metaboliet desoxycarbadox worden beschouwd als genotoxische carcinogene stoffen. Daarnaast zijn er waarnemingen die duiden op een zekere mate van fototoxiciteit c.q. foto-allergeniteit.
4. De residuen van carbadox en desoxycarbadox in eetbare varkensprodukten zijn, bij inachtneming van de regels, verwaarloosbaar klein in vlees na vier weken, en in lever en nier na zes weken. Onder condities van Good Agricultural/Veterinary Practice is het risico van blootstelling aan carcinogene residuen van carbadox voor de consument van varkensprodukten dus verwaarloosbaar.

5. De stuifeigenschappen van carbadox in concentraten, premixen en bereide voeders kunnen leiden tot een zekere mate van blootstelling bij mensen die hetzij in de veevoederfabrieken hetzij op bedrijven (al dan niet zelf voer mengend) bij de be- en verwerking van carbadox betrokken zijn. Werknemers in de diervoedersector waar carbadox wordt verwerkt lopen dus een zeker risico op blootstelling aan deze stof.
6. Alternatieven voor carbadox zijn (1) olaquinox (indicatie: groeibevordering en preventie tegen *Serpulina hyodysenteriae* infecties), en (2) tylosine (indicatie: preventie tegen en therapie bij *Serpulina hyodysenteriae* infecties). Olaquinox behoort tot dezelfde chemische categorie als carbadox: ook olaquinox wordt ervan verdacht carcinogeen te zijn, bovendien zijn de stuifeigenschappen vergelijkbaar met die van carbadox. Als preventief middel tegen genoemde infectie is het beduidend minder werkzaam dan carbadox; daarnaast is het foto-toxisch. Tylosine is niet alleen preventief maar ook curatief werkzaam, en heeft reeds resistentie opgewekt. Varkenshouderij onder SPF-condities maakt het gebruik van een preventief middel tegen varkensdysenterie overbodig.
7. Er dient een afweging gemaakt te worden van enerzijds het nut van carbadox als preventie middel tegen varkensdysenterie, en anderzijds het principiële uitgangspunt dat gebruik van carcinogene stoffen vermeden dient te worden.
De enige risio-groepen zijn de werknemers in de veevoederindustrie en de agrarische ondernemers die anderszins met carbadox c.q. carbadox-bevattend voer werken.
Voor het maken van een betrouwbare schatting van deze risico's ontbreken echter recente onderzoeksgegevens over de actuele blootstelling van deze mensen in de werkomgeving.

LITERATUUR

1. Aerts MML, Roozendaal HA (1985):
Oriënterend onderzoek naar de stuifeigenschappen van carbadox en olaquinox bevattende premixen en concentraten met behulp van de Stauber-Heubach- en RIKILT-methode.
Rapport 85.77, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten, Wageningen.
2. Arbeidsinspectie (1991):
Basisbundel registratieverplichting gevaarlijke stoffen (Arbo informatie systeem - toxische stoffen).
Ministerie van Sociale Zaken & Werkgelegenheid, 's Gravenhage.
3. Baars AJ, Van Ginkel LA, Aerts MML, De Graaf GJ, Seinhorst JW, Keukens HJ, Schwillens PLWJ, Spierenburg TJ, Jager LP (1990):
Kinetics of carbadox residues in pigs.
In: Residues of veterinary drugs in food (Haagsma N, Ruiter A, Czedik-Eysenberg PB, eds), University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht; pp 110-113.
4. Baars AJ, Van der Molen EJ, Spierenburg TJ, De Graaf GJ, Nabuurs MJA, Jager LP (1988):
Comparative toxicity of three quinoxaline-di-N-dioxide feed additives in young pigs.
Arch. Toxicol. S12: 405-409.
5. Baumgartner A, Meyer J, Lebek G, Nicolet J (1985):
Natur und Verbreitung der Carbadoxresistenz bei Escherichia coli, isoliert von Mastschweinen, -Kälbern und Geflügel.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 127: 339-347.
6. Best P (1996):
Production without antibiotics - the Swedish experience.
Feed International, April 1996: 8-12.
7. Björnerot L, Franklin A, Tysén T (1996):
Usage of antibacterial and antiparasitic drugs in animals in Sweden between 1988 and 1993.
Veterinary Record 139: 282-286.
8. Dawson TAJ, Scott KW (1972):
Contact eczema in agricultural workers.
Brit. Med. J. 3: 469-470.
9. Droumev D (1983):
Review of antimicrobial growth promoting agents available.
Veterinary Res. Commun. 7: 85-99.

10. Gezondheidsraad (1979):
Carcinogeniteit van chemische stoffen.
Rapport Gezondheidsraad, 's Gravenhage.
11. Gezondheidsraad (1988):
Beoordeling carcinogeniteit chemische stoffen, deel 2.
Rapport Gezondheidsraad, 's Gravenhage.
12. Gomes P, Cassanas G, Halberg F, Hermida R, Robel P, Baulieu EE, Lakatua D, Haus E (1988):
Taux sanguin du sulfate de la déhydroépiandrostérone (DHEA-S) et risque de cancer du sein.
C. R. Acad. Sci. Paris 306: 261-264.
13. Gropp JM, Englisch WO, Wagner W (1990):
Protein saving effects of carbadox in pigs.
In: Veterinary pharmacology, toxicology and therapy in food producing animals (Ferenc F, Lees P, Semjén G, eds), University of Veterinary Science, Budapest; pp 135-138.
14. Gropp J, Tieuws J, Heidecke FW (1971):
Ein neues wachstumswirksames Futteradditiv in der Schweinehaltung. I. Carbadox in der Ferkelaufzucht.
Z. Tierphysiol. Tierernährung Futtermittelkunde 28: 218-223.
15. Gropp J, Tieuws J, Heidecke FW (1972):
Ein neues wachstumswirksames Futteradditiv in der Schweinehaltung. II. Carbadox in der Schweinemast.
Z. Tierphysiol. Tierernährung Futtermittelkunde 28: 300-306.
16. Gropp JM, Wagner HW (1990):
Possible anabolic mode of action of carbadox in promoting growth in pigs.
In: Veterinary pharmacology, toxicology and therapy in food producing animals (Ferenc F, Lees P, Semjén G, eds), University of Veterinary Science, Budapest; pp 125-133.
17. Holá V, Sevcik B (1990):
Microbiological evaluation of quinoxaline-type growth promoters for domestic animals.
In: Veterinary pharmacology, toxicology and therapy in food producing animals (Ferenc F, Lees P, Semjén G, eds), University of Veterinary Science, Budapest; pp 119-123.
18. Jager LP, De Graaf GJ, Widjaja-Greefkes HCA (1996):
Screening for drug-induced alterations in the production and release of steroid hormones by porcine adrenocortical cells in vitro.
Toxicol. In Vitro 10: 595-608.

19. Jager LP, De Graaf GJ, Widjaja-Greefkes HCA, Accord-Burleson CCF, Van den Dungen HM, Baars AJ (1994): Effects of feed additives and veterinary drugs on aldosterone production and release by porcine adrenal cells in vitro.
J. Vet. Pharmacol. Therap. 17: 175-185.
20. JECFA [Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives] (1990a): Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food.
WHO Food Additives Series 27: 141-173.
21. JECFA [Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives] (1990b): Evaluation of certain veterinary drug residues in food.
WHO Technical Report Series 799: 45-50.
22. JECFA [Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives] (1991): Residues of some veterinary drugs in animals and food.
FAO Food and Nutrition paper 41/3: 19-31.
23. Keukens, HJ (1997):
Persoonlijke mededeling.
24. Keukens HJ, Tomassen MJH (1995):
Toediening van carbadox en olaquinox bevattend voer aan vleesvarkens - residuen in vlees.
Rapport 95.08 (vertrouwelijk), DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten, Wageningen.
25. Kitai K, Kashiwazaki M, Adachi Y, Kume T, Arakawa A (1979):
In vitro activity of 39 antimicrobial agents against *Treponema hyodysenteriae*.
Antimicrob. Agents Chemother. 15: 393-395.
26. Labrie F, Poulin R, Simard J, Hubert JF, Spinola P, Marchetti B (1987):
Adrenal steroids exert potent estrogenic action in both normal and cancer tissue.
In: Hormonal manipulation of cancer - peptides, growth factors, and new (anti)steroidal agents (Klijn JGM et al, eds), Raven Press, New York; pp 7-16.
27. Van der Molen EJ, De Graaf GJ, Baars AJ, Schopman W (1986):
Carbadox induced changes in aldosterone, sodium and potassium levels in the blood of weaned pigs.
J. Vet. Med. 33A: 617-623.
28. Van der Molen EJ, Derkx FHM, Lamers APM, Van Lieshout JHLM, Nabuurs MJA, Michelakis AM (1989):
Changes in plasma renin activity and renal immunohistochemically demonstrated renin in carbadox treated pigs.
Research Vet. Sci. 46: 401-405.

29. Nabuurs MJA, Van der Molen EJ (1989):
Clinical signs and performance of pigs during the administration of different levels of carbadox and after withdrawal.
J. Vet. Med. 37A: 68-76.

30. Najid A, Habrioux G (1990):
Biological effects of adrenal androgens on MCF-7 and BT-20 human breast cancer cells. Oncology 47: 269-274.

31. Ohmae K, Yonezawa S, Terakado N (1981):
R-plasmid with carbadox resistance from Escherichia coli of porcine origin.
Antimicrob. Agents Chemother. 19: 86-90.

32. RIVM [Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu] (1989):
Rapport inzake de beoordeling van carbadox, uitgebracht aan het Ministerie van Volksgezondheid.
~~Geciteerd in de notitie 'Schrappen van de toelating van carbadox als toevoegingsmiddel' van het~~
Produktschap voor Veevoeder, 's Gravenhage, 24 juni 1996.

33. SCAN [Scientific Committee for Animal Nutrition] (1980).
Commission of the European Union, Reports of the Scientific Committee for Animal Nutrition, Brussels; second series, 7-10.

34. SCAN [Scientific Committee for Animal Nutrition] (1984).
Commission of the European Union, Reports of the Scientific Committee for Animal Nutrition, Brussels: fourth series, 1-5, 82-86.

35. SCAN [Scientific Committee for Animal Nutrition] (1986).
Commission of the European Union, Reports of the Scientific Committee for Animal Nutrition, Brussels: fifth series, 11-12.

36. Schumer DL (1990):
Legislation concerning the use of carbadox and olaquinox in the European Community.
In: Veterinary pharmacology, toxicology and therapy in food producing animals (Ferenc F, Lees P, Semjén G, eds), University of Veterinary Science, Budapest; pp 151-156.

37. Stauber D, Beutel R (1984):
Determination and control of the dusting potential of feed premixes.
Fresenius Z. Anal. Chem. 318: 522-524.

38. Vijfhuizen J, Roeden W, Van Zijderveld FG (1988):
Bepaling van de minimaal inhiberende concentratie-waarden van Nederlandse isolaten van *Treponema hyodysenteriae* - bepaling van de MIC-waarden van *Treponema hyodysenteriae* tegen veel gebruikte antibiotica en chemotherapeutica; de ontwikkeling van een ELISA en de bereiding van monoclonale antilichamen ten behoeve van de diagnostiek.
Rapport DLO-Centraal Diergeneeskundig Instituut, Lelystad.
39. De Vries H, Bojarski J, Donker AA, Bakri A, Beyersbergen van Henegouwen GMJ (1990):
Photochemical reactions of quindoxin, olaquinox, carbadox and cyadox with protein, indicating photoallergic properties.
Toxicology 63: 85-95.
40. Zumoff B, Levin J, Rosenfeld RS, Markham M, Strain GW, Fukushima DK (1981):
Abnormal 24-hr mean plasma concentrations of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate in women with primary operable breast cancer.
Cancer Research 41: 3360-3363.

NASCHRIFT

De notitie 'Carbadox - een evaluatie' werd samengesteld op verzoek van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Landbouw (ir. G. de Peuter, ir. E.A. de Boer).

Dr. L.P. Jager (ID-DLO, Lelystad) heeft een belangrijke inbreng gehad in de totstandkoming van deze notitie, zonder welke het schrijven ervan in de beperkte tijd die daarvoor ter beschikking was niet mogelijk zou zijn geweest. Ook dhr. H.J. Keukens (RIKILT-DLO) heeft mij essentiële informatie geleverd. Tevens ben ik hen, dr. J.P. Hoogland (RIKILT-DLO), Ir. E. Maathuis (IKC Landbouw), dr. P. Wester (RIVM) en de opdrachtgevers zeer erkentelijk voor hun commentaar op het concept.