

Cinque anni fa furono trovate 141 vacche positive a questo ormone e ci fu chi ipotizzò un illecito. Ma la ricerca italiana ha fatto chiarezza: lo steroide può essere prodotto dallo stesso animale. Il bovino lo può produrre in condizioni di stress, come quando viene trasportato al macello

Prednisolone È una molecola endogena?



● Veterinari dell'Izslr (Istituto zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna) mentre prelevano campioni di urine da vacche da latte di un allevamento lombardo.

**) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.*

****) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, dirigente biologo.*

*****) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, dirigente veterinario.*

di **Valentina Lorenzi (*)**, **Alessandra Angelucci (*)**, **Francesca Fusi (*)**, **Matteo Donati (*)**, **Guglielmo Dusi (**)**, **T. Hathaway (*)**, **Luigi Bertocchi (***)**

In medicina veterinaria, l'utilizzo dei corticosteroidi di sintesi (prednisolone, betametasona, desametasona e metilprednisolone), negli animali da reddito, è ammesso solo per usi terapeutici; il loro impiego è disciplinato dal Regolamento (Ue) N. 37/2010, che stabilisce i limiti massimi di residuo (LMR) negli alimenti di origine animale. Per queste sostanze, è previsto un periodo di sospensione tra il trattamento e la macellazione in quanto, la loro forte attività farmacologica rende i residui potenzialmente dannosi per l'uomo (Ferranti C. et al., 2011). Per il prednisolone, nel bovino, i limiti massimi di residuo fissati sono di 4 µg/kg per muscoli e grasso, 6 µg/kg per il latte e 10 µg/kg per fegato e reni.

I corticosteroidi possono essere utilizzati in modo illecito come promotori di crescita nei bovini perché, anche a basse concentrazioni, sono ritenuti in grado di aumentare l'accumulo di peso, ridurre l'indice di conversione alimentare ed avere un effetto

sinergico con altre molecole, come i β -agonisti o gli steroidi anabolizzanti (Ferranti C. et al., 2011). Il loro impiego come promotori di crescita negli animali da reddito è proibito in Europa dalla Direttiva 96/22/Ce "concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste nelle produzioni animali", modificata successivamente dalla Direttiva 2003/74/Ce.

In Italia il controllo sull'uso dei corticosteroidi è inserito nel Piano nazionale residui (Pnr) e viene effettuato sia al macello che in allevamento. Nel primo caso, le matrici campionate sono il fegato, per il quale sono fissati limiti massimi di residuo, o le urine; in allevamento invece la sola matrice campionata è l'urina, per la quale la legge non ha fissato limiti massimi di residuo, non essendo quest'ultima un alimento.

Proprio in merito al limite di prednisolone nelle urine, in data 22 maggio 2012 il Consiglio Superiore di Sanità, sulla base dei riscontri scientifici ad oggi disponibili, ha espresso un parere fissando un nuovo limite di 5,0 $\mu\text{g/l}$, al di sopra del quale emettere un giudizio di non conformità e di conseguenza indicando la possibilità che questa molecola possa essere di secrezione endogena.

Problema nato nel 2008

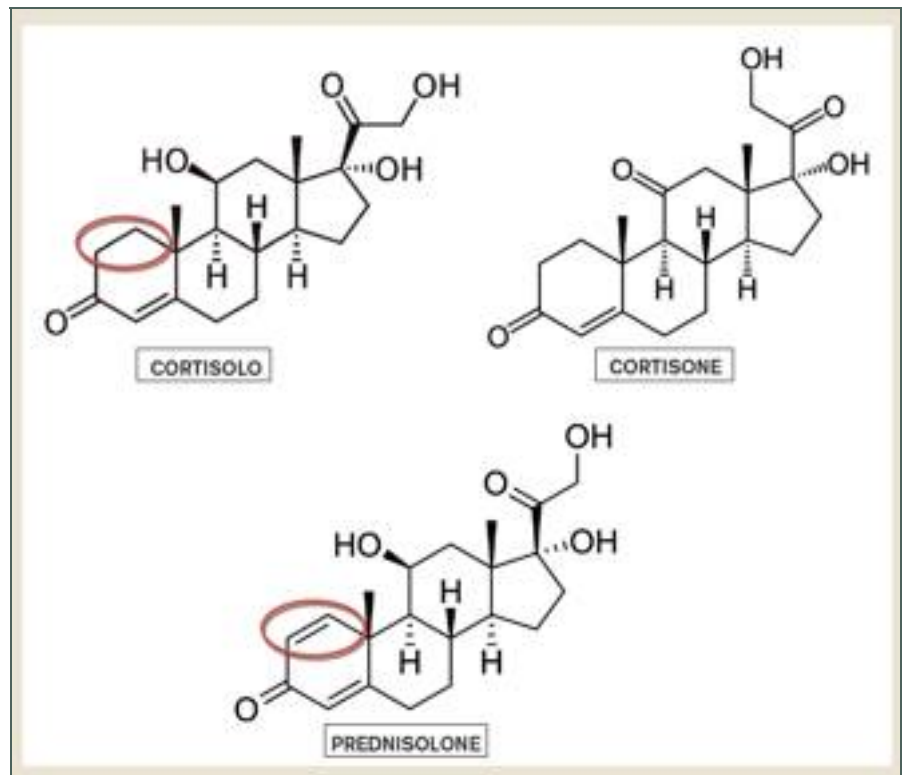
Tutto ebbe inizio nel biennio 2008-2009 quando, nelle urine prelevate dai veterinari delle Asl lombarde, in applicazione di un piano di controllo straordinario teso a monitorare l'uso dei corticosteroidi nelle vacche attraverso il prelievo di urine al macello, uno dei laboratori di chimica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna rilevò una elevata incidenza di positività al prednisolone. Da questo controllo straordinario emerse che, su 196 campioni di urine prelevati da altrettanti animali, 141 (72%) risultavano essere positivi al prednisolone (Bertoc-

SI TRATTA DI UN CORTICOSTEROIDE

I corticosteroidi naturali sono ormoni steroidei secreti dalle ghiandole surrenali e coinvolti in una vasta gamma di processi fisiologici (risposta allo stress, infiammazione, funzione immunitaria, bilancio idroelettrolitico, riproduzione e comportamento). La scoperta delle loro proprietà antinfiammatorie, immunosoppressive e dei loro effetti sul metabolismo, ha portato alla sintesi chimica di corticosteroidi artificiali più attivi, come ad esempio il desametasone e il prednisolone, utilizzati come farmaci terapeutici (Ferranti C. et al., 2011).

Il prednisolone è un corticosteroide con attività gluconeogenetica ed antinfiammatoria, mostra un'attività farmacologica quattro volte superiore a quella del cortisolo (forma attiva del cortisone), dalla cui struttura differisce solo (Figura 1) per un doppio legame (Fidani M. et al., 2012).

L.V. ●



● Figura 1 - Struttura chimica di cortisolo, cortisone e prednisolone. La struttura del prednisolone differisce da quella del cortisolo per la presenza di un doppio legame C1-2.

chi L. et al., 2010).

Il riscontro di residui derivanti da altri trattamenti con corticosteroidi come il desametasone, molto più utilizzato nella veterinaria buiatica, non superavano il 5%. Per tutte le molecole ricercate, ad eccezione del prednisolone, l'incidenza di positività delle urine, corrispondeva a quella normalmente riscontrata nel Pia-

no Nazionale Residui, mentre per il prednisolone l'incidenza di positività era assolutamente anomala, dal momento che non erano mai state segnalate positività in passato. In tutti questi casi di positività al prednisolone, la successiva ispezione veterinaria in allevamento, non rilevò l'uso terapeutico per via intramuscolare di questa molecola e solo in alcuni alle-

PER SAPERNE DI PIÙ

Arioli F, Fidani M, Casati A, Fracchiolla M.L., Pompa G.. 2010. Investigation on possible transformations of cortisol, cortisone and cortisol glucuronide in bovine faecal matter using liquid chromatography-mass spectrometry. *Steroids*, 75, 350–354.

Bertocchi L., Dusi G., Ghidelli V., Hathaway T., Nassuato C., Casati A., Fidani M., Pompa G., Arioli F.. 2013. Investigation on the origin of prednisolone in urine and adrenal glands of cows. *Food. Addit. Contam.*, 30(6), 1055-1062.

Bertocchi L., Dusi G., Vismara F., Daga S., Arioli F., Casati A., Pompa G.. 2010. Preliminary observations of the presence of prednisolone in dairy cattle urine samples. XXVI World Buiatrics Congress, November 14-18, Santiago, Chile.

Bredehöft M., Baginski R., Parr M.K., Thevis M., Schänzer W.. 2012. Investigations of the microbial transformation of cortisol to prednisolone in urine samples. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 129 (1-2), 54-60.

Dusi G., Arioli F., Ghidelli V., Casati A., Hathaway T., Pompa G., Bertocchi L.. 2012a. Investigation on the origin of prednisolone residue in cow urine. *Proceedings of Euroresidue VII, Conference on residues of veterinary drugs in food, Egmond aan Zee, The Netherlands, May 14-16, 2012*, 297-302.

Dusi G., Vago G., Ghidelli V., Pellegrino R.M., Galarini R.. 2012b. Analytical investigations about the presence of prednisolone in cow urine. *J. Mass. Spectrom.*, 47(9), 1221-1231.

Ferranti C., delli Quadri F., Palleschi L., Marchiafava C., Pezzolato M., Bozzetta E., Caramelli M., Draisci R.. 2011. Studies on the presence of natural and synthetic corticosteroids in bovine urine.

Steroids, 76, 616-625.

Fidani M., Gamberini M.C., Pompa G., Mungiguerra F., Casati A., Arioli F.. 2013. Presence of endogenous prednisolone in human urine. *Steroids*, 78(2), 121-126.

Fidani M., Pompa G., Mungiguerra F., Casati A., Fracchiolla M.L., Arioli F.. 2012. Investigation of the presence of endogenous prednisolone in equine urine by high-performance liquid chromatography mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 26(8), 879-886.

Piper T., Geyer H., Gougoulidis V., Flenker U., Schänzer W.. 2010. Determination of ¹³C/¹²C ratios of urinary excreted boldenone and its main metabolite 5β-androst-1-en-17b-ol-3-one. *Drug Test Analysis*, 2, 217–224.

Pompa G., Arioli F., Casati A., Fidani M., Bertocchi L., Dusi G.. 2011. Investigation of the origin of prednisolone in cow urine. *Steroids*, 76, 104–110.

Sterk S., de Rijke E., Rijk J. C.W., Zoontjes P.W., Samson D., van Ginkel L. A.. 2012. Prednisolone a new natural occurring steroid? *Proceedings of Euroresidue VII, Conference on residues of veterinary drugs in food, Egmond aan Zee, The Netherlands, May 14–16, 401–407.*

Verheyden K., Noppe H., Zorn H., Van Immerseel F., Vanden Bussche J., Wille K., Bekaert K., Janssen C.R., De Brabander H.F., Vanhaecke L.. 2010. Endogenous boldenone-formation in cattle: alternative invertebrate organisms to elucidate the enzymatic pathway and the potential role of edible fungi on cattle's feed. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 119, 161–170.

vamenti venne registrato un uso locale, con prodotti endomammari, per la cura della mastite.

L'utilizzo del prednisolone come antinfiammatorio generico è oggi nella pratica veterinaria quasi completamente abbandonato, a favore della maggiore efficacia di altri cortisonici o dei FANS (Farmaci Antiinfiammatori Non Steroidi). Fa eccezione la terapia antimastitica locale, effettuata per via endomammaria, per la quale esistono in commercio alcuni prodotti che contengono generalmente il prednisolone associato ad un antibiotico.

Quando c'è stress

Ipotizzare una così diffusa pratica di trat-

tamento illecito, sembrò da subito molto improbabile e l'ipotesi di un'origine endogena, come spiegazione della presenza di questo steroide nelle urine di bovino, prese piede. La ricerca italiana si attivò, quindi, su questo fronte per fare chiarezza.

L'impegno di importanti enti di ricerca italiani (Istituto superiore di sanità, istituti zooprofilattici sperimentali, università) su questa tematica ha consentito negli ultimi anni la pubblicazione di numerosi lavori scientifici su riviste internazionali; diversi sono stati, infatti, gli studi sperimentali messi in atto nel nostro Paese nel tentativo di spiegare questa anomalia e identificare la fonte di questi residui. Studi condotti inducendo stress farma-

cologico negli animali (Pompa G. et al., 2011), oppure su bovini non trattati ma sottoposti a stress da trasporto e pre-macellazione (Bertocchi L. et al., 2013; Dusi G. et al., 2012a; Ferranti C. et al., 2011; Bertocchi L. et al., 2010), hanno mostrato la presenza di residui di prednisolone nelle urine, spesso accompagnati da elevati livelli di cortisolo e cortisone.

Dal momento che gran parte dei campioni positivi furono riscontrati al macello, i ricercatori ipotizzarono che una bassa concentrazione di prednisolone, comunque rilevabile dai metodi analitici oggi in uso, potesse essere prodotta dal bovino in situazioni di stress (trasporto, operazioni prima della macellazione).

L'associazione tra la presenza di prednisolone nelle urine ed una elevata concentrazione di cortisolo e cortisone sembra confermare questa ipotesi (Bertocchi L. et al., 2013; Ferranti C. et al., 2011).

Lo studio di Izslar e Università Milano

In particolare, uno studio condotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (Izslar), in associazione con la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano, su campioni di urine prelevati dallo stesso animale in allevamento (catterismo) e, a distanza di 2-8 ore, in macello (prelievo diretto dalla vescica appena dopo la macellazione), ha evidenziato come in bovini non trattati e tenuti sotto stretta sorveglianza sia pos-

TAB. 1 - PRESENZA DI PREDNISOLONE NELLE URINE. CONFRONTO FRA I CAMPIONI DEGLI STESSI ANIMALI PRELEVATI IN ALLEVAMENTO E AL MACELLO

Allevamento	Macello	Numero di bovini	% bovini
Assente	Assente	15	29%
Assente	Presente (*)	34	65%
Presente (*)	Presente (*)	3	6%
Presente (*)	Assente	0	0%
TOTALE		52	100%

*Relazione tra rilevazione del prednisolone e luogo di campionamento dell'urina, per lo stesso animale.
*Sopra 0,4 ng/ml (nanogrammi / millilitro)
(Bertocchi et al., 2013).*

sibile rilevare prednisolone nelle urine. Lo studio è stato condotto su 52 bovine di razza frisona, sicuramente non trattate, e ha mostrato che animali negativi in allevamento, cioè prima del trasporto in macello, diventavano positivi quando campionati dopo la macellazione (Tabel-

la 1). Questo fatto si può spiegare solamente con la produzione endogena di prednisolone da parte dell'animale. Inoltre, la frequenza di ritrovamento di prednisolone nelle urine è stata del 50% quando il trasporto e le operazioni al macello richiedevano un tempo inferiore



MAINARDI s.r.l.
COSTRUZIONI MACCHINE AGRICOLE

Via Milano, 38 - 26029 SONCINO (CR) - Tel. 0374 84036 - Fax 0374 85986

www.mainardimacchineagricole.it
info@mainardimacchineagricole.it

Seguici su **YouTube**
www.youtube.com/mainardimacchine

DIAMO PROFONDITÀ AL TUO LAVORO



PER PROVE E DIMOSTRAZIONI 349 3408470

- ✓ **Coltivatore combinato Magico 207 per una buona preparazione del letto di semina**
- ✓ **Adatto per minima lavorazione**
- ✓ **Per la lavorazione estiva delle stoppie e degli stocchi**

Presenti a:
FIERAGRICOLA
Verona
PAD. 6 STAND C6
FAZI - Montichiari
PAD. BRESCIA



Anche la Ditta GRIMALDELLI di Romanengo (CR) utilizza il MAGICO 207

alle 5,5 ore e del 74% quando il tempo richiesto era più alto, indicando così una probabile relazione tra la presenza di prednisolone nelle urine e la lunghezza di queste operazioni. Infine, nessun animale di quelli trovati positivi in allevamento è risultato negativo al macello (Bertocchi L. et al., 2013).

Lo stress legato al trasporto e alla macellazione può quindi essere responsabile della produzione endogena di prednisolone. È stato inoltre osservato che il prednisolone può essere occasionalmente ritrovato anche in animali apparentemente non sottoposti a stress (Pompa G. et al., 2011;).



so, sono state studiate le ghiandole surrenali (Bertocchi L. et al., 2013) prelevate in macello da bovini positivi al prednisolone nelle urine.

Le ghiandole surrenali sono risultate positive per la presenza di questo ormone e potrebbero quindi essere la sede di sintesi endogena del prednisolone ottenuto come metabolita intermedio nella sintesi dei corticosteroidi endogeni.

Ghiandole surrenali e intestino

La via metabolica che porta alla produzione di prednisolone non è stata ancora chiarita. La presenza di residui di prednisolone potrebbe essere spiegata ipotizzando una conversione endogena del cortisolo a prednisolone. In questo sen-

Non è stata, però, esclusa anche la possibilità di una produzione nell'intestino: qui alcuni ceppi batterici potrebbero, infatti, deidrogenare il cortisolo producendo così il prednisolone, come già ipotizzato per l'androstadienedione. Il prednisolone così prodotto potrebbe essere

FB Bossini srl

SAREMO PRESENTI
ALLA FIERA DI
VERONA E MONTICHIARI

*Tradizione e
innovazione
dal 1925*



**CARRO BOTTE
B3 300**
per trasporto
e spandimento
liquame.



**DUMPER SEMISFERICO
RA 200**



**SPANDILETAME ROTATIVO
BREVETTATO SG 200**
idoneo per qualsiasi tipo di letame,
fanghi industriali e compost.
Progettato anche per il trasporto e lo scarico
posteriore di qualsiasi tipo di prodotto.



BREVETTO N° 5199A/89
**NUOVE MOLLE
a 3 settori per utilizzi gravosi**



trasportato al fegato attraverso la vena porta ed escreto per via urinaria, come accade già per altri steroidi (Piper T. et al., 2010).

Contaminazioni e falsi positivi? No

In questi anni è stata anche presa in considerazione l'ipotesi che la presenza di prednisolone nelle urine potesse essere dovuta ad una non adeguata pratica di campionamento o di conservazione del campione, con conseguente contaminazione batterica di origine fecale o ambientale (Arioli F. et al., 2010; Bredehöft M. et al., 2012). Arioli F. e collaboratori (2010) hanno pubblicato, infatti, il risultato di uno studio in vitro dimostrando che l'urina contaminata dalle feci può risultare positiva al prednisolone, come esito di un'attività di deidrogenazione microbica sul cortisolo.

Questo studio però non spiega la presenza di residui di prednisolone nell'urina prelevata direttamente dalla vescica, dove non si ha contaminazione fecale o più in generale una massiva contaminazione batterica.

Anche l'eventualità che la positività delle urine potesse essere dovuta a dei falsi positivi, è stata indagata e successivamente esclusa, confermando l'attendibilità dei metodi di analisi che rispettano i requisiti richiesti dalla Decisione della Commissione 2002/657/EC (Dusi G. et al., 2012b).

Necessari ulteriori studi

Gli studi finora condotti confermano la possibilità che il prednisolone possa essere prodotto in modo endogeno e che la sua presenza nelle urine sia correlata ad uno stato di stress dell'animale. In accordo con quanto ipotizzato anche da studi svolti in altre specie, la possibilità di un'origine endogena del prednisolone è stata dimostrata anche nel cavallo e nell'uomo (Fidani M. et al., 2013; Fidani M. et al., 2012).

Ulteriori studi sono necessari per investigare la correlazione tra il cortisolo/cortisone ed il prednisolone e per spiegare la presenza di quest'ultimo nelle urine dei bovini.

La presenza di certi metaboliti o il rapporto tra concentrazione di cortisolo (o cortisone) e di prednisolone dovrebbero essere studiati per consentire ai controlli ufficiali di prendere le decisioni più opportune in caso di campioni di urina positivi al prednisolone (endogeno o conseguente ad un trattamento illecito) (Dusi G. et al., 2012a).

Ad oggi le indicazioni del Consiglio Superiore di Sanità per il prednisolone nelle urine fanno riferimento ad un limite di 5,0 µg/l, al di sopra del quale emettere un giudizio di non conformità, raccomandando ulteriori verifiche negli allevamenti in cui è stato rilevato prednisolone nelle urine e allargando l'indagine anche ad organi target quale il fegato (Parere del Consiglio Superiore di Sanità-Sezione IV- seduta del 22 maggio 2012). ●

Trattamento ANTISCIVOLO per allevamenti di bovini e suini



Operiamo su tutto il territorio nazionale



Per informazioni e preventivi gratuiti
BORRA ANGELO - 347 2303585
CASTELLEONE (CR)

Il **Nr.1** degli agitatori di liquami!

Speciali eliche ad alta prestazione



Siamo presenti a:
FIERAGRICOLA
Pad. 11 stand E2



RECK
Agrartechnik

RECK-Technik GmbH & Co. KG, Germania
www.reck-agrartec.com
Tel.: +49 (0) 73 74-18 23