

Impiego illecito del desametasone nei bovini da carne: razionale, effetti negli animali trattati e metodologie diagnostiche tradizionali ed innovative



F. GIROLAMI¹, C. DONALISIO¹, M. TAGLIANTE², S. GATTO³, D. BERTARELLI¹, A. BALBO¹, M. CARLETTI¹, G. GARDINI¹, G. BARBARINO⁴, C. NEBBIA¹

¹ Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino - Via L. da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO)

² Servizi Veterinari ASL TO3 - Via Balegno, 6 - 10098 Rivoli (TO)

³ Servizi Veterinari ASL TO3 - Via Poirino, 9 - 10064 Pinerolo (TO)

⁴ Direzione Sanità Pubblica, Regione Piemonte - Corso Stati Uniti, 1 - 10128 Torino

RIASSUNTO

L'utilizzo illecito dei corticosteroidi di sintesi (in particolare, il desametasone) quali promotori di crescita è una pratica piuttosto diffusa nell'allevamento del bovino da carne. Somministrati da soli, o in associazione ad altre molecole (es. ormoni sessuali e β -agonisti), sono in grado di migliorare le performance produttive degli animali e di assicurare agli allevatori una serie di altri "vantaggi". Considerata la nota pericolosità dei residui dei glicocorticoidi nei prodotti destinati al consumo umano, il Legislatore ha fissato Limiti Massimi Residuali molto bassi negli organi edibili del bovino. Tuttavia, le attuali strategie di trattamento fraudolento prevedono l'impiego di dosaggi e modalità di somministrazione che spesso eludono efficacemente i controlli eseguiti dagli organi ufficiali nell'ambito delle indagini previste dal Piano Nazionale Residui.

Lo scopo di questa rassegna critica è quello di illustrare le caratteristiche chimico-farmacologiche dei corticosteroidi di sintesi, che ne spiegano l'utilizzo quali promotori di crescita, e le tecniche d'indagine comunemente impiegate per rivelarne l'uso illecito nel bovino. Inoltre viene dedicata particolare attenzione alle nuove metodologie diagnostiche, sviluppate recentemente al fine di affiancare e supportare le analisi tradizionali nel contrastare le attuali strategie di trattamento.

PAROLE CHIAVE

Desametasone, bovini da carne, trattamenti illeciti, metodologie diagnostiche.

INTRODUZIONE

I glicocorticoidi di sintesi (es. desametasone, betametasone, prednisolone, metilprednisolone e flumetasone) sono molecole largamente impiegate nella pratica clinica veterinaria. In particolare, il desametasone (DEX) è un agente terapeutico che trova numerose applicazioni nelle specie da reddito. Negli ultimi anni, tuttavia, si è andato diffondendo in Europa l'utilizzo di tali farmaci come promotori di crescita soprattutto nella specie bovina, sia da soli, sia in associazione ad altri principi attivi non consentiti, quali estrogeni, androgeni e/o β -agonisti. Considerata la potente azione farmacologica svolta dai glicocorticoidi di sintesi, l'impiego illecito di questi composti pone un serio problema per la salute del consumatore: l'eventuale accumulo di residui negli organi edibili del bovino, infatti, è potenzialmente pericoloso. I possibili effetti nocivi comprendono, ad esempio, l'azione immunodepressiva e le alterazioni del metabolismo glicidico, con aumento della glicemia e resistenza all'insulina. Inoltre, il passaggio dei cortisonici e dei loro metaboliti attraverso la barriera placentare è stato associato ad aborti, parti prematuri, insufficienza surrenalica dei neonati e ritardi nella crescita corporea e nello sviluppo dell'encefalo. Anche l'esposizione attraverso il latte materno può esitare in una serie di effetti negativi, quali diminuito accrescimento, disturbi del metabolismo e problemi di mineralizzazione os-

sea¹. Infine, la pericolosità dei residui dei glicocorticoidi sintetici è ben documentata dalla fissazione nei Paesi dell'Unione Europea di valori estremamente bassi relativi alla Dose Giornaliera Accettabile, pari a soli 0,9 μ g totali (v. paragrafo "Metodologie diagnostiche complementari ed innovative").

Alla luce di quanto sopra riportato, la legislazione vigente prevede l'esecuzione di indagini sistematiche, sia in allevamento sia al macello, volte all'identificazione dell'uso improprio dei cortisonici quali promotori di crescita. Tuttavia, vi è ragione di credere che la diffusione di tale fenomeno sia maggiore di quanto evidenziato dai casi di positività rilevati dai controlli ufficiali. Le attuali strategie dei trattamenti illeciti, infatti, si basano sull'utilizzo di dosaggi molto bassi o di molecole di struttura sconosciuta, che rendono complesse e spesso inefficaci le analisi condotte con tecniche diagnostiche tradizionali. È emersa, pertanto, la necessità di sviluppare metodiche d'indagine innovative, sensibili ed affidabili da affiancare alle analisi di routine, per far fronte a pratiche fraudolente sempre più sofisticate. Il presente lavoro si propone di passare in rassegna i progressi più significativi ottenuti in tal senso, con particolare riguardo ai biomarcatori di esposizione, sottolineando soprattutto le indagini condotte dal nostro e da altri gruppi di ricerca italiani, impegnati da alcuni anni nelle tematiche inerenti la sicurezza e la qualità degli alimenti di origine animale. Non saranno, invece, presi in considerazione gli approcci innovativi relativi alla ricerca dei residui dei glicocorticoidi con metodi di tipo biologico (biosonde e biosensori)^{2,3}. Per una trattazione più esaustiva della materia si rimanda ad altri lavori recenti o di prossima pubblicazione^{4,5}.

Autore per la corrispondenza:

Flavia Girolami (flavia.girolami@unito.it).

CORTICOSTEROIDI E INDICAZIONI TERAPEUTICHE

I corticosteroidi naturali sono una famiglia di ormoni a struttura steroidea, prodotti dalla corteccia delle ghiandole surrenali e coinvolti in numerosi meccanismi fisiologici deputati al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. In particolare, si dividono in glicocorticoidi, che sono dotati di azione antiinfiammatoria e antiallergica e intervengono sul metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine, e mineralcorticoidi, che svolgono importanti funzioni per la regolazione dell'equilibrio idro-elettrolitico. In condizioni di stress o di ipoglicemia l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) secreto dall'adenoipofisi stimola, a partire dal colesterolo, la sintesi

del cortisolo (Figura 1A), il principale ormone glicocorticoide, il quale favorisce le reazioni di gluconeogenesi, attivando lipolisi e catabolismo proteico con un aumento del tasso glicemico. A livello cardiovascolare, inoltre, si verifica un incremento della forza di contrazione cardiaca, della pressione sanguigna e della perfusione tissutale. Parallelamente vengono inibite le reazioni immunitarie ed infiammatorie, mediante la depressione della sintesi anticorpale, la riduzione del numero dei linfociti e degli eosinofili circolanti, e la stimolazione della lipocortina che reprime l'attività della fosfolipasi A₂, enzima coinvolto nell'insorgenza del processo infiammatorio. Gli effetti fisiologici dei mineralcorticoidi, invece, sono legati all'aumento della ritenzione di sodio, cloro e acqua, a fronte di una maggiore escre-

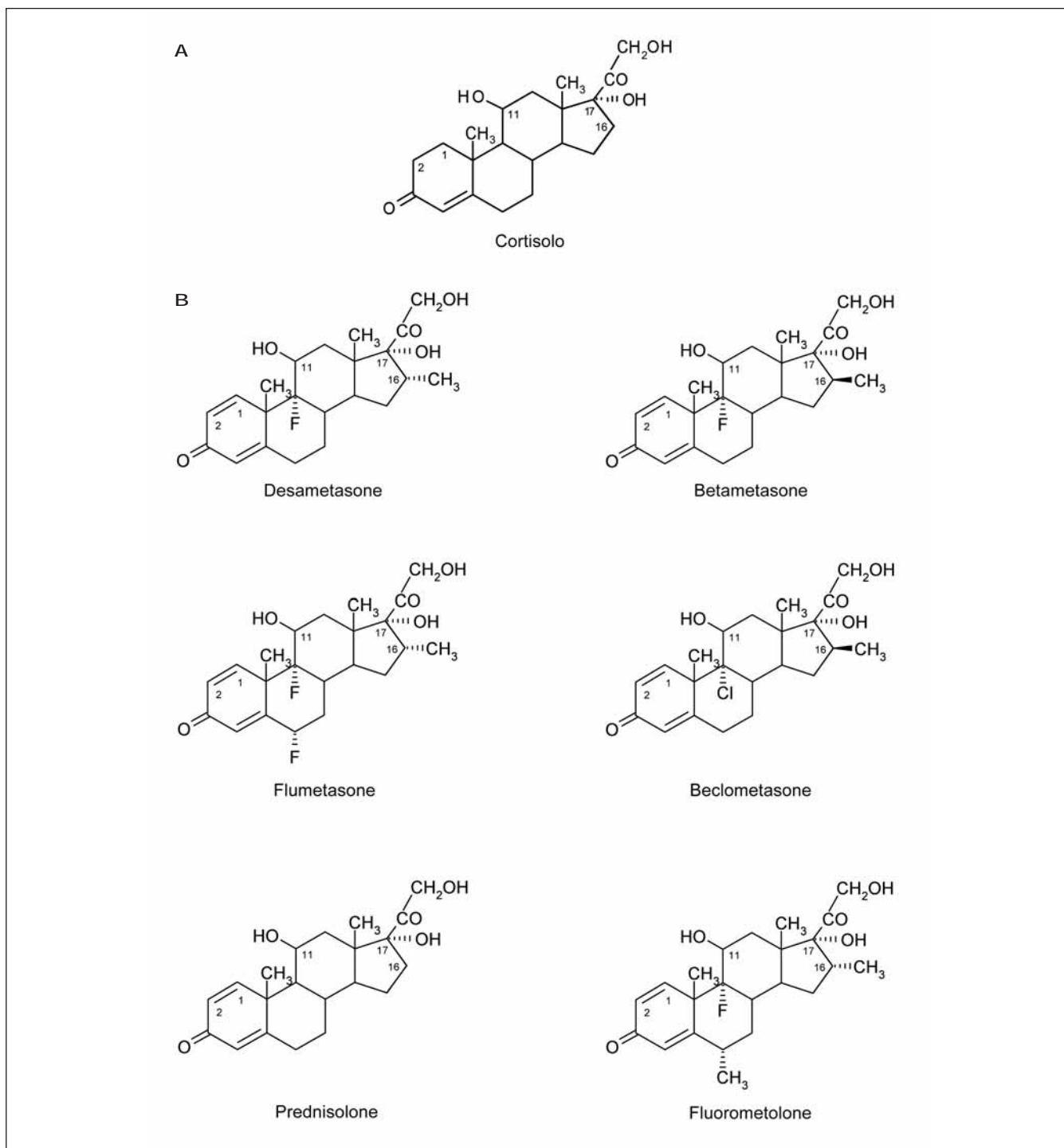


Figura 1 - Struttura chimica del cortisolo (A) e dei principali glicocorticoidi di sintesi (B).

zione di potassio, fosforo e calcio, con conseguente aumento della pressione arteriosa⁶.

Le molecole sintetiche (Figura 1B) utilizzate a scopo farmacologico derivano dal cortisolo ma, grazie ad alcune modificazioni della struttura chimica, sono dotate di una maggiore attività antiinfiammatoria (glicocorticoidea) associata ad un minor effetto sodio-ritentivo (mineralcorticoideo). Questa caratteristica è determinata dalla presenza di un doppio legame tra C1 e C2 e di un gruppo metile in posizione -16. Inoltre, l'alogenazione in posizione -9 (un atomo di F o di Cl) conferisce a tali composti un'aumentata capacità di legame con le proteine sieriche, che ne prolunga considerevolmente l'emivita plasmatica e quindi la durata dell'azione farmacologica. Quest'ultima dipende altresì dal rapporto tra idrosolubilità e liposolubilità del composto: l'esterificazione in C21 con radicali diversi influenza il rilascio della base dal sito di inoculo ad opera delle esterasi tissutali. Ad esempio, i succinati e i fosfati sono maggiormente idrosolubili e vengono rapidamente idrolizzati, mentre gli acetati e gli acetoni favoriscono un lento assorbimento della molecola aumentando la lipofilia. La durata d'azione dei farmaci può essere prolungata fino a tempi superiori alle 48 ore, come nel caso di alcune preparazioni di DEX, betametasona e flumetasone, tra i principi attivi più potenti e maggiormente impiegati nella clinica veterinaria⁷.

Le indicazioni terapeutiche dei glicocorticoidi sono molteplici e comprendono numerose patologie, sia metaboliche sia infiammatorie, tanto nei piccoli quanto nei grandi animali. Per quanto riguarda il bovino, il DEX (soprattutto sodio-fosfato) viene largamente utilizzato in caso di disordini muscolo-scheletrici, chetosi primaria, reazioni allergiche, shock ipovolemico e affezioni cutanee di diversa natura. Inoltre, viene spesso associato ai chemioantibiotici per la terapia di supporto delle malattie batteriche ad evoluzione iperergica, e impiegato nelle vacche durante le ultime fasi della gestazione per indurre il parto. Generalmente la somministrazione del DEX a scopo terapeutico avviene per via parenterale, mediante inoculo endovenoso (maggiore rapidità d'azione, indispensabile ad esempio in caso di shock) o intramuscolare (i.m., azione prolungata dovuta al lento rilascio di alcuni esteri)⁸.

FARMACOCINETICA

I glicocorticoidi sono caratterizzati da un rapido assorbimento: se somministrati *per os* raggiungono il picco ematico dopo due ore, mentre in caso di trattamento per via i.m., i massimi livelli ematici vengono raggiunti entro un'ora, salvo l'utilizzo di particolari composti esterificati a livello del C21. In circolo vengono veicolati principalmente dalla transcortina, una α -globulina specifica, e in misura minore dall'albumina; la percentuale di legame dei composti di sintesi con le proteine plasmatiche è inferiore a quella dei corrispondenti ormoni endogeni (pari a circa il 90%), pertanto tendono a trasferirsi con maggiore facilità ai tessuti, esplicando un'azione farmacologica più rapida ed intensa. La biotrasformazione di tali molecole avviene prevalentemente nel fegato tramite reazioni di ossidazione, catalizzate principalmente dal citocromo P450 e dalle steroido-deidrogenasi, e di coniugazione con acido glucuronico e solfato. I metaboliti polari così originatisi sono perlopiù inattivi e vengono escreti so-

prattutto per via urinaria; nei ruminanti, tuttavia, una buona percentuale (circa il 25%) viene escretata attraverso la bile. Nel complesso, le modificazioni strutturali sopra menzionate fanno sì che i derivati sintetici, a differenza dei composti naturali, vengano biotrasformati in misura minore e più lentamente, caratteristica che, ancora una volta, ne prolunga la durata d'azione¹.

Per quanto concerne la farmacocinetica del DEX nel bovino, numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che l'emivita plasmatica di questo farmaco in seguito a somministrazione per via endovenosa è pari a circa 5 ore e che la biotrasformazione epatica dà origine principalmente a composti inattivi, ossidati o coniugati con solfati e acido glucuronico⁹⁻¹¹. La quota di farmaco che viene biotrasformata, tuttavia, è decisamente modesta: nelle urine il DEX si ritrova, infatti, prevalentemente in forma libera e soltanto il 3-20% è rappresentato da metaboliti di fase II¹², come peraltro confermato da un nostro recente lavoro condotto in vitelloni di razza Frisona¹³. La velocità di eliminazione urinaria è piuttosto elevata, indipendentemente dalla via di somministrazione utilizzata. In un bovino adulto trattato per via i.m. con 50 mg di DEX sodio-fosfato (unica somministrazione), le concentrazioni del farmaco in tale fluido biologico diminuiscono rapidamente da 146 ng/ml dopo 2 giorni dal trattamento a 19,7 ng/ml dopo 7 giorni, fino a scendere sotto i limiti di rilevabilità dopo 11 giorni¹⁴. Analogamente, la somministrazione ripetuta (4 iniezioni a distanza di una settimana) per via i.m. di un'associazione di DEX sodio-fosfato (50 mg/capo) e dello steroide anabolizzante 19-nortestosterone (300 mg/capo) in un gruppo di vitelloni di entrambi i sessi, determina un picco di concentrazione urinaria coincidente con la seconda iniezione (171 ng/ml) e valori inferiori ai limiti di rilevabilità dopo 9 giorni dall'ultimo trattamento¹⁵. Per quanto riguarda la somministrazione *per os*, che alla luce del ritrovamento di basse dosi di DEX nei mangimi (0,1-0,5 μ g/kg) sembra la via di scelta nel trattamento illecito dei bovini al termine del periodo di finissaggio, la velocità di escrezione è altrettanto rapida: in una vacca trattata per sette giorni consecutivi con 50 mg di DEX, è stato riscontrato un picco di concentrazione pari a 980 ng/ml in corrispondenza della terza somministrazione, seguito da una leggera ma costante diminuzione durante il prosieguo del trattamento. Al termine di quest'ultimo, l'eliminazione del farmaco ha subito un'accelerazione repentina: entro 48 ore i livelli sono diminuiti di 10 volte e a distanza di 12 giorni dall'ultima somministrazione i residui di DEX nelle urine non erano più quantificabili¹⁶.

Gli studi di deplezione residuale condotti nel bovino confermano come il DEX, ed in particolare il DEX sodio-fosfato, non tenda ad accumularsi in maniera significativa negli organi edibili in seguito ad un trattamento farmacologico. Fra questi, il fegato presenta concentrazioni relativamente più elevate rispetto agli altri tessuti (muscoli, reni e grasso); tuttavia, secondo i dati disponibili in letteratura, la somministrazione di una singola dose terapeutica per via i.m. è caratterizzata da una sensibile riduzione delle concentrazioni di principio attivo già 4-6 giorni dopo il trattamento, fino a valori inferiori al limite di rilevabilità strumentale dopo 8-10 giorni. Analogamente, secondo l'Agenzia Europea per la valutazione dei farmaci (EMEA), in seguito ad una singola somministrazione di 60 μ g/kg per via i.m., le concentrazioni di DEX nel fegato decrescono da 127 μ g/kg dopo 1 giorno dal trattamento a 16 e 2,6 μ g/kg dopo rispettivamente 2 e 4

giorni. È bene comunque ricordare che, a fronte di una completa negativizzazione della maggior parte dei tessuti già a distanza di 4 giorni dal trattamento, i valori rimangono ben al di sopra del limite di rilevabilità (0,5 µg/kg) a livello del punto di inoculo. Naturalmente, l'eventuale impiego di preparazioni ritardo determina inevitabilmente un rallentamento della cinetica di eliminazione del farmaco e quindi una maggiore persistenza dei residui. Inoltre, la somministrazione a bovine in lattazione provoca la comparsa di residui nel latte, con valori compresi tra 8,4 µg/kg dopo la prima mungitura e 1 µg/kg dopo la sesta.

IMPIEGO ILLECITO

In riferimento al DLgs. 158/2006, per trattamento illecito si intende "l'utilizzazione di sostanze o prodotti non autorizzati, ovvero di sostanze o prodotti autorizzati, a fini o a condizioni diversi da quelli previsti dalle disposizioni vigenti". L'impiego dei corticosteroidi al di fuori della regolare prescrizione da parte del Medico Veterinario e della conseguente annotazione su apposito registro, si configura pertanto come trattamento illecito. I controlli ufficiali eseguiti nei vari Paesi Membri hanno rilevato la presenza di residui di glicocorticoidi in *cocktail* di preparazioni clandestine, nei mangimi, nei siti di inoculo, nelle urine e negli organi, soprattutto dei bovini da carne. A tal riguardo, occorre sottolineare come questo fenomeno sia particolarmente diffuso in Italia, dove nel 2007 i riscontri di positività al DEX nella specie bovina sono stati 23 (a fronte di un numero totale pari a 29), confermando il primo posto del nostro Paese nell'attuazione di questa pratica illegale¹⁷.

Il razionale per l'impiego dei glicocorticoidi quali promotori di crescita si basa sui numerosi effetti "favorevoli" determinati dalla somministrazione dei farmaci a bassi o bassissimi dosaggi, ben inferiori a quelli utilizzati a scopo terapeutico. A dosi farmacologiche, infatti, i glicocorticoidi di sintesi riducono l'indice di accrescimento e conducono ad atrofia muscolare, in seguito al già citato aumento del catabolismo proteico. Al contrario, la somministrazione di basse dosi per lunghi periodi (3-6 settimane) attraverso la via orale, o l'impiego i.m. di preparazioni ritardo capaci di garantire un lento rilascio del principio attivo, possono influenzare positivamente l'accrescimento degli animali e la qualità delle carni. In particolare, studi sperimentali condotti sia sui vitelloni sia sui vitelli a carne bianca hanno dimostrato come, utilizzando tali protocolli di trattamento, il DEX sia in grado di migliorare l'indice di conversione e la conformazione delle carcasse, e di aumentare moderatamente il volume delle masse muscolari¹⁸⁻²⁰. Quest'ultimo effetto, rilevato nel muscolo *longissimus dorsi*, è stato messo in relazione con un incremento dei livelli plasmatici di insulina, che riduce il catabolismo proteico e favorisce la sintesi di nuove proteine aumentando la captazione degli aminoacidi¹⁸. Tale ipotesi è avvalorata dai risultati di alcuni esperimenti eseguiti su linee cellulari di miociti di ratto: l'incubazione con basse concentrazioni di DEX è in grado di potenziare l'effetto mitogeno indotto dall'insulina e dall'*Insulin Growth Factor*²¹. Di grande interesse per far luce sugli effetti auxinici della somministrazione di glicocorticoidi a bassi dosaggi sono gli studi recentemente pubblicati sulla modulazione genica a livello muscolare²² e dei quali verrà fatta menzione nel paragrafo riguardante la genomica. I glicocor-

ticoidi, infine, influenzano positivamente il valore commerciale della carcassa e le qualità organolettiche della carne: la somministrazione orale di basse dosi di DEX in vitelli a carne bianca determina, infatti, un punteggio complessivo più elevato in base alle classificazioni internazionali, nonché un colorito più pallido e una maggiore tenerezza, caratteristiche particolarmente apprezzate dal consumatore¹⁹.

L'utilizzo dei glicocorticoidi a scopo illecito è spesso associato alla somministrazione di altri promotori di crescita, quali i β-agonisti o gli steroidi anabolizzanti, allo scopo di sfruttare gli effetti sinergici tra i diversi principi attivi. In particolare, il DEX ha la capacità di attenuare la sotto-regolazione dei recettori β-adrenergici indotta dal trattamento a dosi auxiniche con il clenbuterolo²³, aumentando quindi l'efficacia di quest'ultimo quale agente di ripartizione. Ad esempio, nei linfociti di vitelli a carne bianca trattati sperimentalmente con 17β-estradiolo e clenbuterolo, la riduzione della concentrazione dei recettori β-adrenergici, evidente durante il trattamento con il β-agonista, viene neutralizzata dalla concomitante somministrazione del glicocorticoide²⁴. Inoltre, i cortisonici sono in grado sia di potenziare l'effetto lipolitico sia di attenuare l'intensa glicogenolisi epatica e alcuni degli effetti negativi sul muscolo (es. colorito scuro, aumento della resistenza al taglio e diminuzione della sapidità) indotti dai composti β-adrenergico-mimetici. L'associazione dei glicocorticoidi ad altri promotori di crescita è giustificata anche dalla possibilità di contrastare in parte le indagini degli organi di controllo. L'azione inibente sull'ormone antidiuretico (ADH) esercitata da tali composti determina, infatti, poliuria e polidipsia, diminuendo la concentrazione urinaria di altre molecole somministrate a scopo illecito. Infine, l'attività antiinfiammatoria viene sfruttata fraudolentemente per ridurre, a livello del punto di inoculo, le lesioni derivanti da ripetute somministrazioni i.m. di sostanze più o meno consentite.

METODOLOGIE DIAGNOSTICHE TRADIZIONALI

Le alterazioni cliniche ed anatomico-patologiche derivanti dalla somministrazione prolungata di glicocorticoidi a basse dosi sono spesso difficilmente evidenziabili. Talvolta è possibile riscontrare fenomeni di poliuria e polidipsia, con il rilevamento della lettiera bagnata; alla macellazione, invece, l'organo maggiormente interessato è il timo, che può presentarsi atrofico e diminuito di peso, con un aumento della componente adiposa e connettivale. Tale riscontro è evidente soprattutto nei vitelli a carne bianca, nei quali è possibile reperire, accanto ai fenomeni atrofici, segni di rigenerazione. Nei vitelloni, invece, le alterazioni si evidenziano maggiormente all'esame istologico, con la presenza nella corticale di un caratteristico quadro definito "a cielo stellato", per i numerosi linfociti apoptotici e fagocitati dai macrofagi, che appaiono come tanti punti chiari su sfondo scuro²⁵.

Per quanto riguarda le indagini ufficiali, condotte secondo le disposizioni del Piano Nazionale Residui (PNR), i campioni da sottoporre ad analisi sono l'urina (in allevamento) e il fegato (al macello). Come già accennato in precedenza, l'escrezione urinaria dei glicocorticoidi è rilevabile sia durante la somministrazione, sia per un periodo variabile dopo la sospensione del trattamento, a seconda della via di somministrazione, della dose e della natura del composto impiegato;

gli stessi fattori influenzano la persistenza dei residui nel fegato, che si aggira intorno ai 6-8 giorni dall'ultimo trattamento. Per le analisi di screening, le metodiche impiegate sono quelle basate sui saggi immunoenzimatici, quali l'ELISA, con un valore di *cut-off* pari a 2 ng/ml; per l'eventuale conferma si ricorre, invece, alla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS). In particolare, per la ricerca dei corticosteroidi nelle urine, l'uso della LC-MS/MS garantisce limiti di rilevazione di 40-70 pg/g (ppt)²⁶. Nonostante l'elevata sensibilità di questa sofisticata tecnica analitica, la maggior parte dei dati disponibili riguardo la cinetica di escrezione urinaria dei glicocorticoidi nel bovino si riferisce a studi sperimentali condotti con dosaggi terapeutici, *per os* o i.m., su vitelli a carne bianca o vacche, talvolta anche in associazione con altre sostanze^{14-16,27}. Soltanto recentemente il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il Centro Regionale Antidoping, ha condotto uno studio per caratterizzare il profilo di escrezione del DEX sodio-fosfato nei vitelloni da carne, che rappresentano la categoria maggiormente interessata dall'uso illegale dei glicocorticoidi¹³. In particolare, gli animali sono stati trattati secondo un protocollo terapeutico (60 µg/kg per via i.m. per 3 giorni consecutivi) o un programma di promozione della crescita (0,7 o 1,4 mg *pro capite* al giorno *per os* per 60 giorni), allo scopo di fornire elementi utili a discriminare, con metodiche tradizionali, tra l'impiego lecito ed illecito dei corticosteroidi. I risultati dello studio confermano l'elevata velocità di eliminazione del DEX nelle urine in seguito alla somministrazione a scopo terapeutico secondo la posologia più impiegata, sia durante sia dopo la fine del trattamento (Figura 2). Infatti, a distanza di 24 ore dalla seconda somministrazione la concentrazione media del composto diminuisce drasticamente da 164 a 35 ng/ml; nonostante successivamente il tasso di escrezione rallenti, il valore di *cut-off* dei metodi immunoenzimatici (2 ng/ml) viene raggiunto a distanza di 3 giorni dalla sospensione del trattamento, e la virtuale negativizzazione delle urine (< 0,0015 ng/ml) dopo soli 5 giorni. Per quanto riguarda il protocollo di promozione della crescita, l'escrezione del DEX è ugualmente rapida per entrambi i dosaggi utilizzati: il gruppo di animali trattati con 1,4 mg di farmaco presenta concentrazioni urinarie medie pari a 8-11 ng/ml fino a 25 giorni dall'inizio della somministrazione, seguite da valori prossimi al *cut-off* (2,5-3 ng/ml) a partire dal 53° giorno; nei vitelloni trattati con 0,7 mg di composto, le concentrazioni di DEX nelle urine sono dimezzate rispetto a quelle del gruppo ricevente la dose più alta e valori inferiori a 2 ng/ml vengono misurati già dopo 25 giorni dall'inizio della somministrazione (Figura 3). È di particolare interesse il fatto che gli animali trattati con la dose più bassa, che tra l'altro sembra essere quella maggiormente impiegata nella pratica illegale, risulterebbero negativi ai comuni test di screening per i corticosteroidi durante tutta la seconda metà del periodo di somministrazione. In base ai risultati ottenuti e tenendo conto dell'elevata variabilità individuale, rilevata soprattutto all'inizio di entrambi i protocolli di trattamento (Figure 2 e 3), è possibile concludere che livelli urinari di DEX superiori a 20 ng/ml sono fortemente indicativi di una terapia cortisonica in atto (circostanza peraltro illecita, se non regolarmente documentata sull'apposito registro). Concentrazioni inferiori a tale valore, ed in particolare comprese fra 2 e 10 ng/ml, sono caratteristiche sia della fase successiva ad un trattamento farmacologico, sia dell'utilizzo del DEX a scopi

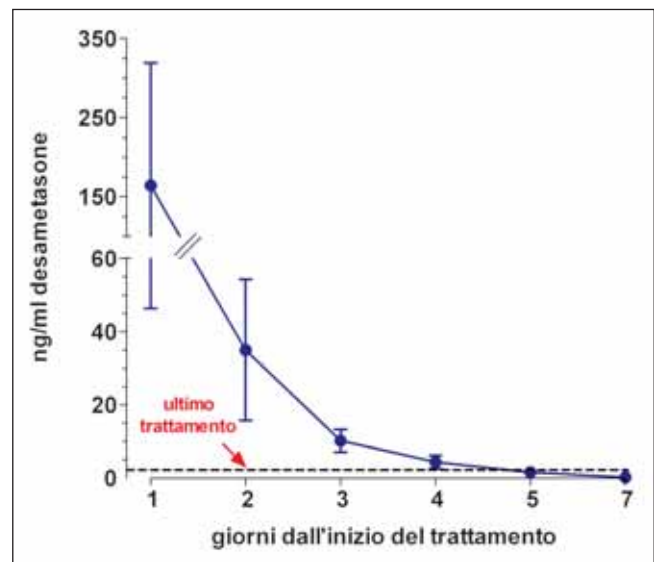


Figura 2 - Profilo di escrezione urinaria del desametasone in vitelloni trattati sperimentalmente con un protocollo terapeutico (60 µg/kg i.m. per tre giorni consecutivi). I valori sono espressi come media ± deviazione standard, n = 7. La linea tratteggiata indica il valore di *cut-off* (2 ng/ml) dei test immunoenzimatici.

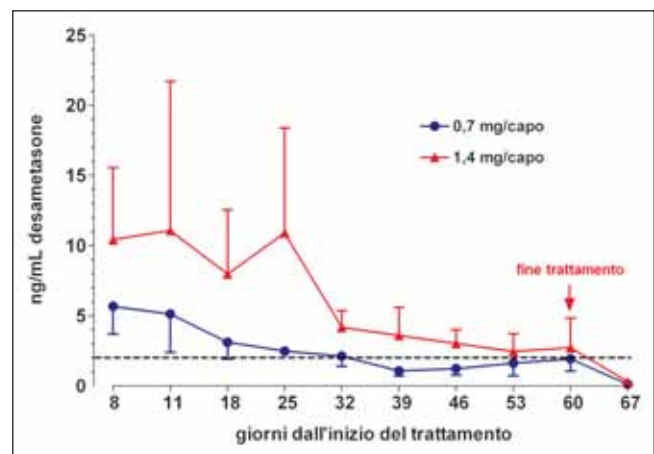


Figura 3 - Profilo di escrezione del desametasone nelle urine di vitelloni trattati con un protocollo di promozione della crescita (0,7-1,4 mg/capo *per os* per 60 giorni). I valori sono espressi come media ± deviazione standard, n = 4. La linea tratteggiata indica il valore di *cut-off* (2 ng/ml) dei test immunoenzimatici.

auxinici (Figura 4). Tuttavia, è importante sottolineare come, a causa della rapida negativizzazione, nei soggetti sottoposti a terapia tali valori siano riscontrabili soltanto per un arco temporale molto limitato (2-3 giorni), mentre sono caratteristici della maggior parte del trattamento ad effetto anabolizzante. A questo proposito, sarebbe opportuno ripetere i prelievi di urina a distanza di 2-3 giorni, per caratterizzare meglio il profilo di escrezione del farmaco; tuttavia tale procedura risulta difficilmente applicabile nelle condizioni di campo. Alla luce di queste nuove informazioni, emerge comunque la necessità, nell'ambito dei programmi di sorveglianza ufficiale, sia di eseguire campionamenti di urina da un numero congruo di animali, per far fronte alla già citata variabilità individuale, sia di sviluppare protocolli di screening che si avvalgano dell'uso di metodiche sensibili per ovviare alla scarsa sensibilità dei test immunoenzimatici nell'individuare gli animali trattati con basse dosi di DEX.

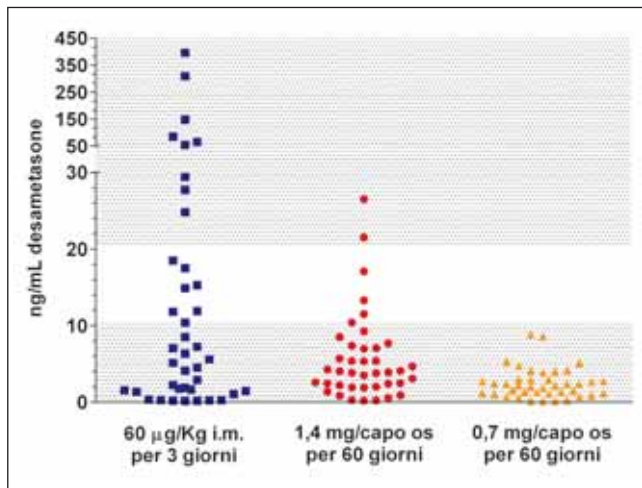


Figura 4 - Concentrazioni urinarie (dati grezzi) del desametasone in vitelloni trattati con un protocollo terapeutico o anabolizzante.

METODOLOGIE DIAGNOSTICHE COMPLEMENTARI ED INNOVATIVE

Per quanto riguarda il bovino da carne, i resoconti delle indagini ufficiali condotte nel 2007 nell'Unione Europea sostengono che le percentuali di positività alle molecole utilizzate illecitamente quali promotori di crescita (steroidi sessuali, β -agonisti e corticosteroidi) sono decisamente trascurabili (nettamente inferiori all'1%)¹⁷. In realtà, i dati relativi ai sequestri di preparazioni clandestine e i risultati delle analisi istopatologiche eseguite sugli organi bersaglio in sede di macellazione depongono per una diffusione assai più vasta del fenomeno. Ad esempio, nel corso di un progetto pilota promosso dal Ministero della Salute in otto Regioni nel periodo 2004-2006, nel quale sono stati esaminati gli organi bersaglio di 295 vitelli a carne bianca e 1035 vitelloni da carne, la percentuale dei campioni sospetti per la sola categoria dei cortisonici è stata pari al 6,7%²⁸. Le cause di questa discrepanza, che indica una scarsa efficacia dei controlli ufficiali nel contrastare il ricorso illegale ai promotori di crescita, sono da ricercare soprattutto nelle mutate strategie di trattamento adottate dagli allevatori. Queste ultime, infatti, prevedono l'impiego di dosaggi molto bassi e/o di molecole di struttura sconosciuta, capaci di limitare notevolmente l'efficacia dei controlli ufficiali, basati unicamente sulla messa in evidenza dei composti ricercati per mezzo di metodiche fisico-chimiche. Negli ultimi anni, pertanto, numerosi gruppi di ricerca, sia italiani sia stranieri, hanno rivolto il proprio interesse alla scoperta di nuove metodologie diagnostiche, che siano affidabili, facili da eseguire e di costo contenuto. In particolare, la maggior parte di questi metodi innovativi non si basa sull'identificazione delle molecole, bensì sulla messa in evidenza degli effetti specifici causati dall'impiego illecito delle stesse. Tale approccio consentirebbe di rilevare casi di sospetta positività indipendentemente dalla natura e dalla dose del composto utilizzato, permettendo di orientare le indagini chimico-analitiche e di contrastare più efficacemente le nuove strategie di trattamento.

In relazione al DEX, diversi lavori sperimentali hanno proposto alcuni parametri quali biomarcatori di trattamento illecito con tale farmaco nel bovino da carne (Tabella 1).

a) Morfologia del timo

Le alterazioni di quest'organo in seguito alla somministrazione del DEX sono state studiate sperimentalmente soltanto nei vitelli a carne bianca. Negli animali trattati secondo un dosaggio terapeutico (due somministrazioni i.m. di 15 μ g/kg a distanza di una settimana) o anabolizzante (0,4 mg al giorno *per os* per 23 giorni), il timo presenta una progressiva atrofia, accompagnata dalla deplezione della popolazione linfocitaria e dall'aumento della componente adiposa, con una conseguente diminuzione di peso dell'organo, soprattutto in rapporto al peso corporeo²⁹. Analoghi risultati sono stati ottenuti in un esperimento simile: l'atrofia timica dei soggetti trattati *per os* è legata ad un assottigliamento della corticale, correlata con un più elevato indice apoptotico dei linfociti³⁰. Sebbene i risultati conclusivi del lavoro indichino come le alterazioni morfologiche del timo indotti dal DEX non siano tali da distinguere il protocollo di trattamento utilizzato (terapeutico o anabolizzante), è comunque interessante notare che nel vitello a carne bianca l'atrofia timica regredisce velocemente al termine del trattamento, sia esso per via i.m. o orale, e che l'organo mostra una rigenerazione completa a distanza, rispettivamente, di 25 e 11 giorni dall'ultima somministrazione, compatibile con il tempo di attesa previsto per alcune fra le specialità medicinali più impiegate. Poiché i trattamenti illeciti, invece, vengono protratti fino a pochi giorni dalla macellazione, per garantire gli effetti anabolizzanti desiderati, le lesioni timiche potrebbero essere ancora evidenziate. Nel complesso, l'esame istopatologico viene proposto come un efficace test di screening per contrastare l'uso illegale dei corticosteroidi nella produzione dei vitelli a carne bianca. Recentemente, infatti, la morfologia timica è stata impiegata, insieme alla determinazione chimica nel fegato, quale parametro per valutare la positività ai più comuni glucocorticoidi in uno studio di campo condotto sia sui vitelli a carne bianca sia sui vitelloni (v. paragrafo "Tasso di cortisolo ematico")³¹.

b) Modulazione degli enzimi farmaco-metabolizzanti

Gli enzimi biotrasformativi hanno un ruolo chiave nella conversione delle sostanze endogene e xenobiotiche in composti più polari ed idrosolubili, che vengono facilmente escreti dall'organismo³². In particolare, i corticosteroidi costituiscono il substrato di numerosi enzimi, e sono in grado, a loro volta, in determinate condizioni, di incrementarne l'espressione, così come riportato per il citocromo P450 (CYP) 3A epatico sia nell'uomo sia nel ratto³³.

Tuttavia, gli studi condotti finora nel bovino non hanno confermato tali dati. In due esperimenti simili ma indipendenti, condotti rispettivamente nei vitelli a carne bianca e nei vitelloni, è stato osservato come la somministrazione di DEX sia *per os* sia i.m. non moduli in modo significativo nel fegato l'espressione genica del CYP3A, misurata mediante una tecnica molto sensibile quale la PCR quantitativa (*real-time* PCR)^{34,35}. Per contro, nei vitelli a carne bianca il mancato effetto trascrizionale è accompagnato da una significativa, anche se modesta, sotto-regolazione dell'enzima, che si riflette in una diminuita attività catalitica, soprattutto in seguito al trattamento *per os*³⁴.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il DEX eserciti, attraverso meccanismi traduzionali e/o post-traduzio-

Tabella 1 - Metodologie diagnostiche innovative e nuovi parametri proposti per l'individuazione dei trattamenti illeciti con il desametasone nel bovino da carne (vitello a carne bianca o vitellone).

Parametro/Tecnica	Matrice	Caratteristiche	Vantaggi	Svantaggi	Referenze
Morfologia/istologia del timo	Timo	Atrofia e assottigliamento della corticale	Facilità di esecuzione Costo contenuto Sensibilità elevata	Analisi <i>post-mortem</i> Discrezionalità operatore Possibili falsi positivi per pregressa terapia cortisonica	Biolatti et al., 2005 Cannizzo et al., 2008
Enzimi farmaco-metabolizzanti	Fegato	Modulazione in senso positivo e/o negativo di alcuni enzimi (es. CYP3A, CYP2E1)	Facilità di esecuzione	Analisi <i>post-mortem</i> Modulazione limitata Specificità non elevata	Cantiello et al., 2009 Zancanella et al., 2009 Giantin et al. 2010
Cortisolo ematico	Siero	Diminuzione	Analisi <i>in vivo</i> Facilità di esecuzione Costo contenuto Adattabilità ad indagini su vasta scala		Vascellari et al., 2008 Marin et al., 2008
Rapporto 6 β -idrossicortisolo/cortisolo	Urina	Aumento	Analisi <i>in vivo</i> Facilità di esecuzione Costo contenuto Adattabilità ad indagini su vasta scala	Elevata variabilità individuale Specificità non elevata Mancanza di valori fisiologici	Capolongo et al., 2007 Cantiello et al., 2009
Recettori glicocorticoidei	Linfociti periferici	Diminuzione	Analisi <i>in vivo</i>	Separazione dei linfociti indaginosi Tecnica analitica complessa (RIA) Mancanza di dati sull'azione di altre sostanze	Odore et al., 2006
Proteomica	Siero, plasma, tessuti (fegato, muscolo...)	Identificazione di biomarcatori proteici	Analisi <i>in vivo</i> e <i>post-mortem</i> Indagini di validazione e screening (WB): facilità di esecuzione, costo contenuto ed adattabilità su vasta scala	Variabilità individuale Indagini di "discovery" (2D-E associata a spettrometria di massa) complesse e costose	Gardini et al., 2006 Nebbia et al., 2008
Genomica	Tessuti (fegato, muscolo...), linfociti periferici	Identificazione di biomarcatori genici	Analisi <i>in vivo</i> e <i>post-mortem</i> Indagini di validazione e screening (<i>real-time</i> PCR): facilità di esecuzione, costo contenuto, adattabilità su vasta scala	Variabilità individuale Indagini di "discovery" (<i>microarray</i>) complesse e costose	Carraro et al., 2009
Spettroscopia NIR	Muscolo	Variazione della capacità assorbente l'energia luminosa	Facilità di esecuzione Costo contenuto	Analisi <i>post-mortem</i> Mancanza valori fisiologici Risultati preliminari	Masoero et al., 2008

nali, un effetto inibitorio sul CYP3A bovino, così come riportato nel cane e nel ratto trattato con dosi sub-terapeutiche³⁶. Analogamente, l'analisi dell'espressione genica di altri enzimi farmaco-metabolizzanti epatici nei vitelloni ha rivelato che il trattamento con il glicocorticoide, sia *per os* sia i.m., regola negativamente il CYP2E1 e l'omologo del CYP2B6, mentre induce debolmente gli omologhi della glutatone-s-transferasi A1 (circa 2 volte i.m.) e della sulfotransferasi A1 (1,5 volte *per os*)³⁵. Infine, negli stessi animali, l'espressione genica del CYP1A1 è significativamente incrementata nel testicolo³⁷. Nonostante i risultati dei lavori citati incoraggino l'utilizzo degli enzimi biotrasformativi quali biomarcatori di trattamento illecito con il DEX, occorre sottolineare la notevole influenza di numerosi fattori endogeni ed esogeni (razza, sesso, stati fisiopatologici, dieta, esposizione contemporanea ad altri xenobiotici) sull'espressione di tali geni³².

c) Tasso di cortisolo ematico

Uno degli effetti del trattamento con i glicocorticoidi è l'inibizione dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che determina una riduzione della sintesi endogena di cortisolo¹⁰. Pertanto, in uno studio condotto in campo, un gruppo di ricercatori italiani ha valutato la possibile correlazione tra i livelli ematici di tale ormone e l'impiego illecito dei corticosteroidi quali promotori di crescita nel bovino da carne³¹. La concentrazione di cortisolo in campioni prelevati al macello da 349 animali (vitelloni e vitelli a carne bianca) è stata confrontata sia con la morfologia e l'aspetto istologico del timo, sia con l'eventuale riscontro di residui epatici di DEX determinati mediante analisi chimica con LC-MS/MS. Da queste indagini è emerso che il tasso di cortisolo ematico è inversamente proporzionale alla severità delle lesioni timiche, e che concentrazioni inferiori a 2 ng/ml sono correlate in modo significativo con la presenza di residui del glicocor-

ticoide nel fegato. Inoltre, a differenza dell'esame istologico, la misurazione dei livelli di cortisolo sembra presentare una specificità (capacità di identificare correttamente i soggetti non trattati) molto elevata: tre animali ritenuti sospetti in base all'aspetto macro- e microscopico del timo, ma con concentrazioni di cortisolo considerate fisiologiche, sono infatti risultati negativi all'analisi chimica. La validità e l'importanza di tali dati è ulteriormente confermata da uno studio sperimentale in cui la quotidiana somministrazione orale di 0,75 mg/capo di DEX per 49 giorni ha determinato nei vitelloni da carne una significativa diminuzione delle concentrazioni ematiche di cortisolo rispetto agli animali di controllo³⁸. Nell'insieme questi risultati suggeriscono come la misurazione del cortisolo sierico nell'animale vivo possa rappresentare un valido test di screening per la ricerca di eventuali trattamenti illegali con i glicocorticoidi.

d) Rapporto fra le concentrazioni urinarie di cortisolo e 6 β -idrossicortisolo

Nell'uomo e negli animali il cortisolo viene eliminato per via urinaria, sia come tale, sia come metabolita idrossilato (6 β -idrossicortisolo) prodotto a seguito di una reazione CYP3A-dipendente. Dal momento che, come precedentemente accennato, il trattamento con il DEX inibisce la produzione di cortisolo e ne diminuisce la concentrazione ematica, è ragionevole attendersi anche una riduzione dei livelli di escrezione urinaria di entrambi i composti. Tale effetto è stato, infatti, evidenziato in due studi indipendenti condotti mediante la somministrazione orale del farmaco in vitelloni da carne³⁹ e in vitelli a carne bianca³⁴ alle dosi, rispettivamente, di 0,75 mg/capo per 50 giorni e 0,4 mg/capo per 23 giorni. In particolare, il DEX determina una riduzione delle concentrazioni urinarie sia del metabolita idrossilato, sia del suo precursore; tuttavia, poiché i livelli di quest'ultimo decrescono maggiormente rispetto a quelli del metabolita, il rapporto 6 β -idrossicortisolo/cortisolo presenta incrementi variabili fino a 6 volte nei vitelloni e fino a 2 volte nei vitelli a carne bianca. Nell'uomo, il rapporto urinario 6 β -idrossicortisolo/cortisolo è un parametro utilizzato per valutare l'attività del CYP3A: infatti, la somministrazione di alcuni induttori enzimatici specifici (es. rifampicina) determina un aumento del valore di tale rapporto, in seguito all'incremento CYP3A-dipendente della generazione del metabolita idrossilato^{40,42}. Nei bovini trattati con il DEX, invece, l'aumento di questo rapporto origina da una diminuzione relativamente più elevata del cortisolo rispetto al suo metabolita e, in accordo con quanto osservato in uno studio citato in precedenza³⁴, potrebbe essere ricondotto ad un effetto inibitorio del DEX sul CYP3A bovino. A prescindere da ciò, occorre precisare che nell'uomo fattori quali l'esposizione a contaminanti ambientali (es. organoclorurati e piombo), nonché patologie polmonari ed epatiche, di origine neoplastica e non, possono alterare significativamente il rapporto urinario 6 β -idrossicortisolo/cortisolo⁴⁰; infine, rimangono da chiarire gli eventuali effetti nel bovino della somministrazione di altri farmaci, leciti e non.

e) Modulazione dei recettori linfocitari

L'azione dei glicocorticoidi a livello cellulare è mediata dal legame con recettori citoplasmatici (*glucocorticoid receptors*, GR), che regolano l'espressione genica e, quindi, proteica di

specifici effettori. Tra questi ricordiamo la tirosina aminotransferasi (TAT), un enzima a prevalente localizzazione epatica il cui ruolo fisiologico consiste nell'avviare la gluconeogenesi a partire dagli aminoacidi. In particolare, l'incremento di espressione della TAT, dimostrato nell'uomo e nel ratto, rappresenta una delle risposte più precoci e sensibili in seguito alla somministrazione dei glicocorticoidi⁴², tanto da essere stato scelto per la definizione della Dose Giornaliera Accettabile per questa classe di principi attivi⁴³. Peraltro, i GR sono essi stessi regolati dall'azione dei cortisonici secondo un meccanismo di feed-back negativo che determina nei tessuti bersaglio una riduzione dei livelli recettoriali e della conseguente risposta biologica^{24,44}. Alla luce di tali premesse, è stata esplorata la possibilità che la modulazione dei GR e/o della TAT potesse rappresentare un utile strumento per valutare l'esposizione ai glicocorticoidi nella specie bovina. In tre esperimenti distinti, condotti su vitelli a carne bianca o vitelloni trattati con il DEX *per os* secondo diversi protocolli anabolizzanti, l'espressione genica nel fegato sia del recettore sia dell'enzima non è risultata significativamente modificata dalla somministrazione del farmaco^{34,35,45}. Analogamente, non sono stati riscontrati incrementi apprezzabili dell'attività catalitica della TAT nei vitelloni, che si presenta addirittura ridotta nei vitelli a carne bianca^{34,35}. Al contrario, la modulazione recettoriale in seguito al trattamento con il DEX risulta evidente e specifica nei linfociti periferici provenienti da vitelli a carne bianca trattati con una delle più utilizzate combinazioni di promotori di crescita (17 β -estradiolo, clenbuterolo e DEX)⁴⁶. Nel suddetto studio, la significativa riduzione della concentrazione dei GR in queste cellule, determinata con tecniche R.I.A. (*radioimmunoassay*), coincide in particolare con il periodo di somministrazione orale dei glicocorticoidi, dimostrando la causalità del fenomeno, ed è in accordo con quanto riportato per i linfociti umani⁴⁷. Tale risultato suggerisce, quindi, come la determinazione dei GR linfocitari potrebbe essere ragionevolmente inclusa in una batteria di indagini volte all'individuazione dell'utilizzo illegale dei corticosteroidi negli animali vivi.

f) Approccio proteomico

La maggior parte dei promotori di crescita e delle molecole ad effetto anabolizzante, compresi i glicocorticoidi, agisce prevalentemente attraverso meccanismi di tipo trascrizionale, che determinano un incremento/decremento della sintesi di proteine specifiche. Le indagini di proteomica costituiscono un valido strumento per delineare il profilo di espressione caratteristico di ogni specie e categoria di animali, consentendo di individuare, nelle proteine differenzialmente espresse, dei biomarcatori indiretti del trattamento. Applicando la tecnica dell'elettroforesi bidimensionale (2D-E) a fluidi (siero, plasma) e omogenati di tessuti o frazioni subcellulari, è possibile discriminare ciascuna proteina sottoforma di un punto (*spot*) colorato su un gel di poliacrilamide. L'analisi quantitativa dell'intensità di tali *spot* per mezzo di appositi *software* consente di rilevare le eventuali differenze fra una situazione di "controllo" ed una situazione "alterata". L'identificazione delle proteine d'interesse avviene, quindi, determinando le sequenze peptidiche con l'ausilio di particolari spettrometri di massa (MALDI-TOF), e confrontandole con banche dati specifiche disponibili in rete. Recentemente l'applicazione di tale approccio ha permesso di identificare per la prima volta due marcatori proteici nelle frazioni subcellulari epatiche di vitel-

li a carne bianca trattati con la già citata combinazione di sostanze illegali (17 β -estradiolo, clenbuterolo e DEX)⁴⁸. L'espressione dell'adenosina chinasi (ADK), un enzima citosolico coinvolto nel metabolismo glicidico, e della reticulocalbina (RCN1), una proteina microsomiale la cui sovraespressione è correlata all'insorgenza e alla progressione tumorale, sono risultate rispettivamente diminuite di circa il 50% e aumentate di oltre due volte rispetto agli animali di controllo. È interessante notare come, a distanza di 4 settimane dalla sospensione del trattamento, i livelli di espressione di entrambe le proteine siano nuovamente sovrapponibili a quelli dei vitelli non trattati⁴⁹. Inoltre, gli stessi autori, conducendo un'indagine di validazione preliminare in campo su vitelli a carne bianca provenienti da tre diversi stabilimenti di macellazione piemontesi, hanno rilevato, nello stabilimento caratterizzato dalla macellazione di un numero limitato di capi provenienti da allevamenti di scarsa consistenza numerica, valori di espressione di entrambi i biomarcatori sovrapponibili a quelli riscontrati nei soggetti trattati sperimentalmente⁴⁹. Attualmente nel nostro laboratorio sono in corso ulteriori indagini per chiarire gli effetti delle singole classi di promotori di crescita sull'espressione dei suddetti biomarcatori. In considerazione del ruolo dell'ADK nel metabolismo glicidico, sarebbe lecito attendersi un coinvolgimento dei glicocorticoidi nella modulazione di tale enzima. Ed infatti, indagini preliminari su colture primarie di epatociti di ratto incubate con concentrazioni di DEX pari a 10⁻⁶ e 10⁻⁷ M depongono per un effetto inibitorio sull'enzima dello stesso ordine di grandezza di quello riscontrato negli esperimenti *in vivo* (dati non pubblicati).

g) Approccio genomico

Come già citato in precedenza, la modulazione dell'espressione proteica indotta dai promotori di crescita può essere determinata anche a livello genico, mediante tecniche che consentono di rilevare differenze della quantità di RNA messaggero. In particolare, la *real-time* PCR viene più frequentemente utilizzata con un approccio di tipo gene-candidato (v. Modulazione degli enzimi farmaco-metabolizzanti epatici e dei recettori linfocitari), ossia nello studio mirato, in specifici organi o tessuti, dell'espressione di geni ritenuti coinvolti in un determinato processo cellulare (cfr. l'esposizione ai glicocorticoidi), sulla base della letteratura e delle conoscenze scientifiche. I *microarray* (matrici ad alta densità), invece, consentono di confrontare i profili di espressione di due o più campioni, utilizzando supporti solidi su cui vengono "fissate" migliaia di sequenze nucleotidiche corrispondenti ad altrettanti geni. Questo secondo tipo di approccio ha il vantaggio di poter analizzare contemporaneamente moltissimi geni appartenenti a differenti categorie di processi cellulari e, anche se necessita di una successiva validazione mediante *real-time* PCR dei risultati ottenuti, può evidenziare variazioni geniche altrimenti non rilevate. Nel 2009 è stato pubblicato il primo lavoro nel quale la combinazione di tali metodologie è stata impiegata per la caratterizzazione del profilo genico muscolare di vitelloni (Charolaise x Limousine) trattati sperimentalmente con dosi auxiniche di DEX (0,75 mg/capo *per os* per 43 giorni), da solo o in associazione con tre iniezioni intramuscolari di 17 β -estradiolo (20 mg/capo) a intervalli di 14 giorni²². I risultati delle analisi di *microarray* rivelano che il trattamento con il glicocorticoide determina l'aumento della trascrizione di un elevato numero di geni (609), la funzione biologica dei quali può essere ri-

condotta a tre categorie principali di processi cellulari: motilità e comunicazione, trasmissione del segnale e metabolismo proteico. Di particolare rilievo è risultata la sovra-regolazione di geni associati con la miogenesi e l'ipertrofia muscolare e la sotto-regolazione del gene codificante per la miostatina, una proteina che svolge un ruolo chiave nel controllo (negativo) della proliferazione muscolare. Tali effetti sono tuttavia significativamente attenuati dalla somministrazione degli estrogeni, con un numero di geni regolati in senso positivo rispetto ai controlli pari a 77, di cui poco meno della metà coincide con quelli identificati negli animali trattati con il solo glicocorticoide. La successiva validazione dei dati mediante *real-time* PCR su alcuni dei geni maggiormente modulati ha permesso di identificare una serie di marcatori molecolari, specifici per la somministrazione del DEX, in grado di assegnare correttamente i campioni al gruppo di appartenenza (trattato o non trattato). Per quanto riguarda l'associazione glicocorticoide-estrogeni, invece, i risultati sono meno affidabili, e sottolineano come il ricorso a più sostanze illecite favorisca, ancora una volta, il mascheramento degli effetti indotti dai singoli composti.

h) Spettroscopia NIR (*Near Infrared*)

Questo metodo di analisi, che sfrutta l'interazione della materia con le radiazioni del vicino infrarosso, si avvale della specifica capacità di ogni composto chimico di assorbire, trasmettere o riflettere la radiazione luminosa. La combinazione delle proprietà assorbenti con quelle di dispersione dell'energia luminosa determina la diffusa riflettanza della luce, che contiene informazioni sulla composizione chimica del campione. Pertanto questa tecnica viene spesso utilizzata nel settore agro-alimentare per la valutazione quali-quantitativa degli alimenti e per l'individuazione di eventuali adulterazioni e sofisticazioni. Recentemente la spettroscopia NIR è stata anche applicata nell'ambito della ricerca per l'individuazione dei trattamenti illeciti dei bovini da carne, mediante l'analisi di campioni di tessuto prelevati da animali trattati sperimentalmente con diverse sostanze^{50,51}. In particolare, l'esame dei muscoli di primo taglio (*m. semitendinosus* e *m. longissimus thoracis*) di vitelloni, ai quali erano stati somministrati per 60 giorni nella razione giornaliera 0,7 o 1,4 mg di DEX, è stato in grado di discriminare in modo efficace i campioni prelevati dai soggetti trattati rispetto a quelli di controllo, a distanza di ben 26 giorni dalla sospensione del trattamento⁵¹. Analoghi risultati, anche se meno significativi, sono stati ottenuti analizzando il timo, la cute e il grasso perirenale provenienti dagli stessi animali. Nonostante la scarsità di dati riguardo questa applicazione ed in attesa di ulteriori conferme, la spettroscopia NIR sembra prospettarsi, almeno in condizioni sperimentali, come un promettente metodo di screening per l'identificazione dell'impiego di sostanze illegali a scopo auxinico negli animali.

ESPERIENZE DI CAMPO: STRATEGIE ADOTTATE PER AUMENTARE L'EFFICACIA DEI CONTROLLI UFFICIALI

Oltre al valore aggiunto rappresentato dalle tecniche innovative menzionate nel paragrafo precedente, un'esperienza condotta in un'ASL del Piemonte ha dimostrato come l'a-

dozione di semplici provvedimenti sia in grado di incrementare in modo significativo l'efficacia dei controlli ufficiali eseguiti secondo le metodiche previste dal PNR. In un quadro di positività diffuse, evidenziate dal riscontro di numerosi casi di atrofia timica negli animali macellati, e in un contesto in cui la maggior parte degli allevatori onesti invocava l'intervento degli organi di controllo, è stata definita una serie di procedure nel tentativo di aumentare l'incisività delle indagini. Il piano in questione è stato articolato nelle seguenti azioni:

- costituzione di un gruppo di lavoro formato da Medici Veterinari ufficiali delle Strutture Complesse Servizi Veterinari area "B" e area "C", tutti rivestenti la qualifica di Ufficiali di Polizia Giudiziaria, e programmazione annuale delle strategie di controllo per l'attuazione del PNR, in relazione alla valutazione del rischio negli allevamenti e in base a precisi riscontri anatomico-patologici al macello;
- comunicazione immediata ed in forma strettamente riservata delle informazioni tra il personale appartenente al suddetto gruppo;
- applicazione rigorosa delle procedure previste dalla Circolare 14/2000 "Linee guida applicative del D.Lvo 4 agosto 1999 n° 336", in vigore per quanto non modificato dal D.Lvo 16 marzo 2006 n° 158, che prevedono, in caso di riscontro di positività al primo screening di un controllo ufficiale, il campionamento ufficiale immediato presso gli allevamenti sospetti e tutti gli allevamenti ad esso collegati;
- utilizzazione puntuale delle buone pratiche di campionamento, e applicazione delle sanzioni amministrative e della segnalazione di notizia di reato come richiesto dalle procedure operative regionali;
- segnalazione contestuale dei casi di positività alla banca dati e all'Organismo Regionale competente, al fine di sospendere le erogazioni dei finanziamenti comunitari agli allevatori scorretti;
- collaborazione stretta e costante con la Procura della Repubblica competente, attraverso la trasmissione di relazioni puntuali e scientificamente documentate in caso di riscontro di positività e all'atto della comunicazione della notizia di reato; in particolare, è risultato essenziale informare correttamente i Magistrati, particolarmente quelli non esperti del settore del doping animale, contestando la natura penale del fatto, in contrapposizione all'evidente interesse degli avvocati difensori a minimizzare il rischio per la salute pubblica;
- impiego dei media e di comunicati agli allevatori per informare e prevenire l'utilizzo di trattamenti illeciti, rendendo note le pesanti sanzioni amministrative e penali in cui incorrono in caso di riscontro di pratiche illecite;
- informazione dei consumatori riguardo l'efficacia delle azioni intraprese, rassicurando e tutelando inoltre i molti allevatori onesti.

L'attuazione di tale programma ha permesso di rilevare, in un periodo di 20 mesi tra il 2006 e il 2007, 30 casi confermati di positività al DEX, con conseguenti sanzioni amministrative e condanne penali. L'efficacia della nuova strategia adottata per contrastare l'impiego illecito è stata, inoltre, confermata dai dati raccolti durante gli ultimi due anni, durante i quali, pur applicando le stesse procedure, non sono stati segnalati ulteriori casi di positività.

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Nel nostro ed in altri Paesi Europei l'impiego di bassi dosaggi di cortisonici nei vitelli a carne bianca e nei vitelloni costituisce senza dubbio uno dei più diffusi trattamenti illeciti, anche in relazione alla non sempre efficace azione di contrasto da parte degli Organi di controllo, nonostante alcuni lodevoli esempi menzionati nel presente lavoro. Questa situazione ha attirato l'attenzione di alcuni ricercatori - soprattutto italiani - che hanno condotto numerose indagini sperimentali ed in campo volte all'applicazione di tecniche alternative ed innovative, basate sul meccanismo d'azione di tali ormoni, allo scopo di individuare affidabili biomarcatori di esposizione. Oltre all'esame istologico del timo, già attuato in via sperimentale nell'ambito del PNR, sono stati proposti nuovi biomarcatori in ambito epatico, la specificità dei quali è ancora tuttavia in corso di accertamento. Di grande prospettiva, anche in rapporto ad un prevedibile incremento delle importazioni di mezzene e carni sezionate in un prossimo futuro, sono le tecniche NIR e l'individuazione di un "pacchetto" di geni la cui espressione muscolare risulta essere incrementata o diminuita dal trattamento con i glicocorticoidi. In considerazione della natura di tale matrice e della possibilità di un campionamento anche a notevole distanza di tempo dalla macellazione, saranno cruciali, ai fini pratici, gli studi intesi a determinare l'utilizzabilità del campione per le suddette indagini.

Particolarmente interessanti appaiono, infine, le tecniche in grado di emettere un sospetto di trattamento nell'animale in allevamento, come la determinazione dei livelli di cortisolo sierico, del rapporto urinario 6β -idrossicortisolo/cortisolo e della sotto-regolazione dei GR nei linfociti circolanti. Sotto questo aspetto, il nostro gruppo di ricerca sta ultimando indagini di proteomica e di genomica su siero e su elementi figurati del sangue di bovini trattati con DEX e altri glicocorticoidi, allo scopo di ampliare il ventaglio dei possibili biomarcatori di esposizione a tali farmaci.

Naturalmente, per quanto specifico possa risultare, un biomarcatore non potrà mai *sostituire* le metodiche previste nell'ambito dei controlli ufficiali, ma potrà fornire un utile ausilio in sede di screening, in modo da orientare le indagini di conferma. A tale proposito è bene ricordare come l'impiego di test di screening basati sull'azione biologica delle molecole in questione è stato ufficialmente riconosciuto dalla Comunità Europea per la ricerca dei PCB e dei composti diossino-simili (Regolamento (CE) n. 1883/2006). È inoltre importante sottolineare come, a nostro avviso, la disponibilità di biomarcatori affidabili possa costituire un importante strumento per le associazioni di allevatori e produttori e le grandi catene di distribuzione, al fine di mantenere un elevato standard di qualità e sicurezza della filiera animale.

Quale che sia la natura, ogni biomarcatore dovrà subire un opportuno processo di validazione che metta in evidenza eventuali variazioni legate al fotoperiodo, alla dieta, al sesso - ivi compresi i cicli sessuali nelle femmine -, a stati fisiopatologici ed alla somministrazione di altri principi attivi, leciti e non. Di non secondaria importanza, ai fini dell'applicazione pratica su vasta scala, infine, dovranno essere le considerazioni relative ad un tangibile vantaggio rispetto ai metodi di screening tradizionali in termini di sensibilità, costo, semplicità e rapidità di esecuzione.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori desiderano ringraziare Mario Botta, Gianluca Orecchia e Federico Monti per la preziosa collaborazione prestata nel corso delle ricerche eseguite in campo. Il presente lavoro è stato in parte finanziato dal fondo Regione Piemonte - CIPE 2004, "Individuazione di biomarcatori dei trattamenti illeciti nei bovini da carne con indagini di proteomica e genomica".

■ Illicit use of dexamethasone in meat cattle: rationale, effects on treated animals, and traditional and innovative diagnostic techniques

SUMMARY

The illegal use of synthetic corticosteroids (especially dexamethasone) for growth-promoting purposes is a relatively common practice in meat cattle breeding. These drugs, administered alone or in combination with other substances (i.e. steroid hormones and β -agonists), are able to improve the productive performances of animals with several advantages for the farmers. Since the residues of glucocorticoids in the foodstuffs are dangerous for human health, very low Maximum Residue Limits in the bovine edible tissues have been set. However, the current strategies of illicit treatments are based on the application of low dosages and routes of administration (e.g. the oral one) that help in eluding the official controls performed according to the National Residue Monitoring Plans.

The aim of this review is to describe the chemical and pharmacological characteristics of synthetic corticosteroids that give reason for their illicit use, and to illustrate the conventional diagnostic techniques employed to reveal their misuse in meat cattle breeding. Moreover, some new methodologies, recently developed to support the traditional analysis, will be discussed.

KEY WORDS

Dexamethasone, meat cattle, illicit treatments, diagnostic techniques.

Bibliografia

- Nebbia C. Corticosteroidi. (2009) In: Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali, Ed. Nebbia C., 285-295, EdISES, Napoli.
- Connolly L., Cai K., Van der Heiden E., Scippo M.L., Muller M., Tarbin J., Elliott C. (2009). Detection of glucocorticoid bioactivity in bovine urine samples using a reporter gene assay. *Analytica Chimica Acta*, 637: 321-327.
- Mooney M.H., Bergwerff A.A., van Meeuwen J.A., Luppá P.B., Elliott C.T. (2009). Biosensor-based detection of reduced sex hormone-binding globulin binding capacities in response to growth-promoter administrations. *Analytica Chimica Acta*, 637: 235-240.
- Mooney M.H., Le Bizec B., Elliott C.T., (2009) Combining biomarker screening and mass-spectrometric analysis to detect hormone abuse in cattle. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 28: 665-675.
- Nebbia C., Urbani A., Carletti M., Gardini G., Balbo A., Bertarelli D., Girolami F. (in corso di pubblicazione) Novel strategies for tracing the exposure of meat cattle to illegal growth-promoters. *The Veterinary Journal*.
- Greco D., Stabenfeldt G.H. (2002) Endocrinology. In: Textbook of Veterinary Physiology, Ed. Cunningham J.G., 3rd ed., 323-372, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
- Badino P., Re G. (2009) Glicocorticoidi. In: *Farmacologia Veterinaria*, Ed. Carli S., Ormas P., Re G., Soldani G., 651-663, IDELSON-GNOC-CHI, Napoli.
- Ferguson D.C., Hoenig M. (1995) Glucocorticoids, mineralocorticoids and steroid synthesis inhibitors. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ed. Adams H.R., 7th ed., 622-637, Iowa State University Press, Ames, IA.
- Tainturier D., Alvinerie M., Brandon R., Toutain P. (1982) Dexamethasone concentrations in bovine blood plasma and milk after intravenous injection. *Journal of Dairy Science*, 65: 1921-1924.
- Toutain P., Brandon R., Alvinerie M., Garcia-Villar R., Ruckebusch Y. (1982) Dexamethasone in cattle: pharmacokinetics and action on the adrenal gland. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 5: 33-43.
- Gaignage P., Lognag G., Bosson D., Vertongen D., Dreze P., Marlier M., Severin M. (1991) Dexamethasone bovine pharmacokinetics. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 16: 219-221.
- Antignac J.P., Le Bizec B., Monteau F., Andre F. (2002) Study of natural and artificial corticosteroid phase II metabolites in bovine urine using HPLC-MS/MS. *Steroids*, 67: 873-882.
- Vincenti M., Girolami F., Capra P., Pazzi M., Carletti M., Gardini G., Nebbia C. (2009) Study of dexamethasone urinary excretion profile in cattle by LC-MS/MS: comparison between therapeutic and growth-promoting administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1299-1306.
- Bagnati R., Ramazza V., Zucchi M., Simonella A., Leone F., Bellini A., Fanelli R. (1996) Analysis of dexamethasone and betamethasone in bovine urine by purification with an "on-line" immunoaffinity chromatography high-performance liquid chromatography system and determination by gas chromatography mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 235: 119-126.
- Calvareso S., Rubini P., Urbani G., Ferri N., Ramazza V., Zucchi M. (1994) Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *Analyst*, 119: 2611-2615.
- Courtheyn D., Vercammen J., De Brabander H., Vandenreyt I., Batjoens P., Vanoosthuyze K., Van Peteghem C. (1994) Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry. *Analyst*, 119: 2557-2564.
- http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf.
- Corah T., Tatum J., Morgan J., Mortimer R., Smith G. (1995) Effects of a dexamethasone implant on deposition of intramuscular fat in genetically identical cattle. *Journal of Animal Science*, 73: 3310-3316.
- Tarantola M., Schiavone A., Preziuso G., Russo C., Biolatti B., Bergero D. (2004) Effects of low doses of dexamethasone on productive traits and meat quality of veal calves. *Animal Science*, 79: 93-98.
- Gottardo F., Brscic M., Pozza G., Ossensi C., Contiero B., Marin A., Cozzi G. (2008) Administration of dexamethasone per os in finishing bulls. I. Effects on productive traits, meat quality and cattle behaviour as indicator of welfare. *Animal* 2: 1073-1079.
- Giorgino F., Smith R. (1995) Dexamethasone enhances insulin-like growth factor-I effects on skeletal muscle cell proliferation. Role of specific intracellular signaling pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1473-1483.
- Carraro L., Ferrareso S., Cardazzo B., Romualdi C., Montesissa C., Gottardo F., Patarnello T., Castagnaro M., Bargelloni L. (2009) Expression profiling of skeletal muscle in young bulls treated with steroidal growth promoters. *Physiological Genomics*, 38: 138-148.
- Abraham G., Gottschalk J., Ungemach F.R. (2004) Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-2-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology*, 72: 196-204.
- Odore R., Badino P., Barbero R., Cuniberti B., Pagliasso S., Girardi C., Re G. (2007) Regulation of tissue beta-adrenergic, glucocorticoid and androgen receptors induced by repeated exposure to growth promoters in male veal calves. *Research in Veterinary Science*, 83: 227-233.
- Biolatti B. (2009) Lesioni indotte dai promotori di crescita illeciti negli animali da carne. In: Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali, Ed. Nebbia C., 321-353, EdISES, Napoli.
- Antignac J.P., Le Bizec B., Monteau F., Poulain F., Andre F. (2001) Multi-residue extraction-purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 757: 11-19.
- Van den Hauwe O., Schneider M., Sahin A., Van Peteghem C.H., Naegeli H. (2003) Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids dexamethasone and flumethasone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 326-330.

28. <http://www.regione.veneto.it/NR/rdonlyres/86D888AC-88B6-4AF1-998B-6C04A8480592/0/PNR2008>.
29. Biolatti B., Bollo E., Cannizzo F.T., Zancanaro G., Tarantola M., Dacasto M., Cantiello M., Carletti M., Biolatti P.G., Barbarino G. (2005) Effects of low-dose dexamethasone on thymus morphology and immunological parameters in veal calves. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine*, 52: 202-208.
30. Cannizzo F.T., Miniscalco B., Riondato F., Bollo E., Barbarino G., Giorgi P., Mazzini C., Biolatti B. (2008) Effects of anabolic and therapeutic doses of dexamethasone on thymus morphology and apoptosis in veal calves. *Veterinary Record*, 163: 448-452.
31. Vascellari M., Pozza G., Poppi L., Capello K., Angeletti R., Ravarotto L., Andrighetto I., Mutinelli F. (2008) Evaluation of indirect biomarkers for detecting corticosteroids used as illegal growth promoters in beef cattle. *Veterinary Record*, 163: 147-152.
32. Nebbia C. (2001) Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Veterinary Journal*, 161: 238-352.
33. Burk O., Wojnowski L. (2004) Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369: 105-124.
34. Cantiello M., Giantin M., Carletti M., Lopparelli R.M., Capolongo F., Lasserre F., Bollo E., Nebbia C., Martin P.G., Pineau T., Dacasto M. (2009) Effects of dexamethasone, administered for growth promoting purposes, upon the hepatic cytochrome P450 3A expression in the veal calf. *Biochemical Pharmacology*, 77: 451-463.
35. Giantin M., Lopparelli R.M., Zancanella V., Martin P.G., Polizzi A., Gallina G., Gottardo F., Montesissa C., Ravarotto L., Pineau T., Dacasto M. (2010) Effects of illicit dexamethasone upon hepatic drug metabolizing enzymes and related transcription factors mRNAs and their potential use as biomarkers in cattle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1342-1349.
36. Zhang K., Kuroha M., Shibata Y., Kokue E., Shimoda M. (2006) Effect of oral administration of clinically relevant doses of dexamethasone on regulation of cytochrome P450 subfamilies in hepatic microsomes from dogs and rats. *American Journal of Veterinary Research*, 67: 329-334.
37. Zancanella V., Lopparelli R.M., Montesissa C., Ravarotto L., Giantin M., Dacasto M. (2009) Effects of illicit dexamethasone and 17 beta-oestradiol on the expression of hepatic and testicular bovine responsive genes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32: 119-120.
38. Marin A., Pozza G., Gottardo F., Moro L., Stefani A.L., Cozzi G., Brscic M., Andrighetto I., Ravarotto L. (2008) Administration of dexamethasone per os in finishing bulls. II. Effects on blood parameters used as indicators of animal welfare. *Animal*, 2: 1080-1086.
39. Capolongo F., Tapparo M., Merlanti R., Ravarotto L., Tealdo E., Gallina G., Montesissa C., Dacasto M. (2007) Illicit treatments in cattle and urinary 6beta-hydroxycortisol/cortisol ratio. *Analytica Chimica Acta*, 586: 228-232.
40. Galteau M.M., Shamsa F. (2003) Urinary 6 beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 59: 713-733.
41. Furuta T., Suzuki A., Mori C., Shibasaki H., Yokokawa A., Kasuya Y. (2003) Evidence for the validity of cortisol 6 beta-hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 31: 1283-1287.
42. Jantzen H.M., Strähle U., Gloss B., Stewart F., Schmid W., Boshart M., Miksicek R., Schütz G. (1987) Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell*, 49: 29-38.
43. Bette P., Kietzmann M. (1991) Effect of dexamethasone on tyrosine aminotransferase activity in rat liver - A sensitive test to define its hormonal no-effect level. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 87: 200-202.
44. Schaaf M.J., Cidlowski J.A. (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83: 37-48.
45. Bertarelli D., Balbo A., Girolami F., Carletti M., Gardini G., Dacasto M., Biolatti B., Nebbia C. (2009) Is liver tyrosine aminotransferase a good marker of dexamethasone misuse in finishing bulls? *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32: 201.
46. Odore R., Badino P., Pagliasso S., Nebbia C., Cuniberti B., Barbero R., Re G. (2006) Changes in lymphocyte glucocorticoid and beta-adrenergic receptors in veal calves treated with clenbuterol and steroid hormones for growth-promoting purposes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 91-97.
47. Schlechte J.A., Ginsberg B.H., Sherman B.M. (1982) Regulation of the glucocorticoid receptor in human lymphocytes. *Journal of Steroid Biochemistry*, 16: 69-74.
48. Gardini G., Del Boccio P., Colombatto S., Testore G., Corpillo D., Di Ilio C., Urbani A., Nebbia C. (2006) Proteomic investigation in the detection of the illicit treatment of calves with growth-promoting agents. *Proteomics*, 6: 2813-2822.
49. Nebbia C., Della Donna L., Carletti M., Balbo A., Barbarino G., Gardini G. (2008) Use of hepatic protein biomarkers for tracing the exposure of veal calves to illegal growth-promoters: investigations on experimental samples and preliminary application under field conditions. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31: 272-275.
50. Berzaghi P., Segato S., Cozzi G., Andrighetto I. (2006) Mid and near infrared spectroscopy to identify illegal treatments in beef cattle. *Veterinary Research Communications*, 30: 109-112.
51. Masoero G., Sala G., Gardini G., Carletti M., Balbo A., Girolami F., Nebbia C., Barbera S., Tarantola M. (2008) Impiego della spettroscopia NIR per l'individuazione di trattamenti illeciti con corticosteroidi nel bovino da carne. *NIR ITALIA '08. Lazise (VR)*.



AnmviOggi è il quotidiano on-line di informazione professionale dell'ANMVI. Il primo e unico quotidiano di informazione professionale via internet che ogni giorno pubblica notizie sui maggiori fatti di interesse per la Professione Veterinaria. AnmviOggi viene inviato gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'Anmvi, a chi ne fa richiesta ed è disponibile sul sito www.anmvioggi.it

Vet Journal pubblica notizie e reportage di tutti i più importanti eventi nazionali ed internazionali e fornisce una informazione scientifica rigorosa sul mondo della medicina veterinaria e delle bioscienze in generale. Fornisce dal 2004 un servizio di traduzione in italiano degli abstract dei più importanti lavori della letteratura scientifica internazionale. La newsletter di Vet Journal viene inviata gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'ANMVI, a chi ne fa richiesta il lunedì, il mercoledì e il venerdì ed è disponibile sul sito www.evsl.it/vet.journal/



Chi non li ricevesse ed è interessato ne può far richiesta per e-mail alle redazioni: anmvioggi@anmvi.it efebbo@scivac.it