

Residui di etilenbisditiocarbamati in tiroidi di bovini

Carlo Nebbia⁽¹⁾ - Enrico Ferrero⁽¹⁾ - Bartolomeo Biolatti⁽¹⁾ - Uberto Pozzali⁽²⁾

Premesse

Gli etilenbisditiocarbamati (EBDC) sono fra i composti più usati in agricoltura nel nostro paese per il controllo di una vasta serie di malattie fungine.

Dal punto di vista chimico, sono sali dell'acido etilenbisditiocarbamico con vari metalli quali, ad esempio, lo zinco (Zineb), il sodio (Nabam), il manganese (Maneb), lo zinco ed il manganese (Mancozeb) e così via.

Pur trattandosi di fungicidi sintetizzati già da parecchi anni, fattori quali il costo relativamente ridotto, l'ampio spettro di azione e soprattutto la possibilità di impiego con mezzi aerei, hanno determinato un crescente e duraturo successo degli EBDC sul mercato.

Secondo dati ISTAT (1985) il consumo annuo degli EBDC come tali od in associazione a composti del rame od al solfo ammonta a circa 30000 tonnellate. Inoltre, sia pure limitatamente ad alcune colture frutticole, si è registrata la tendenza ad aumentare il numero dei trattamenti fino a venti per anno (Zanini e Cignetti, 1983). Poiché l'emivita della maggior parte degli EBDC sui vegetali e nel terreno è compresa tra le due e le tre settimane (Nash e Beall, 1980), tali composti possono essere ragionevolmente considerati quali inquinanti ambientali. Ciò assume una particolare importanza soprattutto in alcune regioni del Nord Italia, fra le quali il Piemonte, dove l'attività zootecnica è prevalentemente praticata nel contesto di un'agricoltura intensiva.

La contaminazione dei vegetali destinati all'alimentazione animale era già stata ipotizzata in un precedente lavoro (Gennaro Soffietti e coll., 1981) nel quale residui di EBDC erano stati rinvenuti in feti bovini abortiti.

In riferimento a tali considerazioni abbiamo ritenuto utile estendere le nostre ricerche ai bovini adulti. Il presente studio ha riguardato la tiroide in quanto tale ghiandola rappresenta nel bovino uno dei principali organi bersaglio degli EBDC e ne costituisce una delle più importanti sedi di accumulo (Gennaro Soffietti e coll., 1988).

Metodologia

Lo studio è stato condotto su 104 vitelloni e su 104 vacche regolarmente macellati in mattatoi pubblici e privati delle provincie di Torino e Cuneo, e provenienti da zone a prevalente agricoltura intensiva.

Le ghiandole sono state prelevate immediatamente

⁽¹⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Via Nizza 52 - 10126 Torino.

⁽²⁾ Veterinario U.S.S.L. 28, Settimo T.se (TO).

dopo la iugulazione, poste a temperatura di refrigerazione e trasportate in laboratorio dove venivano toelettate, pesate e suddivise in due porzioni. Una parte veniva subito congelata a -20°C per le successive determinazioni analitiche mentre la restante veniva fissata in formalina al 10% e destinata alle indagini istopatologiche secondo tecniche routinarie.

I residui di EBDC sono stati determinati secondo la metodica di Cullen (1964) modificata da Keppel (1971) basata sulla valutazione del solfuro di carbonio svolto in ambiente acido a caldo. I risultati sono stati espressi come µg di CS₂/g di tessuto.

Le indagini analitiche sono state eseguite sulla totalità dei vitelloni e su 37 delle 104 vacche prese in esame.

Tab. 1 - Vitelloni: rapporto fra peso della tiroide, concentrazione di residui di EBDC espressi come µg CS₂/g di tessuto e lesioni istologiche. * Esame istologico non eseguito.

Peso tiroide grammi	µg CS ₂ /g tessuto	Stato di riposo funzionale	Struma parenchimatosa	Struma colloide o cistico	Adenomatosi interfol.
20	18.5	-	++	-	-
25	3.8	+	-	-	+
32	6.5	-	-	+	-
34	2.9	-	-	+/-	-
74	7.9	-	+/-	-	+
76*	0.5	-	-	-	-
83	1.5	-	-	+/-	-
85*	7.1	-	-	-	-
90	3.4	-	-	+	-
99	0.7	+	-	-	-
102	1.2	+	-	-	-
105	1.9	-	++	-	-
121	0.3	-	++	-	+
137	0.4	-	-	++	+/-
153	2.8	-	-	++	+/-

Tab. 2 - Vacche: rapporto fra peso della tiroide, concentrazione di residui di EBDC espressi come µg CS₂/g di tessuto e lesioni istologiche.

Peso tiroide grammi	µg CS ₂ /g tessuto	Stato di riposo funzionale	Struma parenchimatosa	Struma colloide o cistico	Adenomatosi interfol.
37	1.3	+	-	-	-
39	8.6	-	++	-	-
39	4.8	-	-	+/-	-
42	2.4	-	-	++	-
44	0.8	-	-	+/-	-
46	0.9	-	++	-	-

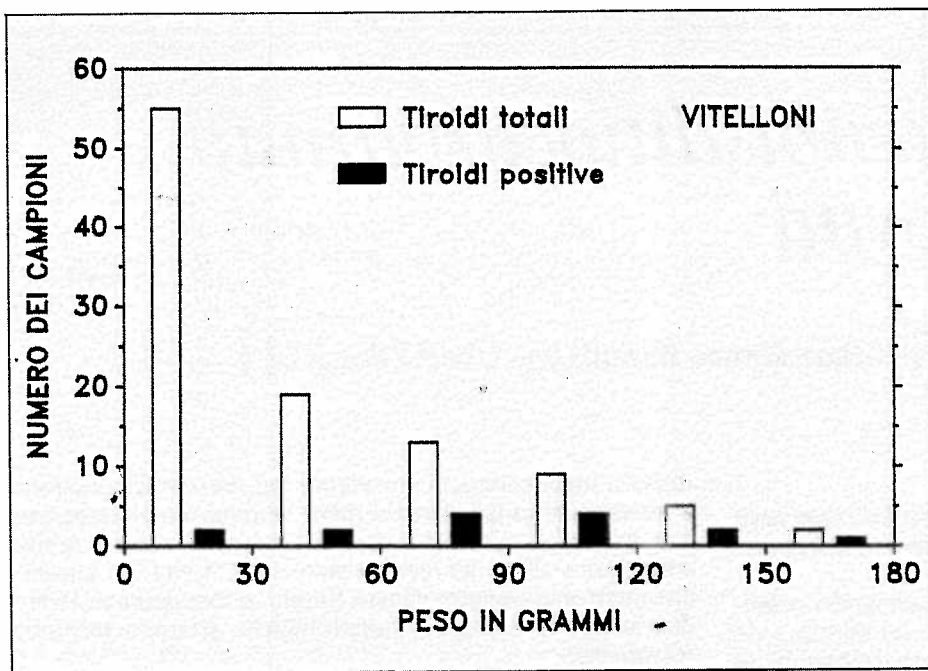


Fig. 1 - Vitelloni: suddivisione delle 104 tiroidi totali esaminate e delle 15 tiroidi positive agli EBDC in rapporto al peso.

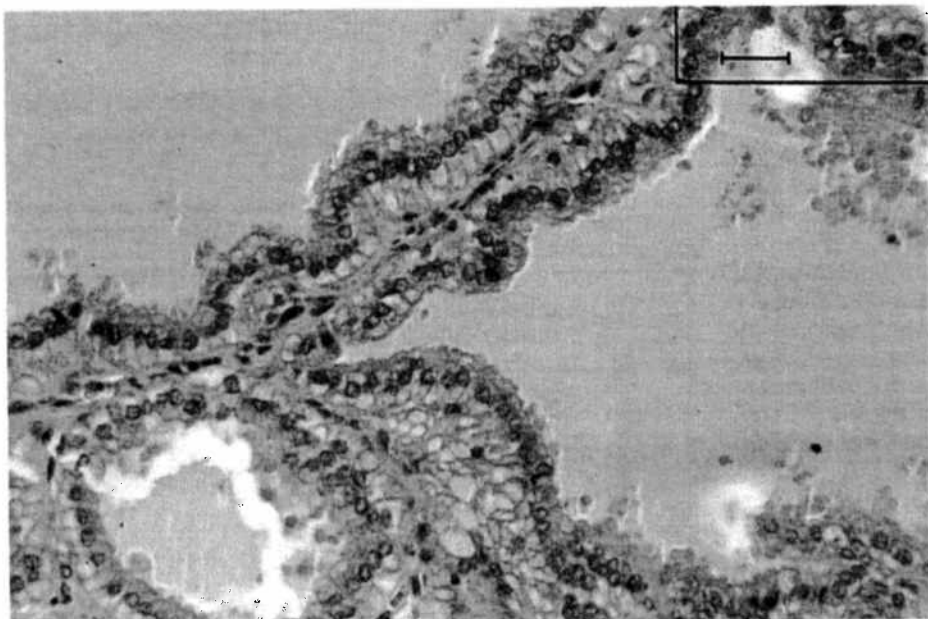


Fig. 2 - Tiroide di vitellone: struma parenchimatosa con iperplasia dell'epitelio follicolare che forma cuscinetti protudenti nel lume (E.E.; barra = 100 µm).

Risultati

Per quanto concerne il peso della tiroide, nei vitelloni quasi la metà dei campioni è risultata superiore a 30 grammi (Fig. 1). La maggioranza delle 15 tiroidi positive (pari al 14,42% del totale) ha ampiamente superato tale peso (Fig. 1 e Tab. 1). Esaminando la Tabella 1 è inoltre possibile osservare nelle tiroidi risultate positive all'analisi chimica la mancanza di un rapporto tra contenuto di CS_2/g di tessuto e peso delle ghiandole.

L'esame istopatologico delle tiroidi positive (Tab. 1) ha permesso di rilevare come la quasi totalità delle ghiandole presenti lesioni variabili dal semplice aspetto di riposo funzionale con macrofollicoli ed epitelio ghiandolare ap-

piattito, allo struma parenchimatosa (Fig. 2) di vario grado, spesso associato ad adenomatosi interfollicolare. In qualche caso si potevano osservare quadri misti di struma colloidocistico (Fig. 3). Non sembrano peraltro sussistere correlazioni significative fra quantità di CS_2 , natura e gravità delle lesioni riscontrate (Tab. 1).

Per quanto riguarda le vacche, i campioni sono risultati ripartiti in due sole classi di peso (Fig. 4): poco meno di due terzi dei campioni (64,42%) hanno fatto registrare un peso inferiore ai 30 grammi, mentre il resto era compreso fra i 30 ed i 60 grammi. Sulla base di quanto osservato nei vitelloni, la ricerca degli EBDC è stata eseguita soltanto sulle ghiandole appartenenti a quest'ultima classe di peso. Sei delle 37 tiroidi (pari al 16,21%) sono risultate positive ed hanno presentato alterazioni istologiche riconducibili soprattutto allo struma colloidocistico (Tab. 2). Analogamente a quanto riscontrato nei vitelloni, non sembrano infine sussistere relazioni fra peso della ghiandola, quantità di CS_2/g di tessuto, natura e gravità delle lesioni istologiche.

Discussione

I risultati della nostra indagine, ancorché riferibili ad un campione di animali piuttosto limitato, indicano chiaramente che gli EBDC sono in grado di pervenire ai bovini verosimilmente attraverso la contaminazione dei foraggi e dei vegetali usati per la preparazione degli alimenti destinati al bestiame. Tale ipotesi è convalidata dalle ricerche di Zanini (1979) che ha determinato residui significativi di tali fungicidi in colture foraggere (avena, prato stabile, frumento, mais) limitrofe a frutteti situati nella Provincia di Cuneo. Inoltre, l'analisi di foraggi prelevati a circa 10 metri di distanza dai filari esterni di pioppeti siti nella provincia di Torino e trattati con Mancozeb ha evidenziato la presenza di residui in circa 2/3 dei campioni, con valori massimi di 84 ppm (Gennari, dati non pubblicati).

Numerose indagini sperimentali hanno dimostrato che gli EBDC svolgono un'azione negativa sulla funzionalità tiroidea in varie specie di mammiferi ed uccelli che si traduce in ipertrofia talvolta marcata della ghiandola (Gennaro Soffietti e Nebbia, 1984). Ricerche condotte da Vos e coll. (1982) e da Pochard (1983) allo scopo di individuare metodi rapidi per diagnosticare l'uso di tireostatici a scopo fraudolento, hanno stabilito che il peso normale della tiroide di un bovino adulto si aggira sui 25-30 grammi mentre un peso uguale o superiore ai 60 grammi è indice di manifesta ipertrofia. Tali classi di peso possono

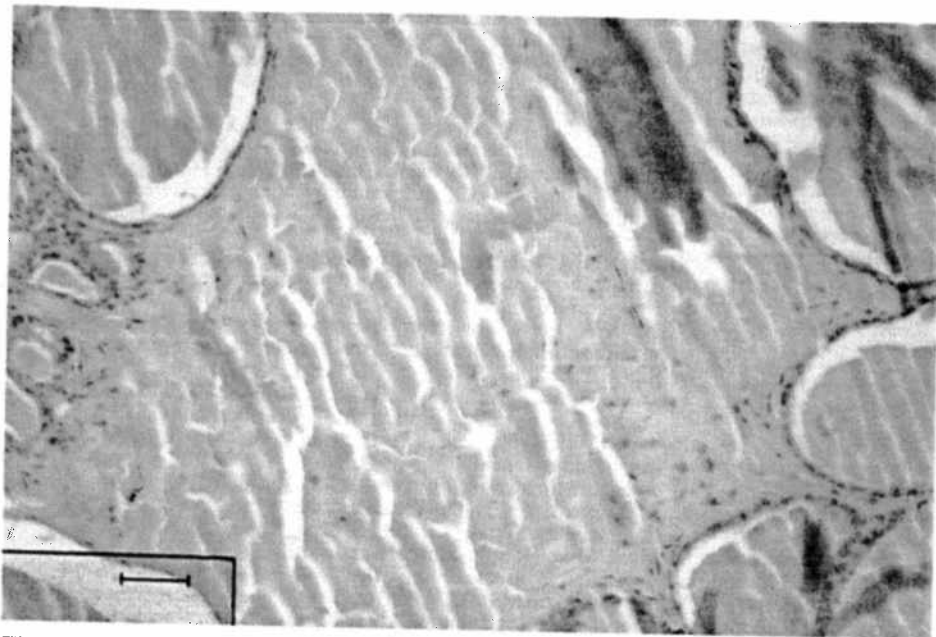


Fig. 3 - Tiroide di vitellone: struma colloidocistico, rottura dei follicoli con dispersione della sostanza colloidale nell'interstizio (E.E., barra = 200 μ m).

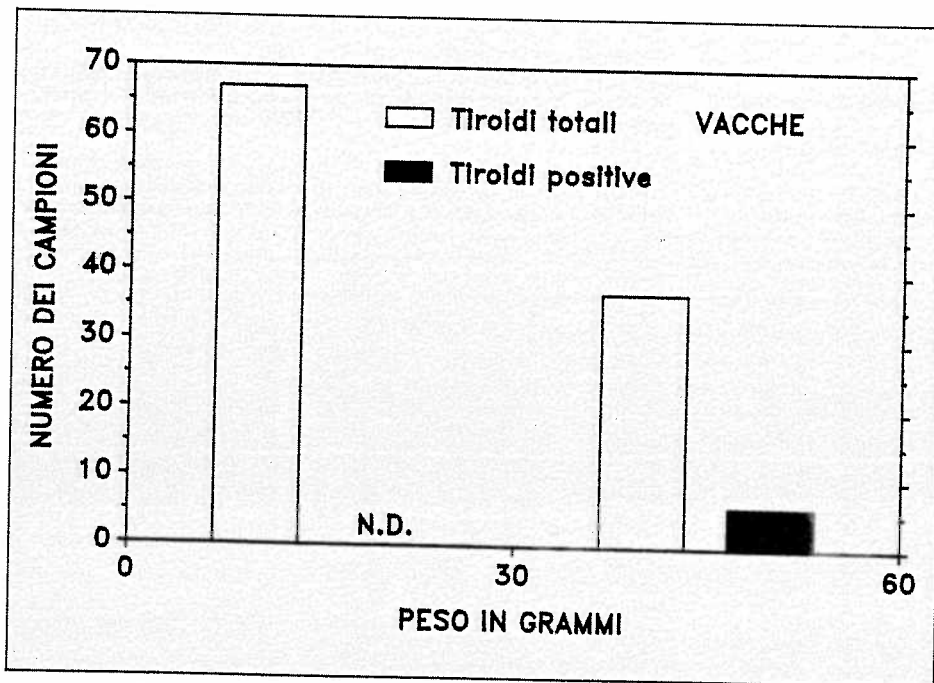


Fig. 4 - Vacche: suddivisione delle 104 tiroidi totali esaminate e delle 6 tiroidi positive agli EBDC in rapporto al peso. Le indagini analitiche sono state condotte unicamente sulle 37 tiroidi di peso superiore a 30 grammi. N.D. = non determinato.

sostanzialmente essere applicate anche ai fungicidi oggetto del nostro studio poiché nei vitelloni, dei quali tutte le tiroidi sono state analizzate, soltanto 2 delle 15 ghiandole positive avevano un peso inferiore a 30 grammi.

Per quanto riguarda la specie bovina, inoltre, la somministrazione sperimentale di etilenbisditiocarbamato di zinco (Zineb) in ragione di 40 mg/kg/giorno ha determinato l'aumento del peso della tiroide fino ad una media di $53,2 \pm 18,6$ grammi (Gennaro Soffietti e coll., 1988). Tali valori sono stati ampiamente superati in oltre il 50% delle ghiandole positive nei vitelloni. Le ragioni di questa discrepanza possono essere molteplici, in quanto molte sostanze assunte con la razione, quali ad esempio i tiocianati

ed i nitrati, possono esercitare un'azione antitiroidea (Nebbia, 1984). Non è inoltre escluso che molecole ad azione tireostatica come i derivati tiouracilici possano essere state somministrate a scopo fraudolento particolarmente ai vitelloni. In entrambi i casi, l'esposizione agli EBDC potrebbe aver determinato un sinergismo d'azione fra i vari principi antitiroidei giustificando, fra l'altro, la mancanza di correlazione fra natura e gravità delle alterazioni istologiche e quantità di CS_2 rilevata a livello tiroideo.

L'elevata variabilità presentata da quest'ultimo parametro, oltre che dipendere da ovvie differenze individuali legate ad intensità e durata dell'esposizione potrebbe anche essere in rapporto alle trasformazioni metaboliche degli EBDC. Recenti studi hanno evidenziato come anche la specie bovina sia in grado di trasformare lo Zineb in etilentiourea (Ferrerio e coll., in corso di stampa), metabolita che, oltre a conservare le proprietà tireostatiche dei composti originari, è caratterizzato da un'attività mutagena, teratogena e cancerogena (Khera, 1987).

Conclusioni

I risultati della nostra indagine rappresentano un'ulteriore testimonianza del livello di inquinamento ambientale raggiunto dai fungicidi etilenbisditiocarbamici e dimostrano come, nella maggior parte dei casi osservati, la positività agli EBDC si accompagni a lesioni istologiche indici di ridotta funzionalità tiroidea. È bene ricordare che nei bovini l'ipotiroidismo può essere causa, fra l'altro, di disturbi della fertilità quali irregolarità estrali, ritenzione placentare e aborto (Fondeur e coll., 1982).

Il riscontro di una non trascurabile percentuale di tiroidi positive agli EBDC solleva infine il problema della possibile presenza di residui di tali fungicidi nelle carni e nei visceri degli animali da macello, matrici per le quali il limite massimo previsto dalla legislazione italiana è di sole 0,2 ppm (O.M. 6/6/85). I dati esistenti in letteratura, anche se non riferiti espressamente alla specie bovina, indicano che l'assorbimento gastro-enterico degli EBDC nei mammiferi è piuttosto ridotto (Searle e coll., 1987). Tuttavia, in alcune aree caratterizzate da intensa frutticoltura, viticoltura e pioppicoltura, la presenza di residui di EBDC nei prodotti di origine animale potrebbe, a nostro avviso, rappresentare un'ipotesi tutt'altro che remota che ci proponiamo di verificare attraverso ulteriori indagini in campo.

RIASSUNTO

Le tiroidi di 104 vitelloni e di 37 vacche prelevate in vari macelli delle provincie di Torino e di Cuneo sono state sottoposte ad indagini analitiche allo scopo di evidenziare la presenza di residui di fungicidi etilenbisditiocarbamici (EBDC). Nella maggioranza delle 21 ghiandole positive agli EBDC sono state riscontrate alterazioni istologiche variabili dallo struma parenchimoso di diversa gravità a quello colloidocistico. Considerando il largo impiego degli EBDC in agricoltura, la ricerca dei residui a livello tiroideo può pertanto rappresentare un importante elemento di monitoraggio dell'inquinamento ambientale da tali fitofarmaci.

Parole chiave: bovino, tiroide, residui, fitofarmaci, etilenbisditiocarbamati, inquinamento ambientale.

SUMMARY

ETHYLENEBISDITHIOCARBAMATE RESIDUES IN THYROIDS FROM FATTENING BULLS AND COWS

Thyroid glands from 104 fattening bulls and 37 cows were collected in different slaughterhouses in the provinces of Turin and Cuneo and analyzed for ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) residues by a spectrophotometric method. The majority of the 21 positive glands showed histological alterations ranging from hyperplastic struma of various degree to colloid-cystic struma. Owing to the extensive use of EBDC as fungicides in agricultural practice, the detection of EBDC residues in thyroid gland may represent a tool in monitoring the environmental pollution brought about by these compounds.

Key words: cattle, thyroid, residues, pesticides, ethylenebisdithiocarbamates, environmental pollution.

BIBLIOGRAFIA

- Annuario di statistica agraria, Istituto Centrale di Statistica, Roma, 544, 1985.
- Cullen T.E. (1964) Spectrophotometric determination of dithiocarbamate residues on food crops. *Anal. Chem.*, 36, 221.
- Ferrero E., Nebbia C., Dacasto M., Topi B., Gennaro Soffietti M. (1988) Determinazione mediante HPLC dei residui di etilentiourea (imidazolidin-2-tione) in tessuti animali. In corso di stampa su: *Ann. Fac. Med. Vet. Torino*.
- Fondeur S., Michaux J.M., Ardillier B., Mouthon G. (1982) Immuno-

- enzymologie et exploration thyroïdienne chez les mammifères domestiques. *Rec. Méd. Vét.*, 158, 273.
- Gennaro Soffietti M., Nebbia C., Biolatti B., Angeletti E. (1981) Determinazione dei residui di tireostatici in tiroidi di feti bovini abortiti. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 123, 655.
- Gennaro Soffietti M., Nebbia C. (1984) Fungicidi. In: *Tossicologia Veterinaria a cura di Beretta C.*; Editoriale Grasso, Bologna, 252.
- Gennaro Soffietti M., Nebbia C., Biolatti B., Re G., Castagnaro M., Cotino F., Guarda F. (1988) Toxicology of fungicides: effects of 270 days administration of zinc ethylenebisdithiocarbamate in Friesian cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 130, 657.
- Keppel G.E. (1971) Collaborative study of the determination of dithiocarbamate residues by a modified carbon disulfide evolution method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 528.
- Khera K.S. (1987) Ethylenethiourea: a review of teratogenicity and distribution studies and an assessment of reproduction risk. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 18, 129.
- Nash R.G., Beall M.L. Jr. (1980) Fate of Maneb and Zineb fungicides in microagroecosystem chambers. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 312.
- Nebbia C. (1984) Nel dedalo dei tireostatici. *Scienza Veterinaria e Biologia Animale*, 3, 16.
- Ordinanza Ministeriale 6 giugno 1985. Quantità massime di residui delle sostanze attive dei presidi sanitari tollerate nei prodotti destinati all'alimentazione. *Suppl. Ord.*, alla G.U., n. 250 del 23/10/1985.
- Pochard M.F. (1983) *Contrôle des résidus de thyrostatiques dans la thyroïde et le muscle de bovin*. *Bull. Acad. Vét de France*, 56, 73.
- Searle A.J.F., Stewart A.C., Paul M. (1987) The measurement of ethylenethiourea and ethyleneurea in the rat and common marmoset *Callithrix jacchus* after zineb (zinc ethylenebisdithiocarbamate) dosing. *Xenobiotica*, 17, 733.
- Vos J.G., Stephany R.W., Caspers J.W., van Loon J.T.H., Metzlar J.W.H., Overhaus H.B.N. (1982) Weight increase of the thyroid gland as a tentative screening parameter to detect the illegal use of thyrostatic compounds in slaughter cattle. *Vet. Quart.*, 4, 1.
- Zanini E. (1979) Studio della contaminazione ambientale da fitofarmaci in un'area frutticola specializzata del Cuneese. *Atti del 2° Convegno sulla Patologia indotta dai Tossici Ambientali ed Occupazionali*, Parte A, 172.
- Zanini E., Cignetti A. (1983) Lo studio della diversificazione degli antiparassitari in uso in agricoltura come strumento base della prevenzione dei rischi occupazionali. II. Diffusione ed importanza relativa dei principi attivi dichiarati in uso su melo e pesco in Piemonte nel biennio 1980-1981. *Atti del 4° Convegno sulla Patologia da Tossici Ambientali ed Occupazionali*, 181.