

RENDICONTI

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



VOLUME XXV

ROMA: FONDAZIONE EMANUELE PATERNÒ
VIALE REGINA ELENA, 299 - ANNO 1962

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

DIRETTORE

GIORDANO GIACOMELLO

CAPI DEI LABORATORI E DEI SERVIZI

BIBLIOTECA: BRUNO MANZONE - *BIOLOGIA*: ANTONIO GALAMINI - *CHIMICA*:
— — - *CHIMICA BIOLOGICA*: G. B. MARINI-BETTOLO - *CHIMICA TERAPEUTICA*:
DANIELE BOVET - *ELETTRONICA*: MARCO FRANK (Inc.) - *FISICA*: MARIO AGENO
- *INGEGNERIA*: SALVATORE SALOMONE - *MICROBIOLOGIA*: GIUSEPPE PENSO -
PARASSITOLOGIA: EZIO MOSNA - *VETERINARIA*: VITTORIO MAZZARACCHIO -
SEGRETERIA DIDATTICA-MUSEO SPERIMENTALE: GIUSEPPE RUSSO - *SERVIZI*
AMMINISTRATIVI E DEL PERSONALE: ITALO DOMENICUCCI

CENTRO INTERNAZIONALE DI CHIMICA MICROBIOLOGICA: E. B. CHAIN (Inc.).

COMITATO SCIENTIFICO

GIORDANO GIACOMELLO - *Presidente*

GIUSEPPE AMANTEA - GUIDO BARGELLINI - GINO BERGAMI - GIOVAN BATTISTA
BONINO - GIUSEPPE CARONIA - GIULIO COTRONEI - PIERO DI MATTEI - BASILIO
FOCACCIA - GAETANO MARTINO - SILVIO RANZI

Rendiconti Istituto Superiore di Sanità

Dir. responsabile: DOMENICO MAROTTA

Redattore Capo: DANIELE BOVET

FOTOGRAFIE, TAVOLE, DIAGRAMMI, DISEGNI
ESEGUITI DAI FOTOGRAFI E DISEGNATORI DELL'ISTITUTO

A. PICCIRILLI - A. PACELLI

1. Gianfranco TIECCO. — Ricerca degli estrogeni sintetici negli alimenti. - Nota I. Validità dei metodi biologici di controllo.

Riassunto. --- L'A. prende in considerazione i metodi biologici per la ricerca degli estrogeni nei mangimi, dando la preferenza alla tecnica di WIBERG e coll.

I risultati ottenuti dimostrano che con tale tecnica è possibile rivelare 0,1 γ di estrogeno per grammo di mangime.

Summary. — The biological methods employed for the detection of estrogens in animal fodder are reviewed, with special emphasis on the method of WIBERG et al.

The results obtained show that with this technique the detection of 0.1 γ of estrogen per gram of fodder, is rendered possible.

La ricerca delle sostanze estrogene di sintesi può essere effettuata sfruttando uno dei metodi biologici descritti e largamente utilizzati per il rivelamento degli estrogeni naturali (¹, ⁶).

Di questi metodi tuttavia il più largamente utilizzato per la ricerca degli estrogeni di sintesi nelle derrate alimentari è quello basato sulle variazioni in peso dell'utero degli animali da esperimento, siano essi ovariectomizzati od impuberi (⁷, ¹⁴).

STOB e coll. (⁹), utilizzando topini femmine ovariectomizzate, riportano la possibilità di determinare una curva standard dose-risposta di riferimento. Tale curva è stata ottenuta in seguito ad alimentazione degli animali con miscele trattate con dietilstilbestrolo per 10 giorni consecutivi. Secondo gli A.A. questa tecnica permetterebbe di svelare fino a 0,0055 mcg/g di dieta.

UMBERGER (¹³) utilizzando topini immaturi, alimentati con mangimi contenenti varie dosi di stilbestrolo, è riuscito ad evidenziare, basandosi sulle variazioni in peso dell'utero, fino a 0,002 mcg/g di dieta.

WIBERG e coll. (¹⁴) in uno studio comparativo condotto su topine ovariectomizzate secondo la tecnica di STOB e coll. e su rattine impuberi di 22 giorni di età, sono giunti alla conclusione che le rattine impuberi rappresentano un ottimo animale test per la ricerca degli estrogeni sintetici presentando una sensibilità superiore a quella delle topine.

In seguito all'entrata in vigore della legge 3 febbraio 1961, n. 4 (G. U. n. 43, del 18 febbraio 1961) che vieta l'uso delle sostanze estrogene nei mangimi per uso zootecnico ed esclude dal commercio i prodotti

ottenuti da animali che siano stati trattati con sostanze estrogene naturali o di sintesi si è reso necessario controllare i vari metodi atti a svelare queste sostanze allo scopo di mettere a punto una tecnica di elevata sensibilità.

MATERIALI E METODI

MANGIMI PER L'ALIMENTAZIONE DEI RATTI.

Il mangime viene preparato mescolando a 2 Kg di mangime standard per ratti una quantità di estrogeno tale da ottenerne una concentrazione pari a 40 γ /g. Questo mangime, previa omogeneizzazione per un'ora in un miscelatore da laboratorio, viene utilizzato per la preparazione degli altri mangimi contenenti concentrazioni di estrogeno sempre inferiori e precisamente 20-10-5-2,5-1-0,1-0,01-0,001-0,0001 γ /g di mangime. Con i tre estrogeni in prova (stilbestrolo, esestrolo, dienestrolo) quindi vengono allestiti i 10 mangimi contenenti le dosi di estrogeno/g sopra ricordati.

I vari mangimi sono trasformati in pellets, utilizzando un piccolo apparecchio prodotto in questo Istituto. Essi prima erano posti per 24 ore in termostato a 52° C, in modo da permettere una completa disidratazione, quindi somministrati alle rattine in esperimento.

RATTINE.

Sono state impiegate per questa esperienza un totale di 180 rattine femmine di 22 g di età di razza Wistar-albino. Gli animali vengono suddivisi in 30 gruppi di 6 individui ciascuno ed a ciascun gruppo viene somministrato uno dei 30 mangimi sopra ricordati.

La tecnica seguita per il dosaggio dei tre estrogeni è la stessa di quella utilizzata da WIBERG e coll. ⁽¹⁴⁾ che consiste nell'alimentare le rattine per 8 giorni consecutivi con il mangime in prova quindi sacrificarle al 9° giorno per l'asportazione dell'utero e della vagina.

La ragione per cui si è data la preferenza alla metodica di WIBERG e coll. ⁽¹⁴⁾ nei riguardi di quella di STOB e coll. ⁽⁹⁾ è puramente pratica. Infatti, a prescindere dalle conclusioni riferite dagli A.A. sulla maggiore sensibilità del metodo, la tecnica di STOB e coll. ⁽⁹⁾ è più indaginosa. Infatti è necessario che il saggio sia preceduto di almeno 20 giorni da una ovariectomia degli animali in modo da permettere un'atrofia uterina necessaria per la esecuzione della prova.

Questo fatto, a mio modo di vedere, pregiudica l'impiego del metodo, in quanto richiede in primo luogo un intervento di non facile esecuzione ed inoltre una piccola scorta di animali precedentemente ovariectomizzati sempre a disposizione in modo da essere in grado di effettuare un controllo nel minor tempo possibile, se non si vuol far trascorrere più di un mese tra l'arrivo del prodotto in esame e la risposta.

Se si pensa che in certi casi il prodotto da esaminare può essere della carne od altre derrate alimentari di facile deterioramento si comprende come una simile procedura non sia la più idonea.

A queste osservazioni va aggiunto inoltre che i due metodi in prove preliminari in questo Laboratorio hanno fornito risultati sovrapponibili.

Altre 40 rattine della stessa razza ed età e mantenute nelle identiche condizioni di quelle utilizzate per il saggio, vengono suddivise in 8 gruppi ed alimentate con il mangime standard impiegato per la preparazione di quello estrogenizzato ed utilizzate come controllo.

VALUTAZIONE DEI RISULTATI.

Ogni rattina dopo l'asportazione e la pesatura dell'utero e della vagina viene pesata. I pesi uterini per ogni rattina così ottenuti vengono riferiti a 100 g di peso corporeo utilizzando la formula:

$$\frac{U}{P} \times 100 \quad \text{dove } U = \text{peso utero e vagina in mg} \\ P = \text{peso corporeo in g}$$

Tale operazione si rende necessaria per ovviare a quelle differenze fisiologiche nel peso tra ratto e ratto. Dai valori così ottenuti si determina la media aritmetica per ciascuno dei 30 gruppi di rattine in esperimento e degli 8 gruppi di controllo e la deviazione standard per ciascun gruppo secondo la formula:

$$\pm \sqrt{\frac{Sx^2 - \frac{(Sx)^2}{n}}{n-1}} \quad \text{dove } Sx^2 = \text{somma dei quadrati dei valori originali} \\ (Sx)^2 = \text{quadrato della somma dei valori originali} \\ n = \text{numero delle osservazioni}$$

Il raffronto fra le medie in modo da stabilire se le differenze ottenute ricadano nel campo dell'errore sperimentale oppure siano da con-

siderarsi statisticamente significative viene effettuato calcolando il « t » di Student:

$$\frac{M_a - M_b}{s} \sqrt{\frac{N_a \cdot N_b}{N_a + N_b}} \quad (15)$$

I risultati ottenuti sono considerati validi con la probabilità di errore dell'1%.

RISULTATI E CONCLUSIONI

La titolazione dei tre estrogeni sintetici ha fornito i risultati riferiti nelle tabelle 2, 3 e 4 rispettivamente per dietilstilbestrolo, esestrolo e dienestrolo. Nella tabella 1 si riportano i dati dalle rattine di controllo mantenute nelle identiche condizioni ed alimentate con lo stesso mangime senza estrogeni.

TABELLA 1

Valori medi in rattine di controllo.

N. determinazioni (*)	Media peso corporeo g	Media peso utero mg	Media peso utero ‰ peso corporeo mg	Media	Devianza ±
1	46,3567	39,2	84,56	108,89	15
2	33,8822	44,2	130,45		
3	28,6212	29,1	101,67		
4	40,7102	48,9	120,11		
5	44,0972	54,2	122,91		
6	26,9654	28,0	103,84		
7	27,6079	26,5	95,99		
8	23,0349	25,7	111,60		

(*) Ogni determinazione rappresenta la media dei valori ottenuti da un numero variabile di rattine.

TABELLA 2

Dosaggio Stilbestrolo su rattina impubere.

Dose	N. rattine	Media peso corporeo g	Media peso utero mg	Media peso utero % peso corpor. mg	Devianza $\pm$	"t"	Signifi- canza
40 γ /g	5	35,7921	186,3	522,80	39	28,08	+
20 γ /g	5	43,5659	239,5	555,25	64	19,98	+
10 γ /g	6	46,4040	262,4	571,68	101	13,81	+
5 γ /g	6	36,3416	173,2	481,09	63	15,93	+
2,5 γ /g	6	35,0373	211,6	614,04	121	11,55	+
1 γ /g	6	40,3653	225,2	571,74	118	10,66	+
0,1 γ /g	5	37,7197	183,9	492,51	126	9,34	+
0,01 γ /g	6	36,1519	39,3	110,27	19	0,10	—
0,001 γ /g	3	35,3042	34,4	100,61	14	0,79	—
0,0001 γ /g	4	37,0624	37,4	100,79	6,5	0,99	—

TABELLA 3

Dosaggio Esestrolo su rattina impubere.

Dose	N. rattine	Media peso corporeo g	Media peso utero mg	Media peso utero % peso corpor. mg	Devianza $\pm$	"t"	Signifi- canza
40 γ /g	6	44,1252	235,6	543,20	99	12,67	+
20 γ /g	6	46,5682	277,3	598,25	130	10,93	+
10 γ /g	4	46,4321	255,0	552,30	38	28,38	+
5 γ /g	5	36,3507	190,0	536,29	74	15,78	+
2,5 γ /g	4	26,7833	184,8	644,50	75	20,65	+
1 γ /g	6	31,3165	175,8	555,64	115	10,72	+
0,1 γ /g	5	40,9227	87,9	213,98	10,5	12,61	+
0,01 γ /g	5	34,4652	37,8	109,93	13	0,12	—
0,001 γ /g	4	35,6406	50,5	142,17	18	2,96	—
0,0001 γ /g	5	36,8906	42,5	114,62	11	0,73	—

Dosaggio Dienestrola su rattina impubere.

Dose	N. rattine	Media peso corporeo g	Media peso utero mg	Media peso utero % peso corpor. mg	Devianza $\pm$	"t"	Signifi- canza
40 γ /g	6	39,1109	257,8	661,76	48	31,64	+
20 γ /g	6	45,1702	275,4	616,32	85	17,12	+
10 γ /g	6	40,4908	269,4	642,07	91	16,64	+
5 γ /g	4	35,3715	214,7	615,60	94	15,26	+
2,5 γ /g	5	31,4123	208,1	663,72	30	42,80	+
1 γ /g	4	32,5232	183,8	564,23	29	34,65	+
0,1 γ /g	4	33,4195	151,9	456,81	89	11,14	+
0,01 γ /g	5	33,6434	47,8	142,62	21	2,89	—
0,001 γ /g	4	34,6049	36,3	105,42	13	0,44	—

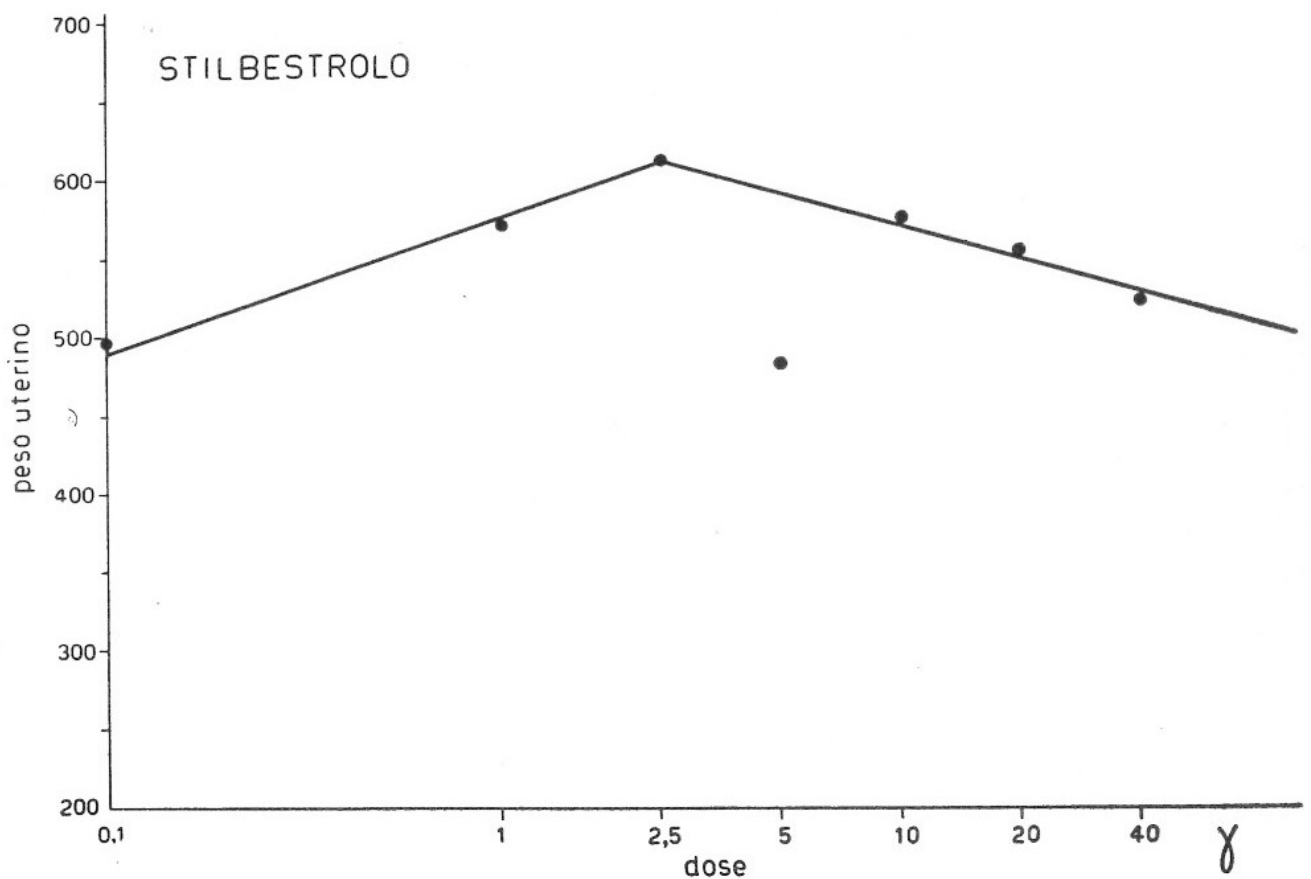


Fig. 1. - Rappresentazione grafica dei pesi medi uterini di rattine impuberi alimentate con stilbestrolo.

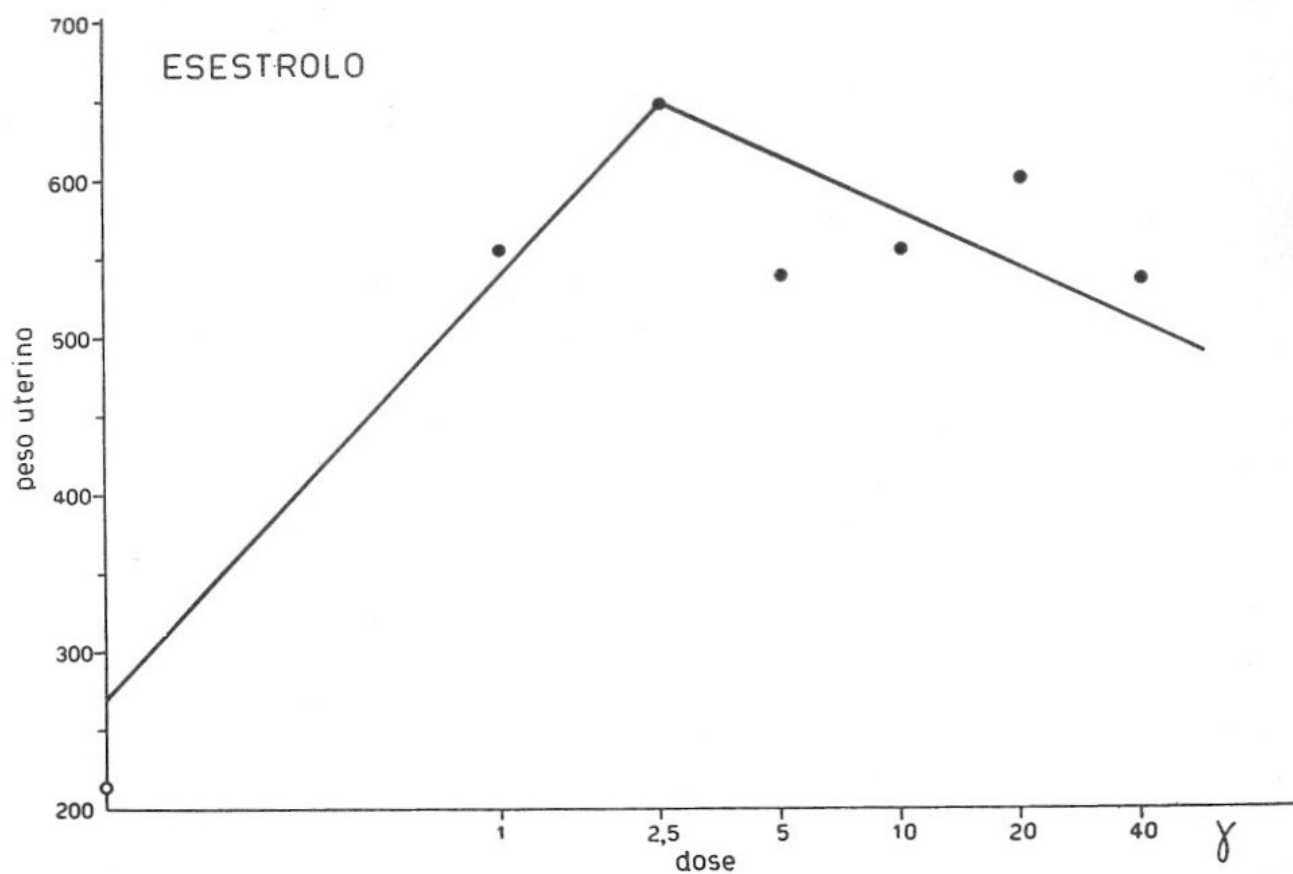


Fig. 2. - Rappresentazione grafica dei pesi medi uterini di rattine impuberi alimentate con esestrolo.

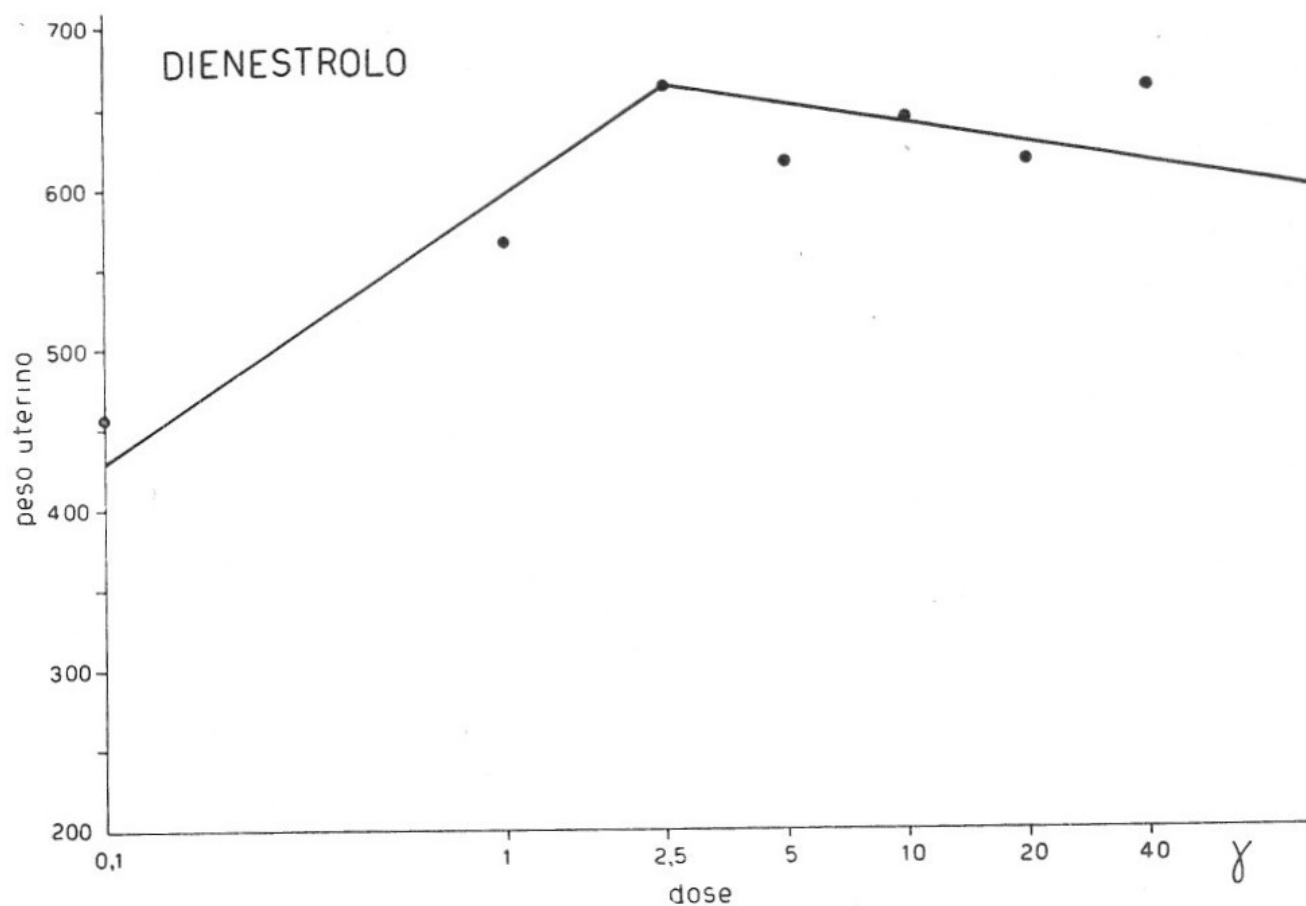


Fig. 3. - Rappresentazione grafica dei pesi medi uterini di rattine impuberi alimentate con dienestrolo.

Dalle tabelle sopra riportate si nota come il comportamento dei tre estrogeni sia pressochè sovrapponibile. Infatti tutti e tre gli estrogeni hanno fornito risultati statisticamente significativi fino alla dose di $0,1\gamma/g$ di mangime. Inoltre in tutti i casi si è potuto notare come la risposta oltre un certo livello non è più proporzionale alla dose somministrata. Dai grafici soprariportati, questo fatto appare molto più evidente. Come può notarsi si ha, per tutti e tre gli estrogeni in esperimento, un'inversione della curva dose-risposta il cui punto di inversione corrisponde alla concentrazione di $2,5\gamma/g$ di mangime. In altre parole fino a tale dose il peso uterino aumenta con l'aumentare della dose, cioè l'aumento è direttamente proporzionale alla dose; superato quel livello l'aumento uterino diviene inversamente proporzionale alla dose stessa.

La ragione di questo fenomeno va ricercata forse nel meccanismo di azione degli estrogeni sintetici. Essi, infatti, espletano la loro attività attraverso l'intermediazione diencefaloipofisaria. Probabilmente quindi aumentando la dose di estrogeno si stabilisce un blocco ipofisario per cui le modificazioni uterine si arrestano.

A favore di questa ipotesi sta il fatto che i risultati ottenuti alle dosi di $5\gamma - 10 - 20 - 40\gamma/g$ di mangime sono pressochè uguali fra di loro: l'unica differenza forse potrebbe risiedere nei diversi tempi di attuazione dei fenomeni osservati.

Dai risultati ottenuti si può concludere quindi che il metodo di WIBERG e coll. ⁽¹⁴⁾ per la ricerca degli estrogeni nei mangimi fornisce un ottimo mezzo di controllo presentando una sensibilità pari a $0,1\gamma/g$ di mangime. Tuttavia tale metodo presenta qualche limitazione non tanto per quanto riguarda la sensibilità ma per il tempo necessario per la sua esecuzione. Infatti un metodo che richiede per la sua esecuzione ben 9 giorni se può essere utile quando si deve applicare su mangimi o nuclei per uso zootecnico non lo è più quando la ricerca va effettuata su carni fresche o su prodotti fermi alla frontiera in attesa di un responso.

Sarebbe interessante ricercare un altro metodo, sia esso biologico che chimico, che accanto alla sensibilità presentata dalla metodica di WIBERG e coll. ⁽¹⁴⁾ fosse di più rapida esecuzione permettendo di effettuare il dosaggio nel giro di 2-3 giorni al massimo.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Veterinaria.

BIBLIOGRAFIA

- ⁽¹⁾ ALLEN E. e DOISY E. A. - J. am. med. Ass., 81: 519 (1923).
- ⁽²⁾ BÜLBRING E. e BURN J. H. - J. Physiol., 85: 320 (1933).
- ⁽³⁾ LAWSON H. D., HELLER C. G., GOLDEN J. B. e SEVRINGHANS E. L. - Endocrinology, 24: 35 (1939).

- (4) ASTWOOD E. B. - Anat. Record, 70: suppl. 3, 5 (1938).
 - (5) HARTMAN C. G. e LITTRELL J. L. - Science, 102: 178 (1945).
 - (6) LITTRELL J. L. - Federation Proc., 5: 65 (1946); Anat. Record, 94: 25 (1946).
 - (7) GOSSETT F. O., SMITH F. A. e DOWNING J. F. - Symposium on medicated feeds - Medical Encyclopedia Inc., New York, 97 (1956).
 - (8) PRESTON R., CHENG E., STORY C. E., HOMEYAR P. e PAULS J. - J. Animal Sci., 15: 3 (1956).
 - (9) STOB M., ANDREWS F. N. e ZARROW M. X. - Am. J. Vet. Res., 15: 349 (1954).
 - (10) STOB M., ANDREWS F. N. e ZARROW M. X. - J. Animal Sci., 13: 138 (1954).
 - (11) STOB M., ANDREWS F. N. e ZARROW M. X. - J. Animal Sci., 15: 997 (1956).
 - (12) TURNER C. W. - J. Animal Sci., 15: 13 (1956).
 - (13) UMBERGER E. J. - Symposium on medicated feeds - Medical Encyclopedia Inc. New York 28 (1956).
 - (14) WIBERG G. S. e STEPHENSON N. R. - Can. J. Biochem. Physiol., 35: 1107 (1957).
 - (15) CAVALLI-SFORZA L. - Analisi statistica per medici e biologi e analisi del dosaggio biologico, ed. Universitarie, Boringhieri, Torino (1961).
-