

CADMIO E CARNI EQUINE.

CORRELAZIONI TRA I LIVELLI NEL FEGATO E NEL MUSCOLO DI CAVALLI MACELLATI IN EMILIA ROMAGNA

MARCO TAMBA - ROBERTO CALABRESE - ENRICA FERRETTI
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA

Parole chiave: Cadmio, contaminante, cavallo.

Riassunto

Sono stati esaminati i livelli di cadmio nel fegato e muscolo di 467 cavalli di diverse età. In questi organi la concentrazione media di questo elemento è risultata rispettivamente pari a 0,739 e 0,019 mg/kg.

Il livello del cadmio nel fegato è risultato correlato alla concentrazione di cadmio nel muscolo, alla età e, in misura minore, al sesso degli animali esaminati. E' stata inoltre rilevata una correlazione cubica tra la concentrazione di cadmio nel muscolo e quella nel fegato. I risultati di questo lavoro dimostrano che l'esclusione di fegato equino dal consumo umano è opportuna e che il tenore in cadmio nel tessuto muscolare degli equini deve essere tenuto sotto continua sorveglianza.

RELATIONS BETWEEN CADMIUM CONCENTRATIONS IN LIVER AND MUSCLE OF HORSES SLAUGHTERED IN EMILIA ROMAGNA REGION

Keywords: Cadmium, contaminant, horse.

Abstract

The occurrence of cadmium was measured in liver and muscle of 467 horse at different age. Cadmium concentrations resulted higher in liver than in muscle: 0,739 mg/kg and 0,019 mg/kg respectively.

Liver cadmium concentration was positively related to cadmium concentration in muscle, age and sex of horses examined. Furthermore a cubic relation between cadmium concentrations in muscle and liver was demonstrated. Exclusion of horse liver from human consumption remains a suitable measure of Public Health; meanwhile muscle cadmium concentrations in horses need to be monitored.

Autore corrispondente: Marco Tamba.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna - Sezione di Bologna. Via Fiorini, 5 - 40127 Bologna.

Telefono: 051-4200032; Fax: 051-4200038; e-mail: mtamba@bs.izs.it

Introduzione

Il cadmio (Cd) è un metallo pesante che in natura non si trova allo stato puro ma sotto forma di solfuro di cadmio nella greenockite e nei minerali di zinco oppure associato ad altri metalli. La contaminazione da cadmio può avvenire in diversi modi, ma tutti sono riconducibili a specifiche attività umane. La distribuzione del Cd nell'ambiente può infatti avvenire per dispersione diretta, attraverso vapori, polveri, fiumi e scarichi che finiscono per contaminare l'aria, l'acqua, il suolo e quindi i vegetali e gli animali che in tali luoghi vivono (Ballarini, 1999; Giofrè e coll., 2000). Negli animali il Cd assunto per ingestione o inalazione si lega alla metallotioneina, una proteina presente in tutti i tessuti, ma in particolar modo nel fegato e nel rene. In questi organi quindi il Cd si accumula sviluppando i propri effetti tossici (Ballarini, 1999).

Per la sua elevata tossicità e quindi per la salvaguardia della salute degli animali e dell'uomo, il Cd richiede un continuo monitoraggio, pertanto questo metallo rientra tra i contaminanti ambientali previsti ogni anno dal Piano Nazionale per la ricerca di Residui negli animali e nelle carni (PNR). Nell'ambito del PNR la ricerca del Cd è effettuata al macello su campioni di fegato prelevati da vacche, ovini adulti, suini ed equini. In quest'ultima specie, considerata a maggior rischio di contaminazione, la ricerca del Cd viene effettuata anche su campioni di tessuto muscolare.

Negli equini infatti, probabilmente per fattori fisiologici, vengono costantemente riscontrati elevati contenuti di Cd, tanto che il Ministero della Sanità ha escluso dal consumo umano i fegati ed i reni degli equini, con l'eccezione di quelli di animali di età inferiore a 2 anni di origine nazionale e comunitaria (Telegramma 600.7/24490/AG/4859 del 04/07/1996).

Scopo di questo lavoro è quello di individuare la possibile relazione esistente tra i livelli di Cd nel fegato, nel muscolo e altre variabili in cavalli macellati e sottoposti a controllo nell'ambito del PNR.

Materiali e metodi

Sono stati elaborati i dati relativi a 467 cavalli macellati in Emilia Romagna nel periodo compreso tra giugno 1997 e dicembre 2000 e sottoposti a campionamento per la ricerca di Cd nell'ambito del PNR, mediante prelievo in parallelo di fegato e muscolo. Al momento del prelievo dei campioni veniva compilata un'apposita scheda contenente il segnalamento e l'origine dell'animale campionato.

I campioni prelevati sono stati esaminati presso il Laboratorio Chimico dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna di Brescia mediante spettrofotometria di massa ad assorbimento atomico, previa digestione umida con acido nitrico concentrato, acqua ossigenata e microonde. La strumentazione utilizzata comprende lo spettrofotometro ad assorbimento atomico Perkin Elmer modello Analyst 600 con fornello di grafite e autocampionatore, e la lampada per Cadmio EDL. Il limite di quantificazione del metodo è risultato pari a 0,01mg/kg.

I dati sono stati raccolti in un database e successivamente elaborati con il software SPSS 6.1 (SPSS, 1995).

L'unità statistica di riferimento è il cavallo, per il quale sono state rilevate ed analizzate le seguenti variabili: concentrazione di cadmio nel fegato e nel muscolo, sesso, età, razza, provenienza dell'animale (italiana o straniera), Provincia e Comune dell'ultimo allevamento di provenienza. A causa della qualità dei dati disponibili sono state considerate soltanto le prime quattro variabili di cui sopra.

Il livello del Cd nel fegato è stato assunto come variabile dipendente e messo in relazione singolarmente con il contenuto di Cd del muscolo, con il sesso e con l'età degli animali. In particolare per quest'ultima variabile gli animali sono stati suddivisi in due gruppi, corrispondenti alle diverse categorie previste dal PNR: cavalli di età inferiore a 2 anni e cavalli di età superiore a 2 anni. Per quanto riguarda la variabile "Cd nel muscolo", invece, sono stati formati dei gruppi calcolando i quartili della sua distribuzione ed utilizzando poi tali valori come riferimento per una ripartizione delle unità statistiche. Eventuali differenze statistiche sono state evidenziate mediante il test F.

Il passo successivo è stato di mettere in relazione funzionale, tramite l'analisi della regressione lineare, il "Cd nel fegato" con le altre variabili. A tale scopo occorre precisare che i dati a disposizione hanno reso necessaria una trasformazione delle variabili originali "Cd nel fegato" e "Cd nel muscolo". In loro sostituzione sono state considerate, rispettivamente, la trasformazione logaritmica e il reciproco, in modo da ricondurci alle condizioni di base per l'applicabilità dell'analisi di regressione. Sono state escluse dall'analisi tutte quelle osservazioni per le quali il livello del Cd nel muscolo è risultato inferiore ai limiti di rilevazione del metodo; per la determinazione del modello sono stati pertanto utilizzate 312 unità statistiche. La concentrazione di cadmio riscontrata nel fegato è stata assunta come variabile dipendente.

Per l'analisi è stata utilizzata la procedura "Stepwise" con $p=0.05$ quale criterio d'inserimento di una variabile nel modello e $p=0.10$ quale criterio di rimozione delle variabili dal modello.

E' stato, infine, riesaminato criticamente il processo di selezione del modello e valutato l'adattamento di altre relazioni, fra cui un modello di tipo cubico. Si è quindi fatto ricorso alla regressione polinomiale ortogonale per sondare la validità dell'intuizione. La trasformazione delle variabili originali in variabili ortogonali si è resa necessaria per eliminare i fenomeni di dipendenza lineare fra i regressori (multicollinearità), fenomeni sempre presenti quando si lavora con variabili di tipo polinomiale (Ryan, 1997).

Risultati

Analisi descrittiva

I risultati delle prime elaborazioni effettuate sui dati relativi alle analisi dei 467 cavalli sono riportati in Tabella 1. Come si può notare, nel fegato è stata rilevata una concentrazione media di Cd e una variabilità maggiore di quasi 38 volte rispetto a quella del muscolo. Entrambe le variabili sembrano essere asimmetricamente distribuite verso sinistra, il che implica che valori molto elevati di cadmio sono comunque poco frequenti. Se si considera infatti un livello di "attenzione" di 1 mg/kg come altri autori italiani (Ghirarduzzi e coll., 1994; Giofrè e coll., 2000) è risultato che solo uno (0,2%) dei campioni di muscolo ha superato questo valore, contro 71 campioni (15,2%) con livelli di Cd nel fegato superiori a tale limite. Utilizzando invece la soglia di 0,2 mg/kg fissato per il muscolo equino dal Regolamento CE 466/2001, sono stati rilevati 66 campioni di muscolo (14,1%) con valori di Cd superiori al limite di legge che entrerà in vigore il 5 febbraio 2002.

In Tabella 2 sono state riportate le diverse concentrazioni di Cd epatico riscontrate a seconda dei diversi livelli di Cd rilevati nel tessuto muscolare. Dall'esame della Tabella si evince che la concentrazione media di cadmio nel fegato aumenta con l'aumentare di quella nel muscolo. Le differenze evidenziate fra i valori medi di Cd nel fegato, all'interno dei quattro sottogruppi definiti dai quartili della variabile "Cd nel muscolo", sono risultate significative.

Lo stesso tipo di risultato si registra per la variabile età: il passaggio dalla classe di equini di età inferiore ai 2 anni a quella di equini di età superiore o uguale ai 2 anni determina un aumento significativo della presenza del metallo nel fegato. In particolare, gli animali di età superiore ai 24 mesi hanno presentato un livello di Cd nel fegato quasi quattro volte maggiore rispetto ai soggetti più giovani (Tabella 3).

La stessa procedura è stata infine seguita sul sesso degli animali esaminati: le femmine hanno presentato una concentrazione di Cd nel fegato superiore a quella rilevata nei maschi, ma tale differenza non è risultata significativa ($F=1.184$; $p=0.277$).

La regressione lineare

Allo scopo di individuare i fattori che maggiormente potrebbero spiegare la variabilità della concentrazione di cadmio nel fegato, sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di tale variabile con le altre. Tutte le variabili considerate (Cd nel muscolo, età e sesso) sono risultate significativamente correlate con la concentrazione di "Cd nel fegato".

Le variabili maggiormente correlate (Cd nel muscolo, età) sono state utilizzate per elaborare un modello di regressione lineare e i relativi risultati finali sono riportati in Tabella 4. Occorre precisare tuttavia che, anche se i coefficienti di regressione nel loro insieme risultano significativamente diversi da zero ($F=52.521$; $p<0.0001$), il modello non è soddisfacente né a livello esplicativo della relazione esistente né a livello predittivo. Esso, infatti, riesce a spiegare soltanto il 26% della variabilità complessiva della concentrazione di cadmio nel fegato ($\text{Adjusted } R^2 = 0.256$).

Si può comunque evincere dai risultati che sia un aumento della concentrazione di cadmio presente nel muscolo, sia l'aumento dell'età dell'animale determinano un incremento della presenza di cadmio nel fegato.

La regressione polinomiale ortogonale

I dati originali hanno suggerito l'ipotesi di una relazione di ordine superiore al primo tra la variabile dipendente e la concentrazione di Cd nel muscolo. E' stato, quindi, adattato ai dati un modello cubico nella sola variabile esplicativa "Cd nel muscolo". I risultati sono riportati in Tabella 5, mentre in Figura 1 è riprodotto l'andamento fra le due variabili con la curva interpolatrice di terzo grado. I risultati riportati in Tabella 5 si riferiscono al modello finale, ottenuto dopo aver escluso dall'analisi tre casi con valori anomali (outliers) e tutti i valori già esclusi nella fase iniziale della regressione lineare (campioni con valori di Cd nel muscolo inferiori alla soglia di quantificazione).

Il modello così ottenuto spiega oltre l' 83% della variabilità del Cd nel fegato ($\text{Adjusted } R^2 = 0.835$).

Discussione

I valori di contaminazione da Cd nel muscolo e fegato equino riscontrati in questa indagine sono paragonabili, se non inferiori, a quelli rilevati da altri autori in cavalli macellati in Italia (Campanini e coll., 1982; Ghirarduzzi e coll, 1994; Pozzali e coll. 1995; Giofrè e coll., 2000).

E' stata rilevata, in accordo con i risultati di altre ricerche (Pozzali e coll. 1995; Plumlee e coll., 1996; Giofrè e coll., 2000), una relazione diretta tra l'età e la concentrazione di Cd epatica. E' evidente che i cavalli di maggior età sono esposti all'assunzione di Cd per più tempo, per cui ne presenteranno un accumulo maggiore nell'organismo, ed in particolare negli organi bersaglio.

Esiste anche una significativa correlazione tra il sesso e la concentrazione di metallo nel fegato equino così come rilevato anche da altri autori (Ghirarduzzi e coll, 1994). Il livello di correlazione è comunque di modesta entità e la maggiore concentrazione di Cd rilevata nel fegato delle femmine è probabilmente attribuibile al fatto che quest'ultime sono macellate mediamente in età più avanzata rispetto ai maschi.

Di rilievo, invece, appare l'evidenza di una relazione diretta fra i livelli di Cd nel muscolo e quella nel fegato. Quest'ultimo, come sostengono la maggior parte degli autori, è, insieme al rene, uno degli organi bersaglio e di deposito di tale elemento nell'organismo. In questo organo infatti si accumula il complesso costituito dallo ione metallico con la metallotioneina, una proteina sintetizzata dagli epatociti. Tale complesso costituisce il metodo di detossificazione adottato dall'organismo, infatti in tale forma il Cd non provoca gli effetti tossici che sono invece provocati dal Cd allo stato libero; d'altra parte il Cd legato alla proteina viene eliminato con lentezza con il conseguente accumulo negli organi bersaglio sopra citati. Dunque, è plausibile che all'aumentare della concentrazione dello ione metallico nel tessuto muscolare, dovuto all'assunzione continuata di quantità anche modeste di Cd da parte dell'organismo, consegua un accumulo di tale elemento nel tessuto epatico.

Conclusioni

I livelli di contaminazione da cadmio riscontrati fanno ritenere corretta e opportuna l'indicazione di mantenere l'esclusione dal consumo umano del fegato e rene degli equini di età superiore ai 2 anni.

L'analisi dei dati raccolti sembra confermare il fatto che la contaminazione da Cd delle carni equine dipende fondamentalmente dalla sua assunzione attraverso la dieta e l'ambiente, per altro difficilmente valutabile tramite un'indagine al macello, e che in questa specie vi è un naturale accumulo durante la vita produttiva.

Di rilievo invece appare l'evidenziazione di una relazione diretta, di tipo esponenziale (cubico), tra il contenuto di Cd nel muscolo e nel fegato. L'equazione da noi individuata permette di predeterminare in oltre l'80% dei casi il livello del Cd nel fegato a partire dal solo tenore in Cd nel muscolo. Nell'ambito del PNR, si ritiene pertanto sufficiente il solo monitoraggio del tenore in Cd nel muscolo in quanto in grado da solo di fornire indicazione sull'eventuale contaminazione del fegato.

Bibliografia

1. **Ballarini G.** (1999), Rischi da cadmio negli animali della catena alimentare, *Obiettivi & Documenti Veterinari*, **20** (2): 29-33.
2. **Campanini G., Madarena G., Dazzi G., Marusi A.** (1982), Contenuto di cadmio in campioni di muscolo e di organi di equini allevati nella provincia di Parma. *Atti S.I.S.Vet.*, **36**: 553-555
3. **Ghirarduzzi P., Maggi E., Oddi P.** (1994). Il cadmio quale elemento contaminante: ricerca dei residui nel muscolo, fegato e rene di equini nazionali e di importazione. *Ingegneria alimentare* **6**: 27-32.
4. **Giofrè F., Saladino A., Caparello G., Marino D., Naccari F.** (2000), Livelli di cadmio in campioni di muscolo e fegato di cavalli allevati nella regione Calabria. *Large Animals Review*, **6** (2): 5-9.
5. **Plumlee K.H., Johnson B., Gardner I.A.** (1996). Heavy metal concentrations in injured Racehorses. *Vet. And Human Toxicology*. **38** (3): 204-206.
6. **Pozzali U., Rattazzi C., Tessori F.** (1995). Residui involontari nelle carni equine: il cadmio. *Il Progr. Vet.* **50** (2): 53-57.
7. **Ryan Thomas P.** (1997), *Modern Regression Methods*, Wiley, New York.
8. **SPSS** (1995), SPSS software, version 6.1, SPSS Inc., Chicago.

Tab. 1 - Media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo della concentrazione di cadmio nel fegato e nel muscolo di equini macellati in Emilia Romagna. Periodo 1997-2000

Variabile	Media e D.S. (mg/kg)	Mediana (mg/kg)	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)
Cadmio nel fegato	0,739 ± 2,201	0,330	0,010	37,700
Cadmio nel muscolo	0,019 ± 0,064	0,010	< 0,01	1,130

Tab. 2 - Descrizione dei sottogruppi. Valori medi di cadmio nel fegato per livelli di cadmio nel muscolo

Livelli di Cd nel muscolo (mg/kg)	Livelli medi di Cd nel fegato (mg/kg)	Casi	F	Significatività
< 0,01	0,31 ± 0,33	154	20.05	p < 0.0001
0,01 - 0,10	0,43 ± 0,40	183		
0,11 - 0,20	0,79 ± 1,88	63		
> 0,20	2,53 ± 5,16	66		

Tab. 3 - Valori medi di cadmio nel fegato per età dell'animale

Età	Livelli medi di Cd nel fegato (mg/kg)	Casi	F	Significatività
< 2 anni	0,35 ± 0,38	272	20.95	p < 0.0001
> 2 anni	1,28 ± 3,31	194		

Tab. 4 - Coefficienti di regressione, errori standard, intervalli di confidenza e significatività delle stime

Variabile	B	S.E. (B)	C.I. (95%)		t-Student	Significatività
Cd nel muscolo (*)	-0.013	0.002	-0.016	-0.010	-7.660	p < 0.0001
Età	0.451	0.112	0.231	0.670	4.040	p < 0.0002
Costante	-0.183	0.162	-0.503	0.137	-1.128	n.s.

(*) Reciproco della variabile originale; n.s. = non significativo

Tab. 5 - Coefficienti di regressione, errori standard, intervalli di confidenza e significatività delle stime

Variabile	B	S.E. (B)	C.I. (95%)		t-Student	Significatività
Z	19.368	0.733	17.925	20.810	26.426	p < 0.0001
Z ²	-27.660	1.982	-31.561	-23.760	-13.952	p < 0.0001
Z ³	-201.652	8.597	-218.568	-184.736	-23.457	p < 0.0001
Costante	0.837	0.058	0.723	0.951	14.439	p < 0.0001

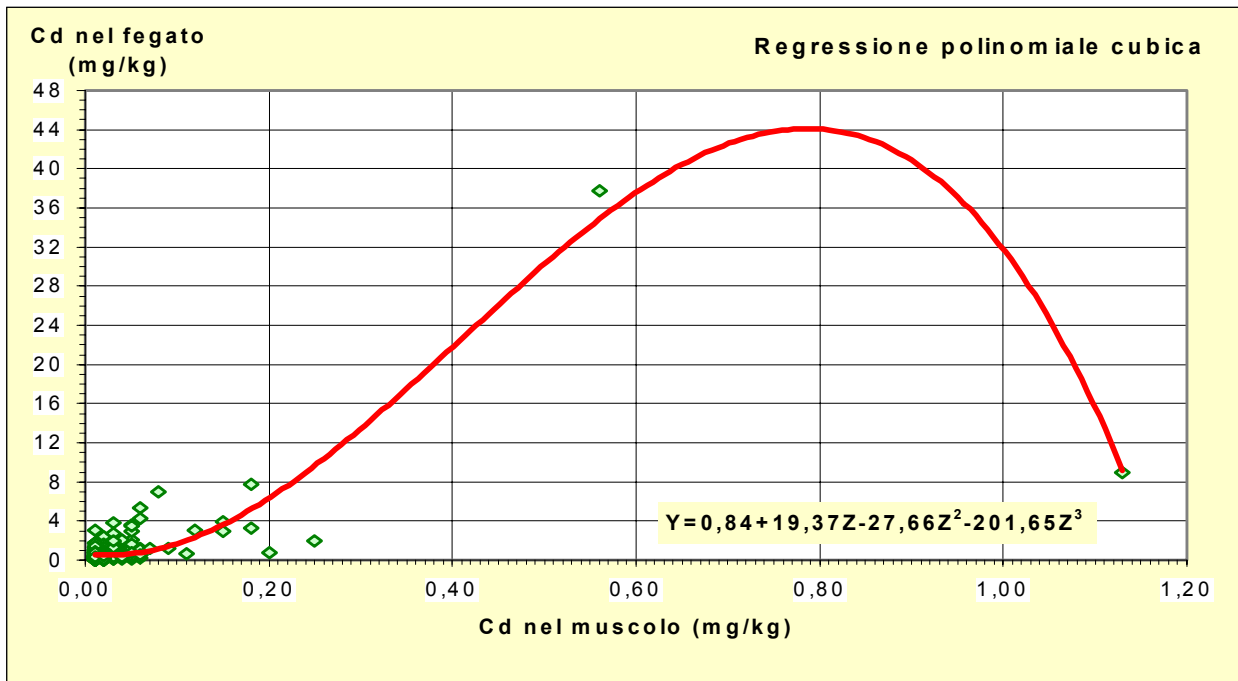
Valutazione complessiva del modello: F = 519.635, gdl= 3;305, p<0.0001. Adjusted R² = 0.835

Z = X - M(X), dove M(X) = media di "Cd nel muscolo" (0.019);

Z² = X² - 0.8601*Z - 0.004;

Z³ = X³ - 1.3548*Z² - 0.8860*Z.

Fig. 1 - Distribuzione del Cd nel fegato in funzione del Cd nel muscolo



Nota: Il grafico è espresso nelle variabili originali, mentre l'equazione nelle trasformate ortogonali. Per determinare i valori di Y dati quelli di X occorre quindi la seguente trasformazione:

$$Z = X - M(X) \text{ dove } M(X) = \text{media di Cd nel muscolo (0.019)}$$

$$Z^2 = X^2 - 0.8601 * Z - 0.004$$

$$Z^3 = X^3 - 1.3548 * Z^2 - 0.8860 * Z$$