

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

Angelo Lasagna



**Il Presidente
del Corso di Studio
Prof.ssa Elsa Cauvin**

E. Cauvin

Università degli Studi di Torino

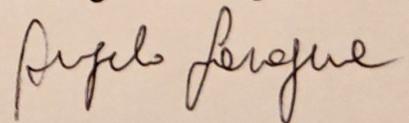
Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di Laurea in Produzioni Animali, Gestione e Conservazione della Fauna

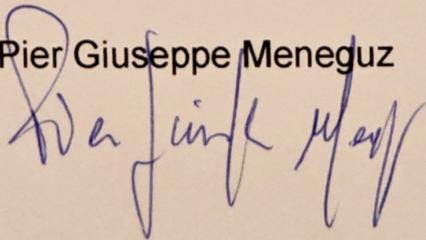
Tesi di Laurea

Comportamento del cinghiale, *Sus scrofa*, alle mangiatoie: possibili applicazioni per la somministrazione di esche con medicamenti.

Candidato: Angelo Lasagna



Relatore: Pier Giuseppe Meneguz



Anno Accademico 2006/2007

Prefazione

La caccia in Spagna, e in particolare in Castilla-La Mancha, è una attività con importanti ripercussioni sociali ed economiche al punto che gli studi e le ricerche dedicati a sviluppare e tutelare le risorse cinegetiche sono considerati imprescindibili.

In questa vasta regione spagnola la tubercolosi negli ungulati selvatici è divenuta un problema che interessa la sostenibilità degli attuali sistemi di gestione cinegetica proprio in un periodo in cui tale attività è chiamata a far fronte ad una costante ed importante crescita del mercato della caccia.

L'esigenza di controllare o meglio, eradicare questi focolai di tubercolosi passa attraverso la riduzione del tasso di trasmissione inter e intraspecifica.

La ricerca di cui si occupa questa tesi, realizzata in collaborazione con l'Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), è propedeutica ad un complesso ed articolato progetto, Control de la tuberculosis bovina en su principal reservorio silvestre en España, el jabalí, mediante vacunación, volto a sviluppare strategie di controllo di questa infezione nella fauna selvatica.

Un doveroso ringraziamento va a Yolanda Fierro, proprietaria della riserva "La Morera", dove è stato realizzato tutto il lavoro di campo.

La mia più sincera gratitudine è per il direttore dell'IREC, Dottor Christian Gortazar, per il Dottor Joaquin Vicente e per la Dottoressa Cristina Ballesteros, per il loro indispensabile aiuto nella realizzazione di questo lavoro.

Sommario

Introduzione	<i>Ai miei genitori, alla mia famiglia. A tutti coloro che mi hanno aiutato e che mi hanno dato fiducia. Grazie!</i>
1. Il Fucolo 200	17
1.1. Pregestibile e contati	17
2. Caratteristiche e scopi della ricerca	19
3. Area di studio	20
3.1 Localizzazione geografica	20
3.2 Climatologia	21
3.3 Flora e uso del suolo	23
3.4 Specie oggetto di caccia presenti nella riserva	25
4. Materiali e metodi	27
4.1 La trappola fotografica	27
4.2 La "Trappola a rete"	28
4.3 Le esche alimentari	28
4.4 Metodologia utilizzata nella prima parte sperimentale	31
4.5 Metodologia utilizzata nella seconda parte sperimentale	32
4.6 Analisi statistiche	39
5. Risultati	41
5.1 Funzionamento delle trappole stazioni	41
5.2 Specie catturate alle stazioni	42
5.3 Velocità di scomparsa delle esche dalle stazioni	53
5.4 Trappole fotografiche e rilevamento dell'operatore a distanza	54
5.5 Velocità di scomparsa delle esche dalle gabbie selettive per studi	55
6. Conclusioni	57
7. Bibliografia	60

- Sommario -

1. Introduzione	6
1.1 <i>La tubercolosi nel cinghiale</i>	8
1.2 <i>I vaccini orali</i>	12
1.3 <i>Il vaccino BCG</i>	17
1.4 <i>Progetto tubercolosi</i>	17
2. Obiettivi e scopi della ricerca	19
3. Area di studio	20
3.1 <i>Localizzazione geografica</i>	20
3.2 <i>Climatologia</i>	21
3.3 <i>Flora e uso del suolo</i>	22
3.4 <i>Specie oggetto di caccia presenti nella riserva</i>	25
4. Materiali e metodi	27
4.1 <i>La trappola fotografica</i>	27
4.2 <i>La "Track station"</i>	28
4.3 <i>Le esche alimentari</i>	29
4.4 <i>Metodologia utilizzata nella prima parte sperimentale</i>	31
4.5 <i>Metodologia utilizzata nella seconda parte sperimentale</i>	32
4.6 <i>Analisi statistiche</i>	39
5. Risultati	41
5.1 <i>Funzionamento delle track stations</i>	41
5.2 <i>Specie visitanti le stazioni</i>	42
5.3 <i>Velocità di scomparsa delle esche dalle stazioni</i>	53
5.4 <i>Trappola fotografica e rilevamento dell'operatore a confronto</i>	54
5.5 <i>Velocità di scomparsa delle esche dalle governe selettive per striati</i>	56
6. Conclusioni	61
7. Bibliografia	63

CINGHIALE
Sus scrofa Linnaeus, 1758



1. INTRODUZIONE

La tubercolosi negli animali domestici costituisce uno dei principali problemi di sanità a livello mondiale, attualmente l'Unione Europea investe grandi somme nel controllo della malattia nei bovini. L'esistenza di *reservoir* tra gli animali selvatici è considerata uno dei fattori principali che impediscono la sua eradicazione (Phillips *et al.*, 2003, Reviriego e Vermeersch, 2006). Una specie *reservoir* per essere definita tale deve essere numericamente abbondante, ma non in eccesso, essere sensibile alla malattia ed avere la capacità di contagiare altri animali (Wobeser 1994, Corner 2006). Attualmente le specie che sono ritenute svolgere un ruolo importante nell'epidemiologia silvestre della tubercolosi sono il tasso *Meles meles* nelle isole Britanniche (Delahay *et al.*, 2002), il possum *Trichosurus vulpecula* in Nuova Zelanda (Caley e Hone, 2002), il bufalo africano *Syncerus caffer* in Sudafrica (Caron *et al.*, 2003), il cervo coda bianca *Odocoileus virginianus* e il bisonte *Bison bison* in Nordamerica (Schmitt *et al.*, 2002). Di recente in alcune regioni spagnole è stato osservato un incremento progressivo della prevalenza di tubercolosi negli *ungulati* selvatici, principalmente nel cervo e nel cinghiale (Parra *et al.*, 2006).

In Spagna il cinghiale è una specie abbondante, in espansione, ampiamente distribuita; condivide numerose malattie con gli animali domestici e costituisce il principale *reservoir* di tubercolosi quando utilizza territori con bovini, caprini e suini (Parra *et al.*, 2003 e 2005, Aranaz *et al.*, 2004, Gortazar *et al.*, 2005, Vicente *et al.*, 2006 e 2007). In questa specie la proporzione di animali con lesioni generalizzate può raggiungere il 60% (Vicente *et al.*, 2006) ed esistono prove che la tubercolosi sopravvive in popolazioni chiuse all'interno di grandi recinti, in assenza di bestiame domestico e di altri ruminanti selvatici (Gortazar *et al.*, 2005).

Data la difficoltà di realizzare campagne di controllo delle popolazioni di animali selvatici affette da questa malattia, e la discussa efficacia di questo intervento per ridurre la comparsa negli animali domestici (Donnelly *et al.* 2006, Vicente *et al.*, in prep.), è opportuno esplorare formule alternative, includendo tra queste la immunizzazione dei *reservoir* selvatici (Buddle *et al.*, 2006, Leseillier *et al.*, 2006).

La diffusione della tubercolosi in una popolazione selvatica in rapido incremento come quella del cinghiale, comporta importanti implicazioni di sanità pubblica veterinaria, poiché può rappresentare un potenziale rischio zoonosico, un

potenziale rischio zoonosanitario associato ad una possibile interferenza con i piani di eradicazione della malattia negli allevamenti bovini (come già sperimentato in altri paesi quali la Gran Bretagna e la Nuova Zelanda) e infine un potenziale rischio faunistico associato alla possibile estensione dell'infezione ad altre specie meno resistenti.

È probabile che le alte densità di cinghiali che esistono in Spagna (Acevedo *et al.*, in stampa), unite alle peculiarità della gestione del territorio cinegetico (aggregazione di animali intorno a punti di abbeverata o fonti di alimento); spieghino la situazione spagnola (Vicente *et al.*, in stampa). Data la capacità del cinghiale di coprire grandi distanze e attraversare barriere naturali, il suo ruolo nella trasmissione della tubercolosi al bestiame domestico potrebbe essere maggiore rispetto agli altri ungulati selvatici.

Il sistema cinegetico delle regioni del sud della Spagna- Extremadura, Castilla-La Mancha e Andalusia- si caratterizza, principalmente, per la tradizione della caccia al cinghiale nella modalità della "monteria". L'organizzazione dei territori di caccia è frequentemente costituita da riserve private, su vaste proprietà private, in molti casi chiuse da recinzioni metalliche. Questa caratteristica ha portato, in alcune situazioni, ad avere problemi sanitari dovuti all'eccessiva consanguineità tra gli individui all'interno di una stessa riserva. Recentemente uno studio genetico ha evidenziato differenze tra la variabilità di alcuni loci tra cinghiali tubercolotici e non tubercolotici provenienti dal centro della Spagna (Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2005); i loci che presentavano maggiori differenze risultavano essere vicini a geni relazionati con il sistema immunitario. Tramite una tecnica di estrazione di RNA per analizzare l'espressione genica differente tra cinghiali tubercolotici e non, esposti per via naturale alla malattia (Naranjo *et al.* 2005 e 2006), nel tessuto linfoide sono stati identificati alcuni geni che presentano una marcata e differente espressione in relazione con l'apparente resistenza alla tubercolosi. Individui con alta eterozigosi appaiono più capaci di resistere alla malattia grazie a una superiore immunità che si instaura dopo essere stati in contatto con il patogeno (Orme 2004).

L'obiettivo principale di questo esaustivo progetto, all'interno del quale rientra questa ricerca, è quello di sviluppare tecnologie che conducano alla possibilità di immunizzare il cinghiale con esche alimentari con il fine di controllare la

tubercolosi per garantire la salute pubblica e permettere una adeguata produzione cinegetica assicurando la conservazione delle popolazioni.

1.1. La tubercolosi nel cinghiale.

La tubercolosi è una malattia infettiva provocata da micobatteri, in particolare da *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*.

La malattia colpisce l'uomo, gli animali domestici, gli uccelli e molte specie di animali selvatici. Le lesioni colpiscono vari organi e si presentano sotto forma di tubercoli o granulomi tubercolari. L'infezione avviene attraverso varie vie: respiratoria, alimentare, congenita, genitale e cutanea. La malattia assume carattere cronico e può persistere per molti anni nel *reservoir* (Morris *et al.*, 1994). Gli animali infettati che guariscono sono pochi, pertanto il periodo di escrezione di batteri è lungo e causa, alla fine del decorso, la morte dell'animale, o una maggior suscettibilità di fronte ad altri patogeni, alla predazione o alle restrizioni imposte dall'ambiente (Caron *et al.*, 2003).

Il carattere riemergente della malattia e i ripetuti fallimenti nel conseguire l'eradicazione nel bestiame domestico di molti paesi sono stati associati alla fauna selvatica. In uno studio eseguito in Spagna nel 2006 (Martin-Hernando *et al.*, 2007), è stato possibile verificare come la malattia si manifesta e quali tipologie di lesioni provoca nel cinghiale. Animali abbattuti durante la caccia presentavano grandi lesioni tubercolari a carico dei linfonodi sottomandibolari, ma erano frequentemente colpiti anche i linfonodi bronchiali, mediastinici e mesenterici (Figura n. 1). Un terzo dei soggetti (34%) presentava lesioni macroscopiche esclusivamente nei linfonodi sottomandibolari. I micobatteri erano presenti anche nel lume dei dotti escretori delle ghiandole salivari. Sovente si riscontravano lesioni a carico dei linfonodi toracici e polmonari. In totale i cinghiali osservati erano 127. Sono state poste in relazione le lesioni microscopiche e macroscopiche con fattori biologici come il sesso e l'età. Centocinque cinghiali su 127 (82,7%) presentavano lesioni macroscopiche causate da tubercolosi. Undici cinghiali (8,7%) presentavano lesioni microscopiche e 11 (8,7%) non ne presentavano. Le lesioni interessavano i linfonodi di 116 cinghiali. Un totale di 49 cinghiali presentava lesioni confinate a una regione anatomica (42,2%), mentre 67 cinghiali ne presentavano in diverse regioni anatomiche (57,8%). La proporzione non differiva di molto tra i sessi (maschi 66%, femmine 55%) e neanche nelle

diverse età (striati 58,3%, giovani 66,7%, adulti 50%). I linfonodi della testa, in particolare i sottomandibolari erano i più colpiti (107 su 116, 92,2%) e 43 cinghiali (40,2% dei 106 che presentavano lesioni macroscopiche) presentavano esclusivamente lesioni ai linfonodi mandibolari. Le lesioni nei linfonodi retrofaringei (n=11) e nella parotide (n=8) erano osservate solo se l'animale presentava lesioni anche ai linfonodi sottomandibolari. Anche altre parti anatomiche erano interessate: le tonsille, la valvola ileocecale e la milza. In tre casi si osservavano lesioni all'apparato mammario e in altri tre casi ai linfonodi renali. Sessanta dei 116 cinghiali (51,7%) presentavano lesioni al polmone o ai linfonodi toracici.

L'epidemiologia, i fattori biologici e di popolazione, la conoscenza delle caratteristiche e della distribuzione delle lesioni, la loro importanza nel meccanismo della trasmissione della malattia, sono essenziali per capire il ruolo di un animale selvatico come *reservoir* di tubercolosi. Le caratteristiche istopatologiche delle reazioni tubercolari, e i danni tissutali associati in vari organi, insieme alla grande diffusione della malattia, indicano che i cinghiali con infezione generalizzata e con numerose lesioni hanno la potenzialità di espellere micobatteri attraverso varie vie.

Questo risultato, in un contesto di aree recintate, con alte densità di cinghiali, insieme a questa forte evidenza epidemiologica, rinforza l'ipotesi che il cinghiale possa essere un vero *reservoir* di tubercolosi in alcune zone della Spagna centro-meridionale (Martin-Hernando *et al.*, 2007).

In Italia, i dati ottenuti da alcune ricerche, non sembrano essere concordanti con la situazione spagnola. Bisogna sottolineare che nella nostra penisola il panorama ecologico è completamente differente così come lo è la gestione della specie. Questi fattori vanno ad agire sull'epidemiologia della tubercolosi nei selvatici, che per questo non può essere paragonata a quella spagnola. In un'indagine epidemiologica nel cinghiale, sono stati esaminati i linfonodi sottomandibolari e retrofaringei di 2488 capi abbattuti durante il 1995 nelle province di Imperia e Savona. Sono state individuate lesioni riconducibili a infezione tubercolare in 300 animali (12,1%). Inoltre 113 campioni su 257 analizzati con una sonda DNA (*Gen-Probe Mycobacterium tuberculosis complex Test*) sono risultati positivi per micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis complex*. L'isolamento in coltura è stato tentato dai linfonodi di 125 cinghiali esaminati nel periodo 1993/95 e da 16 bovini

provenienti dall'area di studio.

Isolati sono stati ottenuti in 27 casi dal cinghiale (16 *M. bovis*, 6 *M. avium*, 1 *M. tuberculosis* e 4 ceppi di micobatteri a rapida crescita) ed in 15 casi dai bovini (tutti *M. bovis*). Gli isolati sono stati individuati con la metodica dello *spoligotyping* che ha permesso di evidenziare come un unico spoligotipo prevalga nella maggior parte dei cinghiali e dei bovini esaminati. La frequenza delle lesioni macroscopiche è positivamente correlata all'età dei soggetti esaminati; al contrario, il numero dei soggetti positivi all'infezione tende a diminuire nella fascia d'età dei soggetti maturi, tanto che 15 dei 16 ceppi di *M. bovis* isolati da cinghiali sono stati ottenuti da soggetti di età inferiore a 12 mesi.

Un quadro riepilogativo dell'epidemiologia della tubercolosi nel cinghiale nella Liguria di ponente, riferito al periodo 1989-2003, è riassunto nella tabella n. 1.

ANNO	CAPI ESAMINATI	CAPI CON LESIONI RIFERIBILI A TUBERCOLOSI	PREVALENZA %
1989	32	6	18,8
1990	190	37	19,5
1991	56	13	23,2
1992	117	16	13,7
1993	78	8	10,3
1994	58	6	10,3
1995	1141	137	12,0
1996	1316	191	14,5
1997	1362	141	10,7
1998	1924	284	14,8
1999	1413	150	10,6
2000	2147	229	10,6
2001	2359	261	11,1
2002	1774	197	12,6
2003	3103	201	8,7
totale	17070	1877	-

Tabella 1. Provincia di Imperia: prevalenza di lesioni riferibili a tubercolosi anni 1989-2003. (www.sanluigi.piemonte.it)

Questi risultati concordano con quelli ottenuti in precedenza da altri ricercatori, che hanno osservato come con l'aumento dell'età dei soggetti esaminati, (sono già individuabili lesioni in soggetti di 4 mesi) aumenta anche la prevalenza di animali con lesioni macroscopiche e diminuisce, allo stesso tempo, la frequenza di

isolamenti colturali (Corner *et al.*, 1981). Il fatto che con il crescere dell'età aumentino le probabilità di contrarre l'infezione, sembra indicare che i cinghiali sono continuamente esposti ai micobatteri.

Studi recenti hanno mostrato la scarsa sopravvivenza dei micobatteri nell'ambiente (Jackson *et al.*, 1995) ma, in questo esperimento, i micobatteri erano stati depositati sulla superficie del terreno. Ben maggiore – fino a 2 anni – è la sopravvivenza dei micobatteri, che per varie cause, si trovano nel terreno a maggiore profondità (Wray, 1975). Considerando che buona parte dell'alimentazione del cinghiale è data da alimenti ipogei (Briederman, 1986), si può ben immaginare come questa specie possa, durante il grufolamento, venire facilmente a contatto con micobatteri sepolti nel terreno. La drastica diminuzione degli isolamenti di micobatteri con il progredire dell'età dei cinghiali, fa supporre la capacità della specie di contrastare l'infezione e neutralizzare i micobatteri nelle lesioni (Corner *et al.*, 1981). Anche la diminuzione di positività al test MTD nei tubercoli calcificati e con fibrosi, potrebbe ricondursi a processi di autosterilizzazione, che sono appunto caratterizzati dal progressiva fibrosi delle lesioni (Ray *et al.*, 1972).

Sulla base dei dati raccolti (localizzazione delle lesioni, limitate ai linfonodi della testa; quadro istopatologico; risultati dell'isolamento e dello spoligotyping; situazione sanitaria del bestiame domestico), il cinghiale non sembra avere un ruolo importante nel mantenimento dell'infezione da *Mycobacterium bovis* nel ponente ligure (Dini *et al.*, 2003). Ciò nonostante negli ultimi decenni, a causa di modificazioni nell'uso del territorio e dei cambiamenti nella gestione dell'attività venatoria, le popolazioni di cinghiale hanno incrementato in modo rilevante la loro consistenza numerica e interferiscono sempre di più con le attività antropiche di tipo agricolo e zootecnico. Sarebbe opportuno quindi proseguire nel monitorare lo stato sanitario delle popolazioni di cinghiale, estendendo l'indagine anche ad altre specie a vita libera che condividono con il suide lo stesso habitat, quali cervi, caprioli, volpi e tassi, per avere un quadro completo della situazione relativa alle infezioni da micobatteri nella fauna selvatica.

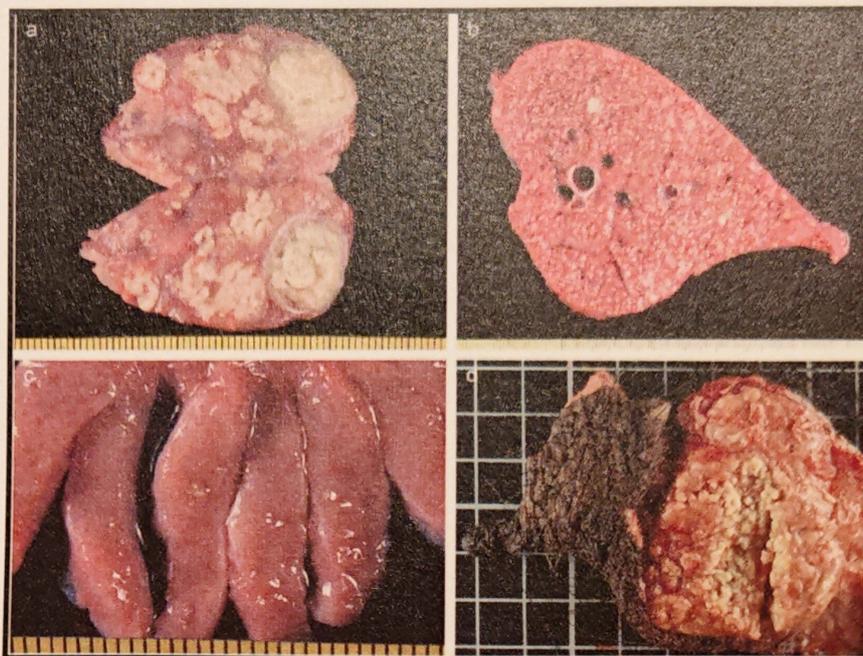


Figura 1. Lesioni macroscopiche nel cinghiale europeo: (a) lesioni calcificate nel linfonodo mandibolare. (b) sezione di polmone con lesioni generalizzate. (c) lesioni diffuse di 2-3 mm nelle tonsille. (d) lesioni a carico della ghiandola mammaria (da Martin-Hernando *et al.*, 2007).

1.2. I vaccini orali.

In molti paesi continuano a persistere malattie virali e batteriche a causa della presenza di *reservoir* tra gli animali selvatici. La rabbia, la malattia di Lyme, la tubercolosi, la brucellosi, possono diventare un serio problema per la salute pubblica o per le produzioni zootecniche.

Nella maggior parte dei casi il controllo con l'abbattimento degli animali non è facilmente attuabile, è difficilmente accettato a livello di opinione pubblica e, in alcuni casi, è di dubbia efficacia. Queste motivazioni hanno fatto sì che negli ultimi decenni la sperimentazione abbia prestato sempre più attenzioni alla vaccinazione preventiva. In particolare la vaccinazione orale contro la rabbia nei carnivori nel Nord America e in Nord Europa, si è rivelata una buona strategia alternativa di controllo delle malattie nei selvatici. L'esempio più eclatante è quello relativo alla rabbia silvestre nella volpe che viene riassunto nel box a cui si rimanda.

Un ulteriore approfondimento sulla versatilità d'uso della vaccinazione per via orale viene compendiato nella tabella n. 2.

Il caso della volpe.

La rabbia è una importante zoonosi, causata da un virus appartenente alla famiglia del *rabdovirus*, genere *Lyssavirus*. Colpisce animali selvatici e domestici e si può trasmettere all'uomo e ad altri animali attraverso il contatto con saliva di animali malati. Il cane per il ciclo urbano e la volpe per il ciclo silvestre sono attualmente gli animali maggiormente interessati.

La rabbia in Europa è prevalentemente silvestre. In passato i metodi tradizionali per il controllo della rabbia silvestre come le intense campagne di abbattimento o di cattura con trappole, miravano a diminuire la via naturale di trasmissione tra le volpi riducendo la loro densità. Tuttavia questi metodi erano incapaci di mantenere le volpi sotto un certo numero e diminuire l'incidenza della malattia.

La vaccinazione orale delle volpi contro la rabbia, sviluppata negli ultimi 25 anni, ha offerto una nuova prospettiva nel controllo della malattia. La prima campagna di vaccinazione orale fu condotta con successo in Svizzera nel 1978, seguita dalla Germania nel 1983. Da allora questo metodo si è rivelato come l'unica via per l'eliminazione della rabbia nella volpe e nelle altre specie *reservoir* perché se la rabbia viene eliminata nella volpe, scompare anche negli animali domestici.

I risultati ottenuti con questo metodo sono rilevanti: il numero annuale dei casi di rabbia è diminuito da 21.000 nel 1990 a 5.400 nel 2004. In molte parti dell'Europa centro-orientale, la rabbia è stata così controllata ed eradicata. Molti paesi come la Finlandia e l'Olanda (1991), l'Italia (1997), la Svizzera (1998), la Francia (2000), il Belgio e il Lussemburgo (2001) e la Repubblica Ceca (2004), si sono dichiarati ufficialmente indenni dalla rabbia.

Per la vaccinazione orale delle volpi e del cane procione vengono usati vaccini vivi modificati, vaccini vivi attenuati e vaccini a virus ricombinanti. Il vaccino contenuto in un involucro è inserito in un'esca composta da pesce disidratato, grasso e paraffina. Le esche con il vaccino vengono depositate negli habitat delle volpi.

Sono stati sviluppati altri sistemi di distribuzione delle esche con il vaccino. La distribuzione aerea con elicotteri o piccoli aerei è quella più usata. Personale adeguatamente formato fa cadere le esche ad un ritmo prestabilito. La distribuzione manuale del vaccino è una via complementare di distribuzione impiegata nei siti urbani e suburbani (parchi cimiteri, aree industriali, proprietà private, ecc).

Disease	Region	Wildlife species	Reason for consideration	Status of wildlife vaccine
Rabies (<i>lyssavirus</i>)	Northern Europe	<i>Red fox, exotic Asian raccoondog, arctic fox</i>	Human health risk	Recombinant vaccinia virus expressing rabies virus glycoprotein G used in extensive oral wildlife vaccination campaigns for last 15 years to control rabies in Europe and North America
	North America	<i>Raccoon, gray and red foxes, coyote, skunks, arctic fox</i>	Human health risk	Attenuated live rabies vaccines considered for use against arctic rabies reservoirs (arctic fox and raccoon dog)
Lyme disease (<i>B. burgdorferi</i>)	NE United States	<i>White-footed mice</i>	Human health risk	Experimental (parenteral) vaccination of wild whitefooted mice with <i>Borrelia</i> outer surface protein A successful in reducing carrier status (NB: studies in laboratory mice have shown protection via oral-route vaccination with live recombinant <i>E. coli</i> or vaccinia virus expressing OspA)
Plague (<i>Yersinia pestis</i>)	United States (Central/North plains)	<i>Black-tailed prairie dog</i>	Human health risk and risk to endangered black-footed ferrets	Experimental oral vaccination of captive prairie dogs with recombinant raccoon poxvirus expressing <i>Y. pestis</i> F1 protein shown to protect against <i>Y. pestis</i> challenge
Tuberculosis (<i>M. bovis</i>)	Great Britain, Ireland	<i>Eurasian badger</i>		Parameters of experimental (parenteral) vaccination of badgers with attenuated <i>M. bovis</i> BCG investigated; development of oral-delivery BCG-based vaccine under consideration
	New Zealand	<i>Brushtail possums</i>	Economic risk to livestock production	Proof-of-concept for BCG-based vaccination of <i>possums</i> via oral or intra-nasal/conjunctival routes; protection against virulent <i>M. bovis</i> challenge demonstrated field and captive animals
	Northern United States	<i>White-tailed deer</i>		Development of oral-delivery BCG-based vaccine under consideration for use in <i>white-tailed deer</i>
	Kruger National Park (South Africa)	<i>African buffalo</i>	Risk to adjacent livestock; risk to iconic species (lions) consuming infected animals	Parenteral-route BCG vaccination has undergone a preliminary trial to determine protection against virulent <i>M. bovis</i> challenge
Brucellosis (<i>Brucella abortus</i>)	United States (Yellowstone National Park)	<i>Elk, bison</i>	Economic risk to adjacent livestock	Proof-of-concept for oral- or parenteral-route vaccination using attenuated <i>B. abortus</i> strain RB51; vaccine delivery via ballistic bullet shown to be effective
Pseudorabies, Aujeszky's disease (<i>porcine herpesvirus</i>)	Southern United States	<i>Feral pigs</i>	Economic risk to commercial piggeries	Development of an oral-delivery live recombinant pseudo rabies vaccine under consideration
Pasteurellosis (<i>Mannheimia haemolytica</i>)	United States, Various populations	<i>Bighorn sheep</i>	Protection of iconic species	Experimental (parenteral) vaccination of big horn sheep; results showed limited protection against <i>Mannheimia</i> challenge
Anthrax (<i>Bacillus anthracis</i>)	Etosha National Park, Namibia	<i>Cheetah and black rhinoceros</i>	Protection of iconic and endangered species	Parenteral vaccination of sedated animals; sera taken and passively transferred to mice in order to demonstrate established protection against <i>B. anthracis</i> spore challenge

Tabella 2. Stato attuale dello sviluppo dei vaccini contro malattie a carattere diffusivo negli animali selvatici (da Cross *et al.*, 2006).

L'efficacia di vaccino orale da somministrare alla fauna selvatica dipende dalla combinazione di 3 componenti: un efficace immunogeno, un buon veicolo e una esca alimentare specie-specifica (Cross *et al.*, 2006).

La possibilità di controllare le malattie nelle popolazioni di cinghiale è auspicabile per migliorare la sanità animale, ma anche per assicurare una buona produzione cinegetica, la conservazione e garantire la salute pubblica. Esistono 3 vie d'azione: 1) utilizzo di metodi diretti, 2) utilizzo di metodi indiretti, 3) non intervento (Wobeser, 1994). La vaccinazione rientra nei metodi diretti. I metodi indiretti includono principalmente la riduzione della densità di popolazione. Infine il non intervento è una alternativa da accettare quando i costi di intervento superano i benefici sperati.

L'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) considera prioritario lo sviluppo e la sperimentazione di vaccini per la fauna selvatica dove esista un problema di tubercolosi legato ad essa. In accordo con una recente revisione, esistono esperienze di vaccinazione preventiva contro la tubercolosi nell'opossum, nel tasso, nel cervo e nel bufalo africano. Attualmente si sta valutando una prova di campo in Nuova Zelanda per valutare l'efficacia di una mutazione attenuata di *M.bovis* (BCG) descritta all'inizio del 20° secolo (Calmette *et al.*, 1927) per immunizzare l'opossum in condizioni naturali. Il vaccino si introduce in esche alimentari con involucro lipidico per evitare la barriera acida dello stomaco.

In Irlanda è in avanzato stadio la realizzazione di una prova di campo con BCG orale nel tasso (Buddle *et al.*, 2006). Nel Regno Unito il Departement for Environnement, Food and Rural Affairs (DEFRA) realizza prove di vaccinazione parenterale nel tasso.

Sono assai scarse le conoscenze esistenti sull'applicazione di vaccini nel cinghiale. Il caso più studiato è quello della Peste Suina Classica. Nell'UE si stanno attualmente sviluppando estese campagne di vaccinazione del cinghiale con un ceppo attenuato del virus. Il vaccino si introduce in forma di blister in una esca rigida a base di cereali che si interra in superficie. Si sa che la applicazione di vaccini in aree definite è efficace quando la densità dei cinghiali e la prevalenza dell'infezione sono moderati. Studi sperimentali hanno permesso di conoscere aspetti importanti come il periodo migliore di vaccinazione, le caratteristiche delle esche alimentari, la quantità e la distribuzione ottimale degli stessi, la proporzione

degli animali trattati, le variazioni legate all'età, ecc. (Kaden *et al.*, 2000, Brauer *et al.*, 2006). Bisogna però considerare che questi studi sono stati eseguiti su popolazioni naturali di cinghiale in Germania, con densità minori e condizioni climatiche e ambientali molto diverse da quelle degli ecosistemi mediterranei.

Negli Stati Uniti si studia la possibilità di controllare la Brucellosi suina nel maiale rinselvatichito, con un altro tipo di esca. In questo caso si tratta di un amalgama di melassa con "nueces pecanas", un frutto sudamericano utile per scarificare la mucosa orale facilitando la penetrazione del vaccino.

Per la tubercolosi nel complesso *M.tuberculosis* non si conoscono esperienze di vaccinazione nel cinghiale anche se ne esistono in relazione alla tubercolosi aviare (Hines *et al.*, 1998). Le prove di laboratorio suggeriscono inoltre che è preferibile immunizzare gli animali in giovane età per evitare le interferenze con micobatteri ambientali. In alcune specie l'immunità dura più di 12 mesi e il grado di immunità può dipendere dalla dose, con molta variazione nella risposta quando si immunizza con dosi eccessivamente alte o ripetute (Buddle *et al.*, 2006). Risulta evidente che la via orale è quella preferita nello sviluppo di vaccini orali per la fauna selvatica. Tuttavia il più grande limite dell'efficacia della vaccinazione orale è legata allo stesso immunogeno. Sono state analizzati vari materiali per la buona conservazione dei bacilli come matrici lipidiche, microsfele di polisaccaridi, essendo necessario garantire la presenza di un buon numero di batteri vivi nei siti di induzione immune.

Una recente review (Cross *et al.*, 2006) evidenzia come la capacità degli animali vaccinati con BCG nel produrre una risposta immune cellulo-mediata, dipenda non solo dalla distribuzione di bacilli vivi nei siti di induzione ma anche dalla persistenza e replicazione in situ di bacilli nel sistema linfatico del tratto alimentare. Il buon esito di una vaccinazione con BCG risulta essere quindi la deposizione di un sufficiente numero di bacilli vivi nel sistema linfatico del tratto alimentare in grado di assicurare una replicazione batterica, per mantenere una prolungata risposta immune. Il punto di induzione immune per la via orale di BCG è localizzato nell'intestino tenue mentre altri vaccini per la fauna selvatica hanno altri siti di induzione come la orale-mucosale. In questo caso il sito di replicazione e la sua induzione immune si trova nel tessuto linfatico faringeo e buccale. Sono state adottate in questo caso strategie per prolungare il tempo di permanenza del

vaccino nella cavità buccale, al fine di aumentare il contatto con la mucosa ad esempio utilizzando sostanze scarificanti o agenti mucosali bioadesivi selettivi

1.3. Il vaccino BCG

L'identificazione nel 1882 del *Mycobacterium tuberculosis* come agente eziologico della tubercolosi, aprì nuove strade nella prevenzione e nel controllo di questa malattia. Si testarono molti vaccini con bacilli morti e con bacilli vivi ma attenuati. Albert Calmette e il suo aiutante Camille Guérin osservarono che un ceppo virulento di bacillo di tubercolosi bovina, attraverso coltivi successivi, perdeva la sua virulenza. Con questo venne elaborato un vaccino che venne sperimentato sugli animali e in seguito sui bambini. Il vaccino del bacillo Calmette–Guérin (BCG) cominciò ad essere usato in Europa già nel 1921 per la prevenzione della tubercolosi umana e oggi è incluso nei programmi di vaccinazione di molti paesi.

In molti casi BCG è un vaccino liofilizzato di bacilli vivi, non patogeni, derivante da un ceppo di *Mycobacterium bovis* attenuato. Questo vaccino ha la capacità di sviluppare una risposta immune anche nei confronti di *M.tuberculosis*. Ad oggi, nessun vaccino si è dimostrato più efficace di BCG. Ciò nonostante la vaccinazione orale con BCG pone 2 principali problemi: assicurare che i bacilli rimangano vivi nell'esca fino al momento dell'induzione immune e assicurare che la conseguente risposta immunitaria sia sufficiente a conferire una protezione immune efficace.

La combinazione di BCG con proteine o vaccini DNA ha prodotto risultati promettenti. Nella attualità si sta studiando anche lo sviluppo di altri mutanti di *M.bovis*, non reversibili a virulenza e che non contengano geni di resistenza agli antibiotici (Buddle *et al.*, 2006, Martìn *et al.*, 2006).

Nel progetto a cui fa capo questa tesi si intende utilizzare il ceppo attenuato di *M.bovis* BCG Pasteur 1173P2 per preparare un vaccino liquido diluito con siero PBS. Il progetto intende verificare l'efficacia di questo vaccino per il cinghiale.

1.4. Il “Progetto tubercolosi in Spagna”.

Il progetto all'interno del quale rientra questo lavoro di tesi riunisce esperti di fauna

selvatica e di malattie infettive (micobatteriosi) appartenenti a 3 istituti di riconosciuta esperienza: Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC – UCLM- JCCM), L'Instituto Complutense de Sanidad Animal (UCM), e l'Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker).

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare tecnologie che conducano alla possibilità di immunizzare il cinghiale, principale *reservoir* di tubercolosi in Spagna. L'obiettivo finale è quello di controllare la malattia nelle popolazioni selvatiche che condividono territori con specie domestiche (bovini, caprini, suini).

Questo progetto si pone 3 obiettivi:

- Mettere a punto un sistema di esche alimentari che permetta la somministrazione di vaccini ai cinghiali.
- Caratterizzare e comparare la risposta immune del cinghiale a BCG e ai micobatteri inattivati.
- Progettare un vaccino orale costituito da esca alimentare e antigene che sia efficace nell'immunizzazione del cinghiale di fronte alla tubercolosi.

Questi 3 obiettivi globali si articolano nelle seguenti fasi:

1. Sviluppare esche adeguate per la somministrazione orale di medicinali ai cinghiali.
2. Studiare la risposta immune del cinghiale inseguito a immunizzazione con BCG viva.
3. Studiare la risposta immune del cinghiale in seguito a immunizzazione con micobatteri inattivati.
4. Studiare la possibile escrezione di BCG da parte di animali vaccinati.
5. Studio sulle varie forme di distribuzione orale di vaccini.
6. Elaborazione di un documento tecnico sopra il buon funzionamento o meno dell'immunizzazione orale del cinghiale.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo principale è stato quello di studiare alcune fasi del comportamento alimentare del cinghiale, con il metodo delle Track station e il supporto di trappole fotografiche, al fine di rilevare la reazione di questa specie alla presentazione di esche alimentari.

In particolare sono stati esaminati i seguenti aspetti:

1. Verifica dell'idoneità della capsula contenente il vaccino e dell'esca nel suo insieme ad essere assunte dal cinghiale.
2. Verifica della selettività delle esche con il metodo della Track station e il supporto della trappola fotografica.
3. Verifica del consumo di esche alimentari all'interno delle mangiatoie (governe) selettive da parte degli striati.

3. AREA DI STUDIO

3.1. Localizzazione geografica.

Il lavoro è stato realizzato nella riserva privata di caccia "la Morera", di proprietà della società "Yolfi Properties" dal 1988 (figura n. 2). La proprietà occupa una superficie totale di 938,38 ha, distribuiti in due comuni, Abenojar (865,64 ha) e Cabezarados (72,74 ha) in provincia di Ciudad Real nella Regione Castilla-La Mancha (centro-sud della Spagna (coordinate UTM: fuso 30, fascia S: 387.305 - 390.948, 4.306.205 - 4.309.5618).

La circolazione all'interno dell'appezzamento è garantita da una rete di strade che lo percorrono in tutte le direzioni. Esiste una strada principale lungo tutto il perimetro della riserva che si dirama in strade secondarie, che permettono di raggiungere qualsiasi punto, facilitando l'accesso alle diverse strutture della riserva (governe, abbeveratoi, altane, postazioni di caccia). La riserva presenta una altitudine media di 755 m (min 660, max 830). La topografia è caratterizzata dall'esistenza di 5 colli che fiancheggiano le tre valli principali: valle de "La Casa" con disposizione N-S, valle de "Las Palomas" con disposizione SO-NE, e la valle de "Los Machos" con la stessa disposizione della valle precedente. Sono presenti due ruscelli stagionali di poca entità, tanto in longitudine come nel tempo che presentano acqua. Entrambi presentano una disposizione NO-SE. La portata di questi due ruscelli è ridotta e per questo motivo sono stati creati artificialmente 13 stagni di acqua permanente, intorno ai quali gli animali si radunano. Questo fattore costituisce un notevole punto di contatto tra di essi. Inoltre la riserva dispone di 5 pozzi di acqua, utilizzabili dagli animali per l'abbeverata durante tutto l'anno.

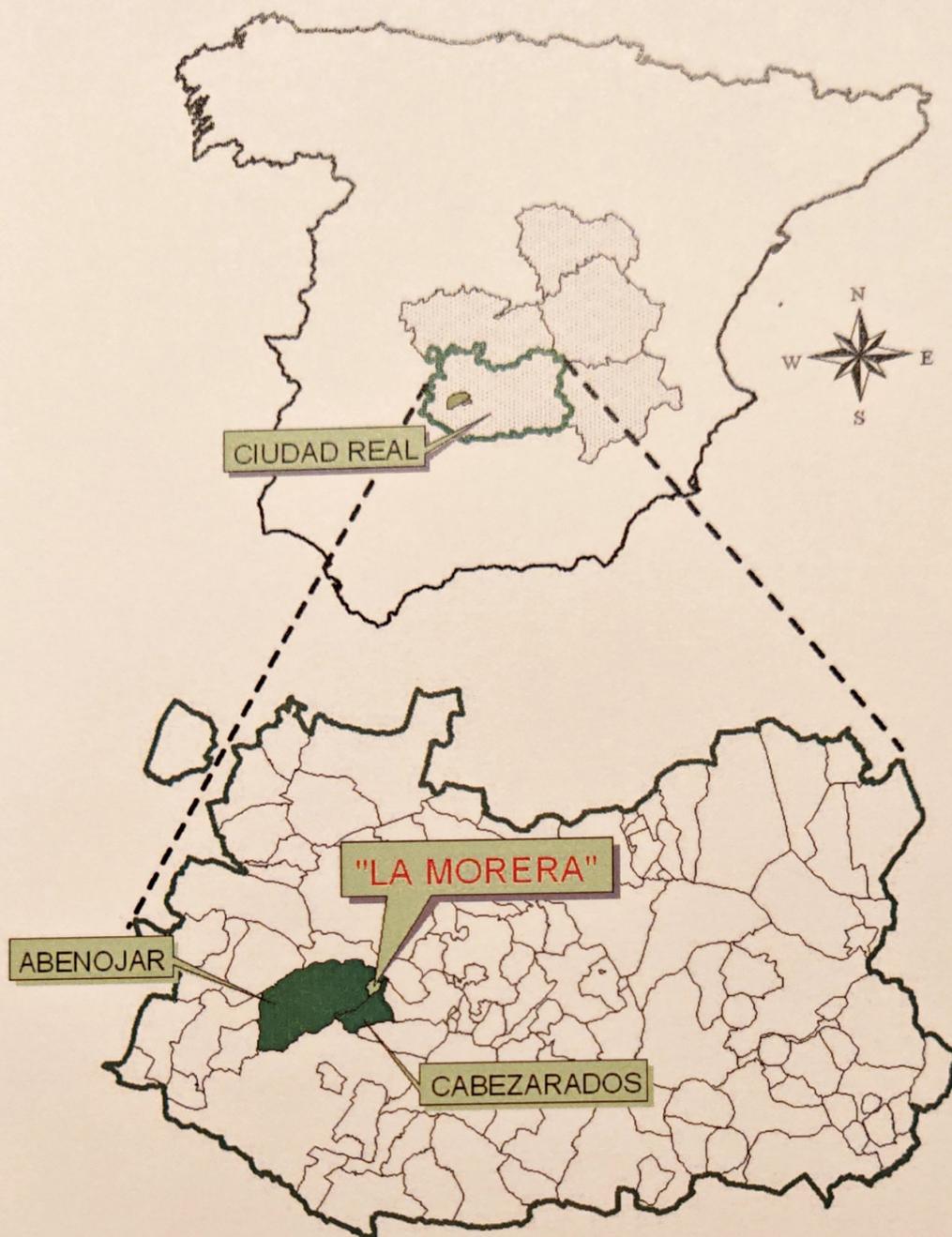


Figura 2. La localizzazione della Castilla-La Mancha nella penisola iberica. In verde chiaro la riserva di caccia "La Morera".

3.2. Climatologia

La riserva si trova nel dominio climatico mediterraneo-continentale. La media annuale delle precipitazioni nell'anno 2002 è stata di 406 mm, in questo caso insufficiente per un rendimento elevato della maggior parte dei coltivi. È caratteristica di questa zona l'alternarsi di anni piovosi e secchi. Sebbene le precipitazioni abbiano un carattere mediterraneo, le temperature presentano tratti di marcata continentalità. Questo potrebbe sembrare insolito data la latitudine, ma

è normale se si tiene conto dell'altitudine e della disposizione del rilievo. Il regime termico è caratterizzato da inverni freddi e lunghi, primavere corte e temperate, con gelate abbondanti e frequenti. Nei mesi estivi si possono raggiungere i 40-45 gradi. Le variazioni termiche giornaliere e stagionali sono rilevanti.

3.3. Flora e uso del suolo

La superficie agricola all'interno della riserva non rappresenta grande importanza e la totalità dei coltivi esistenti è esclusivamente destinata agli animali. Non sono presenti coltivi con fine produttivo. Esistono sette tipologie di uso del suolo: edifici, specchi d'acqua, dehesa (un tipico sistema agroforestale caratteristico della regione), eucalipti, arbusti e cespugli, rimboschimenti di quercia e rovere (Tabella n. 3 e figure n. 3, 4 e 5).

Uso del suolo	Legenda Corine	Area (ha)	%
Edifici	Tessuto urbano discontinuo	1,46	0,16
Specchi d'acqua	Laghi e stagni	1,58	0,17
Dehesa*	Sistemi agroforestali	390,52	41,62
Eucalipti	Eucalipti	1,47	0,16
Cespugli	Cespugli xerofili e mesofili	504,6	53,77
Rimboschimento di querce	Coltivi permanenti	37,10	3,95
Rovere	Sempreverdi e rovere	1,65	0,18

Tabella 3. Uso del suolo all'interno della riserva privata di caccia " La Morera" (* tipico sistema agroforestale caratteristico della regione).



Figura 3. Fotografia aerea della riserva. Si noti la elevata compenetrazione fra la macchia mediterranea (grigio scuro) e il pascolo (grigio chiaro) .



Figura 4. La figura rappresenta l'uso del suolo, le infrastrutture presenti nella riserva e le installazioni per la gestione degli ungulati: specchi d'acqua, postazioni di caccia, pali per lo sfregamento dei palchi dei cervi, ecc.



Figura 5. Il paesaggio caratteristico della riserva di caccia "La Morera"

3.4. Specie oggetto di caccia presenti nella riserva.

Nel 1988, quando venne acquistato l'appezzamento, questo era adibito all'allevamento del bestiame e alla pratica della cosiddetta "caza menor" ovvero della caccia alla pernice rossa, al coniglio selvatico, alla lepore iberica, ecc.. Senza dubbio la "caza mayor" (caccia agli ungulati) era poco praticata. In questo stesso anno i proprietari cominciarono ad introdurre ungulati, ponendo attenzione particolare al cervo iberico. Parallelamente si introdussero cinghiali, mufloni e ammotraghi.

Dall'inizio della gestione delle popolazioni, è stata posta particolare attenzione alla purezza genetica dei cervi, come punto chiave della gestione. Il resto delle specie presenti sono andate incontro a tipi di gestione molto differenti.

Due specie di bovidi alloctone, (ammotrigo e muflone) sono presenti storicamente nella riserva, con abbondanza di popolazione ridotta e omogenea nel corso degli

anni, a testimoniare la sostenibilità della caccia e il controllo delle popolazioni (Chico, 2004).

Il cinghiale è aumentato numericamente fino al 1995. A partire da allora la gestione ha puntato a ridurre il numero degli effettivi, fino ad arrivare alla sua eradicazione nel 2004 (per motivi di inquinamento genetico dovuto all'incrocio con il suino domestico). Successivamente è stato reintrodotta con soggetti "puri".

Da allora il numero di cinghiali all'interno della riserva è andato incontro ad una esplosione demografica e il numero di esemplari si aggira oggi intorno alle 200 unità.

4. Materiali e metodi

4.1. La trappola fotografica

Fra le diverse tecniche di fotografia naturalistica, il trappolaggio fotografico ha un posto di primaria importanza, soprattutto nella ripresa delle specie più elusive come la lince, l'orso, il lupo ecc. La storia delle trappole fotografiche è molto antica. I primi sistemi di questo tipo sono nati nel lontano 1888 ad opera di sir George Shiras III che utilizzò ingombranti fotocamere con emulsione a lastra e flash a polvere. Una trappola fotografica è un sistema in grado di fotografare un soggetto senza il bisogno della presenza di un operatore. Il trappolaggio fotografico è utile per documentare la presenza di animali, per comprenderne le abitudini e raccogliere altri importanti dati scientifici. Permette di avere un approccio rispettoso degli animali, meno invasivo di un sistema di cattura tradizionale. Questa tecnica permette l'abbattimento drastico dei tempi e dei costi della ricerca perché lavora nelle condizioni di attesa più dure, anche di notte, nelle condizioni alle quali un operatore non può resistere.

L'utilizzo di trappole fotografiche su carnai o su governe permette di acquisire importanti informazioni sulla popolazione e sugli individui che la compongono. In specie territoriali può dare informazioni sull'utilizzo dello spazio da parte dei singoli individui. I vantaggi di questa tecnica sono notevoli e possono essere così riassunti:

- riduzione dei costi
- risultati nel breve periodo
- impiego ridotto di personale
- possibilità di rilevazione in situazioni ambientali proibitive per la presenza umana

La trappola fotografica che è stata usata in questa ricerca per studiare il comportamento dei cinghiali è prodotta dalla ditta americana Leaf River e il modello è Trail Scan Hunt 24-7 Model iR-3BU (figura n. 6). La macchina scatta foto in bianco e nero con una qualità di 4-mega pixel. Ha la possibilità di regolare il numero di foto eseguibili in un minuto e al suo interno le immagini vengono memorizzate su una card che contiene fino a 1200 foto. Un sensore ad infrarossi si attiva al passaggio dell'animale, permettendo così lo scatto.

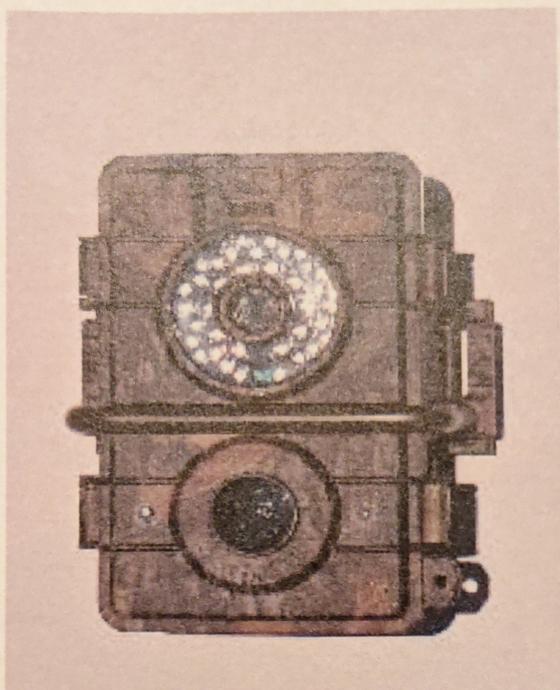


Figura 6. La trappola fotografica modello iR-3BU della ditta americana Leaf River, utilizzata per osservare alcune fasi del comportamento alimentare dei cinghiali.

4.2. La «Track-station»

Le stazioni di impronta o *estaciones de huella* o *Track station* sono superfici circolari di un metro di diametro ($0,79 \text{ m}^2$), preparate sul suolo, costituite da un fondo sottile in argilla e terra finemente setacciata, al centro delle quali vengono poste sostanze attrattive (feci, esche alimentari, o sostanze odorose). Dopo una notte si ritorna alle stazioni e si osserva quali di esse sono state visitate. Osservando le impronte che gli animali lasciano all'interno della stazione possiamo ricavare numerose informazioni come: specie, classe d'età, consumo o meno dell'esca, delle feci o di ciò che si vuole osservare.

Nello studio sull'alimentazione e sul comportamento dei carnivori, la tecnica prevede di predisporre al centro della stazione sostanze fortemente odorose, in grado di attirare gli animali (scent station). La percentuale di stazioni visitate ci dà un indice di abbondanza della specie studiata.

Nel caso specifico l'obiettivo era quello di verificare se il cinghiale si nutrisse o meno di esche alimentari, all'interno delle quali sarà possibile porre, in un secondo momento, il vaccino contro la tubercolosi. La bibliografia riporta track station simili a quelle realizzate in questo esperimento. Livingston (2005) ha utilizzato stazioni

circolari con superficie pari a 0,79 m² per studiare la coprofagia e la dieta del coyote (*Canis latrans*) e della lince nord americana (*Linx rufus*). In un altro studio lo stesso autore ha analizzato i tempi di rimozione delle feci dalla track station da parte di animali della stessa specie o da parte di altre specie.

4.3. Le esche alimentari.

Nella progettazione del vaccino orale si è posta particolare attenzione alle caratteristiche dell'esca alimentare contenente l'antigene. La forma non eccessivamente grande è stata pensata per un facile consumo da parte delle classi d'età più giovani, striati e rossi. La vaccinazione in giovane età permette una buona immunizzazione futura. L'aromatizzante al tartufo e alla cannella specifico per cinghiali, aumenta l'appetibilità della stessa. La forma è cilindrica, con l'estremità superiore arrotondata e il suo peso si aggira intorno ai 10-11 grammi. L'altezza è di 1,6 cm e la larghezza di 3,4 cm. La composizione è la seguente:

1. 43,47% mangime per striati
2. 21,73% farina di grano
3. 16,4% paraffina
4. 16,4% zucchero
5. 2% aromatizzante al tartufo e cannella

All'interno dell'esca viene posta una piccola capsula in polietilene con capacità di 200 µl, di consistenza non eccessivamente dura, contenente il vaccino (BCG + siero PBS) (figura n. 7).

Uno degli obiettivi di questo lavoro era proprio quello di capire se il cinghiale masticando l'esca, rompesse la piccola capsula contenuta al suo interno, così che il vaccino potesse venire a contatto con la mucosa buccale e faringea, provocando l'induzione immune (figure n. 8 e 9).

La preparazione dell'esca con il vaccino prevede le seguenti fasi:

- Scaldare su piastra 10 grammi di paraffina in pellet con punto di fusione tra 51 e 54 gradi, fino a che passi allo stato liquido.
- Aggiungere 10 grammi di zucchero e mescolarlo alla paraffina liquida.
- Aggiungere poco a poco 40 grammi della miscela composta da mangime per striati e farina di grano e mescolare bene fino ad

ottenere una buona amalgama, scaldando di tanto in tanto ma facendo attenzione a non cuocere gli ingredienti.

- Aggiungere l'aromatizzante e mescolare ancora.
- Posizionare una quantità di impasto nello stampo, aggiungere la capsula con il vaccino e ricoprire con un'altra quantità di impasto e aspettare fino al suo indurimento.

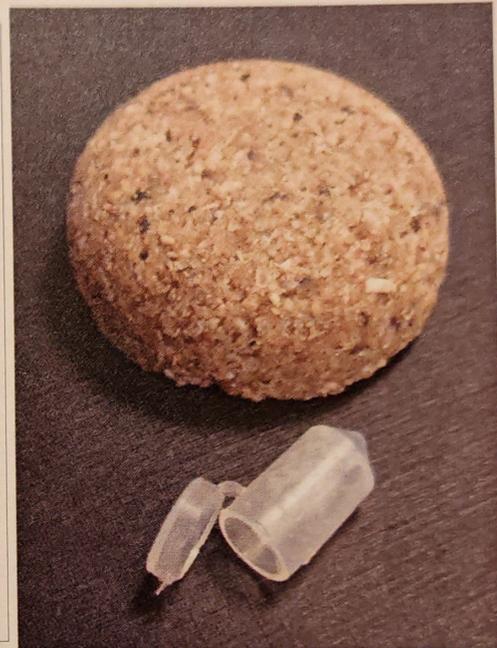
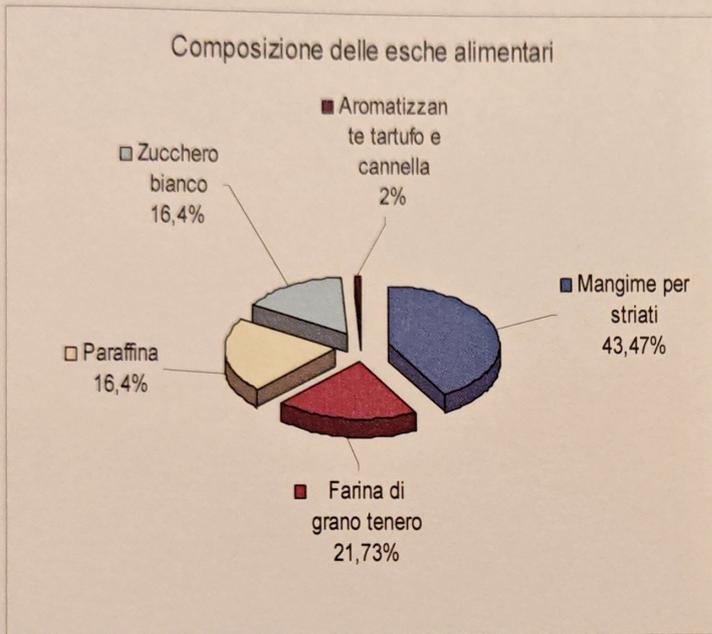


Figura 7. A sinistra la composizione delle esche. A destra l'esca alimentare e la capsula contenente il vaccino, posizionata al suo interno al momento della fabbricazione.



Figure 8 e 9. A destra in alto: capsula intatta al momento del posizionamento nell'esca. In basso capsula rinvenuta nella governa dopo il processo di masticazione dell'esca da parte del cinghiale. A sinistra sezione di esca contenente la capsula con il vaccino.

4.4. Metodologia utilizzata nella prima parte sperimentale

Al fine di studiare alcune fasi del comportamento alimentare del cinghiale, in particolare il consumo delle esche alimentari, sono state realizzate 36 track station nel territorio della riserva. Le stazioni sono state realizzate in prossimità delle 9 governi dei cinghiali distribuite all'interno della riserva.

Queste aree sono quotidianamente visitate dai suidi, oltre che da altri ungulati e numerose specie di uccelli. Nelle ore serali e notturne gli animali si portano in queste zone per cibarsi di cereali, (prevalentemente mais) che le guardie della riserva distribuiscono quotidianamente. Con l'uso della pala e del rastrello sono state create delle piazzole circolari del diametro di un metro. Con un grande setaccio, si è provveduto a creare uno strato sottile di terra fine sopra il quale gli animali potessero lasciare le impronte (Figura n. 10).

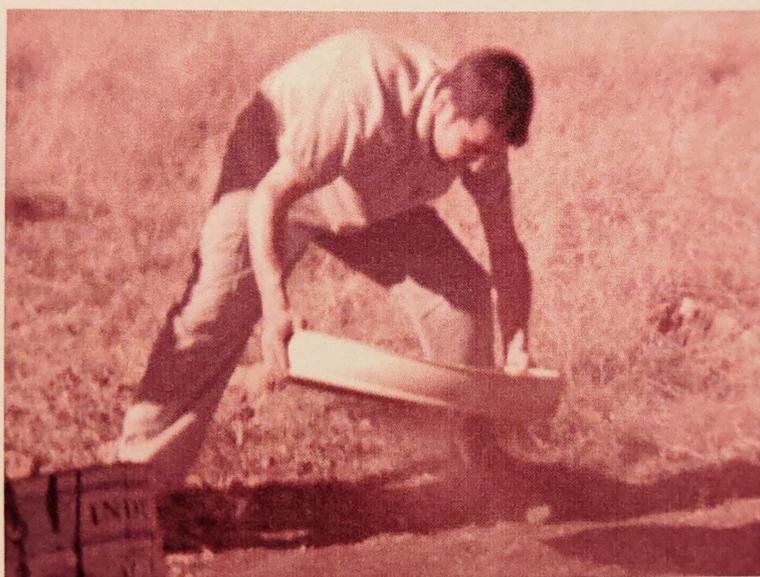


Figura 10. Operatore intento a setacciare la terra sopra la track station.

Al termine dell'operazione si provvedeva a marcare con 3 dita la stazione (figura n. 11). Se il giorno seguente si potevano riconoscere le impronte delle dita, si riteneva buono il funzionamento della stessa, altrimenti il funzionamento della stazione era considerato non sufficientemente attendibile.

La prima fase della sperimentazione prevedeva di realizzare nei pressi di ogni governo 2 stazioni, una contenente l'esca alimentare e una senza, con la funzione di controllo. Altre 2 stazioni, una con esca e una di controllo erano poste a una distanza di circa 100 m, col fine di annullare l'effetto concentrazione di animali intorno alla governa, che risulta essere alto durante le fasi di alimentazione serali

e notturne degli animali. Il numero totale di stazioni era 36, di cui 18 con esca e 18 senza, con la funzione di controllo (figura n. 12).

Nel primo ciclo, 3 stazioni contenenti l'esca alimentare erano monitorate dalla trappola fotografica, ad ulteriore supporto per la determinazione della specie visitante la stazione. La revisione giornaliera consisteva nell'identificare gli animali che avevano visitato la stazione attraverso il riconoscimento delle orme (figura n. 13) e l'annotazione su apposita scheda (figura n. 14) di alcuni dati come: il buon funzionamento della stazione, la presenza di orme di cinghiale, di ungulato indeterminato, di pernice rossa, di altri animali, il meteo, la presenza di vento ecc. Si cercava di determinare la specie, la classe d'età e il consumo o meno dell'esca e rilevare altri importanti indizi. Veniva effettuata anche la revisione delle 3 trappole fotografiche annotando su apposita scheda il numero di foto scattate. L'ultima operazione consisteva nella cancellazione delle impronte con un panno di carta nelle stazioni dove l'esca non era stata consumata e nelle relative stazioni controllo. Se nella revisione mattutina non si rinveniva più l'esca nella stazione, questa e il relativo controllo venivano considerati decaduti. Questo esperimento è stato ripetuto tre volte alternando le stazioni con l'esca con le stazioni controllo. L'obiettivo era quello di non abituare gli animali a cercare l'esca sempre nella stessa stazione. Le stazioni e la metodica di revisione sono rimaste invariate. Nella prima turnata sono state poste esche alimentari prive di capsula. Nel secondo e nel terzo ciclo le esche presentavano al loro interno la capsula contenente acqua. L'obiettivo era quello di verificare se il cinghiale masticasse la piccola capsula che in futuro conterrà il vaccino, o se invece la sputasse.

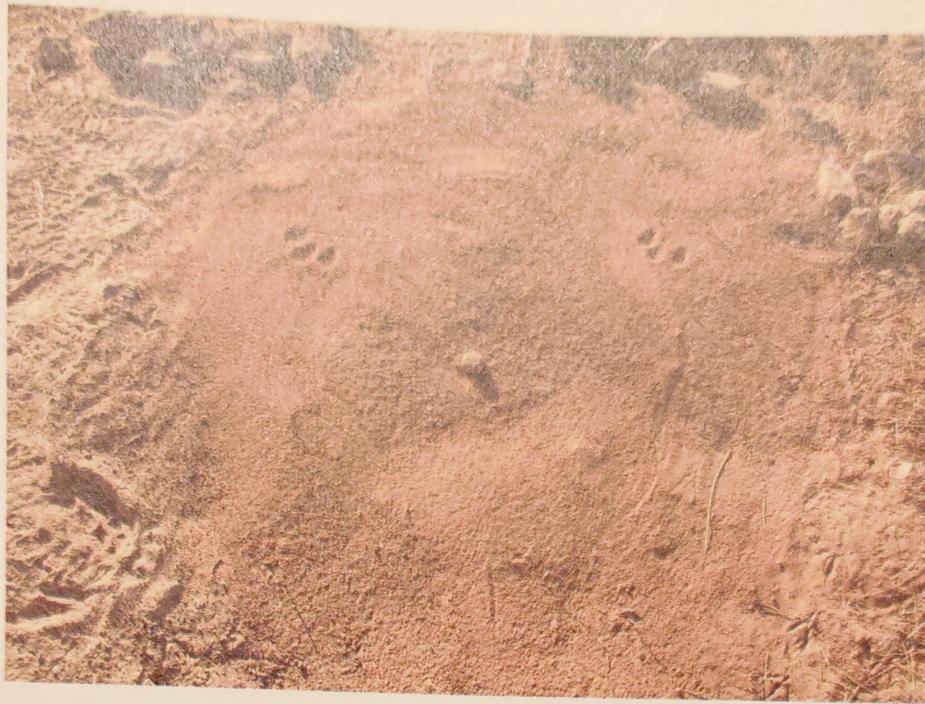


Figura 11. Track station appena fatta contenente l'esca alimentare per i cinghiali. Al centro l'esca alimentare, ai lati la marca fatta con le tre dita.



Figura 12. In verde le 36 *track station* realizzate all'interno della governa



Figura 13. Track station di controllo con impronte di cinghiale

Track station

Track station												
N° stazione		Ubicazione			Vicino a governa		Lontano da governa		Data di inizio			
Coordinate Gps							operatore					
Escremento			Controllo				Esca alimentare					
		Data	ora	Staz att	Cinghiale	Ung. indet	Rum	Pern	Altro	indet	Meteo	Vento
Colloca z Stazione												
Osservazioni												
Rev 1												
Osservazioni												
Rev 2												
Osservazioni												
Rev 3												
Osservazioni												
Rev 4												
Osservazioni												
Rev 5												
Osservazioni												
Rev 6												
Osservazioni												
Note												

Figura 14. La scheda di rilevazione dati della Track station.

4.5 Metodologia utilizzata nella seconda parte sperimentale

Al fine di testare il consumo delle esche alimentari contenenti il vaccino da parte delle classi d'età più giovani dei cinghiali, si è provveduto a posizionare 25 esche alimentari in ognuna delle 6 governa selettive per striati (figura n. 15), per un totale di 150 esche. Una governa selettiva per striati non è altro che una grande gabbia costruita in rete metallica elettrosaldada, all'interno della quale vengono posti cereali o altri alimenti. La dimensione della maglia permette il passaggio esclusivamente ai cinghiali giovani, di piccole dimensioni.

Si è prestato attenzione a distribuire uniformemente nella governa le esche. Il numero di cinghiali all'interno della riserva si aggira intorno alle 200 unità. Dato il forte incremento utile anno di questa specie, unito alle condizioni artificiali di alimentazione che permettono una buona fitness, si stima il numero degli individui giovani essere di circa la metà degli individui totali, quindi 100 individui. Con questa prova si pensa che, se non la totalità dei giovani, una grande maggioranza abbia consumato l'esca. La revisione mattutina consisteva nell'entrare, quando possibile, nella governa e annotare su apposita scheda ciò che si osservava e più in particolare i seguenti parametri:

- N° esche fuori dalla governa intere
- N° esche fuori dalla governa parzialmente consumate
- N° di capsule fuori dalla governa intere
- N° capsule fuori dalla governa masticate
- Presenza di frammenti di esca

Si osservava scrupolosamente anche nei paraggi della governa per rilevare indizi sul consumo delle esche da parte dei cinghiali. Dopo un'attenta osservazione si entrava al suo interno e si cercava meticolosamente tra le mangiatoie tutti gli indizi che potevano suggerire il consumo delle esche da parte dei cinghiali. Capsule rinvenute intere, masticate, dentro la governa o fuori, numero di esche rinvenute, tutto veniva annotato su apposita scheda (figura n. 16).

Le governa erano monitorate al loro interno dalla trappola fotografica, per avere una ulteriore conferma del consumo delle esche da parte degli striati. Questo modello di trappola fotografica ha la caratteristica di presentare la foto con l'ora in cui è stata scattata. Un'attenta analisi di tutte le foto e dell'ora del relativo scatto poteva offrire un quadro generale sulla distribuzione e sul numero degli striati

all'interno della riserva, durante il corso della notte.

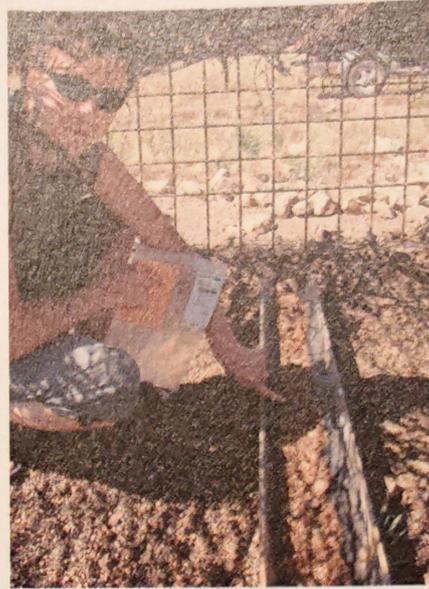


Figura 15. Mangiatoia selettiva per striati, costruita in rete metallica elettrosaldata. A destra posizionamento delle esche alimentari nelle mangiatoie.

Governa per striati:

Posizionamento esche N°		Operatore					
Data		Meteo					
ora							
		1° rev	2° rev	3° rev	4° rev	5° rev	Totale
Fuori da governa	Esche fuori da governa intere						
	Esche fuori governa parzialm consumate						
	Capsule fuori da governa intere						
	Capsule fuori da governa parzialm masticate						
	Frammenti di esca						
Dentro governa	Esche dentro governa intere						
	Esche dentro governa parzialmente consumate						
	Capsule dentro governa intere						
	Capsule dentro governa parzialmente masticate						
	Frammenti di esca						
Annotazioni							

Figura 16. La scheda rilevazione dati utilizzata per rilevare informazioni nelle governe selettive per striati

4.6. *Analisi statistiche*

Sono state utilizzate la statistica descrittiva e la statistica inferenziale parametrica (Crawley 1996) per spiegare l'eterogeneità nei nostri dati. Nella statistica descrittiva sono state utilizzate tecniche di riduzione dei dati per ottenere valori numerici descrittivi (localizzazione e frequenza) indicatori di tendenza e valori graficamente rappresentabili.

I Modelli Lineari Generalizzati (MLGz) permettono di trattare simultaneamente, in una stessa analisi, variabili continue e categoriche, così come la loro interazione. Alcuni fattori sono capaci di condizionare la relazione di altri con la variabile dipendente. L'analisi dell'interazione è interessante per spiegare fenomeni biologici di non semplice natura. I Modelli Lineari Generalizzati Misti (MLGMz) ci permettono di controllare il problema della pseudoreplicazione. Nel nostro caso si tratta di pseudoreplicazione spaziale. Sono stati adottati i seguenti modelli:

1. **Visita del cinghiale adulto (presenza-assenza)** = tipo stazione (con esca o senza esca) + vicinanza della stazione alla governa + presenza di governa selettiva + distanza dal bosco + numero di ciclo + esca-controllo x vicinanza o meno alla governa + esca controllo x presenza di governa selettiva per striati o meno + vicinanza alla governa con presenza di governa selettiva per striati o meno. Abbiamo ripetuto questo modello per ogni specie considerata: cinghiale giovane, cinghiale adulto, cinghiale considerato complessivamente, cervo, coniglio selvatico, pernice rossa, ungulato indeterminato, altro uccello.
2. **Consumo delle esche** = vicinanza della stazione alla governa + distanza dal bosco + numero revisione + presenza di governa selettiva per striati o meno + numero di ciclo.
3. **Esito di consumo da parte del cinghiale** = vicinanza della stazione alla governa + distanza dal bosco + numero revisione + presenza di governa selettiva + numero di ciclo + esca-controllo x vicinanza o meno alla governa + esca controllo x presenza di governa selettiva per striati o meno + vicinanza alla governa con presenza di governa selettiva per striati o meno.
4. **Esito di consumo da parte del cervo** = vicinanza della stazione alla governa + distanza dal bosco + numero revisione + presenza di governa

selettiva per striati o meno + numero di ciclo.

Per la realizzazione di questa analisi statistiche sono stati utilizzati i software SPSS 10.0.6 (SPSS Inc.,1999) e SAS 9.0 (SAS Statistic Inc.). Le analisi statistiche hanno presentato la struttura di una regressione multipla logistica binaria. Data la natura delle variabili dipendenti (binaria), è stato utilizzato un errore binomiale (0 e 1) e la funzione vincolo logistica (la variabile è categorica e non continua).

5. Risultati.

5.1. Funzionamento delle track-station.

In generale le track station si sono dimostrate un buon metodo nella determinazione delle specie presenti attraverso il riconoscimento delle orme. Nel primo ciclo sono state effettuate 54 revisioni e solo in tre casi le stazioni non hanno funzionato perché il vento ha cancellato le impronte (Figura n. 17).

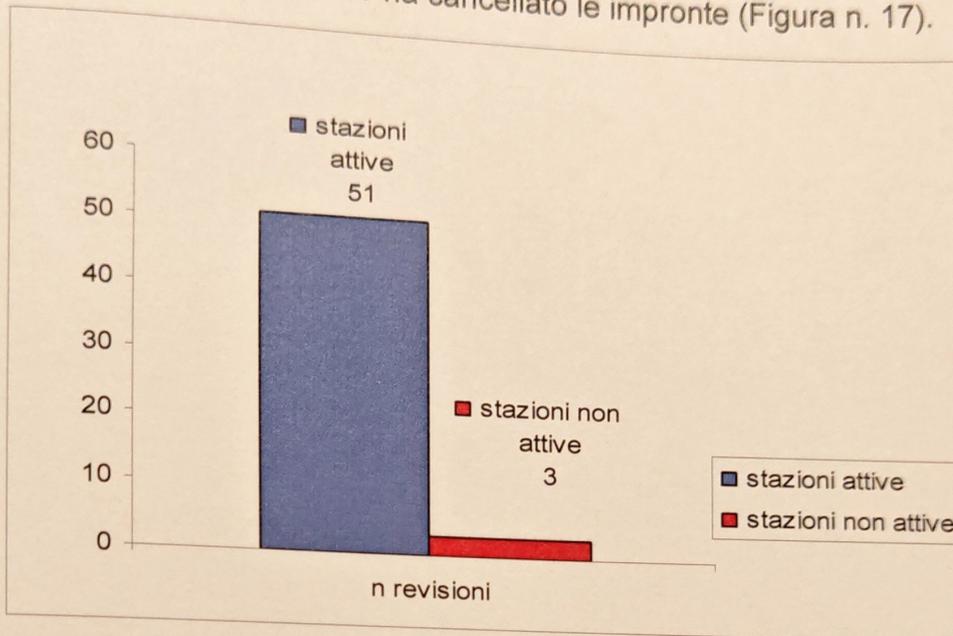


Figura 17. Efficacia delle track station durante il primo ciclo.

Anche nel secondo ciclo su 43 revisioni, 2 stazioni non hanno funzionato a causa del vento. (Figura n. 18).

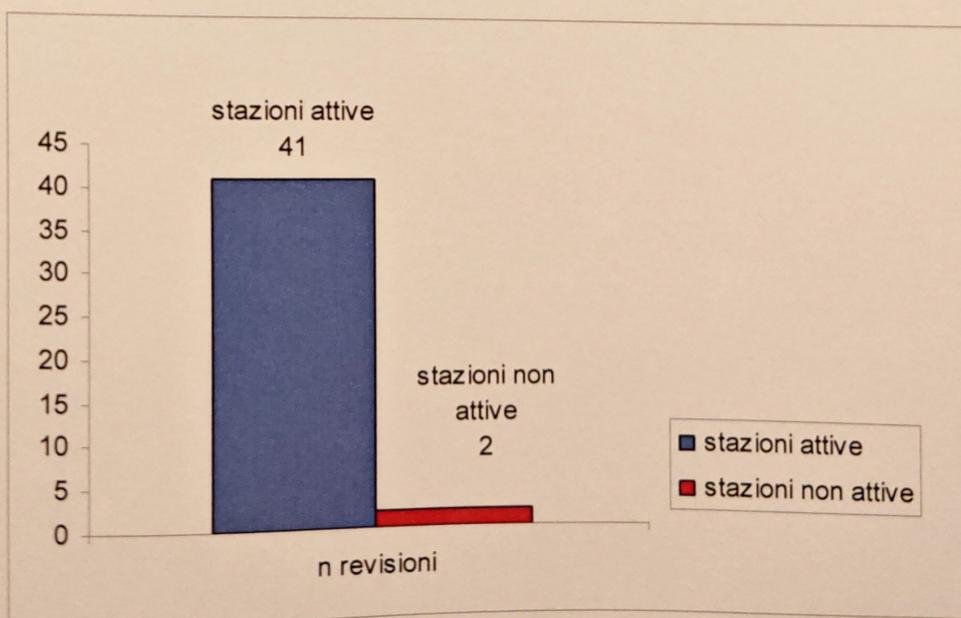


Figura 18. Efficacia track station secondo ciclo

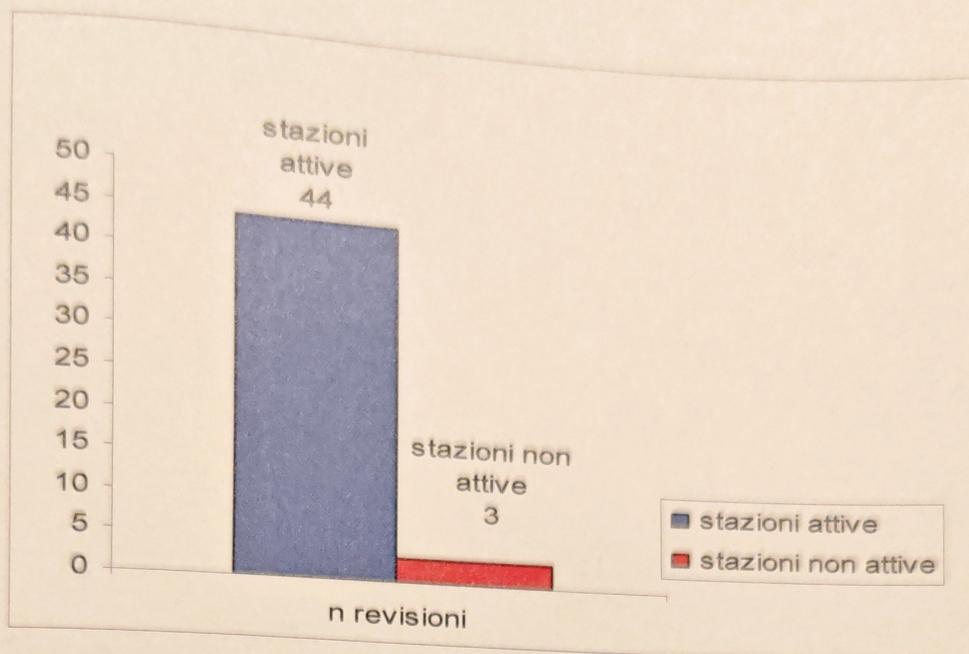


Figura 19. Efficacia track station terzo ciclo

Nel terzo ciclo, (figura n. 19). su un totale di 47 revisioni, 3 stazioni non hanno funzionato. In due casi la pernice rossa ha rovinato la stazione effettuando un bagno di terra. In un altro caso il vento ha cancellato le impronte.

La forte densità delle pernici rosse all'interno della riserva ha creato in qualche caso dei problemi nel riconoscimento di alcune impronte. Questo galliforme traeva vantaggio dalle track stations, spollinandosi nello strato di terra e sabbia fine della stazione. In qualche caso cancellava le impronte degli altri animali.

5.2 Specie visitanti le stazioni.

Nel primo ciclo sperimentale il più assiduo frequentatore delle stazioni con esca è stata la pernice rossa, seguita da cinghiale giovane, cinghiale adulto, volpe, ungulato indeterminato, cervo e coniglio selvatico (Figura n. 20). Nelle stazioni controllo senza esca è stato il cinghiale giovane a predominare con 16 presenze, seguito da pernice rossa, ungulato indeterminato, cervo, cinghiale adulto, volpe, altri uccelli, lepre e insetti vari (Figura n. 21).

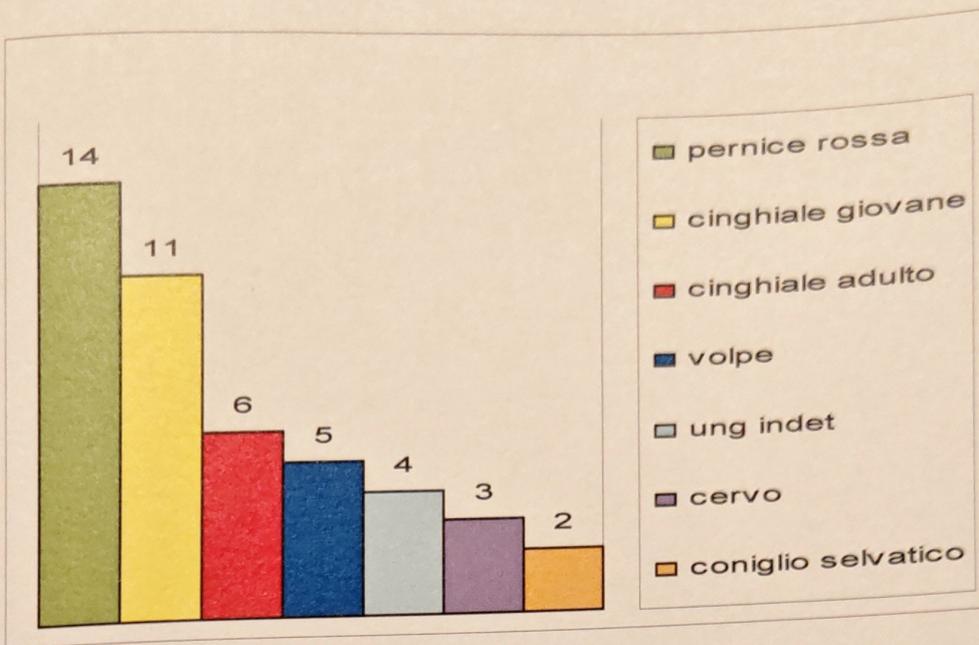


Figura 20. Specie visitanti le stazioni con esca nel primo ciclo

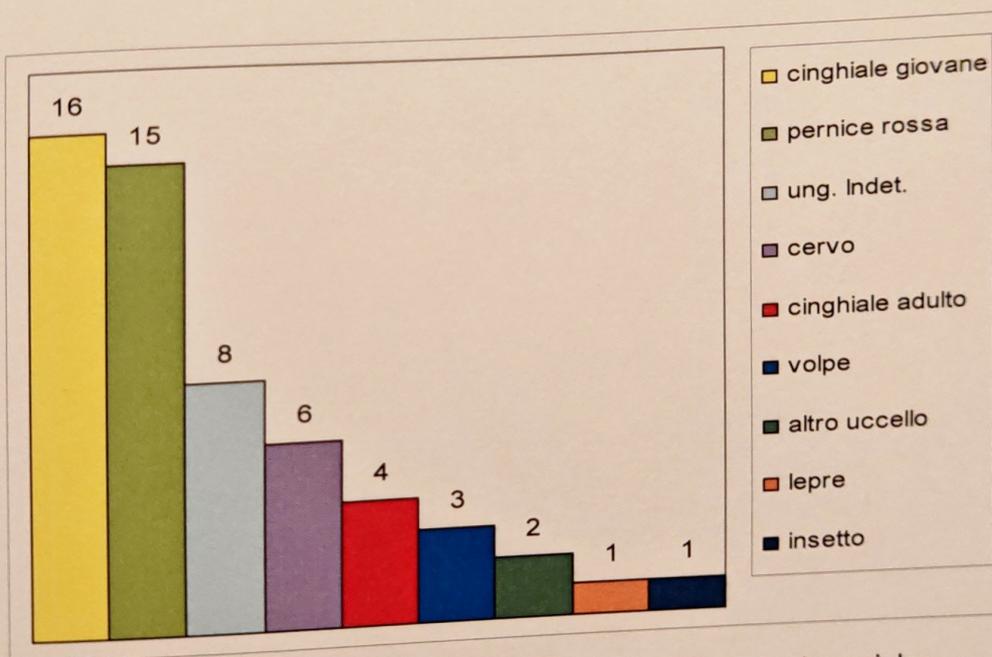


Figura 21. Specie visitanti le stazioni controllo nel primo ciclo

Nel secondo ciclo ancora il cinghiale giovane predomina nelle stazioni con esca con 12 presenze, seguito da pernice rossa, cinghiale adulto, ungulato indeterminato, altri uccelli, cervi e coniglio selvatico (Figura n. 22). Nelle stazioni controllo predomina ancora la pernice seguita da cinghiale giovane, cinghiale adulto e ungulato indeterminato, cervo e altri uccelli e infine volpe e coniglio selvatico (Figura n. 23).

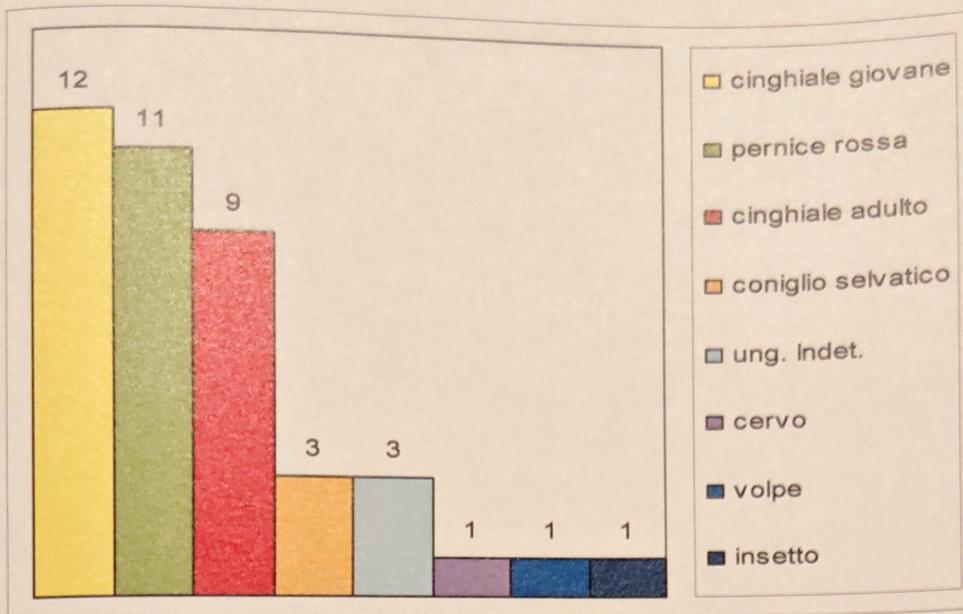


Figura 22. Specie visitanti le stazioni con esca nel secondo ciclo

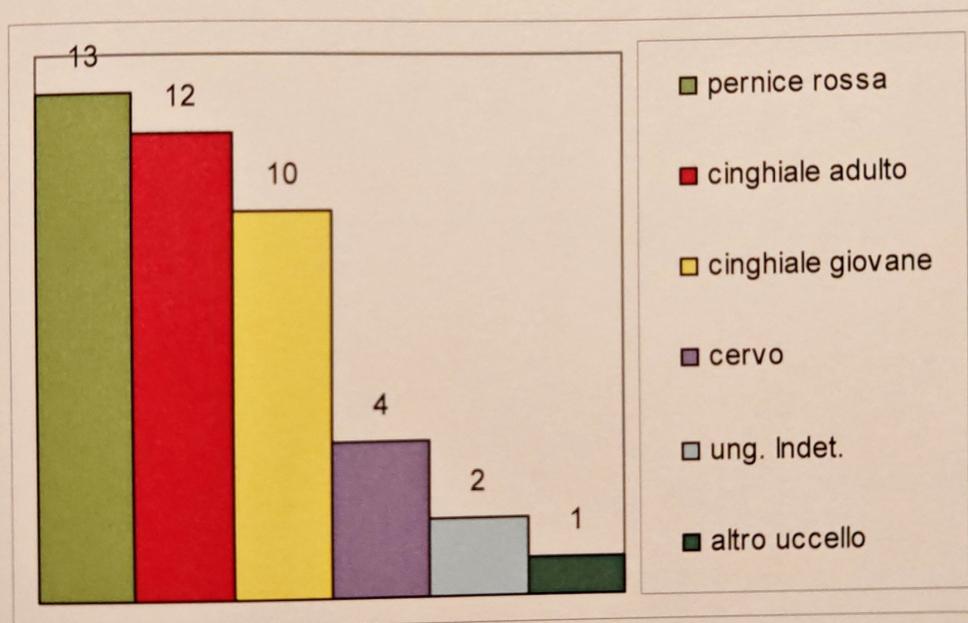


Figura 23. Specie visitanti le stazioni controllo nel secondo ciclo

Nel terzo ciclo sperimentale, nelle stazioni con esca, il più assiduo frequentatore è il cinghiale giovane con 12 presenze seguito da pernice rossa, cinghiale adulto e ungulato indeterminato (Figura n. 24). Mentre la pernice rossa si conferma il maggior visitatore delle stazioni controllo come già è avvenuto nel secondo ciclo (Figura n. 25).

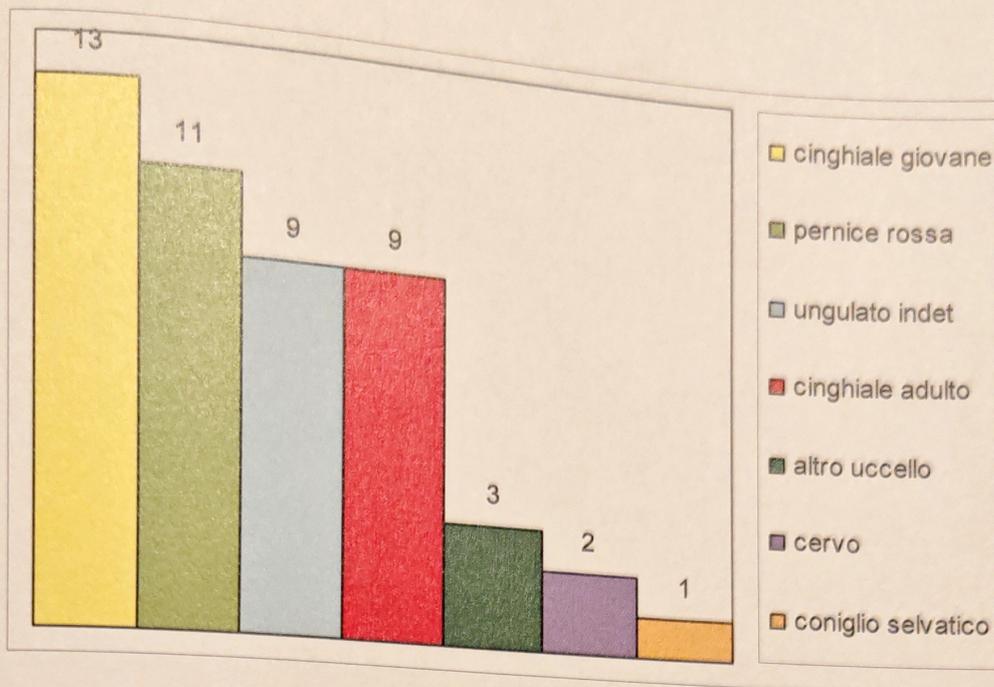


Figura 24. Specie visitanti le stazioni con esca nel terzo ciclo

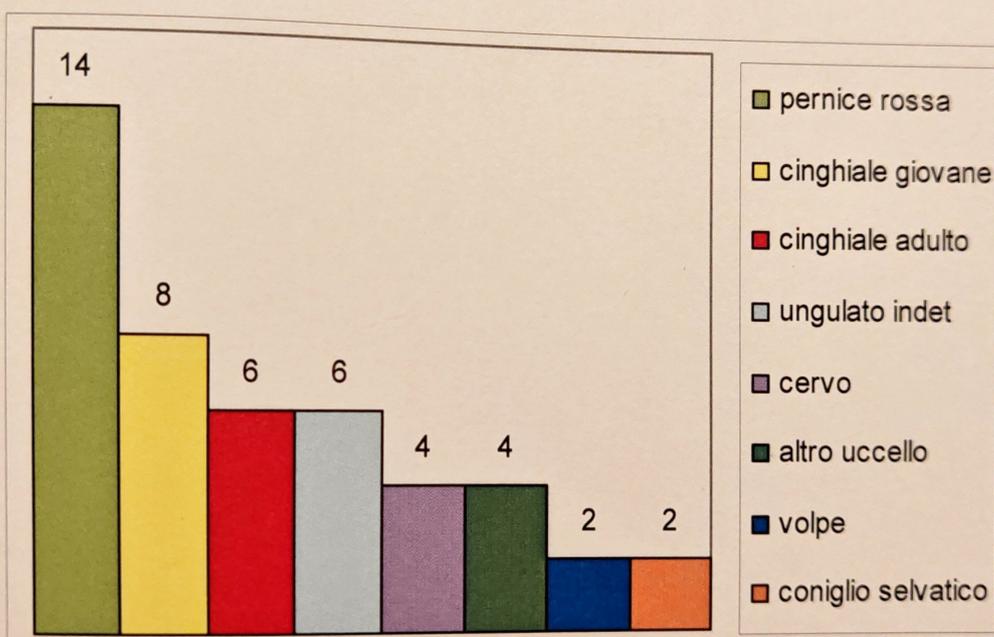


Figura 25. Specie visitanti le stazioni controllo nel terzo ciclo

Un quadro complessivo è riportato nelle figure n. 26 e n. 27. Possiamo apprezzare come il cinghiale (sia giovane che adulto) è la specie di mammifero che più frequentemente visita le stazioni con esca e le stazioni controllo (figura n. 28), con una prevalenza maggiore delle classi giovani (striati e rossi). Ma il suide non è stato l'unico animale a consumare l'esca. Anche altri ungulati come cervi, ammotraghi o mufioni hanno consumato l'esca, così come la volpe (la trappola fotografica ci ha permesso di inquadrarla proprio mentre si avvicinava alla stazione. Figura n. 29).

Consumatori occasionali dell'esca si sono dimostrati essere il coniglio selvatico (più volte sono state rinvenute fatte all'interno della stazione e l'esca presentava segni evidenti di morsicatura da parte del leporide) e la Gazza azzurra, *Cyanopica cyanus* anch'essa fotografata mentre mangia l'esca.

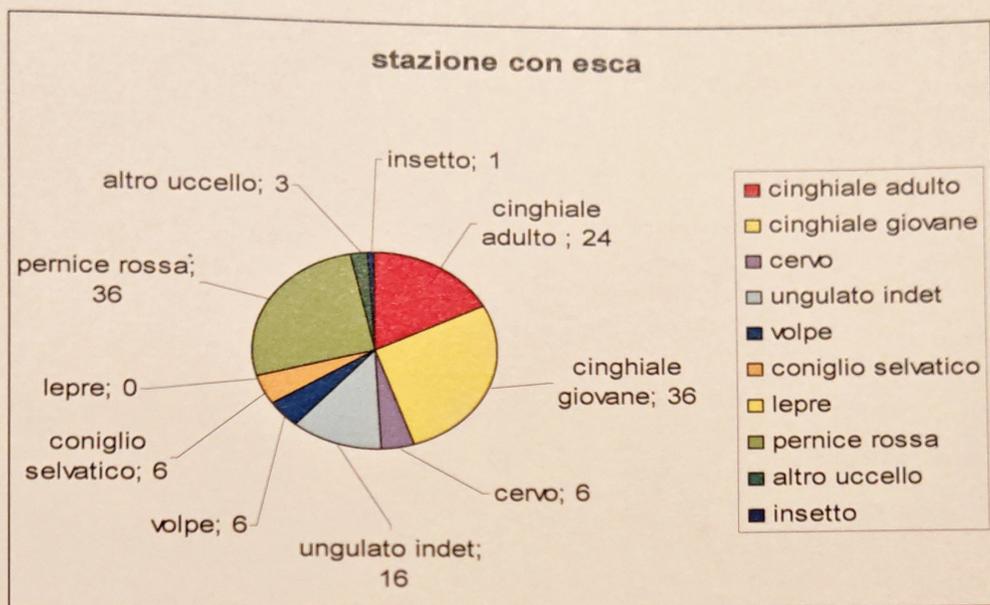


Figura 26. Somma delle specie visitanti le stazioni con esca nei tre cicli

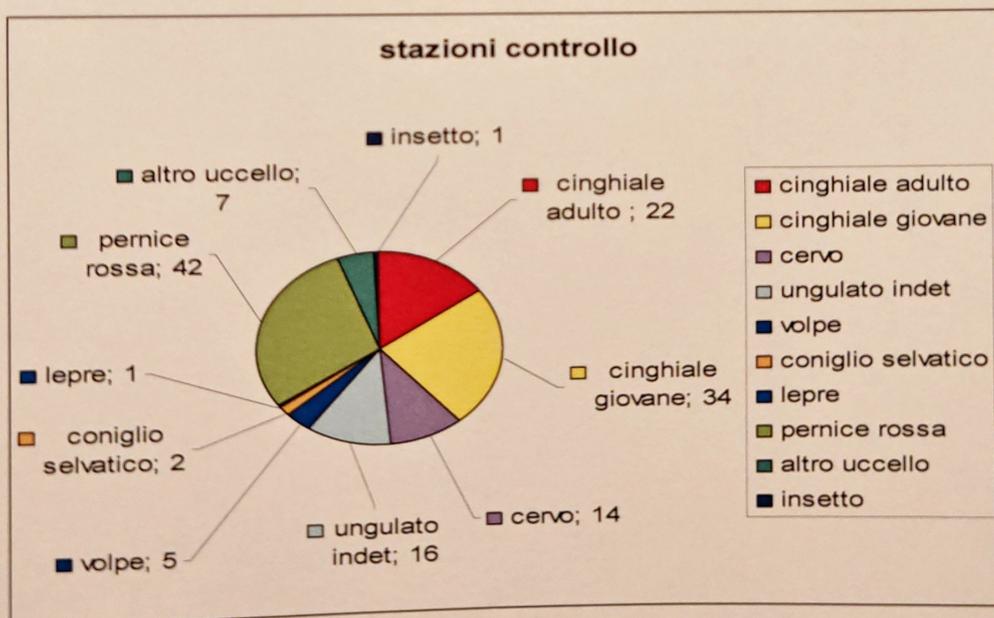


Figura 27. Somma delle specie visitanti le stazioni controllo nei tre cicli



Figura 28. Cinghiale adulto fotografato nella stazione mentre annusa l'esca



Figura 29. Volpe nei pressi della track station

L'analisi statistica dei dati ha permesso le seguenti osservazioni:

1. La vicinanza della track station alla governa influisce positivamente sulla visita alla stazione da parte del cinghiale sia esso giovane o adulto (Figura 30).
2. La percentuale di visita del cinghiale (sia giovane che adulto) è simile sia che si tratti di una stazione con esca sia che si tratti di una stazione controllo (Figura 31).
3. Il cinghiale (sia giovane che adulto) visita più frequentemente le stazioni vicine alla governa (Figura 32).
4. Anche considerando solo il cinghiale adulto, le stazioni poste vicino alla governa vengono maggiormente visitate (Figura 33).
5. La frequenza di visita del cinghiale adulto aumenta con la ripetizione dei cicli di presentazione delle esche (Figura 34).
6. La frequenza di visita del cinghiale adulto è maggiore dove è presente anche la governa selettiva per striati (Figura 35).
7. La vicinanza della track station alla governa influisce positivamente sulla frequentazione del cinghiale giovane (Figura 36).
8. La categoria "ungulato indeterminato" visita con maggior frequenza la stazione con esca rispetto alla stazione controllo (Figura 37).
9. La presenza di governa selettiva per striati influisce positivamente sulla frequenza di visita alle track station da parte della categoria "ungulato indeterminato" (Figura 38).
10. La frequenza di consumo dell'esca da parte del cinghiale giovane è leggermente più alta nelle track station lontane dalla governa (Figura 39).

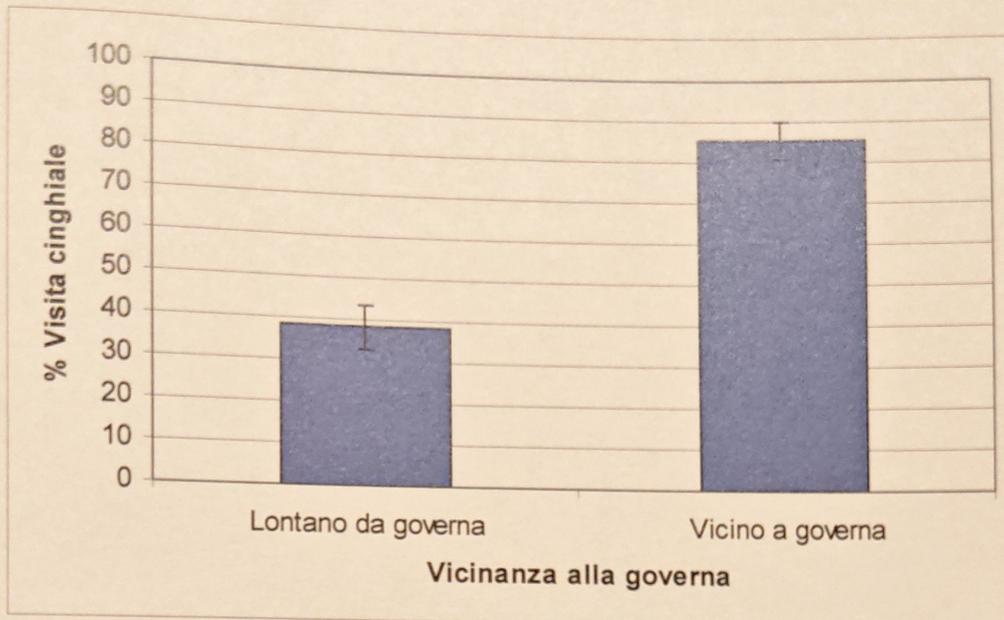


Figura 30. Cinghiale: frequentazione della track station in funzione della sua vicinanza alla governa.

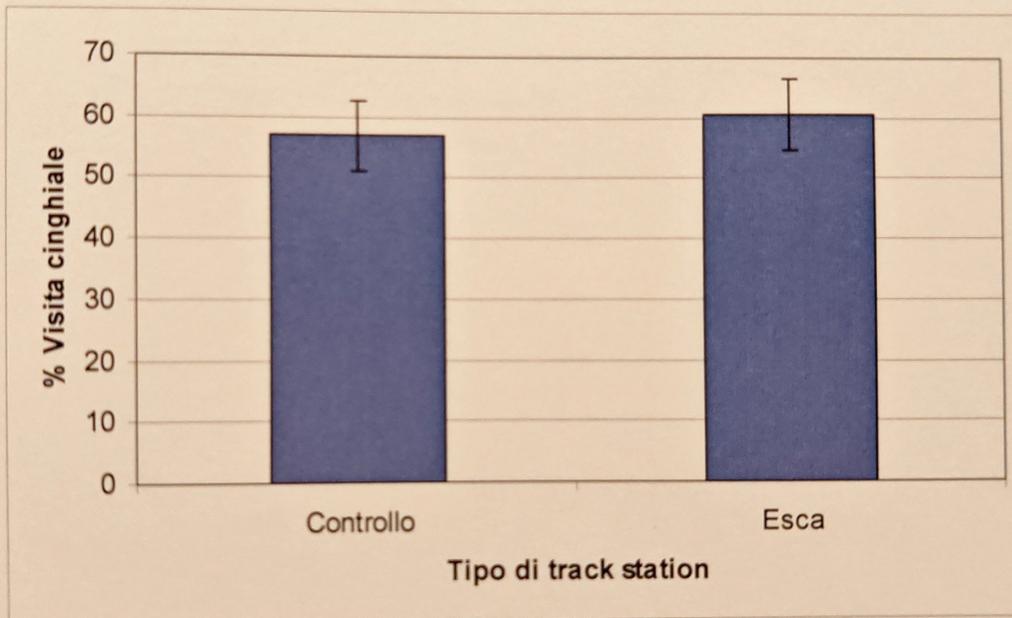


Figura 31. Cinghiale: frequentazione della track station in funzione del tipo di stazione

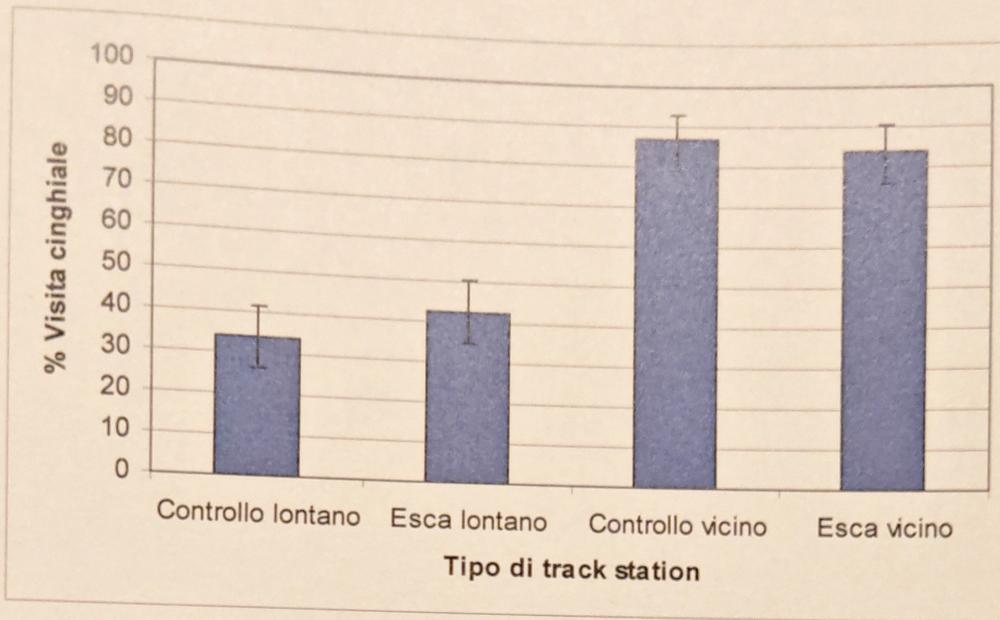


Figura 32. Cinghiale: frequentazione della track station in funzione del tipo di stazione e in funzione della vicinanza o meno alla governa

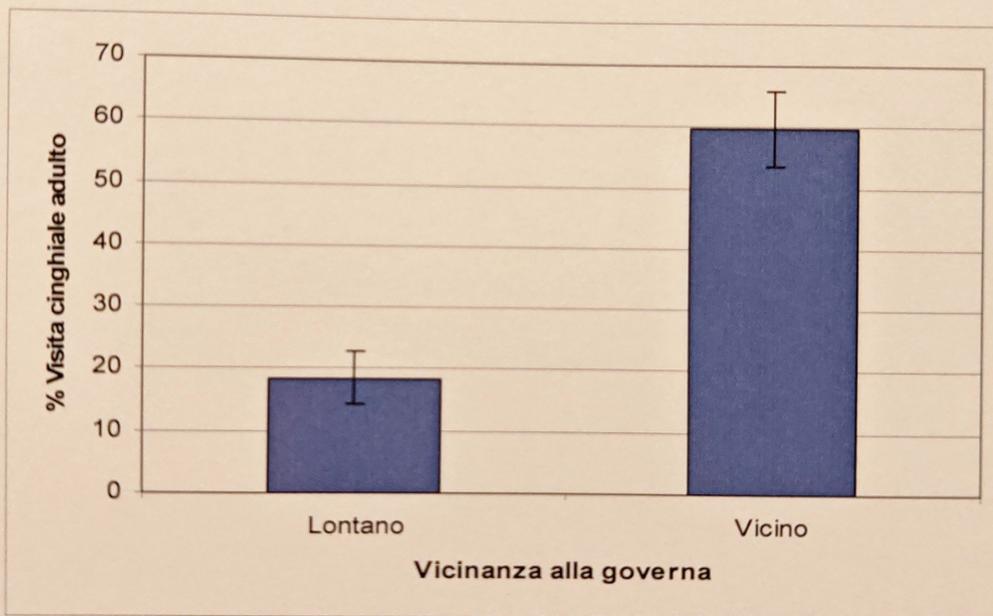


Figura 33. Cinghiale adulto: frequentazione della stazione in funzione della vicinanza o meno alla governa

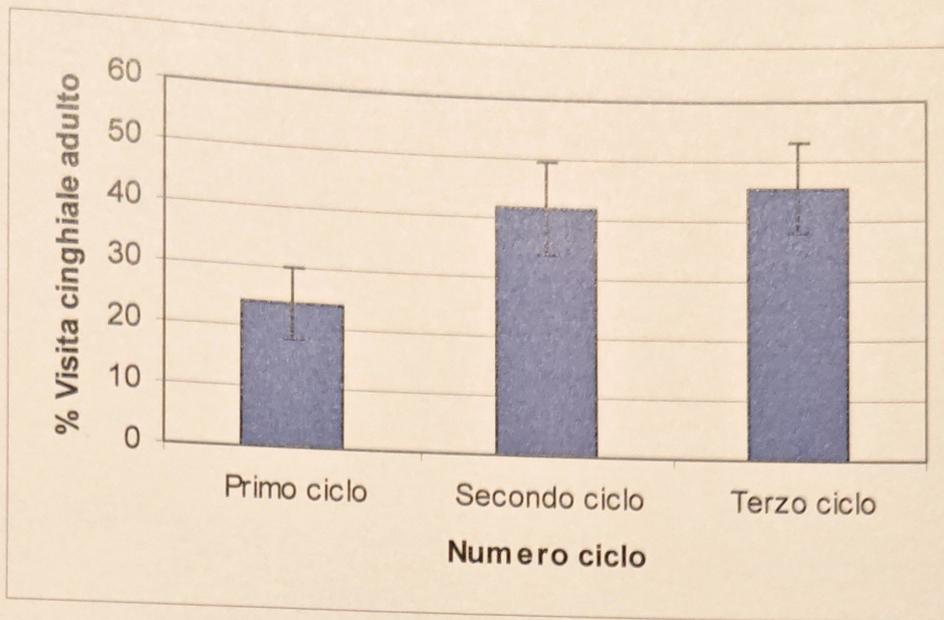


Figura 34. Cinghiale adulto: frequentazione della stazione in relazione al ciclo

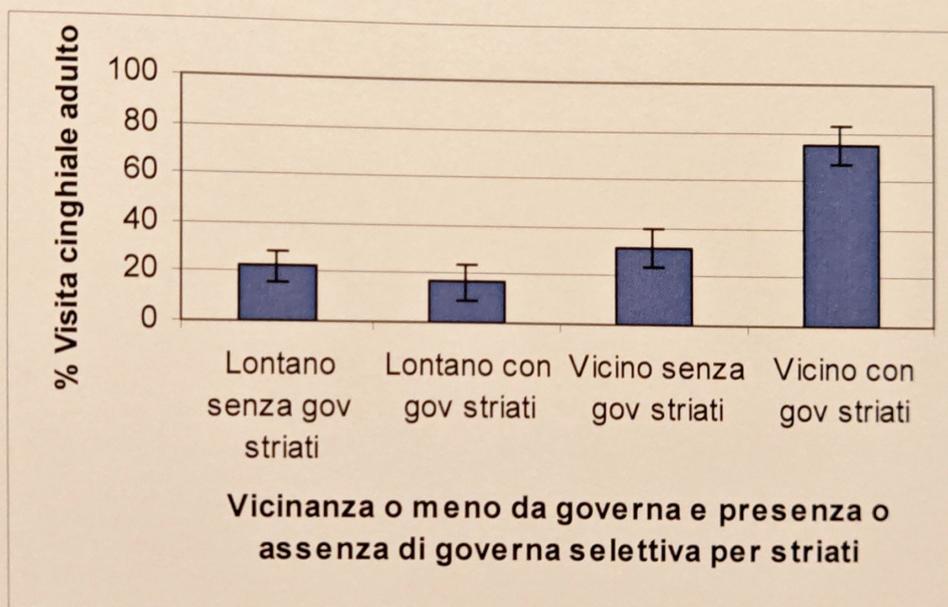


Figura 35. Cinghiale adulto: frequentazione della stazione in relazione alla vicinanza o meno dalla governa e in funzione della presenza o assenza della governa selettiva per striati.

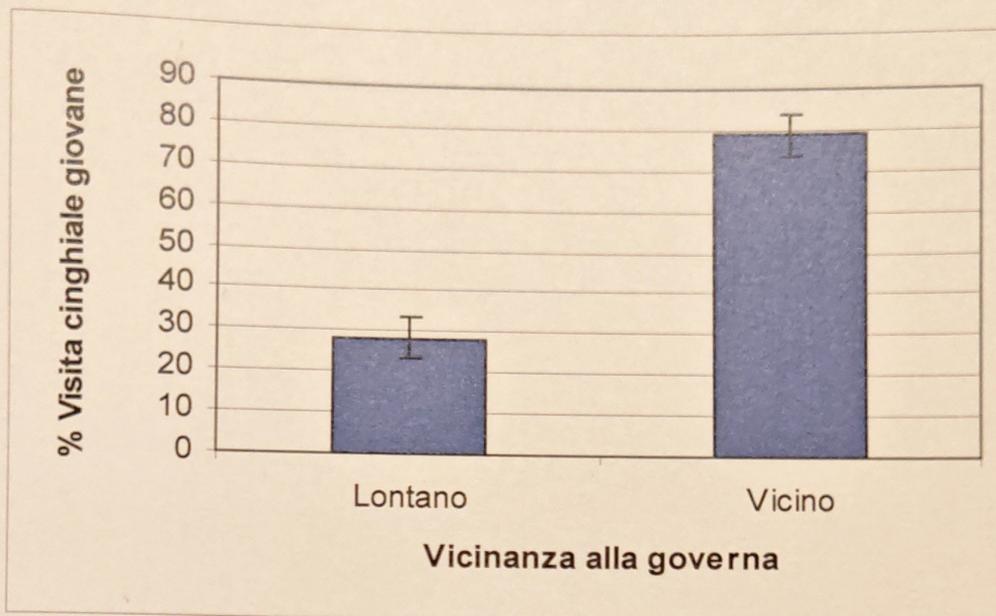


Figura 36. Cinghiale giovane: frequentazione della stazione in funzione della vicinanza o meno dalla governa

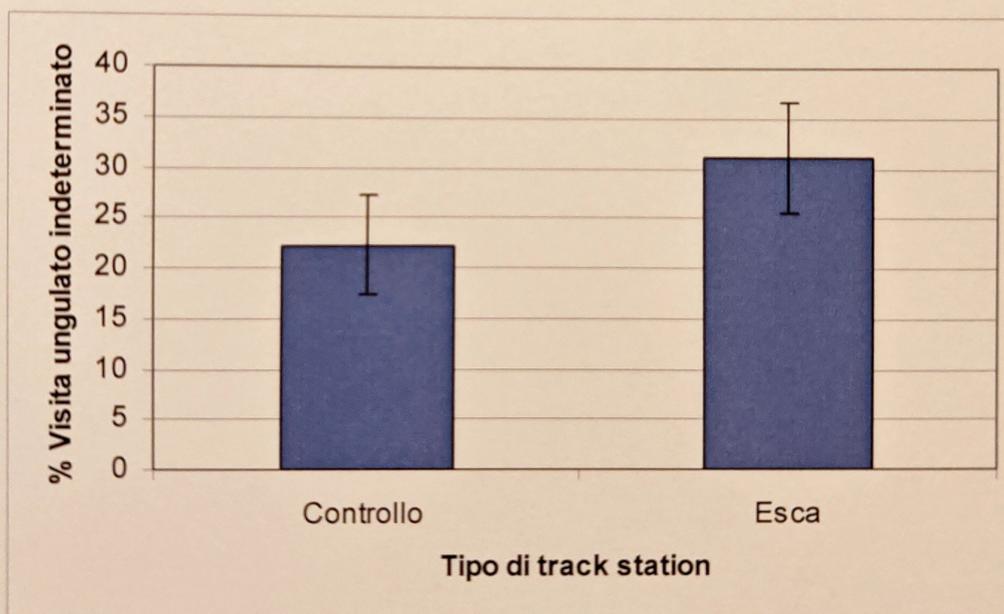


Figura 37. Ungulato indeterminato: frequentazione della stazione in funzione del tipo di stazione

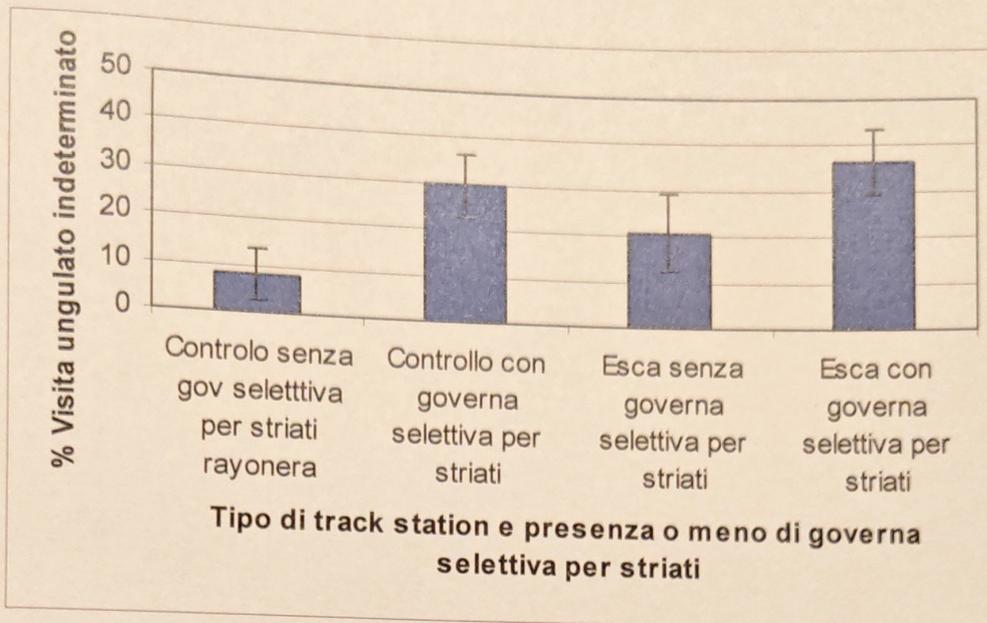


Figura 38. Ungulato indeterminato: frequentazione della stazione in funzione del tipo di stazione e della presenza o meno della governa selettiva per striati

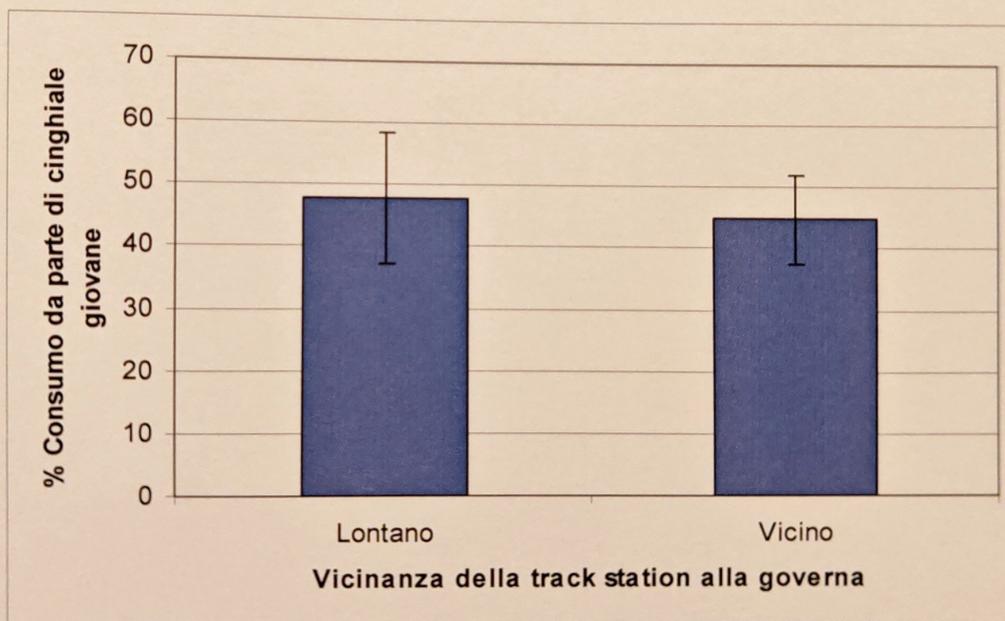


Figura 39. Cinghiale giovane: percentuale di consumo in base alla vicinanza o meno della stazione alla governa

5.3. Velocità di scomparsa delle esche dalle stazioni.

I 3 cicli ci hanno permesso di valutare il tempo impiegato dagli animali per consumare tutte le 18 esche poste nelle stazioni (figura n. 40). Nel primo ciclo gli animali hanno impiegato 3 giorni per consumare tutte le esche. Nel secondo, in 2 notti, tutte le esche sono scomparse. Nel terzo ciclo ci si aspettava una velocità ancora superiore presupponendo che gli animali si fossero abituati a cercare

l'esca sempre nelle stesse stazioni. In realtà la velocità di scomparsa delle esche è risultata essere simile al secondo esperimento, infatti anche nel terzo ciclo, in 2 notti, tutte le esche sono state consumate.

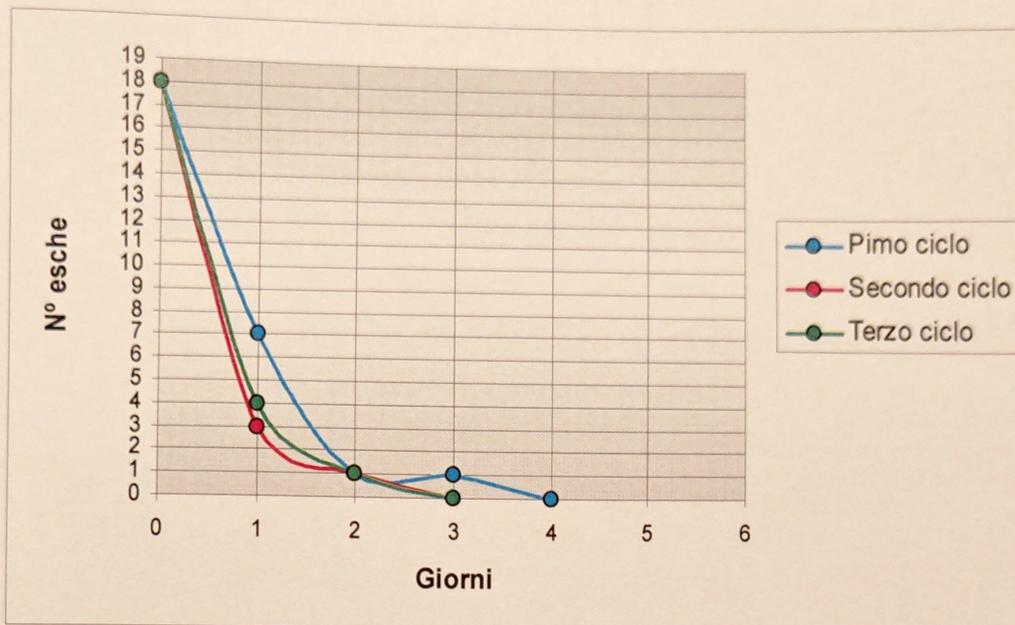


Figura 40. Velocità scomparsa esche nelle track stations

Nel secondo e nel terzo ciclo, l'esca conteneva la piccola capsula con acqua. In 6 occasioni, su un totale di 36 esche poste nel secondo e terzo ciclo, sono state rinvenute le piccole capsule nei pressi della stazione. In 3 casi erano molto masticate mentre in altri 3 casi si presentavano con il tappo aperto ma non masticate. Molto probabilmente il cinghiale, consumando l'esca ha individuato la piccola capsula di plastica e l'ha sputata.

5.4. Trappola fotografica e rilevamento dell'operatore a confronto.

Nelle tabelle sottostanti sono messe a confronto le informazioni raccolte dall'operatore nelle revisioni mattutine con le foto scattate dalla trappola fotografica nelle tre stazioni con esca (Tabelle n. 4, 5 e 6).

Si osservi come ci sia corrispondenza tra le informazioni raccolte dall'operatore e quelle fornite dalle fotografie sia nella track station "Los Machos" e sia in quella della "Colmena". Mentre così non è per quella de "La Paloma" dove la trappola non ha fotografato il coniglio rilevato dall'operatore. Il fatto che la trappola fotografica non sia riuscita a catturare il coniglio selvatico può essere dato dal fatto che questo tipo di sensore non si attivi per animali così piccoli e che si muovono

lentamente. Questo tipo di trappola infatti è stata progettata per catturare animali di medie-grandi dimensioni.

Revisione	Trappola fotografica	Dati operatore
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1 cervo adulto 1 cinghiale adulto altro uccello	cervo adulto cinghiale adulto altro uccello

Tabella 4. – Confronto fra le informazioni desunte dall'operatore e quelle desumibili dalle fotografie nella track station "Los Machos".

Revisione	Trappola fotografica	Dati operatore
1	1 volpe	volpe

Tabella 5. Confronto fra le informazioni desunte dall'operatore e quelle desumibili dalle fotografie nella track station "La Colmena".

Revisione	Trappola fotografica	Dati operatore
1	1 cinghiale adulto	Cinghiale subadulto Coniglio selvatico
2	0	Coniglio selvatico

Tabella 6. Confronto fra le informazioni desunte dall'operatore e quelle desumibili dalle fotografie nella track station "La Paloma".

In particolare si segnala come la trappola fotografica consente anche di apprezzare comportamenti che non sarebbero desumibili dal solo rilievo delle tracce. Infatti nelle fotografie si può rilevare come un cinghiale adulto si sia avvicinato all'esca, l'abbia annusata e si sia allontanato senza consumarla (figura n. 40 e 41). Comportamento che il solo studio delle tracce non avrebbe individuato.



Figure 41 e 42. In questa sequenza la trappola fotografica ha catturato un cinghiale che visita la stazione e si allontana senza consumare l'esca.

5.5. Velocità di scomparsa delle esche dalle governe selettive per striati

Anche il risultato generale di questa seconda parte sperimentale è stato soddisfacente in quanto tutte le esche poste all'interno della mangiatoia selettiva sono state consumate dagli striati e dai rossi in un tempo relativamente breve (Figura n. 43).

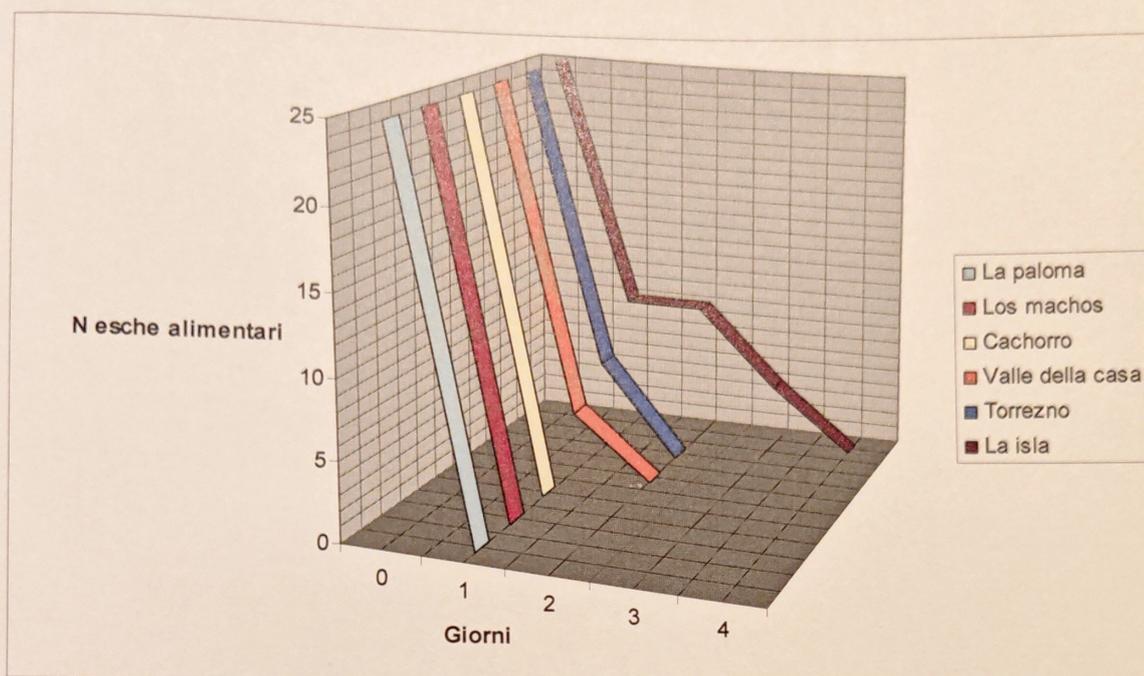


Figura 43. Velocità di scomparsa delle esche dalle governe selettive.

In particolare si osservi come in 3 casi, nelle mangiatoie chiamate "La Paloma", "Los Machos" e "Cachorro" tutte le esche sono state consumate la prima notte (Tabella n. 7).

Un'attenta analisi delle foto scattate dalla trappola fotografica ha messo in evidenza una forte affluenza di cinghiali giovani durante tutto il corso della notte.

Governa	Giorni scomparsa totale esche	Capsule intere nella governa	Capsule masticate nella governa	Capsule masticate fuori dalla governa	Totale capsule ritrovate
Los Machos	1		7	2	9
Cachorro	1		6	1	7
La Paloma	1		6		6

Tabella n. 7 Consumo delle esche presentate ai cinghiali in tre governe selettive.

Nella mangiatoia "Valle della casa" alla prima revisione erano presenti 4 esche (tabella n. 8), nella seconda revisione tutte le esche erano state mangiate. Nella mangiatoia "Torrezno" nella prima revisione avanzavano 6 esche. Anche qui i cinghiali hanno consumato il resto la notte successiva.

In queste 2 governi le esche sono state consumate in 2 notti. In "Valle della casa" i cinghiali hanno consumato 21 esche la prima notte e il resto nella seconda. In Torrezno sono state consumate 18 esche la prima notte e le restanti la seconda notte.

Governa Valle della casa	Giorni scomparsa totale esche	Capsule intere nella governa	Capsule masticate nella governa	Capsule masticate fuori dalla governa	Totale capsule ritrovate
	2	2	11	1	14
Governa Torrezno	Giorni scomparsa totale esche	Capsule intere nella governa	Capsule masticate nella governa	Capsule masticate fuori dalla governa	Totale capsule ritrovate
	2		7	1	8

Tabella n. 8 Consumo delle esche presentate ai cinghiali in due governi selettive.

Il tempo di scomparsa più lungo è stato riscontrato nella mangiatoia "La Isla" (tabella n. 9). Alla prima revisione avanzavano 9 esche e così anche nella seconda revisione. Alla terza revisione i cinghiali avevano consumato altre 5 esche ed infine alla 4 revisione tutte le esche erano state consumate. Questa ultima mangiatoia si trova in un luogo poco visitato dai cinghiali.

Una attenta analisi delle foto scattate dalla trappola fotografica (figura n. 44), ci ha permesso di osservare, in questa mangiatoia, sempre lo stesso gruppo familiare, ridotto numericamente rispetto ai gruppi visitanti le altre mangiatoie.

In questa governa la prima notte sono state mangiate 16 esche. La seconda notte non sono state consumate esche, la terza notte sono state consumate altre 5 esche e solo nella quarta revisione tutte le esche sono state consumate.

Governa La Isla	Giorni scomparsa totale esche	Capsule intere nella governa	Capsule masticate nella governa	Capsule masticate fuori dalla governa	Totale capsule ritrovate
	4		8		8

Tabella n. 9 Consumo delle esche presentate ai cinghiali nella governa "La Isla"



Figura 44. Striati intenti a consumare le esche all'interno della mangiatoia selettiva denominata "La Isla". All'esterno della mangiatoia si possono osservare alcuni adulti intenti a consumare i cereali nella governa.

In ogni governa è stata rinvenuta una media di 8,6 capsule sputate dai cinghiali (figura n. 45). In 43 casi le capsule si presentavano masticate. In 8 casi non masticate ma aperte da un lato e solo in 2 casi le capsule erano rimaste intatte e il liquido era rimasto al loro interno.



Figura 45. Le capsule rinvenute nelle governa selettive per striati dopo il processo di masticazione delle esche.

Gli animali consumando l'esca si sono spostati e in qualche caso sono usciti dalla governa, così, 5 capsule masticate e sputate sono state rinvenute all'esterno delle mangiatoie. Possiamo supporre che le capsule che non sono state ritrovate sono

state ingoiate insieme all'esca.

Il processo di masticazione delle esche con la conseguente rottura della capsula e la fuoriuscita del liquido contenuto al suo interno è risultato essere efficace. Nelle revisioni giornaliere è stata rinvenuta una buona parte delle capsule che erano state poste all'interno delle esche. La maggior parte di esse risultava masticata, in ogni caso aperta dal lato del tappo, a testimoniare la fuoriuscita del liquido e il contatto con la mucosa buccale e faringea dei cinghiali.

6. Conclusioni

1. Nell'area di studio la track station si è rivelata un buon metodo nella determinazione delle specie visitanti le stazioni. Un assunto fondamentale è che l'operatore abbia buona dimestichezza nel distinguere le orme dei vari ungulati, che in qualche situazione possono essere molto simili. Le trappole fotografiche poste nelle vicinanze delle track station e all'interno delle governe selettive per striati, sono state di grande aiuto nella determinazione delle specie consumanti l'esca. L'analisi delle orme nella stazione insieme all'analisi delle foto scattate ci ha permesso di identificare, con buona precisione, il soggetto visitante la stazione.
2. Il tipo di esca alimentare utilizzata è risultata ben appetita dal cinghiale. Infatti, nella maggioranza delle revisioni, le capsule rinvenute si presentavano masticate o in ogni caso aperte da un lato, a testimoniare la fuoriuscita del liquido e il buon funzionamento dell'esca. Solo in due casi le capsule erano rimaste intatte e il liquido era ancora contenuto al loro interno.
3. La collocazione delle esche in campo, distribuite nelle track station, ci ha permesso di verificare il grado di selettività delle stesse. Sebbene il cinghiale abbia consumato l'esca nella maggioranza dei casi, possiamo concludere che questo tipo di collocazione non è sufficientemente selettiva in quanto anche altre specie non-bersaglio hanno occasionalmente consumato l'esca.
4. La distribuzione delle esche nelle governe selettive per striati raggiunge un alto grado di selettività.
5. I cinghiali sembrano preferire le governe più centrali nella riserva in quanto il tempo di scomparsa delle esche è più lungo nelle governe periferiche.
6. La trappola fotografica ci ha mostrato che i cinghiali visitanti le stazioni periferiche, dove è minore il consumo delle esche, sono rappresentati soprattutto da animali di età inferiore ai 3 mesi. Nell'ambito di un piano di

vaccinazione contro la Peste Suina Classica, Brauer (2006) ha osservato come i cinghiali di età inferiore ai 3 mesi non riescono a consumare efficacemente le esche, indipendentemente dalla taglia e dalla forma delle stesse. Questo rilievo potrebbe spiegare le nostre osservazioni, anche se necessita di conferme future al fine di confermare o meno le conclusioni di questo autore che ritiene inattuabile la vaccinazione dei cinghiali di età inferiore ai 3 mesi perché non in grado di consumare l'esca.

7. L'appetibilità e la rapidità nel consumo delle esche da parte dei cinghiali potrebbe esserne stata influenzata dal fatto che nell'area di studio gli animali ricevono giornalmente una importante quota di alimento artificiale. Lavori futuri dovrebbero testare ulteriormente l'appetibilità e la selettività delle esche in altre aree dove le densità, il foraggiamento artificiale e la gestione degli animali siano diverse.

7. Bibliografia

- Abalos P., & Retamal P. 2004. ¿Tuberculosis : una zoonosis re-emergente ? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 23(2), 583-594.
- Acevedo Whitehouse K., Vicente J., Gortazar C., Hofle U., Fernandez de Mera IG., & Amos W. 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. Riv. Molecular Ecology , doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02656.X.
- Acevedo P., Vicente J., Höfle U., Cassinello J., Ruiz-Fons F., & Gortázar, C. 2006. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. Epidemiology and Infection. In stampa
- Artois M., 2003. Wildlife infectious disease control in Europe. Riv. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 89-97
- Ballesteros C., Pérez de la Lastra J.M. de la Fuente, J. 2007. Recent developments in oral bait vaccines for wildlife. Recent Patents on Drug Delivery and Formulation, in stampa.
- Brauer A., Lange E., & Kaden V. 2006. Oral immunisation of wild boar against classical Swine fever: uptake studies of new baits and investigations on the stability of lyophilised C-strain vaccine. Riv. European Journal of Wildlife Research, vol 52 n°4, 271-276.
- Brennan M.J., Morris S.I., & Sizemore C.F. 2004. Tuberculosis vaccine development : research, regulatory and clinical strategies. Expert Opin. Biol Ther.4 (9) 1493-1504
- Britton W.J., & Palendira U. 2003. Improving vaccines against tuberculosis. Immunology and Cell Biology 81, 34-45.
- Buddle B. M., Wedlock D.N. & Denis M. 2006. Progress in developpement of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife . Riv Veterinary Microbiology 112 191-200.
- Caley P., & Hone J. 2004. Disease transmission between and within species, and the implications for disease control. Riv. Journal of Applied Ecology 41, 94-104.
- Campbell Tyler A., & Long David B. 2007. Species-specific visitation and removal of baits for delivery of pharmaceuticals to feral swine. Journal of Wildlife Disease, 43(3) , pp 485-491.
- Chico Garcia E. 2004. Caracterizazion del suelo bajo influencia cinegetica.Tesi E.U.I.T.A. Ciudad Real.
- Corner L.A.L. 2005. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. Veterinary Microbiology
- Crawley MJ. 1993. GLIM for Ecologist. Blackwell. London, Regno Unito.
- Cross M.L., Buddle B.M., & Aldwell F.E. 2006. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. Riv. The Veterinary Journal , doi: 10.1016/j.tvjl. 2006.10.005.
- D'Andrea L., Durio P., Macchi E., Perrone A. & Zenna F. 2001. Il Cinghiale (Sus scrofa L.) in Provincia di Torino. Provincia di Torino. Università degli studi di Torino. Pag., 51-55.

- Dini V., Ferroglio E., Serraino., Mignone W., Sanguinetti V., Bollo E. & Rossi L., 2003. Epidemiologia delle micobatteriosi nel cinghiale in Liguria. Riv. J. Mt Ecol.7 (Suppl.): 145-153.
- Guberti V., Zamboni L. & Corrain R., 2003. Interventi di controllo numerico delle popolazioni recettive e dinamica delle infezioni. Riv. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 75-84.
- Gortázar C., Acevedo P., Ruiz-Fons F. & Vicente J. 2006. Disease Risks and Overabundance of Game Species. European Journal of Wildlife Research. 52: 81-87
- Gortázar C., Vicente J., Sámpeter S., Garrido J. M., Fernández-De-Mera I. G., Gavín P., Juste R. A., Martín C., Acevedo P., De La Fuente J. & Hofle U. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in South-Central Spain. Veterinary Research 36, 43-52.
- Gortázar C., Vicente J. & Gavier-Widen D. 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). Veterinary Record, 154, 779-780.
- Gortázar C., Vicente J., Fierro Y., León Vizcaíno L., Cubero M.J. & González M. 2002. Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population. Annals New York Academic of Sciences 969: 210-212.
- Gortázar C., Vicente J., Sámpeter S., Garrido J.M., Fernández-De-Mera I.G., Juste R.A., Martín C., Acevedo P. & Hofle U. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in South-Central Spain. Veterinary Research 36: 43-52.
- Hermoso de Mendoza J., Parra A., Tato A., Alonso J.M., Rey J.M., Peña J., García-Sánchez A., Larrasa J., Teixido J., Manzano G., Cerrato R., Pereira G., Fernández-Llario P. & Hermoso de Mendoza M. 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004) Preventive Veterinary Medicine 74: 239-247
- Herrero J. 2002. Adaptación funcional del jabalí *Sus scrofa* L. a un sistema agrario intensivo en Aragón. Tesi dott., Facultad de Biología de La Universidad Complutense de Madrid.
- Hines M.E., Frazier K.S., Baldwin C.A. et al. 1998. Efficacy of vaccination for *Mycobacterium avium* with whole cell and subunit vaccines in experimentally infected swine. Riv Veterinary Microbiology 63(1) 49-59.
- Höfle U., Vicente J., Acevedo P. & Ruiz-Fons F. 2004. Health risks in game production: the wild boar. "4° International Wild boar Symposium" (Portugal) 19-22 settembre 2002. Riv. Galemys, vol 16 (N.E), 197-206.
- Knobel D.L., du Toit J.T. & Bingham J. 2002. Development of a baiting system for delivery of oral vaccine to free-ranging african wild dogs (*Lycaon pictus*). Riv. Journal of Wildlife Disease, 38(2), 352-362
- Livingston T.R., Gipson Philip S., Ballard Warren B., Sanchez Dana M., & Krausman P.R. 2005. Scat removal: a source of bias in feces-related studies. Wildlife Society Bulletin, 33(1) : 172-178.
- Martin-Hernando M., Hofle U., Vicente J., Ruiz Fons F., Vidal D, Barral M., Garrido J.M., de la Fuente J., & Gortazar C. 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. Riv. Tuberculosis 87, 360-367.

Naranjo V., Hofle U., Vicente J., Martin MP., Ruiz Fons F., Gortazar C., Kocan KM., & de la Fuente J. 2006. Genes differentially expressed in oropharyngeal tonsils and mandibular lymphnodes of tuberculous and non-tuberculous European wild boars naturally exposed to *Mycobacterium bovis*. *Fems Immunology e Medical Microbiology*, Vol. 46, 298-312.

Naranjo V., Ayoubi P., Vicente J., Ruiz-Fons F., Gortazar C., Kocan K.M., & de la Fuente J. 2006. Characterization of selected genes upregulated in non-tuberculous European wild boar as possible correlates of resistance to *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*. In stampa

Parra A., Garcia A., Inglis N.F., Tato A., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza M., Hermoso de Mendoza J. & Larrasa J. 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Research in Veterinary Science* 80: 140-146

Parra A., Larrasa J., García A., Alonso J.M., & Hermoso de Mendoza J. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor análisis. *Veterinary Microbiology* 110: 293-300

Parra A., Fernandez-Llario P., Tato A., Larrasa J., García A., Alonso J.M., Hermoso de Mendoza M. & Hermoso de Mendoza J. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology* 97: 123-133

Ruiz Fons J.F. 2006. Riesgos sanitarios asociados a la producción cinegética del jabalí : la enfermedad de Aujeszky. Tesi dott., Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos.

Sanchez Dana M., Krausman Paul R., Livingston Troy R. & Gipson Philip S. 2004. Persistence of carnivore scat in the Sonoran Desert. *Wildlife Society Bulletin* 32(2) : 366-372

Smith Issar. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Vol. 16, No. 3, 463-496

Vicente. J., Höfle U., Garrido J. M., Fernández-de-mera I. G. , Acevedo P., Juste R., Barral M. & Gortazar C. 2006. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Riv. Vet. Res.* 38

Vicente J., Höfle U., Garrido J.M., FERNÁNDEZ-DE-MERA I.G., Acevedo P., Juste R., Barral M., Gortázar C. 2006b. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in South Central Spain. *Veterinary Research*. In stampa

Vicente J., Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Acevedo P., Villanua D., Fernandez-De-Mera I.G., Martin M.P., Gortazar C. 2005. Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. *Veterinary Record* 156: 408-412

Vicente J., Fierro J., Gortazar C. 2005. Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Riv. Vet Res.* 36 (2005) 43-52

Yasuda M. 2004 .Monitoring diversity and abundance of mammals with camera traps: a case study on Mount Tsukuba, central Japan. *Mammal Study* 29: 37-46