

**Alma Mater Studiorum Università di Bologna**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**  
**Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria**

Materia di Tesi: Patologia della selvaggina

**INDAGINE VIROLOGICA PER LA  
RICERCA DI VIRUS INFLUENZALI IN  
GALLIFORMI FASIANIDI E  
TETRAONIDI SELVATICI DELLE ALPI  
CENTRALI**

Tesi di Laurea di:  
**Ghetti Giulia**

Relatore:  
Dott. **Delogu Mauro**

Correlatore:  
Dott.ssa **Cotti Claudia**

Visto, si approva la tesi

\_\_\_\_\_  
(firma del relatore)

Anno Accademico 2009/2010  
Sessione III

**Alma Mater Studiorum Università di Bologna**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**  
**Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria**

Materia di Tesi: Patologia della selvaggina

**INDAGINE VIROLOGICA PER LA  
RICERCA DI VIRUS INFLUENZALI IN  
GALLIFORMI FASIANIDI E  
TETRAONIDI SELVATICI DELLE ALPI  
CENTRALI**

Tesi di Laurea di:  
**Ghetti Giulia**

Relatore:  
Dott. **Delogu Mauro**

Correlatore:  
Dott.ssa **Cotti Claudia**

Visto, si approva la tesi

\_\_\_\_\_  
(firma del relatore)

Anno Accademico 2009/2010

Sessione III

## INDICE

**RIASSUNTO**..... p. 3

**INTRODUZIONE**..... p. 5

### PARTE PRIMA

**CAP. 1 – Cenni di biologia di specie**..... p. 15

1.1 Fagiano di monte..... p. 19

1.2 Pernice bianca..... p. 27

1.3 Coturnice..... p. 36

**CAP. 2 – Influenza aviaria**..... p. 44

### PARTE SECONDA

**CAP. 1 – Materiali e metodi**..... p. 69

1.1 Area di studio..... p. 69

1.2	Censimento dei Galliformi alpini..	p. 77
1.3	Prelievo dei Galliformi alpini.....	p. 91
1.4	Raccolta campioni.....	p. 94
1.5	Biologia molecolare.....	p. 103
<b>CAP. 2 – Risultati.....</b>		<b>p. 110</b>
<b>CAP. 3 – Discussione e conclusioni.....</b>		<b>p.111</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>p. 115</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>		<b>p. 127</b>

In epoca recente le infezioni sostenute da virus influenzali di Tipo A sono divenute una delle sfide più importanti di sanità umana e veterinaria. Questi virus sono infatti accomunati dal fatto che emergono per entrambi i percorsi dal *pool* genico presente nello stesso serbatoio animale. Questa malattia, sostenuta da un virus appartenente alla famiglia degli *Orthomyxoviridae*, è responsabile di focolai sia nei volatili selvatici sia nelle loro derivazioni domestiche, destando preoccupazione non solo per l'industria avicola, dove può dar luogo ad una malattia economicamente devastante, ma anche per la sanità pubblica.

Considerando il ruolo dei Galliformi *Phasianidae* domestici (*Gallus gallus*) nella circolazione e nel mantenimento delle popolazioni di virus influenzali nel pianeta, lo scopo della presente tesi è quello di implementare le conoscenze, ancora scarse e contrastanti, sul ruolo ecologico dei Galliformi selvatici contribuendo a determinare quale sia il grado di coinvolgimento di questi ultimi nell'ecologia dei virus influenzali di tipo A. Oggetto della presente ricerca sono specie selvatiche a vita libera appartenenti a metapopolazioni di Galliformi *Phasianidae*, *Alectoris graeca*, e *Tetraonidae*, *Tetrao tetrix* e *Lagopus mutus*. Trattandosi di specie relitte post-glaciali con un ciclo biologico che si svolge a quote comprese tra i 1400 e 3000 m s.l.m., l'area investigata ha interessato le Alpi centrali della regione Lombardia in provincia di Sondrio con un periodo di campionamento avvenuto negli anni 2003 e 2004. Sono stati raccolti 45 tamponi cloacali di fagiano di monte (*Tetrao tetrix*), 23 di pernice bianca (*Lagopus mutus*) e 11 di Coturnice (*Alectoris graeca*), per un totale di 79 campioni.

Mediante metodiche di biologia molecolare (*RT-PCR*), non è stata evidenziata la presenza dell'*Orthomyxovirus* nel biennio di studio in alcuna delle classi di sesso e di età delle tre specie investigate. Questo consente di escludere la presenza di circolazione virale all'interno delle popolazioni oggetto di studio, non attribuendo quindi alle stesse un ruolo ecologico attivo nel mantenimento dell'agente

virale. Tale dato apre la porta a considerazioni di tipo conservazionistico riguardanti la tutela delle specie oggetto di ricerca, soprattutto legate al rischio connesso all'introduzione di individui portatori di patologie trasmissibili potenzialmente letali per queste popolazioni *naïve* nei confronti degli *Orthomyxovirus*. Ne consegue un'estrema attenzione sanitaria e genetica che dovrebbe essere applicata ad ogni singola interazione che preveda movimentazioni e rilasci all'interno dello stesso ecosistema di soggetti allevati dall'uomo, pena la totale estinzione della specie selvatica.

Negli ultimi anni l'influenza aviaria è divenuta una delle sfide più importanti di sanità umana e veterinaria, che sono emerse da serbatoi animali (WHO, 2000). L'insorgenza di focolai, rilevati nel pollame e nei volatili selvatici in molti paesi asiatici, europei ed africani, sono una fonte di preoccupazione non solo per l'industria avicola, in cui si ha una malattia economicamente devastante, ma anche per la salute pubblica. Infatti il potenziale di questi virus di causare una pandemia rappresenta una costante minaccia per pollame, uccelli selvatici ed esseri umani. (Webster, 1997).

L'epidemiologia dei virus dell'influenza aviaria è complessa, con molti aspetti ancora da chiarire, in particolar modo in relazione al serbatoio, ritenuto da molti essere gli uccelli selvatici. Sebbene questi virus infettino numerose specie ospiti, come suini, cavalli, cani, felidi, furetti, foche e varie specie aviarie, analisi filogenetiche indicano che tutti i virus influenzali sono ancestralmente legati ai virus degli uccelli acquatici (Webby *et al.*, 2007), che quindi sono stati riconosciuti come serbatoio principale. In natura gran parte di popolazioni di specie selvatiche aviarie interagiscono con i virus influenzali.

Uno studio di isolamento virale, condotto su 88 specie, suddivise in 22 Famiglie ed in 12 Ordini, quali Gaviformi, Podicipediformi, Procellariiformi, Pelecaniformi, Ciconiformi, Anseriformi, Galliformi, Columbiformi, Gruiformi, Caradriformi, Piciformi e Passeriformi, ha dimostrato che queste specie volatili a vita libera possono assumere diversi ruoli epidemiologici nel ciclo naturale dell'influenza (Stallknecht e Shane, 1988). In questo studio la prevalenza percentuale complessiva di isolamento virale è risultata pari al 10.9% (2317 virus influenzali isolati da 21318 uccelli) e in particolare del 15.2% negli Anseriformi selvatici (2173 virus provenivano da 14303 volatili di questa specie), del 2.9% nei Passeriformi e del 2.2% nei Caradriformi (Stallknecht e Shane, 1988), evidenziando pertanto il ruolo ecologico primario rivestito dagli Anseriformi.

Anche se nelle specie aviarie circolano tutti i sottotipi di emoagglutinina (H1/H16) (Fouchier *et al.*, 2005) e di neuroaminidasi (N1/N9) ad oggi conosciute, il virus probabilmente ha trovato il serbatoio epidemiologico negli Anseriformi. In questo Ordine zoologico, originatosi dal punto di vista filogenetico nell'Oligocene (circa 23-34 milioni di anni fa) ed evolutosi nelle forme attuali nel Miocene, in un'epoca compresa tra i 7 ed i 10 milioni di anni fa, il virus ha stabilito rapporti stabili e ha avuto modo di coevolvere, andando incontro, in questi volatili, ad una stasi evolutiva, che consiste in una quasi totale attenuazione della patogenicità e in una bassa frequenza di mutazioni puntiformi (*drift* antigenico) (Webster *et al.*, 1992). Questi virus sporadicamente possono attraversare barriere interspecie ed interclasse e risultano capaci di infettare le specie selvatiche e le loro derivazioni domestiche, esprimendo successivamente patogenicità elevate. Infatti in tempi successivi i virus hanno esteso lo spettro d'ospite ad altri gruppi aviari, evolvendosi rapidamente, adattandosi all'ospite e, talvolta, acquisendo un'elevata patogenicità.

Fino ad oggi da un elevato numero di specie aviarie selvatiche sono stati isolati numerosi virus influenzali a bassa patogenicità (LPAIV), mentre più raramente forme altamente patogene (HPAIV). Questo è successo prevalentemente in uccelli selvatici trovati morti in vicinanza di allevamenti infettati da virus ad alta patogenicità (Capua *et al.*, 2000).

In uccelli selvatici a vita libera sono state osservate mortalità di massa e forme con una forte sintomatologia clinica, non correlate ad epidemie ad alta patogenicità in allevamenti avicoli, nel 1961 in Sud Africa e nel 2002 ad Hong Kong. Nel 1961, data che corrisponde anche al primo isolamento di virus influenzali di tipo A in volatili selvatici, un virus altamente patogeno (H5N3) causò la morte di circa 1300 sterne comuni (*Sterna hirundo*), mentre nel 2002 un focolaio HPAIV (H5N1) portò alla morte di anatre selvatiche stanziali e di uccelli selvatici migratori in due parchi nazionali di Hong Kong (*Kowloon and Penfold Parks*).

L'ecologia dei virus dell'Influenza di tipo A costituiscono un sistema

dinamico in cui coesistono costanti strutturali (serbatoio, migrazioni) ed altre variabili ambientali strettamente legate alle caratteristiche biologiche delle specie aviarie interessate come serbatoio o, eventualmente, come epifenomeno, condizionando sia la biologia stessa dei volatili, sia la loro interazione con il virus (Delogu *et al.*, 2003).

Tra le specie aviarie a vita libera, gli Anseriformi, grazie alle loro caratteristiche etologiche, come l'elevata tendenza all'aggregazione, la possibilità di compiere migrazioni e l'intima interazione con l'ambiente acquatico, rappresentano l'ospite ideale e quindi il serbatoio dell'agente eziologico, ovvero il sistema in cui questo virus riesce a perpetuarsi nel tempo. In queste specie, che subiscono un'infezione per lo più asintomatica o con una modesta sintomatologia, il virus influenzale replica nel tratto respiratorio e/o in quello gastrointestinale con una eliminazione rispettivamente attraverso le secrezioni orofaringee ed il materiale fecale per un periodo di circa 2-4 settimane. Tuttavia il sito di infezione può variare nelle varie specie. Studi di isolamento virale hanno dimostrato che il germano reale (*Anas platyrhynchos*) presenta una maggior probabilità di isolamento da tamponi del tratto cloacale, l'oca lombardella (*Anser albifrons*) dal tratto orofaringeo, mentre nel fischione eurasiatico (*Anas penelope*) non sussistono differenze tra i due siti (Hoye *et al.*, 2010).

Nel Paleartico occidentale la popolazione di Anseriformi può essere suddivisa in specie sedentarie, come casarca (*Tadorna ferruginea*), gobbo rugginoso (*Oxyura leucocephala*) ed anatra marmorizzata (*Anas angustirostris*), che rimangono per tutta la loro vita in determinate regioni geografiche, in specie migratorie, quali marzaiola (*Anas querquedula*) e pesciaiola (*Mergellus albellus*), che compiono vere e proprie migrazioni da nord a sud e, infine, in specie parzialmente migratorie, che costituiscono la maggior parte della famiglia degli Anatidae, che con diversa importanza rivestono, in Europa, il ruolo di serbatoio per i virus influenzali (Delogu *et al.*, 2003). Proprio le migrazioni sono un fattore rilevante nell'ecologia di

questa malattia, poiché consentono la diffusione dei virus, come hanno dimostrato studi di isolamento virale condotti in Italia presso la laguna di Orbetello in Toscana, zona interessata da rotte migratorie invernali (De Marco *et al.*, 2003a). Le anatre selvatiche migrano per diverse necessità biologiche, che ne condizionano la sopravvivenza e che variano nelle diverse specie e popolazioni. In tarda estate ed autunno i volatili adulti e i giovani intraprendono migrazioni stagionali con lenti movimenti di discesa per raggiungere le aree di svernamento a clima più mite, mentre in tardo inverno ed inizio primavera individui potenzialmente riproduttivi compiono rapidi movimenti di risalita verso i quartieri di riproduzione. La natura ciclica della circolazione dei virus influenzali di tipo A è condizionata dalla presenza dei giovani uccelli, i quali, caratterizzati da una spiccata sensibilità per l'agente eziologico (Delogu *et al.*, 2003), si infettano nelle aree di aggregazione migratorie del nord e contribuiscono durante la discesa al sud alla diffusione dei virus con l'eliminazione del materiale fecale contaminato. Questo è stato confermato da ricerche svolte su anatidi presso i laghi di Alberta, dove, nei giovani prima della migrazione, sono state raggiunte percentuali di isolamento superiori al 60% (Hinshaw *et al.*, 1980). Durante la migrazione verso sud gli uccelli diffondono l'infezione in maniera sempre meno efficiente con frequenze di isolamento che si portano al 0.01% (Kawaoka *et al.*, 1988). In seguito alla migrazione di ritorno, in Canada, gli isolamenti virali hanno raggiunto lo 0.25% dimostrando così il ruolo attivo delle anatre nella reintroduzione, anche se a bassi livelli, dei virus influenzali nei siti riproduttivi (Webster *et al.*, 1992). Censimenti invernali annuali hanno stimato che la consistenza totale delle popolazioni aviarie acquatiche, che compiono migrazioni nel Paleartico occidentale, è compresa tra i 13 e i 15 milioni di uccelli (Delogu *et al.*, 2003). Questi volatili si concentrano ad alte densità in aree di aggregazione, le quali sono affollate da molte specie migratrici di uccelli acquatici e da specie sedentarie, formando così gruppi omo- ed eterospecifici che favoriscono la trasmissione di virus influenzali sia per contatto diretto uccello-uccello, sia per contatto indiretto tramite l'eliminazione fecale nell'ambiente acquatico da

parte di soggetti eliminatori.

Per questo motivo, l'ambiente acquatico e l'acqua assumono un ruolo molto importante non solo come elemento di trasmissione della malattia, ma anche di conservazione temporale del virus, che dipende dal pH, dalla salinità e dalla temperatura (Stalknecht *et al.*, 1990a, 1990b). Infatti i virus influenzali possono persistere in acqua circa un paio di mesi a temperature di 20°C, concentrandosi prevalentemente sulla superficie (Delogu *et al.*, 2006), come è stato evidenziato anche da studi, svolti in Norvegia, sulla prevalenza dei virus influenzali in uccelli selvatici. Queste ricerche, infatti, denotano una prevalenza maggiore di infezione nelle anatre di superficie (12.8%), quali ad esempio germano reale, fischione euroasiatico ed alzavola (*Anas crecca*) mentre nelle anatre tuffatrici, come smergo maggiore (*Mergus merganser*), moretta (*Aythya fuligula*), edredone comune (*Somateria mollissima*) e quattrocchi comune (*Bucephala clangula*), è stata osservata una prevalenza inferiore (4.1%) (Germundsson *et al.*, 2010).

L'acqua che viene assunta come bevanda o come alimento per filtrazione, espone all'assunzione dell'agente virale. In questo modo, gli uccelli possono acquisire il virus, libero nell'acqua, consentendo a numerose specie separate da limiti etologici ed ecologici di venire indirettamente a contatto. Proprio per questo motivo Passeriformi, Galliformi selvatici e, in misura minore, Columbiformi possono essere un'interfaccia ecologica tra le specie serbatoio e gli uccelli domestici (Delogu *et al.*, 2003).

Il ruolo chiave dell'acqua è stato dimostrato anche grazie all'isolamento di virus influenzali aviari dalle acque superficiali. Considerando però l'elevata diluizione che subiscono le feci in acqua fino a percentuali infinitesimali, si verifica una forte diminuzione del rischio di iterazione virus/ospite. Studi hanno dimostrato che il virus durante la sua evoluzione ha messo in atto come meccanismo quello di legarsi allo strato di grasso impermeabilizzante, prodotto dall'uropiglio, che ricopre le penne dei volatili. In questo modo il virus raggiungerebbe rapidamente una concentrazione sul piumaggio nettamente superiore a quella ambientale e quando gli uccelli, da soli

o reciprocamente, si sistemano le piume con il becco, attività alla quale dedicano il 10% della loro giornata, ingeriscono questo grasso, ricco di vitamina D e, pertanto, si contagerebbero anche in assenza di contatto con individui infetti (Delogu *et al.*, 2010). Questo meccanismo consentirebbe anche di spiegare le modalità di circolazione virale, che comprenderebbero non solo soggetti eliminatori, ma anche soggetti sani o già guariti dalla malattia, che in questo modo parteciperebbero direttamente alla circolazione virale (Delogu *et al.*, 2010).

Gli uccelli selvatici possono, inoltre, rivestire il ruolo di epifenomeno, cioè possono essere in grado di albergare e di diffondere il virus per un periodo di tempo limitato, senza consentire il mantenimento della malattia in natura. Circa 400 specie aviarie italiane possono assumere questo ruolo, ma studi di monitoraggio dell'avifauna selvatica dal 1992 al 1999, hanno dimostrato che la circolazione dei virus influenzali di tipo A nelle specie epifenomeno è nettamente ridotta se paragonata alle specie serbatoio (De Marco *et al.*, 2003a, 2003b). Queste ricerche hanno dimostrato come numerose specie evidenzino un'interazione con i virus influenzali modesta o, addirittura, assente e dimostrabile solamente sierologicamente.

Fanno parte degli epifenomeni, i Caradriformi, quali i *Laridae* e gli *Sternidae*, che compiono lunghe migrazioni in Est Europa o in Africa del sud, i Passeriformi, come la cannaiola (*Acrocephalus scirpaceus*), che sono una specie di possibile interfaccia ecologica, gli Anatidi, che svernano nelle aree sub-sahariane (Marzaiola) e i Rapaci diurni e notturni che sono specie all'apice della catena alimentare. Anche specie di Galliformi stanziali, come il fagiano (*Phasianus colchicus*) e migratori, come la quaglia (*Coturnix coturnix*), i quali presentano un'affinità filogenetica con il pollo (*Gallus gallus domesticus*), in quanto tutti appartenenti alla famiglia di *Galliformes Phasinidae*, possono assumere il ruolo di epifenomeno; sebbene studi effettuati nel febbraio del 1992 e del 1994 nelle aree delle valli del delta del Po su 379 sieri di fagiano a vita libera e nel maggio del 1998 in provincia di Pesaro-Urbino su 260 sieri di quaglie hanno evidenziato una sieronegatività in tutti i

soggetti (De Marco *et al.*, 1999).

Il ruolo dei Galliformi selvatici nella circolazione dei virus influenzali e nella loro successiva potenziale evoluzione verso popolazioni virali ad elevata patogenicità risulta essere ad oggi controverso. Da un lato le popolazioni domestiche dei Fasianidi (*Gallus gallus*) risultano essere uno dei principali punti di forza che i virus influenzali utilizzano per implementare la loro popolazione nel pianeta, mentre di contro scarse e contrastanti sono le informazioni riguardanti la circolazione dei virus stessi nelle popolazioni di Galliformi selvatici. La ricerca a seguito presentata ha lo scopo di investigare quale sia il grado di coinvolgimento di ulteriori specie di Galliformi selvatici a vita libera, quali Galliformi *Phasianidae*, *Alectoris graeca*, e *Tetraonidae*, *Tetrao tetrix* e *Lagopus mutus*. La scelta di queste specie quali oggetto della ricerca è riconducibile all'ecologia delle stesse (isolamento geografico), alle esigenze di conservazione e tutela, così come anche all'affinità filogenetica con alcune specie allevate. Trattandosi per alcune di queste di specie relitte post-glaciali, l'area investigata ha interessato le Alpi centrali della regione Lombardia in provincia di Sondrio con un periodo di campionamento avvenuto negli anni 2003 e 2004.

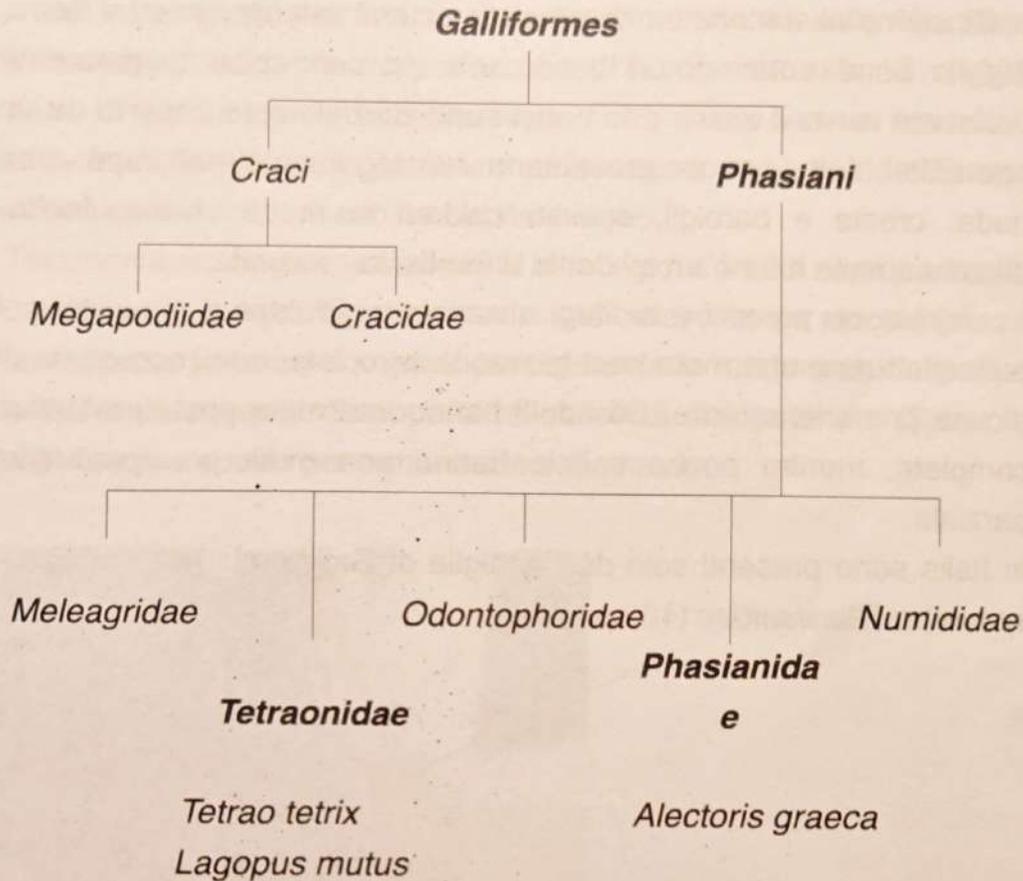


## PARTE PRIMA

TABLE 1

—

—



L'ordine dei Galliformi è un gruppo omogeneo e probabilmente monofiletico di volatili, suddiviso in 2 sottordini (*Craci*, *Phasiani*). I *Craci* raggruppano *Megapodidae*, distribuiti in Australia, e *Cracidae*, localizzati in America. I *Phasiani* comprendono *Meleagridae*, *Tetraonidae*, *Odontophoridae* e *Numididae*.

Sono specie di dimensioni variabili e di forme massicce e compatte. Le zampe sono corte e pesanti con dita, dotate di forti unghie, posizionate tre nella porzione anteriore del piede ed una, vestigiale, in quella posteriore. Sono zampe adatte ad una vita terrestre, essendo volatili che vivono prevalentemente sul terreno, con qualche specie parzialmente arboricola. Sono infatti ottimi corridori e/o camminatori che effettuano brevi voli, ad eccezione della quaglia

(*Coturnix coturnix*) che è l'unica specie che effettua lunghi voli di migrazione transahariana. Le ali sono corte, larghe e arrotondate con circa 10 remiganti primarie e 10-20 remiganti secondarie che nell'insieme assumono un' caratteristica curvatura (Spagnesi e Serra, 2004). Sono dotati di un becco robusto con apice leggermente incurvato verso il basso e le narici sono parzialmente coperte da un opercolo. Molte specie presentano nel tegumento del capo aree nude, creste e barbigli, spesso colorati in modo vivace. Inoltre diverse specie hanno un evidente dimorfismo sessuale.

I pulcini sono precoci e nidifugi e nascono già coperti di piumino. I pulli effettuano una muta post-giovanile completa, con l'eccezione di alcune primarie esterne. Gli adulti hanno una muta post-riproduttiva completa, mentre poche specie hanno una muta pre-riproduttiva parziale.

In Italia sono presenti solo due famiglie di Galliformi: *Tetraonidae* (4 specie) e *Phasianidae* (10 specie).

## TETRAONIDI

La famiglia dei Tetraonidi comprende un gruppo di volatili, terricoli e/o arboricoli, di medio-grandi dimensioni a distribuzione oloartica circumpolare con popolazioni relitte di origine postglaciale nei maggiori sistemi montuosi euroasiatici. Il termine "tetrao" sembra che derivi dal greco antico "τετράζω", che significa schiamazzo e strido, termine molto comprensibile se si considera l'elevata vocalità di questi uccelli e in modo particolare dei maschi nel periodo nuziale.

Le prime tracce fossili di questa famiglia, ritrovate in Nebraska, risalgono al Miocene inferiore, circa 20 milioni di anni fa, era in cui il ponte di terra sullo stretto di Bering, formatosi al culmine delle glaciazioni, permise il passaggio di questi volatili dall'ecozone nearctica a quella paleartica. Studi su fossili hanno dimostrato che, nel Miocene superiore e più precisamente il genere *Tetrao* ha avuto

la prima apparizione nei Balcani e nell'Europa non oltre il primo periodo del Pliocene (Boev, 2002). Inoltre durante il Neozoico, era in cui si sono succedute varie glaciazioni, questi uccelli, favoriti dai climi freddi, si sono spostati fino ai versanti più meridionali delle Alpi. Dopo il ritiro dei ghiacci, che ricoprivano tutta l'Europa centrale, la maggior parte di queste specie è risalita verso nord, e una parte si è adattata a vivere nelle Alpi, nelle pianure e nelle catene montuose dell'Europa centrale, che costituivano un habitat idoneo.

Testimonianza degli adattamenti ai climi rigidi e freddi sono particolari caratteristiche morfologiche, quali narici ricoperte da piccole penne, tarsi senza sperone e coperti parzialmente o totalmente da penne, anziché da squame. Sono, inoltre, dotati di dita pettinate (figura 1), che sono un ausilio per camminare sulla neve.



Dita pettinate

**Figura 1:** Particolare delle dita pettinate di *T. tetrix*.

Molte specie presentano caruncole sopra gli occhi di un colore che varia da un giallo brillante ad un rosso scarlatto e che tendono ad aumentare di volume, diventando evidenti, prevalentemente nei maschi nel periodo del corteggiamento.

La famiglia dei Fasianidi comprende un gruppo di uccelli di piccole e grandi dimensioni, a distribuzione praticamente cosmopolita, ad eccezione delle regioni polari, di alcune aree del Sud America e della maggior parte delle isole oceaniche. A differenza dei Tetraonidi, i Fasianidi sono prevalentemente diffusi nelle fasce climatiche temperate e calde. Questo gruppo di volatili è composto da tante specie diverse difficili da classificare, ma a livello internazionale sono riconosciute due sottofamiglie abbastanza distinte, *Perdicinae* (le quaglie e le pernici eurasiatiche) e *Phasianine* (fagiani e pavoni). Questa famiglia comprende soggetti dal corpo massiccio, ali corte ed arrotondate (10 remiganti) e coda di lunghezza e forme variabili. Il becco, non particolarmente convesso, è piuttosto corto, le narici sono prive di penne, come anche in genere i robusti tarsi ed i piedi, che nei maschi di alcune specie possono essere dotati di un solo sperone. Le dita, non pettinate, sono dotate di forti unghie ricurve. In certe specie è presente un elevato dimorfismo sessuale morfologico, mentre in altre gli abiti sessuali sono abbastanza somiglianti.

## 1.1 FAGIANO DI MONTE

Regno:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Chordata</i>
Subphylum:	<i>Vertebrata</i>
Classe:	<i>Aves</i>
Ordine:	<i>Galliformes</i>
Sottordine:	<i>Phasiani</i>
Famiglia:	<i>Tetraonidae</i>
Genere:	<i>Tetrao</i>
Specie:	<i>Tetrao tetrix</i> (Linnaeus, 1758)

Specie politipica a corologia eurosibirica boreoalpina, con areale che si estende attraverso l'intera Eurasia dalla Gran Bretagna sino alla Siberia orientale. Sono note 7 sottospecie.

Nel nostro paese è una specie sedentaria e nidificante nell'Alpi. È distribuita in maniera omogenea su tutto l'arco alpino e prealpino e si è insediata anche a quote poco elevate sulle Alpi Liguri, Prealpi Lombarde, Altopiano di Asiago e Prealpi Giulie.

La popolazione è stimata in 20000-24000 individui in primavera (circa 10000 covate). Negli anni sono state calcolate consistenze a fine estate che si portano dai 37500-42600 individui della metà degli anni '80 ai 30000-40000 dell'inizio degli anni '90, per giungere a consistenze pari a 26000-32000 individui alla fine degli anni '90 (Brichetti e Fracasso, 2004).

## Biometria di *T. tatrix* (tratta da Brichetti e Fracasso, 2004)

Lunghezza totale: 400-550 mm

Apertura alare: 650-800 mm

Esemplari italiani:

Biometrie	Maschio	Femmina
Ala	242-285 mm	222-232 mm
Becco (dalla narice)	13.8-18.3 mm	12.5-14.9 mm
Tarso	44.1-56.6 mm	44.1-57.6 mm
Coda (18 timoniere)	t1 98-128 mm	t1 95-110 mm
	t9 142-243 mm	t9 118-132 mm
Peso	1000-1480 gr	800-1100 gr

## Caratteristiche morfologiche

Tetraonide di dimensioni medio grandi dotato di una coda relativamente lunga e di un capo piccolo. Vi è un elevato dimorfismo sessuale sia per le dimensioni sia per il piumaggio.

La livrea maschile tende al blu-nero con riflessi blu metallici sul dorso e sul petto. Il capo ed il collo sono di color nero con riflessi verde metallico e soltanto sulla superficie superiore dell'ala, di color bruno-nero, si può notare uno specchio alare bianco tra la base delle copritrici primarie e l'alula. Aree bianche sono localizzate anche nel sottoala e nel sottocoda. Le timoniere laterali sono ricurve verso l'esterno e conferiscono alla coda una particolare forma "a lira" (da qui il nome anche di gallo forcello), che è molto evidente soprattutto durante le parate (*figura 2*).



**Figura 2:** Particolare della coda a lira del *T. tetrax*.

I tarsi sono rivestiti di piume brune con macchiette bianche. Il becco è breve e ricurvo, di colore scuro ed è ricoperto da piccole piume che scendono oltre le narici. Sopra gli occhi vi sono delle caruncole, escrescenze carnose, che diventano appariscenti nel periodo riproduttivo (figura 3).



**Figura 3:** Particolare delle narici piumate e delle caruncole di *T. tetrax*.

La femmina di fagiano di monte è di color bruno rossiccio con ampie barrature e screziature di nero e grigio sul collo, sui fianchi e sul ventre. Questo piumaggio si rileva molto mimetico tra le pietraie, le eriche e i chiaro oscuri del bosco e costituisce un'ottima difesa contro i predatori (Martino, 2004). Da lontano potrebbe essere scambiata per una femmina di *T. urugallus* dalla quale si distingue per l'assenza

della macchia rossiccia sul petto, per la coda leggermente forcuta e per le dimensioni inferiori.

Tra giugno ed ottobre si ha una muta post-riproduttiva che interessa prima i soggetti maschi e che prevede la sostituzione delle primarie con modalità discendente dalla più interna. Le secondarie vengono sostituite con andamento divergente da due centri di muta successivi (s3 e s2). Infine le timoniere vengono rinnovate quasi completamente con andamento centripeto dalle più esterne (Brichetti e Fracasso, 2004).

Tra giugno e luglio si ha anche una muta supplementare parziale o eclissale limitata alle penne del capo e del collo che dopo circa un mese vengono nuovamente sostituite. Inoltre subiscono una vera e propria muta del becco e degli artigli. Infatti il fagiano di monte, analogamente ad altri Tetraonidi, nel periodo estivo quando si ciba di mirtilli e bacche di ginepro perde la vecchia ranfoteca, l'astuccio corneo che riveste il becco, la quale viene completamente ricostituita nel periodo invernale quando si ciba di aghi di conifere.

I giovani sono simili alla femmina, ma sono di dimensioni più ridotte ed hanno una colorazione più smorta. I soggetti immaturi maschi nel



corso dell'autunno assumono un aspetto simile a quello degli adulti e si differenziano per la presenza di molte penne del dorso barrate o vermicolate di bruno, per riflessi metallici poco spiccati e per la forma a lira della coda poco accentuata (figura 4).

**Figura 4:** Esempio di giovane di *T. tetrax*.

Le remiganti primarie più esterne (p9 e p10) sono più appuntite delle altre ed in punta presentano sottili e leggere barrature brune (De Franceschi, 1992). Hanno caruncole rosso-arancio e il becco inizialmente è nella parte superiore di color bruno, mentre in quella inferiore giallastro. Le femmine immature hanno una colorazione più pallida e grigiasta.

I pulli presentano parti superiori fulve a disegni scuri, mentre quelle inferiori sono di color crema chiaro. Dopo circa 2 settimane dalla nascita i pulli hanno una muta post-giovanile che perdura per 3-4 mesi.

In natura è possibile trovare varie forme di ibridazione con altri Galliformi, quali *Tetrao urugallus*, *Bonasia bonasia*, *Lagopus mutus*, *Phasianus colchicus*. In passato in Italia sono stati osservati ibridi di *T. tetrix* X *T. urugallus*, che sono stati chiamati tetraoni mezzani (De Franceschi, 1992).

### **Habitat**

Sulle Alpi occupa in modo stabile una fascia altimetrica che si estende dagli 800 ai 1800 m s.l.m. nelle aree prealpine e dai 1400-1700 ai 2200-2300 m s.l.m. nei massicci alpini interni (Spagnesi e Bocca, 2004). Frequenta ambienti costituiti prevalentemente da conifere, quali, l'larice (*Larix decidua*), pino cembro (*Pinus cembra*), abete rosso (*Picea abies*), ma anche da latifoglie, come carpino bianco (*Carpinus betulus*), dove sosta tra spiazzati, radure con sottobosco ricco di piante erbacee ed arbusti con bacche e frutti di cui si ciba durante tutto l'anno. Nelle stagioni invernali si rifugia in zone inaccessibili, costituite da strapiombi, pareti verticali, fenditure di granito e gigantesche morene, cosparse di ontani (*Alnus spp.*) e rododendri (*Rhododendron ferrugineum*)(Martino, 2004).

### **Alimentazione**

Sono animali onnivori, ma hanno una dieta quasi esclusivamente vegetale, tranne nelle prime settimane di vita quando sono insettivori. Nel periodo autunnale ed invernale si nutrono di bacche di mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus*), di sorbo degli uccellatori (*Sorbus*

*aucuparia*) e di foglie e getti di rododendro, di faggio (*Fagus sylvatica*), e di erica (*Erica carnea*). La capacità di cibarsi di gemme, di amenti e di getti di conifere ha permesso a questi uccelli stanziali di sopravvivere durante gli inverni (de Juana, 1994). La sopravvivenza con alimenti poco energetici è possibile grazie ad intestini particolarmente lunghi, che consentono la digestione della cellulosa ad opera dei batteri altamente specializzati (Storch, 2006). Inoltre la lunghezza dell'intestino e, soprattutto, dei due cechi, essendo correlata positivamente al contenuto di fibra dell'alimento (Remington, 1989), nel periodo invernale subisce un incremento, che permette all'animale di digerire i rametti legnosi e gli aghi di conifere, tipici dell'alimentazione invernale, ricavandone il massimo valore energetico.

Nel periodo primaverile ed estivo rientrano nella loro dieta gemme, punte gemmate foglie e fiori di numerose specie vegetali, quali per esempio mirtillo, rododendro, betulle (*Betula spp.*). Si cibano anche di vari frutti in corso di maturazione presenti nel sottobosco.

Soltanto i giovani uccelli nelle prime settimane di vita hanno una dieta proteica, costituita da insetti, loro larve, ortotteri ed aracnidi.

### **Abitudini e comportamento**

Il fagiano di monte è un volatile prevalentemente terricolo, ma anche arboricolo, riuscendo a posarsi per lunghi tempi nei rami degli alberi. Si muove nel terreno con facilità e tende ad involarsi soltanto se viene spaventato. Riesce a volare per lunghi tratti in planata, ma anche a sollevarsi raggiungendo quote elevate. Ha un volo rapido e molto potente e l'involo non è particolarmente rumoroso.

Normalmente trascorre le notti sul terreno. Molto interessante invece è il suo comportamento, simile anche al genere *Lagopus*, durante le notti invernali, quando suole scavare buche nella neve. Queste buche di circa 60 cm, dove si rifugia per trascorrere i periodi di riposo, vengono utilizzate solo una volta e gli consentono un

notevole risparmio energetico.

Sono volatili di natura schiva, talvolta solitari, ma nella maggior parte dei casi vivono all'interno di gruppi monosessuali, soprattutto nel periodo invernale. Sono tendenzialmente sedentari, ma spesso compiono movimenti locali in inverno spinti da esigenze alimentari, spostandosi dalle foreste di latifoglie a quelle di conifere (de Juana, 1994). Infatti compiono erratismi durante le stagioni fredde, normalmente inferiori a 3-5 km e comunque non superiori a 10-15 km. Sono inoltre segnalate delle migrazioni verticali invernali di discesa fino a quote di 75-150 m s.l.m., soprattutto da parte delle femmine (Brichetti e Fracasso, 2004).

### Ciclo annuale e riproduzione



**Figura 5:**  
Rituali di corteggiamento  
(Martino, 2004)

Per la maggior parte dell'anno il fagiano di monte è una specie generalmente gregaria, a parte durante il periodo degli amori. Infatti all'inizio della stagione riproduttiva, tra metà marzo e giugno, è possibile assistere, all'interno di aree di canto o *lek*, a particolari esibizioni maschili comunitarie (da 2-4 maschi raramente oltre 10), caratterizzate da "danze rituali", corteggiamenti e talvolta da aspre battaglie tra i soggetti più forti, intenzionati ad accaparrarsi i favori di più femmine (*figura 5*). I maschi dominanti tendono a percorrere i confini dell'arena, emettendo particolari vocalismi soffiati o gorgoglianti (soffi e rugolii) e trascinando la coda spiegata a ventaglio, pronti ad assalire con impeto qualsiasi altro gallo che tenti di insidiare la loro posizione (Martino, 2004).

I luoghi del canto, che rimangono invariati per generazioni e sono stabili fino a che non vengano apportati mutamenti all'ambiente, sono esposti a levante in modo che i fagiani di monte possano sfruttare sia l'albore protettivo del crepuscolo, sia le prime luci del giorno (Salvini, 1967).

In seguito all'accoppiamento le femmine si disperdono e si appartano nella ricerca del sito dove avverrà la nidificazione. Infatti non vi è nessun legame che lega le femmine ai maschi, che tornano a formare comunità maschili. Agli inizi di giugno, all'incirca dopo 10 giorni dalla fecondazione avviene la deposizione delle uova in nidi rudimentali e collocati a terra, spesso al riparo di tronchi o di sporgenze rocciose. In media vengono deposte 7-9 uova e dopo una cova di circa 24-26 giorni si ha una schiusa sincrona. Nelle prime settimane di vita i pulli sono costretti a continui erratismi sia per ricercare cibo sia per disperdersi in aree con pietrame cespugliato, che offrono un elevato mimetismo all'animale.

Inoltre in questo periodo sono particolarmente importanti le condizioni meteorologiche; infatti condizioni climatiche negative come temporali, sbalzi repentini di temperatura o nevicata precoci, che spesso si verificano nei mesi di giugno e luglio, possono influire in maniera nefasta sulla covata e quindi sul successo riproduttivo (Ludwig *et al.*, 2006).

## 1.2 PERNICE BIANCA

Regno:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Chordata</i>
Subphylum:	<i>Vertebrata</i>
Classe:	<i>Aves</i>
Ordine:	<i>Galliformes</i>
Sottordine:	<i>Phasiani</i>
Famiglia:	<i>Tetraonidae</i>
Genere:	<i>Lagopus</i>
Specie:	<i>Lagopus mutus</i> (Montin, 1776)

*Lagopus mutus* è una specie politipica a corologia circumartica boreoalpina, di cui sono riconosciute 30 sottospecie.

La presenza nel Paleartico occidentale è una conseguenza della dispersione dal Neartico dell'ancestrale antenato avvenuta durante le fluttuazioni climatiche del Pliocene e del Pleistocene (Lucchini *et al.*, 2001). Attualmente occupa la tundra artica ed alpina del Nord America e dell'Eurasia, è infatti il tetraonide con la più ampia distribuzione latitudinale, andando dalle popolazioni più settentrionali della Groenlandia a quelle più meridionali delle Montagne del Nord America, dei Pirenei e delle Montagne di Altai in Asia centrale (Storch, 2007).

In Europa è distribuita in Islanda, Scandinavia, Penisola di Kola, Scozia, Pirenei e recentemente è stata segnalata anche in Bulgaria. In Italia è una specie sedentaria e nidificante su tutto l'Arco alpino partendo da occidente dalle Alpi Marittime sino ad oriente alle Alpi Giulia.

La popolazione è stimata in 5000-8000 capi a fine anni '90, valori che descrivono un leggero decremento rispetto a 7000-10000 della fine degli anni '80 (Brichetti e Fracasso, 2004).

## **Biometria di *L. mutus* (tratta da Brichetti e Fracasso, 2004)**

Lunghezza totale: 340-360 mm

Apertura alare: 540-600 mm

Esemplari italiani:

Biometrie	Maschio	Femmina
Ala	195-221 mm	182-205 mm
Becco (dalla narice)	9.2-12 mm	9-10.8 mm
Tarso	30-38.7 mm	30.4-35.5 mm
Coda (16 timoniere)	105-132 mm	97-129 mm
Peso	350-535 gr	320-480 gr

### **Caratteristiche morfologiche**

Volatile di medie dimensioni, forme massicce e raccolte con becco forte e robusto, nero nel periodo invernale e bruno in quello estivo. Le ali e la coda, formate da 14-16 timoniere nere, hanno un aspetto corto ed arrotondato. Le zampe robuste, provviste di dita con lunghe unghie taglienti, che permettono di scavare cunicoli nella neve fresca, sono ricoperte interamente da un fittissimo piumino filiforme, che consente al volatile di camminare nei terreni innevati. Questo particolare ha contribuito all'origine del nome lagopede, piede di lepre, che deriva dai termini greci antichi "λαγώς" e "πούς", che significano rispettivamente lepre e piede.

Il piumaggio è folto e le barbule hanno numerosi e peculiari vacuolizzazioni con cavità colme d'aria, i quali sembra vengano utilizzati per aumentare la capacità di isolamento termico durante il periodo invernale o per aumentare la somiglianza del piumaggio ai cumuli di neve (mimetismo criptico) (de Juana, 1994).

Entrambi i sessi sono provvisti di caruncole rosso vermiglio, evidenti

prevalentemente nei maschi nel periodo degli amori, quando aumentano di volume per una maggior irrorazione sanguigna (figura 6).



Caruncole

**Figura 6:** Particolare delle caruncole della pernice bianca.

Il dimorfismo sessuale è ridotto, mentre si hanno notevoli differenze cromatiche nel piumaggio tra le stagioni. Queste variazioni costituiscono un sistema di protezione mimetico legato alle varie tonalità stagionali dell'ambiente e derivano da un processo di sostituzione progressivo del piumaggio senza evidenti pause tra una fase e l'altra, non connesso ad una muta vera e propria, che invece si verifica nei mesi di luglio e di agosto. Il periodo di transizione della livrea è particolarmente cruciale e gli uccelli, essendo consapevoli della loro maggior visibilità, cercano di accelerare le variazioni cromatiche attraverso un'esposizione attiva ad un diverso fotoperiodo, cui consegue un meccanismo ormonale fisiologico innescato dalla quantità stessa di luce assorbita, che si traduce in un aumento di produzione di triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) capaci di variare in senso positivo la sostituzione del piumaggio. Infatti con le prime intense nevicate, le pernici bianche guidate dall'istinto si dirigono nei versanti più settentrionali meno illuminati e sostano fra dirupi per non esporsi alla luce. Viceversa avviene nella stagione avanzata, quando si portano nei versanti più esposti ai raggi solari per ritardare l'assunzione del piumaggio bianco (Martino, 2004).

Le modificazioni del piumaggio possono essere distinte in quattro livree, quali quella primaverile o nuziale, estiva, autunnale ed invernale. Nel maschio in abito riproduttivo le parti superiori del corpo e del petto sono a macchie di color bruno-grigiastro intervallate da spot bianchi, residui del piumaggio invernale. Il mento, la gola e le

parti laterali del collo sono bianche con qualche penna scura barrata di nero, mentre le porzioni inferiori, quali ali, tarsi e sottocoda, sono completamente bianche. Tra le penne soltanto le secondarie e le copritrici più interne sono scure e le timoniere, ad eccezione di quelle centrali, sono di color nero. Il maschio, inoltre, presenta redini nere, generalmente assenti nella femmina, che dipartono dalla base del becco portandosi alla base degli occhi e proseguono per un breve tratto fino a sparire. Il piumaggio riproduttivo della femmina è leggermente più scuro con tonalità più brune o beige e con piume fulvo-giallastre fittamente barrate di nero o bruno scuro. In estate, il maschio in abito eclissale ha capo, collo, dorso, copritrici e sottocoda grigiastri scuri con ampie chiazze bianche, mentre le parti inferiori sono di color grigio ardesia (*figura 7*). La femmina ha una colorazione più calda, fulvo-rossastra screziata di bruno o di nero, con la parte inferiore del petto e l'addome bianchi.



**Figura 7** Esemplare di pernice bianca in abito estivo.

La livrea autunnale è un abito di transizione di un colore tendente al grigio cenere, con macchie nere e screziature grigiastre localizzate nel petto, nei fianchi e nel dorso. Le timoniere sono scure con un apice biancastro, più esteso nella coppia centrale.

Il piumaggio invernale è caratterizzato da una colorazione bianco candido con tutte le timoniere, eccetto le due centrali, il rachide delle primarie più esterne e la mascherina tra becco e margine posteriore dell'occhio, completamente di color nero (*figura 8*).



**Figura 8:** Esemplare di pernice bianca in abito invernale (Martino, 2004).

La vera e propria muta completa, che interessa dapprima i maschi e solo circa due settimane dopo le femmine, avviene tra luglio ed agosto ed è innescata dalla caduta delle prime primarie. Si ha una sostituzione delle primarie dalla più interna con modalità discendente; le secondarie vengono mutate da due centri di muta in modo discendente ed, infine, le timoniere vengono modificate con andamento centripeto dalle più esterne (Brichetti e Fracasso, 2004).

I giovani sono simili alla femmina in abito autunnale. Gli immaturi, nella stagione autunnale, assomigliano prevalentemente alle femmine, anche se con striature più disordinate, mentre in quella invernale, sono simili all'adulto ad eccezione delle due primarie esterne (p2 più scura di p3) (Brichetti e Fracasso, 2004). A circa 3 settimane dalla nascita si ha una muta incompleta che interessa soprattutto le penne del capo, del collo e del corpo e che viene completata dopo circa 2 mesi di vita nella prima muta che da origine all'abito immaturo invernale.

### **Habitat**

La pernice bianca si localizza nella zona alpina e nivale situate fra i 2000 e i 3000 m s.l.m.. La maggior diffusione è tra i 2300-2700 m s.l.m. con presenze a quote minime di 1550-1600 m s.l.m. sulle prealpi Giulie e massime di 2850-2900 m s.l.m. in Lombardia e Valle

D'Aosta. Inoltre sulle Alpi di Sondrio si è osservata una maggior diffusione tra 2400-2800 m s.l.m., con assenze nelle fasce climatiche a rodoro-vaccinieto (*Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium* sp.) (Brichetti e Fracasso, 2004).

L'habitat tipico di questa specie sono i ghiaioni con vegetazione scarsissima, gli avvallamenti ombrosi ed i canali nei quali la neve persiste a lungo oppure i pendii sassosi e rocciosi, che offrono sia una buona visuale sia una valida protezione. Durante l'inverno, occupa i crinali ed i pendii soleggiati, dove la neve si scioglie per prima, e solo in caso di abbondanti innevamenti si sposta temporaneamente a quote inferiori. Infatti il genere *Lagopus*, sempre più scarso ed isolato, si è adattato sia alle esigenti condizioni artiche, sia ai substrati rocciosi con scarsa vegetazione (de Juana, 1994). Nidifica al di sopra del limite superiore della vegetazione arbustivo-arborea in piccole buche nel terreno, in zone aperte di pendenza limitata con una scarsa copertura erbacea ed ai margini di pietraie e morene.

### **Alimentazione**

La dieta, quasi esclusivamente vegetale ad eccezione delle prime settimane di vita, varia a seconda della stagione e delle condizioni di innevamento. Generalmente si ciba di fiori e foglie di trifoglio alpino (*Trifolium alpinum*), margherita alpina (*Leucanthemopsis alpina*), di bacche, gemme e punte gemmate di erica (*Erica carnea*), mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus*), mirtillo blu (*Vaccinium uliginosum*) e di uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*). Nella stagione invernale rientrano nella sua dieta foglie e gemme di vari salici alpini (*Salix* spp.), punte gemmate e rametti di ontano verde (*Alnus viridis*) e di rododendro (*Rhododendron ferrugineum*). È stato riscontrato che le Pernici bianche arrivano persino a cibarsi dell'humus, che si forma attorno ad alcuni massi di granito, dimostrando il loro elevato grado di adattamento alle aspre condizioni (Martino, 2007).

I pulcini, soprattutto nelle prime settimane di vita, hanno una dieta di natura proteica, costituita da piccoli invertebrati, quali insetti, molluschi e aracnidi.

### **Abitudini e comportamento**

La pernice bianca trascorre la maggior parte del tempo a terra alla ricerca di cibo, ama portarsi in posizioni sopraelevate e di rado si posa sugli arbusti. Sul terreno si muove molto agilmente ed è addirittura in grado di correre assumendo un atteggiamento particolare con collo allungato, schiena leggermente ricurva e coda abbassata a terra ad una velocità che può essere paragonata a quella di un cavallo in trotto (de Juana, 1994). Se minacciata tende ad acquattarsi sul terreno cercando di sfruttare la sua colorazione criptica, oppure s'involta rumorosamente. Ha un volo elegante con rapide battute e dopo un tratto più o meno lungo plana ad ali tese a poca altezza dal suolo.

Analogamente al genere *Tetrao*, trascorre la notte all'interno di buche che scava con le unghie nella neve. Inizialmente scava verticalmente verso il basso, poi orizzontalmente per una certa distanza, in genere pari a 2-3 volte la sua lunghezza, per terminare in uno spazio ovale abbastanza largo. L'entrata del tunnel viene infine richiusa con la neve delle porzioni più lontane del condotto. La pernice bianca, inoltre, per non lasciare tracce in prossimità dell'apertura del cunicolo, normalmente, dopo aver scelto il punto idoneo alla costruzione, o si avvicina con un piccolo volo di breve distanza o scende al di sopra del sito prescelto con un saltello da un albero.



Al momento di lasciare il tunnel, che viene utilizzato solo una volta, dapprima fora direttamente il soffitto sporgendo con la testa (*figura 9*) ed in seguito si allontana camminando oppure involandosi, se la neve è particolarmente fresca.

**Figura 9:** pernice bianca all'uscita da una buca scavata nella neve.

Questa strategia denota un notevole adattamento ai climi artici e freddi, che durante l'inverno possono raggiungere valori di  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $-50^{\circ}\text{C}$ , temperature che non consentirebbero all'uccello, vista la scadente dieta invernale, di affrontare un dispendio metabolico ed energetico per la termoregolazione. Invece, all'interno di queste buche si raggiunge una temperatura di circa  $-2/ -3^{\circ}\text{C}$ , che consentono al volatile di non spendere energie al di sopra di quelle basali (de Juana, 1994).

Sono animali prevalentemente sedentari e, durante le stagioni invernali, compiono erratismi di modeste entità, che non superano gli 8.2 km (De Franceschi, 1992) in senso altitudinale, sponstandosi nei versanti più a sud e a quote inferiori (1500-1600 m s.l.m.). Migrazioni verticali si osservano anche in settembre quando i maschi, tendenzialmente gregari nei periodi extra-riproduttivi, si portano ad altitudini di 3000-3500 m s.l.m. (Brichetti e Fracasso, 2004).

### **Ciclo annuale e riproduzione**

Le pernici bianche sono uccelli socievoli, a parte nel periodo riproduttivo quando formano coppie isolate e monogame, che rimangono unite fino alle prime neviccate autunnali. All'inizio della stagione degli amori, all'interno dei gruppi d'aggregazione si formano le prime coppie le quali si insedieranno nei territori scelti per la nidificazione. Prima della formazione delle coppie, tra maggio e giugno, si possono osservare i rituali di corteggiamento e le esibizioni dei maschi. Infatti i maschi, al di sopra di sporgenze rocciose e di massi, inizialmente, emettono suoni particolarmente bassi e rauchi, e successivamente intraprendono un vero e proprio cerimoniale nuziale costituito da saltelli, battiti di ali e giochi con la coda, tali da attirare l'attenzione e i favoritismi della femmina (*figura 10*).



**Figura 10:** Atteggiamento territoriale del maschio di pernice nel periodo dei corteggiamenti (Martino, 2007).

Nella zona prescelta per la nidificazione vengono completati il corteggiamento e la parata nuziale, che si concludono con l'accoppiamento. Le femmine, dopo essere state coperte più volte, si apprestano alla ricerca di un sito idoneo per la deposizione, che il più delle volte è un semplice buco nel terreno nascosto da cespugli o da anfratti rocciosi. Tra la fine di maggio e quella di giugno, vengono deposte in media 7-10 uova, vistosamente punteggiate di scuro, le quali saranno covate per circa 24-26 giorni. Nel caso in cui la prima deposizione non vada a buon fine, come in molti Tetraonidi, si ha una seconda deposizione meno cospicua (Salvini, 1967). Il maschio durante questo periodo rimane in prossimità del nido, vigilandolo e richiamando con voce rauca l'attenzione della madre in caso di pericoli ed eventuali predatori.

I pulcini, nati in seguito ad una schiusa sincrona, già a poche ore dalla nascita, sono in grado di muoversi con agilità e, se allarmati dalla madre, riescono a nascondersi rapidamente dietro a cespugli o a rocce, dove rimangono al sicuro, grazie al loro piumaggio mimetico, fino al segnale di cessato pericolo emesso con suoni convenzionali dalla madre. La femmina in situazioni particolarmente pericolose si finge ferita e tenta di attirare verso sé stessa le attenzioni. I giovani uccelli restano con la coppia adulta fino ai primi mesi autunnali, quando si ha la dispersione. Analogamente al genere *Tetrao*, il successo riproduttivo è strettamente legato alle condizioni

climatiche ed eventuali calamità o sbalzi repentini di temperatura possono influire negativamente sui piccoli sia in modo diretto, sia rendendo più problematico il reperimento del cibo.

### 1.3 COTURNICE

Regno:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Chordata</i>
Subphylum:	<i>Vertebrata</i>
Classe:	<i>Aves</i>
Ordine:	<i>Galliformes</i>
Sottordine:	<i>Phasiani</i>
Famiglia:	<i>Phasianidae</i>
Genere:	<i>Alectoris</i>
Specie:	<i>Alectoris graeca</i> (Meisner, 1804)

*Alectoris graeca* è una specie politipica a distribuzione europea. Reperti fossili ne hanno documentato la presenza in Europa fino dal Pleistocene. L'attuale distribuzione include sia i rifugi glaciali (Spagna meridionale, Italia e Balcani) sia le montagne, che erano ricoperti dai ghiacci fino all'Olocene (circa 10000 anni fa). L'areale di diffusione si estende dai Balcani occidentali, Grecia, Bulgaria meridionale fino all'Austria, la Francia e a tutto il territorio nazionale italiano. Studi filogeografici hanno suggerito una suddivisione del genere *Alectoris* in 4 sottotipi (Randi *et al*, 2003):

- *A. g. graeca*, distribuita in Grecia, Albania e nei Balcani Occidentali;
- *A. g. saxatilis*, presente nei Balcani occidentali, Alpi Dinariche e nell'arco alpino;

- *A. g. orlandoi*, localizzata esclusivamente negli Appennini centro-meridionali;
- *A. g. whitcheri*, sottospecie endemica della Sicilia.

La coturnice è una specie sedentaria ed è diffusa dalla provincia di Imperia fino ai territori più ad est della provincia di Udine, ad altitudini comprese tra 800-1000 e 2300-2500 m s.l.m..

La popolazione italiana è stimata in 10000-20000 coppie, rappresentando circa il 30% della popolazione mondiale. In Piemonte-Val d'Aosta sono stati calcolate 2000-4000 coppie nel periodo 1980-2000, mentre in Lombardia 883-1048 covate e 4500-6000 individui. Inoltre nel territorio lombardo nel periodo 1997-2002 è stata stimata una densità primaverile di 1.17 coppie e 2.85 individui per kmq ed una densità di fine estate pari a 4.53 individui (Brichetti e Fracasso, 2004).

#### **Biometria di *A. graeca*** (tratta da Brichetti e Fracasso, 2004)

Lunghezza totale: 320-350 mm

Apertura alare: 460-530 mm

Esemplari italiani (*A.g.saxatilis*):

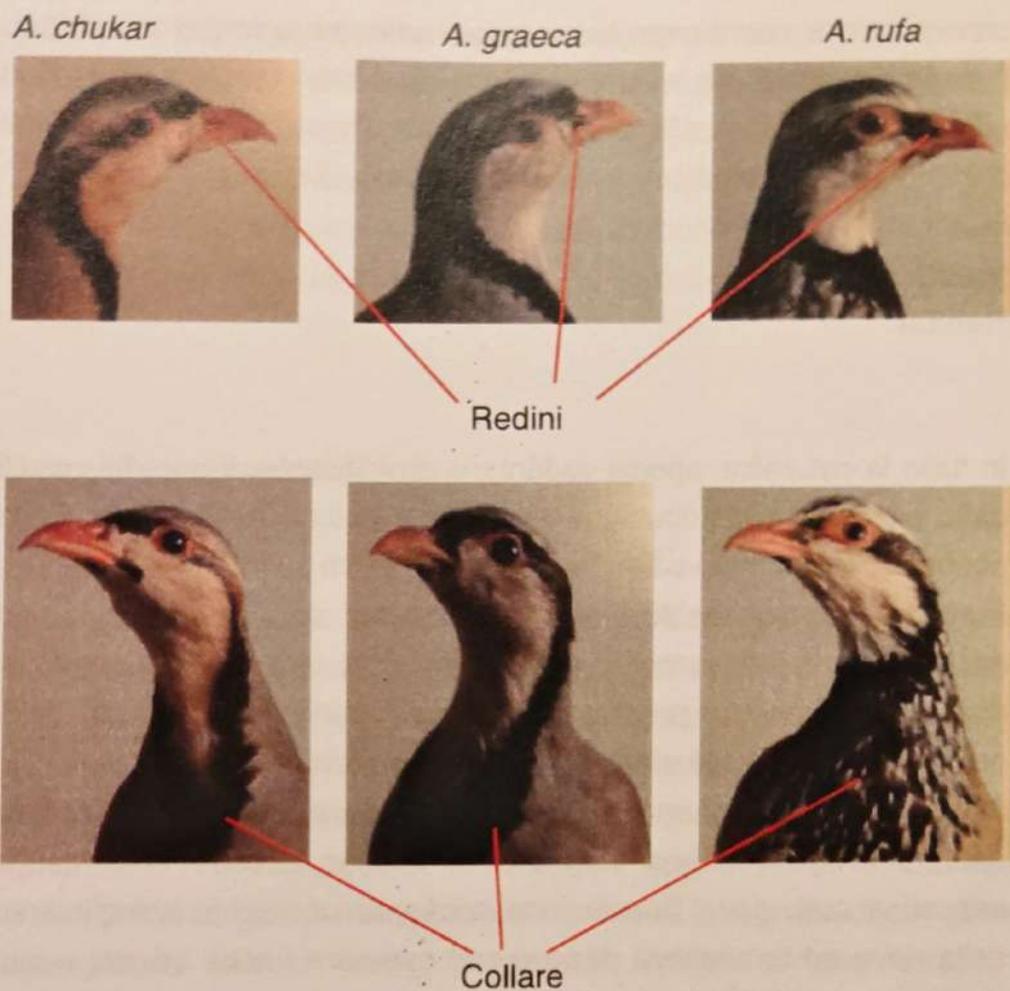
Biometrie	Maschio	Femmina
Ala	164-176 mm	157-170 mm
Becco (dalla narice)	15-17 mm	15-16 mm
Tarso	42.4-51 mm	40.6-50 mm
Coda	82-95 mm	76-90 mm
Peso	610-740 gr	510-585 gr

## Caratteristiche morfologiche

Fasianide di dimensioni medie, che non mostra un elevato dimorfismo sessuale, se non limitato alle biometrie e alla presenza di un piccolo sperone corto ed ottuso nel maschio dopo il primo anno di vita. Infatti non si ha una marcata differenza di piumaggio né tra i sessi né tra le stagioni.

Gli adulti hanno una livrea particolarmente variopinta. Infatti, le parti superiori del corpo sono di color verde/marrone, il petto è grigio cenere con sfumature azzurrine, le parti ventrali e il sottocoda sono di color ruggine. Sui fianchi, come sul capo sono presenti caratteristici disegni. Nel primo caso su una colorazione grigio azzurra spiccano una decina di strie verticali alternate, nero e bianco crema e sfumate di un castano acceso. Mentre nel capo risalta una fascia circolare nera, che si porta, a mo' di collarino, dalla base del becco all'occhio fino al sottogola e alle porzioni laterali del collo, delimitando un'area chiara a livello delle guance. La coda è bicolore, le timoniere sono infatti di color rossiccio, ad eccezione di quelle centrali che sono color grigio ardesia. Per il colore del piumaggio potrebbe essere confusa per un soggetto di *A. chukar*, dalla quale però si distingue per l'estensione della striscia nera oculare ai lati del becco (redini) sino alla commessura labiale e per la presenza di una sopracciglio bianco (Brichetti e Fracasso, 2004). Il becco, il circolo oftalmico, le zampe ed i piedi sono di color rosso corallo. Le ali hanno un aspetto corto ed arrotondato.

Nell'insieme è complessivamente simile anche alla pernice rossa (*Alectoris rufa*), con la quale spesso in natura si ibrida (*Caccabis labatiei*) (Priolo e Bocca, 1992), e si distingue per la striscia nera sul collo netta, non sfrangiata e sfumata verso il petto (figura 11). La caratteristica migliore che facilita il riconoscimento della coturnice rimane però il verso molto particolare, vario e simile ad un cicaleccio di tono piuttosto elevato, metallico, prolungato e con note doppie o triple alternate.



**Figura 11:** Caratteristiche morfologiche distintive tra *A. chukar*, *A. graeca* e *A. rufa*.

Negli adulti, tra maggio-luglio ed agosto-ottobre, si ha una muta post-riproduttiva, che prevede la sostituzione delle primarie con modalità discendente e delle timoniere con andamento centrifugo. Nelle femmine la muta spesso inizia durante le deposizione delle uova o durante il periodo di cova.

Nei giovani, di dimensioni più ridotte e colorazioni più smorte, mancano il collare nero, le penne nere nella fronte e a lato degli occhi. Gli immaturi sono simili agli adulti, dai quali si distinguono dall'aspetto delle 2 primarie esterne più corte, strette ed appuntite alla base (Brichetti e Fracasso, 2004). I pulli hanno le parti inferiori di color beige con sfumature color cenere, mentre le parti superiori

sono rossicce con il capo bruno-grigio uniforme e le guance chiare. Nei giovani si ha una muta post-giovanile quasi completa tra giugno ed ottobre con la sostituzione di tutte le penne, a parte delle due primarie esterne ed eventualmente di qualche terziaria.

### **Habitat**

In Italia la coturnice, specie sedentaria e nidificante, è uno dei volatili dalla più estesa distribuzione altitudinale poichè nidifica, infatti, da poche decine di metri s.l.m. fino circa a 2600 m s.l.m..

Frequenta quasi esclusivamente praterie esposte al sole ed intervallate da affioramenti rocciosi e solchi vallivi. Difficilmente si ripara nei boschi, prediligendo aree aperte in versanti ripidi caratterizzate da prati alpini e subalpini con arbusti nani, quali mirtillo nero, rosso (*Vaccinium myrtillus*, *V. vitis-idaea*), ginepro (*Juniperus spp.*) e brugo (*Calluna vulgaris*). In inverno occupa ripidi pendii esposti a sud, dove l'insolazione consente un rapido scioglimento della neve ed in assenza di neve può svernare anche ad alta quota ad altitudini di 2500 m s.l.m..

### **Alimentazione**

Sono volatili onnivori con una dieta prevalentemente vegetariana, ma anche insettivora soprattutto durante il periodo riproduttivo. In autunno ed in inverno si nutrono di bacche di mirtillo, di ginepro, di sorbo degli uccellatori (*Sorbus aucuparia*), di semi di pino mugo (*Pinus mugo*), larice (*Larix decidua*) e di gemme e getti di faggio (*Fagus sylvatica*), ontano verde (*Alnus viridis*), betulle (*Betula spp.*) e graminacee. Con il progressivo scioglimento della neve, la scelta del cibo si amplia comprendendo un gran numero di specie di vegetali, ma anche una ricca componente proteica data da insetti, molto

importanti soprattutto per le femmine in deposizione e per i pulcini. Infatti nel periodo primaverile ed estivo la dieta è costituita, oltre che da getti freschi di trifogli (*Trifolium spp.*), steli di graminacee, petali di composite (*Asteraceae spp.*) e sassifraghe (*Saxifraga spp.*), anche da uova, larve di insetti ed insetti, quali *Orthoptera spp.*, *Coleoptera spp.*, *Diptera spp.*, *Lepidoptera spp.* e *Formicidae spp.* (McGowan, 1994).

### **Abitudini e comportamento**

É un animale prevalentemente terricolo, che si muove con estrema agilità sul terreno, mentre è poco propenso al volo. Il decollo avviene con un esplosivo frullo, mentre il volo è caratterizzato da rapide battute, alternate a planate con ali leggermente arcuate verso il basso, e con traiettoria radente il suolo, quasi sempre verso valle (Brichetti e Fracasso, 2004). É un volatile notevolmente abitudinario e stabile nel territorio, ma in caso di necessità è in grado di compiere spostamenti più o meno consistenti. Infatti compie erratismi altitudinali di varia entità, da pochi metri a 3-5 km, in relazione alle avversità del clima invernale, all'innervamento, alle condizioni vegetazionali e alle disponibilità alimentari. Sulle Alpi in versanti soleggiate sono stati osservati raggruppamenti invernali anche a quote di 200-300 m s.l.m. (Brichetti e Fracasso, 2004).

Per la maggior parte dell'anno è una specie gregaria, tranne che nel periodo riproduttivo quando diventa fortemente monogama e territoriale. Con l'arrivo delle stagioni più fredde, gruppi isolati di coturnici, all'alba e al tramonto, esibiscono canti frenetici per richiamare soggetti di altri nuclei familiari o singoli. In questo modo si creano raggruppamenti di anche 30-40 individui, che, dapprima, iniziano un lungo peregrinare alla ricerca di un idoneo sito per svernare, e successivamente collaborano sia per la ricerca di cibo sia per la reciproca difesa. Spesso per sopravvivere al gelo ed ai climi rigidi si ammassano anche all'interno di stalle delle malghe, che

vengono abbandonate dagli uomini durante gli inverni.

### **Ciclo annuale e riproduzione**

All'inizio della stagione degli amori, alle prime avvisaglie della ripresa del ciclo vegetativo, piccoli gruppi di coturnici, formati generalmente da una femmina e due maschi, essendo quest'ultimi in numero leggermente superiore, iniziano ad abbandonare le comunità invernali alla ricerca di un sito di nidificazione. Con l'aumentare dell'eccitazione sessuale nascono veri e propri dissidi tra i maschi, che cercano di scacciarsi con intimidazioni, litigi, dispute e, se necessario, anche con vere lotte brutali intervallate da fasi di tolleranza. Nelle lotte i maschi si lanciano l'uno contro l'altro, beccandosi cruentemente, stridendo, strappandosi penne per acquisire il diritto sulla femmina, che resta impassibile fino a quando la situazione non si decide a favore di uno. Spesso queste dispute possono terminare con la morte di uno dei due contendenti, oppure con l'allontanamento del perdente che a volte forma piccoli gruppi con gli altri vinti.

Formatasi la coppia, generalmente monogama, tra aprile ed i primi di giugno inizia una vera e propria parata di corteggiamento del maschio, che si erge da posizioni sopraelevate strisciando a terra le ali e spiegando le timoniere. Al termine del corteggiamento avviene l'accoppiamento con la femmina, la quale si concede più volte nell'arco della giornata.

Successivamente inizia una scrupolosa ricerca del sito di nidificazione, che, come per gli altri Galliformi, spesso è rappresentato da una semplice buca nel terreno ricoperta da foglie e steli d'erba e al riparo tra cespugli e sporgenze rocciose. Infatti la coturnice nidifica principalmente in praterie aride a prevalenza di graminacee, in punti ben soleggiati e piuttosto ripidi, caratterizzati dalla presenza di rocce, scarpate, burroni, ma poveri di arbusti ed alberi. In questi siti vengono deposte da un minimo di 8 ad un

massimo di 14-16 uova, che vengono covate per circa 24-26 giorni (Salvini, 1967) (figura 12).



**Figura 12:** Femmina di coturnice con pulcini (Martino 2004).

Durante le cova, la femmina non abbandona mai il nido, accumulando addirittura le fatte all'interno della cloaca nell'attesa di un'unica uscita giornaliera (feci coliche), mentre il maschio rimane nascosto nelle vicinanze con il compito di difendere il territorio e di allertare la madre in caso di pericoli. La femmina, se la covata viene minacciata da vicino, abbandona il nido e inizia ad attirare l'attenzione di eventuali predatori su se stessa fingendosi ferita. Inoltre, analogamente agli altri Galliformi, se la prima deposizione non va a buon fine, se ne ha una seconda di entità inferiore. In seguito ad una schiusa sincrona si ha la nascita di pulcini dalla livrea fortemente criptica, che nelle prime settimane di vita hanno una dieta altamente proteica, costituita da piccoli insetti. I giovani uccelli rimarranno con la madre fino alla piena autonomia, quando inizieranno a disperdersi in piccoli gruppi, che normalmente non mantengono legami di parentela con la coppia di genitori riunita.

### Tassonomia

I virus influenzali, responsabili di malattia nei Mammiferi e negli Uccelli, vengono classificati nell'ambito del tipo A ed appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*. Il significato del nome di questa famiglia è di derivazione greca ed indica l'affinità di questi virus per i mucopolisaccaridi, in particolare per gli acidi sialici. All'interno degli *Orthomyxoviridae* si riconoscono tre generi (Murphy *et al.*, 1995):

- *Influenzavirus A, B* che comprende le specie *Influenza A virus* e *Influenza B virus*;
- *Influenzavirus C* con la specie *Influenza C virus*;
- "Thogoto-like-viruses" in cui sono inclusi i *Dhori virus* e i *Thogoto virus*;
- *Isa virus*.

Sono virus a RNA monocatenario a polarità negativa, dotati di *envelope* e di grandezza compresa tra 80 e 120 nm. Il genoma è formato da un numero di segmenti, che varia a seconda della specie: 8 nell'*Influenzavirus A, B*; 7 nell'*Influenzavirus C* e 6 nel "Thogoto-like-viruses" (Murphy *et al.*, 1995).

I tipi A, B e C vengono distinti in base alla diversa composizione chimica della nucleoproteina (NP) e della proteina di matrice (M1), che sono proteine strutturali interne del virus, le quali, invece, sono costanti nell'ambito di ciascuna specie virale (Horimoto e Kawaoka, 2001).

Nell'uomo sono responsabili di forme clinicamente rilevanti soltanto i virus di tipo A e B, mentre quelli di tipo C, generalmente, sono connessi ad infezioni subcliniche di moderata entità o asintomatiche. Inoltre gli *Influenza A virus*, a seconda della differente struttura chimica dell'emoagglutinina (HA o H) e della neuraminidasi (NA o N), due glicoproteine di superficie, vengono ulteriormente distinti dal

punto di vista antigenico in sottotipi. Attualmente sono stati identificati 16 sottotipi di HA e 9 di NA antigenicamente differenti, che si combinano in vari modi. Tutte le combinazioni conferiscono all'*envelope* virale una configurazione antigenica caratteristica (Röhm *et al.*, 1996; Horimoto e Kawaoka, 2001; Fouchier *et al.*, 2005), testimoniando l'estrema variabilità genetica e antigenica di questi virus.

In natura questi virus hanno un'ampia gamma di ospiti di specie aviari e non, come uomo, maiale, cavallo, felidi, canidi ed occasionalmente anche altri mammiferi come visoni, foche e balene (Houser e Heuschele, 1980; Webster *et al.*, 1992; Osterhaus *et al.*, 2000; Kuiken *et al.*, 2004; Keawcharoen *et al.*, 2004; Songserm *et al.*, 2006).

Nei vari sottotipi, la sequenza amminoacidica della regione HA1, che è responsabile delle proprietà antigeniche dell'HA, differisce per almeno un 30% (Röhm *et al.*, 1996; Horimoto e Kawaoka, 2001).

I mammiferi possono essere infettati soltanto da limitati sottotipi di HA e NA, mentre le specie aviarie possono essere colpite da tutti i sottotipi dei virus influenzali (Horimoto e Kawaoka, 2001).

Dal punto di vista tassonomico i ceppi di virus influenzali vengono denominati attraverso un sistema di definizione, proposto nel 1971 e successivamente modificato nel 1980 (W.H.O. Memorandum, 1980), il quale prevede l'indicazione:

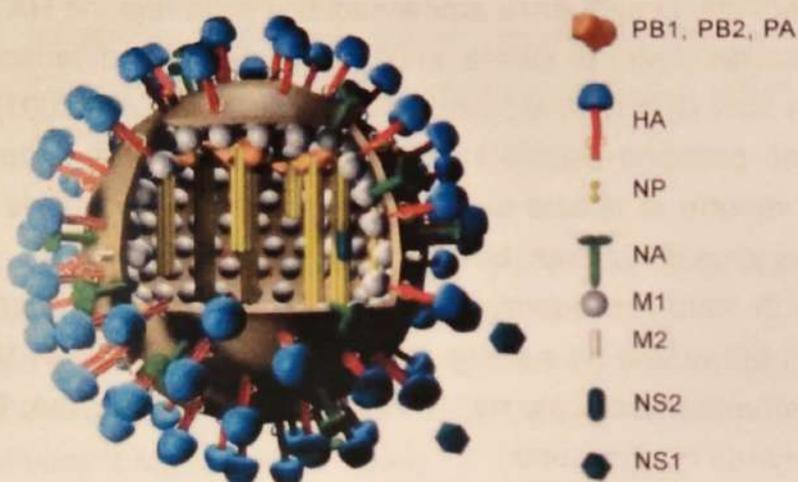
- del tipo antigenico (A, B, C);
- dell'ospite di origine (quando non si tratta dell'uomo) o del materiale da cui è stato eventualmente isolato (ad esempio, acqua);
- del sito geografico di provenienza;
- di un numero di riferimento del ceppo;
- dell'anno di isolamento;
- degli antigeni HA ed NA (tra parentesi);

ad esempio: A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9).

## Struttura e funzionalità del virione

Dall'esame al microscopio elettronico, si evince che si tratta di particelle virali pleomorfe, poichè includono forme sferoidali di diametro fra 80-120 nm, e forme filamentose circa dello stesso diametro e di lunghezze variabili (Horimoto e Kawaoka, 2001).

Dalla superficie del virione sporgono evidenti proiezioni regolarmente distribuite e lunghe in media 16 nm, riconducibili a due differenti tipi di strutture. Queste, chiamate con il nome di *spikes*, corrispondono alle glicoproteine HA e NA, che per mezzo di brevi sequenze amminoacidiche idrofobiche sono ancorate all'*envelope* (regione transmembranaria).(figura 13).



**Figura 13:** Rappresentazione schematica di un virus influenzale

Le emoagglutinine, presenti in numero superiore, comprendono un ectodominio amino-terminale e un sito di ancoraggio carbossi-terminale. Morfologicamente sono simili ad una chiave e sporgono dall'*envelope* con una struttura trimerica. Le neuraminidasi sono tetrameri dall'aspetto simile ad un fungo, i quali contengono un punto di ancoraggio amino-proximale e un ectodominio carbossi-terminale (Horimoto e Kawaoka, 2001). Inoltre, oltre alle HA e alle NA, si trovano un numero limitato di piccole proteine di matrice denominate M2, le quali sono inserite nei lipidi dell'*envelope* (Zebedee *et al.*,

1988).

L'*envelope* è formato da un doppio strato lipidico, acquisito mediante gemmazione della membrana plasmatica della cellula ospite, in seguito all'inserzione di proteine virus-specifiche e all'interno presenta otto segmenti di RNA a singolo filamento, complementari all'RNA messaggero.

I segmenti di RNA sono associati a nucleoproteine ed a tre subunità proteiche (PB1, PB2 e PA) a costituire il complesso della polimerasi virale, denominato complesso ribonucleoproteico (RNP), o nucleocapside, il quale partecipa alla replicazione ed alla trascrizione dell'RNA. Inoltre, il complesso ribonucleoproteico è in associazione con la proteina di matrice M1, che a sua volta interagisce con la proteina NS2, che è in stretta connessione con l'*envelope*. I virus influenzali di tipo A presentano un'unica proteina non strutturale NS1, essendo stata dimostrata l'incorporazione di NS2 alla progenie virale (Horimoto e Kawaoka, 2001).

Ciascuno segmento di RNA codifica in modo indipendente la sintesi di una o due specifiche proteine virali. In totale vengono codificate dieci proteine virali di cui nove strutturali ed una non strutturale.

I primi tre segmenti di RNA codificano rispettivamente la sintesi di PB2, PB1 e PA, che formano, insieme alla NP, il complesso RNA polimerasi. Questo ha una funzione endonucleasica e transcriptasica ed, inoltre, partecipa alla sintesi di tre classi di RNA virus specifico, quali RNA messaggero, RNA complementare e RNA del genoma virale, che sono stati individuati nelle cellule infette (Brown e Alexander, 1998).

Il quarto segmento codifica la sintesi del principale antigene di superficie, l'emoagglutinina (HA), la quale media l'interazione e l'adsorbimento del virus ai recettori della cellula ospite, indispensabile per la successiva penetrazione. Le HA si legano all'acido N-acetilneuraminico e al galattosio (sialiloligosaccaridi), che sono espressi sulle cellule, condizionando la specificità verso la specie ospite. I virus che colpiscono i volatili, ad esempio, riconoscono preferenzialmente le cellule dell'epitelio intestinale, dove l'acido sialico è unito con legame  $\alpha$ 2-3 al galattosio. Mentre il

bersaglio dell'HA virale nell'uomo sono le cellule del tratto respiratorio, poiché questi virus riconoscono preferenzialmente il legame di tipo  $\alpha$ 2-6 (Paulson, 1985 citato da Horimoto e Kawaoka, 2001; Connor *et al.*, 1994). Inoltre, poiché gli acidi sialici sono presenti anche sulla membrana dei globuli rossi, questi virus sono in grado di causare emoagglutinazione. Un'altra funzione dell'HA è quella di regolare la fusione tra *envelope* del virus con la membrana della cellula ospite.

Le emoagglutinine neoformate vanno incontro a vari passaggi. Dapprima subiscono la rimozione di una sequenza amino-terminale di circa 14-18 aminoacidi, che agiscono come un segnale per il trasporto alla membrana cellulare. Successivamente vengono aggiunte, in numero e posizione diverse a seconda del ceppo virale, delle catene laterali glucidiche ed avviene l'acilazione con acido palmitico. Infine l'HA ad opera di proteasi tripsinosimili subisce un clivaggio in due subunità connesse da ponti disolfuro, HA1 e HA2. Questa fase è indispensabile per l'infettività, poiché la fusione virus-cellula è mediata dal terminale amminico libero dell'HA2.

Ciascuna molecola di HA è costituita da tre catene polipeptidiche caratterizzate da uno stelo, dato dalla subunità HA2 e da una porzione della HA1, e da delle estremità. All'estremità esterna è presente una porzione globosa, formata esclusivamente dall'HA1 e che contiene il sito recettoriale, a forma di "tasca", il quale possiede un'alta affinità per gli acidi sialici (Ponti, 2005).

L'RNA polimerasi ha una certa tendenza all'errore ( $1/10^4$  basi per ciclo replicativo, rispetto ad  $1/10^9$  per la DNA polimerasi), condizionando in questo modo un elevato tasso di mutazioni dell'HA (Zambon, 2001) e, visto che l'HA è il bersaglio principale della risposta umorale dell'ospite, la pressione immunitaria seleziona, almeno in parte, le mutazioni avvenute con sostituzione di aminoacidi. Benché gli aminoacidi, che formano il sito di legame per il recettore, siano altamente conservati, la rimanente parte della molecola può presentare un elevato grado di variazione.

L'HA induce la produzione di anticorpi che vanno ad interferire con le porzioni virali utilizzate per l'aggancio sia alla cellula ospite sia ai

globuli rossi, avendo quindi le importanti proprietà di neutralizzare l'infettività e di inibire l'attività emoagglutinante del virus (Webster *et al.*, 1992).

Il quinto segmento di RNA codifica la sintesi della nucleoproteina (NP) che viene trasportata nel nucleo della cellula infetta, dove si lega all'RNA virale formando, in questo modo, il nucleocapside a simmetria elicoidale. La NP è il bersaglio principale della risposta immunitaria delle cellule T citotossiche dell'ospite ed è la seconda proteina più abbondante nel virione, essendo sintetizzata in elevata quantità nelle cellule infette (Webster *et al.*, 1992). La nucleoproteina è inoltre il determinante primario della specificità d'ospite, sebbene questa sia influenzata anche da altri fattori (Scholtissek *et al.*, 1993). Studi filogenetici, rivolti all'analisi della sequenza del gene NP di numerosi ceppi di diversi sottotipi di virus influenzali, isolati da un'elevata gamma di ospiti e zone geografiche, hanno permesso di suddividere i geni di NP in 5 linee ospite-specifiche. Questi cinque gruppi corrispondono rispettivamente:

- 1- al ceppo Equine/Prague/56 (H7N7) del cavallo;
- 2- agli isolati equini più recenti (H3N8);
- 3- agli isolati classici H1N1 del suino e ai ceppi isolati dall'uomo;
- 4- ai virus appartenenti al sottotipo H13, trovati nel gabbiano;
- 5- ai rimanenti ceppi aviari.

Il quinto gruppo riconosce altri tre sottogruppi, individuati sulla base della provenienza geografica: Nord America, Eurasia ed Africa, Australia e Nuova Zelanda (Gorman *et al.*, 1991). Nel 2001, Horimoto e Kawaoka hanno proposto un'altra classificazione basata sulla specificità d'ospite. Secondo questi studiosi, l'evoluzione dei virus influenzali ha seguito sette diverse linee: due relative agli equini, una ai gabbiani, una agli uccelli nordamericani, una agli uccelli dell'Eurasia, comprendendo i virus "avian-like" ed infine due geneticamente correlate, riferite rispettivamente ai virus dell'uomo e

ai virus classici del suino, che probabilmente derivano da un antenato comune, originatosi da un virus aviario.

Il sesto segmento codifica la sintesi di un'altra glicoproteina di membrana, la neuroaminidasi, che è il secondo principale antigene di superficie del virione. La NA è una sialidasi e ha il compito di rimuovere le molecole di acido sialico presenti sulla superficie virale e cellulare, permettendo così il distacco dei virioni dalle cellule in cui si sono replicati e la loro diffusione nell'ospite. L'azione della NA sui recettori per le HA localizzati sulla membrana della cellula ospite ostacola, formando aggregati sulla superficie, il riassorbimento dei virioni progenie da parte della cellula di provenienza (Brown e Alexander, 1998). La rimozione dei residui di acido sialico è necessaria anche per l'acquisizione, da parte dell'emoagglutinina, della capacità di legare i recettori (Ohuchi *et al.*, 1995). La neuroaminidasi, analogamente all'HA, è fortemente soggetta a mutazioni, in parte come risposta alla pressione immunitaria dell'ospite. I nove sottotipi esistenti non cross-reagiscono tra loro e vi sono ulteriori varianti nel loro ambito. Gli anticorpi indotti da questo antigene non agiscono direttamente neutralizzando l'infettività del virus, ma vanno ad ostacolare il distacco dei virioni dalle cellule, limitandone quindi la diffusione (Easterday *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1988).

Il settimo segmento codifica la sintesi delle proteine di matrice, M1 ed M2. La proteina M1, presente in misura maggiore nel virione, circonda i nucleocapsidi formando così una specie di guscio al di sotto dell'*envelope*. La sua attività è quella di stabilizzare la particella virale e si ritiene che sia coinvolta nelle fasi di assemblaggio e di gemmazione (*budding*) (Horimoto e Kawaoka, 2001). La M2 costituisce dei tetrameri che, con attività di canali ionici H<sup>+</sup>, superano lo strato lipidico. Quando sono attivati dal pH basso dell'endosoma, determinano un'acidificazione dell'interno del virione che facilita lo svestimento (Horimoto e Kawaoka, 2001). Inoltre, molto probabilmente la proteina M2 esplica una funzione anche nelle fasi tardive della replicazione, quando consente il trasporto delle HA sulla superficie della cellula (Brown e Alexander, 1998).

L'ottavo segmento codifica la sintesi delle proteine NS1 ed NS2. La

NS1 si trova prevalentemente a livello di nucleo delle cellule infette, mentre la NS2, localizzata nel citoplasma, viene poi incorporata nei virioni. Entrambe le proteine hanno un ruolo molto importante nella replicazione virale. La NS2 interagisce con la proteina di matrice M1 e in questo modo media il trasferimento della ribonucleoproteina al di fuori del nucleo, mentre la NS1 svolge diverse funzioni, tra cui quelle di partecipare alla regolazione dell'assemblaggio e del trasporto dell'RNA messaggero della cellula fuori dal nucleo, e di indurre anche la traduzione (Ward *et al.*, 1995; O'Neill *et al.*, 1998; Horimoto e Kawaoka, 2001). Tuttavia il ruolo principale sembra sia quello di contrastare l'attività interferonica dell'ospite. A supporto di questi ipotesi è stato osservato che un virus privo di NS1 mantiene la vitalità, ma si replica in modo meno efficiente in cellule dotate di interferone (Garcia-Sastre *et al.*, 1998; Horimoto e Kawaoka, 2001). Ampliando le conoscenze relative alla sequenza genica degli otto segmenti di RNA è possibile determinare le basi genetiche di importanti proprietà biologiche del virus, quali patogenicità, tropismo tissutale e gamma degli ospiti (Easterday *et al.*, 1997).

### Composizione chimica

I virus influenzali sono composti prevalentemente da proteine ed in misura decrescente da lipidi, carboidrati e RNA (*tabella 1*).

Componenti chimici	% di composizione
Proteine	70-75
Lipidi	20-24
Carboidrati	5-8
RNA	0.8-1.1

**Tabella 1:** Composizione chimica di virus influenzale

Le proteine sono codificate dal genoma virale, mentre la sequenza delle catene di carboidrati, legate alle glicoproteine e ai glicolipidi della membrana virale, sono ad appannaggio della cellula ospite.

I carboidrati, principalmente sotto forma di glicoproteine e glicolipidi, sono dati da galattosio, mannosio, fruttosio, glucosamina e ribosio, nell'RNA.

I lipidi, presenti nell'*envelope*, sono principalmente fosfolipidi e, in minor quantità, colesterolo e glicolipidi (Easterday *et al.*, 1997).

### **Replicazione virale**

In seguito all'adsorbimento, che prevede l'interazione delle HA con gli acidi sialici dei recettori di superficie della cellula, si verifica la penetrazione per endocitosi delle particelle virali, le quali sono incorporate in un endosoma. I bassi valori di pH all'interno dell'endosoma inducono un'alterazione conformazionale dell'HA, che permette all'HA2 e, più precisamente, al suo terminale amminico di mediare la fusione dell'*envelope* con la membrana della vescicola endosomica, consentendo in questo modo la fuoriuscita del nucleocapside nel citoplasma cellulare (Bullough *et al.*, 1994). Questa fase è controllata dal canale protonico della proteina M2, che causa, inoltre, la dissociazione di M1 dalla ribonucleina.

Successivamente il nucleocapside viene trasportato nel nucleo, all'interno del quale un'endonucleasi virale compie la scissione del terminale 5' di un RNA messaggero cellulare, che è utilizzato come *primer* per la trascrizione dalle transcriptasi virali (Easterday *et al.*, 1997; Horimoto e Kawaoka, 2001). Tale processo porta alla formazione di molecole di RNA messaggero virale, le quali migrano nel citoplasma consentendo la sintesi delle proteine virali, e di RNA complementare a polarità positiva, che funge da stampo per gli otto segmenti di RNA genomico a polarità negativa. Questi otto segmenti, in seguito, sempre all'interno del nucleo, saranno incapsidati dalle nucleoproteine (Horimoto e Kawaoka, 2001).

Nel reticolo endoplasmatico rugoso, contestualmente alla formazione del nucleocapside, vengono glicosilate le proteine HA e NA, che in seguito vengono ulteriormente processate nell'apparato del Golgi e trasportate alla superficie della cellula per essere integrate alla membrana citoplasmatica. M1 ed NS2, localizzandosi a livello nucleare ed associandosi al complesso RNP, consentono la migrazione di quest'ultimo a livello citoplasmatico, in modo tale che venga assemblato nella progenie virale. Presumibilmente il complesso RNP-M1 interagisce con le proteine M1 associate alla membrana plasmatica ed in corrispondenza della quale avviene il rilascio per gemmazione (*budding*) delle nuove particelle virali. La membrana stessa, che avvolge le nuove particelle virali, andrà a costituire l'*envelope* dotato delle glicoproteine HA ed NA (Ponti, 2005; Horimoto e Kawaoka, 2001).

Infine, nel comparto extracellulare ad opera di endonucleasi avviene la scissione dell'emoagglutinina indivisa HA0 in HA1 e in HA2, determinando così la maturazione della maggior parte dei virus influenzali. Poiché l'HA scissa è relativamente poco stabile a valori bassi di pH, i virus dell'Influenza aviaria, che vengono trasmessi principalmente per via oro-fecale, subiscono il clivaggio dopo essere entrati nel nuovo ospite quando hanno oltrepassato lo stomaco. Invece la maturazione dei ceppi aviari ad alta virulenza, più probabilmente, è intracellulare. Si ritiene infine che le HA dei virus influenzali dei mammiferi vengano scisse da proteasi extracellulari del tratto respiratorio (Webster *et al.*, 1992).

### **Variazioni antigeniche**

Una delle caratteristiche distintive dei virus influenzali consiste nel modificare in maniera più o meno marcata la struttura chimica degli antigeni di superficie. Il ceppo modificato, in questo modo, riesce ad eludere l'immunità specifica, che viene acquisita in seguito ad altre infezioni e che, quindi, non è in grado di offrire protezione. Pertanto,

è proprio questa proprietà il fattore che influisce sulla difficoltà di eradicazione o di controllo efficace della malattia mediante la vaccinazione, determinando così occasionali o annuali pandemie, umane ed animali.

L'antigenicità dei virus influenzali può subire variazioni di grado lieve oppure variazioni più drastiche come conseguenza rispettivamente di mutazioni puntiformi (*drift*) e di un riassortimento genetico (*shift*) (Ponti, 2005; Easterday *et al.*, 1997; Horimoto e Kawaoka, 2001).

Il *drift* antigenico, che si verifica con una certa frequenza a carico di un sottotipo, prevede una mutazione a livello di un singolo nucleotide, che può determinare un'alterazione della struttura chimica delle glicoproteine di superficie HA o NA e quindi anche una variazione delle loro proprietà antigeniche ed immunologiche, come è stato avvalorato da studi effettuati sul sottotipo umano H3 (Horimoto e Kawaoka, 2001). Inoltre, i ceppi varianti, che ne conseguono, cross-reagiscono sierologicamente soltanto in parte.

Il *drift* antigenico, sebbene sia stato accertato prevalentemente nei virus influenzali umani, rendendo necessario ogni anno l'allestimento di un vaccino, è stato osservato in ceppi influenzali sia dei mammiferi sia dei volatili, anche se in quest'ultimi, forse per la breve vita che va a limitare la pressione immunitaria, è presente in entità minore (Easterday *et al.*, 1997; Horimoto e Kawaoka, 2001).

Lo *shift* antigenico è un evento che si manifesta in maniera più repentina e che determina la comparsa di una nuova emoagglutinina ed eventualmente anche di una nuova neuraminidasi, poichè i rispettivi geni sono localizzati su segmenti diversi di RNA. Questo fenomeno, responsabile delle pandemie influenzali dell'uomo, comporta l'origine di un nuovo sottotipo, non più correlato antigenicamente al precedente. Anche le variazioni puntiformi del *drift*, se apportate nel tempo, potrebbero determinare, mediante un meccanismo di sommissione, la formazione di nuovi sierotipi (Ponti, 2005). Variazioni ingenti si possono verificare nel caso in cui il riassortimento genetico coinvolga due differenti virus che abbiano infettato contemporaneamente la stessa cellula. I segmenti di RNA vengono incorporati nella progenie virale, in parte casualmente, con

la possibilità di dare origine a 256 diverse combinazioni di RNA, quindi 256 nuovi virioni geneticamente differenti. Nelle infezioni miste sono stati osservati degli scambi fra segmenti di RNA che codificano per proteine di superficie, anche se tuttavia possono essere interessati anche altri geni. Studi, inoltre, hanno dimostrato che è più facile che vi sia un passaggio di geni tra virus che appartengono a specie diverse (Easterday *et al.*, 1997). A tale proposito, si presume, ad esempio, che il ceppo A/Seal/Mass1/80 (H7N7), responsabile dell'inaspettata grave epidemia influenzale, che nel 1980 colpì le foche, abbia avuto origine dal riassortimento genetico di virus influenzali aviari endemici nelle colonie di diversi uccelli marini, che risiedevano nella stessa nicchia ecologica dei pinnipedi. Successivamente in laboratorio il virus è stato accidentalmente trasmesso all'uomo, dove ha causato una congiuntivite (Ponti, 2005). È stato ipotizzato che sia il riassorbimento genetico tra virus umani ed aviari la causa dell'insorgenza di nuovi ceppi pandemici umani (Webster *et al.*, 1992). Anche il riapparire di un virus circolato in periodi passati sembra che sia un ulteriore meccanismo di comparsa di *shift* antigenico (Horimoto e Kawaoka, 2001). Studi effettuati in natura prelevando campioni di feci dalla stesso volatile hanno consentito di isolare due o più virus influenzali antigenicamente distinti, dimostrando, in questo modo che le infezioni miste si verificano con una certa frequenza (Sharp *et al.*, 1997). Da popolazioni di Anseriformi, sono stati peraltro isolati virus influenzali con quasi ogni possibile combinazione antigenica (Easterday *et al.*, 1997). Sembra che i virus influenzali degli uccelli acquatici selvatici abbiano raggiunto uno stato di adattamento ottimale, per cui mutazioni puntiformi, come sostituzioni di aminoacidi, non determinano vantaggi selettivi. Oltre a ciò, se si considera che questi volatili raramente manifestano sintomi di malattia, si può dedurre che i virus influenzali hanno acquisito un equilibrio evolutivo negli uccelli acquatici, che quindi rappresentano l'ultimo serbatoio naturale (Horimoto e Kawaoka, 2001).

## Proprietà biologiche

### Proprietà emoagglutinante

Nel 1941 è stata dimostrata l'attività emoagglutinante dei virus influenzali. Poiché la reazione viene inibita da antisieri specifici, per evidenziare e titolare il virus e gli anticorpi si possono utilizzare test di emoagglutinazione e di inibizione dell'emoagglutinazione (Bonaduce *et al.*, 1986).

La maggior parte dei ceppi di virus influenzali tipo A agglutinano a 4°C e a 20°C i globuli rossi di uomo, scimmia, cavia, cane, furetto, riccio, scoiattolo, ratto, topo, rana, pollo, anatra, tacchino e di molti altri volatili. Soltanto alcuni ceppi non sono in grado di agglutinare le emazie di coniglio, ratto, topo, cavallo e ovino (Bonaduce *et al.*, 1986).

### Patogenicità

I virus influenzali aviari hanno una patogenicità estremamente variabile e difficilmente può essere prevista facendo riferimento al sottotipo o all'ospite d'origine. Generalmente, i virus all'interno delle specie selvatiche serbatoio sono a bassa patogenicità e possono evolvere ad altamente patogeni, soltanto se vengono introdotti nelle specie domestiche e se circolano negli allevamenti. Studi effettuati hanno dimostrato che finora i ceppi più patogeni appartengono ai sottotipi H5 ed H7, ma all'ambito degli stessi se ne riscontrano anche di non patogeni. Tutto ciò indica che non è soltanto la configurazione antigenica a determinare la patogenicità, la quale è sempre e comunque associata all'interazione ospite-parassita (Easterday *et al.*, 1997). Inoltre un virus influenzale patogeno per una specie non necessariamente lo è per un'altra. Infatti, per esempio, il virus A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) è in grado di dare il 100% di mortalità in polli e tacchini, ma allo stesso tempo è apatogeno nei confronti degli Anseriformi selvatici (Slemons e Easterday, 1972).

La virulenza è una proprietà con base poligenica, che viene

determinata in base alla maggiore o minore facilità di clivaggio delle glicoproteine HA. Generalmente le emoagglutinine dei virus influenzali aviari non patogeni subiscono un clivaggio ad opera di un numero limitato di tipi cellulari, determinando così soltanto delle infezioni localizzate, che normalmente interessano il tratto respiratorio e/o quello intestinale e che decorrono in modo lieve o asintomatico. Mentre le HA dei virus più patogeni possono essere scisse in un ampio *range* di cellule ospite, essendo pertanto in grado di causare infezioni sistemiche letali (Horimoto e Kawaoka, 2001). Studi condotti nel 1979 da Bosch *et al.* hanno dimostrato che le HA di virus patogeni, in colture tissutali, quali fibroblasti di embrione di pollo (CEF), vengono clivate in assenza di proteasi esogene, come la tripsina; ciò non avviene, invece, nelle forme apatogene, indicando pertanto una differente sensibilità delle HA all'azione delle proteasi endogene. Quindi la diversa distribuzione delle proteasi nei tessuti e la differente sensibilità delle HA a questi enzimi condizionerebbero il decorso dell'infezione (Horimoto e Kawaoka, 2001).

La scindibilità dell'HA è legata a due caratteristiche strutturali, quali la sequenza aminoacidica nel sito di clivaggio e la presenza di carboidrati in prossimità dello stesso. Confrontando le sequenze aminoacidiche di virus aviari patogeni e non patogeni, isolati dal pollo durante infezioni di campo, Bosch *et al.* (1981) hanno constatato che le HA con ristretta possibilità di clivaggio contengono generalmente una singola arginina. Invece quelle che si scindono facilmente possiedono residui basici multipli localizzati immediatamente a monte del sito di clivaggio, in corrispondenza del carbossile terminale dell'HA1. Molto probabilmente gli amminoacidi basici multipli aumentano la sensibilità verso le proteasi, in modo da rendere alcuni virus più soggetti alla scissione dell'HA (Easterday *et al.*, 1997).

In ceppi isolati in Pennsylvania in seguito all'epidemia del 1983-1984 è stata osservata la presenza, non sempre costante, di una catena laterale glucidica nelle vicinanze del sito di clivaggio, la quale rappresenterebbe un impedimento sterico per le proteasi. Nel sito di clivaggio di ceppi H5 apatogeni, oltre alla catena glucidica, sono presenti quattro amminoacidi e nella maggior parte dei casi più di

uno è basico. Gli H5 patogeni erano caratterizzati, invece, da amminoacidi basici multipli in assenza della frazione glucidica; nel caso in cui la catena glucidica fosse presente si poteva assistere o all'ulteriore inserimento di due amminoacidi o allo scambio di prolina o glutamina (prossimalmente al terminale carbossilico dell'HA1) con residui basici (Horimoto e Kawaoka, 2001). Pertanto si può dedurre che la frazione glucidica laterale interferisce con l'accessibilità delle proteasi e che la distanza di tale catena dal sito di clivaggio, insieme alla sequenza amminoacidica determini la suscettibilità dell'HA a proteasi ubiquitarie. Spesso, inoltre, ceppi H5 diventano apatogeni in seguito alla perdita della catena laterale glucidica (Horimoto e Kawaoka, 2001).

La connessione diretta tra patogenicità dei virus influenzali aviari e scindibilità dell'HA è stata anche dimostrata mediante la *reverse-genetics*, tecnica che permette di ottenere organismi con un bagaglio genetico identico ai virus influenzali di partenza, tranne, in questo caso, nel sito di clivaggio dell'HA, il quale è stato mutato in una sequenza non patogena. In seguito a questa mutazione è stato osservata una drastica riduzione della virulenza (Horimoto e Kawaoka, 2001). Organi internazionali raccomandano, soprattutto per i sottotipi H5 ed H7, la determinazione della sequenza amminoacidica in vicinanza del terminale carbossilico dell'HA1, poiché questa è un indice attendibile del grado di patogenicità dei virus influenzali aviari (CEE, 1992).

Le proteasi cellulari, che sono implicate nel clivaggio dell'HA, vengono suddivise in base alla loro specificità per i substrati in due gruppi. Il primo gruppo è composto da enzimi tripsino-simili, che sono in grado di scindere sia le HA di virus apatogeni sia quelle di virus patogeni, caratterizzati rispettivamente da una singola arginina e da residui basici multipli nel sito di clivaggio (Horimoto e Kawaoka, 2001). Generalmente gli enzimi che agiscono sui ceppi non patogeni sono localizzati a livello di cellule epiteliali del tratto respiratorio o gastrointestinale, condizionando a volte anche il decorso clinico (Zambon, 2001). In alcuni virus umani del tipo A, in particolar modo il ceppo A/WSN/33 (H1N1), nel quale manca la sequenza di

amminoacidi basici multipli (Goto e Kawaoka, 1998), è stato scoperto che l'HA viene attivato dalla plasmina, che agisce con un singolare meccanismo. Questo processo interessa la neuraminidasi, che lega e sequestra il plasminogeno, precursore della plasmina, incrementando in tal modo la concentrazione locale di proteasi. Visto che il plasminogeno è ubiquitario, il virus può prontamente sfruttare, in una grande varietà di organi, la plasmina per la separazione dell'HA. Pertanto fra i virus influenzali la capacità della NA di legarsi al plasminogeno rappresenta un fattore di patogenicità (Horimoto e Kawaoka, 2001; Zambon, 2001).

La replicazione dei virus aviari non patogeni avviene in seguito al clivaggio dell'HA ad opera di una proteasi, simile al fattore X della coagulazione ed appartenente alla famiglia della protrombina, presente nel liquido allantoideo delle uova (Horimoto e Kawaoka, 2001; Zambon, 2001). Anche proteasi batteriche sono in grado di attivare l'HA in modo diretto o indiretto. A tal proposito, *Staphylococcus aureus* secreta delle proteasi che sono capaci di scindere, in vitro e in vivo (polmoni di topo), le HA che contengono un singola arginina nel sito di clivaggio (Scheiblaue *et al.*, 1992). Inoltre Staphylochinasi e streptochinasi sono in grado di trasformare il plasminogeno, presente negli essudati infiammatori, in plasmina e quindi riescono ad attivare indirettamente l'HA virale. Fattori secreti da batteri possono determinare una risposta flogistica con liberazione di enzimi tripsino-simili nei fluidi respiratori, che sono in grado di scindere l'emoagglutinina, giustificando in questo modo lo sviluppo di polmonite dopo un'infezione mista, batterica e virale (Horimoto e Kawaoka, 2001; Zambon, 2001).

Il secondo gruppo di proteasi, enzimi ad attività  $Ca^{++}$  dipendente che hanno condizioni ottimali a pH acido, scindono solamente le HA di virus influenzali patogeni con residui basici multipli nel sito di clivaggio. Queste sostanze, "subtilisin-like", mediante un processo di endoproteolisi che coinvolge gli amminoacidi basici accoppiati o multipli, sono comunemente implicate nella strutturazione di proteine e peptidi biologicamente attivi.

I virus aviari patogeni possono essere attivati da "Furin" e PC6, due

proteasi ampiamente diffuse nei tessuti degli uccelli, le quali consentono all'agente eziologico di replicare, almeno teoricamente, in tutti i tipi cellulari dell'ospite (pantropismo) (Zambon, 2001). Inoltre la disponibilità di recettori funzionali per l'emoagglutinina sulle cellule dell'ospite e la permissività di questa alla replicazione determinano, in aggiunta a tutti i meccanismi menzionati, il tropismo tissutale e la capacità di diffusione sistemica dei virus influenzali. Le HA dei virus influenzali umani riconoscono preferenzialmente recettori con legame  $\alpha 2-6$  fra acido N-acetilsialico e galattosio (*NeuAc  $\alpha 2,6Gal$* ), mentre i virus aviari ed equini quelli con legame  $\alpha 2-3$  (*NeuAc  $\alpha 2,3Gal$* ).

La prevalenza di recettori con specifici legami varia nelle diverse specie d'ospite. Infatti nell'uomo a livello delle cellule epiteliali tracheali predominano le *NeuAc  $\alpha 2,6Gal$* , mentre nelle cellule tracheali e negli eritrociti di equino e nelle cellule intestinali di anatra prevalgono le *NeuAc  $\alpha 2,3Gal$* . È interessante ricordare che negli epiteli tracheali dei suino sono presenti entrambi i tipi di legame, spiegando in tal modo l'elevata suscettibilità di questa specie ai virus influenzali sia umani sia aviari (Ito *et al.*, 1998; Horimoto e Kawaoka, 2001).

La specificità d'ospite che si osserva in molti ceppi influenzali è influenzata da inibitori del legame HA-recettore cellulare, presenti nel siero ed in altri fluidi corporei, che possono comportare il semplice ingombro sterico, oppure il blocco competitivo dei siti recettoriali dell'HA (Zambon, 2001).

La neuraminidasi, il cui meccanismo d'azione prevede la rimozione dell'acido sialico dall'HA della progenie virale, facilitando così il rilascio dalle cellule infette, partecipa anch'essa alla determinazione della gamma degli ospiti e del tropismo tissutale, dovendo condividere la specificità dell'HA (Zambon, 2001). Pertanto un virus soggetto a riassortimento, formato da geni che provengono da un tipo aviario, ad eccezione di un unico gene, corrispondente all'NA di derivazione umana, perde la capacità di replicare nelle anatre (Horimoto e Kawaoka, 2001). Infatti la NA del sottotipo N2 di origine aviaria, al contrario di quella umana, non riesce ad idrolizzare il

legame  $\alpha(2,6)$  dell'acido sialico. La specificità d'idrolisi della NA sembra che condizioni le sostituzioni aminoacidiche nel sito attivo, come è stato dimostrato in isolati in natura in cui si sono osservate significative variazioni a carico dei geni codificanti la NA (Zambon, 2001). In tal modo la NA di un virus aviario N2, sebbene presenti un'elevata specificità per l'idrolisi del legame  $\alpha(2,3)$ , può ottenere, evolvendosi nell'uomo, anche un'azione  $\alpha(2,6)$  (Horimoto e Kawaoka, 2001). Tutto ciò evidenzia come le glicoproteine di superficie, HA e NA, siano estremamente importanti nel promuovere un'efficiente replicazione virale nei vari ospiti, sebbene sembra che la necessità di specificità per la NA sia meno rigorosa, poiché esistono ancora virus N2 umani di lontana derivazione aviaria, con NA capaci di identificare solamente legami  $\alpha(2,3)$  (Baum e Paulson, 1991; Kobasa *et al.*, 1999). Non è del tutto chiaro l'importanza nei mammiferi del tropismo tissutale e non è ancora stata dimostrata in modo definitivo una replicazione sistemica dei virus influenzali. In seguito all'ultima epidemia influenzale del 1997 ad Hong Kong sono stati isolati dei virus capaci di replicare a livello sistemico nei topi, ma questo non è stato ancora comprovato nell'uomo. Inoltre, sebbene questi virus isolati non presentino variazioni nelle rispettive HA, non tutti hanno manifestato uguale patogenicità nei topi, suggerendo quindi che altre componenti virali partecipino alla determinazione della patogenicità dei virus influenzali (Zambon, 2001). Sembra che il gene PB2, che codifica per la subunità della polimerasi virale, ricopra un ruolo centrale nell'abilità di replicazione del virus in diversi ospiti. In alcuni H5N1 isolati ad Hong Kong nel 1997, la proteina PB2 è provvista di una lisina in posizione 627, che in vitro su cellule di rene di cane Madin-Darby, partecipa alla formazione di placche di maggiori dimensioni, connesse, anche se non in modo assoluto, ad una più alta patogenicità nei topi. Inoltre sembra che anche il gene PB2 dei sottotipi H5N1 altamente patogeni derivi da un virus aviario H9N2. Potrebbe, infatti, essere stata la donazione di geni interni dell'H9N2 un prerequisito permissivo dell'infezione dell'uomo (Zambon, 2001).

Il fenotipo virale viene determinato anche dal gene NS1, il quale

partecipa a delimitare il *range* dei possibili ospiti. Questo è stato dimostrato da una variante mutata di NS1 che donava al virus una sensibilità nei confronti della temperatura degli animali. Inoltre, NS1 sembra che espliciti anche una funzione neutralizzante sull'attività antivirale sostenuta dall'interferone, il quale agisce prevenendo la diffusione sistemica dell'agente eziologico. I virus influenzali altamente patogeni potrebbero contenere proteine NS1 dotate di una maggiore efficienza (Zambon, 2001).

In aggiunta, certe combinazioni di geni potrebbero risultare più favorevoli alla replicazione virale nei vari ospiti. Studi *in vitro*, su varianti ottenute tramite riassortimento, hanno dimostrato che non tutte le proteine interne codificate comportano un'efficiente replicazione dei virus umani ed aviari, suggerendo così la necessità di interazione tra le proteine stesse (Zambon, 2001).

## **Resistenza virale**

### Resistenza agli agenti chimici e fisici

Sono relativamente sensibili all'azione inattivante dei solventi dei lipidi (detergenti) poiché i virus influenzali sono dotati di *envelope*. Formalina, beta-propiolattone, ossidanti, acidi diluiti, etere, sodio desossicolato, idroxilamina, sodio dodecilsolfato e ioni ammonio sono alcuni degli agenti chimici in grado di annullare rapidamente l'infettività di questi virus. Il virus dell'Influenza aviaria viene anche inattivato dal calore, dai valori estremi di pH, dalle condizioni non isotoniche e dall'essiccamento (Easterday *et al.*, 1997).

### Resistenza ambientale

L'eliminazione virale nell'ambiente avviene tramite le secrezioni oronasali e prevalentemente con le feci, all'interno dei quali il virus rimane protetto dal materiale organico, che determina un notevole aumento della resistenza. All'interno delle feci il virus mantiene il

potere infettante per 30-35 giorni a 4°C e per 7 giorni a 20°C. Nei focolai che hanno coinvolto polli in Pennsylvania, è stato isolato virus infettante da deiezioni liquide fino a 105 giorni dallo svuotamento dei ricoveri (Easterday *et al.*, 1997). Proprio perché i virus influenzali sono in grado di sopravvivere in condizioni di umidità e bassa temperatura a lungo tempo, un punto di partenza molto importante per il controllo dell'infezione, è rappresentato dal trattamento dei reflui fortemente contaminati. Per un'adeguata disinfezione di strutture ed ambienti, innanzitutto deve essere ridotto o rimosso con detergenti il materiale organico e successivamente mediante l'impiego di calore, ipoclorito di sodio in soluzione, formalina, disinfettanti deve essere attuato un processo di decontaminazione. Per quanto concerne le lettiere e le deiezioni, queste possono essere smaltite con interrimento o trasformate in concime previo compostaggio (Easterday *et al.*, 1997). Durante focolai di malattia in domestici, sono stati isolati anche virus dall'acqua di abbeveratoi, contaminata da feci e secrezioni (Easterday *et al.*, 1997). L'isolamento è stato effettuato anche dalla superficie di laghi e stagni, frequentati da elevate concentrazioni di volatili acquatici in Alberta, Canada (Hinshaw *et al.*, 1980); in Minnesota, USA (Halvorson *et al.*, 1983) e in Alaska, USA (Ito *et al.*, 1995). I dati relativi alla persistenza di questi agenti nell'acqua sono tuttora estremamente limitati. Oltre al primo lavoro effettuato da Webster *et al.* (1978) solo altri tre sono stati compiuti a tal riguardo (Stallknecht *et al.*, 1990a; Stallknecht *et al.*, 1990b; Brown *et al.*, 2007). Questi studi hanno permesso di dimostrare come i virus dell'Influenza aviaria (incluso il sottotipo H5N1 HPAI) siano in grado di persistere a lungo tempo in acqua in dipendenza di diversi fattori, quali, il ceppo virale, il grado di salinità, il pH e la temperatura. È stato osservato che alcuni ceppi mantengono la capacità infettante a 17°C fino a 207 giorni e a 4°C anche più a lungo (Stallknecht *et al.*, 1990a; Stallknecht *et al.*, 1990b; Webster *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2007).

### Resistenza in laboratorio

La coltivazione dei virus influenzali solitamente avviene nel liquido allantoideo di uova embrionate di pollo, poiché a questo livello sono molto stabili e perché sono protetti dalla presenza proteine. (Easterday *et al.*, 1997). I virus cresciuti in uova possono mantenere, se conservati a 4°C, per diverse settimane l'infettività, l'attività emoagglutinante e quella neuraminidasi. Per aumentare questi tempi è indispensabile ricorrere alla liofilizzazione o alla conservazione a -70°C. Per eliminare l'infettività, senza alterare le attività emoagglutinante e neuroaminidasi, si possono utilizzare formalina o betapropiolattone (Esterday *et al.*, 1997).

In laboratorio per ottenere l'inattivazione dei virus influenzali possono essere utilizzati numerosi detergenti comuni o disinfettanti, come quelli fenolici o l'ipoclorito di sodio (Easterday *et al.*, 1997).

### **Coltivazione in vivo ed in vitro**

La coltivazione dei virus influenzali può essere effettuata in embrioni di pollo inoculati al 9°-11° giorno d'incubazione. Questa tecnica permette la crescita di tutti i ceppi aviari, ottenendo alti titoli di virus dotati di emoagglutinina scissa. Inoltre gli embrioni di pollo sono utilizzati per produrre vaccini (Easterday *et al.*, 1997). La coltivazione può essere fatta anche in colture cellulari, tecnica adottata in minor misura in campo aviario poiché i virus vi replicano con bassi titoli. Normalmente la coltivazione viene eseguita su fibroblasti di embrione di pollo (CEF), e linee continue di cellule renali di cane Madin-Darby (MDCK), aggiungendo al terreno di coltura, nel caso di ceppi a bassa patogenicità, tripsina, che permette di indurre il clivaggio dell'HA consentendo quindi la replicazione del virus e la formazione di placche.

Invece, per le infezioni sperimentali le specie che vengono più frequentemente utilizzate sono polli, tacchini e anatre poiché evidenziano un'elevata sensibilità all'infezione naturale.

Generalmente, si preferisce ricorrere all'impiego di animali della stessa specie ed età. È stato dimostrato che in seguito ad un'infezione sperimentale i virus dell'Influenza aviaria sono in grado di replicare anche in alcuni mammiferi quali furetti, gatti, criceti, topi, scimmie, visoni e maiali (Easterday *et al.*, 1997).



La provincia di Bergamo è una delle provincie della Lombardia. Essa si estende per una lunghezza di circa 100 chilometri (dal lago d'Inferno a Castiglione del Garda) e per una larghezza di circa 40 chilometri (dal lago d'Inferno al lago di Pusiano). La provincia di Bergamo è una delle provincie della Lombardia. Essa si estende per una lunghezza di circa 100 chilometri (dal lago d'Inferno a Castiglione del Garda) e per una larghezza di circa 40 chilometri (dal lago d'Inferno al lago di Pusiano). La provincia di Bergamo è una delle provincie della Lombardia. Essa si estende per una lunghezza di circa 100 chilometri (dal lago d'Inferno a Castiglione del Garda) e per una larghezza di circa 40 chilometri (dal lago d'Inferno al lago di Pusiano).

**PARTE SECONDA**

La provincia di Bergamo confina con la provincia di Sondrio (Canton Grigioni), ad Ovest con la provincia di Como e con quella di Lecco, a Est con la provincia di Piacenza e ad Est confina con la provincia di Biella e con quella di Aosta (provincia di Valle d'Aosta).

**Geologia**

La geologia della provincia di Bergamo è caratterizzata da una grande varietà di rocce. Le rocce più antiche sono quelle del Paleozoico, che si estendono per tutta la provincia. Le rocce più recenti sono quelle del Quaternario, che si estendono per tutta la provincia. La geologia della provincia di Bergamo è caratterizzata da una grande varietà di rocce. Le rocce più antiche sono quelle del Paleozoico, che si estendono per tutta la provincia. Le rocce più recenti sono quelle del Quaternario, che si estendono per tutta la provincia.

REVISED

1998

1998

## 1.1 AREA DI STUDIO

La provincia di Sondrio, una delle 10 provincie della Lombardia, è composta da un territorio prevalentemente montuoso (Alpi Retiche e Orobie) e comprende tutta la Valtellina attraversata dal fiume Adda e tutta la Valchiavenna percorsa dal fiume Liro e dal Mera.

La superficie della provincia è di 3197 kmq e si estende per una lunghezza massima di 119 km da Est ad Ovest e con una larghezza massima di 66 km da Nord a Sud. L'ambito territoriale registra l'altezza massima sulla punta Perrucchetti (gruppo Bernina), che risulta a 4021 m s.l.m., mentre l'altezza minima si trova nel comune di Piantedo, in prossimità della frazione Sant'Agata, a quota 198 m s.l.m..

La provincia di Sondrio confina a Nord-Ovest con la Svizzera (Canton Grigioni), ad Ovest con la provincia di Como e con quella di Lecco, a Sud con la provincia di Bergamo e ad Est confina con la provincia di Brescia e con il Trentino-Alto Adige (provincia di Trento e di Bolzano).

### **Geologia**

Le montagne sono costituite da diversi tipi di rocce, sia dal punto di vista strutturale, mineralogico che geologico. In generale sono rocce metamorfiche, cioè rocce che hanno subito modificazioni nella composizione mineralogica o nella struttura o nella tessitura in seguito a mutamenti di temperatura e pressione. Infatti, sono rocce che si sono formate durante l'orogenesi alpina, detta anche alpino-himalaiana, che è iniziata nel Cretaceo (circa 100 milioni di anni fa) e si è praticamente conclusa nel Miocene (circa 15 milioni di anni fa).

Dal punto di vista geografico il territorio di Sondrio è diviso in due versanti, quello retico e quello orobico, separati tra loro dalla "Linea Insubrica" o "Linea del Tonale", che è un lineamento tettonico che separa geologicamente la catena principale delle Alpi centrali dal dominio delle Alpi calcaree meridionali, che comprendono le Prealpi italiane e i massicci dolomitici. Questa linea rappresenta una geosutura, ossia l'espressione sulla superficie terrestre dello scontro fra la placca europea e quella africana, come viene descritto nel modello della tettonica a zolle.

Inoltre i rilievi del territorio di Sondrio hanno subito anche l'influenza del ritiro dei ghiacciai quaternari che, giunti fino all'alta pianura Padana, non sparirono di colpo, ma si ritirarono gradualmente, con periodi di stasi che si prolungarono più o meno nel tempo. Testimonianza dei ghiacciai quaternari sono le morene, i cordoni morenici e le rocce montanate.

## **Clima**

Le condizioni climatiche, che dipendono da fattori zionali e da fattori geografici locali, quali per esempio il tipo di substrato, l'altitudine, lo sviluppo morfologico del terreno e l'irraggiamento solare, partecipano direttamente alla determinazione della vegetazione, mentre indirettamente influiscono sulla quantità e sulla qualità delle risorse disponibili per la fauna selvatica e quindi sulla distribuzione di quest'ultima.

La temperatura in provincia di Sondrio, nonostante il lento e costante aumento generalizzato verificatosi negli ultimi decenni a livello mondiale, è influenzata principalmente dall'altitudine e dall'esposizione ai raggi solari. Per quanto riguarda l'altitudine è normale che le aree più elevate abbiano delle medie sensibilmente minori di quelle a quota più bassa. Infatti si può osservare una temperatura media annua che varia da +12°C del fondovalle della Valtellina (Sondrio, 298 m s.l.m.) a +7°C in Val Masino (787 m s.l.m.),

a +2°C al lago di Cancano (2000 m s.l.m.) fino a circa -8°C alle quote maggiori (3000-4000 m s.l.m.).

Anche l'escursione termica annua risente delle condizioni morfologiche: si passa dalla zona prealpina con escursioni che variano dai 21.6°C ai 18.8°C, alla fascia alpina (1500-2000 m) dove diminuisce a circa 16.5°C, per poi ridursi a meno di 14°C nella zona culminale delle Alpi.

Mentre l'esposizione al sole, oltre a differenziare le temperature, soprattutto quelle della stagione invernale, determina anche gli aspetti ambientali dei versanti.

Prendendo in considerazione la media annuale dal fondovalle ai 2300 m s.l.m. si osservano i seguenti valori:

Mese	Fondovalle (280 m s.l.m.)	2300 m s.l.m.
gennaio	+0.6°C	-6.8°C
aprile	+11.6°C	+1.4°C
luglio	+20.7°C	+11.1°C
ottobre	+12.3°C	+3.8°C

Per quanto concerne alle precipitazioni, queste aumentano dal fondovalle alla montagna a causa principalmente dell'azione del vento. Il versante orobico (alla sinistra del fiume Adda) è più piovoso di quello retico (alla destra del fiume Adda). Il massimo di piovosità si registra fra maggio ed ottobre, mentre i valori minimi si hanno nel periodo invernale. La neve è un fenomeno normale durante tutto l'inverno e la sua persistenza varia con l'altitudine, la morfologia e l'esposizione.

### **Vegetazione**

Anche la vegetazione del territorio di Sondrio risente dell'altitudine, che è il fattore che maggiormente interviene a determinare sia

l'insediarsi sia il persistere dei vari "climax" di flora.

- Piano submontano (500-1000 m): caratterizzato principalmente da faggio (*Fagus sylvatica*), abete bianco (*Abies alba*), larice (*Larix decidua*) e abete rosso (*Picea abies*). Il sottobosco è formato da arbusti, quali il sorbo degli uccellatori (*Sorbus aucuparia*) e il maggiociondolo (*Cytisus laburnum*), e da cespugli di mirtillo e brugo (*Calluna vulgaris*). Inoltre nelle praterie submontane, a livello delle faggete, è abbondante l'avena bionda (*Trisetum flavescens*) a cui si associano trifoglio montano (*Trifolium montanum*), ranuncolo montano (*Ranunculus montanus*), campanula barbata (*Campanula barbata*) e botton d'oro (*Trollius europaeus*).
- Piano montano (1000-1400 m): specie caratteristica è l'abete rosso accompagnato da abete bianco e da larice. Nel sottobosco sono presenti mirtillo nero (*Vaccinium myrtillus*) e rosso (*Vaccinium vitis idaea*). Nelle radure sono frequenti cespugli di rododendri (*Rhododendron ferrugineum*) e di lamponi (*Rubus idaeus*). Le piante erbacee comprendono festuca ovina (*Festuca ovina*), melampiro (*Melampyrum silvaticum*), campanula barbata e veronica (*Veronica officinalis*).
- Piano subalpino (1400-1800): caratterizzato da larice, cembro (*Pinus cembra*) e spesso da mugo (*Pinus mugo*) e abete rosso. Il sottobosco è costituito comunemente da rododendro, ontano verde (*Alnus viridis*), ginepro nano (*Juniperus nana*). Le erbacee più diffuse sono l'erba oline (*Festuca olinea* var. *capillata*), nardo (*Nardus stricta*), trifogli (*Trifolium montanum* e *Trifolium alpinum*) e diverse specie di *Carex* e *Juncus*. A livello delle conifere si possono osservare delle praterie e delle torbiere caratterizzate da prati pascolabili costituiti da numerose specie di graminacee, quali per esempio i nardeti delle Alpi (*Nardetum alpigenum*).
- Piano alpino (2400-2700 m): si estende sopra il limite superiore della vegetazione arborea ed arbustiva. É

caratterizzato da aggregazioni erbose con caratteri di tundra e steppa alpina (*Curvuletum*), che occupa le superficie a terreno acido dove domina la carice curvula (*Carex curvula*). Nei suoli calcarei si trovano altri due cariceti, il firmeto (*Carex firma*) e l'alineto (*Carex elyna*).

- Piano nivale (oltre 2700 m): costituito principalmente da piccoli pascoli a mosaico di *Curvuletum* e *Salicetum*, da alcune specie di sassifragacee (*Saxifraga paniculata*, *S. aizoon*) e da muschi e licheni.

### Comprensori alpini

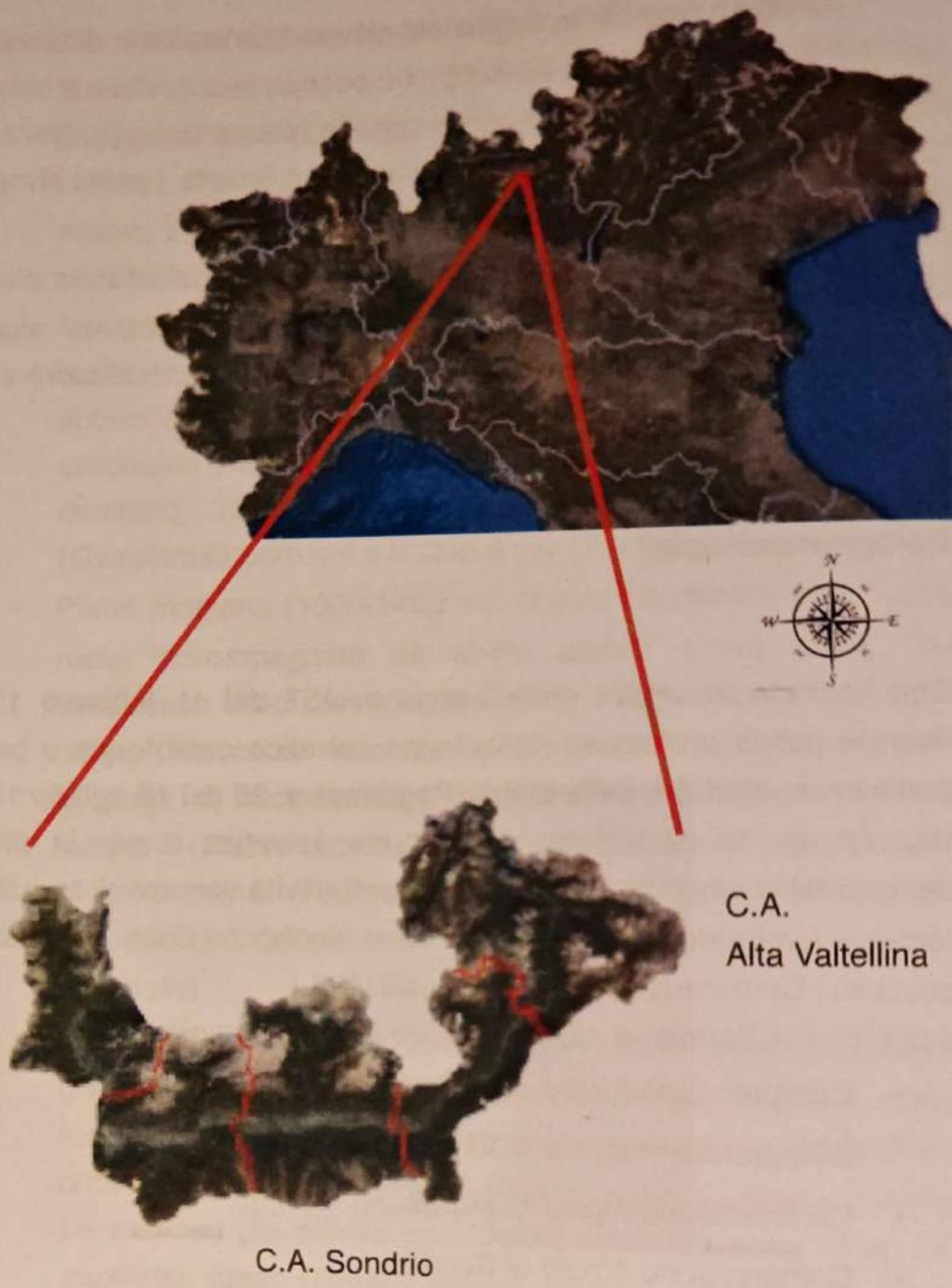
Con l'entrata in vigore della Legge n. 157 del 11 febbraio 1992 (Norme per la protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio) e della Legge Regionale n. 26 del 16 agosto 1993 (Norme per la protezione della fauna selvatica e per la tutela dell'equilibrio ambientale e disciplina dell'attività venatoria) su tutto il territorio lombardo compreso nella zona faunistica delle Alpi si sono costituiti i Comprensori Alpini di Caccia (C.A.).

Il territorio di Sondrio è stato suddiviso in 5 Comprensori:

- Comprensorio Alpino dell'Alta Valtellina
- Comprensorio Alpino di Chiavenna
- Comprensorio Alpino di Morbegno
- Comprensorio Alpino di Sondrio
- Comprensorio Alpino di Tirano

Ogni comprensorio è dotato di statuto e sono delle strutture senza fini di lucro, che perseguono scopi di tutela e gestione del territorio e della fauna selvatica (figura 14).

I campioni esaminati nella presente ricerca derivano da 13 comuni del Comprensorio Alpino di Sondrio e da 1 comune di quello dell'Alta Valtellina (tabella 2 e 3) (figura 15).



**Figura 14:** Rappresentazione della suddivisione in comprensori alpini della provincia di Sondrio.

**Tabella 2:** Elenco dei comuni del C.A. di Sondrio coinvolti nel campionamento.

Comune	Superficie Km <sup>q</sup>	Altitudine (m s.l.m.)	Coordinate geografiche
Albosaggia	34.25	287-2573	46°08'54.24"N-9°51'18.36"E
Berbenno in Valtellina	35.70	258-3114	46°10'07.32"N-9°44'46.32"E
Caiolo	33.35	278-2663	46°09'03.24"N-9°48'56.16"E
Caspoggio	6.82	850-2686	46°15'51.84"N-9°51'50.04"E
Castione Andevenno	17.15	278-2490	46°10'25.32"N-9°48'04.68"E
Cedrasco	14.77	273-2620	46°09'00.72"N-9°46'05.16"E
Chiesa in Valmalenco	114.96	916-3678	46°15'57.60"N-9°50'58.92"E
Chiuro	51.71	349-3248	46°09'57.24"N-9°58'55.20"E
Lanzada	115.95	950-4021	46°16'12.72"N-9°52'13.08"E
Montagna in Valtellina	48.60	288-3323	46°10'44.84"N-9°54'14.40"E
Piateda	71.00	295-3038	46°09'37.80"N-9°56'09.60"E
Ponte in Valtellina	69.48	324-3137	46°10'33.24"N-9°58'44.04"E
Torre Santa Maria	45.49	460-3648	46°14'04.20"N-9°51'09.36"E

**Tabella 3:** Elenco dei comuni del C.A. Alta Valtellina coinvolti nel campionamento.

Comune	Superficie Km <sup>q</sup>	Altitudine (m s.l.m.)	Coordinate geografiche
Livigno	210.79	1693-3302	46°32'08.16"N-10°08'05.28"E

**C.A. Alta Valtellina**



**C.A. Sondrio**

**Figura 15:** Comuni del C.A. dell'Alta Valtellina e del C.A. di Sondrio coinvolti nel campionamento di Galliformi alpini.

## 1.2 CENSIMENTO DEI GALLIFORMI ALPINI

I censimenti dei Galliformi alpini vengono suddivisi in primaverili ed in tardo estivi (tabella 4).

Le consistenze rilevate in primavera vanno inserite in un contesto di serie storica, al fine di monitorare nel medio-lungo periodo la tendenza demografica. Consentono inoltre di verificare come l'attività venatoria, le condizioni invernali ed il successo riproduttivo della stagione precedente abbiano effettivamente influito sulla demografia. I dati raccolti nei censimenti tardo estivi, cioè post-riproduttivi, permette di valutare il successo riproduttivo ( $S.R = N^{\circ} Juv / N^{\circ}$  femmine totali) e l'indice riproduttivo ( $N^{\circ} Juv / N^{\circ}$  adulti totali).

**Tabella 4:** Schema riassuntivo delle modalità di esecuzione dei censimenti dei Galliformi alpini.

Specie	Dato da ottenere	Modalità
Fagiano di monte	Densità pre-riproduttiva	Su arene in aree campione
Pernice bianca	Densità pre-riproduttiva	Al canto in aree in aree campione
Coturnice	Densità pre-riproduttiva	Al canto in aree in aree campione
Tutte le specie	Densità post-riproduttiva	Con cane da ferma in aree campione

## Modalità di esecuzione dei censimenti primaverili o pre-riproduttivi

I censimenti si effettuano sfruttando l'attività di canto degli animali, in particolar modo dei maschi, in modo tale di localizzarli più facilmente (tabella 5). Il censimento si effettua in aree campione di settori vocati alle specie, ascoltando e/o osservando i maschi al canto, sull'arena per il fagiano di monte, o nel territorio delle coppie per la pernice bianca e la coturnice (de Franceschi, 1984). Per il fagiano di monte si contano anche le femmine eventualmente presenti sull'arena, mentre per la pernice bianca e per la coturnice è importante distinguere i maschi accoppiati da quelli non accoppiati.

**Tabella 5:** Periodo indicato per il campionamento per i Galliformi alpini.

Specie	Periodo indicato per il censimento
Fagiano di monte	Fine aprile – Maggio
Pernice bianca	Metà maggio – Inizio giugno
Coturnice	Aprile – Maggio

Fagiano di monte: in ciascuna area campione vengono individuate delle postazioni fisse che vengono affidate ad osservatori per il censimento al canto. Il numero degli osservatori deve consentire di coprire tutta la superficie da indagare con la vista e/o con l'udito (tabella 6).

Ogni operatore è dotato di una scheda di osservazione e una cartina con scala di dettaglio non inferiore a 1:50000, dove verranno segnati:

- orario di inizio e di fine di ogni osservazione;
- numero di uccelli, possibilmente distinti per classe di sesso e di età;
- tipo di osservazione (solo avvistamento, osservazione del maschio in canto, maschio in canto e non udito), unitamente

ad eventuali osservazioni utili all'eliminazione dei doppi conteggi;

- precisa localizzazione del contatto sulla carta;
- eventuali altre osservazioni (tracce fresche, ecc.).

**Tabella 6:** Schema riassuntivo dei censimenti del fagiano di monte.

Periodo indicato per il censimento	Inizio indicativo attività dei maschi (ora legale)	Durata dell'osservazione (min)
25 aprile – 10 maggio	4.45 – 5.30 a.m.	90
11 – 20 maggio	4.30 – 5.15 a.m.	90

Pernice bianca: in ciascuna area campione vengono individuate le postazioni che vengono affidate ad osservatori fissi per il censimento al canto (tabella 7). Gli osservatori contano i maschi di pernice bianca mediante l'ascolto delle caratteristiche manifestazioni vocali e l'osservazione dei voli di parata, nel periodo di massima territorialità della specie.

Nelle schede di osservazione e nelle carte saranno indicati:

- orario di ogni osservazione di maschi, femmine ed indeterminati;
- tipo di osservazione (maschio in canto non visto, maschio da solo in canto, maschio accoppiato, individuo indeterminato);
- eventuali altre osservazioni (tracce fresche, ecc.).

**Tabella 7:** Schema riassuntivo dei censimenti della pernice bianca.

Periodo indicato per il censimento	Inizio indicativo attività dei maschi (ora legale)	Durata dell'osservazione (min)
15 – 10 maggio	4.15 – 4.30 a.m.	90
11 – 20 maggio	4.00 – 4.30 a.m.	90

Coturnice: in ciascun area campione vengono individuati uno o più itinerari che preferibilmente devono essere percorsi nell'arco di 3-4 ore soste incluse. Lungo ciascun percorso si utilizzano richiami acustici, che vengono effettuati, in ogni punto, per almeno tre sessioni di un minuto di richiamo e di un minuto di ascolto. Queste operazioni vengono svolte dalle prime luci dell'alba nel momento di massima territorialità della specie. Le coturnici cantano spesso spontaneamente anche in tarda mattinata, ma le ore ideali sono quelle tra l'alba e le 8.00 di mattina e dalle 18.00 al giungere del buio (tabella 8).

Ogni rilevatore ha a disposizione una scheda di osservazione e una cartina, dove indicherà:

- orario di ogni osservazione di maschi e femmine;
- numero di uccelli;
- tipo di osservazione;
- precisa localizzazione su carta;
- eventuali altre segnalazioni (tracce fresche, ecc).

**Tabella 8:** Schema riassuntivo dei censimenti della coturnice.

Periodo indicato per il censimento	Inizio indicativo attività dei maschi (ora legale)	Durata dell'osservazione (min)
aprile-maggio	4.30-8.00 a.m.	180-240
aprile-maggio	18.00-21.00 a.m.	180-240

### **Modalità di esecuzione dei censimenti tardo estivi o post-riproduttivi**

Questo censimento viene svolto in tarda estate, con l'ausilio di cani da ferma per individuare le nidiate e consente di accertare il successo riproduttivo dei Galliformi alpini e quindi di impostare i piani di prelievo.

Queste operazioni vengono svolte dopo la metà di agosto, quando anche i pulcini delle nidiate più tardive sono atti al volo e prima del periodo di dispersione dei giovani. L'area campione da censire viene suddivisa in parcelle di rilevamento e la ricognizione comincerà dal basso e procederà per linee orizzontali lungo le curve di livello, che si innalzeranno progressivamente fino a raggiungere il limite superiore di quota, poiché gli uccelli localizzati dai cani si involano normalmente verso valle. Questa modalità permette di limitare i doppi conteggi.

Ogni osservatore ha a disposizione una scheda di osservazione e una cartina, dove indicherà i dati rilevati nella parcella censita.

#### Fagiano di monte:

- ora di osservazione;
- maschi adulti;
- femmine adulte senza covata;
- femmine adulte con covata;
- numero dei giovani della covata, possibilmente distinti per classe di sesso e per grado di sviluppo;
- eventuali altre osservazioni.

#### Pernice bianca e coturnice:

- ora di osservazione;
- adulti senza covata;
- femmine con covata;

- numero dei giovani della covata;
- grado di sviluppo dei giovani
- eventuali altre osservazioni.

### Consistenza della popolazione nel periodo 2001-2006

#### Fagiano di monte

La specie è presente in buona parte del territorio con aree di assenza localizzate nel fondovalle, nelle zone di bassa montagna ed in quelle a quote superiori a 2300 m s.l.m..

La superficie censita nei censimenti tardo estivi è stata in media 11.441 ha (poco più del 4% di territorio agro-silvo-pastorale). I censimenti dal 2001 al 2005 hanno complessivamente evidenziato 827 galli all'anno, pari ad una densità media provinciale di 7.2 individui/kmq nelle aree censite (tabella 9, 10, 11, 12) (figura 16).

**Tabella 9:** Consistenze post-riproduttive di fagiano di monte (media 2001-2006) (Ferloni, 2007).

C.A.	aree censite	Media 2001-2006	Superf. censita (kmq)	Superf. vocata (Kmq)	Stima totale
Sondrio orobiche	4	79	1754	6117	471
Sondrio retiche	4	135	1374	7618	438
Alta Valtellina	2	69	1428	7094	341
Tot. provincia	37	827	11441	44962	2809

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche.

**Tabella 10:** Capi di fagiano di monte, divisi per classi di sesso e di età, censiti nel periodo post-riproduttivo sulle aree campione (2001-2006) (Ferloni, 2007).

C.A.	Tot. individui	M Ad	F senza covata	N° Juv	N° covate
Sondrio orobiche	135	19	8	87	22
Sondrio retiche	79	22	6	40	12
Alta Valtellina	69	19	5	35	10
Tot. provincia	776	133	72	454	116

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche.

**Legenda:**

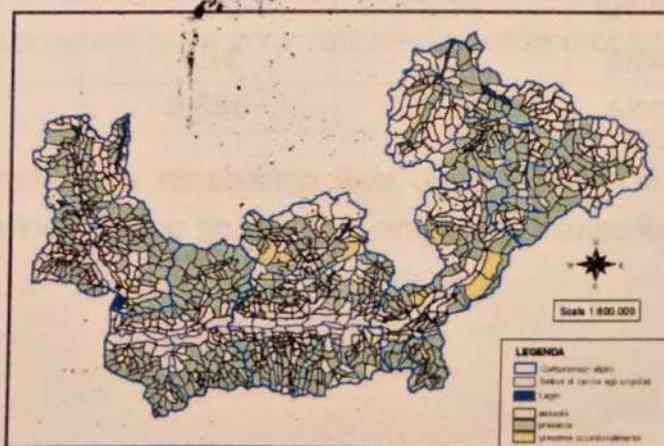
**Tot. individui:** numero totale di individui;

**M Ad:** maschi adulti;

**F senza covata:** femmine senza covata;

**N° Juv:** numero di giovani;

**N° covate:** numero delle covate.



**Figura 16:** distribuzione del fagiano di monte nelle aree di rilevamento faunistico (Ferloni, 2007).

**Tabella 11:** Medie degli indici riproduttivi del fagiano di monte, ricavati dai censimenti post-riproduttivi (2001-2005) (Ferloni, 2007).

C.A.	N° <i>Juv</i> / covata	S.R. (N° <i>Juv</i> / FF tot.)
Sondrio orobiche	4.04	2.98
Sondrio retiche	3.34	2.19
Alta Valtellina	3.62	2.39
Tot. provincia	3.92	2.41

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche.

**Legenda:**

**N° *Juv*/covata:** numero giovani per covata;

**S.R. (N° *Juv*/ FF tot.):** successo riproduttivo (numero giovani/ numero di femmine totali).

**Tabella 12:** Risultati censimenti pre-riproduttivi del fagiano di monte (media 2001-2006) (Ferloni, 2007).

C.A.	N° arene	Maschi censiti	N° maschi/arena
Sondrio orobiche	12.5	56.5	4.52
Sondrio retiche	21.8	94.0	4.31
Alta Valtellina	5.5	37.7	6.85
Tot. provincia	80.2	383.6	4.78

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche.

### Pernice bianca

La superficie coperta dai censimenti post-riproduttivi è stata in media di 5161 ha, pari a meno del 2% del territorio agro-silvo-pastorale censito.

Sono state contate in media 218 pernici bianche all'anno dal 2001 al 2005, pari ad una densità media di 4.2 individui/kmq nelle aree censite (tabella 13, 14, 15) (figura 17).

**Tabella 13:** Consistenze post-riproduttive della pernice bianca (media 2001-2006) (Ferloni, 2007).

C.A.	aree censite	Media 2001-2006	Superf. censita (kmq)	Superf. vocata (Kmq)	Stima totale
Sondrio orobiche	0	-	-	1502	46
Sondrio retiche	2	45	1465	7637	233
Alta Valtellina	1	41	1088	8603	320
Tot. provincia	19	218	5161	33111	1137

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone retiche da quelle orobiche.

**Tabella 14:** Capi di pernice bianca censiti nelle aree campione estive (Ferloni, 2007).

C.A.	Tot. individui	Ad senza covata	N° JUV	N° covate
Sondrio orobiche	-	-	-	-
Sondrio retiche	45	12	31	6
Alta Valtellina	41	9	26	6
Tot. provincia	218	43	147	32

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone retiche da quelle orobiche. Non sono disponibili dati per le aree orobiche del C.A. di Sondrio.

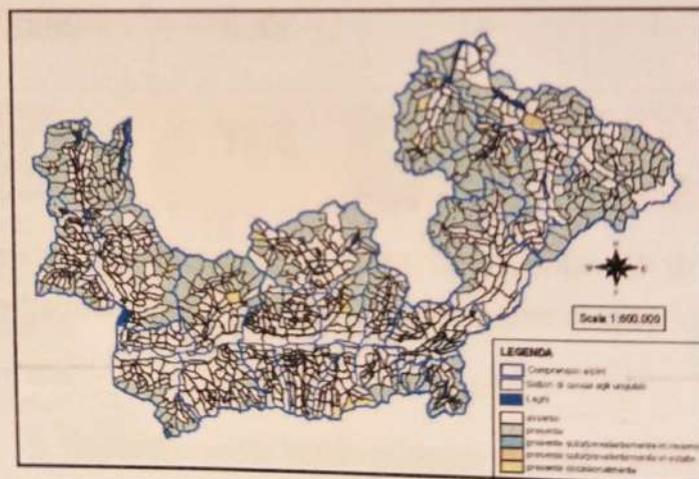
**Legenda:**

**Tot. individui:** numero totale di individui;

**Ad senza covata:** adulti senza covata;

**N° Juv:** numero di giovani;

**N° covate:** numero delle covate.



**Figura 17:** distribuzione della pernice bianca nelle aree di rilevamento faunistico (Ferloni, 2007).

**Tabella 15:** Medie degli indici riproduttivi della pernice bianca ricavati dai censimenti post-riproduttivi (2001-2005) (Ferloni, 2007).

C.A.	N° <i>Juv</i> / covata	S.R. (N° <i>Juv</i> / FF tot.)
Sondrio orobiche	4.71	(4.71)
Sondrio retiche	4.36	1.27
Alta Valtellina	4.25	1.70
Tot. provincia	4.66	1.69

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche. Il dato del successo riproduttivo per Sondrio orobiche non può essere calcolato con certezza per incompletezza dei dati forniti.

**Legenda:**

**N° *Juv*/ covata:** numero giovani per covata;

**S.R. (N° *Juv*/ FF tot.):** successo riproduttivo (numero giovani/ numero di femmine totali).

I dati dei censimenti primaverili pre-riproduttivi effettuati sono ancora pochi e frammentari, anche a causa della difficoltà di accesso alle aree di riproduzione da censire nel periodo in esame. Pertanto non vengono riportati.

## Coturnice

La specie è presente in modo stabile in tutto il territorio provinciale, ad eccezione del fondovalle e delle zone ad altitudine maggiore, poiché le coturnici sono capaci di adattarsi ai diversi tipi di ambiente e ricoprono un'ampia fascia altitudinale.

La superficie complessiva censita è stata pari in media a 7885 ha e sono state indagate in media 35 aree campione. Sono state evidenziate complessivamente 295 soggetti, pari ad una densità media post-riproduttiva nelle aree campione di 3.74 individui/kmq (tabella 16, 17,18) (figura 18).

**Tabella 16:** Consistenze post-riproduttive della coturnice (media 2001-2006) (Ferloni, 2007).

C.A.	aree censite	Media 2001-2006	Superf. censita (kmq)	Superf. vocata (Kmq)	Stima totale
Sondrio orobiche	0	-	-	1502	46
Sondrio retiche	2	45	1465	7637	233
Alta Valtellina	1	41	1088	8603	320
Tot. provincia	35	295	7885	50643	1628

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone retiche da quelle orobiche.

I bassi valori ottenuti nel C.A. dell'Alta Valle confermano la situazione non ottimale della zona nei confronti delle caratteristiche biologiche della specie in questa zona, a causa delle condizioni ambientali e climatiche più rigide.

**Tabella 17:** Capi di coturnice censiti nelle aree campione estive (Ferloni, 2007).

C.A.	Tot. individui	Ad senza covata	N° Juv	N° covate
Sondrio orobiche	15	3	11	2
Sondrio retiche	12	1	9	2
Alta Valtellina	11	2	8	2
Tot. provincia	295	51	205	40

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone retiche da quelle orobiche. Non sono disponibili dati per le aree orobiche del C.A. di Sondrio.

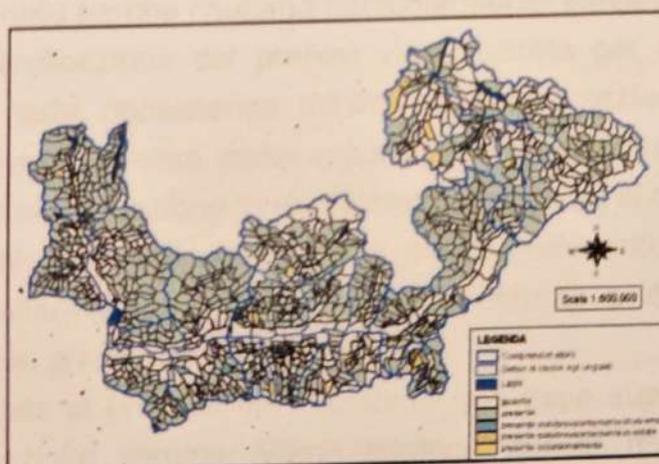
**Legenda:**

**Tot. individui:** numero totale di individui;

**Ad senza covata:** adulti senza covata;

**N° Juv:** numero di giovani;

**N° covate:** numero delle covate.



**Figura 18:** distribuzione della coturnice nelle aree di rilevamento faunistico (Ferloni, 2007).

**Tabella 18:** Medie degli indici riproduttivi della coturnice ricavati dai censimenti post-riproduttivi (2001-2005) (Ferloni, 2007).

C.A.	N° Juv/ covata	S.R. (N° Juv/ FF tot.)
Sondrio orobiche	4.50	2.05
Sondrio retiche	5.40	3.38
Alta Valtellina	5.44	2.72
Tot. provincia	5.12	2.25

Per il C.A. di Sondrio sono stati considerati separatamente i dati relativi ai capi censiti nelle zone orobiche da quelle retiche. Il dato del successo riproduttivo per Sondrio orobiche non può essere calcolato con certezza per incompletezza dei dati forniti.

**Legenda:**

**N° Juv/ covata:** numero giovani per covata;

**S.R. (N° Juv/ FF tot.):** successo riproduttivo (numero giovani/ numero di femmine totali).

### 1.3 PRELIEVO DEI GALLIFORMI ALPINI

Molto importanti sono i dati relativi all'entità e alla qualità del prelievo perché consentono sia di conoscere in modo più approfondito le popolazioni selvatiche sia di migliorare ed ottimizzare la gestione faunistica. Inoltre grazie ad una politica di prelievo è possibile simulare l'andamento della dimensione della popolazione per un certo periodo e stimare il numero medio di capi abbattuti e la variabilità degli abbattimenti. (Gatto *et al.*, 2003).

Il prelievo dei Galliformi alpini riguarda un campione definito numericamente e casuale della popolazione per sesso ed età, poiché nel momento degli abbattimenti è particolarmente difficile selezionare le classi di sesso (soprattutto per le pernici bianche e per le coturnici) e di età, permettendo in tal modo di ottenere informazioni attendibili sulla struttura e sulla qualità di tutta la popolazione.

Per i Galliformi alpini, poiché i censimenti vengono effettuati in aree altamente vocate per quelle specie, non è semplice basarsi sulle densità ottenute perché risultano particolarmente elevate.

Infatti la pianificazione dei prelievi viene basata per una maggior correttezza sulla consistenza minima della popolazione dei C.A.. Questa è una grandezza molto importante che indica la dimensione minima di una popolazione in un determinato *habitat* al di sopra della quale il rischio di estinzione è minimo, anche nell'eventualità in cui si verificano alterazioni a causa di eventi naturali o di fluttuazioni demografiche, ambientali e genetiche.

La percentuale di prelievo dei Galliformi non deve superare il 20% della popolazione stimata. Viene adottata questa misura perché viene considerato che i Galliformi in seguito al prelievo possano andare incontro ad una stagione invernale particolarmente rigida e che quindi siano soggetti ad un'elevata mortalità invernale.

Per calcolare in modo corretto la quota di soggetti da prelevare, viene valutato il successo riproduttivo (S.R.). Questo parametro viene ricavato dai dati riportati dai censimenti tardo estivi, in relazione al numero di giovani e di femmine censiti (*tabella 19*).

**Tabella 19:** Regolazione del prelievo in base al successo riproduttivo delle tre specie di Galliformi (Ferloni, 2007).

Gestione del prelievo	S.R. = $N^{\circ} Juv / N^{\circ} Femmine\ totali$		
	Fagiano di monte	Pernice bianca	Coturnice
No prelievo	S.R. < 1	S.R. < 2.5	S.R. < 3
Fino al 10%	1 < S.R. < 1.8	2.5 < S.R. < 3.5	3 < S.R. < 4
10 – 20%	S.R. > 1.8 – 2	S.R. > 3.5	S.R. > 4

La percentuale di prelievo può essere valutata anche calcolando il rapporto tra il numero dei giovani e degli adulti censiti. Questo parametro viene utilizzato prevalentemente per la pernice bianca e per la coturnice, perché in queste specie durante i censimenti è molto difficile distinguere nei gruppi di adulti senza covata le femmine dai maschi e quindi risalire al rapporto tra i giovani e le femmine. Inoltre la determinazione di questo parametro consente di verificare il successo riproduttivo in itinere e, quindi, di confermare se è corretto proseguire con il piano di prelievo (tabella 20).

**Tabella 20:** Regolazione del prelievo in base al successo riproduttivo delle tre specie di Galliformi (Ferloni, 2007).

Gestione del prelievo	S.R. = $N^{\circ} Juv / N^{\circ} Adulti\ totali$		
	Fagiano di monte	Pernice bianca	Coturnice
No prelievo	S.R. < 0.5	S.R. < 1.25	S.R. < 1.5
Fino al 10%	0.5 < S.R. < 0.9	1.25 < S.R. < 1.75	1.5 < S.R. < 2
10 – 20%	S.R. > 1	S.R. > 1.75 – 2	S.R. > 2

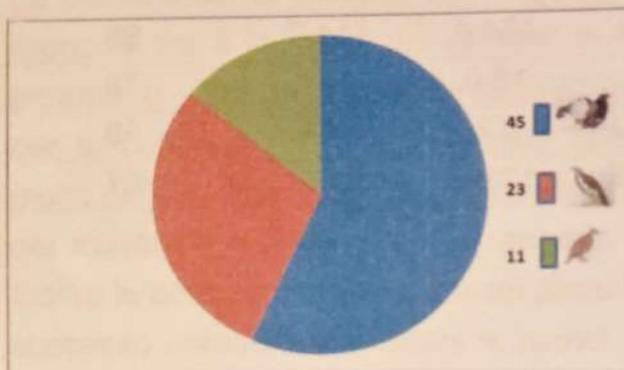
## Entità del prelievo (tabella 21)

**Tabella 21:** Numero di capi previsti dal piano di prelievo, numero di capi prelevati e percentuale di completamento del piano (media 2001-2005) (Ferloni, 2007).

Specie	C.A.	N°capi piano	N°capi prelievo	% completamento
Fagiano di monte	Sondrio	71.0	60.0	85
	Alta Valtellina	16.0	10.8	68
	Tot. provincia	255.0	261.6	85
Pernice bianca	Sondrio	26.0	23	88
	Alta Valtellina	69.0	59.4	86
	Tot. provincia	134.4	114.8	85
Coturnice	Sondrio	16.0	12.4	78
	Alta Valtellina	3.3	1.25	38
	Tot. provincia	121.0	105.8	87

## 1.4 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il campionamento finalizzato alla ricerca in oggetto è stato ottenuto tramite l'ausilio dei piani di prelievo della provincia di Sondrio nei comprensori alpini di Sondrio e dell'Alta Valtellina nei confronti di *Tetrao tetrix*, *Lagopus mutus*, *Alectoris graeca saxatilis* negli anni 2003 e 2004. Il campionamento di origine ha coinvolto sia Galliformi *Phasianidae* con il 13.9% sia Galliformi *Tetraonidae* con il 87.1%. Il campionamento totale è stato di 79 soggetti suddivisi per specie in 45 Fagiani di monte, 23 Pernici bianche e 11 Coturnici (figura 19).



**Figura 19:** Ripartizione per specie del campionamento virologico

I Tamponi cloacali, ottenuti da ciascun soggetto sono stati conservati singolarmente immergendoli in 1 ml di terreno di trasporto costituito da PBS antibiotato e glicerolo e quindi stoccati a -20°C in attesa della processazione.

La struttura del campionamento, suddivisa per numero progressivo di identificazione dei soggetti campionati, classe di età, classe di sesso, periodo, località di cattura e dati biometrici, è a seguito riportata nelle tabelle 22, 23, 24, 25, 26 e 27.

**Tabella 22:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici di *T. tetrix* campionati in provincia di Sondrio nel 2003.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
1	Fagiano di monte	Albosaggia	Camp. Cervè	1950	M	Ad 1	5	-	259	17.5	-	1322
2	Fagiano di monte	Chiuro	Dalico	1750	M	Ad 2+	7	596	260	19.7	227	1295
3	Fagiano di monte	Piateda	Mambretti	2100	M	Ad 2+	7	578	270	16.0	235	1235
4	Fagiano di monte	Albosaggia	Bolveggio	1950	M	Juv.	3	542	248	14.9	187	1115
5	Fagiano di monte	Cedrasco	Val. Cervia	1800	M	Juv.	3	550	244	16.2	200	1220
6	Fagiano di monte	Cedrasco	Val. Cervia	2000	M	Juv.	3	-	257	15.1	201	1100
7	Fagiano di monte	Ponte in V.	Griioni	1950	M	Juv.	3	-	245	15.0	-	1025
8	Fagiano di monte	Ponte in V.	Griioni	1950	M	Juv.	3	577	253	15.7	212	1160
9	Fagiano di monte	Lanzada	Acquanegra	1800	M	Juv.	3	541	244	15.5	205	1011
10	Fagiano di monte	Torre S.M.	Rifugio Bosio	2150	M	Juv.	3	559	261	16.0	220	1200
11	Fagiano di monte	Albosaggia	Punta Piada	2000	M	Juv.	3	555	251	15.6	198	1125
12	Fagiano di monte	Lanzada	Acquanegra	1900	M	Juv.	3	-	245	14.9	-	1090
13	Fagiano di monte	Ponte in V.	Tripolo	2000	M	Ad 2+	7	-	258	17.4	-	1455
14	Fagiano di monte	Albosaggia	Lago Casera	2000	M	Juv.	3	545	255	14.3	194	1035
15	Fagiano di monte	Albosaggia	Portorella	1950	M	Juv.	3	-	245	15.3	217	1210

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
16	Fagiano di monte	Ponte in V.	Piulu	1900	M	Juv	3	561	244	15.7	221	1165
17	Fagiano di monte	Piateda	Cigola	2200	M	Ad 1	5	617	253	16.2	257	1280
18	Fagiano di monte	Caiolo	B. Scoltador	2000	M	Juv	3	552	261	14.6	201	1260
19	Fagiano di monte	Albosaggia	Lago Casera	2000	M	Juv	3	-	258	14.9	-	1215
20	Fagiano di monte	Chiesa V.	Fora	2000	M	Juv	3	571	242	14.3	205	1080
21	Fagiano di monte	Albosaggia	Bolveggio	2100	M	Ad 1	5	602	262	15.6	237	1280
22	Fagiano di monte	Torre S.M.	Canale	2000	M	Juv	3	597	248	14.7	231	1100
23	Fagiano di monte	Torre S.M.	Canale	2000	M	Juv	3	564	250	15.4	221	1105
24	Fagiano di monte	Piateda	Scais	1850	M	Ad 1	5	602	260	15.7	239	1305
25	Fagiano di monte	Castione	Monte Rolla	1900	M	Juv	3	576	259	15.2	225	1170
26	Fagiano di monte	Montagna	Laserè Mara	2000	M	Juv	3	572	245	15.3	223	1070
27	Fagiano di monte	Ponte in V.	Griani	1700	M	Juv	3	567	253	15.8	210	1160
28	Fagiano di monte	Castione A.	Bocchetta	1950	M	Juv	3	556	256	14.9	199	1070
29	Fagiano di monte	Torre S.M.	Rifugio Bosio	2000	M	Ad 1	5	619	258	15.8	260	1275
30	Fagiano di monte	Torre S.M.	Canale	2100	M	Ad 2+	7	622	258	14.9	275	1240
31	Fagiano di monte	Chiuro	Dalico	2000	M	Ad 1	5	587	261	14.9	236	1240
32	Fagiano di monte	Lanzada	Rif. Cristina	2100	M	Ad 1	5	630	260	11.8	255	1300
33	Fagiano di monte	Montagna	Mara	2000	M	Juv	3	558	248	15.9	209	1115

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
34	Fagiano di monte	Albosaggia	La Piada	1900	M	Juv	3	579	250	15.1	230	1020
35	Fagiano di monte	Piateda	Bolveggio	2000	M	Ad 1	5	597	260	15.4	245	1235
36	Fagiano di monte	Piateda	Bolveggio	2200	M	Juv	3	579	251	15.6	219	1105
37	Fagiano di monte	Dalico	Chiuro	1900	M	Juv	3	568	252	15.7	219	1215
38	Fagiano di monte	Livigno	-	-	M	Ad 2+	7	-	-	-	-	-

**Legenda:**

**Classe d'età:** - Juv = giovane; - Ad 1 = adulto di un anno; - Ad 2+ = adulto da 2 anni in su.

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso; 5 = 11° anno, nato nell'ultimo anno trascorso; 7 = nato da due anni prima, ma data non nota;

**Lunghezza totale:** distanza dall'apice del becco all'apice delle timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza dall'articolazione carpale e l'apice della remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becco;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

**Tabella 23:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici di *L. mutus* campionati in provincia di Sondrio nel 2003.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
39	Pernice bianca	Chiesa V.	Longoni	2750	M	Ad	4	380	210	9.0	137	1322
40	Pernice bianca	Chiesa V.	Scerscen	2800	M	Ad	4	382	202	10.8	148	1295
41	Pernice bianca	Chiuro	F.V.Togno	2600	F	Ad	4	361	193	9.6	133	1235
42	Pernice bianca	Chiesa V.	P.Tremoggia	3000	F	Ad	4	360	178	8.4	119	1115
43	Pernice bianca	Montagna	F.V.Togno	2700	M	Juv	3	-	198	9.8	-	1220
44	Pernice bianca	Montagna	F.V.Togno	2700	F	Juv	3	348	196	9.1	127	1100
45	Pernice bianca	Chiesa V.	Scerscen	2800	F	Juv	3	344	185	9.2	127	1025
46	Pernice bianca	Livigno	-	-	F	Ad	4	-	-	-	-	-
47	Pernice bianca	Livigno	-	-	M	Ad	4	-	-	-	-	-
48	Pernice bianca	Livigno	-	-	M	Ad	4	-	-	-	-	-
49	Pernice bianca	Livigno	-	-	M	Juv	3	-	-	-	-	-

**Legenda:**

**Classe D'età:** - *Juv* = giovane; - *Ad* = adulto;

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso; 4 = *Ad.* di un anno certo, ma data non nota;

**Lungh. Tot.:** distanza apice becco ad apice timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza tra articolazione carpale e apice remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becco;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione nella pelle delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

**Tabella 24:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici di *A. graeca* campionati in provincia di Sondrio nel 2003.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Eunning)	Lungh. Tot. (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Tarso (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
50	Coturnice	Lanzada	C. Francia	1700	F	Juv	3	348	156	9.0	52.7	95	460
51	Coturnice	Lanzada	C. Francia	1850	F	Juv	3	331	157	10.8	52.0	94	515
52	Coturnice	Piateda	Ambria	1500	F	Juv	3	349	157	9.6	54.6	96	555
53	Coturnice	Piateda	C. Bianca	1400	Ind.	Juv	3	350	169	8.4	58.4	98	595
54	Coturnice	Piateda	Bolveggio	1800	Ind.	Juv	3	359	163	9.8	56.8	101	595
55	Coturnice	Montagna	Mara	2000	M	Juv	3	367	168	9.1	57.5	97	605

**Legenda:**

**Classe d'età:** - Juv = giovane; - Ad 1 = adulto di un anno;

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso;

**Lunghezza Totale:** distanza dall'apice del becco all'apice delle timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza dall'articolazione carpale e l'apice della remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becco;

**Tarso:** distanza dall'articolazione inter-tarsale e l'articolazione del dito;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

**Tabella 25:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici di *T. tetrrix* campionati in provincia di Sondrio nel 2004.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
56	Fagiano di monte	Albosaggia	Lago Casera	2000	M	Juv	3	-	256	14.6	-	1150
57	Fagiano di monte	Albosaggia	Lago Casera	2000	M	Ad 2+	7	625	264	16.7	-	1375
58	Fagiano di monte	Lanzada	Musella	1900	M	Ad 1	5	618	257	16.7	-	1280
59	Fagiano di monte	Berbenno	D. Piviana	1800	M	Juv	3	580	248	16.0	-	1130
60	Fagiano di monte	Cedrasco	V. Cervia	2000	M	Ad 2+	7	-	258	16.2	-	1399
61	Fagiano di monte	Caspoggio	Acuanegra	2000	M	Ad 1	5	610	270	15.8	-	1270
62	Fagiano di monte	Livigno	-	-	M	Ad 1	5	-	-	-	-	-

**Legenda:**

**Classe d'età:** - *Juv* = giovane; - *Ad 1* = adulto di un anno; - *Ad 2+* = adulto da 2 anni in su.

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso; 5 = 11° anno, nato nell'ultimo anno trascorso; 7 = nato da due anni prima, ma data non nota;

**Lunghezza totale:** distanza dall'apice del becco all'apice delle timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza dall'articolazione carpale e l'apice della remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becca;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

**Tabella 26:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici di *L. mutus* campionati in provincia di Sondrio nel 2004.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lung. Tot (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
63	Pernice bianca	Chiesa V.	Muretto	2600	F	Juv	3	346	190	8.8	119	400
64	Pernice bianca	Chiesa V.	Tremoggia	2900	F	Juv	3	350	189	9.5	125	420
65	Pernice bianca	Chiesa V.	Tremoggia	2900	F	Ad.	4	367	187	10.1	119	455
66	Pernice bianca	Chiesa V.	Muretto	2700	F	Juv	3	346	185	9.3	118	355
67	Pernice bianca	Chiesa V.	Muretto	2700	F	Ad	4	364	191	10-3	116	445
68	Pernice bianca	Chiuro	Cederna	2500	M	Ad	4	377	196	10.4	130	455
69	Pernice bianca	Chiuro	Cederna	2500	M	Juv	3	380	197	9.2	125	445
70	Pernice bianca	Chiuro	Saline	2600	M	Ad	4	381	197	10.6	-	458
71	Pernice bianca	Chiuro	Saline	2600	M	Juv	3	340	181	9.2	105	369
72	Pernice bianca	Chiuro	Saline	2600	M	Ad	4	375	195	10	130	440
73	Pernice bianca	Chiuro	Cederna	2500	F	Juv	3	369	184	10.2	110	426
74	Pernice bianca	Chiuro	Cederna	2700	M	Ad	4	374	200	10.1	132	479

**Legenda:**

**Classe D'età:** - Juv = giovane; - Ad = adulto;

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso; 4 = Ad. di un anno certo, ma data non nota;

**Lungh. Tot.:** distanza apice becco ad apice timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza tra articolazione carpale e apice remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becco;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione nella pelle delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

**Tabella 27:** Elenco progressivo, località di prelievo e dati biometrici dei campioni di *A. graeca* campionati in provincia di Sondrio nel 2004.

N°	Specie	Comune	Località	Altitudine (m s.l.m.)	Sesso	Classe d'età	Codice età (Euring)	Lungh. Tot. (mm)	Ala (mm)	Becco (mm)	Tarso (mm)	Coda (mm)	Peso (gr)
75	Coturnice	Piateda	Venina	2300	M	Juv	3	-	168	12.5	56.4	-	570
76	Coturnice	Torre S.M.	A. Mastabbia	2200	F	Ad	4	340	155	12.8	51.6	99	548
77	Coturnice	Torre S.M.	A. Canale	2300	F	Juv	3	352	161	11.6	56.3	94	612
78	Coturnice	Piateda	Agneda	1600	M	Ad	4	369	171	12.7	59.2	130	689
79	Coturnice	Piateda	Scais	2200	IM	Juv	3	341	158	12.9	55.0	94	485

**Legenda:**

**Classe d'età:** - *Juv* = giovane; - *Ad 1* = adulto di un anno;

**Codice età (European Union for Bird Ringing):** 3 = 1° anno, nato nella stagione in corso; 4 = *Ad.* di un anno certo, ma data non nota;

**Lunghezza Totale:** distanza dall'apice del becco all'apice delle timoniere più lunghe;

**Ala:** distanza dall'articolazione carpale e l'apice della remigante primaria più lunga;

**Becco:** distanza dal limite anteriore della narice all'apice della becco;

**Tarso:** distanza dall'articolazione inter-tarsale e l'articolazione del dito;

**Coda:** distanza dal punto di inserzione delle timoniere centrali all'apice delle timoniere più lunghe.

### Estrazione RNA virale

Il giorno precedente a quello dell'estrazione dell'RNA virale, sotto cappa *biohazard* classe A II (Asalair Atlantic 1500) con flusso acceso, sono stati preparati i *pool* dei campioni cloacali.

Da ciascun campione, precedentemente vortexato, sono stati prelevati, con una P200 con puntali sterili con filtro, 40  $\mu$ l di tampone cloacale e sono stati trasferiti in eppendorf sterili da 1.5 ml, per ottenere un volume finale di almeno 140  $\mu$ l, come richiesto dalla metodica di estrazione (figura 20).

In questo modo i 79 tamponi cloacali sono stati suddivisi in 15 *pool* da 5 campioni e in 1 da 4, contenenti rispettivamente 200  $\mu$ l e 160  $\mu$ l (tabella 28).



Figura 20: Preparazione dei 16 pool.

**Tabella 28:** Suddivisione dei campioni cloacali in pool

Numero progressivo dei pool	Campioni corrispondenti cloacali
1	1, 2, 7, 8, 9
2	3, 4, 5, 6, 38
3	10, 11, 12, 39, 46,
4	13, 14, 15, 40, 47
5	15, 17, 18, 41, 42
6	19, 20, 21, 43, 44
7	22, 23, 24, 25, 48
8	26, 27, 28, 45, 49
9	29, 30, 31, 32, 33
10	34, 35, 36, 37, 50
11	51, 52, 53, 54, 54
12	56, 57, 58, 62, 63
13	64, 65, 66, 67, 75
14	59, 68, 69, 70, 76
15	60, 71, 72, 73, 74
16	61, 77, 78, 79

Inoltre sono state allestite una eppendorf con 150  $\mu$ l di controllo negativo (bianco di estrazione) e una con 150  $\mu$ l a costituire il controllo positivo (A/ *Mallard/Italy/* Unibo 49 MO/05 LPAIV H5N1).

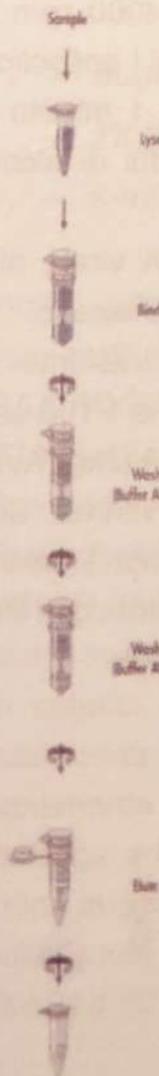
L'estrazione dell'RNA virale è stata eseguita utilizzando il kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

La scatola di estrazione contiene:

- alcool etilico 100%
- buffer AVL
- buffer AVE
- aliquota di buffer AW1
- aliquota di buffer AW2
- colonnine di estrazione (QIAamp Mini Spin Column)
- *collection tube*.

Con una P1000 con puntali sterili con filtro sono stati prelevati 560  $\mu$ l del buffer AVL, contenente il carrier RNA, e sono stati inseriti ad ogni eppendorf da 1.5 ml. Il carrier RNA viene utilizzato per migliorare il legame dell'RNA virale alla membrana della QIAamp Mini Spin Column, specialmente quando nei campioni sono presenti poche tracce di RNA virale. Inoltre viene addizionato per ridurre la probabilità di degradazione dell'RNA virale in presenza di eventuali RNAsi. Quindi se il buffer AVL non contenesse il *carrier* RNA, si andrebbe a ridurre la quota di RNA virale recuperato. In seguito sono stati aggiunti 140  $\mu$ l di campione prelevato da ciascun pool, utilizzando una P200 con puntali sterili con filtro.

QIAamp Viral RNA  
Mini Spin Procedure



Le eppendorf, così allestite, sono state vortexate per circa 15 secondi poiché, per ottenere un'efficiente lisi cellulare è essenziale che il campione sia perfettamente miscelato al Buffer AVL. Successivamente sono state lasciate a temperatura ambiente (15-25°C) per 10 minuti, in modo tale da avere una lisi completa delle particelle virali (figura 21).

Dopo è stata centrifugata ogni eppendorf per 1 minuto a 2000 rpm a 20°C per favorire il distacco di eventuali gocce dal tappo. Con una P1000 con puntale sterile con filtro, sono stati aggiunti 560  $\mu$ l di etanolo al 100% nelle eppendorf con il campione. Ogni campione è stato vortexato per 15 secondi ed è stato centrifugato per 1 minuto a 2000 rpm a 20°C. È infatti essenziale che il campione sia mescolato con cura all'etanolo, ottenendo così una soluzione omogenea.

Dopo, dalla soluzione centrifugata, con una P1000 con puntale sterile con filtro, sono stati prelevati 630  $\mu$ l e inseriti nella provetta con colonnina (QIAamp Mini Spin Column), che è stata centrifugata per 1 minuto a 8000 rpm a 20°C.

**Figura 21:** Rappresentazione schematica dei passaggi dell'estrazione dell'RNA virale.

Successivamente è stato eliminato il filtrato svuotando il *collection tube* ed è stata reinserita la colonnina. Inoltre sono stati aggiunti 630  $\mu$ l della soluzione precedentemente centrifugata e nuovamente sottoposti alla centrifugazione per un minuto a 8000 rpm a 20°C. Infine sono stati eliminati i *collection tubes* contenenti il filtrato e le colonnine sono state trasferite in un nuovo *collection tube*.

Questi passaggi sono stati effettuati per favorire il deposito e il legame dell'RNA virale alla membrana delle QIAamp Mini column. A questo punto sono stati aggiunti 500  $\mu$ l di aliquota di buffer AW1 e, dopo aver centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm a 20°C, è stato scartato il *collection tube* con il filtrato e sostituito con uno nuovo. Sono stati addizionati altri 500  $\mu$ l di aliquota buffer AW2 e sono stati sottoposti ad ulteriore centrifugazione per 3 minuti a 14000 rpm a 20°C. Anche in questo caso sono stati eliminati e sostituiti i *collection tubes* e le colonnine venivano centrifugate a vuoto per 1 minuto a 14000 rpm per favorire l'eliminazione di eventuali residui di alcool etilico al 100%.

Tutti questi passaggi hanno favorito il legame dell'RNA virale alla membrana della colonnina di estrazione e il lavaggio dello stesso. Dopo l'eliminazione dei *collection tubes*, sono state trasferite le colonnine in eppendorf sterili da 1.5 ml. A queste, con una P100 con puntali sterili con filtro, sono stati aggiunti 50  $\mu$ l di buffer AVE, depositandolo in vicinanza della membrana per favorirne una distribuzione uniforme. Per ultimo, dopo centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm a 20°C, veniva eliminata la colonnina e il filtrato con RNA virale conservato a +4°C per la successiva amplificazione.

## Amplificazione virale

L' RNA virale è stato amplificato mediante la tecnica della RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*).

Per l'amplificazione è stato impiegato il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen).

La metodica di tipo one-step RT-PCR consente di ottenere in un unico passaggio sia la retro-trascrizione dell'RNA che permette la sintesi di DNA complementare (DNAC), sia l'amplificazione del DNAC tramite una metodica di pcr tradizionale.

Il kit, che deve essere conservato a -20°C, fornisce:

- SuperScript™ III/ Platinum® Taq Mix
- 2X Reaction Mix
- 5-mM di solfato di magnesio (MgSO<sub>4</sub>)

Inoltre per l'amplificazione sono stati utilizzati come *primer* le sequenze oligonucleotidiche M52C (5'-CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG-3') e M253R (5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA-3') (Fouchier *et al*, 2000).

Per ciascun campione sono necessari 7.5 µl di buffer 2x, 0.3 µl di Taq polymerase, 0.3 µl di *primer* M52C (0.5 µM) e 0,3 µl di *primer* M253R (0.5 µM), quindi, un totale di 8.4 µl di *master mix* aggiunti in una provetta sterile da 0.2 ml.

In seguito, con una P200 con puntali sterili con filtro, sono stati addizionati 6.6 µl di RNA virale estratto, tranne nella provetta contenente il bianco di *mix*, dove sono stati aggiunti 6.6 µl di acqua distillata ed autoclavata (*Nuclease-free Water*- Qiagen). In questo modo in ogni provetta si è raggiunto il volume finale di 15 µl.

Infine tutti i campioni sono stati trasferiti nel termociclatore (BioRad\_iCycler Thermal Cycler).

Il programma prevede:

Sintesi DNA complementare:	45°C x 30 min	
Denaturazione iniziale:	94°C x 2 min	
Denaturazione:	94°C x 45 sec	} 40 cicli
Appaiamento:	55°C x 45 sec	
Estensione:	72°C x 45 sec	
Estensione finale:	72°C x 7 min	

Infine i campioni rimangono all'interno del termociclatore a 15°C per l'immediato utilizzo.

Nella prima fase è stata ottenuta la retro-trascrizione dell'RNA virale e la sintesi del filamento complementare di DNA. Successivamente la reazione prevede il ripetersi di cicli di amplificazione, durante i quali si ottiene la denaturazione della doppia elica del DNA in due singole eliche, l'appaiamento delle sequenze oligonucleotiche dei *primers* alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari, ed infine, l'estensione del filamento ad opera della DNA polimerasi, che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo.

### **Elettroforesi**

Inizialmente è stato allestito un gel di agarosio al 2% con GelRed™ Nucleic Acid gel Stain, 10000 in Water (Biotium).

In ogni pozzetto, inoltre, sono stati caricati 5 µl di amplificato e 1 µl di Gel Loading Dye Blue (BioLabs) (figura 22). Unitamente agli amplificati veniva inserito come riferimento lo standard 100 bp DNA

Ladder (BioLabs) ( $1 \mu\text{l}$ ), che consente di visualizzare da 100 paia di basi a 1517 paia di basi.

Infine veniva impostata una tensione di 100 V per 400 mA e la corsa avveniva in 25 minuti.



**Figura 22:** Caricamento dell'amplificato nei pozzetti del gel prima dell'elettroforesi.

L'indagine molecolare svolta sui 45 tamponi cloacali campionati da Fagiano di monte (*Tetrao tetrix*) non ha evidenziato la presenza di RNA virale, così come non sono state evidenziate positività nell'altra famiglia di *Tetraonidae* costituita dalla Pernice Bianca (*Lagopus mutus*), i cui 23 tamponi cloacali sono risultati RT-PCR negativi nei confronti delle porzioni conservate del genoma degli Influenza virus di tipo A. Analogamente la Coturnice delle Alpi (*Alectoris graeca saxatilis*), galliforme *Phasianidae* testato con 11 soggetti nella stessa area di studio, non ha dimostrato evidenze di circolazione dei patogeni oggetto della ricerca (figura 23).

**Legenda:**

**B.E.:** bianco di estrazione;

**Ctrl +:** controllo positivo;

**B.M.:** Bianco di *mix*;

**L.:** 100 bp DNA Ladder.

**Figura 23:** Tracciato elettroforetico ottenuto.

L'indagine svolta ha occupato un periodo di campionamento di circa due mesi concentrandosi nel periodo post-riproduttivo delle tre specie esaminate. Tale momento nelle specie serbatoio è ritenuto essere quello di massima circolazione virale (Hinshaw *et al.*, 1980), in quanto nel periodo post riproduttivo coincidono sia il calo di immunità passiva che i giovani hanno acquisito dai soggetti adulti, sia la condizione di gregarietà che mantiene gli stessi all'interno dei gruppi familiari di origine, favorendo il maggior contatto tra gli individui della brigata e quindi un potenziale maggiore di circolazione dell'agente eziologico. Ulteriore elemento che rafforza la scelta dell'indagine molecolare è costituito dal tempo di *shedding* evidenziato nella famiglia dei fasianidi, dove l'eliminazione virale può prolungarsi fino a 45 giorni post infezione (Humberd *et al.*, 2007). Tale dato applicato al nostro campionamento copre una finestra temporale sufficientemente ampia da consentire di escludere la presenza di circolazione virale all'interno delle popolazioni oggetto di studio nel periodo compreso tra settembre e dicembre 2003 e 2004. Questo risultato permette di non attribuire un ruolo ecologico attivo nel mantenimento e/o circolazione di virus influenzali nei Galliformi selvatici di alta quota dell'arco alpino ed in maggior dettaglio nel fagiano di monte, dove i 45 campioni esaminati, attribuibili per un 60% alla classe di età dei giovani dell'anno (*Euring code 3*) e quindi di massima suscettibilità, non presentavano comunque elementi di circolazione virale. Nella pernice bianca la prevalenza percentuale dei soggetti giovani all'interno del campione era del 43%. Tale dato oltre a confermare l'assenza della circolazione virale evidenzia una destrutturazione della piramide della popolazione alla cui base stanno venendo a mancare individui giovani per motivi non condizionati dalla presenza di agenti patologici, quali quelli investigati.

Analogamente a quanto osservato nel fagiano di monte, nonostante l'elevata prevalenza di soggetti giovani nel campione esaminato (82%) si confermava anche per la coturnice delle Alpi l'assenza di circolazione virale virologicamente dimostrabile.

Una considerazione ulteriore deriva dai dati di quota altimetrica in cui sono stati ottenuti i campioni. Le tre specie oggetto di ricerca erano campionate in quote variabili tra il 1400-2300 m s.l.m. nella coturnice, il 1700-2200 m s.l.m. nel fagiano di monte e il 2600-3000 m s.l.m. nella pernice bianca. Tale rilievo geografico evidenzia come solamente il fagiano di monte e la coturnice abbiano una sovrapposizione parziale dell'areale, che comunque non modifica i risultati virologici.

L'assenza di circolazione virale all'interno di tutti e tre i gruppi esaminati apre la porta a considerazioni di tipo conservazionistico riguardanti la tutela delle specie oggetto di ricerca. L'isolamento geografico post-glaciale che ha influito in maniera determinante sulla speciazione dei tre gruppi indagati ne ha ecologicamente condizionato la possibilità di interazione con gruppi di Galliformi comunemente presenti a quote più basse e spesso coinvolti nell'epidemie sostenute da virus influenzali aviari. Tale situazione ambientale ha finito con il determinare in queste popolazioni uno stato di non contatto ecologico con le popolazioni virali oggetto di studio. Nell'area geografica interessata dalla ricerca il fagiano di monte, la pernice bianca e la coturnice dimostrano l'appartenenza a metapopolazioni *naïve* nei confronti degli *Orthomyxovirus* aviari e tale condizione va ad aggiungersi ai fattori di rischio che possono implementare in maniera negativa la variabilità genetica di queste specie. Tra le principali cause di rarefazione prevalentemente dei tetraonidi e subito a seguire della coturnice, molte risultano essere di tipo antropico ed ambientale.

Infatti il deterioramento, la perdita e la frammentazione dell'ambiente in seguito all'abbandono delle tradizionali pratiche agro-silvo-pastorali e ai cambiamenti delle modalità di sfruttamento del territorio da parte dell'uomo, e soprattutto all'intensificazione della silvicoltura e dell'agricoltura sono considerati come cause determinanti per la

diminuzione delle popolazioni dei Galliformi alpini (Storch, 2006).

Altri fattori che contestualmente partecipano alla rarefazione delle specie di Fasianidi e di Tetraonidi sono gli effetti legati alla presenza dell'uomo. Infatti è stato dimostrato come il turismo e le attività svolte all'aria aperta, quali le escursioni e gli sport invernali (Watson e Moss, 2004; Arlettaz *et al.*, 2007; Patthey *et al.*, 2008) sovrapponendosi agli habitat delle tre specie in esame possano rappresentare una seria minaccia per le stesse. Inoltre il disturbo antropico in particolare in inverno e all'inizio della primavera potenzialmente può influire negativamente sul successo riproduttivo (Baines e Richardson, 2007; Warren *et al.*, 2009).

Inoltre tra queste cause, quelle che influiscono maggiormente sono le modificate condizioni termiche del pianeta e il conseguente arretramento dei nevai perenni e dei ghiacciai. Questa nuova recente condizione non fornisce un tempo evolutivo sufficiente da consentire a specie strettamente legate alla temperatura e al colore di fondo dei territori di adattarsi in tempo utile alla nuova condizione (Ludwig *et al.*, 2006). Tale stato ripropone in chiave attuale quanto già osservato nel periodo industriale della storia moderna per la farfalla *Biston betularius* e viene enfatizzato da quanto osservato nel campionamento tenuto nella pernice bianca, dove il numero degli adulti (57%) superava numericamente quello dei giovani (43%). Tale elemento riferito ad una popolazione a strategia R è prognostico di un insufficiente *turn-over* dei giovani rispetto agli adulti avvenuto in tempi recenti e se protratto nel tempo può indurre molto velocemente un collasso numerico della popolazione. L'omogeneità genetica che deriva da tale situazione è attribuibile alla riproduzione di individui superstiti presenti in piccoli nuclei sul territorio e può esitare in breve tempo nell'incremento del livello di *inbreeding* delle popolazioni stesse (Höglund *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 2008). Questa condizione genetica protratta nel tempo viene definita come collo di bottiglia di una popolazione e prelude all'estinzione della stessa, in quanto sono sufficienti piccole variazioni negative applicate alle specie (incluse ingresso di nuovi patogeni) per portare la popolazione al di sotto della dimensione minima vitale (Höglund *et*

al.,2007). Risulta evidente a questo punto come popolazioni *naïve*, quali quelle del fagiano di monte, pernice bianca e coturnice risultino essere particolarmente a rischio, qualora vengano immesse in queste, individui portatori di patologie trasmissibili potenzialmente letali per la specie (Bertran et al., 2011). L'elevata gregarietà stagionale unitamente alla forte coesione dei gruppi favorisce l'interazione fra soggetti appartenenti allo stesso genere allevati in cattività e successivamente introdotti in natura. Ne consegue un'estrema attenzione sanitaria e genetica che dovrebbe essere applicata ad ogni singola interazione che preveda movimentazioni e rilasci all'interno dello stesso ecosistema di soggetti allevati dall'uomo, pena la totale estinzione della specie selvatica.

## BIBLIOGRAFIA

- Arlettaz R., Patthey P., Baltic M., Leu T., Schaub M., Palme R., Jenni-Eiermann S., (2007) – Spreading free-riding snow sports represent a novel serious threat for wildlife. *Proceedings of the Royal Society B.* 274: 1219-1224.
- Baines D., Richardson M. (2007) – An experimental assessment of the potential effects of human disturbance on Black Grouse *Tetrao tetrix* in the North Pennines, England. *Ibis.* 149, (Suppl. 1): 56-44.
- Baum L.G., Paulson J.C. (1991) – The N2 neuraminidase of human influenza virus has acquired a substrate specificity complementary to the hemagglutinin receptor specificity. *Virology.* **180**: 10-15.
- Bertran K., Pérez-Ramírez E., Busquets N., Dolz R., Ramis A., Darji A., Abad F. X., Valle R., Chaves A., Vergara-Alert J., Barral M., Höfle U., Majó N. (2011) – Pathogenesis and transmissibility of highly (H7N1) and low (H7N9) pathogenic avian influenza virus infection in red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Veterinary research.* 42, **24**: 1-9.
- Boev Z. (2002) – Tetraonidae VIGORS, 1825 (Galliformes-Aves) in the Neogene-Quaternary record of Bulgaria and the origin and evolution of the family. *Acta zoologica Cracoviensia.* 45 (special issue): 263-282.
- Bonaduce A., Iovane G., Martone F. (1986) – L'influenza aviaria. *Acta Medica Veterinaria.* 32: 143-288.
- Bosch F.X., Orlich M., Klenk H.D., Rott R. (1979) – The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology.* 95: 197-207.

- *Bosch F.X., Garten W., Klenk H.D., Rott R. (1981) – Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. Virology. 113: 725-735.*
- *Brichetti P., Fracasso G. (2004) – Ornitologia italiana Vol.II° Tetraonidae-Scolopacidae. Identificazione, distribuzione, consistenza e movimenti degli uccelli italiani. Alberto Perdisa Editore, Bologna.*
- *Brown I.H., Alexander D.J. (1998) – Influenza. In: Zoonoses. Biology, clinical practice and public health control. Palmer S.R., Soulsby L., Simpson D.H.I. (Eds). Oxford University Press, Oxford.*
- *Brown J.D., Swayne D.E., Cooper R.J., Burns R.E., Stallknecht D.E. (2007) – Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. Avian Diseases. 51: 285- 289.*
- *Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. (1994) – Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. Nature. 371: 37-43.*
- *Capua I., Grossele B., Bertoli E., Cordioli P. (2000) – Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild bird in Italy. Veterinary Record. 147, 22: 640 (Abstr).*
- *CEE (1992) – Direttiva 92/40/CEE del Consiglio del 19 maggio 1992 che istituisce delle misure comunitarie di lotta contro l'influenza aviaria. G.U. seconda serie speciale n. 69 del 3/9/1992.*
- *Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C. (1994) – Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. Virology. 205: 17-23.*
- *De Franceschi P. (1992) – Pernice bianca, 708-721; Fagiano*

di monte, 721-739, In: Fauna D'Italia Aves.1 Gaviidae-Phasianidae. Brichetti P., De Franceschi P., Bacetti N. (eds) Ed I, Vol.XXIX. Edizioni Calderini, Bologna.

- *De Franceschi P.* (1984) – Le fluttuazioni delle popolazioni di TETRAONIDI in una zona delle alpi orientali. U. N. C. Z. A., Vicenza.
- *De Juana E.* (1994) – Family TETRAONIDAE (GROUSE) 376-410, In Handbook of the Bird of the World del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. (eds) Vol.II° New World Vultures to Guineafowl. Lyns Edicions, Barcelona.
- *De Marco M.A., Guberti V., Raffini E., Foni E., Delogu M., Donatelli I.* (1999) – Influenza aviaria: indagini epidemiologiche in specie selvatiche. La Selezione Veterinaria. 12: 897-907.
- *De Marco M.A., Foni G.E., Campitelli L., Raffini E., Di Trani L., Delogu M., Guberti V., Barigazzi G., Donatelli I.* (2003a) – Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. Avian Diseases. **47**: 861-866.
- *De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Delogu M., Donatelli I.* (2003b) – Long-term Monitoring for Avian Influenza Viruses in Wild Bird Species in Italy. Veterinary Research Communications. 27, **Suppl.1**: 107-114.
- *Delogu M., De Marco M.A., Donatelli I., Campitelli L., Catelli E.* (2003) – Ecological Aspects of Influenza A Virus Circulation in Wild Birds of the Western Palearctic. Veterinary Research Communications. 27, **Suppl.1**: 101-106.
- *Delogu M., De Marco M.A., Donatelli I.* (2006) – Il melting pot virale è sul pelo dell'acqua. Darwin. **11**: 84-91.

- *Delogu M, De Marco M.A., Di Trani L., Raffini E., Cotti C., Puzelli S., Ostanello F., Webster R.G., Cassone A., Donatelli I. (2010) – Can Preening Contribute to Influenza A Virus Infection in Wild Waterbirds?. PLoS ONE. 5, 6: e11315.*
- *Easterday B.C., Hinshaw V.S., Halvorson D.A. (1997) – Influenza. 651-675. In: Diseases of Poultry. Calnek B.W., Barnes H.Y., Beard C.W., McDougald L.R., Saif Y.M. (Eds). Iowa State University Press, Ames, USA.*
- *Ferloni M. (2007)- Piano Faunistico venatorio. Provincia di Sondrio. Settore risorse ambientali, Servizio caccia e Pesca.*
- *Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herfst S., Van Der Kemp L, Rimmelzwaan, Osterhaus A.D.M.E. (2000) – Detection of Influenza A Virus from Different Species by PCR Amplification of Conserved sequences in the Matrix Gene. Journal of Clinical Microbiology. 38, 11: 4096-4101.*
- *Fouchier R.A.M., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D.M.E. (2005) – Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. Journal of Virology. 79, 5: 2814-2822.*
- *Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S., Levy D.E., Durbin J.E., Palese P., Muster T. (1998) – Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology. 252: 324-330.*
- *Gatto M., Paris G., Ranci Ortigosa G., Scherini G. (2003) – Metodi quantitativi per la gestione della fauna selvatica. Journal of mountain. 7.(Suppl.): 17-26.*
- *Germundsson A., Madslie K., Hjortaas M.J., Handeland K., Jonassen C.M. (2010) – Prevalence and subtypes of influenza A viruses in wild waterfowl in Norway 2006-2007. Acta*

- *Gorman O.T., Bean W.J., Kawaoka Y., Donatelli I., Guo I., Webster R.G. (1991)* – Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *Journal of Virology*. 65: 3704-3714.
- *Goto H., Kawaoka Y. (1998)* – A novel mechanism for the acquisition of virulence by human influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 10224-10228.
- *Halvorson D.A., Karunakaran D., Senne D., Kellener C., Bailey C., Abraham A., Hinshaw V., Newman J. (1983)* – Simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Disease*. 27: 77-85.
- *Hinshaw V.S., Webster R.G. (1980)* – The perpetuation of orthomixoviruses and paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Canadian Journal of Microbiology*. 26: 622-629.
- *Höglund J., Baines D., Larsson J.K., Segelbacher G. (2003)* – Population fragmentation and genetic variability in European Black Grouse- a progress report. *Sylvia*. 39 (Suppl.) : 13-23.
- *Höglund J., Larsson J.K., Jansman H.A.H., Segelbacher G. (2007)* – Genetic variability in European black grouse (*Tetrao tetrix*). *Conservation genetics*. 8: 239-243.
- *Horimoto T., Kawaoka Y. (2001)* – Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 14, 1: 129-149.
- *Houser R.E., Heuschele W.P. (1980)* – Evidence of prior infection with influenza A/Texas/77 (H3N2) virus in dogs with clinical parainfluenza. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 44, 4: 396-402.

- *Hoye B.J., Munster V.J., Nishiura H., Klaassen M., Fouchier R.A.M. (2010) – Surveillance of Wild Bird for Avian Influenza Virus. Emerging Infectious Diseases. 16, 12: 1827-1834*
- *Humberd J., Boyd K., Webster R. G. (2007) – Emergence of Influenza A Viral Variant after Prolonged Shedding from Pheasants. Journal of Virology. 81, 8: 4044-4051.*
- *Ito T., Okazaki K., Kawaoka Y., Takada A., Webster R.G., Kida H. (1995) – Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. Archives of Virology. 140: 1163-1172.*
- *Ito T., Couceiro J.S., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y. (1998) – Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. Journal of Virology. 72: 7367-7373.*
- *Kawaoka Y., Chambers T.M., Sladen W.L., Webster R.G. (1988) – Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks?. Virology. 163: 247-250.*
- *Keawcharoen J., Oraveerakul K., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Amonsin A., Payungporn S. Noppornpanth S., Wattanodorn S., Theamboonlers A., Tantilertcharoen R., Pattanarangsarn R., Arya N., Ratanakorn P., Osterhaus A.D.M.E., Poovorawan. (2004) – Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards. Emerging Infectious Diseases. 10, 12: 2189-2191.*
- *Kobasa D., Kodihalli S., Luo M., Castrucci M.R., Donatelli I., Suzuki Y., Suzuki T., Kawaoka Y. (1999) – Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. Journal of Virology. 73: 6743-6751.*
- *Kuiken T., Rimmelzwaan G., Van Riel D., Van Amerongen G., Baars M., Fouchier R., Osterhaus A. (2004) – Avian H5N1 Influenza in Cats. Science Express. 306, 5694: 241.*

- *Larsson J.K., Jansman H.A.H., Segelbacher G., Höglund J.* (2008) – Genetic impoverishment of the last black grouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. *Molecular Ecology*, 17: 1897-1904.
- *Lucchini v., Höglund J., Klaus S., Swenson J., Randi E.* (2001) – Historical Biogeography and a Mitochondrial DNA Phylogeny of Grouse and Ptarmigan. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 1: 149-162.
- *Ludwig G.X., Alatalo R.V., Helle P., Lindén H., Lindström J., Siitari H.* (2006) – Short- and long-term population dynamical consequences of asymmetric climate change in black grouse. *Proceedings of the Royal Society B*, 273: 2009-2016.
- *Martino M.* (2004) – Il Patrimonio dei Tetraonidi e della Cuturnice. Carlo Lorenzini Editore, San Daniele del Friuli (UD).
- *Martino M.* (2007) – Pernici Bianche. Carlo Lorenzini Editore, San Daniele del Friuli (UD).
- *McGowan P.J.K.* (1994) – Family PHASIANIDAE (PHEASANTS AND PARTRIDGES) 434 -549, In: Handbook of the Bird of the World del Hoyo J., Elliott A., Sargatal J. (eds) Vol.II° New World Vultures to Guinea-fowl. Lyns Edicions, Barcelona.
- *Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D.* (1995) – Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. 6<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Wien. Archives of Virology; suppl.10.

- O'Neill R.E., Talon J., Palese P. (1998) – The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO Journal*. **17**: 288-296.
- Ohuchi M., Feldmann A., Ohuchi R., Klenk H.D. (1995) – Neuraminidase is essential for fowl plague virus hemagglutinating to show hamagglutinating activity. *Virology*. **212**: 77-83.
- Osterhaus A.D.M.E, Rimmelzwaan G.F., Martina B.E.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A.M. (2000) – Influenza B virus in Seals. *Science*. **288**: 1051-1053.
- Patthey P., Wirthner S., Signorell N., Arlettaz R. (2008) – Impact of outdoor winter sports on the abundance of a key indicator species of alpine ecosystems. *Journal of Applied Ecology*. **45**: 1704-1711.
- Ponti W. (2005) – Classificazione dei virus e virologia speciale. 423-500 In: Poli G., Cocilovo A, Dall'Ara P., Martino A.M, Ponti W. (Eds.) *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. Ed. II, Vol. I°. UTET, Torino.
- Priolo A., Bocca M. (1992) – Coturnice, 766-777, In: *Fauna D'Italia Aves.1 Gaviidae-Phasianidae*. Brichetti P., De Franceschi P., Bacetti N. (eds) Ed I, Vol.XXIX. Edizioni Calderini, Bologna.
- Randi E., Tabarroni C., Rimondi S., Lucchini V., Sfougaris A. (2003) – Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). *Molecular Ecology*. **12**: 2201-2214.
- Remington T.E. (1989) – Why do Grouse have ceca? A test of the fiber digestion theory. *The Journal of Experimental Zoology supplement*. **Suppl. 3**: 87-94.

- *Röhm C., Zhon N.A., Süss J.C., Mackenzie J., Webster R.G. (1996)* – Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology*. 217: 508-516.
- *Salvini P.G. (1967)* – Tetraonidi e Coturnice. La nobile avifauna delle Alpi italiane. Abitudini e caccia. Ed I, Vol. I°. Editoriale Olimpia, Firenze.
- *Scheiblaue H., Reinacher M., Tashiro M., Rott R. (1992)* – Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *Journal of Infectious Disease*. 166: 783-791.
- *Scholtissek C., Ludwig S., Fitch W.M. (1993)* – Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanism leading to new phylogenetic virus lineages. *Archives of Virology*. 131: 237-250.
- *Sharp G.B.; Kawaoka Y., Jones D.J., Bean W.J., Pryor S.P., Hinshaw V., Webster R.G. (1997)* – Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology*. 71: 6128-6135.
- *Slemons R.D., Easterday B.C. (1972)* – Host response differences among 5 avian species to an influenza virus A/turkey/Ontario/7732/66 (Hav5 N?). *Bulletin of W.H.O.* 47: 521-525.
- *Songserm T., Amonsin A., Jam-on R., Sae-Heng N., Pariyothorn N., Payungporn S., Theamboonlers A., Chutinimitkul S., Thanawongnuwech R., Poovorawan Y. (2006)* – Fatal Avian Influenza A H5N1 in a Dog. *Emerging Infectious diseases*. 12, 11: 1744-1747.
- *Spagnesi M., Serra L. (a cura di) (2004)* – Uccelli d'Italia Quaderni di Conservazione della Natura 21 Ministero Ambiente Istituto Nazionale della fauna selvatica.

- *Stallknecht D.E., Shane S.M. (1988) – Host range of avian influenza virus in free-living birds. Veterinary Research Communications. 12: 125-141.*
- *Stallknecht D.E., Kearney M.T., Shane S.M., Zwank P.J. (1990a) – Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. Avian Diseases. 34: 412-418.*
- *Stallknecht D.E., Shane S.M., Kearney M.T., Zwank P.J. (1990b) – Persistence of avian influenza virus in water. Avian Diseases. 34: 406-411.*
- *Storch I., (2006) – An overview to the conservation status of grouse in Europe. I galliformi alpini. Esperienze europee di conservazione e gestione. 15-22. [http://www.regione.piemonte.it/agri/osserv\\_faun/convegno11\\_06/atti\\_convegno.htm](http://www.regione.piemonte.it/agri/osserv_faun/convegno11_06/atti_convegno.htm) (ultimo accesso 14/03/11)*
- *Storch I. (2007) – Grouse: status Survey and Conservation Action Plan 2006-2010. Gland, Switzerland: IUCN and Fordingbridge, UK: Pheasant Association.*
- *W.H.O. Committee (1980) – A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: A WHO memorandum. Bulletin of WHO. 4, 58: 585-591.*
- *Ward A.C., Castelli I.A., Lucantoni A.C., White J.F., Azad A.A., Macreadie I.G. (1995) – Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus. Archives of Virology. 140: 2067-2073.*
- *Warren P., Baines D., Richardson M. (2009) – Mitigating against the impacts of human disturbance on black grouse *Tetrao tetrix* in northern England. Folia Zoologica. 58, 2: 183-189.*

- *Watson A., Robert M. (2004)* – Impacts of ski-development on ptarmigan (*Lagopus mutus*) at Cairn Gorm, Scotland. *Biological Conservation*. **116**: 267-275.
- *Webby R.J., Webster R.G., Richt J.A. (2007)* – Influenza Viruses in Animal Wildlife Populations. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **305**: 67-83.
- *Webster R.G., Yakhno M., Hinshaw V.S., Bean W.R., Murti K.G. (1978)* – Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. **84**: 268-278.
- *Webster R.G., Reay P.A., Laver W.G. (1988)* – Protection against lethal influenza with neuraminidase. *Virology* **164**: 230-237.
- *Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawakita Y. (1992)* – Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. **56**, **1**: 152-179.
- *Webster R.G. (1997)* – Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. In: Kaaden O.R., Czerny C.P., Eichorn W. (eds). *Viral zoonoses and food of animal origin. A re-evaluation of possible hazards for human health*. *Archives of Virology*. **Suppl. 13**: 105-113, Springer Verlag, Wien.
- *World Health Organization (2000)* – WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases WHO/CDS/CSR/ISR/2000.1  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO\\_Report\\_Infectious\\_Diseases.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_Report_Infectious_Diseases.pdf) (ultimo accesso 14/03/11).
- *Zambon M.C. (2001)* – The pathogenesis of influenza in Humans. *Reviews in Medical Virology*. **11**: 227-241.

- Zebedee S.L., Lamb R.A.(1988) – Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of Virology*. 62: 2762-2772.

## RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo lavoro di tesi vorrei porgere i miei più sentiti ringraziamenti alle persone che ho avuto modo di conoscere in questo lungo cammino.

Un ringraziamento sentito va al mio relatore Dott. Mauro Delogu. La mia stima per lui è dovuta, oltre che alla sua profonda esperienza e conoscenza, alla grande umanità con la quale ha saputo incoraggiarmi in tutti i momenti, spingendomi a capire quali sono le mie passioni, per farne l'obiettivo del mio lavoro futuro.

Ringrazio enormemente la mia correlatrice, la Dott.ssa Claudia Cotti per i suoi pazienti insegnamenti, le risposte a tutti i miei dubbi, il sostegno ed i consigli, senza i quali la tesi non avrebbe prodotto alcun risultato.

Vorrei ringraziare inoltre il Dott. Alessandro Gugiatti, faunista del Comprensorio alpino di Sondrio, per la sua professionalità per avermi fornito i dati del campionamento e materiale indispensabili per la realizzazione della seguente.

Sono certa che non troverò mai le parole giuste per ringraziare i miei genitori e la mia famiglia, però vorrei che questo mio traguardo raggiunto, per quanto possibile, fosse un premio anche per loro e per i sacrifici che hanno fatto.

Non possono mancare da questo elenco di ringraziamenti gli amici di sempre che a volte ho trascurato, ma che sono stati sempre presenti, Caterina e Paolo, e tutti i compagni che ho conosciuto durante l'esperienza universitaria. In particolare, Corinne, Ilaria, Isabella, Letizia, Caterina, Martina e molti altri che sicuramente sto dimenticando.

Ed ora è giunto il momento di ringraziare la persona che negli ultimi anni tra bisticci, litigi, sorrisi e momenti felici mi è stato (e sarà...) sempre accanto... grazie Michele!