



AZIONE A2 Experimental protocol guidelines

**Linee guida e protocollo operativo
per il progetto sperimentale dal titolo
"Valutazione della sicurezza ed
efficacia di un vaccino
immunocontraccettivo monodose per
il controllo di fertilità nella specie
Nutria (Myocastor coypus)."**

SOMMARIO

1. PREMESSA	3
1.1. Il contesto	3
2. Criteri di selezione del campione	4
3. Metodologia e tecnica dell'esperimento:	5

1. Premessa

1.1. Il contesto

La mitigazione dell'impatto della fauna selvatica sulle attività antropiche è stata tradizionalmente condotta attraverso procedure di controllo letale delle popolazioni animali. Ciononostante, un rinnovato interesse dell'opinione pubblica per l'applicazione di metodi di controllo non-letali ha indirizzato la ricerca verso modelli alternativi di gestione dell'impatto della fauna selvatica. Tra questi, il controllo di fertilità condotto con i vaccini immunocontraccettivi, grazie alla facilità di impiego e ai costi di produzione e somministrazione contenuti, sembra offrire la migliore prospettiva e ottenere i migliori consensi per la gestione delle popolazioni di animali selvatici. In particolare, i vaccini immunocontraccettivi anti-gonadotropine GnRH messi a punto dal National Wildlife Research Center negli USA che verranno testati in questo progetto, stimolano una risposta anticorpale che neutralizza il GnRH a livello del sistema portale ipotalamo-ipofisario con conseguente soppressione della secrezione ipofisaria di gonadotropine (FSH e LH) (1). L'attività sessuale di un animale trattato con il vaccino viene sospesa fino a quando la concentrazione degli anticorpi rimane relativamente elevata ed in varie specie di mammiferi (es. cavalli, cervi dalla coda bianca) una singola somministrazione è in grado di causare infertilità nel 90-100% dei soggetti detenuti in cattività, per diversi anni (2, 3). L'esperienza pregressa ed estesa del gruppo (National Wildlife Management Centre, Animal and Plant Health Agency (York, UK) che, previo ottenimento dell'autorizzazione alla sperimentazione, sarà coinvolto nel progetto è testimoniato dalle numerose pubblicazioni scientifiche ad oggi prodotte, relative alla sperimentazione dell'immunovaccino in specie selvatiche sia in cattività sia a vita libera (1, 4-6).

Originalità e interesse dello studio

Nonostante il numero crescente di modelli teorici e di studi empirici sugli effetti del controllo di sterilità sulla dinamica di popolazione in varie specie di fauna selvatica (es. tasso, cervo dalla coda bianca...etc), ad oggi nessun lavoro è stato condotto sulla specie Nutria, il cui controllo prevede esclusivamente l'abbattimento finalizzato all'eradicazione. L'approccio ecologico introdotto con l'immunovaccino potrebbe risultare anche più efficace degli abbattimenti nel ridurre il numero di animali presenti in un'area, giustificando il sempre maggiore interesse per l'uso dei contraccettivi nella gestione dei selvatici (7). Diversi studi hanno infatti mostrato che l'abbattimento può portare a immigrazione, disgregazione sociale ed effettivamente dare luogo ad una maggiore frequenza di contatti in quanto gli animali compiono movimenti a lunga distanza, rioccupando i territori liberati da coloro che sono stati rimossi dalla popolazione. Il controllo della fertilità non chirurgico ha invece meno probabilità di influenzare il comportamento sociale e gli spostamenti degli animali selvatici, dimostrandosi un valido metodo innovativo per la gestione anche di specie invasive, quali la Nutria.

Eventuali ricadute nell'ambito della salute pubblica animale

Qualora il risultato della sperimentazione fosse positivo, l'applicazione in campo di questo

progetto consentirà di approcciare in maniera innovativa e a costi tecnicamente sostenibili la gestione delle specie problematiche, agendo, tra i fattori demografici, principalmente sulla natalità anziché sulla mortalità ed evitandone la soppressione. La messa a punto di questa pratica assicurerebbe una maggiore accettazione sociale, perché associa il controllo demografico al rispetto etico e tecnico del benessere animale. L'utilizzo di questo vaccino immunocontraccettivo permette infatti di intervenire su una specie senza modificarne la struttura sociale o parentale dei gruppi, passaggio estremamente critico se metodiche di controllo demografico vengono applicate a specie fortemente sociali e/o invasive (esotiche introdotte o cosiddette pest species).

Eventuale impatto nel settore economico-industriale

L'applicazione in campo di questo vaccino permetterebbe di ridurre l'impatto della specie Nutria sulle attività antropiche, danni alle colture e alle arginature in primis, rimanendo uno dei pochi metodi poco costosi da produrre e da somministrare in campo e valido dal punto di vista dell'efficacia e del benessere ambientale ed animale, in grado di garantire il controllo di fertilità anche nei casi di popolazioni isolate o di animali la cui gestione non può essere condotta attraverso abbattimenti (es. aree protette).

2. Criteri di selezione del campione

I criteri di inclusione da applicare ai soggetti catturati in natura sono: sesso femminile (12 soggetti), sesso maschile (12 soggetti), maturità sessuale e buono stato di salute. Il sesso viene definito tramite l'osservazione di caratteri sessuali secondari (18, 19): pene, a 5 mm circa dall'area anale, prepuzio e glande del pene per i maschi; orifizio vaginale e papilla prominente nelle femmine. Sono esclusi dallo studio i soggetti non sessati. La maturità sessuale viene definita in base al peso, > 2.1 - 3 kg (20). La pesatura degli animali in campo viene effettuata tramite dinamometro. Lo stato di salute viene verificato con una prima rapida osservazione in sede di cattura e successivamente approfondito sul sito di ricovero. I soggetti inclusi nello studio vengono così ripartiti in 4 gruppi: femmine trattate e controlli (gruppo 1 e gruppo 2); maschi trattati e controlli (gruppo 3 e gruppo 4). I gruppi vengono costituiti in modo da assegnare randomicamente individui di diverso peso tramite il programma R© (R version 3.6.2, 2019).

3. Metodologia e tecnica dell'esperimento:

Lo studio si compone di 3 diverse fasi qui descritte.

3.1 Fase 1: prelievo dei soggetti in natura (durata stimata 2 mesi)

I soggetti vengono prelevati in natura durante le attività di controllo sulla specie Nutria effettuate tramite l'utilizzo di una trappola a cassetta/individuo (trappole atraumatiche). Le dimensioni delle trappole sono conformi a cattura in vivo secondo quanto disposto dal "Piano di gestione nazionale della Nutria" (11), sono dotate di apertura singola o doppia con meccanismo di scatto collegato ad un'esca alimentare e sono munite di una matricola identificativa individuale. Le gabbie-trappola, una volta attivate, sono controllate almeno una volta al giorno. Le catture sono effettuate da personale formato del Consorzio della Bonifica Renana, ente di gestione del bacino di canali in provincia di Bologna e Ferrara da cui verranno prelevati gli animali dello studio. Il trasporto dal sito di cattura al sito di ricovero si svolge tramite gabbie singole dalle dimensioni 80 x 30 x 30 cm (12) e nel rispetto a quanto definito dal Reg. CE 1/2005 sul trasporto di animali vivi. Il viaggio ha una durata stimata di due ore, tempo definito in base alla distanza chilometrica dai siti di cattura al sito di studio (40 km circa) e alle esigenze operative del momento. Sono catturati e trasportati un massimo di 4 individui/die, di modo da velocizzare le operazioni e ridurre lo stress degli stessi. Il sito di studio si trova all'interno del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna, negli spazi di competenza del Servizio di Fauna Selvatica ed Esotica in un'area verde all'aperto.

3.2 Fase 2: prima manipolazione degli animali e quarantena (7 giorni di quarantena, 4 animali per volta)

Il protocollo anestesiológico qui definito viene utilizzato per ciascuna delle operazioni di manipolazione dell'animale previste dallo studio:

- Isoflurano (Vetflurane 1000mg/g fl. 250 ml) erogato tramite vaporizzatore di precisione in concentrazioni con O₂ fino al 5% nella fase di induzione, 1-3% nella fase di mantenimento in base alla profondità desiderata (13). L'anestesia gassosa rappresenta il metodo preferito per il contenimento chimico dei roditori poiché garantisce adeguata ossigenazione e le fasi di induzione e di risveglio sono rapide (14). Essendo le procedure eseguite sull'animale previste da questo studio poco invasive, il grado di profondità dell'anestesia richiesto sarà lieve. Non è eseguito il digiuno prima della somministrazione di isoflurano. Essendo le procedure eseguite sull'animale previste da questo studio poco invasive, l'anestesia sarà poco profonda. Non è necessario il digiuno prima della somministrazione di isoflurano.

Durante l'anestesia c'è un accurato monitoraggio clinico dell'animale condotto da un operatore e scritto in una scheda in cui si riporta: numero dell'individuo; tempo di inizio e di termine dell'erogazione dell'isoflurano; i parametri vitali dell'animale rilevati ogni 5 minuti (frequenza respiratoria, frequenza cardiaca, presenza/assenza di polso periferico a livello metatarsale e concordanza cuore-polso); spO₂ a livello di orecchio ed eventuali note del caso.

In caso di evidenti stati di ansia mostrati dal soggetto manipolato prima dell'anestesia (ipereccitazione, vocalizzi eccessivi, tremori), si somministra un sedativo intramuscolo a livello di muscoli della coscia superiore tramite ago 25G: Midazolam 1-2 mg/kg IM, nei Roditori è considerata una delle benzodiazepine più maneggevoli, con una durata dell'effetto di circa 1 ora

(15).

In caso di anestesia di durata superiore ai 10 minuti, è somministrato per via sottocutanea tramite ago 22G Ringer Lattato 10 ml/kg. Al risveglio, l'animale viene posizionato su un giaciglio e viene monitorato attentamente fino alla completa riacquisizione dello stato di coscienza.

Il giorno 0 della fase 2 (arrivo al ricovero dal sito di cattura) gli individui vengono sottoposti ad anestesia per un primo controllo sanitario da parte del Medico Veterinario e in particolare:

- EOG (Esame Obiettivo Generale) per la valutazione dello stato di salute del soggetto;
- Prelievo di feci per esame coprologico;
- Prelievo di sangue: eseguito dalla vena della coda o dalla vena giugulare tramite ago 23G o 25G a seconda del peso. Viene prelevato un volume pari all'1% del peso vivo dell'animale espresso in kilogrammi (16). Un'aliquota di sangue viene utilizzata per definire la baseline ormonale riproduttiva dell'individuo e un'altra viene eventualmente utilizzata per condurre uno screening degli anticorpi verso specifiche malattie infettive a seconda della situazione epidemiologica e di pregressi studi;
- Ecografia delle femmine: per valutare un eventuale stato di gravidanza precedente e visualizzare ovaie/utero per valutarne la normalità. Gli animali gravidi sono esclusi dallo studio e restituiti al committente.
- Apposizione di microchip retro-nucleare interscapolare tramite iniezione sottocutanea (nanochip 1,4 x 8 mm) e di marca auricolare inamovibile (sull'orecchio destro per le femmine e sinistro per i maschi). La marca auricolare è di piccole dimensioni per evitare eventuali intrappolamenti e mutilazioni ed è utile per l'immediato riconoscimento dei soggetti a distanza (marca auricolare tipo lepre).

Gli animali sono fatti risvegliare all'interno di gabbie individuali poste nell'area di quarantena in cui rimangono per un totale di 7 giorni. Le gabbie individuali sono qui utilizzate per garantire la diretta osservazione degli individui e per eventuali interventi terapeutici blandi richiesti dal Medico Veterinario (es. antiparassitario). Le gabbie sono di dimensioni 140 x 60 x 50 cm (gabbie da roditore per esterno) e sono munite di una "casetta", poggiate a terra e provviste di lettiera di trucioli. Le gabbie vengono posizionate l'una accanto all'altra in modo che i soggetti mantengano il contatto visivo e tattile, per tutelarne il benessere. Durante la quarantena gli animali vengono monitorati 3 volte al dì (mattino, metà giornata, sera). Cibo (mais, verdure, pannocchie) ed acqua potabile sono somministrati tramite l'utilizzo di ciotole metalliche autoclavabili.

3.3 Fase 3: manipolazione a cadenza periodica degli animali nel sito di ricovero collettivo.

Le gabbie individuali vengono spostate all'interno di una delle 4 aree del recinto di ricovero (6 animali/1 area). Ciascuna area è separata dalle altre tramite reti metalliche e teli ombreggianti di modo da limitare il contatto visivo degli animali appartenenti a gruppi diversi. Le gabbie sono lasciate aperte per consentire la spontanea esplorazione e vengono successivamente rimosse. I gruppi (4 in totale) sono così ripartiti:

- gruppo 1: 6 femmine;
- gruppo 2: 6 femmine;
- gruppo 3: 6 maschi;
- gruppo 4: 6 maschi.

Gli animali sono gestiti collettivamente poiché questa è la modalità che più si addice alle abitudini della nutria in natura.

Ciascuna area del recinto di ricovero si compone di due zone:

- zona 1 - “vasca-piscina” necessaria per garantire l'espletarsi delle normali funzioni etologiche del roditore acquatico. Un operatore si occupa della sua pulizia e gestione quotidiana;
- zona 2 - ripari per gli animali di dimensioni adeguate e costituite da lettiera di trucioli; punti di abbeveramento e di cibazione riforniti e puliti quotidianamente e spazio di esplorazione.

Il recinto di ricovero è costruito calcolando uno spazio individuale ai sensi del D. Lgs 26/2014 sezione B tabella 2.1 in riferimento ai requisiti minimi per i conigli di peso superiore ai 5 kg:

- spazio minimo al suolo per uno o due animali socialmente armoniosi: 5400 cm²;
- superficie supplementare al suolo fino al sesto esemplare: 3000 cm²/individuo.

È prevista una base anti-scavo in tutta l'area, posta interrata a 0,5 mt di profondità e costituita da saldatura metallica. Un telo ombreggiante viene collocato lungo tre dei quattro lati di ciascuna area del recinto di ricovero, con siti di ispezione posti all'altezza degli operatori così da evitare la progressiva abituação degli animali alla vista degli operatori. In riferimento all'art. 12 comma 2 del D. Lgs 26/2014, un sito di ricovero così strutturato ha la primaria utilità di ridurre la possibile insorgenza di fattori stressanti di carattere sociale ed ambientale che possano compromettere la fisiologia riproduttiva dell'animale e compromettere i risultati della sperimentazione (17). L'iperattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA – Hypothalamic Pituitary Adrenal axis) nei mammiferi determina infatti un'azione inibitoria nei confronti della fisiologia riproduttiva sia maschile sia femminile.

Fase 3A. Fase di ambientamento e di consolidamento dei 4 gruppi.

Ha una durata di 90 giorni e non prevede alcuna manipolazione degli animali, se non per eventi accidentali (es. ferite, aggressività intraspecifica).

Fase 3B. Somministrazione del vaccino.

In 4 giorni (giorno 91-95) ciascuno dei 24 individui è catturato tramite trappola ad imbuto a-traumatica ed è sottoposto ad anestesia o sedazione più anestesia (protocolli descritti in alto) in base allo stato di agitazione dello stesso. Un operatore somministra:

- 1 ml di GonaCon™ tramite ago 23G nella coscia superiore a 6 femmine (gruppo 1);
- 1 ml di NaCl con le stesse modalità dell'immunovaccino a 6 femmine (gruppo 2);
- 1 ml di GonaCon™ tramite ago 23G nella coscia superiore a 6 maschi (gruppo 3);
- 1 ml di NaCl con le stesse modalità dell'immunovaccino a 6 femmine (gruppo 4).

Ciascun inoculo è trascritto nel registro della sperimentazione con la data, il numero di lotto del vaccino o la soluzione salina, il numero dell'individuo come evidente dalla marca auricolare e il numero di microchip dello stesso.

Fase 3C. I gruppi 1, 2, 3, 4 rimangono in cattività per un totale di 12 mesi dalla somministrazione dell'immunovaccino. Ogni 30 giorni tutti gli animali vengono catturati con imbuto atraumatico, sono sottoposti ad anestesia (protocollo riportato in alto) e sono pesati per valutare la condizione generale di salute. Ciascuna delle femmine (gruppo 1 e gruppo 2) viene sottoposta a:

- prelievo di sangue (1% del peso corporeo totale) secondo i metodi sopra descritti per la valutazione del profilo ormonale (progesterone), degli anticorpi anti-GnRH indotti dal vaccino e per eventuali altre necessità valutate dal Medico Veterinario;
- screening ecografico per la valutazione delle ovaie e dell'utero da correlare alle valutazioni ormonali;

Ciascuno dei maschi (gruppo 3 e gruppo 4) è sottoposto a:

- prelievo di sangue (1% del peso corporeo totale) per valutare i livelli di testosterone e di anticorpi anti-GnRH.

I profili ormonali vengono ottenuti tramite dosaggio radioimmunologico (RIA), i dosaggi anticorpali vengono ottenuti tramite Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) adattato alla specie per la valutazione delle IgG (7, 8).

Lo studio si considera finito al 12° mese dalla somministrazione dell'immunovaccino. Sono calcolati 36 mesi totali per il progetto considerando eventuali ritardi nel reperimento degli animali che rispettino i criteri di inclusione in seguito descritti. Al termine dello studio gli animali vengono restituiti al committente e si valuta la possibilità di re-immettere i soggetti considerati "sterilizzati" in natura, vedesi punto 25.

Considerazioni statistiche:

Il numero di animali totali è stato calcolato considerando il minimo numero possibile per ottenere dati statisticamente significativi. In particolare, tramite l'utilizzo del test di Fisher, si è visto che utilizzando un numero di animali per gruppo pari a 6 la prova risulta essere statisticamente significativa se 1 animale su 6 dei soggetti trattati non risponde alla somministrazione dell'immunovaccino e se 1 animale su 6 dei soggetti di "controllo" non si

riproduce. Non è stata effettuata una power analysis poiché non sono presenti in letteratura studi simili sulla specie di interesse. Il numero di animali coinvolti è stato definito direttamente dall'Animal and Plant Health Agency (York, UK), agenzia sopracitata che supervisionerà il progetto.



LIFE GREEN4BLUE è un progetto finanziato dal
Programma LIFE dell'Unione Europea
LIFE18 NAT/IT/000946



www.lifegreen4blue.eu | [facebook](#) | [twitter](#)

