



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie

Corso di Laurea specialistica a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

Studio sul rischio di una possibile fuoriuscita di *Fascioloides magna* dal Parco

Regionale La Mandria

RELATORE

Prof. Luca Rossi

CANDIDATO

Marco Coraglia

Anno Accademico 2014-2015



Alla mia famiglia

ai miei nonni materni e paterni

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
2. PARTE GENERALE	2
2.1 <i>Caratteristiche F. magna</i>	2
2.1.1 Classificazione.....	2
2.1.2 Morfologia.....	2
2.1.3 Ciclo biologico	5
2.1.4 Ospiti intermedi	8
2.1.5 Ospiti Definitivi.....	9
2.1.6 Distribuzione geografica	11
2.2 <i>Ecologia ed epidemiologia della parassitosi</i>	13
2.2.1 Ecologia dei gasteropodi appartenenti alla famiglia Lymnaeidae.....	13
2.2.2 Epidemiologia <i>F. magna</i> in Nord America	15
2.2.3 Epidemiologia di <i>F. magna</i> in Europa	16
2.3 <i>Patologia e reperti anatomo-patologici</i>	20
2.4 <i>Diagnosi</i>	22
2.5 <i>Gestione farmacologica dell'infestazione nei serbatoi selvatici</i>	24
2.6 <i>La cartografia tematica applicata alla parassitologia</i>	27
2.6.1 Introduzione.....	27
2.6.2 Che cos'è un Sistema Informativo Geografico	27
2.6.3 Rappresentazione dei dati	29
2.6.4 Sistemi di riferimento	29
2.6.5 Funzioni di un sistema GIS	32
2.6.6 Il GIS come strumento per l'epidemiologia.....	33

2.6.5 L'utilizzo di mappe di rischio per la presenza di ospiti intermedi	34
3. CONTESTO GENERALE E SCOPO DEL LAVORO	36
4. MATERIALI/METODI.....	39
4.1 Area di studio	39
4.2 Flora e fauna del Parco	40
4.3 Azione obiettivo 1 - Sorveglianza attiva sui ruminanti selvatici	43
4.4 Azione obiettivo 2 - Sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici	46
4.5 Azione obiettivo 3 - Caratterizzazione dei siti favorevoli alla presenza degli ospiti intermedi di <i>F. magna</i> con produzione di mappe tematiche	47
4.5.1 Valutazione rischio all'interno del Parco Regionale La Mandria	55
4.6 Azione obiettivo 4 - Ricerca delle forme larvali di <i>F. magna</i> negli ospiti intermedi	56
4.7 Azione obiettivo 5 - Monitoraggio mediante videotrappole degli ingressi e delle uscite dal Parco di caprioli ed altri Cervidi recettivi a <i>F. magna</i>	59
4.8 Analisi statistica	61
5. RISULTATI	63
5.1 Risultati sorveglianza attiva su selvatici abbattuti.....	63
5.2 Risultati sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici	64
5.3 Risultati Caratterizzazione dei siti favorevoli alla presenza degli ospiti intermedi di <i>F. magna</i>	68
5.3.1 Variabili campionate	78
5.3.2 Valutazione rischio traParco La Mandria e pre-parco.....	93
5.4 Risultato ricerca delle forme larvali di <i>F. magna</i>	106

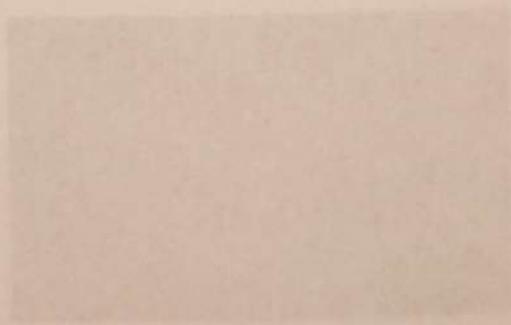
5.5 Risultato monitoraggio mediante videotrappole degli ingressi e delle uscite dal

Parco 108

6. **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**..... 112

7. **BIBLIOGRAFIA** 119

8. **APPENDICI**..... 130



1. INTRODUZIONE

Fascioloides magna parassita originario del Nord America è giunto in Italia, nella fattispecie all'interno di quello che è oggi il Parco Regionale della Mandria, nella seconda metà del XIX secolo con l'importazione di esemplari di Wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) per fini venatori.

La prima descrizione del parassita si deve a Bassi (1875) che, dopo aver osservato all'interno del Parco un'elevata mortalità nei cervi, denominò il parassita *Distomum magnum*, ipotizzando per primo che il parassita fosse giunto tramite l'importazione dei cervi da oltreoceano.

In seguito alle prime descrizioni del parassita effettuate in Italia, tra il 1882 ed il 1892 lo stesso venne ritrovato anche negli U.S.A e descritto da numerosi ricercatori.

Stiles (1894) stabilì tramite alcune caratteristiche morfologiche che il parassita descritto da Bassi (1875) e quello nordamericano appartenevano alla stessa specie, che venne rinominata *Fasciola magna*. Stiles (1894) fu anche il primo ad ipotizzare che il ciclo del parassita fosse molto simile a quello di *Fasciola hepatica* e che, quindi, includesse come ospite intermedio un gasteropode acquatico; tuttavia solo nel 1935, grazie a Swales, venne descritto l'intero ciclo di *Fasciola magna*, includendovi tutti gli stadi larvali. Il nome definitivo fu stabilito nel 1917 da Ward che creò il nuovo genere *Fascioloides* e rinominò il trematode *Fascioloides magna*.



Fig. 1.1: esemplare di *Cervus elaphus canadensis* nelle foreste del Wyoming

2. PARTE GENERALE

2.1 Caratteristiche *F. magna*

2.1.1 Classificazione

Fascioloides magna: classificazione

- TIPO: *Platelminta*
- CLASSE: *Trematoda*
- ORDINE: *Platyhelminthes*
- FAMIGLIA: *Fasciolidae*
- GENERE: *Fascioloides*
- SPECIE: *F. magna*

2.1.2 Morfologia

F. magna è uno dei trematodi di maggiori dimensioni: possiede un corpo non segmentato di forma ovale, appiattito dorso-ventralmente, lungo fino ad 80-100 mm e largo 20-35 mm. Lo spessore oscilla tra i 2 e i 4,5 mm e il colore varia dal bruno-rossiccio al bruno-giallastro.

La superficie del parassita è ricoperta da una cuticola provvista di microspine traumatizzanti. Come altri *Fasciolidae* è provvisto di due ventose: quella ventrale è un organo di adesione e quella orale, cui corrisponde l'apertura boccale. Manca il cosiddetto "cono cefalico" presente invece in *F. hepatica*.

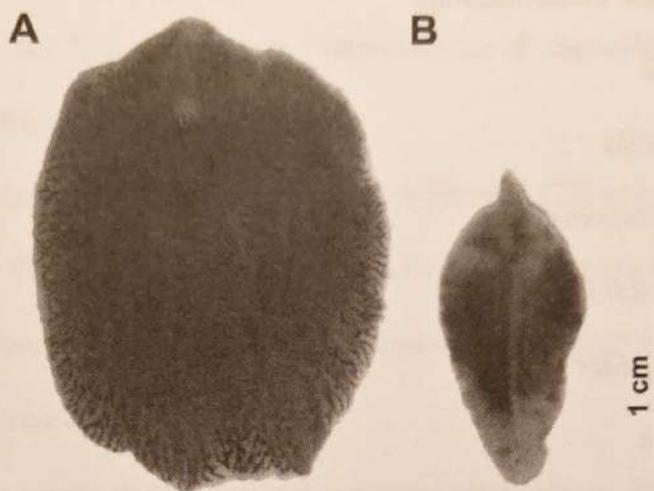


Figura 2.1: differenza di dimensioni tra *F. magna*(sx) e *F. hepatica* (dx)

L'apparato digerente è a fondo cieco: alla bocca seguono il faringe, l'esofago e l'intestino, che si divide a sua volta in 2 branche che terminano con numerose ramificazioni. Non esistono organi deputati alla respirazione o alla circolazione.

Come la maggior parte dei Trematodi, *F. magna* è ermafrodita; il poro genitale è situato a metà circa tra la ventosa orale e quella ventrale. I due testicoli, posti uno di fronte all'altro, sono situati lateralmente nella metà posteriore del parassita e da ciascuno di essi parte una serie di dotti confluenti nell'organo copulatore detto "cirro" che, evaginandosi, entra in vagina per eiaculare il seme. Gli organi femminili sono costituiti da un solo ovaio, anch'esso ramificato, situato nella porzione destra del corpo, anteriormente ai testicoli, da cui parte l'ovidutto. Lungo i margini del corpo sono situate due grandi ghiandole vitellogene che, attraverso una serie di canali trasversali e longitudinali, versano il vitello in una dilatazione dell'ovidutto dove si completano le uova. Da qui inizia l'utero che tramite la vagina, sbocca all'esterno.

L'apparato escretore, che elimina i cataboliti azotati, è costituito da una rete di canalicoli escretori che fanno capo ad una o più cellule a fiamma dotate di lunghe ciglia vibratili, il cui movimento convoglia i cataboliti stessi nel lume del tubulo escretore.

Il sistema nervoso è costituito da una serie di gangli e fibre posti attorno all'esofago, da cui irradiano numerosi nervi.

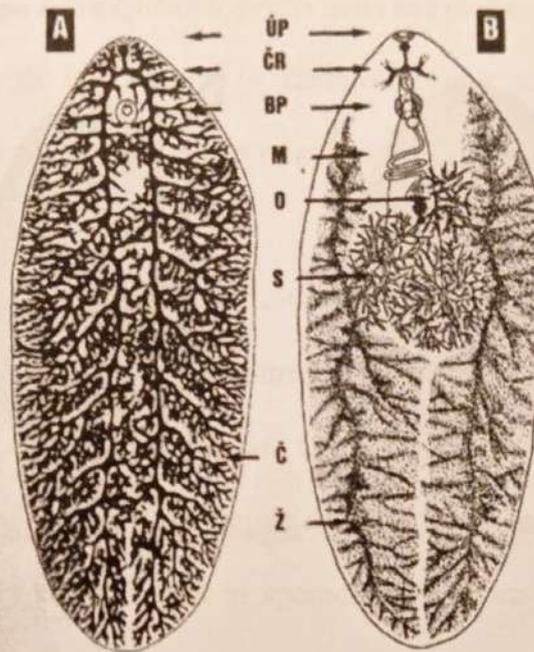


Figura 2.2: Anatomia di *Fascioloides magna*: UP = ventosa orale, CR = biforcazione intestinale, BP = ventosa ventrale, M = utero, O = ovaio, S = testicoli, C = intestino, Z = ghiandola vitellogena.

Le uova hanno forma ovalare e misurano 109-168 μm per 75-96 μm (Erhardová-Kotrlà, 1971). Presentano un polo acuto ed uno ottuso: in prossimità di quest'ultimo è situato un opercolo, vicino al quale si trova un gruppo di cellule germinali; al microscopio ottico l'opercolo, quando è dislocato per permettere la fuoriuscita del miracidio, appare come un piccolo disco di 20-25 μm di diametro. Le uova sono di colore giallo-brunastro e lo zigote è circondato da una membrana ricca di granuli di vitello.

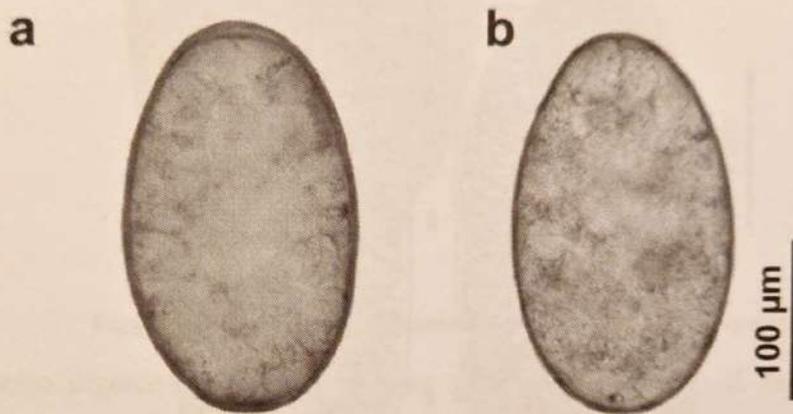


Figura 2.3: uovo di *F. magna*(a) e uovo di *F. hepatica* (b)

2.1.3 Ciclo biologico

Il ciclo di *F. magna* è molto simile a quello di *F. hepatica* ed è un ciclo evolutivo indiretto, che necessita di un ospite intermedio, di un ospite definitivo e dell'ingestione da parte dell'ospite definitivo delle forme infestanti.

Il parassita adulto è localizzato a livello epatico, e nel fegato vengono prodotte le uova che giungono nel piccolo intestino attraverso la bile e da qui sono eliminate nell'ambiente esterno con le feci. Nell'ambiente esterno, ove presenti condizioni favorevoli, avviene l'evoluzione dell'uovo a miracidio; essenziali perché questo possa avvenire sono: un velo d'acqua che permetta all'embrione di nuotare, una sufficiente presenza di ossigeno ed una temperatura compresa tra +5°C e +35°C. Se la

temperatura è $<5^{\circ}\text{C}$ l'uovo non schiude rimanendo però vitale per circa un anno, con la possibilità quindi di riprendere lo sviluppo in condizioni ambientali migliori; con una temperatura $<20^{\circ}\text{C}$ si ha un ritardo nello sviluppo mentre invece con temperature $>35^{\circ}\text{C}$ si ha l'inattivazione delle uova (Campbell, 1961). In condizioni ambientali estive lo sviluppo avviene in 35 giorni circa (Swales, 1935) ma le variazioni possono essere importanti. Il miracidio per fuoriuscire dall'uovo produce degli enzimi proteolitici ed il tempo a disposizione, prima della sua morte, corrisponde a circa 1-2 giorni. È provvisto di fototropismo e chemiotropismo positivi, e, muovendosi nell'acqua andrà alla ricerca dell'ospite intermedio in cui continuerà il suo sviluppo (Erhardová-Kotrlá, 1971).

Di conseguenza, dopo aver localizzato un ospite intermedio compatibile, rappresentato da un gasteropode (cfr. oltre), il miracidio vi penetrerà a livello del piede localizzandosi nel sacco polmonare (Swales, 1935) e continuando da questo punto la propria evoluzione. Ogni miracidio effettivamente penetrato all'interno dell'ospite intermedio si svilupperà in sporociste, struttura sacciforme contenente cellule germinative che evolveranno in redie madri. Dopo 1-2 settimane queste ultime migreranno dal sacco polmonare all'epatopancreas. La redia possiede già una ventosa orale ed un apparato digerente primitivo e la parte posteriore del corpo accoglie cellule germinali che si svilupperanno in un'altra generazione larvale: le redie "figlie".

Da queste ultime si sviluppa la cercaria: un organismo di circa $300\ \mu\text{m}$ di lunghezza e munito di lunga coda, che fuoriesce dall'ospite intermedio, nuota nell'acqua alla ricerca di uno stelo vegetale, vi aderisce e, persa la coda, vi si incista. Ogni miracidio può originare fino a 1000 cercarie, impiegando indicativamente fra 40 e 58 giorni (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1961). Il tempo necessario varia soprattutto

in relazione alle temperature esterne, ma anche in relazione alla specie di gasteropode parassitato (Pybus, 2001).

La forma larvale successiva, incistata sullo stelo d'erba, prende il nome di metacercaria, ha forma sub-sferica, diametro di circa 250 μm ed è in grado di resistere alcuni mesi nell'ambiente. Le metacercarie si ritrovano in raccolte d'acqua, su vegetazione sommersa od emersa (Erhardová-Kotrlá, 1971).

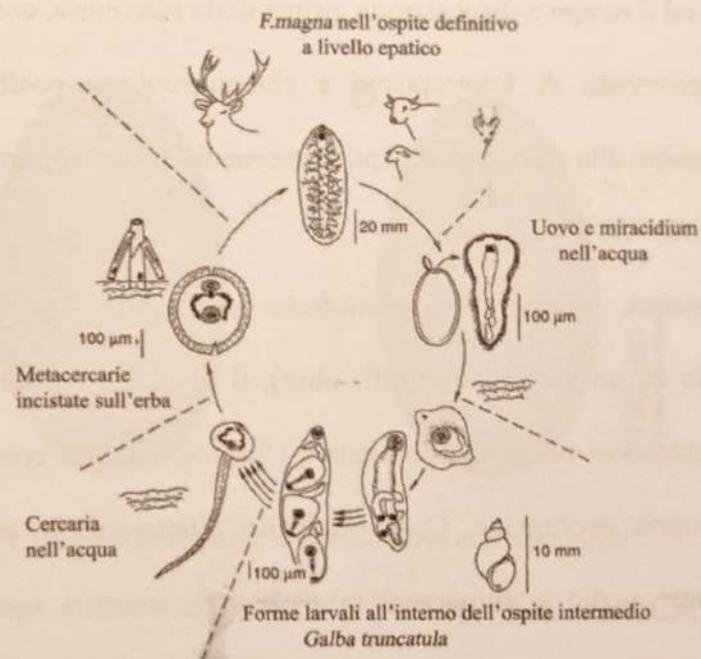


Figura 2.4: Ciclo biologico del parassita *F. magna*

Dopo l'ingestione, avviene il disincistamento della metacercaria ad opera di enzimi litici da lei stessa prodotti.

A livello duodenale, dalle metacercarie fuoriescono le adolestarie, forme immature ma di aspetto già simile al parassita adulto, che migrano verso il fegato attraverso la cavità peritoneale. Raramente è possibile che alcune adolestarie penetrino in altri organi quale il polmone. In questo caso, tuttavia, non si avrà evoluzione verso la forma adulta (Pybus, 2001).

Le adolestarie che giungono all'organo target, il fegato, vi permangono per circa cinque mesi, nutrendosi di parenchima, in attesa di completare lo sviluppo ed essere

in grado di deporre le uova. Il ciclo completo, dallo stadio di uovo a quello di individuo adulto, dura pertanto 8-9 mesi.

2.1.4 Ospiti intermedi

L'ospite intermedio di *F. magna* è rappresentato da alcuni gasteropodi acquatici riconducibili alla famiglia *Lymneidae*. Nel Nord America (Usa e Canada) i gasteropodi naturalmente infestati dal parassita sono risultati essere 5: *Lymnaea modicella* (Swales, 1935), *L. caperata* (Griffiths, 1959) e, meno frequentemente, *L. bulimoides* (Sinitsin, 1930), *L. parva* e *L. palustris nuttalliana* (Swales, 1935).

In Europa invece l'ospite intermedio è stato identificato in *Lymnea (Galba) truncatula* (Erhardová-Kotrlá, 1971) e in *Radix peregra* (Faltynkova et al, 2006).

Sembra che non più di uno-due vettori per zona possano giocare un ruolo epidemiologicamente significativo.

I gasteropodi appartenenti alla famiglia *Lymneidae* sono provvisti di una conchiglia spiralata, oblunga, destrogira, di altezza variabile e con peristoma semplice.

In base alla conformazione della conchiglia il genere *Lymnea* è suddiviso in diversi sottogeneri: gli ospiti intermedi preferenziali di *F. magna* appartengono al sottogenere *Galba*, caratterizzato da una conchiglia di piccole dimensioni grigia o grigia-rossastra, sulla cui superficie sono evidenziabili tre striature longitudinali, ravvicinate ed ineguali.

In *L. truncatula* la conchiglia ha forma conoide od ovoide, altezza di 6-10 mm e 3-5 mm di larghezza, spiralata verso destra con 4-5 giri di elica separati da un solco profondo. L'ultimo giro di spira, più panciuto, occupa all'incirca i 2/3 dell'altezza dell'intera conchiglia.

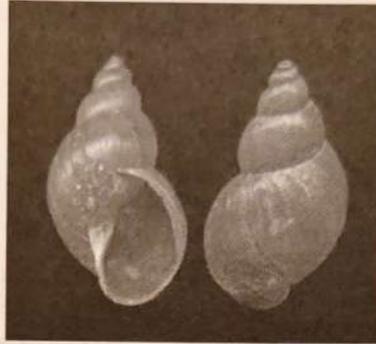


Figura 2.5: Esemplare adulto di *G. truncatula*

2.1.5 Ospiti Definitivi

Cervidi e bovidi in generale sono suscettibili a questa parassitosi con una sensibilità più o meno marcata. Sebbene esista un'ampia varietà di ospiti definitivi, soltanto poche specie contribuiscono significativamente al mantenimento della popolazione parassitaria.

Dal punto di vista epidemiologico, gli ospiti di *F. magna* si suddividono in tre gruppi: gli ospiti definitivi propriamente detti, gli ospiti aberranti e gli ospiti che costituiscono "fondi ciechi" (Swales, 1935; Foreyt, 1996; Pybus, 2001).

1. Gli ospiti definitivi pd. sono quelli in cui il parassita completa il suo ciclo biologico riuscendo ad eliminare le uova nell'ambiente esterno. Come esempi si possono citare: in Nord America il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*), il wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) e la renna (*Rangifer tarandus*); in Europa il cervo rosso (*Cervus Elaphus*) ed il daino (*Cervus Dama*).

2. Gli ospiti aberranti sono quelli in cui il parassita non riesce a completare con successo la propria migrazione. Questi ospiti spesso muoiono a causa delle lesioni da migrazione causate dalle forme immature del parassita. Gli ovi-caprini sono l'esempio più evidente per questa categoria.
3. Gli ospiti "fondi ciechi" sono invece quelli in cui il parassita raggiunge il fegato ma raramente si sviluppa ad adulto e, se questo accade, le poche uova prodotte non raggiungono l'intestino. Esempi possono essere l'alce, il bisonte, il cavallo, il bovino, il cinghiale ed il maiale.

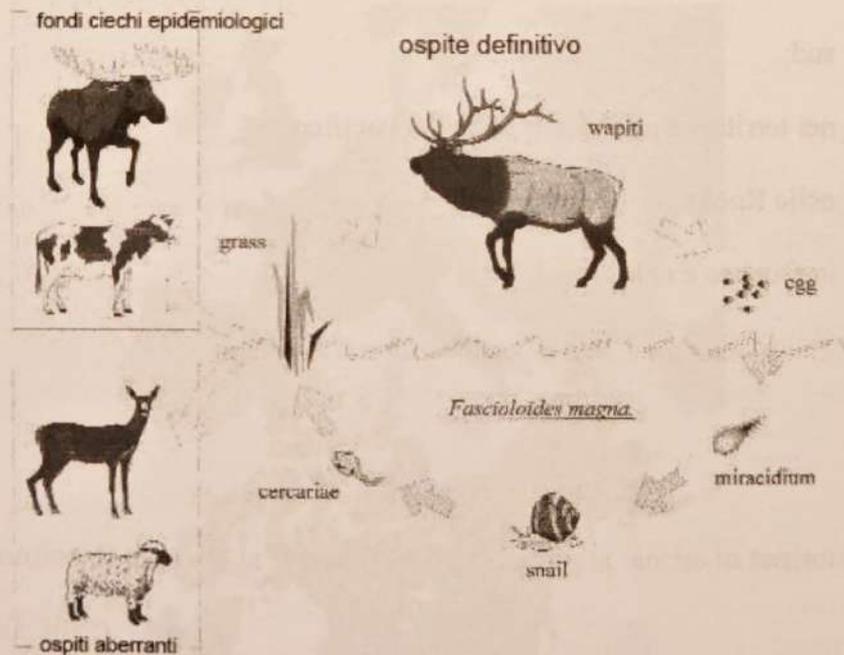


Figura 2.6: Elenco e specie di ospiti definitivi

La prevalenza del parassita nell'ospite intermedio come nell'ospite definitivo dipende molto dalle condizioni ambientali che si presentano nell'area di studio, con particolare riferimento alla temperatura, alle precipitazioni ed all'estensione delle zone acquitrinose in cui gli ospiti intermedi si ritrovano.

La prevalenza aumenta quando gli ospiti definitivi vivono in gruppi numerosi oppure in aree chiuse, come nel caso del Parco Regionale La Mandria, arrivando fino al 100% di prevalenza all'anno di età (Balbo et al., 1987)

2.1.6 Distribuzione geografica

Nord America

Il continente nordamericano è la regione d'origine del parassita. Il parassita vi è distribuito in 5 aree distinte (Pybus, 2001), e più precisamente :

- 1) nella regione dei Grandi Laghi;
- 2) lungo la costa del Golfo, sotto il Mississippi, e lungo le coste atlantiche più a sud;
- 3) nei territori a nord delle coste del Pacifico;
- 4) nelle Rocky Mountains
- 5) in Quebec e nel Labrador.



Figura 2.7: distribuzione in Nord America della parassitosi

Europa

Il parassita venne importato in Europa nel 1865, con l'introduzione di wapiti in quello che è oggi il Parco Regionale La Mandria (Bassi, 1875).

Successivamente, *F. magna* venne segnalato anche nell'Est Europa, inizialmente solo in Repubblica Ceca (Ulrich, 1930, Erhardová-Kotrlá, 1971) e sporadicamente in Polonia (Slusarski, 1955). In anni più recenti, le aree di presenza del parassita si sono moltiplicate, comprendendo l'Austria (Pfeiffer, 1983), la Slovacchia (Rajsky et al., 1994), l'Ungheria (Sztojkov et al., 1995) e la Croazia (Marinculic et al., 2002), essenzialmente lungo il bacino del fiume Danubio, dove esistono habitat ideali per la presenza degli ospiti intermedi e definitivi al tempo stesso (Spakulova et al., 2003).



Figura 2.8: Focolai europei di *F. magna*

Ultima in ordine di tempo è la segnalazione del parassita anche in territorio tedesco (Kasny et al., 2012).

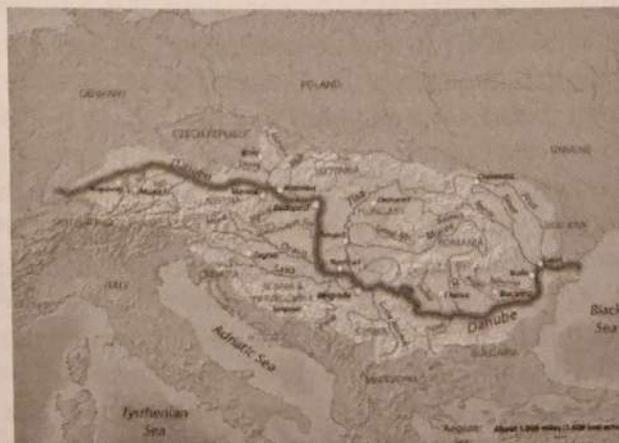


Figura 2.9: decorso del fiume Danubio evidenziato, potenziale via di espansione del parassita

Altri continenti

Negli altri continenti sono stati riportati casi sporadici di infestazione a seguito di importazione di bovini da aree endemiche del continente nord-americano, come avvenuto in Sud Africa (*Boomker e Dale-Kuys, 1977*) e in Australia (*Pybus, 2001*).

2.2 Ecologia ed epidemiologia della parassitosi

2.2.1 Ecologia dei gasteropodi appartenenti alla famiglia Lymnaeidae

Di fondamentale importanza per il mantenimento del ciclo biologico di *F. magna* sono la presenza e l'abbondanza degli ospiti intermedi citati precedentemente.

Il loro sviluppo è fortemente influenzato dalla temperatura e dalla presenza di acqua, che ne determinano tempi e continuità. Quando il terreno è coperto da almeno un velo di acqua, le limnee si attivano, si nutrono, crescono di dimensioni e si riproducono; al contrario, quando il terreno diventa asciutto e la temperatura supera i 25°C, le limnee vanno incontro ad una fase di inattività, detta estivazione, durante la quale i gasteropodi restano chiusi nel guscio (*Kendall et McCullough, 1951; Taylor, 1965*).

Questi gasteropodi possono sopportare condizioni ambientali sfavorevoli anche per periodi prolungati, ma a discapito dei naturali cicli di riproduzione.

Nello stesso modo l'attività dei gasteropodi è negativamente influenzata da temperature inferiori ai 10°C; in queste condizioni, gli stessi vanno incontro ad un periodo cosiddetto di ibernazione (*Kendall and McCullough, 1951*).

Durante le fasi di quiescenza (estivazione ed ibernazione), eventuali forme immature di *F. magna* presenti all'interno del gasteropode non vanno incontro ad ulteriore sviluppo e non hanno la possibilità di fuoriuscire dall'ospite intermedio. Solitamente, dopo l'ibernazione sono presenti sia gasteropodi maturi che immaturi: i primi saranno pronti a deporre le uova per la prima generazione mentre quelli immaturi

giungeranno a maturazione in tarda primavera ed inizieranno solo allora la deposizione.

A seconda delle condizioni meteo-climatiche, in annate particolarmente favorevoli le generazioni di limnee possono arrivare fino a 3. Al contrario, in condizioni sfavorevoli vi sarà una sola generazione, che per di più giungerà a maturazione solo l'anno successivo.

È stato pertanto dimostrato che particolari condizioni ambientali come forti piogge in primavera ed estati molto calde, comportano un'estivazione dei gasteropodi nei mesi estivi. Queste particolari condizioni comportano però il completamento del ciclo biologico in autunno garantendo lo svolgersi di due cicli riproduttivi effettivi (Mekroud et al., 2002).

L'habitat di *L. truncatula* si può funzionalmente suddividere (Taylor, 1965) in:

- a) Habitat serbatoio: terreni permanentemente allagati quali rive di torrente, pozze e rigagnoli poco profondi e a decorso lento;
- b) Habitat annessi: zone solo periodicamente allagate come prati-pascolo periodicamente inondati e solchi lasciati dai mezzi agricoli.

In generale, detti habitat sono particolarmente numerosi laddove il substrato è poco drenante, come nel caso dei terreni di tipo argilloso/fangoso (Ollerenshaw et Smith, 1969). Inoltre la specie per la sua sopravvivenza richiede un ph alcalino.

Infine, *L. truncatula* gradisce la presenza di vegetazione erbacea, viva o morta, ma non eccessivamente rigogliosa, in modo tale, che la luce solare possa raggiungere l'acqua e garantire la crescita di alghe unicellulari della famiglia *Clorophicee*, che rappresentano la base dell'alimentazione delle limnee stesse (Kendall, 1951; Rapsch et al., 2008). Come detto, anche *R. peregra*, appartenente alla famiglia *Lymnaeidae*, di ampia diffusione nel continente europeo, è ospite intermedio del parassita. Alcuni

studi su questo gasteropode hanno dimostrato la recettività a ques'ultimo sebbene non agli stessi livelli di infestività verificati in *G. truncatula* (Faltynkova et al., 2006).



Figura 2.10: presenza di ambienti acquitrinosi lungo il decorso del fiume Danubio, habitat ideale per *G. truncatula*

2.2.2 Epidemiologia *F. magna* in Nord America

Come accennato in precedenza, gli ospiti in cui viene più comunemente rinvenuto *F. magna* sono il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*), il wapiti (*Cervus elaphus canadensis*), il caribù (*Rangifer caribou*) ed il cervo mulo (*Odocoileus hemionus*).

Inoltre, nelle zone in cui il parassita è enzootico, l'infestazione è segnalata anche nel bestiame domestico, in particolare nel bovino, ma anche nella pecora, nel cavallo e nel maiale.

A causa dell'elevata prevalenza nella fauna selvatica, in alcuni stati nordamericani il sequestro di fegati bovini può arrivare fino ad oltre il 15% degli organi ispezionati, con notevole perdita economica per gli allevatori (Knapp, 1992).

Inoltre, un caso particolare da segnalare è avvenuto nel territorio canadese dell'Alberta; qui i primi studi sull'epidemiologia del parassita hanno permesso di evidenziare le sue potenzialità nella colonizzazione di nuove aree. In aree con un'elevata prevalenza questo ha aumentato la sua diffusione in zone ecologicamente simili tramite la naturale migrazione degli animali (Pybus, 1990).

2.2.3 Epidemiologia di *F. magna* in Europa

In Europa questo parassita "alieno" è stato segnalato in numerose specie ospiti, delle quali sono tre quelle che maggiormente contribuiscono al suo mantenimento in natura: il cervo rosso (*Cervus elaphus*), il daino (*Cervus dama*) ed il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) (Pybus, 2001). Quest'ultima specie, introdotta nell'est e nel nord Europa a scopi venatori, è a sua volta "aliena".

Il capriolo (*Capreolus capreolus*) è un caso particolare, alcuni studi citano la specie come ospite definitivo propriamente detto, quindi con un importante risvolto per il mantenimento del ciclo del parassita (Rajsky et al., 2002; Plotz et al., 2015). Altre ipotesi invece identificano questo ungulato come ospite aberrante (Pybus, 2001; Sattman et al., 2014); non in grado quindi di svolgere alcun ruolo nell'espansione dell'areale della parassitosi.

Di poco significato epidemiologico sono risultati essere gli ungulati quali il muflone ed il camoscio, i quali possono essere infestati ma il parassita non riesce a portare a termine il suo ciclo (Erhardová-Kotrlá et Blazek., 1970; Pybus, 2001).

Utilizzando questi ospiti, nell'ultimo ventennio, dalle storiche aree endemiche della Repubblica Ceca (Erhardova-Kotrlá, 1971) il parassita sta avanzando velocemente verso zone di nuova espansione (Novobilsky et al., 2007, Kasny et al., 2012).

Il ritrovamento del parassita in Germania e in Austria, tanto in ambiente libero (Sattman et al., 2014) come in aree recintate (Plotz et al., 2015) desta notevole

preoccupazione fra gli addetti ai lavori, che non si aspettavano una diffusione così veloce della parassitosi, forse favorita dalla presenza dei cosiddetti "corridoi ecologici" che la fauna selvatica utilizza per le proprie migrazioni.

In Italia la situazione epidemiologica pare invece più circoscritta rispetto all'est Europa grazie alla presenza di un muro che circonda l'intero Parco Regionale La Mandria.

È da ricordare però come negli anni '77-'78-'79, all'interno del Parco, i cervi – a causa di una proliferazione del parassita essenzialmente legata a fattori climatici – subirono un drastico calo demografico stimato intorno al 50% della popolazione inizialmente presente. La parassitosi coinvolse anche il bestiame (bovini) e marginalmente anche i cavalli e i cinghiali. (*Balbo et al., 1987;1989*).

Da allora, il parassita ha continuato ad evidenziarsi in cervi e daini ma senza produrre ulteriori episodi di mortalità. Un nuovo problema si sta però ponendo all'interno del Parco.

Si è notato come, il capriolo, estintosi all'interno del parco sul finire degli anni '70 e nel frattempo proliferato nelle aree immediatamente circostanti, stia lentamente tentando di ricolonizzare La Mandria, penetrandovi attraverso soluzioni di continuo del muro di cinta in corrispondenza dell'entrata e dell'uscita del fiume Ceronda (*Fig.2.11*)



Figura 2.11: paratie semovibili in corrispondenza dell'entrata del fiume Ceronda

Si teme quindi, che il capriolo possa infestarsi all'interno del Parco e, attraverso i suoi spostamenti naturali, veicolare il parassita al suo esterno. Se questo avvenisse, stanti la situazione ambientale e faunistica attuali, potrebbe avviarsi una fase di espansione di *F. magna* in qualche modo simile a quanto recentemente avvenuto nei Paesi attraversati dal fiume Danubio.

Per completare lo studio epidemiologico su *F. magna* una ricerca (Kràlovà-Hromadová et al., 2011) ha determinato con estrema accuratezza l'esatta origine dei focolai europei della parassitosi che risultavano fino ad allora sconosciuti.

Allo scopo, il DNA mitocondriale di esemplari di *F. magna* raccolti in detti focolai europei è stato messo a confronto con quelli di esemplari provenienti dalle 5 aree enzootiche nordamericane.

Relativamente all'Italia, è stato evidenziato come la presenza di *F. magna* abbia almeno due origini. In particolare, nel Parco Regionale La Mandria sono stati individuati 4 aplotipi mitocondriali, uno dei quali perfettamente corrispondente all'aplotipo Ha 1 trovato in Alberta ed Oregon, ed altri tre possibilmente ricollegabili ad una popolazione di *F. magna* attualmente estinta.

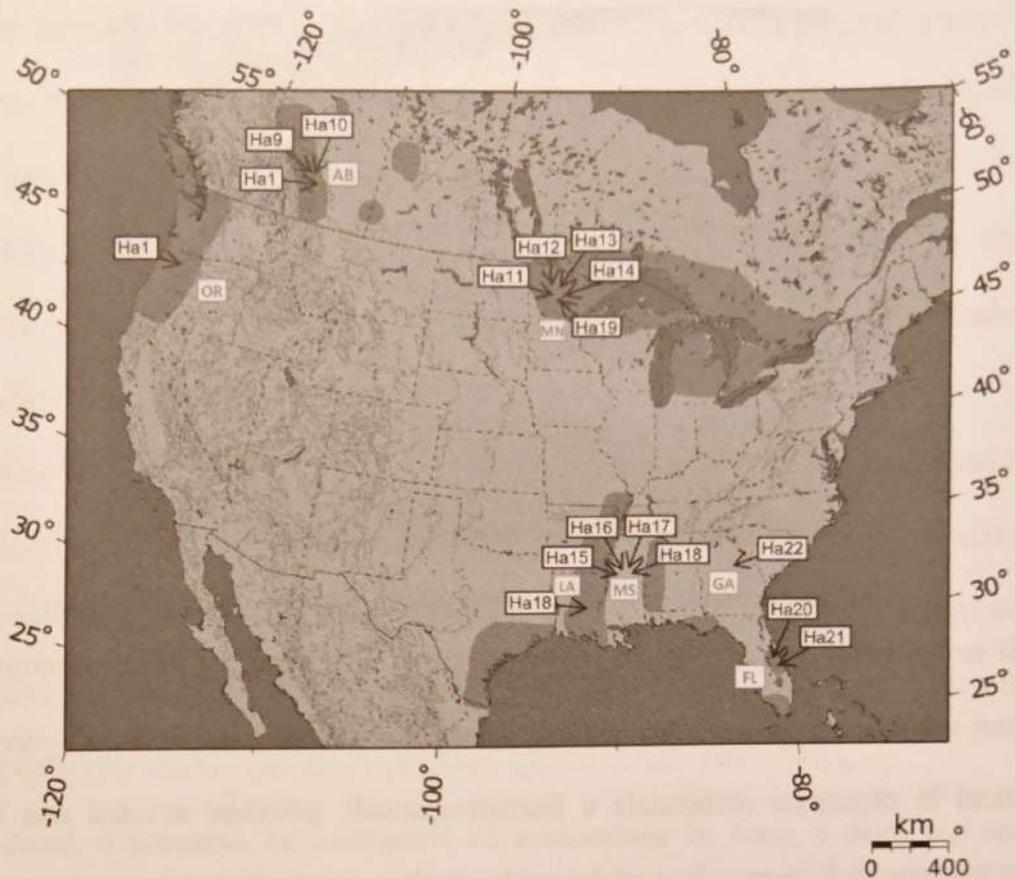


Figura 2.12: distribuzione aplotipi mitocondriali nordamericani

È stato inoltre confermato che le due popolazioni europee di *F. magna*, quella italiana e quella dell'Est Europa, sono a tutti gli effetti due popolazioni indipendenti. Dunque, si può escludere che il focolaio più recente dei due, quello dell'Est Europa, derivi dal primo. È sua volta evidente che la presenza di *F. magna* al centro e al sud della Repubblica Ceca è il risultato di una o più introduzioni di cervi infestati provenienti dai territori a sud-est degli U.S.A. L'esatta provenienza della popolazione rimane però sconosciuta.

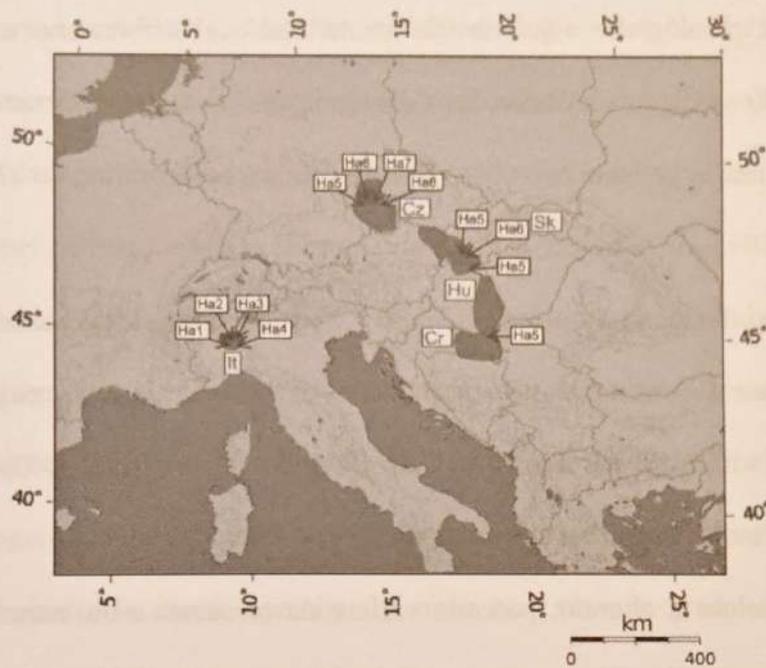


Figura 2.13: distribuzione degli aplotipi mitocondriali europei

2.3 Patologia e reperti anatomo-patologici

Le prime descrizioni della patologia causata da *F. magna* si devono a Bassi che, nel 1875, descrisse un episodio di mortalità massiva di cervi all'interno di quello che è oggi il Parco Regionale La Mandria.



Figura 2.14: lesioni da *F. magna* in un fegato parassitato

Le lesioni patologiche e le manifestazioni cliniche differiscono molto a seconda dell'ospite, se ospite definitivo propriamente detto, ospite aberrante oppure ospite che si limita a giocare un ruolo di fondo cieco epidemiologico (*Foreyt et Todd, 1976*).

Negli ospiti definitivi propriamente detti, il fegato si presenta aumentato di volume e interessato da tumefazioni o pseudocisti al cui interno si rinvengono uno o due esemplari adulti del parassita (*Swales, 1935; Foreyt et Todd, 1977*). Sono inoltre visibili accumuli di fibrina sulla sierosa.

Anche il colore è alterato, potendo variare da rossastro a blu-nerastro; le striature rossastre eventualmente presenti evidenziano i tragitti emorragici effettuati dalle forme larvali mentre il pigmento blu-nerastro è fortemente patognomonico di *F. magna* ed è dato dall'ematina (pigmento porfirinico), risultato della digestione del sangue da parte del parassita (*Campbell, 1960*).

Alla palpazione possono essere presenti aree con consistenza aumentata intervallate ad aree con consistenza diminuita. Nelle infestazioni recenti, effettuando più tagli paralleli a livello dei lobi epatici, potranno essere ritrovate le forme immature all'interno dei dotti biliari, immerse in un liquido emorragico; nelle fasi successive della parassitosi, invece, si evidenzia un'ectasia dei dotti biliari con infiammazione (colangite) e modico ispessimento della loro parete (*Pybus, 2001*). Nelle infestazioni meno recenti, le pseudocisti si trasformano in focolai induriti, circoscritti da una spessa capsula fibrosa e contenenti una massa compatta e friabile, simile ad un fondo di caffè, rappresentata dai resti disidratati dei parassiti misti a bile. I linfonodi periportalari sono costantemente ingrossati e di colore scuro nerastro.

Nei cervidi (ospiti definitivi pd.) la parassitosi è solitamente asintomatica (*Swales, 1965; Foreyt and Todd, 1977*), ma nel caso in cui l'equilibrio ospite-parassita si

rompa (come avvenuto a La Mandria sul finire degli Anni Settanta), l'animale iperinfestato manifesta sintomi quali grave scadimento fisico fino alla cachessia, ottundimento del sensorio, letargia, depressione, pelo opaco ed arruffato, lentezza nei movimenti e nei riflessi, decubito permanente e morte (Balbo et al., 1987).

Nei bovini (fondi ciechi), la parassitosi è per lo più inapparente, notandosi solo un calo della resa produttiva. Il fegato viene sequestrato in corso di visita ispettiva al macello, a causa della notevole fibrosi, della presenza di parassiti all'interno del parenchima epatico e della pigmentazione nerastra di vari tessuti. I dotti biliari sono totalmente occlusi e le pareti ispessite. Le uova non sono in grado di passare nel sistema biliare poiché le grosse cavità cistiche non comunicano con i dotti biliari, impedendo così la prosecuzione del ciclo biologico del parassita stesso (Swales, 1935; Foreyt and Todd, 1976).

Negli ovicaprini (ospiti aberranti) la sintomatologia invece è ben evidente e molto grave, la morte è associata a forme acute di peritonite e gravi emorragie causate dalla migrazione dei trematodi. In questi ospiti il parassita riesce raramente a maturare, infatti il ritrovamento delle uova nelle feci di questi animali è del tutto occasionale (Swales, 1935; Campbell et Todd, 1954; Erhardova-Kotrla, 1971; Pybus, 2001).

2.4 Diagnosi

La diagnosi circa il ritrovamento del parassita adulto è relativamente semplice, infatti, *F. magna* è uno dei pochi trematodi che si localizza nel parenchima epatico. Altri trematodi come *F. hepatica*, *D. dendriticum* e *F. gigantica* si ritrovano all'interno dei dotti biliari ed inoltre sono facilmente differenziabili da *F. magna* per caratteristiche morfologiche (Pybus, 2001).

La diagnosi nell'ospite definitivo vivo si può effettuare mediante esame copromicroscopico identificando le uova prodotte dal parassita adulto; con l'esame

necroscopico invece si mettono in evidenza gli adulti effettuando dei tagli longitudinali nei lobi epatici.

Per quanto concerne l'ospite intermedio si possono ricercare le forme larvali del parassita utilizzando diverse tecniche :

- mediante schiacciamento del gasteropode ed osservazione allo stereomicroscopio di eventuali redie e cercarie (Pybus, 2001).
- mediante abbassamento della temperatura a circa 13-15°(con acqua e ghiaccio) per 24 ore del gasteropode. Questo favorisce la fuoriuscita delle cercarie "mature" e successivamente si osservano eventuali metacercarie incistate nei pozzetti in cui erano state preventivamente apposte (*Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*" HMSO Publication (1971).
- mediante estrazione del DNA e PCR (Faltynková et al., 2006;Haider et al., 2012)

2.5 Gestione farmacologica dell'infestazione nei serbatoi selvatici

Gli studi sui possibili farmaci da utilizzare ai fini del controllo dell'infestazione da *F. magna* sono stati numerosi, sia in Nord America sia in Europa.

La principale difficoltà che li accomuna è che i serbatoi di questa parassitosi sono rappresentati da animali selvatici. Di conseguenza l'unica opzione possibile è quella di somministrare gli antelmintici attraverso il cibo.

Il farmaco deve però possedere un odore ed un sapore tali da non indurre gli animali a rifiutare i mangimi medicati (Pybus, 2001). È importante inoltre valutare attentamente, oltre che la via di somministrazione, la posologia degli antelmintici da somministrare: bisogna cercare di raggiungere una minima dose efficace in quei soggetti che, non ricoprendo un ruolo dominante all'interno del branco, si alimenteranno di meno ed evitare una overdose di farmaco o effetti tossici nei soggetti dominanti.

Il trattamento di *F. magna* è problematico anche a causa del fatto che il parassita adulto è localizzato nelle pseudocisti a livello epatico dove la diffusione del farmaco è più difficile rispetto ad altri trematodi, *F. hepatica* in primis. Dunque, non è scontato che i farmaci utilizzati per il trattamento di *F. hepatica* siano adeguati anche per il trattamento di *F. magna*.

Gli antelmintici usati sono stati il clorsulon, il triclabendazolo, l'albendazolo, il clioxanide, il diamphenetide, l'esaclorofene, l'esacloretano, il nitroxil, il rafoxanide, l'oxyclozanide. Alcuni agiscono solo nei confronti delle forme adulte (come l'oxyclozanide), altri sono attivi anche contro le forme immature di *Fascioloides* (Foreyt, 1988). Nel caso del clorsulon, la sua efficacia addirittura decresce al maturare del parassita, infatti l'azione contro i parassiti di 8 settimane è maggiore

(65% con un dosaggio di 7mg/kg e 100% con un dosaggio di 21 mg/kg) rispetto all'azione che il farmaco ha contro i parassiti di 16 settimane (rispettivamente 20% e 74%) (Foreyt, 1988).

In Nord America il farmaco più efficace nel trattamento della fascioloidosi è risultato essere il Fasinex, a base di triclabendazolo. Negli ovini, caprini e bovini questo benzimidazolico è risultato attivo sia contro le forme immature che contro quelle adulte (Boray et al., 1983; Eckert et al., 1984; Pybus, 2001).

L'albendazolo è un antielmintico utilizzato negli animali domestici contro parassiti gastrointestinali, nematodi polmonari e trematodi. Foreyt e Drawe (1978) valutarono l'efficacia del farmaco nei cervi dalla coda bianca degli Stati Uniti, naturalmente infestati con nematodi gastrointestinali e con *F. magna*. Una singola dose di albendazolo di 11-54 mg/kg nel cibo dimostrò un'efficacia del 99% contro *Haemoncus contortus*, *Trycostrongylus akivali*, *Ostertagia odocoilei*, *O.mossi* e *Nematodirus odocoilei*. L'efficacia risultò minore (38%) invece contro le forme immature di *F. magna*.

Utilizzando invece l'albendazolo in pasta per uso orale in dose da 17 a 46 mg/kg la percentuale salì al 67% (Foreyt & Drawe, 1985).

Il diamphenetide è un altro farmaco che agisce contro le forme giovanili di *F.hepatica* e che fu testato sui cervi del Parco regionale "La Mandria" (Balbo et al., 1987). Somministrato agli animali tramite pellets medicati, alla dose di 140 mg/kg per 2-3 giorni, si dimostrò efficace sia contro le forme giovanili che contro quelle adulte.

Negli Stati Uniti, tuttavia, l'utilizzo di questo farmaco non ebbe la stessa efficacia nel trattamento della parassitosi (Foreyt and Todd, 1976).

Successivamente, sempre all'interno del Parco, si sperimentò l'efficacia del rafoxanide, dell'oxyclozanide e del triclabendazolo, somministrati durante il periodo invernale (Balbo et al., 1987). Attraverso questi interventi, i gestori dell'area protetta riuscirono nell'intento di contrastare la mortalità e ripristinare l'equilibrio parassita-ospite all'interno del Parco (Spakulová et al., 2003).

Venne peraltro dimostrato come il rafoxanide non avesse particolare interesse per il controllo della fascioloidosi, riducendo solo temporaneamente l'eliminazione delle uova di *F. magna* (Balbo et al., 1987).

In Repubblica Ceca, invece, lo stesso farmaco venne testato su un gruppo di 200 cervi tenuti in cattività, di cui il 50% era infestato da *F. magna*. Venne somministrata una dose di farmaco pari a 15mg/kg due volte all'anno per due anni e ci fu una riduzione dell'80% nell'eliminazione di uova (Chroust, 1987).

Dopo aver effettuato il trattamento sugli animali domestici è importante impedire, per quanto possibile, la convivenza dei cervidi con il bestiame, allevando quest'ultimo in aree recintate, lontane dalle aree umide dove è dimostrata la presenza del parassita. In aggiunta, per diminuire il numero di gasteropodi infetti, si possono utilizzare dei molluschicidi che però, a causa dell'inquinamento ambientale e del possibile impatto su altre specie, sono una forma di prevenzione non raccomandata (Balbo et al., 1989).

Un'altra strategia, difficilmente applicabile però in ambito europeo, consiste nel bruciare la vegetazione nei territori dove il livello di infestazione degli ospiti intermedi e la presenza di metacercarie infettanti è elevato (Pybus, 2001). Il trattamento degli animali con una terapia adeguata è importante per aumentare la resistenza di questi ultimi nei confronti del parassita, soprattutto in quelle aree di prima diffusione della parassitosi. Il trattamento degli ospiti definitivi infetti è però

applicabile principalmente sui cervi d'allevamento o nelle situazioni in cui cervi selvatici, provenienti da aree enzootiche, debbano subire degli spostamenti.

Per prevenire la diffusione di *F. magna* in nuove aree sembrerebbe opportuno impedire del tutto lo spostamento di animali provenienti da zone endemiche. Peraltro, come dimostrato in Canada e negli Stati Uniti, la migrazione spontanea degli animali infetti a partire da zone endemiche non implica necessariamente la diffusione del parassita, perché la concentrazione delle forme infettanti non è sempre sufficiente (Spakulová et al., 2003).

2.6 La cartografia tematica applicata alla parassitologia

2.6.1 Introduzione

Dalla cartografia tradizionale, su supporto cartaceo, negli ultimi decenni si è passati alla cartografia digitale, grazie alla contemporanea evoluzione ed utilizzo dell'informatica su vasta scala.

Il primo contributo significativo della cartografia digitale in ambito epidemiologico è stata la creazione dell' "Atlante della distribuzione globale della schistosomiasi" (Doumenge et al., 1987).

Le novità apportate nei sistemi cartografici digitali hanno permesso un accesso ai dati in tempo reale con la possibilità di un monitoraggio e controllo in tempo reale di alcune patologie. Un esempio in questo senso è quello legato ad alcune patologie trasmesse da vettori, la cui distribuzione è influenzata dai cambiamenti climatici (Thomson et Connor, 2000).

2.6.2 Che cos'è un Sistema Informativo Geografico

Un GIS (Geographical Information System) è un sistema informativo computerizzato che permette la gestione di informazioni geografiche (geo-riferiti).

Secondo la definizione di *Burrough (1986)* il GIS è composto da una serie di strumenti software per acquisire, memorizzare, estrarre, trasformare e visualizzare dati spaziali dal mondo reale.

Il GIS può quindi essere visto come un DBMS (Database Management System) capace di gestire le posizioni degli "elementi" sul territorio.

Il punto chiave di questo sistema è la capacità di associare ad ogni singola informazione le informazioni sulla sua localizzazione spaziale.

Per avere un inquadramento generale di un sistema GIS è necessario identificare le componenti necessarie al suo:

- Componente software: componente, costituita da algoritmi matematici che permette il corretto funzionamento del sistema. Condizione essenziale di queste, è quella di avere caratteristiche che permettano 1) l'inserimento ed il trattamento di dati spaziali, 2) la presenza di un sistema per il trattamento del database e 3) la presenza di strumenti che supportino la visualizzazione, l'analisi e l'interrogazione geografica.
- Componente hardware: è la componente su cui i sistemi GIS possono lavorare e sono costituiti da un PC oppure da vere e proprie stazioni di lavoro costituite da reti e server.
- Database sono strutture che permettono la raccolta e la gestione dei dati e tramite moduli di collegamento permettono al software di utilizzarli.
- Dati : costituiscono la porzione portante di un sistema GIS. I dati si dividono in tematici e spaziali; quelli spaziali definiscono l'ubicazione di un particolare oggetto mentre il dato tematico fornisce una dettagliata descrizione del fenomeno.

2.6.3 Rappresentazione dei dati

I dati in un GIS rappresentano oggetti del mondo reale in formato digitale. I dati geografici possono essere immagazzinati attraverso due modelli di dati : il modello raster e quello vettoriale.

Il modello raster è organizzato in righe e colonne composte da celle (pixel) di un'unica dimensione in cui è registrato un singolo numero. Viene utilizzato per rappresentare quei dati che cambiano continuamente nel tempo e nello spazio.

Questi dati possono essere rappresentati ad esempio da immagini fotografiche.

Il modello vettoriale utilizza invece geometrie come punti(coppie di coordinate), linee (serie di punti) o poligoni(aree delimitate da linee)ed è il metodo migliore per rappresentare oggetti con limiti distinti e ben definiti.

Gli esempi di utilizzo dei dati vettoriali sono dati da elementi che hanno confini definiti come l'utilizzo dei poligoni per i confini amministrativi o i punti per le localizzazioni.

2.6.4 Sistemi di riferimento

Prima di analizzare i dati raccolti in un sistema GIS, questi devono essere correttamente integrati sottoponendoli a dei processi di proiezione e di conversione delle coordinate.

Il problema riguardante le coordinate in GIS si pone partendo dal presupposto che bisogna rappresentare su una superficie piana una superficie irregolare. La Terra può essere rappresentata con vari modelli, per ciascuno dei quali si può fornire una differente serie di coordinate (longitudine, latitudine e altitudine) per ciascun punto sulla superficie terrestre.

In riferimento a questo si può affermare che la Terra non è esattamente sferica ed al fine di introdurre un sistema di coordinate che consentisse di identificare in modo

univoco la posizione di un punto, la forma ideale che può rappresentarla al meglio è quella del geoide.

Eliminando tutti i rilievi e le depressioni e sostituendole con un oceano avente come livello quello medio dei mari si ottiene la superficie geodetica; il geoide ne è il solido di riferimento.

È quindi una superficie perpendicolare in ogni punto alla direzione della verticale, cioè alla direzione della forza di gravità. Questa è la superficie che meglio descrive la superficie media degli oceani quindi, la superficie media della Terra.

Il geoide non può essere utilizzato per la determinazione planimetrica di una porzione di terreno; di conseguenza questa superficie viene utilizzata solo in riferimento alle quote.

Per poter introdurre un sistema di coordinate è necessario conoscere l'equazione che rappresenta il geoide calcolando l'ellissoide di riferimento che è una superficie definita matematicamente approssimando il geoide.

A causa della relativa semplicità, gli ellissoidi di riferimento sono usati comunemente come superficie di riferimento per definire una rete geodetica e qualunque punto dello spazio di cui sia definita la latitudine e la longitudine.

Per questa ragione attraverso i secoli sono stati proposti diversi modelli matematici che potessero rappresentare la Terra, questi, con il trascorrere del tempo si sono rivelati sempre più precisi.

L'ultimo ellissoide adottato è risultato essere il WGS84 (World Geodetic System 1984).

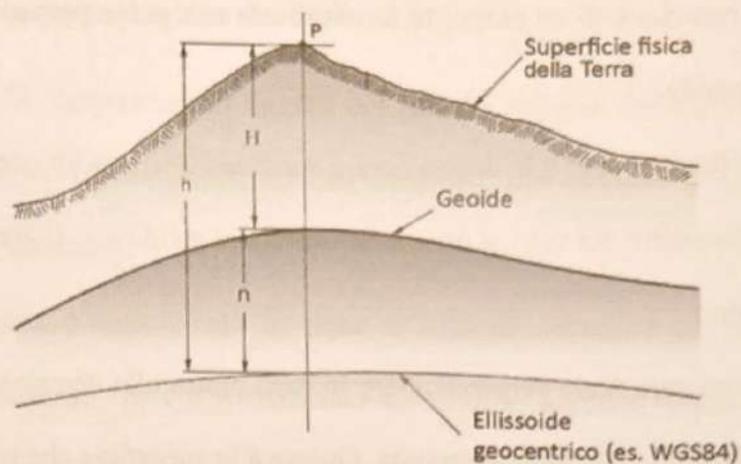


Figura 2.15: rappresentazione grafica di ellissoide e geoide

Attualmente grazie all'utilizzo ed alla diffusione sempre maggiore dei GPS sta prendendo piede il WGS84.

Definita la forma dell'ellissoide convenzionale, per approssimare il geoide in una certa zona occorre definire la posizione spaziale dell'ellissoide rispetto al geoide.

Il datum (sistema di riferimento di coordinate) ne ha questa funzione e può essere globale o locale. E' locale quando approssima il geoide in una zona limitata; globale quando approssima l'intera superficie terrestre.

Le singole nazioni usano generalmente un datum locale, cercando di adattare l'ellissoide prescelto al geoide nel proprio territorio.

I sistemi di riferimento locali per l'Italia includono :

“Roma 1940” e “ED 50”

che differiscono da quello globale (WGS84) per differenze di latitudine e longitudine.

La proiezione è un altro componente fondamentale nella produzione delle carte.

Si tratta di una trasformazione matematica per trasferire l'informazione

tramite un modello della terra, che rappresenta una superficie curva tridimensionale,

su un supporto bidimensionale come la carta o lo schermo del computer. Ciascuna

proiezione è usata per scopi diversi in quanto privilegia la rappresentazione o delle forme, delle aree o delle distanze, le une a scapito delle altre.

2.6.5 Funzioni di un sistema GIS

Un sistema GIS permette di mettere in relazione dati diversi che condividono la medesima localizzazione geografica, ottenendo nuove informazioni a partire da dati pre-esistenti.

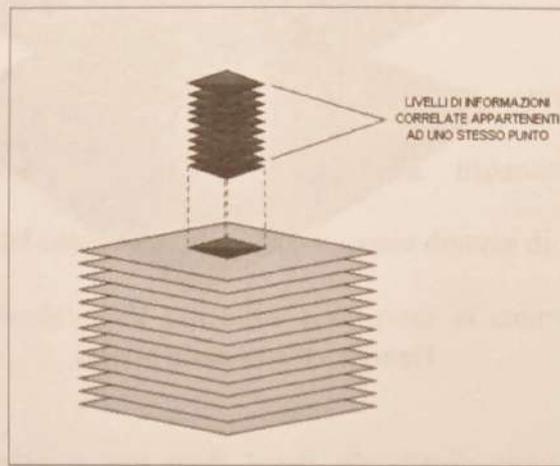


Figura 2.16: livelli di informazioni diverse appartenenti ad uno stesso punto

Questi sistemi utilizzano le informazioni tematiche a più livelli definiti "layer" e sfruttando questa organizzazione effettuano l'analisi delle relazioni spaziali tra oggetti diversi.

Si possono citare alcuni esempi di queste analisi spaziali:

- Query spaziali, interrogazioni relative a proprietà e relazioni spaziali (distanza da un punto, da una linea o da un'area)
- Buffering , da un punto, una linea o un poligono definire un poligono rispetto ad una distanza fissa o variabile in funzione degli attributi dell'elemento
- Overlay , è la sovrapposizione di diversi layers per creare una rappresentazione cartografica che comprenda tutte le informazioni di quelle sovrapposte .



Figura 2.17: esempio di overlay

2.6.6 Il GIS come strumento per l'epidemiologia

Alcuni fenomeni di natura sanitaria sono legati in qualche modo al territorio in termini di causa ed effetto e le informazioni riguardanti il territorio stesso rappresentano un importante elemento utile alla loro comprensione. Studiare quindi una malattia osservando la sua distribuzione spaziale permette una visualizzazione globale del fenomeno e rende più facile stabilire le relazioni di causa-effetto. Le rappresentazioni cartografiche visualizzano infatti informazioni in maniera più immediata rispetto ad una semplice tabella.

L'avvento di questi sistemi ha portato un notevole miglioramento nella ricerca in ambito epidemiologico/parassitologico, soprattutto per quei parassiti che richiedono la presenza di un vettore. Dall'inizio degli anni '90 l'introduzione di sistemi GIS

(Lawson et al., 1999) ha permesso la creazione del “disease mapping” consentendo la creazione di mappe aggiornate ed aggiornabili in tempo reale.

2.6.5 L'utilizzo di mappe di rischio per la presenza di ospiti intermedi

Di particolare rilevanza per il nostro studio all'interno del Parco Regionale La Mandria è stata quella di valutare la potenzialità di creare una mappa di rischio in relazione alla presenza del gasteropode intermedio *Galba truncatula* utilizzando delle carte predittive.

Queste ultime sono state utilizzate con ottimi risultati soprattutto in Africa, per verificare la distribuzione di vettori della tripanosomiasi; è il caso dell'identificazione del range di presenza di 8 specie diverse di mosche tse-tse che ha conseguentemente permesso di effettuare operazioni di controllo dei vettori stessi (Rogers et al., 1996).

Un altro esempio relativo agli studi legati alla distribuzione dei vettori è quello relativo alla identificazione delle zone di potenziale trasmissione della Malaria. I vettori di questa malattia, zanzare del genere *Anopheles*, sono legate alla presenza di bacini umidi che possono essere rilevati tramite l'utilizzo di cartografia tematica (Bayoh et al., 2001; Devi et al., 2003).

Per quanto riguarda invece esempi in ambito europeo è importante ricordare lo studio sulla Borreliosi di Lyme il cui vettore è una zecca e più precisamente *Ixodes ricinus* (Furlanello et al., 2003); inoltre è da ricordare la creazione di cartografia tematica in uno studio effettuato sulla Blue Tongue negli ovi-caprini legato alla presenza dei *Culicoides* (Calistri et al., 2003; Capela et al., 2003).

Cartografia tematica è stata creata anche per lo studio dei gasteropodi acquatici. Utilizzando variabili climatiche ed ambientali in Uganda sono state create mappe di rischio relative ad ogni specifico gasteropode presente nell'area. I principali

gasteropodi ritrovati erano ospiti intermedi di parassiti quali *S. mansoni*, *S. bovis* e *F. gigantica*. Tra i numerosi parametri ambientali presi in considerazione dal lavoro, i più rilevanti sono stati la temperatura, la presenza di acqua e la quantità di vegetazione (Stensgaard et al., 2006).

In Cambogia è stata creata una mappa del rischio per la fascioliasi in funzione dei seguenti fattori di rischio: presenza di zone di inondazione, vicinanze ai fiumi, utilizzo del suolo, pendenza del terreno, altitudine, densità del bestiame. I risultati hanno dimostrato una significativa correlazione di questi fattori di rischio con la prevalenza della parassitosi (Tum et al., 2004)

In condizioni ambientali più simili alle nostre, in Svizzera, fu creato un modello di rischio per monitorare la presenza delle forme libere di *F. hepatica* e di conseguenza, anche dell'ospite intermedio, *Galba truncatula* con caratteristiche leggermente diverse a quelle utilizzate in Cambogia. Nel modello di rischio furono identificate la temperatura come fattore di rischio diretto nella schiusa delle uova del parassita. Furono identificate inoltre altre tre variabili direttamente legate alla presenza dell'ospite intermedio : la piovosità (mm di pioggia), la copertura forestale ed il tipo di suolo (Rapsch et al., 2008).

Non si hanno rilevanze bibliografiche invece sulla produzione di mappe del rischio riguardanti lo studio della parassitosi mediata da *F. magna*.

3. CONTESTO GENERALE E SCOPO DEL LAVORO

Il Parco Regionale La Mandria (PRLM), ex tenuta di caccia reale, è l'unica zona nell'Europa Occidentale in cui è stabilmente presente *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), trematode epatico qui introdotto nella seconda metà del XIX secolo con l'importazione di Wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) direttamente dagli USA (Balbo et al., 1987). Sinora, e a differenza di quanto sta avvenendo nell'Europa centro-orientale (Kasny et al., 2012), l'infestazione è rimasta circoscritta al PRLM grazie alla presenza di un muro di cinta della lunghezza di oltre 30 km, che lo delimita rispetto al territorio circostante.

Il ciclo biologico di *F. magna* è sovrapponibile a quello di *Fasciola hepatica*. Il completamento del ciclo biologico è subordinato alla presenza di uno o più ospiti definitivi (solitamente Cervidi) e di uno o più ospiti intermedi (gasteropodi acquatici) e all'ingestione da parte dell'ospite definitivo delle forme infestanti (metacercarie) presenti nell'ambiente. Il ciclo completo, dallo stadio di uovo a quello di parassita adulto, dura 8-9 mesi.

Nel PRLM sono presenti numerosi individui di cervo (*Cervus elaphus*), daino (*Cervus dama*) e cinghiale (*Sus scrofa*). Il capriolo (*Capreolus capreolus*), estintosi sul finire degli Anni Settanta e nel frattempo esploso demograficamente ai confini dell'area protetta, sta nuovamente tentando di ricolonizzare il PRLM, dove riesce occasionalmente a penetrare tramite soluzioni di continuità del muro di cinta, in corrispondenza dei punti di entrata e di uscita di un corso d'acqua. Dunque, negli ultimi anni si sta ponendo il problema di una possibile fuoriuscita di *F. magna* dal PRLM attraverso caprioli infestati, e di una altrettanto possibile infestazione di ruminanti domestici (Foreyt et al., 1976; Pybus et al., 2001) e selvatici - Cervidi

(Spakulova et al., 2003) ma anche di Muflone (Pybus et al., 2001) e Camoscio (Erhardová-Kotrlá et Blazek, 1970), presenti nelle vicine aree di bassa e media montagna.

Date le premesse quindi, obiettivo generale del presente lavoro è verificare se *F. magna* è già stato in grado, o meno, di insediarsi in ambienti esterni al muro di cinta del Parco Regionale La Mandria, dando origine ad un ciclo evolutivo completo. In parallelo, si è cercato di quantificare il rischio che quanto sopra possa comunque avvenire in futuro. Allo scopo si sono studiati, in particolare, i flussi di Cervidi verso l'esterno dell'area cintata del Parco Regionale La Mandria, e l'idoneità dell'ambiente di pre-parco (esterno al muro di cinta) nei confronti dei molluschi potenziali ospiti intermedi di *F. magna*.

La ricerca è stata schematicamente divisa in 5 azioni obiettivo, come segue:

- 1) sorveglianza attiva sui ruminanti selvatici (camoscio, muflone e capriolo) prelevati in zone prossime al Parco, mediante ricerca delle lesioni epatiche suggestive delle fasi di migrazione e localizzazione di *F. magna*;
- 2) sorveglianza passiva sui caprioli recuperati all'interno del Parco e nelle sue immediate vicinanze (pre-parco);
- 3) caratterizzazione dei siti favorevoli alla presenza degli ospiti intermedi di *F. magna*, con produzione di mappe tematiche relative all'intera superficie del Parco;
- 4) ricerca (mediante tecniche molecolari) delle forme larvali di *F. magna* in esemplari di *Galba truncatula* e *Radix peregra* raccolti in varie zone del Parco, soprattutto all'esterno del muro di cinta;

- 5) monitoraggio (mediante videotrappole) degli ingressi e delle uscite dal perimetro di cinta del Parco, da parte di caprioli ed altri Cervidi recettivi a

F.magna.

4. MATERIALI/METODI

4.1 Area di studio

Il Parco Regionale "La Mandria" comprensivo del cd. pre-parco è un territorio di circa 6500 ettari, la metà circa dei quali interamente cintati per una lunghezza di 30 km circa. L'area protetta si inserisce nella cintura nord-est di Torino.

A partire dal XVI secolo, la Tenuta de La Mandria è stata destinata a riserva di caccia della corte sabauda e, in generale, a luogo attrezzato per il soggiorno del Re e della sua corte. I principali palazzi della Tenuta, oggi di interesse storico e architettonico, vennero fatti costruire da Carlo Emanuele II nel XVII secolo (Castello della Venaria) e da Vittorio Emanuele II nel secolo successivo (Borgo Castello, Bizzarria e varie cascine). Sotto il regno di Vittorio Amedeo II fu creato un allevamento di cavalli per le scuderie reali (da cui il nome "La Mandria").

Sul finire dell' 800 la proprietà passò ai Marchesi Medici del Vascello, quindi negli anni che vanno dal 1920 al 1930 vennero compiute grandi opere di bonifica, che fecero assumere alla Tenuta l'aspetto attuale. Nel 1946 il Marchese fu costretto ad effettuare i primi frazionamenti, tra cui la cessione alla Fiat, nel 1958, di una grande fascia di terreno sulla quale verrà ricavata una pista di collaudo per auto; nel 1960 fu la volta di 243 ettari destinati all'insediamento di un campo da golf; in seguito altri 430 ettari furono acquistati dalla famiglia Bonomi Bolchini come riserva di caccia; un lotto di 400 ettari fu ceduto per erigersi il complesso residenziale i "Roveri" ed un altro campo da golf ed infine un'ultima porzione, di circa 11 ettari fu destinata all'istituto zoo-profilattico del Piemonte. Questi frazionamenti terminarono nel 1976 con l'acquisto, da parte della Regione Piemonte, di 1345 ettari a cui saranno poi aggiunti, nel 1995 i 500 ettari della Tenuta dei Laghi, fino ad allora di proprietà della famiglia Bonomi Bolchini.

L'istituzione del Parco Regionale "La Mandria" risale al 21 agosto 1978.

4.2 Flora e fauna del Parco

Il Parco è caratterizzato da una notevole ricchezza di habitat d'acqua dolce essendovi numerosi i laghi di origine artificiale, i rii, i canali e le zone acquitrinose; tale rete idrica concorre ad aumentare la diversità floristica e faunistica dell'area. Tutta l'area della Mandria è tributaria al Torrente Ceronda, che a sua volta si inserisce nel bacino idrografico della Stura di Lanzo. La confluenza tra questi due fiumi avviene poco più a valle del Parco stesso.

Da un punto di vista geomorfologico, il Parco è caratterizzato da un territorio molto eterogeneo: foreste che si alternano a spazi aperti, corsi d'acqua, zone umide e stagnanti. Questi territori, insieme alla vicinanza della catena alpina e delle aste fluviali della Dora Riparia e della Stura di Lanzo, rendono il Parco un'area di importante valenza naturalistica.

I fattori naturali che insistono sul territorio del Parco, come ad esempio la quota, la latitudine, il suolo e il clima, fanno sì che la vegetazione evolva verso uno stadio ottimale di climax rappresentato da una foresta di latifoglie dominata da querce. In origine la foresta de "La Mandria" si presentava in modo stratificato, con il dominio di grandi alberi che potevano raggiungere anche i 45 m di altezza come il Rovere (*Quercus petraea*), la Farnia (*Quercus robur*) e il Carpino comune (*Carpinus betulus*); vi era poi uno strato intermedio costituito da specie arboree come il Frassino (*Fraxinus xanthoxyloides*), il Tiglio selvatico (*Tilia cordata*) e il Ciliegio (*Prunus avium*), ed infine uno strato ancora più basso in cui si trovavano arbusti come il Sanguinello (*Cornus sanguinea*), il Corniolo (*Cornus mas*), il Ligustro (*Ligustrum Vulgare*), il Biancospino (*Crataegus Levigata*) e il Nocciolo (*Corylus avellana*).

Oggi la superficie forestale risulta frammentata a causa degli interventi di disboscamento e bonifica effettuati tra il 1920 e il 1950. Inoltre, l'utilizzo dell'area per il pascolo del bestiame (avvenuto fino agli Anni Novanta) e l'introduzione di specie alloctone come la Robinia (*Robinia pseudoacacia*), la Quercia rossa (*Quercus rubra*) e il Pino Strobo (*Pinus strobus*) hanno determinato un allontanamento dallo stato originario.

La fauna è una delle componenti fondamentali del parco. Stagionalmente è possibile registrare la presenza di specie aviari migratrici su brevi e lunghe distanze, fra cui specie non comuni come *Grus grus* (gru europea), *Egretta alba* (airone bianco), *Ciconia nigra* (cicogna nera). Nei 6500 ettari di Parco e pre-parco sono state avvistate ben 181 specie di uccelli, di cui 70 sono di accertata nidificazione. Fa queste citiamo: *Otus scops* (assiolo), *Caprimulgus europaeus* (succiacapre), *Ciconia ciconia* (cicogna europea), *Coracias garrulus* (ghiandaia marina), *Picus viridis* (picchio verde), *Phoenicurus phoenicurus* (codiroso).

Sono presenti anche diverse specie di invertebrati tutelate dalla Direttiva 92/43/CEE, come ad esempio *Callimorpha quadripunctata* (falena dell'edera), *Coenonympha oedippus* (Lepidoptera), *Lycaena dispar* (licena delle paludi), *Lucanus cervus*, (cervo volante) *Cerambix cerdo* (cerambice della quercia), *Satyrium pruni*, forse il ropalocero più minacciato in Italia, ed infine *Austropotamobius pallipes* (gambero di fiume). Tra le 9 specie di rettili censite spicca *Emys orbicularis* (testuggine palustre); tra gli anfibi *Triturus cristatus* (tritone crestato), *Hyla arborea* (raganella), *Rana dalmatina* (rana agile) e *Pelophylax lessonae* (rana dei fossi).

I pesci costituiscono un'importante componente del patrimonio faunistico del Parco; è stata accertata la presenza di 26 specie ittiche, di cui 17 indigene.

I mammiferi sono presenti con 43 specie tra le quali si trovano *Myotis myotis* (vespertilio maggiore) e *Myotis blythii* (vespertilio minore), due delle specie di chiroteri più rare a livello regionale (si conoscono solo altre 4 stazioni in Piemonte e Valle d'Aosta). Fra i predatori sono ricomparse *Martes martes* (martora) e *Mustela putorius* (furetto), ma sono i grandi mammiferi ungulati a caratterizzare l'area e richiamare la maggior attenzione da parte dei molti visitatori.

Il passato di riserva di caccia reale ha segnato in modo indelebile la componente faunistica del Parco. Ad esempio, gli esemplari di Wapiti introdotti nel 1865 hanno geneticamente compromesso l'originaria popolazione di *Cervus elaphus*. Sospesa la caccia dopo il passaggio della Tenuta a Parco, agli inizi degli anni '90 la popolazione ibrida di cervi ha registrato un notevole aumento numerico, che ha costretto i gestori dell'area protetta ad attuare un piano di riequilibrio, giustificato in particolare dal grave impatto sulla rinnovazione forestale con conseguenti danni sulle altre componenti dell'ecosistema. La popolazione di cervo si aggira oggi attorno alle 500 unità.

Il cinghiale (*Sus scrofa*) fu reintrodotta solo a partire dagli anni '70, raggiungendo in poco tempo densità di popolazione elevatissime a causa delle eccezionali condizioni bioclimatiche e risorse trofiche dell'area. Per questo motivo nel parco si provvede al contenimento numerico di questa specie, con rimozione annua di 600-900 capi.

Il daino (*Cervus Dama*) è presente nel parco con circa 200 esemplari.

Il capriolo (*Capreolus capreolus*), estintosi sul finire degli Anni Settanta e nel frattempo esplosa demograficamente ai confini dell'area protetta, sta nuovamente tentando di ricolonizzare il Parco. Il numero dei caprioli stabilmente presenti nella parte cintata del Parco non è disponibile, ma si ritiene non superi attualmente la decina di individui.

4.3 Azione obiettivo 1 - Sorveglianza attiva sui ruminanti selvatici

Per indagare sulla presenza di animali infestati da *F. magna* nel territorio circostante l'area cintata del PNLM, è stata attivata una collaborazione con il Comprensorio Alpino TO4. Precisiamo che un comprensorio alpino (CA) è istituto di gestione faunistico-venatoria previsto dalla legge n° 157/92. È un ente privato ma di fatto, e ai sensi della Legge, svolge pubbliche funzioni per conto dell'autorità regionale, occupandosi di organizzazione dell'attività venatoria e di gestione della fauna e del territorio in senso lato.

Più precisamente, ogni comprensorio alpino è dotato di un centro di controllo nel quale ogni cacciatore è tenuto a presentare, in giornata, il capo abbattuto. Su questo, un tecnico faunistico appositamente incaricato effettuerà il segnalamento, una serie di accertamenti di carattere biometrico e, all'occorrenza, eventuali indagini sanitari. Il tecnico faunistico inoltre ha le competenze per progettare, organizzare e analizzare le ricognizioni della consistenza faunistica e della capacità biotica del territorio, in modo tale da raggiungere o mantenere un equilibrio tra la conservazione delle specie di interesse venatorio e di quelle protette, l'ambiente naturale e le attività agricole e forestali sostenibili.

Il nostro riferimento è stato il centro di controllo del Comprensorio Alpino Torino 4 sito in Germagnano (To) in via Borgo Nuovo 20.

Il Comprensorio Alpino TO4 comprende il territorio delle tre Valli di Lanzo (Val di Viù, Val d'Ala e Val Grande), delle Valli Tesso e Malone e delle Valli

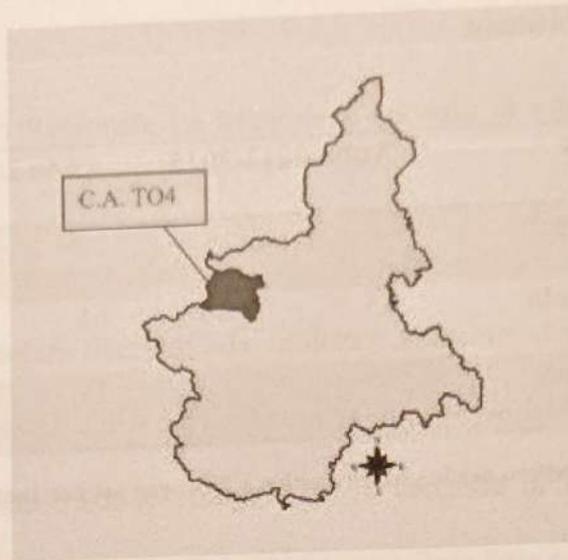


Figura 4.1: comprensorio CATO4 all'interno della regione Piemonte

Ceronda e Casternone, estendendosi su 73.800 ha di superficie planimetrica.

Per una gestione più efficace delle attività di prelievo venatorio, il comprensorio è stato suddiviso in cinque distretti per le specie camoscio e capriolo e in due distretti per il muflone. Per il cervo, specie di recente reintroduzione la cui gestione cinegetica è iniziata solo nella stagione 2012/2013, non è stata prevista una suddivisione in distretti.

Il distretto di nostro interesse, adiacente all'area di pre-parco, era quello identificato con il numero 5.

Il Distretto 5 "Valli Ceronda, Casternone e Bassa Val di Viù" occupa il territorio delle omonime valli, comprendendo parte del territorio dei comuni di Valdellatorre, Givoletto, La Cassa, Fiano, Vallo T.se, Cafasse, Lanzo T.se, Germagnano, Traves e Viù, estendendosi su 11.294 ha, nella porzione sud-orientale del Comprensorio.

L'attività di sorveglianza per *F. magna* si è svolta nelle stagioni venatorie 2012/2013 e 2013/2014, prendendo in considerazione le specie capriolo, camoscio e muflone.

Nel Distretto 5 non sono invece presenti esemplari di cervo nel piano di tiro. Per ognuna di queste specie erano disponibili, in giorni e periodi pre-stabiliti, i seguenti capi da abbattere:

Specie	Anno 2012/2013	Anno 2013/2014
Camoscio	28	28
Capriolo	45	65
Muflone	36	28

Tabella 4.1: Piano di prelievo per le specie recettive a *F. magna* nei due anni di realizzazione del piano di sorveglianza attiva

Per la stagione 2012/2013 il prelievo venatorio ha avuto inizio il 15/9 protraendosi fino al 13/10; dopo una settimana di interruzione, è poi ripreso il 20/10 fino al 17/11. I giorni di prelievo sono stati il lunedì, il giovedì ed il sabato.

Per la stagione 2013/2014 il prelievo venatorio ha avuto inizio il 21/9 protraendosi fino al 19/10. E' poi ripreso il 24/10 fino al 21/11. Anche in questo caso i giorni destinati al prelievo sono stati lunedì, il giovedì e il sabato.

I capi abbattuti sono stati sottoposti ad ispezione allo scopo di evidenziare lesioni (in particolar modo a livello epatico) suggestive di infestazione da *F. magna*, tanto in fase di migrazione come di localizzazione. Il fegato veniva consegnato al centro di controllo assieme all'animale abbattuto e qui veniva ispezionato macroscopicamente. Nel caso di situazioni dubbie, il fegato veniva sezionato per evidenziare meglio eventuali lesioni macroscopiche.

4.4 Azione obiettivo 2 - Sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici

All'interno del Parco Regionale La Mandria il servizio di vigilanza è garantito da personale interno.

Fra gli innumerevoli compiti dei guardiaparco vi è anche il recupero di fauna in difficoltà e di esemplari deceduti, da inoltrare ai centri diagnostici presenti sul territorio (essenzialmente Università e Istituto Zooprofilattico Sperimentale). Previo accordo con l'Amministrazione competente, le carcasse di capriolo ritrovate nel PNLM (pre-parco compreso) nel 2013 e 2014 sono state fatte pervenire presso la sala necroscopie del Dipartimento di Scienze Veterinarie.

Le necroscopie hanno avuto come obiettivo principali: 1) l'accertamento della causa di morte; 2) la messa in evidenza di eventuali lesioni suggestive di infestazione da *F. magna*.

Per il secondo obiettivo, il fegato dell'animale deceduto era sottoposto a:

- ispezione (margini, dimensioni, colore, aspetto delle sierose, regolarità della superficie)
- palpazione (consistenza)
- incisione (tagli paralleli, in modo da ottenere "fette" dello spessore di un cm circa, che venivano poi lavate in acqua all'interno di una bacinella in plastica.

Il contenuto di quest'ultima veniva poi sottoposto, per aliquote, ad una prima osservazione ad occhio nudo, seguita da verifica allo stereomicroscopio, 10-40x).

I parassiti messi in evidenza sono stati fissati in etanolo 70% per eventuali approfondimenti di natura molecolare.

4.5 Azione obiettivo 3 - Caratterizzazione dei siti favorevoli alla presenza degli ospiti intermedi di F. magna con produzione di mappe tematiche

Per indirizzare la ricerca e raccolta dei gasteropodi acquatici (*G. truncatula* e *R. peregra*) potenziali ospiti intermedi di *F. magna* è stata creata e successivamente validata una mappa predittiva della loro localizzazione all'interno dell'area di studio.

A questo scopo, l'applicativo utilizzato è stato il software QGIS 2.6.1 (*QGIS core team, 2014*), un GIS Desktop open-source per la gestione, visualizzazione, modifica ed analisi di dati geografici. QGIS opera sulle più comuni piattaforme informatiche quali Windows, MacOSX e Linux. La possibilità di espandere le funzionalità di base del software tramite plugins ne ha favorito la rapida diffusione e, al momento, QGIS 2.6.1 è uno dei softwares maggiormente apprezzati nel mondo open source (e non solo) per la visualizzazione ed analisi di dati geografici.

Per la creazione aprioristica della mappa di rischio sono state considerate le seguenti due variabili, che come indicato in letteratura possono influenzare la presenza dei gasteropodi (*Rapsch et al., 2008*):

- permeabilità dei suoli
- tipologia di utilizzo del soprassuolo

Permeabilità dei suoli. La permeabilità dei suoli è direttamente correlata con le loro caratteristiche pedologiche. I dati pedologici sono disponibili sul sito della Regione Piemonte in scala 1:50.000 al seguente URL: http://www.regione.piemonte.it/agri/area_tecnico_scientifica/suoli/suoli1_50/carta_suoli.htm

Il relativo file è uno shapefile (.shp), popolare formato vettoriale per i sistemi GIS. Associato a questo file è disponibile un database che contiene la descrizione delle

caratteristiche e proprietà del suolo. Per una corretta consultazione degli attributi associati al suolo si è fatto riferimento al “*Manuale di campagna per il rilevamento e la descrizione dei suoli*” edito dall’IPLA, Istituto per le Piante da Legno e l’Ambiente, con sede in Torino (www.ipla.org/).

Nel database associato alla carta pedologica regionale, la permeabilità dei suoli, definita come “il movimento dell’acqua nel suolo in condizioni di saturazione”, è classificata in 6 classi. All’interno della nostra zona di studio le classi sono 5; la classe 1 indica una permeabilità molto alta mentre i valori più elevati sono indicativi di bassa permeabilità e di ristagni favorevoli alla presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*. Ai nostri scopi, le cinque classi di permeabilità di cui alla carta pedologica regionale sono state risuddivise in tre classi di rischio (alto, medio e basso) in relazione all’eventuale presenza di detti gasteropodi, con valore numerico associato compreso fra 10 (rischio basso) a 30 (rischio alto).

Per le classi 1-2, che indicano permeabilità alta, il punteggio è stato stabilito essere pari a 10 , che diventava 20 per la classe 3 e 30 per le classi 4-5.

La riclassificazione della permeabilità è esemplificata in *Tab.4.2*:

PERMEABILITÀ SUOLO	PUNTEGGIO	RISCHIO
Alta(Classi 1-2)	10	Basso
Media (Classe 3)	20	Medio
Bassa (Classi 4-5)	30	Alto

Tabella 4.2: riclassificazione permeabilità

Tipologia di utilizzo del soprassuolo. Nel database associato alla carta pedologica della Regione Piemonte (cfr) viene descritto anche l’attuale utilizzo del soprassuolo. Anche in questo caso le classi di utilizzo del soprassuolo sono state riclassificate in tre classi di rischio - basso, medio e alto - in base alla loro minore e maggiore

idoneità ad accogliere microhabitats favorevoli alla presenza dei gasteropodi potenziali vettori di *F. magna*.

La nuova classificazione prevede la distinzione in 3 classi, corrispondenti alle aree agricole, a quelle forestali e a quelle a prevalenza pastorale o di formazioni erbacee seminaturali (Tab 4.3) :

USO DEL SUOLO	PUNTEGGIO	RISCHIO
Aree Agricole	10	Basso
A.Forestali	20	Medio
A prevalenza pastorale	30	Alto

Tabella 4.3: riclassificazione uso suolo

Come si evince dalla tabella soprastante, per quanto riguarda le caratteristiche del soprassuolo non sono state prese in considerazione le aree urbanizzate, mentre i fiumi sono stati identificati come ambienti a basso rischio.

La mappa di rischio per la presenza dei gasteropodi potenziali vettori di *F. magna* è stata generata, come da Fig.4.2, mediante sovrapposizione tra layers, nella fattispecie i layers “utilizzo del soprassuolo” e “permeabilità dei suoli”, sommando i valori numerici relativi a ciascuno dei due parametri. In questo modo, il rischio di presenza dei gasteropodi poteva variare in un range compreso fra 10 e 60. Da ultimo, detti valori sono stati ricondotti alle tre categorie di rischio basso, medio e alto (cfr. Tab. 4.4).

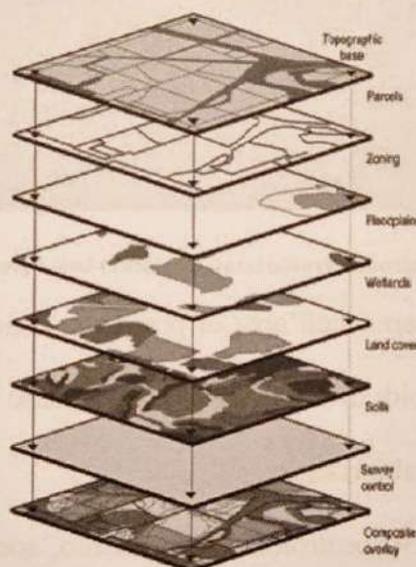


Figura 4.2: esempio di sovrapposizione di layers in QGIS

10-20	Basso
30-40	Medio
50-60	Alto

Tabella 4.4: Valori numerici e corrispondenti categorie di rischio per la presenza di gasteropodi potenziali ospiti intermedi di *F. magna*

La mappa di rischio così generata è stata poi sottoposta a validazione in campo, per verificare la sua effettiva capacità di predire la presenza e l'abbondanza dei gasteropodi (e quindi la presenza potenziale di *F. magna*).

A questo scopo, la mappa relativa all'area di studio è stata suddivisa in celle (quadranti) delle dimensioni di 200m x 200m e per ogni quadrante è stato identificato il punto centrale (centroide), individuandone l'appartenenza ad una delle tre categorie di rischio, come da *Fig.4.3*.



Figura 4.3 Esempio di centroidi caratterizzati da rischio basso (verde), medio (giallo) e alto (rosso)
Successivamente, all'interno dell'area di pre-parco sono stati selezionati - in modo randomizzato - 30 centroidi di cui 10 nella zona a basso rischio, 10 in quella a medio rischio e 10 in quella ad alto rischio.

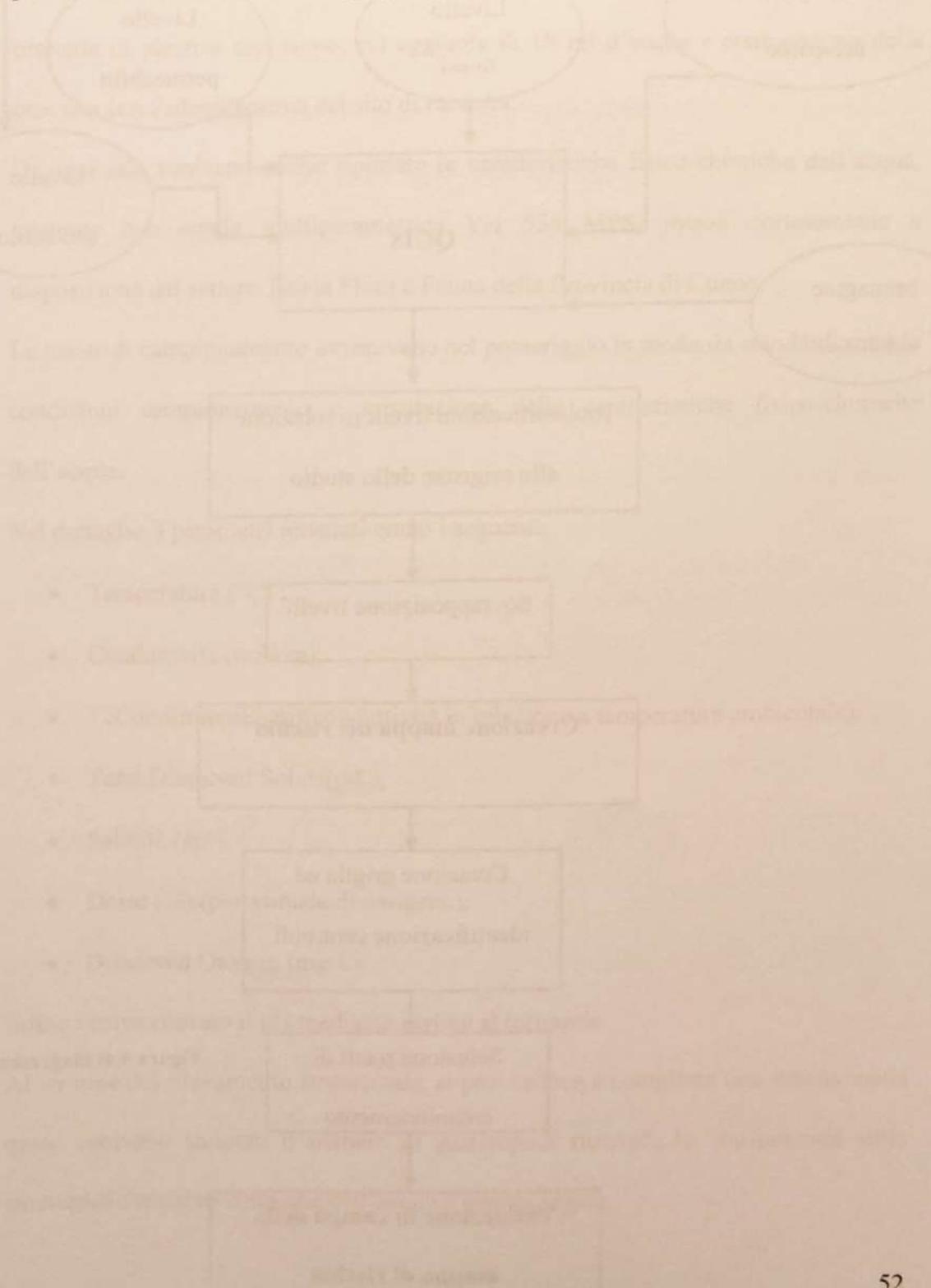
Una volta identificati i 30 centroidi di riferimento, sono stati loro assegnati delle sigle dividendo la zona di pre-parco in 3 sottozone rispettivamente denominate: sud, medio e nord come illustrato nei Risultati (cfr).

Per ognuno dei 30 centroidi sono state estrapolate le coordinate (datum UTM-WGS84), successivamente inserite in un GPS, Garmin Etrex 10.

Durante il primo campionamento da noi effettuato, ci si è posizionati all'interno di ogni singolo centroide utilizzando il GPS ed è stato perlustrato un raggio di 100 metri intorno al centroide al fine di ritrovare e identificare la presenza di ambienti acquitrinosi favorevoli alla presenza di gasteropodi acquatici.

Ogni ambiente potenzialmente favorevole veniva georeferenziato in vista dei successivi campionamenti, e rinominato univocamente come sottopunto del quadrante di riferimento.

Di seguito, tramite diagramma di flusso, sono illustrati i diversi passaggi che hanno portato alla creazione della mappa predittiva (Fig. 4.4).



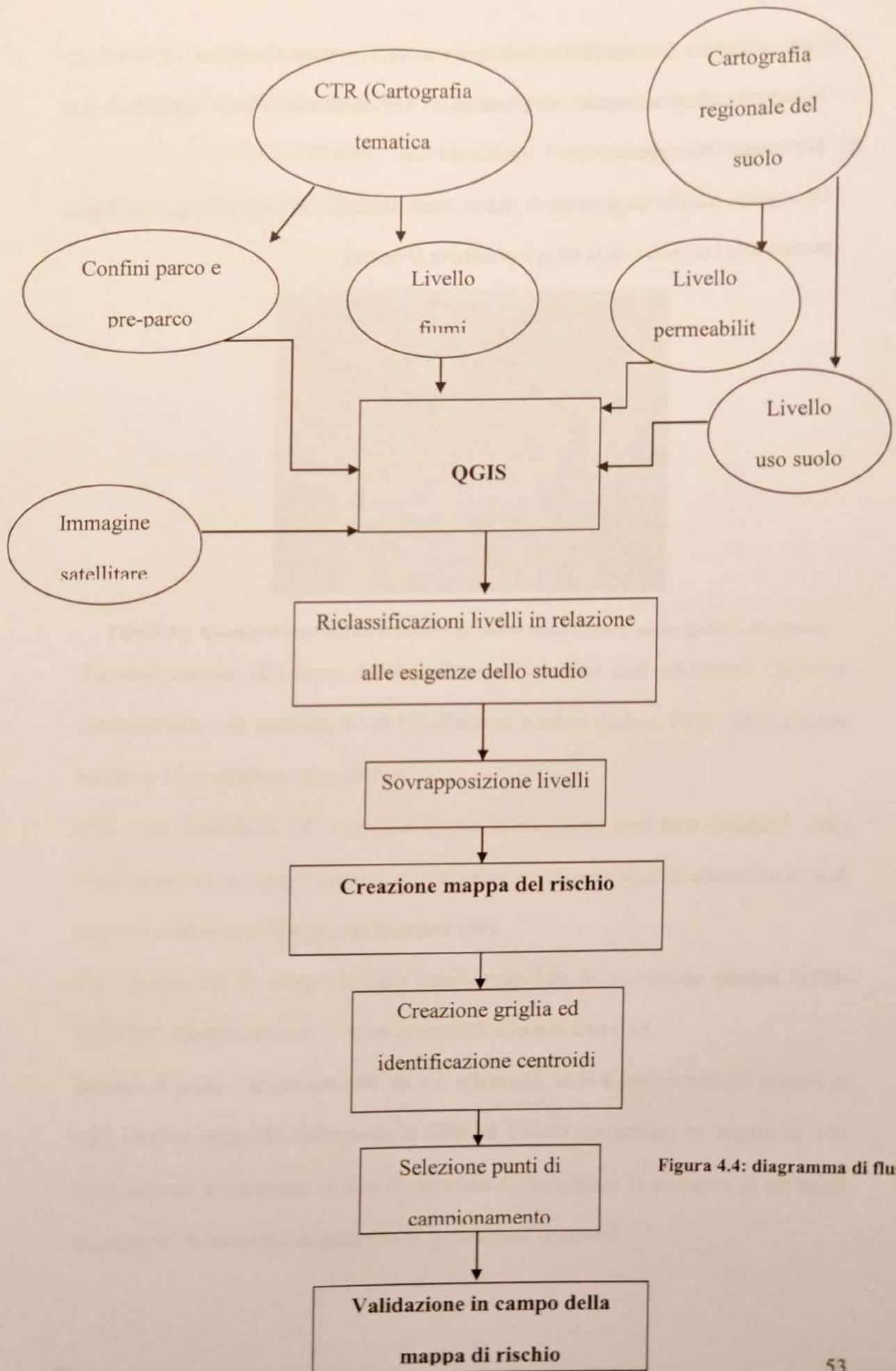


Figura 4.4: diagramma di flusso

La raccolta dei gasteropodi in corrispondenza dei siti potenzialmente favorevoli individuati attorno ai centroidi selezionati avveniva secondo la seguente metodica: i) attenta esplorazione del sito per mettere in evidenza i gasteropodi (max. 5 min); ii) a partire dal ritrovamento del primo gasteropode, raccolta dei suoi "simili" per la durata cronometrata di 5 minuti; iii) conteggio introduzione dei gasteropodi in una provetta di plastica con tappo; iv) aggiunta di 10 ml d'acqua e contrassegno della provetta con l'identificativo del sito di raccolta.

Di ogni sito venivano anche riportate le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua, misurate con sonda multiparametrica Ysi 556 MPS, messa cortesemente a disposizione dal settore Tutela Flora e Fauna della Provincia di Cuneo.

Le uscite di campionamento avvenivano nel pomeriggio in modo da standardizzare le condizioni campionamento e misurazione delle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua.

Nel dettaglio, i parametri misurati erano i seguenti:

- Temperatura (°C) ;
- Conduttività (mS/cm);
- TcCond(microS/cm)(conduttività in relazione a temperatura ambientale);
- Total Dissolved Solids(g/L);
- Salinità (ppt);
- Dosat (%) (percentuale di ossigeno);
- Dissolved Oxygen (mg/L);

Infine veniva rilevato il pH mediante cartine al tornasole.

Al termine del rilevamento strumentale, si provvedeva a compilare una scheda nella quale venivano annotati il numero di gasteropodi ritrovati, le misurazioni sulle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua e quanto segue:

- Presenza di altri gasteropodi, oltre ai potenziali ospiti intermedi di *F. magna*
- Presenza/Assenza di alghe
- Tipo di fondo (se fangoso o roccioso)
- Presenza di acqua corrente oppure stagnante.

Le limnee raccolte venivano trasportate nel laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie e congelate ad una temperatura di -18°C in attesa di sottoporle ad analisi molecolare per la presenza di DNA di *F. magna*.

Il campionamento a fini di validazione della mappa di rischio è stato effettuato nel 2013, e più precisamente in:

- Primavera (fine Maggio - inizio Giugno)
- Estate (fine Luglio - inizio Agosto)
- Autunno (fine Settembre - inizio Ottobre)

4.5.1 Valutazione rischio all'interno del Parco Regionale La Mandria

Al fine di confrontare il livello di rischio nella zona di pre-parco con quello rilevabile nell'area "endemica" all'interno del parco della Mandria, nel 2014 è stata effettuata una successiva campagna di campionamento per rilevare le differenze nella presenza di limnee ed i parametri fisico-chimici rispetto alle zone esterne al parco.

Per valutare questa ipotesi si è utilizzata la precedente mappa predittiva andando a campionare punti con diverse zone di rischio nell'area del parco.

Nell'area di pre-parco invece sono stati utilizzati i punti definiti come alto rischio nel 2013. Infine il numero di limnee ritrovate, i parametri acquatici e quelli fattoriali rilevati dentro e fuori dal Parco sono stati messi in correlazione

Questo è stato fatto per valutare la densità media di limnee dentro e fuori dal parco e per evidenziare particolari condizioni ambientali che possano garantire un maggiore ritrovamento dell'ospite intermedio all'interno del parco stesso.

4.6 Azione obiettivo 4 - Ricerca delle forme larvali di F. magna negli ospiti intermedi

Nel nostro studio ci siamo esclusivamente occupati della ricerca delle forme larvali immature di *F. magna* tramite estrazione del DNA totale dell'ospite intermedio e ricerca del DNA del parassita all'interno di quest'ultimo tramite PCR. Per l'estrazione del DNA totale dell'ospite intermedio è stato utilizzato il kit commerciale NucleoSpin Tissue (Machegerey-Nagel).

I gasteropodi raccolti, differenziati per sito di prelievo, sono stati preventivamente misurati e identificati a livello di specie secondo le chiavi (apertura conchiglia, forma spirale e dimensioni) presenti in "*Atlante delle conchiglie terrestri e dulciacquicole italiane*".

Le parti molli dei singoli gasteropodi (in toto nel caso di quelli appartenenti al genere *Lymnea* e una parte nel caso di quelli appartenenti al genere *Radix*), erano poi individualmente introdotte in provette Eppendorf, identificate con un codice, e infine conservate in freezer a -18°C.

Il protocollo per l'estrazione del DNA da dette parti molli prevedeva, dopo lo scongelamento, i seguenti passaggi:

aggiungere 180 µl di Buffer T1 e successivamente 25 µl di proteinasi K lasciando agire la proteinasi per tutta la notte ad una temperatura di 56°C;

- 1) terminata l'incubazione, aggiungere 200 µl di Buffer B3 ai campioni ed incubare a 70° per 10 minuti;
- 2) Aggiungere 210 µl di etanolo (96%-100%) ai campioni;

- 3) Trasferire ciascun campione in "spin columns" fornite dal kit e inserirle in provette da 2ml. All'interno di queste "colonnine" il DNA contenuto nel campione si lega alla membrana di silice presente mentre il lisato, con successive centrifugazioni e lavaggi, viene eliminato; dopo questi passaggi si effettua una centrifugazione per 1 minuto a 14,000 rpm.
- 4) Lavare la membrana aggiungendo inizialmente 500 µl di Buffer BW, centrifugare per 1 minuto a 14,000 rpm; svuotare la provetta da 2ml dal lisato e effettuare un secondo lavaggio utilizzando 600 µl di buffer B5; centrifugare sempre per 1 minuto a 14,000 rpm.
- 5) Asciugare la membrana da eventuali residui di etanolo centrifugando per 1 minuto a 14,000 rpm,.
- 6) Aggiungere 30 µl di tampone BE precedentemente riscaldato a 70°C, incubare le colonnine per 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugare per 1 minuto a 14,000 rpm per eluire il DNA.

La concentrazione del DNA è stata quantificata mediante utilizzo del NanoDrop, Spettrofotometro UV-Visibile.

Terminata l'estrazione del DNA genomico si è proceduto con la PCR, tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

I primer considerati per l'amplificazione del DNA di *F. magna* sono stati 2:

ITS-1 → ITS-1 F (5'-TGTCATGCGATAAAAATGTTTT-3) ITS-1 R (5'-CTGGACCCGCGCCCGAAGGA-3) bp:127

ITS-2 → ITS-2 F (5'-ACCAGTTATCGTTGTGTTG-3) ITS-2 R (5'-CCGTCTTTAAACAACAG-3) bp:152

Inizialmente sono stati utilizzati entrambi per valutare quale fosse più efficiente nell'amplificazione.

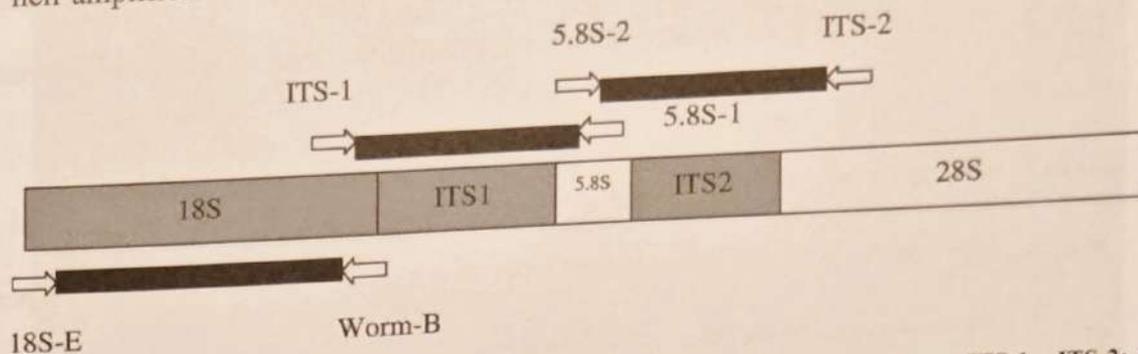


Figura 4.5: schema del gene ribosomiale nucleare con la relativa posizione dei primers ITS-1 e ITS-2: I box grigi indicano i geni da replicare, i box neri indicano i frammenti amplificati, le frecce indicano posizione e direzione dei primers

Dopo alcuni tests preliminari si è deciso di utilizzare il primer ITS-1.

Per quanto riguarda la PCR è stato utilizzato il seguente protocollo:

- Buffer (10x) concentrazione finale : 1x
- MgCl₂ (25 mM) : 2,5mM
- dNTP (10mM) : 0,2mM
- Primer F (10µM) : 0,4 µM
- Primer R (10µM) : 0,4 µM
- TAQ (5U/µl) : 1 U/reaz
- DNA *F. magna* : 10/20 n/g

Si è scelto di usare un volume di reazione di 25 µl.

Le provette sono state inserite nel termociclatore alle seguenti condizioni:

- 95°C x 15 min
 - 94°C x 30 sec
 - 55°C x 45 sec
 - 72°C x 1,5 min
 - 72°C x 10 min
- } 35 cicli

La lettura della PCR è stata fatta mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%.

Al gel, quando era ancora liquido, è stato aggiunto del bromuro d'etidio, agente intercalante il DNA che, esposto ai raggi ultravioletti, emette fluorescenza e rende possibile evidenziare il DNA .

Dopo aver fatto solidificare il gel in ogni pozzetto, sono stati caricati 5 µl di amplificato oppure 5 µl di DNA "ladder", per avere uno standard di riferimento per il peso molecolare dei segmenti amplificati.

Il controllo positivo era costituito da DNA estratto da un esemplare adulto di *F. magna*.

Il DNA è stato fatto correre per 30 minuti circa a 100-120V e poi analizzato con luce ultravioletta.

I campioni considerati positivi sono stati quelli che all'analisi con luce ultravioletta risultavano identificabili tramite la presenza del frammento corrispondente a 127 paia di basi.

4.7 Azione obiettivo 5 - Monitoraggio mediante videotrappole degli ingressi e delle uscite dal Parco di caprioli ed altri Cervidi recettivi a F. magna

Nel corso di due cicli annuali, e precisamente da marzo 2012 a marzo 2014, gli unici due siti del Parco ipotizzabili come punti di transito di Cervidi da e verso l'esterno del muro di cinta sono stati monitorati tramite utilizzo di foto-videotrappole.

Detti punti corrispondono all'ingresso ed alla fuoriuscita del fiume Ceronda (*Loc. La Bizzarria e Loc. Ponte Del Violino*), dove sono presenti semplici paratie semovibili (*Fig.5*), in quanto tali permeabili al passaggio di animali.

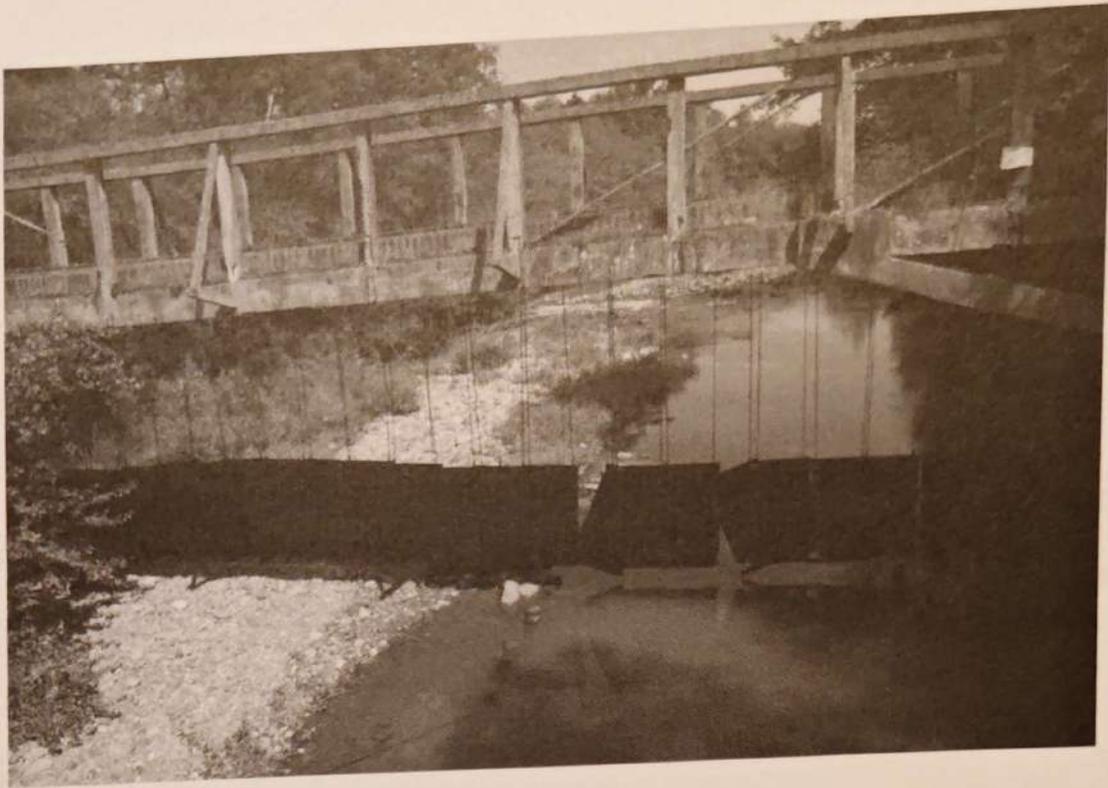


Figura 4.6: Paratie semovibili sul punto di entrata del fiume Ceronda

Il monitoraggio è stato effettuato tramite l'utilizzo di 4 video-fototrappole (IR-Plus) posizionate in modo da ottenere riprese quanto più lunghe possibili. Il posizionamento delle fototrappole era effettuato in modo da indagare l'intera area di ipotetico passaggio degli animali. A questo scopo sono state fissate su alberi presenti nelle immediate vicinanze delle paratie, ad altezza "uomo" e direzionate verso queste ultime.

Le videofototrappole sono state utilizzate una settimana/mese per due anni, per un totale di 168 giorni di videotrappolaggio. Ciascuno dei due punti prescelti è stato monitorato con due videofototrappole.

L'obiettivo era quello di verificare se i punti lungo il muro di cinta, ipotizzati come "passaggi", lo fossero effettivamente e, nel caso, con quale frequenza fossero utilizzati da Cervidi.

4.8 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando i programmi R (*R core team, 2015*) ed EPIINFO (*Dean et al., 2011*).

Per la fase di validazione della mappa si è rapportato il numero di ambienti in cui la presenza del gasteropode è stata verificata con le zone di rischio identificate in basso, medio e alto.

Si è valutato quanto fosse elevato il rischio di ritrovare il gasteropode nelle zone contrassegnate come rosse rispetto alle altre zone.

Per fare questo è stata utilizzata una tabella di contingenza 2x2 con il calcolo dell'Odds ratio ed è stato utilizzato il test del chi-quadrato di Pearson con la correzione di continuità di Yates.

Per i parametri numerici raccolti con la sonda multiparametrica e quelli fattoriali annotati si è dapprima effettuata una statistica descrittiva calcolando media e mediana del parametro in relazione alla presenza e all'assenza del gasteropode. Si è creata una tabella a due colonne suddividendo le zone di ritrovamento del gasteropode da quelle in cui era assente.

Per i parametri fattoriali è stata creata una tabella 2x2 si è effettuato il test del chi-quadrato di Pearson con la correzione di continuità di Yates e ne è stato calcolato l'Odds ratio;

Per i parametri numerici sono stati confrontati tutti i parametri ottenuti dalla sonda correlandoli con il ritrovamento del gasteropode; per fare questo è stato utilizzato il Wilcoxon test.

Per verificare se il Parco Regionale La Mandria fosse a più alto rischio di presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna* rispetto all'area di pre-parco, è stata

dapprima creata una tabella 2x2. Ne sono stati valutati i valori il test del chi-quadrato di Pearson con la correzione di continuità di Yates ed è stato calcolato l'Odds ratio.

Sono stati infine analizzati i parametri ambientali (numerici e fattoriali) confrontando i valori ottenuti dentro il parco con i valori ottenuti nell'area di pre-parco, valutando se potessero essere presenti differenze statisticamente significative fra i due gruppi (dentro Parco/fuori Parco).

Per le variabili numeriche è stato utilizzato il Wilcoxon Test con la correzione di continuità; per le variabili fattoriali invece è stato utilizzato l'Odds ratio ed il test di Pearson con correzione di continuità di Yates.

Il limite di significatività è fissato per un valore di $p < 0,05$.

5. RISULTATI

Nell'illustrare i risultati abbiamo seguito la suddivisione in azioni/obiettivo precedentemente adottata per i "Materiali e Metodi".

5.1 Risultati sorveglianza attiva su selvatici abbattuti

La collaborazione con il CATO4, nella figura del suo tecnico faunistico, ha consentito l'analisi di numerosi individui delle specie camoscio, capriolo e muflone, prelevati nelle stagioni venatorie 2012/2013 e 2013/2014.

Camoscio

Rispetto al piano di prelievo concesso, i capi di camoscio (*Rupicapra rupicapra*) abbattuti sono stati in numero largamente inferiore, come segue (Tab.5.1):

	Anno	Anno
Specie	2012/2013	2013/2014
Camoscio	13/28 - 46,4%	16/28 - 57,1%

Tabella 5.1: numero di capi prelevati della specie camoscio in rapporto al piano di prelievo e relativa percentuale.

Peraltro, tutti i 29 capi abbattuti sono stati ispezionati per la presenza di lesioni epatiche riconducibili a infestazione da *F. magna*.

Capriolo

Per la specie Capriolo (*Capreolus capreolus*) i risultati sono riportati in Tab.5.2.

	Anno	Anno
Specie	2012/2013	2013/2014
Capriolo	24/45 - 53,3%	45/65 - 69,2%

Tabella 5.2: numero di capi prelevati della specie capriolo in rapporto al piano di prelievo e relativa percentuale

I capi controllati sono stati 69 , 24 dei quali prelevati nell'anno 2012/2013 e 45 prelevati nell'anno 2013/2014.

Muflone

Per la specie Muflone (*Ovis aries musimon*) i risultati sono riportati in *Tab.5.3*.

	Anno	Anno
Specie	2012/2013	2013/2014
Muflone	19/36 - 52,8%	18/28 - 64,28%

Tabella 5.3: numero di capi prelevati della specie muflone in rapporto al piano di prelievo e relativa percentuale

I capi controllati per sono risultati essere 37, ripartiti in 19 prelievi nell'anno 2012/2013 e 18 nell'anno 2013/2014.

Dei 135 ruminanti selvatici controllati, nessuno ha presentato lesioni epatiche o extra-epatiche (es. tesaurismosi) riconducibili a infestazione da *F. magna*.

5.2 Risultati sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici

Grazie alla collaborazione coi guardiaparco, sono stati rinvenuti quattro caprioli, di cui uno all'interno del Parco e tre nelle immediate vicinanze (Pre-parco).

I caprioli erano:

1. Femmina adulta (*Fig.5.1*), ritrovata nel febbraio 2012
2. Maschio adulto ritrovato nel luglio 2012
3. Femmina adulta ritrovata nel gennaio 2013
4. Maschio adulto ritrovato nell' ottobre 2013

Gli esami necroscopici hanno permesso di evidenziare la presenza di *F. magna* nel capriolo numero 1, mentre sono risultati negativi al parassita i restanti tre caprioli.

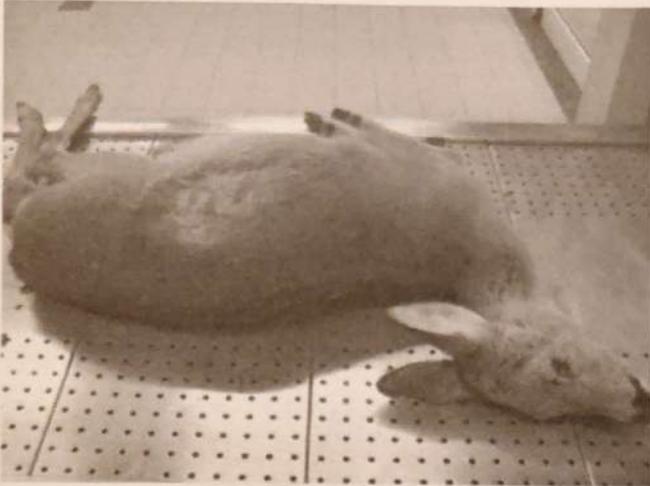


Figura 5.1: capriolo numero 1

Nel capriolo 1, le lesioni evidenziate a livello epatico (Fig.5.2;Fig.5.3) erano chiaramente indicative

dell'infestazione da *F. magna*.

Il fegato si presentava aumentato di volume e con i margini arrotondanti; l'aspetto originario del fegato non era mantenuto a causa delle evidenti alterazioni a carico del periepate (esiti di periepatite fibrinosa con aderenze al diaframma, infiltrazione di pigmento rerastro) e del parenchima sottostante (tumefazioni in corrispondenza di cisti parassitarie, fibrosi).



Figura 5.2: fegato capriolo numero 1

Al taglio dell'organo (Fig.5.3) si è rinvenuta la presenza di pigmenti porfirinici nerastri, fortemente indicativi della parassitosi. Inoltre erano presenti ectasia dei dotti biliari e colangite; le aree di parenchima epatico di aspetto normale erano limitate se non quasi assenti.

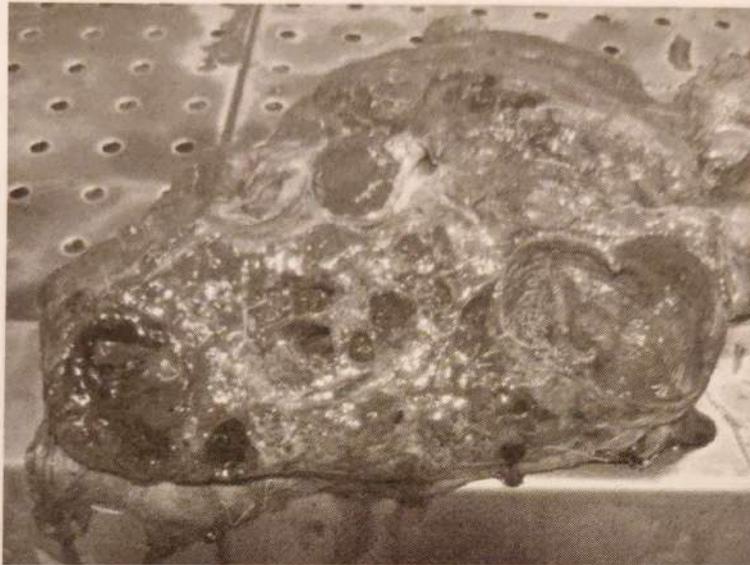


Figura 5.3: sezione longitudinale del fegato del capriolo ritrovato all'interno del Parco

In totale, sono stati raccolti 34 esemplari di *F. magna*, in massima parte adulti.

E' stato inoltre eseguito un esame copromicroscopico quantitativo secondo il metodo di Mc Master, il cui risultato è stata la presenza di 650 uova/grammo di feci.

L'animale appariva in cattivo ma non pessimo stato di nutrizione, e non era gravido.

Nei tre caprioli ritrovati nel Pre-parco non erano invece presenti lesioni riconducibili ad da *F. magna*.

Più precisamente :

- il capriolo numero 2 presentava ematomi diffusi sottocutanei nelle regioni dorsale e toracica destra e sinistra. È stata evidenziata inoltre una frattura vertebrale (vertebra lombare). Le lesioni erano indicative di un possibile impatto con autoveicolo.
- il capriolo numero 3 è stato ritrovato in un fossato e presentava lesioni compatibili con un attacco da canide, in particolare lacerazioni ed ematomi sottocutanei agli arti posteriori. Erano inoltre presenti ulcere abomasali di aspetto lineare, possibile espressione di stress.
- il capriolo numero 4 presentava frattura mandibolare sx , a causa della quale l'approvvigionamento di cibo era limitato. Alla necropsia si è evidenziata la quasi totale assenza di alimento nel rumine e l'animale si presentava fortemente emaciato.

Per le immagini relative ai caprioli 2-4, cfr. il capitolo "Appendici".

5.3 Risultati Caratterizzazione dei siti favorevoli alla presenza degli ospiti intermedi di *F. magna*

Secondo il procedimento illustrato nei Materiali e Metodi (cfr), è stata prodotta una mappa predittiva (Fig.5.4) della presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*.



Figura 5.4: mappa di rischio per ritrovamento dell'ospite intermedio

A partire dalla mappa di rischio sono stati selezionare 30 punti di campionamento, e più precisamente 10 punti per ognuna delle tre fasce di rischio (Fig.5.5).



Figura 5.5: punti di campionamento identificati per differente area di rischio (rossa, arancione, verde)

Concentricamente ai 30 punti sono stati individuati i seguenti 94 micro-ambienti con presenza di acqua nelle 3 stagioni di campionamento, compatibili con la presenza dei gasteropodi potenziali ospiti intermedi di *F. magna* (Tab.5.4):

	Alto Rischio	Medio Rischio	Basso Rischio
Ambienti con acqua	37	28	29

Tabella 5.4: presenza ambienti idonei al ritrovamento degli ospiti intermedi nei 3 campionamenti effettuati

Di seguito vengono elencati i vari ambienti campionati nel pre-Parco. Nel testo sono state inserite immagini rappresentative delle differenti tipologie di ambiente; per immagini più dettagliate si rimanda al capitolo “Appendici”.

Sud 1 con sottopunti Sud 1 1, Sud 1 2 e Sud 1 3:



in questa zona si ha eterogeneità di ambienti umidi, sono presenti canali d’irrigazione (Fig.5.6) e pozze di acqua stagnante ombreggiate

Sud 2 con sottopunto Sud 2 1:

canale di irrigazione con acqua stagnante, non ombreggiato.

Fig.5.6: sottopunto sud_1_1

Sud 3 con sottopunto Sud 3 1: il punto si trova ai margini del fiume Casternone, su fondo roccioso.

Sud 4 con sottopunto Sud 4 1 : il punto si trova ai margini del fiume Casternone su fondo roccioso.

Sud 5 con sottopunti Sud 5 1 : il punto si trova in campi incolti, la quantità di acqua stagnante è limitata.

Sud 8 con sottopunti Sud 8 1 : il punto si trova ai margini del fiume Casternone su fondo roccioso.

Sud 9 con sottopunti Sud 9 1 : Pozza d'acqua stagnante fangosa al limitare del bosco in una zona molto ombreggiata (Fig.5.7).



Figura 5.7: sottopunto Sud 9 1

Sud 10 con sottopunti Sud 10 1, Sud 10 2, Sud 10 3:

questo punto presenta 3 sottopunti, ubicati in campi non coltivati e con condizioni simili. La formazione di acqua stagnante è dovuta ad avvallamenti nel terreno, in zone non ombreggiate.

Sud 11 con sottopunti Sud 11 1 :

il punto si trova nel bosco con poca acqua corrente su fondo roccioso.

Medio 1 con sottopunti Medio 1 1 : il punto si trova sul margine del fiume Ceronda.

Medio 2 con sottopunti Medio 2 1 e Medio 2 2 : i punti si trovano sul margine del fiume Ceronda, uno è costituito da un'insenatura con acqua poco corrente.

Medio 3 con sottopunti Medio 3 1 : canale di irrigazione in campi coltivati, andamento parallelo al muro di cinta del Parco.

Medio 5 con sottopunti Medio 5 1, Medio 5 2, Medio 5 3 : i punti si presentano tutti in canali di irrigazione nei pressi di campi coltivati, non sono presenti zone ombreggiate (Fig.5.8)



Figura 5.8: sottopunto Medio_5_3

Medio 6 con sottopunti Medio 6 1, Medio 6 2 : i punti si presentano in canali di irrigazione o in avvallamenti formati dal terreno, non sono presenti zone d'ombra.

Medio 7 con sottopunti Medio 7 1 : il punto si presenta ai margini del fiume Ceronda.

Figura 5.9: sottopunto Medio_8_2



Medio 8 con sottopunti Medio 8 1, Medio 8 2, Medio 8 3 : i punti si presentano

nel bosco molto fitto, due punti su tre anche sono luoghi di insoglio di cinghiali (*Fig.5.9*).

Medio 10 con sottopunti Medio 10 1, Medio 10 2, Medio 10 3 : i punti sono molto diversi tra loro, sono presenti un canale con acqua corrente per l'irrigazione ma anche piccole pozze in canali in disuso vicino a campi coltivati.

Nord 1 con sottopunti Nord 1 1 : il punto si trova lungo il decorso del fiume Ceronda.

Nord 3 con sottopunti Nord 3 1 : il punto si trova lungo il decorso del fiume Ceronda

Nord 4 con sottopunti Nord 4 1: il punto si trova in un piccolo affluente del fiume Ceronda con fondo roccioso

Nord 5 con sottopunti Nord 5 1 : il punto si trova lungo il decorso del fiume Ceronda

Nord 6 con sottopunti Nord 6 1, Nord 6 2 :

i punti si trovano al limitare del bosco, uno è un piccolo canale di irrigazione con un basso volume d'acqua e l'altro punto è una pozza stagnante di notevoli dimensioni presente in tutte le stagioni (*Fig.5.10*).



Figura 5.10: sottopunto Nord_6_2

Nord 9 con sottopunti Nord 9 1, Nord 9 2, Nord 9 3: si trovano tutti all'interno del bosco e sono piccoli corsi d'acqua con acqua poco corrente o stagnante.

Alcuni punti non sono presenti nell'elenco dei siti perché non ospitavano ambienti idonei al ritrovamento di gasteropodi acquatici.

Gli ambienti umidi positivi per la presenza degli ospiti intermedi sono risultati essere i seguenti :

Sud 1 1, Sud 2 1, Medio 3 1, Medio 5 2, Medio 10 3, Nord 6 1, Nord 6 2.

Più precisamente questi ambienti umidi erano così ripartiti per fascia di rischio :

Alto Rischio	Medio Rischio
Sud_1_1	Sud_2_1
Medio_10_3	Medio_3_1
Nord_6_1	Medio_5_2
Nord_6_2	

Tabella 5.5 zone di ritrovamento gasteropodi ripartite per zone di rischio

È da sottolineare il fatto che il ritrovamento di gasteropodi in occasione delle 3 sessioni di campionamento non è risultato costante, come si può evincere dalla tabella sottostante :

	Primavera	Estate	Autunno
Sud_1_1	Negativo	Positivo	Positivo
Sud_2_1	Positivo	Negativo	Negativo
Medio_3_1	Positivo	Negativo	Positivo
Medio_5_2	Positivo	Positivo	Negativo
Medio_10_3	Positivo	Positivo	Positivo
Nord_6_1	Positivo	Positivo	Negativo
Nord_6_2	Positivo	Positivo	Positivo
Totale	6	5	4

Tabella 5.6: ripartizione dei gasteropodi ritrovati nei 3 campionamenti effettuati; "positivo"

indica la presenza di gasteropodi, "negativo" l'assenza.

Il totale dei punti campionati nelle tre stagioni, in cui erano presenti gasteropodi, è risultato pari a 15. Soltanto due punti nell'area ad alto rischio hanno costituito una "fonte" di gasteropodi nelle tre stagioni dell'anno. Un aspetto caratteristico è dato però dal fatto che un'unica pozza si è prosciugata (Nord_6_1 nel periodo autunnale); gli altri siti non sono andati incontro a prosciugamento, ma solo a negativizzazione per la presenza di gasteropodi.

Nel grafico che segue si fornisce un dettaglio sulla numerosità stagionale dei siti con presenza di acqua, suddivisi fra siti positivi e negativi per la presenza di gasteropodi potenziali ospiti intermedi di *F. magna* (Fig. 5.11).

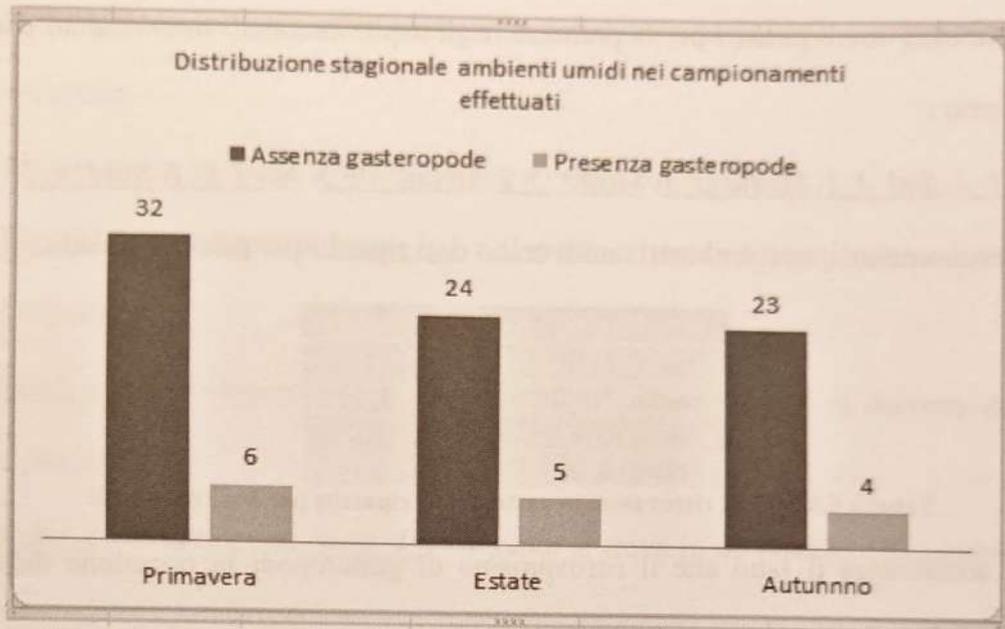


Figura 5.11: trend stagionale di ambienti umidi in cui si è evidenziata la presenza di gasteropodi(verde) e l'assenza(rosso).

Il totale di siti campionati nell'intero anno è di 94 come calcolabile dalla somma dei siti (positivi e negativi) presenti nelle 3 stagioni (Fig.5.11).

Il primo campionamento ha permesso di identificare 38 siti (32 negativi e 6 positivi alla presenza di ospiti intermedi) i quali sono diminuiti nel corso dei successivi campionamenti diventando 29 totali (24 positivi e 5 negativi) in estate e 27 totali (23 negativi e 4 positivi) in autunno.

È chiaro che le prime piogge primaverili hanno influenzato la presenza di detti ambienti così come il caldo estivo ne ha ridotto il numero. Il mese autunnale, dato che il nostro campionamento veniva effettuato ad inizio ottobre era presumibilmente ancora influenzato dalle temperature estive e dalla scarsità di precipitazioni.

Gli ambienti umidi in cui non sono stati trovati gasteropodi sono diminuiti del 25% nel periodo estivo e nel periodo autunnale del 28% rispetto al campionamento primaverile.

Quelli in cui la presenza di gasteropodi era positiva ha seguito lo stesso trend, diminuendo del 18% nel periodo estivo e nel periodo autunnale del 34%.

Nella zona di pre-parco la presenza degli ospiti intermedi negli habitat investigati si è quindi così ripartita per aree di rischio :

	Alto Rischio	Medio Rischio	Basso Rischio
Presenza gasteropodi	10	5	0
Assenza gasteropodi	27	23	29

Tabella 5.7 : presenza/assenza gasteropodi nei siti campionati

Sul totale dei punti campionati (10 per fascia di rischio) nell'intero anno in cui è stata compiuta la ricerca sono stati individuati 94 ambienti umidi. I siti di riproduzione degli ospiti intermedi di *F. magna* sono risultati essere 15 (10 ad alto rischio e 5 a medio rischio). Nessuno di questi era localizzato nella fascia a basso rischio, mentre i due terzi (10 su 15) erano localizzati nella fascia ad alto rischio. La zona ad alto rischio presentava un rischio di 3,85 volte maggiore nel ritrovamento di gasteropodi rispetto alle altre due zone in relazione ($p < 0,05$; Chi-quadro : 4,3 ODDS 3,85). Si può quindi affermare che la suddivisione delle aree di rischio effettuata con la mappa predittiva è stata confermata in campo tanto nel ritrovamento di ambienti umidi quanto nel numero di siti positivi alla presenza del gasteropode.

I gasteropodi della famiglia *Lymnaeidae* ritrovati nei campionamenti sono risultati appartenere alle specie *G. truncatula* e *R. peregra*. S; sono stati raccolti anche altri gasteropodi, appartenenti alle famiglie Physidae e Planorbidae, che tuttavia non in grado di fungere da ospiti intermedi di *F. magna*, ella parassitosi. .

Nel pre-Parco , la specie numericamente dominante è stata *G. truncatula* (93,2% degli esemplari raccolti) mentre il sottogenere *Radix* è risultato assai meno abbondante (13 esemplari su 190, pari al 6.8%).

In relazione al numero di gasteropodi raccolti viene fornita una tabella (Tab.5.8) ed un grafico (Fig.5.12) per meglio comprendere la distribuzione di questi nelle varie zone di rischio; in riferimento alla zona di pre-parco campionata viene allegata una cartina (Fig.5.13) con il numero di ospiti intermedi ritrovati per ciascun sottopunto.

Alto Rischio	N°Limnee	Medio Rischio	N°Limnee
Sud_1_1	12	Medio_3_1	13
Medio_10_3	64	Medio_5_2	19
Nord_6_1	14	Sud_2_1	10
Nord_6_2	58		
Totale	148		42

Tabella 5.8 numero gasteropodi ritrovato in ciascun sottopunto differenziato per area di rischio

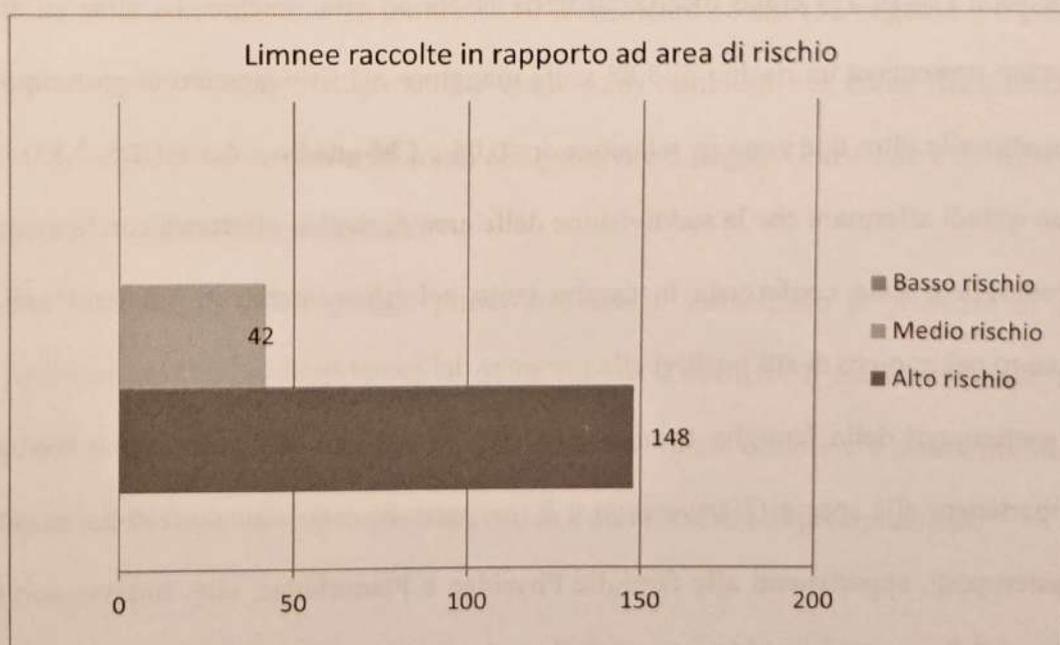


Figura 5.12: distribuzione dei gasteropodi raccolti in relazione all'area di rischio

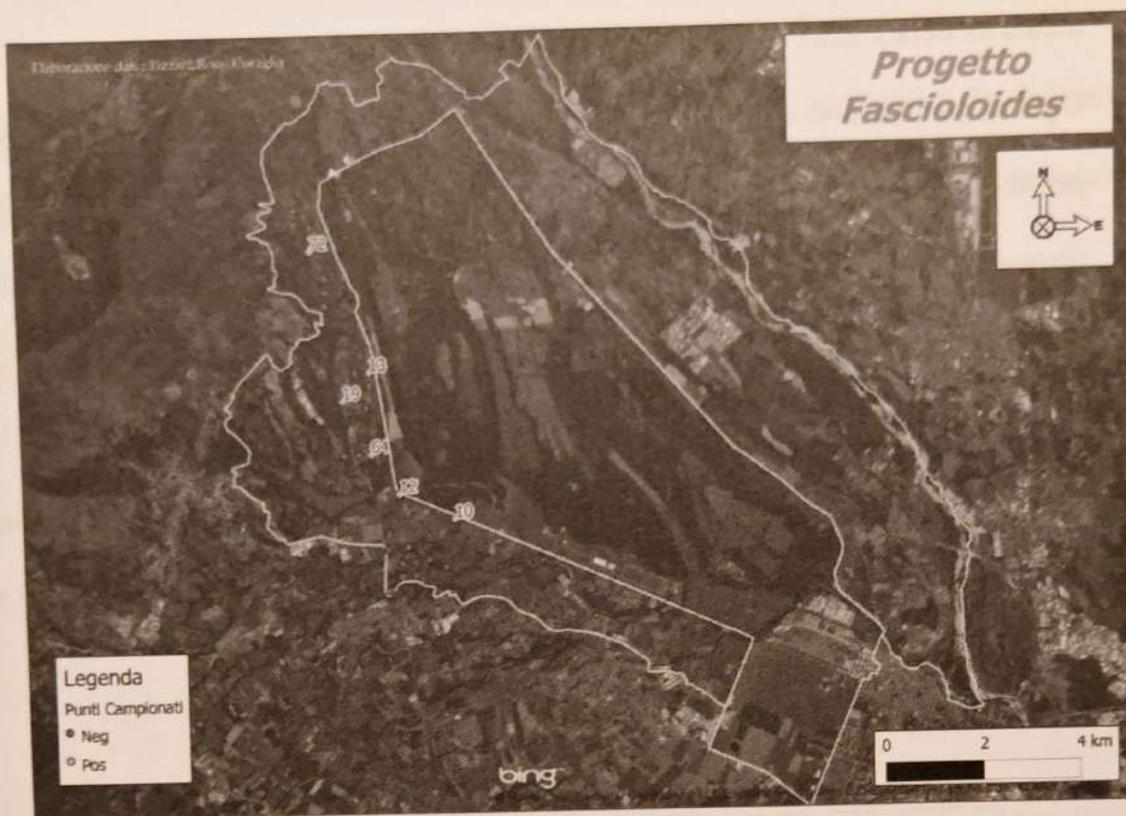


Figura 5.13 distribuzione dei gasteropodi raccolti in relazione ai vari punti di campionamento nell'area di pre-parco

Sul totale di 190 potenziali ospiti intermedi di *F. magna* raccolti nella fase di validazione della mappa di rischio, il 78% dei è stato ritrovato nelle zone ad alto rischio mentre il 22% è stato raccolto nelle zone a medio rischio. Nelle zone a basso rischio, il numero di limnee raccolte è risultato pari a zero, in accordo con le previsioni effettuate dalla carta del rischio.

5.3.1 Variabili campionate

I dati sulle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua in corrispondenza degli ambienti allagati da noi monitorati nel corso di questo studio, sono stati analizzati allo scopo di evidenziare possibili correlazioni con la presenza dei gasteropodi potenziali ospiti intermedi di *F. magna*.

Tutti i parametri numerici presi in considerazione saranno presentati sotto forma di media associata alla deviazione standard e mediana.

Ogni variabile è presentata con una tabella a due colonne, differenziate in siti positivi per il ritrovamento di gasteropodi (in viola nei grafici) ed in siti negativi per il ritrovamento degli stessi (in blu nei grafici).

Per ogni parametro è stata inoltre effettuata un'analisi statistica al fine di valutare un'eventuale correlazione con la presenza dei gasteropodi.

I parametri presi in considerazione sono stati valutati nei 94 ambienti acquatici ritrovati nell'anno di campionamento suddividendo i valori di detti parametri nei siti di presenza (N=15) e assenza dei gasteropodi (N=79).

Temperatura

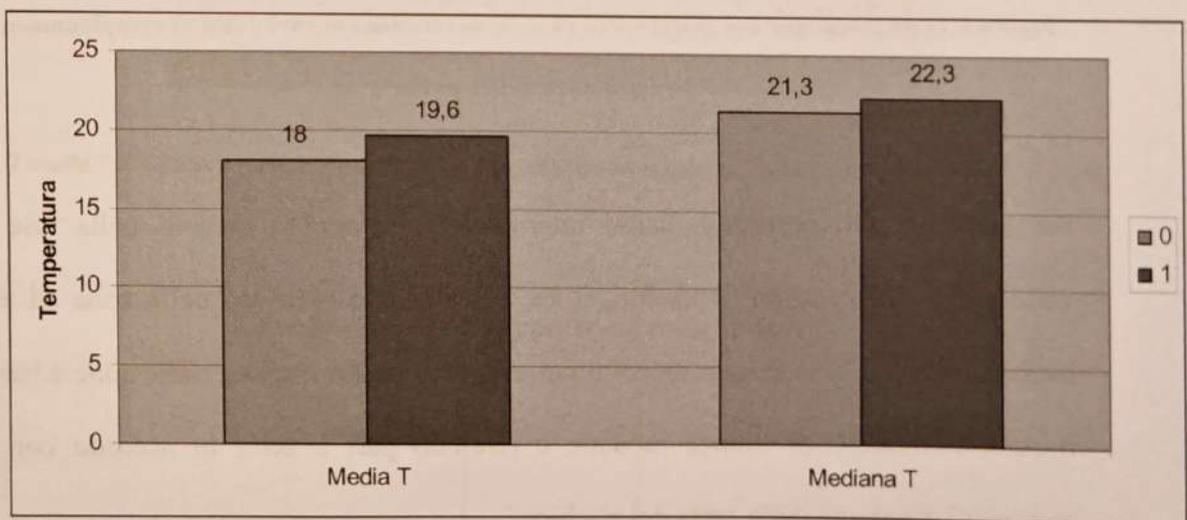


Figura 5.14: distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola)

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media T	18 ±5,13	19,6±5,41
Mediana T	21,3	22,3

Tabella 5.9: media+(DS) e mediana T° rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.14) che numericamente (Tab.5.9).

Si evidenzia una differenza statisticamente significativa (ancorchè al limite della significatività) tra la temperatura rilevata negli ambienti con presenza e quelli con assenza di gasteropodi.

$W = 397.5$, $p\text{-value} = 0.05078$

Il boxplot seguente illustra la distribuzione dei risultati ottenuti:

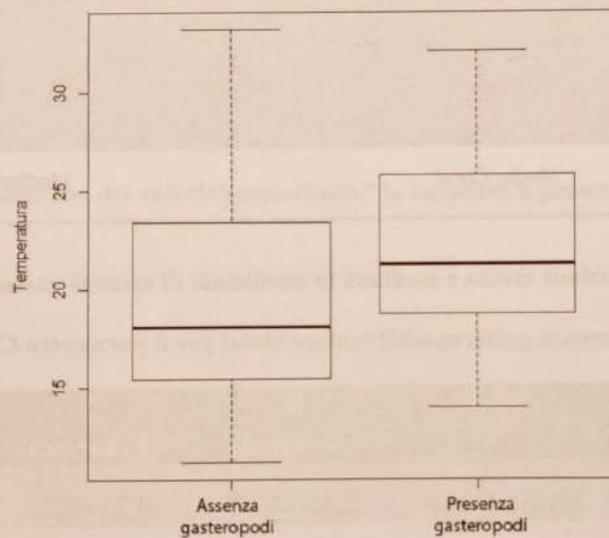


Figura 5.15 distribuzione dei valori "temperatura" in rapporto a presenza/assenza gasteropodi

Conduttività

Il parametro conduttività è stato misurato in $\mu\text{S}/\text{cm}$ (S=micro-siemens). La conduttività è definita come la capacità di una qualsiasi sostanza (acqua in questo caso) di condurre l'elettricità.

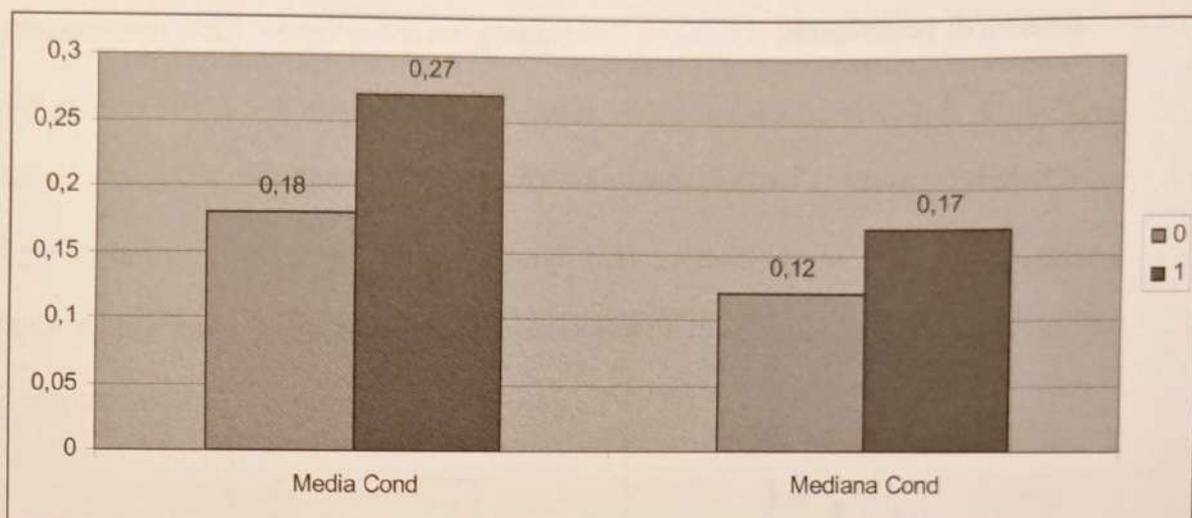


Figura 5.16: distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0; colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro Cond

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media Cond	0,18±0,17	0,27±0,24
Mediana Cond	0,12(0,94)	0,17(0,82)

Tabella 5.10: media+(DS) e mediana "Cond" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.16) che numericamente(Tab.5.10).

Si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra la conduttività rilevata negli ambienti con presenza di gasteropodi (maggior conduttività) e quelli con assenza degli stessi.

$$W = 384, p\text{-value} = 0.03621$$

La distribuzione dei risultati viene riportata di seguito con un boxplot :

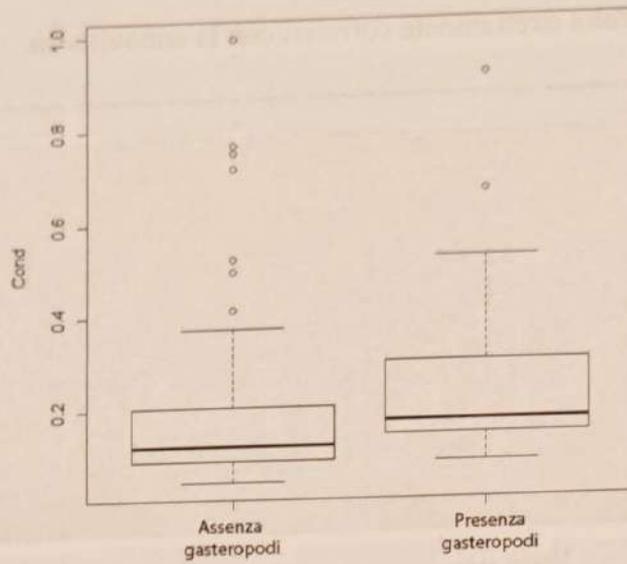


Figura 5.17: distribuzione dei valori "conduttività" in rapporto a presenza/assenza gasteropodi

TDS (Total Dissolved Solids)

Questo parametro indica i solidi dissolti totali, ovvero la presenza degli ioni totali in soluzione, a loro volta strettamente correlati con la conduttività.

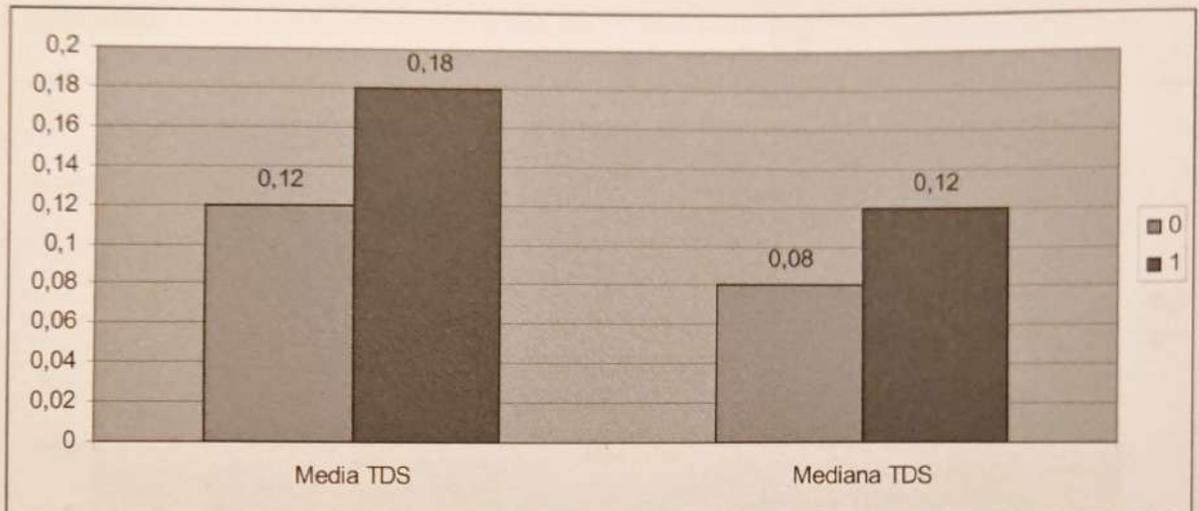


Figura 5.18: distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro TDS

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media TDS	0,12±0,09	0,18±0,14
Mediana TDS	0,08(0,526)	0,12(0,522)

Tabella 5.11: media+(DS) e mediana "TDS" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.18) che numericamente(Tab.5.11).

Si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra i DTS rilevati negli ambienti con presenza di gasteropodi (con valori DTS più elevati) e quelli con assenza degli stessi.

$W = 378.5$, $p\text{-value} = 0.03138$:

La distribuzione dei risultati viene riportata di seguito con un boxplot :

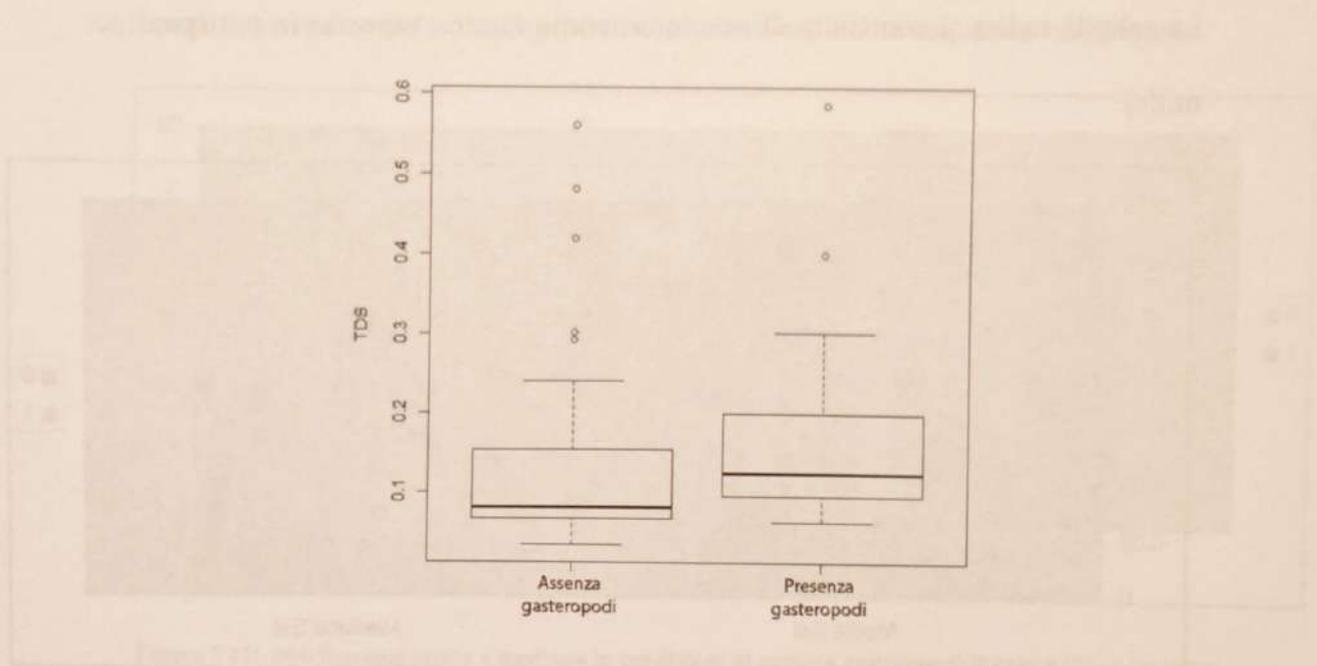


Figura 5.19: distribuzione dei valori "TDS" in rapporto a presenza/assenza gasteropodi

Salinità

La salinità indica il contenuto di sali in un corpo liquido espresso in ppt (parti per mille).

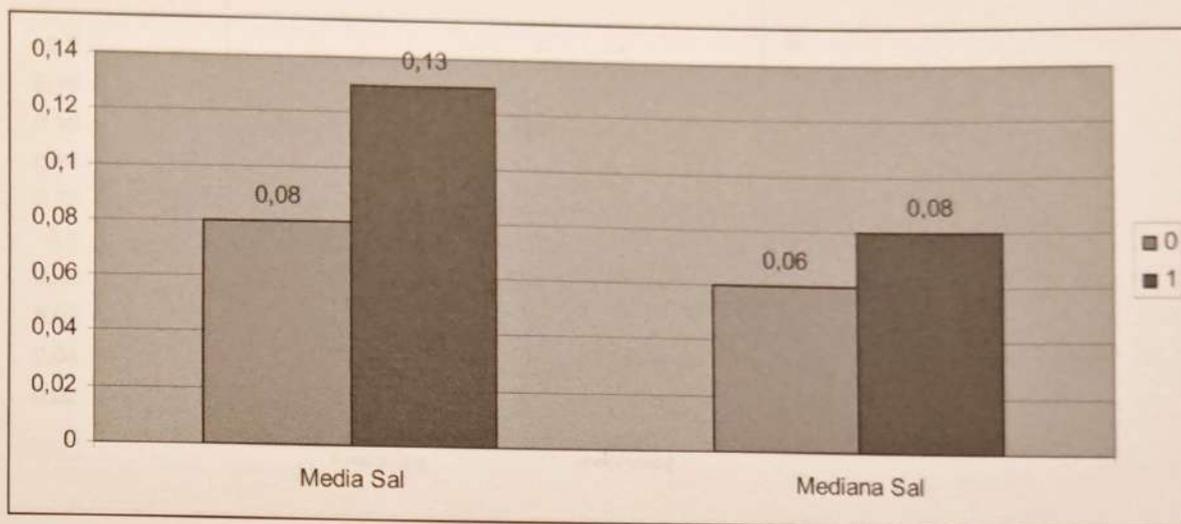


Figura 5.20 distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro "Sal"

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media Sal	0,08±0,07	0,13±0,11
Mediana Sal	0,06(0,41)	0,08(0,4)

Tabella 5.12: media+(DS) e mediana "Sal" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.20) che numericamente (Tab.5.12).

Il parametro salinità non è risultato significativamente associato alla presenza di gasteropodi negli ambienti acquatici campionati.

Dosat

Il parametro indica la % di ossigeno disciolto nell'ambiente acquatico campionato.

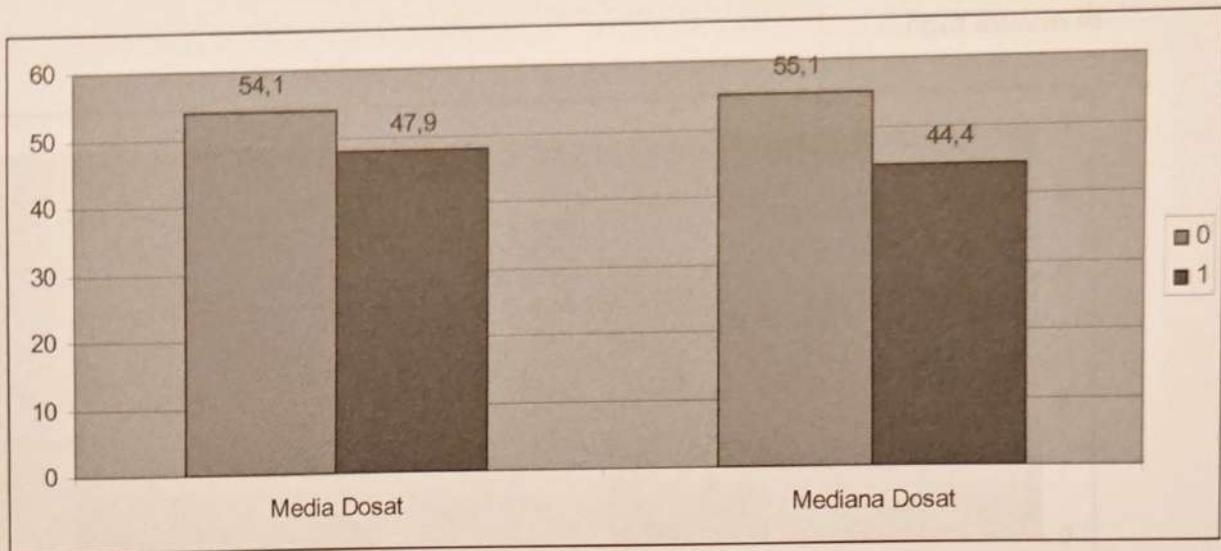


Figura 5.21: distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro "Dosat"

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media Dosat	54,1±13,90	47,9±15,21
Mediana Dosat	55,1(70,9)	44,4(54,2)

Tabella 5.13: media+(DS) e mediana "Dosat" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.21) che numericamente(Tab.5.13).

Il parametro Dosat non è risultato significativamente associato alla presenza di gasteropodi negli ambienti acquatici campionati.

DO

Il parametro DO indica l'ossigeno disciolto nell'ambiente acquatico mediante l'unità di misura mg/l.

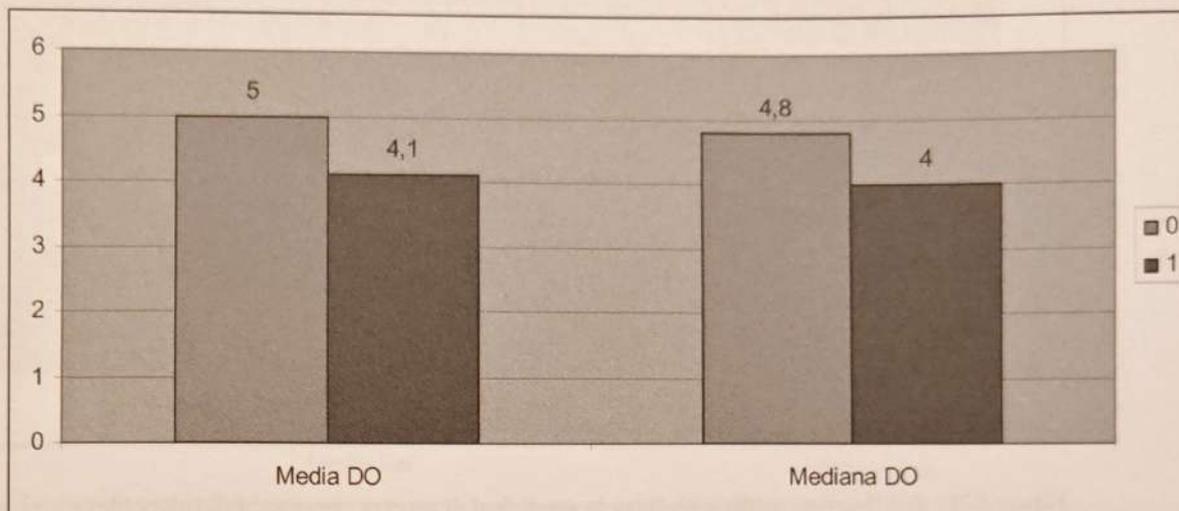


Figura 5.22 distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro "DO"

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media DO	5±1,47	4,1±1,36
Mediana DO	4,8(7,18)	4(4,96)

Tabella 5.14 media+(DS) e mediana "DO" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.22) che numericamente(Tab.5.14).

Si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra il DO rilevato negli ambienti con presenza di gasteropodi (minor DO) rispetto a quelli con assenza degli stessi.

$W = 777, p\text{-value} = 0.04545$

La distribuzione dei risultati viene riportata di seguito con un boxplot :

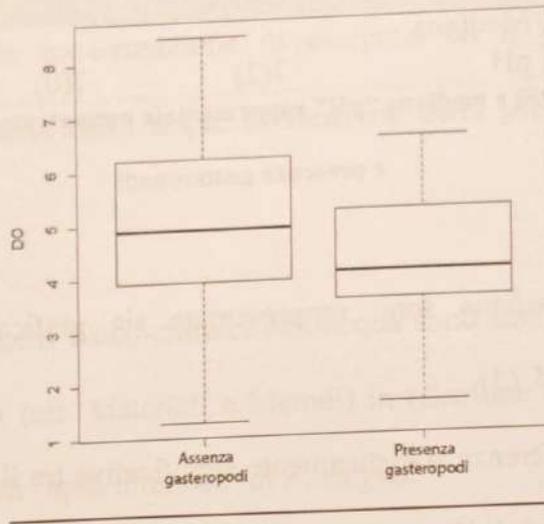


Figura 5.23: distribuzione dei valori "DO" in rapporto a presenza/assenza gasteropodi

pH

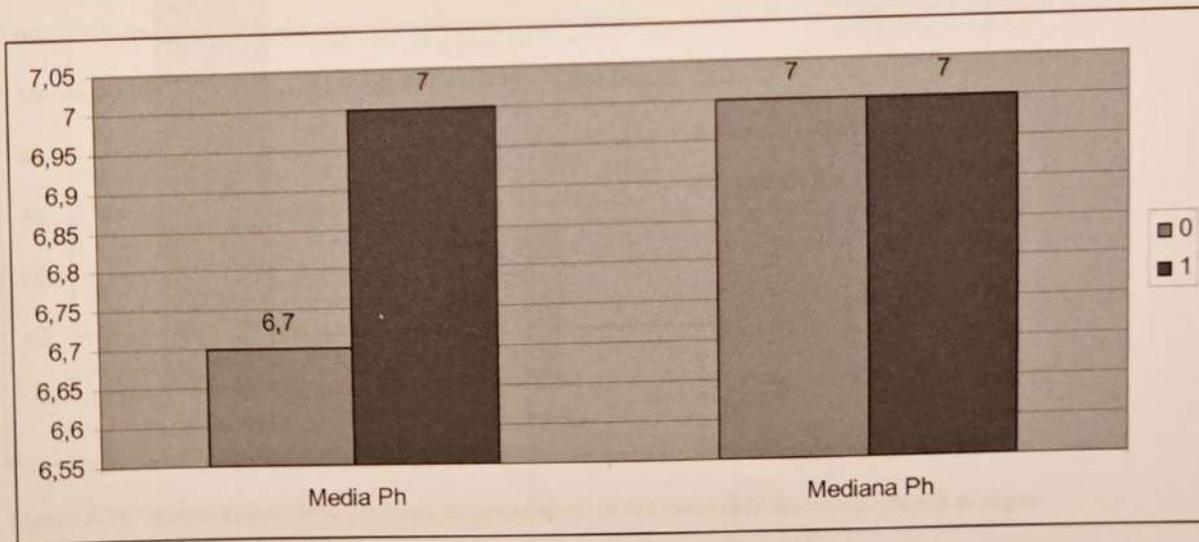


Figura 5.24: distribuzione media e mediana in condizioni di assenza gasteropodi(0;colore blu) e presenza gasteropodi(1=colore viola) per il parametro "pH"

	0 (Assenza)	1 (Presenza)
Media pH	6,7±0,52	7±0
Mediana pH	7(2)	7(0)

Tabella 5.15 media+(DS) e mediana "pH" rappresentate numericamente in funzione di assenza e presenza gasteropodi

La media e la mediana sono rappresentate sia graficamente (Fig.5.24) che numericamente (Tab.5.15).

Si evidenzia una differenza statisticamente significativa tra il pH negli ambienti con presenza di gasteropodi (pH più elevato) rispetto a quelli con assenza degli stessi.

$W = 412.5$, $p\text{-value} = 0.03018$:

La distribuzione dei risultati viene riportata di seguito con un boxplot :

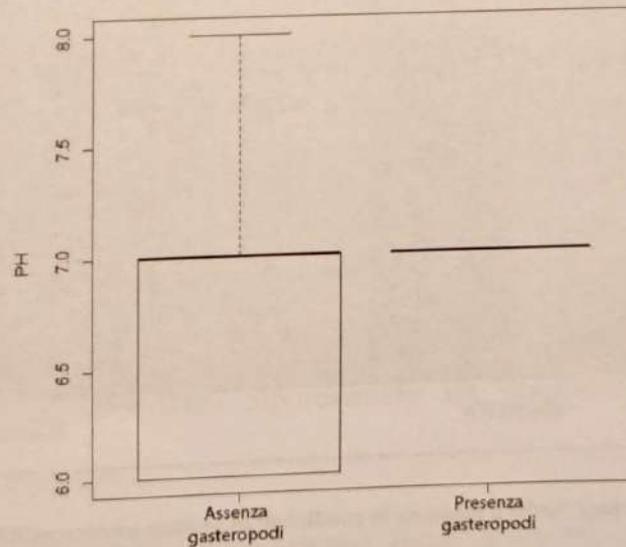


Figura 5.25: distribuzione dei valori "Ph" in rapporto a presenza/assenza gasteropodi

Sono emerse differenze statisticamente significative per ben 5 delle 7 variabili prese in considerazione. Questo suggerisce che la temperatura, la conduttività, i Total Dissolved Solids, la concentrazione di ossigeno ed il pH ben si prestano a caratterizzare la qualità delle acque in funzione della presenza dei vettori di *F. magna*.

In aggiunta ai parametri fisico-chimici dell'acqua sono stati analizzati anche alcuni parametri fattoriali (cfr. Materiali e Metodi) in relazione alla presenza/assenza di gasteropodi potenziali ospiti intermedi di *F. magna*.

Presenza di Alghe

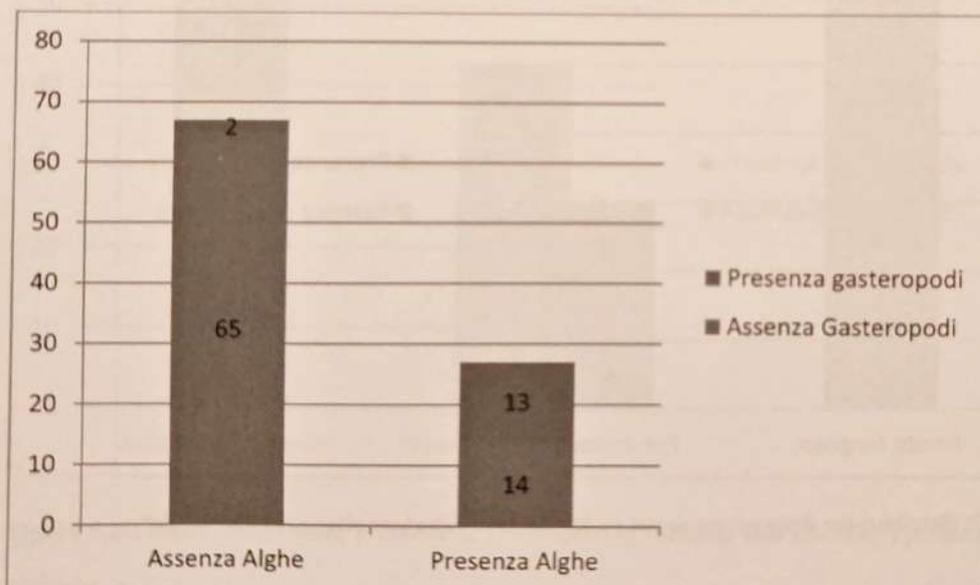


Figura 5.26: distribuzione della presenza di gasteropodi in funzione dell'assenza/presenza di alghe

	Assenza Alghe	Presenza Alghe
Assenza Gasteropodi	65	14
Presenza gasteropodi	2	13

Tabella 5.16: tabella 2x2 su presenza/assenza gasteropodi in zone con presenza/assenza alghe

La tabella (Tab.5.16) ed il grafico (Fig.5.26) indicano il totale delle zone campionate (N=94), differenziandole in rapporto alla presenza/assenza di gasteropodi e alla presenza/assenza di alghe.

È evidente come le alghe siano frequentemente presenti (13 volte su 15, 85.5%) negli ambienti graditi ai gasteropodi.

L'associazione appare statisticamente significativa (ODD: 30,2 chi-quadro : 26 p<0,05).

Fondo

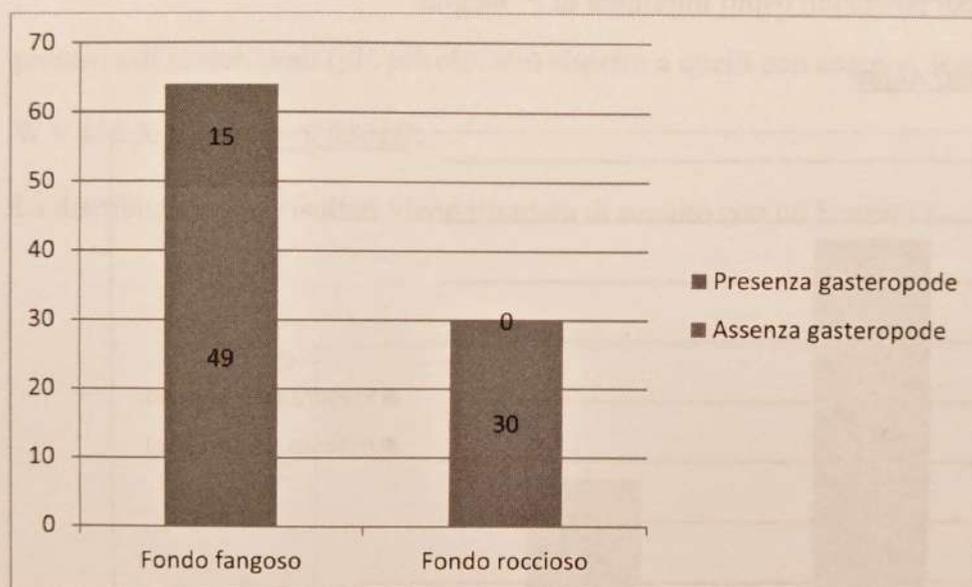


Figura 5.27: distribuzione della presenza del gasteropode in relazione alla variabile "fondo"

	Fondo fangoso	Fondo roccioso
Assenza gasteropode	49	30
Presenza gasteropode	15	0

Tabella 5.17: tabella 2x2 su presenza/assenza gasteropodi in zone con diverso tipo di fondo(fangoso o roccioso)

Come è evidenziabile graficamente (Fig.5.27) e numericamente (Tab.5.17), sicuramente indicativa l'assenza di fondo sabbioso contrasta con il ritrovamento dei gasteropodi (100% dei quali è stato raccolto in ambienti a fondo fangoso). La Odds Ratio non è stata calcolata a causa della presenza di uno zero in tabella. È stato però valutato il tipo di fondo in relazione alla presenza del gasteropode, evidenziandosi una differenza significativa (chi-quadro : 4,7 $p < 0,05$)

Acqua Corrente

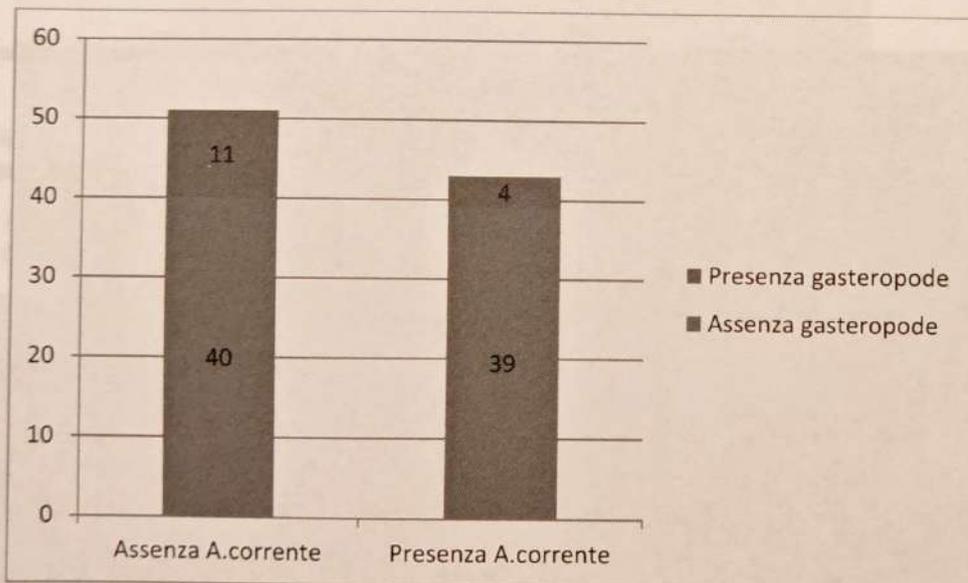


Figura 5.28: distribuzione della presenza di gasteropodi in funzione dell'assenza(0)/presenza(1) di acqua corrente

	Assenza A.corrente (0)	Presenza A.corrente (1)
Assenza gasteropode	40	39
Presenza gasteropode	11	4

Tabella 5.18: tabella 2x2 su presenza/assenza gasteropodi in zone con acqua corrente(1) o stagnante(0)

Sulla *Tab.5.18* e dalla *Fig.5.28* si evince la maggior presenza di gasteropodi nei siti con acqua ferma o in lentissimo scorrimento. Tuttavia non si ha una p statisticamente significativa nel test utilizzato ($p > 0,05$)

5.3.2 Valutazione rischio tra Parco La Mandria e pre-parco

Si riporta, di seguito, la mappa di rischio con i relativi punti di campionamento dei gasteropodi all'interno e all'esterno del Parco. Si ricorda che detti punti sono stati esclusivamente individuati nelle aree ipotizzate "ad alto rischio".

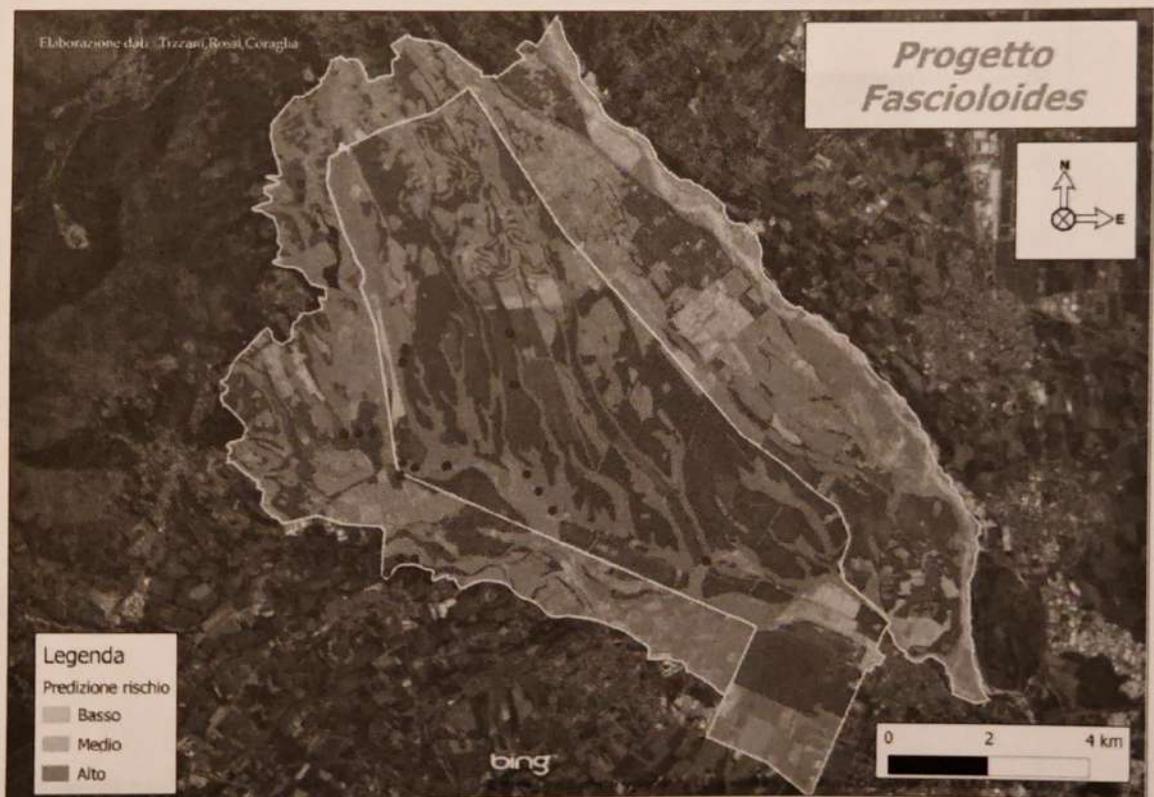


Figura 5.29: identificazione dei punti campionati all'esterno ed all'interno del Parco

Segue la descrizione dei punti di campionamento interni al Parco . Per la documentazione fotografica dettagliata degli ambienti campionati si rimanda al capitolo “Appendici”.

Bivio Cascina Vittoria : pozza di acqua stagnante in un prato pascolo in una zona ombreggiata con terreno fangoso(Fig.5.30)

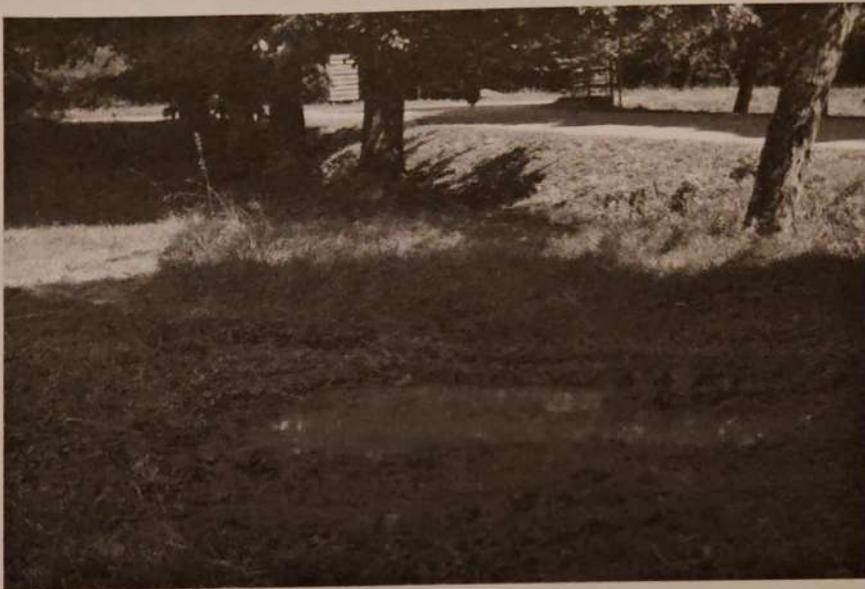


Figura 5.30: sottopunto bivio Cascina Vittoria

Galliassi Basso : canale che permette l'irrigazione dei campi adiacenti,situato al limitare del bosco(Fig.5.31)



Figura 5.31: sottopunto Galliassi basso

Prati Galliassi : canale trasversale a quello precedente, utilizzato per irrigazione dei campi

Galliassi Alto : pozza di acqua stagnante all'interno del bosco con terreno fangoso/melmoso

Ceronda 1 e Ceronda 1 2 : punto situato ai margini del fiume Ceronda caratterizzato da fondale roccioso (Fig.5.32)



Figura 5.32: sottopunto Ceronda_1

Ceronda 2 : punto situato ai margini del Fiume Ceronda ,caratterizzato da fondale più fangoso e con più vegetazione rispetto al primo

Bizzarria 1 e Bizzarria 1 2 : punto situato lungo il fiume Ceronda, appena entrato dentro il Parco (Fig.5.33)



Figura 5.33: sottopunto Bizzarria_1

Bizzarria_2 :punto situato al confine tra bosco e spazio aperto, in prossimità del fiume, dove questo fa una piccola insenatura in cui l'acqua è più stagnante

Ninfee_1 :punto di acqua stagnante di notevole dimensioni, fondo con terreno fangoso/argilloso ed acqua molto torbida, ricco di vegetazione (Fig.5.34)



Figura 5.34: sottopunto Ninfee_1

Ninfee_2 :punto di acqua stagnante con terreno fangoso/argilloso ed acqua meno abbondante e più limpida rispetto al sito precedente, anch'esso ricco di vegetazione

Rete Piste Fiat :punto di acqua stagnante ricco di vegetazione all'interno del bosco in prossimità della recinzione con la pista Fiat, terreno fangoso

Bassa Colleria : pozza situata su terreno fangoso all'interno del bosco in prossimità del torrente Colleria, acqua torbida e poco profonda

Fosso Piano Mule: canale in cui è presente l'acqua corrente anche se con un flusso molto lento, sponde ricche di vegetazione e fondo fangoso

Fosso Pioppi : completamente prosciugato nelle 3 stagioni di campionamento

Ad alcuni dei siti (N=48) corrispondevano dei sottopunti (per un N totale pari a 16), gli ambienti con acqua effettivamente campionati nelle tre stagioni sono stati 45. In tutti questi ambienti era sempre presente acqua stagnante o corrente ad eccezione dell'unico punto escluso sopra citato. Così non è stato negli ambienti campionati nel pre-Parco (N=48), il 42% dei quali è andato incontro ad una "secca" estiva.

In totale, sono stati raccolti 211 gasteropodi, di cui 144 nel Parco e 67 nel Pre-parco. Dei primi, 62 appartenevano alla specie *R. peregra* (42% sul totale) e 82 a *G. truncatula*; dei secondi, la totalità apparteneva a *G. truncatula*.

	Interno Mandria	Esterno Mandria
Siti Campionati	48	48
N° Gasteropodi totale	144	67

Tabella 5.19: numero di siti campionati e gasteropodi raccolti tra interno/esterno del Parco la Mandria

Per verificare l'esistenza di un fattore di rischio (> densità di ambienti favorevoli alla presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*) legato alla localizzazione interna o esterna al muro di cinta del Parco, è stata creata la seguente tabella di contingenza 2x2.

	Assenza Gasteropodi	Presenza Gasteropodi
Esterno Mandria	43	5
Interno Mandria	29	19

Tabella 5.20: ambienti umidi interno/esterno Mandria in cui sono presenti/assenti gasteropodi

Si è verificata la differenza risultata statisticamente significativa con il test di Pearson con la correzione di continuità di Yates, $X\text{-squared} = 9.3889$,

$p\text{-value} = 0.002183$. L'Odds Ratio che ne deriva è pari a 5,53.

Conseguentemente, si può concludere che il rischio di trovare gasteropodi all'interno del Parco era 5,5 volte maggiore rispetto al pre-parco.

Oltre alla densità degli ambienti favorevoli alla presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, è stata messa a confronto anche la numerosità di detti ospiti intermedi all'interno e all'esterno del muro di cinta del Parco.

È di seguito riportata la media(\pm deviazione standard) e la mediana inerente al ritrovamento dei gasteropodi con differenze tra l'interno e l'esterno del Parco Regionale La Mandria.

	Media	Mediana
Dentro Mandria	9,16 \pm 6,9	7
Fuori Mandria	9,4 \pm 11,1	5

Tabella 5.21 media \pm DS e mediana in riferimento ai numeri di gasteropodi campionati

Ne è emersa una differenza significativa, con maggior densità dei gasteropodi all'interno del Parco.

$W = 814$, $p\text{-value} = 0.001143$

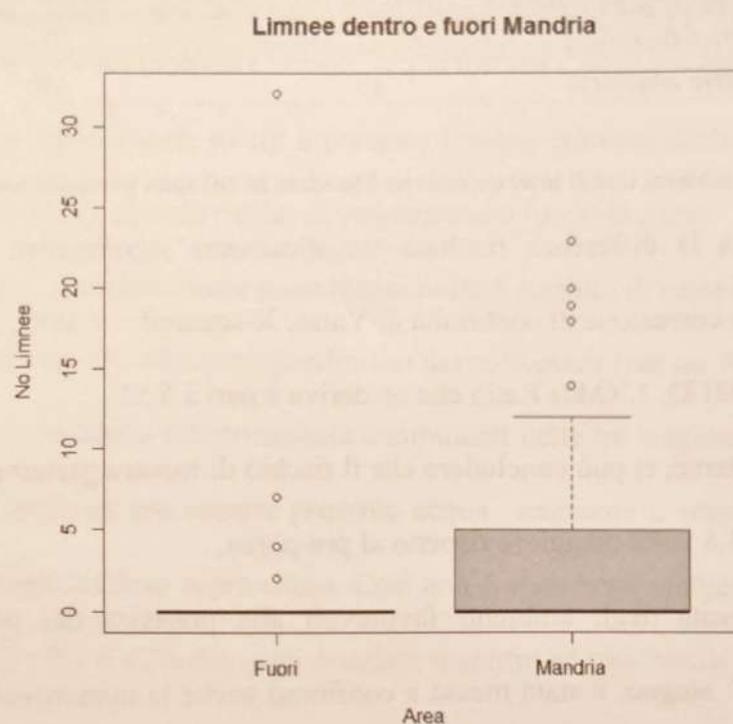


Figura 5.35: distribuzione numero limnee dentro/fuori Mandria

Il confronto fra Parco e pre-Parco è stato infine esteso alle variabili fisico-chimiche e fattoriali registrate negli ambienti con presenza di acqua, coi seguenti risultati:

Temperatura

T	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	Se
Pre-Parco	28	19.41	3.26	18.62	13.71	27.74	14.03	0.7	-0.06	0.62
Parco	45	18.65	3.69	18.54	13.3	28.39	15.09	0.7	-0.22	0.55

Tabella 5.22: parametri riferibili alla variabile temperatura tra parco/pre-parco

Tra Parco e pre-Parco non sono state riscontrate differenze significative in riferimento alla temperatura dell'acqua ($p > 0,05$).

Conduttività

Cond	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	0.16	0.1	0.11	0.03	0.43	0.4	1.23	0.95	0.02
Parco	45	0.10	0.04	0.09	0.04	0.21	0.16	1.12	0.13	0.01

Tabella 5.23: parametri riferibili alla variabile conduttività tra parco/pre-parco

W = 865, p-value = 0.007795

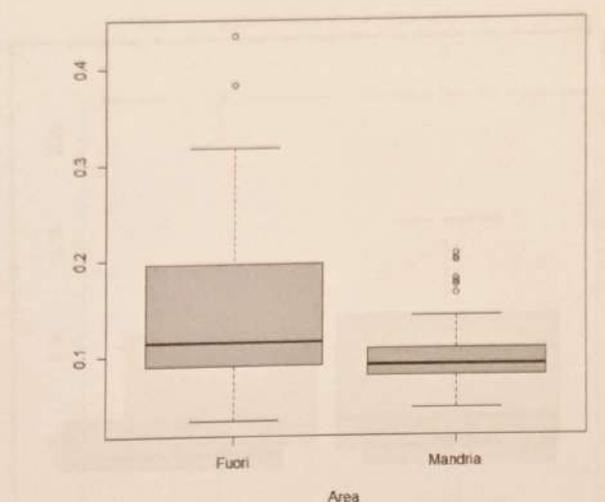


Figura 5.36: distribuzione parametri conduttività dentro/fuori Mandria

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative in riferimento alla conduttività dell'acqua, superiore nel secondo ($p < 0,05$).

TDS

TDS	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	0.11	0.07	0.09	0.02	0.29	0.27	1.05	0.4	0.01
Parco	45	0.08	0.03	0.07	0.03	0.16	0.13	1.02	0.21	0

Tabella 5.24: parametri riferibili alla variabile TDS tra parco/pre-parco

W = 852, p-value = 0.01195

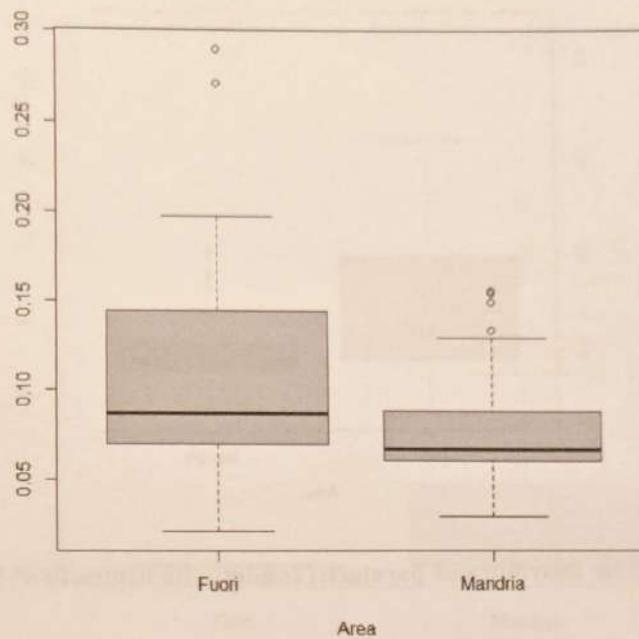


Figura 5.37: distribuzione valori TDS fuori/dentro Mandria

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative in riferimento ai Total Dissolved Solids, superiori nel secondo ($p < 0,05$).

Salinità

Sal	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	0.08	0.05	0.06	0.01	0.21	0.2	1.04	0.46	0.01
Parco	45	0.05	0.02	0.05	0.02	0.11	0.09	0.98	0.16	0

Tabella 5.25 parametri riferibili alla variabile salinità tra parco/pre-parco

W = 852, p-value = 0.01058

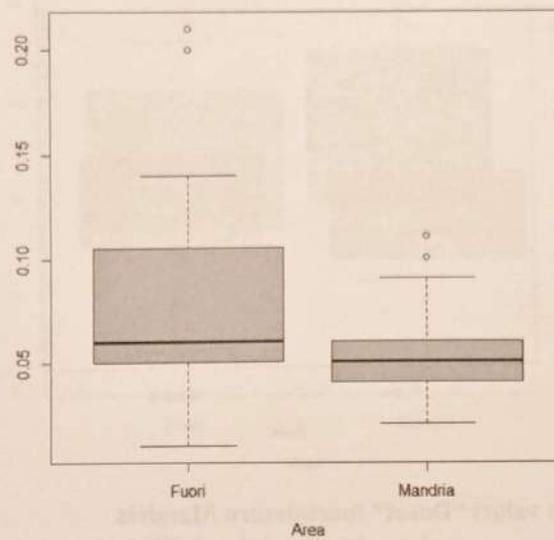


Figura 5.38: distribuzione valori salinità fuori/dentro Mandria

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative in riferimento alla salinità dell'acqua, superiore nel secondo ($p < 0,05$).

Dosat

Dosat	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	48.23	10.6	46.75	30.8	69.6	38.8	0.2	-1	2
Parco	45	39.97	8.44	39	22.7	59.1	36.4	0.24	-0.4	1.26

Tabella 5.26 parametri riferibili alla variabile Dosat tra parco/pre-parco

W = 916, p-value = 0.001199

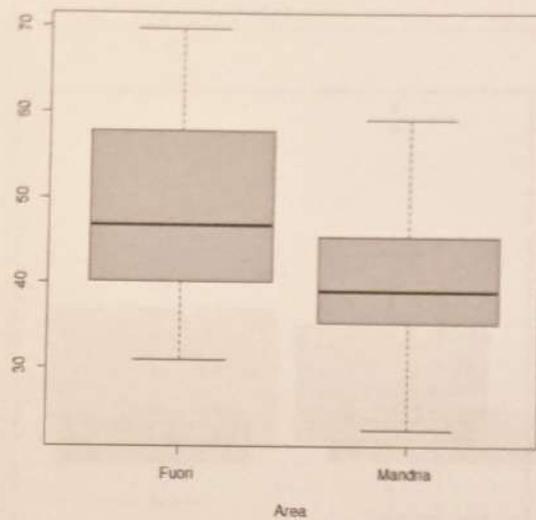


Figura 5.39 distribuzione valori "Dosat" fuori/dentro Mandria

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative in riferimento alla % di ossigeno disciolto nell'acqua (Dosat)($p < 0,05$), risultata superiore nel secondo.

DO

DO	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	4.43	1.06	4.44	2.42	6.51	4.09	-0.03	-0.73	0.2
Parco	45	3.75	0.87	3.63	2.11	5.95	3.84	0.5	0.09	0.13

Tabella 5.27 parametri riferibili alla variabile DO tra parco/pre-parco

W = 870.5, p-value = 0.006469

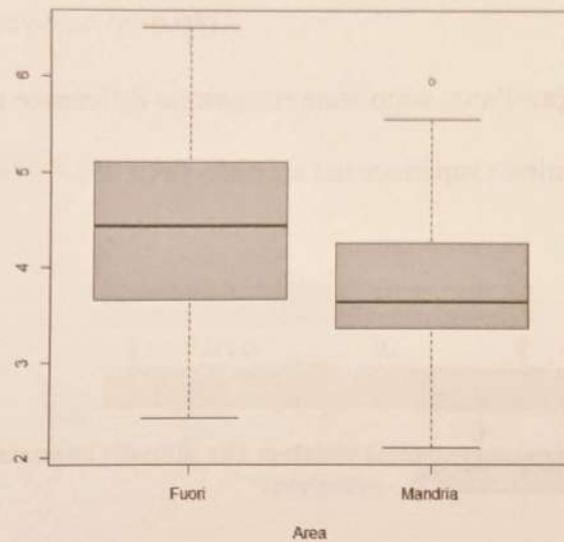


Figura 5.40: distribuzione valori DO fuori/dentro Mandria

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative in riferimento al parametro DO, risultato superiore nel secondo ($p < 0,05$).

pH

DO	n	mean	sd	median	min	max	range	skew	kurtosis	se
Pre-Parco	28	7	0	7	7	7	0	NaN	NaN	0
Parco	45	6.87	0.34	7	6	7	1	-2.09	2.41	0.05

Tabella 5.28 parametri riferibili alla variabile pH tra parco/pre-parco

W = 714, p-value = 0.04647

Dunque, tra Parco e pre-Parco sono state riscontrate differenze significative anche in riferimento al pH, risultato superiore nel secondo ($p < 0,05$).

Alghe

	0	1
Pre-Parco	22	6
Parco	18	27

Tabella 5.29 parametri riferibili alla variabile alghe(presenza=1;assenza=0) tra parco e pre/parco

X-squared = 8.8682, df = 1, p-value = 0.002902 odds ratio 5.365179

Il rischio di ritrovare la presenza di alghe all'interno del Parco La Mandria è dunque 5,36 volte maggiore rispetto all'esterno e vi si evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fondo

	0	1
Pre-Parco	24	4
Parco	36	9

Tabella 5.30 parametri riferibili alla variabile alghe(presenza=1;assenza=0) tra parco e pre/parco

Non si evidenziano differenze statisticamente significative nella variabile fondo tra zona di parco e pre/parco ($p > 0,05$)

Acqua corrente

	0	1
Pre-Parco	20	8
Parco	18	27

Tabella 5.31 parametri riferibili alla variabile alghe (presenza=1; assenza=0) tra parco e pre/parco

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

X-squared = 5.6299, df = 1, p-value = 0.01766

odds ratio 3.67934

Il rischio di ritrovare acqua corrente è dunque 3,68 volte maggiore all'interno del Parco rispetto all'esterno e vi si evidenzia una differenza statisticamente significativa.

5.4 Risultato ricerca delle forme larvali di *F. magna*

Con il supporto della mappa di rischio, nella zona di pre-Parco sono stati raccolti 226 gasteropodi potenziali ospiti di *F. magna*, di cui 13 appartenenti alla specie *R. peregra* e i restanti 213 a *G. truncatula*.

Sono stati analizzati, all'interno del Parco e a titolo di confronto, 54 esemplari di *G. truncatula*.

Nessuno dei gasteropodi raccolti nel pre-Parco è risultato positivo per la presenza di DNA di *F. magna*; al contrario, due degli esemplari di *G. truncatula* raccolti nel Parco sono risultati positivi alla PCR, con una prevalenza del 3,7% (Fig.5.41).

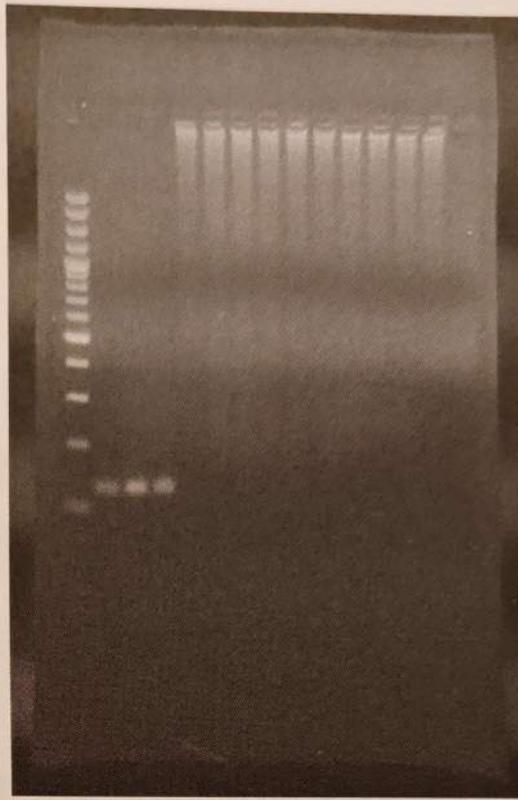


Figura 5.41: positività a *F.Magna* nel PRLM

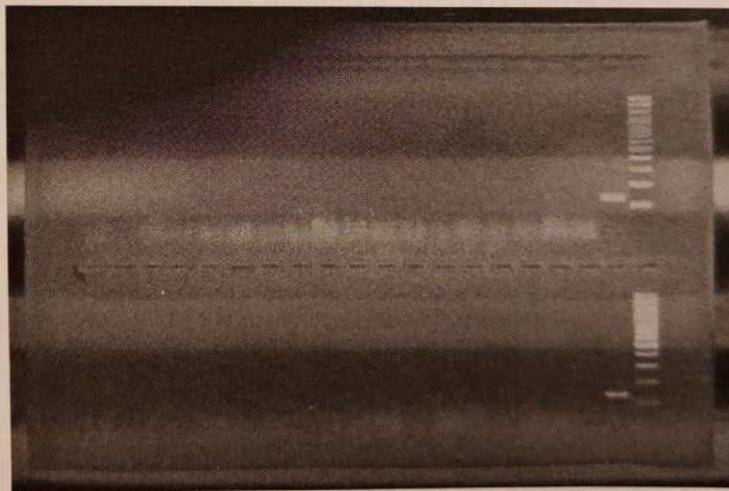


Figura 5.42: negatività a *F. magna* , è presente solo il controllo positivo

5.5 Risultato monitoraggio mediante videotrappole degli ingressi e delle uscite dal Parco

Il videotrappolaggio ha permesso di evidenziare il passaggio di numerose specie animali in un solo sito tra i due monitorati, più precisamente in quello situato in località *La Bizzarria*, all'entrata nel Parco del fiume Ceronda.



Figura 5.43: entrata del fiume Ceronda nel Parco

Nell'altro sito, in località *Ponte del Violino* all'uscita dal Parco del fiume Ceronda, non è stato documentato alcun passaggio di animali.

Le registrazioni effettuate dalle due fototrappole nel primo dei due siti hanno permesso di documentare 218 passaggi durante il periodo di monitoraggio.

I passaggi erano così ripartiti per specie :

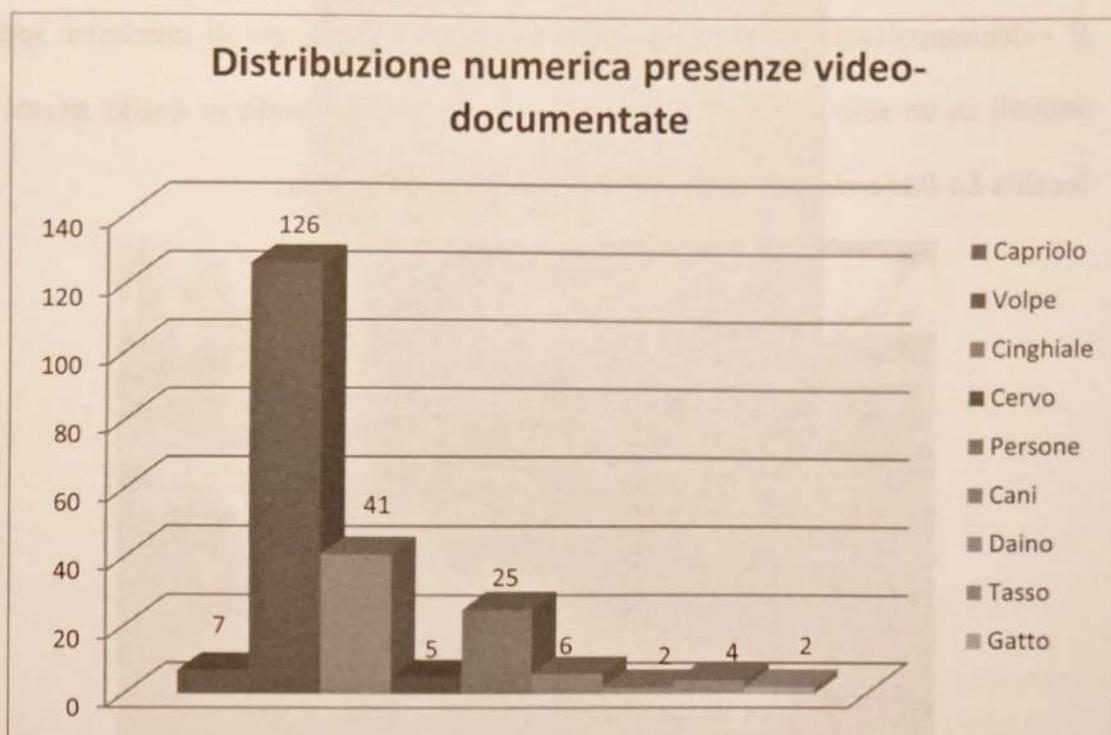


Figura 5.44: distribuzione numerica passaggi video-trappolati

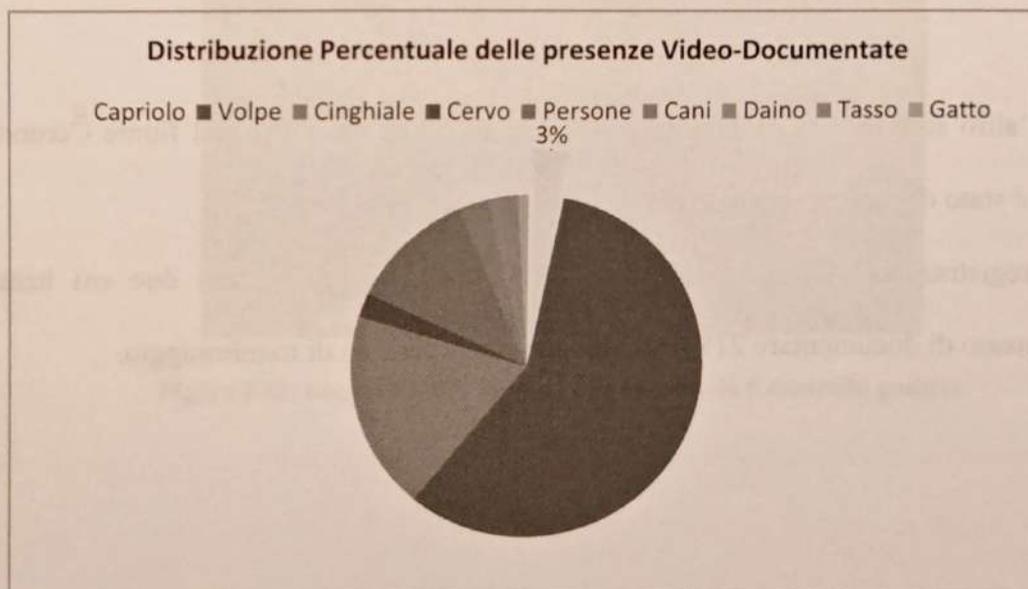


Figura 5.45: distribuzione percentuale passaggi video-trappolati con evidenza dei passaggi della specie capriolo

Risulta con evidenza come la maggior parte dei passaggi sia riferibile al transito di volpi (58% dei passaggi totali) e cinghiali (19%) mentre per quanto riguarda i cervidi (capriolo, daino e cervo) i passaggi non superano il 6% del totale.

I passaggi delle tre specie maggiormente recettive alla parassitosi è meglio descritto nel grafico a torta sottostante, da cui si evince che il capriolo è la specie più "mobile", con il 50% dei passaggi documentati.

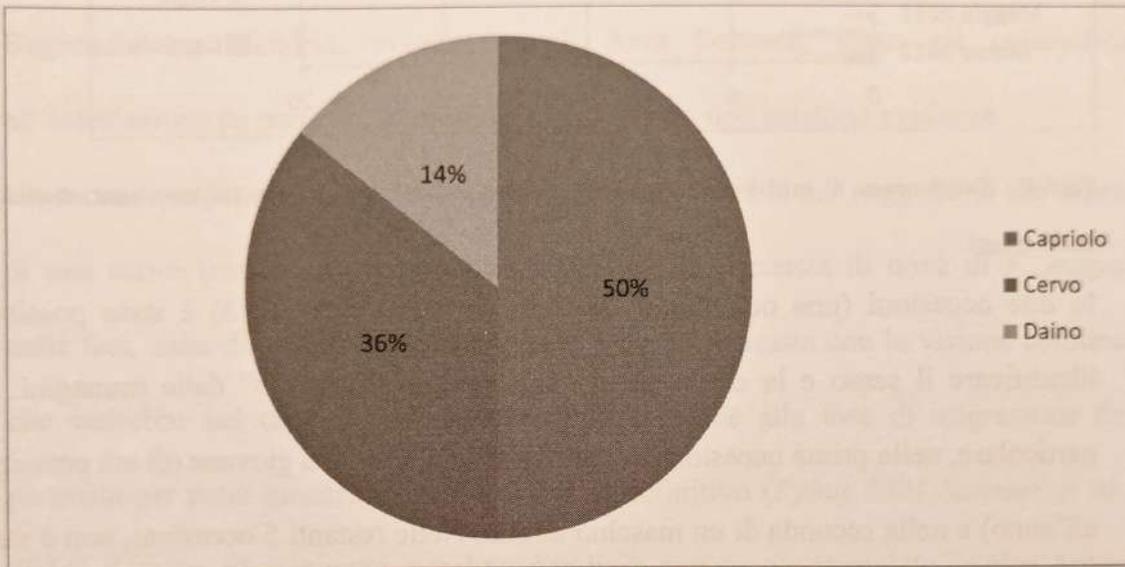


Figura 5.46: percentuale dei passaggi dei cervidi video-trappolati suddivisi per specie

Nei due anni di video-trappolaggio, 5 delle 7 videoriprese di capriolo sono state effettuate nei mesi primaverili (marzo e maggio) (Fig.5.47), che notoriamente coincidono con la fase di dispersione degli individui subadulti, alla ricerca di un territorio dove insediarsi.

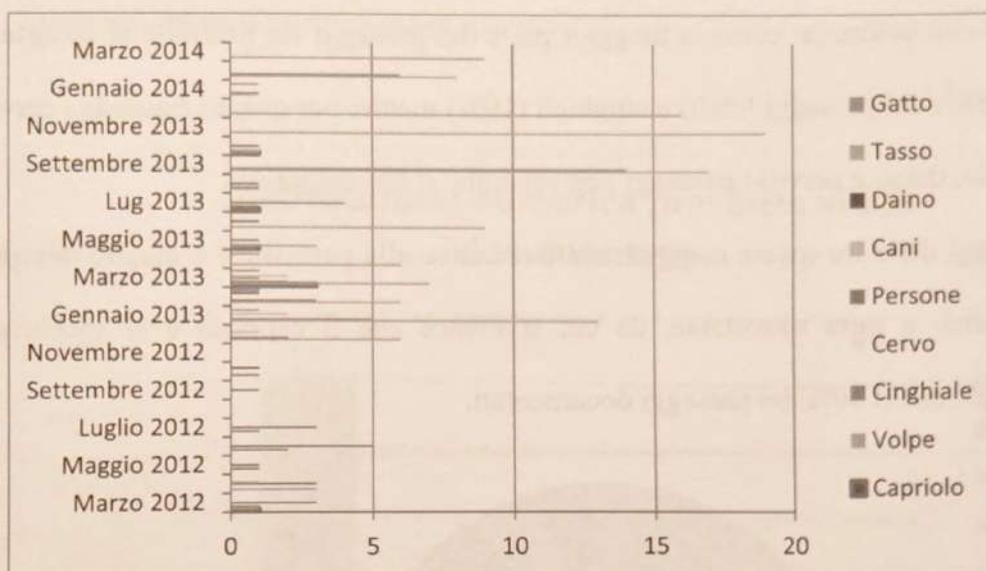


Fig.5.47: distribuzione di tutti i passaggi in riferimento ai mesi dell'anno in cui sono stati effettuati i monitoraggi

In due occasioni (una nel Marzo 2012 e una nel Marzo 2013) è stato possibile identificare il sesso e la classe di età del capriolo "catturato" dalle immagini. In particolare, nella prima occasione si trattava di una femmina giovane (di età prossima all'anno) e nella seconda di un maschio adulto. Nelle restanti 5 occasioni, non è stata possibile alcuna attribuzione dato che le videoriprese sono avvenute di notte, con conseguente minor qualità delle immagini. Il capriolo del Marzo 2013 è l'unico ad essere transitato a lungo davanti alle fototrappole e in pieno giorno. Le immagini hanno documentato la sua fuoriuscita all'esterno del Parco attraverso le paratie semovibili sul fiume Ceronda.

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il primo aspetto che ci sembra importante sottolineare è il ritrovamento, all'interno del Parco Regionale La Mandria, di un capriolo fortemente infestato dal parassita *F. magna*. A quanto ci consta, questa è la prima segnalazione di *F. magna* in un capriolo in Italia. E' possibile che l'estinzione del capriolo all'interno del Parco Regionale La Mandria, avvenuta negli Anni Settanta, fosse già collegabile all'infestazione da parte del trematode, ma di questo non esistono evidenze.

Un secondo aspetto meritevole di attenzione è la presenza, nel soggetto di cui sopra, di una carica parassitaria importante associata alla presenza di uova di *F. magna* nelle feci, ossia di un'infestazione patente. Questo contrasta con la visione comune, che vedrebbe nel capriolo un ospite troppo sensibile alla fase di migrazione del parassita per poter giocare un ruolo di ospite definitivo (Pybus, 2001; Sattman et al., 2014). Il nostro ritrovamento, peraltro, è in linea con quanto segnalato da altri Autori (Rajsky et al., 2002; Plotz et al., 2015). Ovviamente, quanto sopra non implica, necessariamente, che il capriolo possa giocare un ruolo di reservoir autonomo, cioè mantenere la circolazione del parassita ed eventualmente favorirne l'espansione geografica anche in assenza di cervi o daini infestati.

Un terzo interessante contributo di questa tesi è la messa a punto di una mappa di rischio per la presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, rappresentati nell'area di studio dalle specie *G. truncatula* e *R. peregra*. La mappa è risultata strumento essenziale per il ritrovamento dei gasteropodi in modo particolare nell'area di pre-parco, mai oggetto in precedenza di studi malacologici di campo. In precedenza, un documento simile aveva guidato con successo la ricerca dei potenziali ospiti intermedi di *Fasciola hepatica* all'interno di un territorio molto più

vasto, rappresentato dall'intera Confederazione Elvetica (*Rapsch et al., 2008*). In futuro, potrebbe essere utile estendere l'applicazione della nostra mappa anche alle aree della Nord Italia dove ancora viene esercitato un pascolo con ruminanti domestici. Questo potrebbe indirizzare non solo la ricerca degli eventuali ospiti intermedi di *F. hepatica*, sostanzialmente analoghi a quelli di *F. magna*, ma anche il campionamento delle aziende zootecniche, ottimizzandone la rappresentatività con beneficio su tempi e costi.

L'utilizzo del suolo e la sua permeabilità sono i due parametri da noi scelti aprioristicamente per lo sviluppo della mappa di rischio predittiva della presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*. Anche se la loro importanza risulta in lavori simili (*Rapsch et al., 2008*), riteniamo che il nostro modello – pur valido come testimoniato dai risultati – sarebbe stato ancora migliore se altri parametri aggiuntivi fossero stati inclusi sin da subito. Fra questi, potrebbero prestarsi a un futuro affinamento del modello l'umidità ambientale, le precipitazioni e la pendenza dei suoli (*Tum et al., 2004; Rapsch et al., 2008*). Altri lavori simili hanno considerato anche l'inondabilità (*Tum et al., 2004*), ma questo parametro non sembra pertinente, alle nostre latitudini e a maggior ragione nella nostra area di studio, per le dimensioni dei fiumi e la tipologia dei terreni. Inoltre, se anche la temperatura gioca un ruolo fondamentale nel determinare la presenza dei gasteropodi, l'utilizzo di questa variabile nel modello predittivo non è sembrata poter essere così migliorativa dello stesso, a differenza - ad esempio - di quanto segnalato per il continente africano (*Malone et al., 1998*).

La ricerca dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, guidata dalla mappa di rischio, ne ha evidenziato una diffusa presenza anche nell'area di pre-parco, con ritrovamenti nelle tre sottozone considerate. Nell'area di pre-parco, tuttavia, i siti positivi per detti

ospiti costituivano solo una parte limitata dei potenziali ambienti umidi campionati e, a differenza di quanto osservato all'interno del Parco, corrispondevano quasi esclusivamente a canali per l'irrigazione dei campi agricoli (per lo più di mais). Analogamente a quanto si riscontra nel Parco, anche nei focolai dell'Est Europa le aree agricole rappresentano solo una frazione dei siti dove sono presenti i potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, che invece preferiscono ambienti naturali periodicamente allagati dalle piene del Danubio (Spakulova et al., 2003). Infine, la numerosità dei potenziali ospiti intermedi a livello dei siti positivi è risultata inferiore rispetto ai campionamenti effettuati nel Parco e quanto segnalato relativamente ai focolai di fascioloidosi presenti nell'Est Europeo (Erhardova-kotrka, 1971; Rajsky et al., 2002; Spakulova et al., 2003).

La misurazione delle caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua in corrispondenza degli ambienti umidi indagati ha permesso di mettere in evidenza differenze fra il Parco e il pre-parco, più precisamente per quanto riguarda i valori di conduttività e di TDS (ioni disciolti nei liquidi), significativamente meno elevati all'interno del Parco. Non ci è stato possibile trovare, in letteratura, associazioni fra questi parametri e la presenza/abbondanza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna* o *F. hepatica*. In generale, comunque, gli organismi acquatici sono molto sensibili a questo valore e sopportano male variazioni della conduttività, in quanto ad essa è correlata la pressione osmotica. A sua volta, la presenza di ioni disciolti (TDS), fra cui in particolare gli ioni carbonato e gli ioni fosfato è indispensabile per la corretta formazione della conchiglia dei gasteropodi. Non stupisce, dunque, che la loro concentrazione possa costituire un marker dell'idoneità di una raccolta d'acqua ad ospitare colonie riproduttive di gasteropodi anfibi, quali *G. truncatula* e *R. peregra*. In futuro, potrebbe essere interessante studiare se la conduttività dell'acqua e la

presenza di ioni disciolti risentano o meno delle attività agricole, ciò che almeno in parte potrebbe spiegare la diminuita prevalenza di *F. hepatica* in quelle che erano le zone tradizionalmente endemiche della pianura piemontese (Meneguz, ex verbis).

Non vi erano invece differenze fra il Parco e il pre-parco per quanto riguarda i parametri Temperatura, pH, e concentrazione di ossigeno (DO e Dosat). Come già suggerito da altri Autori (Kendall et McCullough, 1951; Taylor, 1965; Spakulova, 2003), i valori di temperatura e pH devono rimanere in un range ben definito (pH neutro o debolmente alcalino e temperatura compresa tra i 10°C e 25°C) perché i gasteropodi acquatici potenziali ospiti di trematodi possano completare il loro sviluppo.

Un'ulteriore importante differenza fra gli ambienti umidi all'interno e all'esterno del muro di cinta del Parco riguarda la presenza delle alghe, significativamente superiore all'interno, a testimonianza di condizioni trofiche più favorevoli alla presenza dei gasteropodi di nostro interesse.

E' infine da sottolineare la prima messa in evidenza di DNA di *F. magna* all'interno di esemplari di *G. truncatula* raccolti all'interno del Parco, a conferma di un ruolo vettoriale ipotizzato da tempo ma mai compiutamente dimostrato. La prevalenza dei gasteropodi infestati dal trematode è parsa in linea con quanto recentemente riportato in letteratura (Sattman, 2008; Haider et al, 2012).

Tornando al tema generale della tesi, e cioè se i caprioli possano alterare la focalità naturale di *F. magna* consentendone un'espansione verso ambienti esterni al Parco, evento sinora mai verificatosi in oltre 150 dall'importazione accidentale del parassita, le evidenze di cui disponiamo sono le seguenti:

- 1) *F. magna* non è dimostrabile in ruminanti selvatici presenti all'esterno del Parco. E' evidente, tuttavia, come il numero di carcasse provenienti dall'area

di pre-Parco, a immediato ridosso del muro di cinta, sia insufficiente per una netta conclusione in questo senso;

- 2) Nel pre-Parco sono evidenziabili ambienti favorevoli alla presenza dei potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, e gli stessi sono stati effettivamente rinvenuti, con l'ausilio importante della mappa di rischio da noi messa a punto. Peraltro, sia la densità degli ambienti acquatici che la loro idoneità ad ospitare colonie numerose dei potenziali ospiti intermedi sono significativamente inferiori all'esterno del Parco, dove in generale è minore la naturalità e maggiore l'impatto antropico;
- 3) Le forme evolutive di *F. magna* sono state dimostrate solo in gasteropodi raccolti all'interno del Parco. Alla luce dei dati presenti in letteratura (Sattman, 2008; Haider et al, 2012), il campionamento da noi effettuato sembrerebbe numericamente adeguato per confidare nell'attendibilità del risultato ottenuto;
- 4) Infine, i movimenti di caprioli da e verso l'area cintata del Parco, dove potrebbero infestarsi, sono risultati meno frequenti di quanto atteso. Altrettanto può dirsi per quanto riguarda i movimenti di cervi e daini, "tradizionali" ospiti intermedi di *F. magna* nell'area di studio.

Pur i limiti di campionamento sopra richiamati, l'insieme di dette evidenze offre una giustificazione plausibile della mancata espansione di *F. magna* verso le aree esterne al muro di cinta, ormai ripopolatesi con specie potenzialmente recettive al parassita, capriolo *in primis*. In particolare, sembra potersi concludere che la semplice somma fra gli "attori" (ospiti intermedi e definitivi) del ciclo biologico di *F. magna* e un certo flusso di forme parassitarie (uova) in ingresso nel "sistema" pre-Parco non sia stata sufficiente per garantire la colonizzazione stabile, da parte del parassita, delle

biocenosi prossime al Parco. Con tutta evidenza, all'esterno dell'area cintata l'incontro fra il parassita, i suoi ospiti intermedi e i suoi ospiti definitivi resta aleatorio per ragioni di tipo quantitativo, verosimilmente legate: i) alla densità non elevata degli ambienti umidi; ii) alla loro relativa inospitalità per i potenziali ospiti intermedi di *F. magna*, possibile conseguenza di un diverso uso del territorio; iii) al limitato appeal che i potenziali ambienti di incontro con le forme infestanti di *F. magna*, essenzialmente rappresentati da canali di irrigazione, possono esercitare sul capriolo; iv) al flusso non elevato di caprioli ed altri Cervidi recettivi a *F. magna*, dunque possibili eliminatori delle sue uova, in fuoriuscita dall'area cintata del Parco.

Tutto questo nulla toglie alla possibilità che l'incontro possa avvenire e/o che la situazione possa evolvere in senso favorevole al parassita, ad esempio attraverso una rinaturalizzazione degli ambienti circostanti il muro di cinta, al momento essenzialmente occupati da coltivazioni di mais, e/o un aumento numerico del capriolo all'interno del Parco (da cui una sua maggior esposizione a *F. magna* da un lato e un suo aumentato flusso verso il pre-Parco dall'altro). Per questi motivi ci sembra opportuno che non venga trascurato l'unico intervento a carattere preventivo praticabile con relativa facilità, e cioè la manutenzione delle paratie semovibili sul fiume Ceronda, Ponte del Violino, che limitano il flusso di animali da e verso il Parco. In aggiunta, potrebbe essere considerato un rinforzo di questo unico significativo punto di passaggio di Cervidi mediante uso di recinzioni elettriche o altro tipo di dissuasori. Difficilmente praticabile, e di dubbia efficacia almeno nella situazione attuale, sarebbe un intervento volto a contenere il numero di caprioli all'interno dell'area cintata Parco, che si ha motivo di ritenere ancora molto basso. Sarà invece importante che venga incrementata la pressione di sorveglianza passiva

(e possibilmente attiva) sui caprioli presenti nel pre-Parco e nelle zone planiziali immediatamente adiacenti.



Figura 6.1: situazione (settembre 2015) delle paratie semovibili sul fiume Ceronda

7. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Balbo T., Lanfranchi P., Rossi L., Meneguz P.G. (1987) Health management of a red deer population infected by *Fascioloides magna*. *Annali Fac. Med. Vet. Torino* **32**:23-33.

- ❖ Balbo T., Rossi L., Meneguz P.G. (1989) Integrated control of *F.magna* infection in northern Italy. *Parassitologia* **31**:137-144.

- ❖ Bassi (1875) Sulla cachessia ittero verminosa o marciaria dei cervi, causata da *Distomum magnum*. *Annali Fac. Med. Vet. Torino* n° 11 e n° 12.

- ❖ Bayoh M. N., Thomas C. J., Lindsay S. W. (2001) Mapping distributions of chromosomal forms of anopheles gambiae in west africa using climate data. *Med Vet Entomol* **15**:267-74.

- ❖ Boomker J., Dale-Kuys J. C. (1977) 1st report of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res* **44**:49-51.

- ❖ Boray J.C., Crowfoot P.D., Strong J.R., Allison M., Schellenbaum M., Orelli M., Sarasin G. (1983) Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Res* **113**: 315-317.

- ❖ Calistri P., Goffredo M., Caporale V., Meiswinkel R. (2003) The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**:132-8.
- ❖ Campbell W.C. and A.C. Todd. (1954) Natural infections of *Fascioloides magna* in Wisconsin sheep. *The Journal of Parasitology*. **40**:100.
- ❖ Campbell W.C. (1960) Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. *Journal of Parasitology* **46**:769-775.
- ❖ Campbell W.C. (1961) Notes on the egg and miracidium of *Fascioloides magna*, (Trematoda). *Transactions of the American Microscopical Society* **80** :308-319.
- ❖ Capela R., Purse B. V., Pena I., Wittman E. J., Margarita Y., Capela M., Romao L., Mellor P. S., Baylis M. (2003) Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Med Vet Entomol* **17** : 165-77.
- ❖ Chroust, K. Rozšíření (1987) kokcidiózy a helmintózy z převýkávé zvěře v ČSR. *Folia Venatoria* **17**:91-104.
- ❖ Cossignani T. & V. 1995: Atlante delle conchiglie terrestri e dulciacquicole italiane – L'informatore Piceno 13, 50, 51.
- ❖ Dean AG, Arner TG, Sunki GG, Friedman R, Lantinga M, Sangam S, Zubieta JC, Sullivan KM, Brendel KA, Gao Z, Fontaine N, Shu M, Fuller G, Smith

DC, Nitschke DA, and Fagan RF (2011) Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals CDC, Atlanta, GA, USA.

- ❖ Devi P. M., Manickiam B., Balasubramanian S. (2003) Use of remote sensing and gis for monitoring the environmental factors associated with vectorborne disease (malaria) *Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health*, Chennai, India, 15-17 December, 2003. Chennai: Department of Geography, University of Madras and Faculty of Environmental Studies, York University. Pages 127 – 137.
- ❖ Doumenge J. P., Mott K. E., Cheung C., Villenave D., Chapuis O., Perrin M., Reaud-Thmas G. (1987) Atlas of the Global Distribution of Schistosomiasis. Centre de Recherche sur les Espaces Tropicaux, Bordeaux.
- ❖ Eckert J., Schveiter G., Wolff K. (1984) Fasinex (triclabendazole): A new fasciolicide. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* **97**:349-356.
- ❖ Erhardova-Kotrlá, B. (1961) Fascioloides magna in Europe. *Helminthologia* **3**:91-106.
- ❖ Erhardová-Kotrlá, B. and Blazek, K. (1970) Artificial infestation caused by the fluke Fascioloides magna. *Acta Veterinaria (Brno)* **39**: 287-295.
- ❖ Erhardová-Kotrlá B. (1971) The occurrence of Fascioloides magna in Czechoslovakia. *Prague, Academia*, 155 pp.

- ❖ Faltýnková, A., Horáčková, E., Hirtová, L., Novobilský, A., Modrý, D., Scholz, T., (2006) Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica* **51**: 87–90.

- ❖ Foreyt, W. J. and A. C. Todd. 1976. Development of the large American liver fluke *Fascioloides magna* in white-tailed deer, cattle and sheep. *J. Parasitol.* **62**:26–32.

- ❖ Foreyt, W. J., W. M. Samuel, and A. C. Todd (1977) *Fascioloides magna* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): observation of the pairing tendency. *J. Parasitol.* **63**:1050–1052.

- ❖ Foreyt W. And Drawe D.L. (1978) Anthelmintic Activity of Albendazole in white tailed deer. *American J. Vet. Res.* **39** :1901-1903.

- ❖ Foreyt W.J. and Drawe D.L. (1985) Efficacy of clorsulon and albendazole against *Fascioloides magna* in naturally infected white-tailed deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **187**: 1187-1188.

- ❖ Foreyt W.J. (1988) Evaluation of clorsulon against immature *Fascioloides magna* in cattle and sheep. *American J. Vet. Res.* **49** :1004-1006.

- ❖ Foreyt J. (1996) Susceptibility of Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*) to Experimentally-Induced *Fascioloides magna* Infections. *Journal of Wildlife Disease* **32**:556-559.

- ❖ Furlanello C., Neteler M., Merler S., Menegon S., Fontanari S., Donini A., Rizzoli A., Chemini C. (2003) Gis and the random forest predictor: Integration in r for tick-borne disease risk assessment *In Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing (DSC 2003)*. A cura di Hornik K., Leisch F., Zeileis A., Vienna, Austria.

- ❖ Griffiths HJ (1959) *Stagnicola (Hinckleyia) caperata* Say, a natural intermediate host for *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), in Minnesota. *J Parasitol* **49**: 146.

- ❖ Haider, M., Hörweg, C., Liesinger, K., Sattmann, H., Walochnik, J. (2012) Recovery of *Fascioloides magna* (Digenea) population in spite of treatment programme? Screening of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) from Lower Austria. *Veterinary Parasitology* **187**: 445-451.

- ❖ Kasny M., Beran L., Siegelova V., Siegel T., Leontovyc R., Berankova K., Pankrac J., Kostakova M., Horak P. (2012) Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Vet Med-Czech* **57**:101-109.

- ❖ Kralova-Hromadova, I., Bazsalovicsova E., Stefka J., Spakulova M., Vavrova S., Szemes T. (2011) Multiple origins of European population of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fascioloidae), a liver parasite of ruminants. *Int. J. Parasitol* **41**:373– 383.

- ❖ Kendall S., McCullough F. (1951) The emergence of cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Limnaea truncatula*. *Journal of Helminthology* **25**:77-92.

- ❖ Kendall S. (1949) Nutritional factors affecting the rate of development of *Fasciola hepatica* in *Limnaea truncatula*. *Journal of Helminthology* **23**: 179-190.

- ❖ Knapp S., Dunkel A., Han K, Zimmerman L. Epizootiology of fascioliasis in Montana (1992) *Veterinary Parasitology* **42**:241-246.

- ❖ Lawson, A., Biggeri, A., Böhning, D., Lesaffre, E., Viel, J. F., Bertollini, R. Disease mapping and risk assessment for public health. WHO 1999 pp 482 ISBN 0471986348.

- ❖ Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques
Ministry Of Agriculture, Fisheries and Food Published by HMSO (1971)
ISBN : 0112409180.

- ❖ Marinculic, A., N. Dzakula, Z. Janicki, S. Lucinger, and T. Zivicniak. (2002)
Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in
Croatia- a case report. *Vet. Arhiv* **72**:319–325.

- ❖ Malone, J.B., Gommers, R., Hansen, J., Yilma, J.M., Slingenberg, J.,
Snijders, F., Nachtergaele, F., Ataman, E. (1998) A geographic
information system on the potential distribution and abundance of
Fasciola hepatica and *F. gigantica* in east Africa based on Food and
Agriculture Organization databases. *Vet. Parasitol* **78**:87–101.

- ❖ Mekroud A, Benakha A, Benlatreche C, Rondelaud D. Dreyfuss G (2002)
First studies on the habitats of *Galba truncatula* (Mollusca Gastropoda:
Lymnaeidae), the snail host of *Fasciola hepatica*, and the dynamics of snail
populations in Northeastern Algeria. *Rev. Méd. Vét.* **153**:181–188.

- ❖ Mulvey, M. (1991) Comparative population genetic structure of a parasite
(*Fascioloides magna*) and its definitive host. *Evolution* **45**:1628–1640.

- ❖ Novobilsky A., Horackova E., Hirtova L., Modry D., Koudela B. (2007): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research* **100**: 549–553.
- ❖ Ollerenshaw C.B., Smith L.P. (1969) Meteorological factors and forecasts of helminthic disease. *Adv. Parasitol* **7**: 283–323.
- ❖ Pfeiffer H. (1983) *Fascioloides magna*: Erster Fund in Österreich. *Wiener tierärztliche Monatschrift* **70**: 168-170.
- ❖ Plötz C, Rehbein S, Bamler H, Reindl H, Pfister K, Scheuerle MC (2015) *Fascioloides magna* : epizootiology in a deer farm in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **128**: 177-82.
- ❖ Pybus M. J. (1990) Survey of hepatic and pulmonary helminths of wild cervids in Alberta, Canada. *Journal of Wildlife Diseases* **26**: 453-459.
- ❖ Pybus M.J. (2001) Liver flukes. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State Press, 121-149.
- ❖ QGIS Development Team (2014) Qgis Geographic Information System. Open source Geospatial Foundation Project.

- ❖ R Development Core Team, 2012. R : a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- ❖ Rapsch, C., Dahinden T., Heinzmann D., Torgerson P. R., Braun U., Deplazes P., Hurni L., H. Bär and G. Knubben-Schweizer (2008) An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol* **154**: 242-249.

- ❖ Rajskey, D., Patus, A., Bukovjan K. (1994) Prvy nalez *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) na Slovensku. *Slov. Vet. Čas* **19**: 29-30.

- ❖ Rajskey D., Corba J., Varady M., Spakulova M., Cabadaj R. (2002) Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red and roe deer. *Helmintologia* **39**: 67-70.

- ❖ Rogers D.; Hay S.; Packer M. (1996) Predicting the distribution of tsetse flies in West Africa using temporal Fourier processed meteorological satellite. *Ann Trop Med Parasitol* **90**: 225-41.

- ❖ Sattmann, H., Hörweg, C., Gaub, L., Feix, A. S., Haider, M., Walochnik, J., Prosl, H. (2014) Wherefrom and whereabouts of an alien: the American liver fluke *Fascioloides magna* in Austria: an overview. *Wiener Klinische Wochenschrift* **126** : 23-31.

- ❖ Slusarsky, W.(1955) Studia nad europejskim przedstawicielami przywry *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) I. Ponowne wykrycie inwazji u jeleni na Slacsku. *Acta Parasitol* **3**:1-59.
- ❖ Stensgaard A., Jorgensen A., Kabatereine NB., Rahbek C., Kristensen TK. (2006) Modeling freshwater snail habitat suitability and areas of potential snail-borne disease transmission in Uganda. *Geospatial Health* **1**: 93–104.
- ❖ Sinitsin DF (1930) A note on the life history of the large American liver fluke, *Fasciola magna* (Bassi). *Science* **72**: 273–4.
- ❖ Spakulova M., Rajskey D., Sokol J., Vodnansky M. (2003) Giant liver fluke (*Fascioloides magna*), an important liver parasite of ruminants - *PaRPRESS Bratislava*, 61pp (ISBN 80-88789-96-6).
- ❖ Stiles, C. W. (1895): The anatomy of the large American fluke (*Fasciola magna*) and a comparison with other species of the genus *Fasciola*, *Comp. Med. Vet. Arch.*, **15**: 161-178, 225-243, 299-313, 407-417, 457-462; **16**: 139-147, 213-222, 277-282.
- ❖ Swales W.E. (1935): The life cycle of *F.magna* the large liver fluke of ruminants, in Canada. With observation on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. *Can.J.Res* **12**: 177-215.

- ❖ Sztojkov V., Majoros G., Kaman K. (1995): Szarvasokban ebo nagy amerikai majmetely (*Fascioloides magna*) megjelenese Magyarorszagon. *Mag. Allat. Lap.* **50**: 157-159.

- ❖ Taylor (1965) Le maladies vermineuse des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome II Livre I – *Vigot Freres Editeurs* 338-362.

- ❖ Thomson M. C. and Connor S. J. (2000) Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* **14**: 227–44.

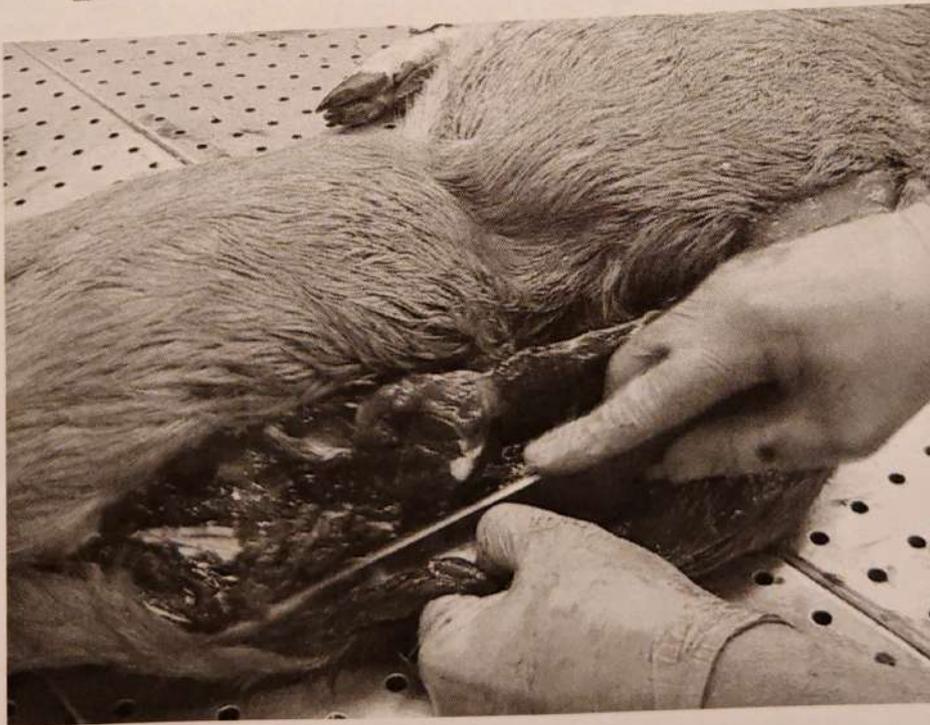
- ❖ Tum S., Puotinen ML., Copemanc DB (2004) A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Vet Parasitol.* **122**:141–49.

- ❖ Ulrich K. (1930) Uber das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vögel in Böhnen und Mähren. *Pr. Ar. Tiermed.* **10**: 19–43.

- ❖ Ward H.B. (1917) On the structure and classification of North American parasitic worms *J. Parasitol.* **4**: 1-11.

8. APPENDICI

Capriolo numero 2 recuperato per l'azione "sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici"





Capriolo numero 4 recuperato per l'azione "sorveglianza passiva sui ruminanti selvatici"





Punti campionati nell'area di pre-parco dopo pianificazione con mappa predittiva
Esempi aggiuntivi di ambienti campionati per zona di suddivisione
(Sud, Medio, Nord)
Sottopunto Sud_2_1



Sud_4_1



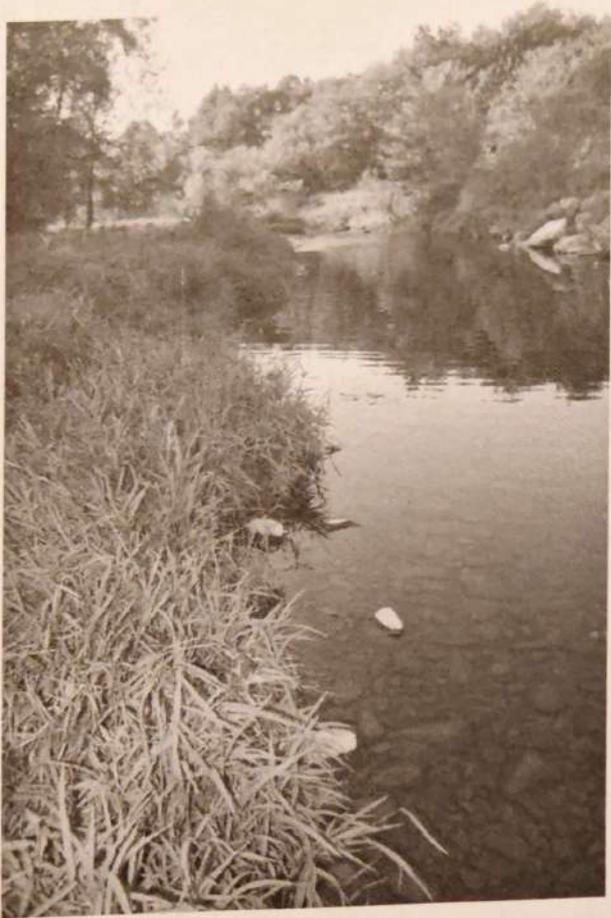
Sottopunto_11_1



Medio_5_1



Medio_7_1



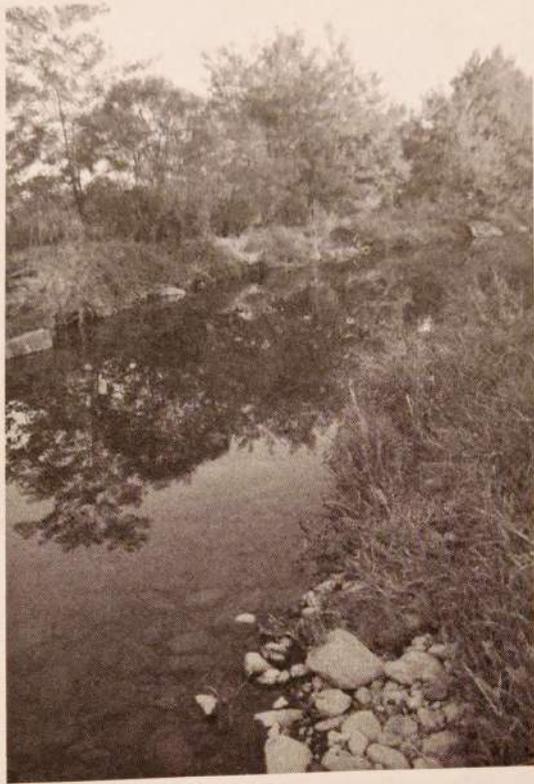
Medio_8_3



Medio_10_2



Nord_5_1



Nord_6_1





Nord_6_2

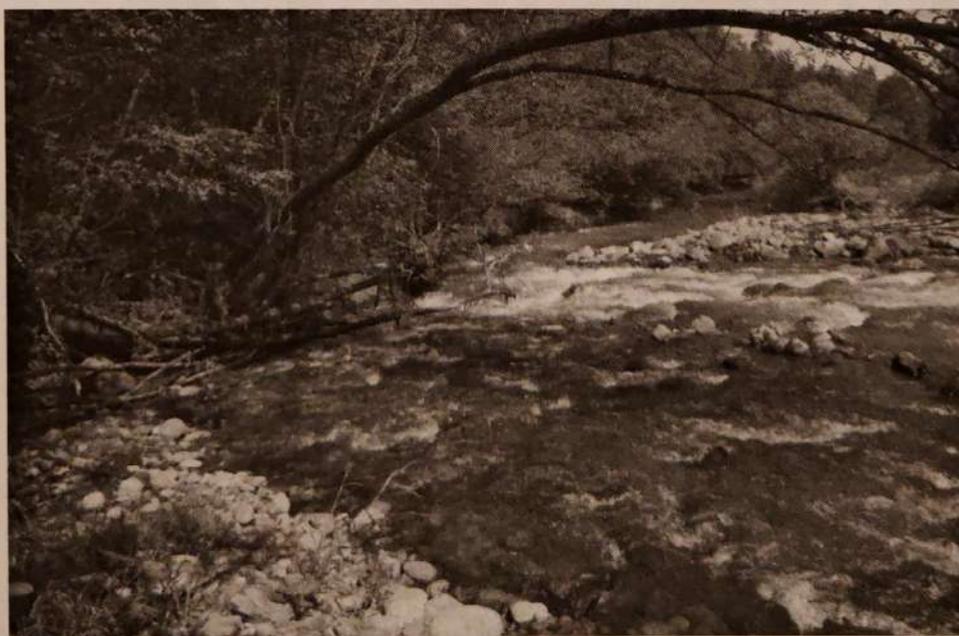


Esempi aggiuntivi di tipologie di ambienti umidi all'interno del Parco La Mandria

Sottopunto Galliassi_Alto



Sottopunto Bizzarria_2



Sottopunto Galliassi Alto



Parametri numerici campionati nelle tre stagioni nell'area di pre-parco più controlli(campionamento 2013)

Sito	Punti	Presenza	N_Lim	Rischio	T	TcCond	Cond	TDS	Sal	Dosat	DO	Ph
Sud_1	Sud_1_1	0	0	alto	13,36	94	0,073	0,061	0,04	67,8	7,08	6
Sud_1	Sud_1_2	0	0	alto	27,96	194	0,205	0,126	0,09	87,4	6,85	7
Sud_1	Sud_1_3	0	0	alto	14,9	190	0,153	0,123	0,09	62,8	6,34	8
Sud_1	Sud_1_1	1	11	alto	17,71	99	0,086	0,065	0,05	54,1	5,15	7
Sud_1	Sud_1_2	0	prosciugato	alto								
Sud_1	Sud_1_3	0	Prosciugato	alto								
Sud_1	Sud_1_1	1	1	alto	14	113	0,089	0,073	0,05	63,4	6,53	7
Sud_1	Sud_1_2	0	0	alto	17,27	182	0,156	0,119	0,09	51,7	4,97	7
Sud_1	Sud_1_3	0	prosciugato	alto								
Sud_2	Sud_2_1	1	10	medio	26,12	376	0,384	0,24	0,18	74,6	6,03	7
Sud_2	Sud_2_1	0	0	medio	29,22	100	0,108	0,065	0,05	56,9	4,36	8
Sud_2	Sud_2_1	0	0	medio	17,16	245	0,208	0,159	0,12	42,7	4,11	7
Sud_3	Sud_3_1	0	0	basso	26,78	352	0,364	0,232	0,13	56	4,32	7
Sud_3	Sud_3_1	0	0	basso	30,47	370	0,409	0,241	0,17	52	3,9	7
Sud_3	Sud_3_1	0	0	basso	25,86	358	0,37	0,238	0,14	58	4,57	7
Sud_4	Sud_4_1	0	0	basso	16,64	113	0,12	0,081	0,05	59	4,78	6
Sud_4	Sud_4_1	0	0	basso	18,28	107	0,113	0,09	0,05	57	4,64	7
Sud_4	Sud_4_1	0	0	basso	15,9	120	0,125	0,085	0,05	60	4,89	7
Sud_5	Sud_5_1	0	0	medio	15,72	274	0,226	0,178	0,13	65	6,45	6
Sud_5	Sud_5_1	0	Prosciugato	medio								
Sud_5	Sud_5_1	0	Prosciugato	medio								
Sud_8	Sud_8_1	0	0	basso	15,42	118	0,096	0,077	0,06	73,3	7,32	6
Sud_8	Sud_8_1	0	0	basso	18,61	111	0,097	0,072	0,05	65,2	6,09	6
Sud_8	Sud_8_1	0	0	basso	14,7	115	0,09	0,075	0,05	62,5	6,45	7
Sud_9	Sud_9_1	0	0	alto	16,62	291	0,244	0,189	0,14	86,8	8,45	7
Sud_9	Sud_9_1	0	0	alto	16,62	146	0,123	0,095	0,07	46,4	4,52	7
Sud_9	Sud_9_1	0	Prosciugato	alto								

Sud_10	Sud_10_1	0	0	0	0	25,95	103	0,105	0,067	0,05	87,6	7,11	6
Sud_10	Sud_10_2	0	0	0	0	18,07	173	0,15	0,112	0,08	82,6	7,81	6
Sud_10	Sud_10_3	0	0	0	0	23,54	266	0,259	0,173	0,13	66,8	5,67	6
Sud_10	Sud_10_1	0	Prosciugato	0	0								
Sud_10	Sud_10_2	0	Prosciugato	0	0								
Sud_10	Sud_10_3	0	Prosciugato	0	0								
Sud_10	Sud_10_1	0	Prosciugato	0	0								
Sud_10	Sud_10_2	0	Prosciugato	0	0								
Sud_10	Sud_10_3	0	Prosciugato	0	0								
Sud_11	Sud_11_1	0	0	0	0	15,97	162	0,134	0,105	0,08	70,9	7	7
Sud_11	Sud_11_1	0	0	0	0	24,86	58	0,058	0,038	0,03	47,6	3,94	7
Sud_11	Sud_11_1	0	0	0	0	15,99	322	0,267	0,21	0,15	48,7	4,8	7
Medio_1	Medio_1_1	0	0	0	0	20,86	100	0,092	0,065	0,05	53,7	4,8	6
Medio_1	Medio_1_1	0	0	0	0	22,47	105	0,1	0,068	0,05	44,4	3,85	7
Medio_1	Medio_1_1	0	0	0	0	15,41	95	0,078	0,062	0,04	58,5	5,85	7
Medio_2	Medio_2_1	0	0	0	0	20,84	97	0,089	0,063	0,05	59,3	5,27	6
Medio_2	Medio_2_2	0	0	0	0	15,21	105	0,085	0,068	0,05	50,8	5,1	6
Medio_2	Medio_2_1	0	0	0	0	23,4	124	0,12	0,081	0,06	44	3,74	7
Medio_2	Medio_2_2	0	0	0	0	20,53	146	0,134	0,095	0,07	49	4,4	7
Medio_2	Medio_2_1	0	0	0	0	15,13	90	0,073	0,058	0,04	60,2	6,05	6
Medio_2	Medio_2_2	0	Prosciugato	0	0								
Medio_3	Medio_3_1	1	1	1	1	21,3	174	0,162	0,113	0,08	59,1	5,24	7
Medio_3	Medio_3_1	0	0	0	0	20,89	143	0,132	0,093	0,07	30,2	2,7	7
Medio_3	Medio_3_1	1	12	1	1	18,76	159	0,149	0,124	0,07	48,5	3,7	7
Medio_5	Medio_5_1	0	0	0	0	31,24	464	0,519	0,301	0,22	74	5,47	7
Medio_5	Medio_5_2	1	4	1	1	32,12	166	0,189	0,108	0,08	46,3	3,37	7
Medio_5	Medio_5_3	0	0	0	0	26,52	742	0,764	0,482	0,36	29,1	2,33	7
Medio_5	Medio_5_1	0	0	0	0	24,72	54	0,054	0,035	0,02	33,7	2,8	7
Medio_5	Medio_5_2	1	15	1	1	25,57	900	0,91	0,585	0,44	28	2,29	7
Medio_5	Medio_5_3	0	0	0	0	29,94	450	0,492	0,292	0,21	16,7	1,27	7

Medio_5	Medio_5_1	0		0	medio	17,5	100	0,086	0,065	0,05	54	5,17	7
Medio_5	Medio_5_2	0		0	medio	15,95	863	0,714	0,561	0,43	46,9	4,62	7
Medio_5	Medio_5_3	0		0	medio	16,19	267	0,222	0,174	0,13	45	4,42	7
Medio_6	Medio_6_1	0		0	medio	23,5	367	0,357	0,239	0,18	43,2	3,67	7
Medio_6	Medio_6_2	0		0	medio	26,76	253	0,262	0,165	0,12	33,7	2,7	7
Medio_6	Medio_6_1	0		0	medio	26,57	122	0,126	0,08	0,06	41,1	3,3	7
Medio_6	Medio_6_2	0		0	medio	26,55	121	0,125	0,079	0,06	38,8	3,12	7
Medio_6	Medio_6_1	0		0	medio	15,66	93	0,076	0,06	0,04	46,5	4,62	7
Medio_6	Medio_6_2	0		0	medio	15,33	95	0,077	0,062	0,04	47,4	4,74	7
Medio_7	Medio_7_1	0		0	basso	21,17	98	0,081	0,07	0,05	58,7	5,09	7
Medio_7	Medio_7_1	0		0	basso	26,06	124	0,126	0,08	0,06	43,2	3,5	7
Medio_7	Medio_7_1	0		0	basso	15,25	95	0,078	0,062	0,04	58,5	5,87	7
Medio_8	Medio_8_1	0		0	alto	15,77	56	0,046	0,036	0,03	30,7	3,05	6
Medio_8	Medio_8_2	0		0	alto	17,74	100	0,086	0,065	0,05	32	3,04	7
Medio_8	Medio_8_3	0		0	alto	18,96	94	0,083	0,061	0,04	50,9	4,73	6
Medio_8	Medio_8_1	0		0	alto	24,42	140	0,132	0,086	0,06	36,5	3,12	7
Medio_8	Medio_8_2	0		0	alto	23,06	150	0,145	0,098	0,07	35,4	3,03	7
Medio_8	Medio_8_3	0		0	alto	21,06	121	0,112	0,079	0,06	40,3	3,59	7
Medio_8	Medio_8_1	0		0	alto	21,68	137	0,125	0,074	0,04	34,7	3,04	7
Medio_8	Medio_8_2	0		0	alto	23,07	146	0,136	0,089	0,06	33,4	2,86	7
Medio_8	Medio_8_3	0		0	alto	18,8	110	0,099	0,069	0,05	45,6	4,2	7
Medio_10	Medio_10_1	0		0	alto	14,61	82	0,065	0,053	0,04	66	6,71	6
Medio_10	Medio_10_2	0		0	alto	33,21	647	0,748	0,42	0,31	52,1	3,73	8
Medio_10	Medio_10_3	1		21	alto	31,24	464	0,519	0,301	0,22	74	5,47	7
Medio_10	Medio_10_1	0		0	alto	17,72	103	0,088	0,067	0,05	55,6	5,29	7
Medio_10	Medio_10_2	0		0	Prosciugato								
Medio_10	Medio_10_3	1		24	alto	28,95	615	0,662	0,4	0,3	20,4	1,57	7
Medio_10	Medio_10_1	0		0	alto	15,03	89	0,072	0,058	0,04	64,9	6,53	6
Medio_10	Medio_10_2	0		0	alto	17,34	345	0,294	0,224	0,17	48,7	4,67	7
Medio_10	Medio_10_3	1		19	alto	19,17	210	0,186	0,136	0,1	42,7	3,94	7
Nord_1	Nord_1_1	0		0	basso	18,04	94	0,08	0,067	0,05	64,5	6,85	6

Borgo Castello		0 Prosciugato													
Ceronda(bordo)		1	4			19,86	104	0,093	0,067	0,05	39,8	3,63	7		
Ceronda		1	15			20,06	100	0,091	0,065	0,05	49,6	4,5	7		
Bassa Colleria Prato		0 Prosciugato													
Fosso Pascolo		1	6			22,89	113	0,108	0,073	0,05	49,7	4,27	7		
Borgo Castello		0	0			28,13	285	0,302	0,185	0,13	43,1	3,37	7		
Ceronda(bordo)		0	0			14,86	105	0,085	0,068	0,05	50,1	5,07	6		
Ceronda		0	0			14,4	92	0,073	0,06	0,04	56,6	5,78	6		
Bassa Colleria Prato		0	5			14,84	103	0,083	0,067	0,05	42	4,25	7		
Fosso Pascolo		0	0			16,44	150	0,125	0,097	0,07	49,2	4,86	7		
Borgo Castello		0	0			16,73	112	0,094	0,073	0,05	48,7	4,67	7		

Parametri fattoriali campionati nelle tre stagioni nell'area di pre-parco più controlli(campionamento 2013)

Sito	Punti	Alghe	Zona	Fondo	Acqua_Corrente	Lumachine	Periodo	Pozza	Tipo
Sud_1_1	Sud_1_1	0	confine	fangoso	1		0	primavera	canale permanente
Sud_1_2	Sud_1_2	1	aperto	fangoso	0		0	primavera	pozza temporaneo
Sud_1_3	Sud_1_3	0	confine	fangoso	0		0	primavera	canale temporaneo
Sud_1_1	Sud_1_1	1	confine	fangoso	1		0	estate	canale permanente
Sud_1_2	Sud_1_2	Prosciugato							
Sud_1_3	Sud_1_3	Prosciugato							
Sud_1_1	Sud_1_1	1	confine	fangoso	1		0	autunno	canale temporaneo
Sud_1_2	Sud_1_2	1	aperto	fangoso	0		0	autunno	pozza permanente
Sud_1_3	Sud_1_3	Prosciugato							
Sud_2_1	Sud_2_1	1	aperto	fangoso	0		1	primavera	canale temporaneo
Sud_2_1	Sud_2_1	1	aperto	fangoso	0		1	estate	canale permanente
Sud_2_1	Sud_2_1	1	aperto	fangoso	0		1	autunno	canale temporaneo
Sud_3_1	Sud_3_1	0	aperto	roccioso	1		0	primavera	fiume permanente

Sud_3	Sud_3_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Sud_3	Sud_3_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Sud_4	Sud_4_1	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	fiume
Sud_4	Sud_4_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Sud_4	Sud_4_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Sud_5	Sud_5_1	1	aperto	roccioso	0	1	Primavera	temporaneo	canale
Sud_5	Sud_5_1	Prosciugato							
Sud_5	Sud_5_1	Prosciugato							
Sud_8	Sud_8_1	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	fiume
Sud_8	Sud_8_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Sud_8	Sud_8_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Sud_9	Sud_9_1	1	confine	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	pozza
Sud_9	Sud_9_1	1	confine	fangoso	0	0	Autunno	temporaneo	pozza
Sud_9	Sud_9_1	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_1	0	aperto	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	pozza
Sud_10	Sud_10_2	0	aperto	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	pozza
Sud_10	Sud_10_3	0	aperto	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	pozza
Sud_10	Sud_10_1	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_2	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_3	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_1	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_2	Prosciugato							
Sud_10	Sud_10_3	Prosciugato							
Sud_11	Sud_11_1	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	permanente	pozza
Sud_11	Sud_11_1	0	bosco	fangoso	0	0	Estate	permanente	pozza
Sud_11	Sud_11_1	0	bosco	fangoso	0	0	Autunno	permanente	pozza
Medio_1	Medio_1_1	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	fiume
Medio_1	Medio_1_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Medio_1	Medio_1_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Medio_2	Medio_2_1	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	fiume

Medio_2	Medio_2_2	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	temporaneo	pozza
Medio_2	Medio_2_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Medio_2	Medio_2_2	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	temporaneo	pozza
Medio_2	Medio_2_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Medio_2	Medio_2_2	Prosciugato							
Medio_3	Medio_3_1	1	aperto	fangoso	1	1	Primavera	temporaneo	canale
Medio_3	Medio_3_1	1	aperto	fangoso	1	1	Estate	permanente	canale
Medio_3	Medio_3_1	1	aperto	fangoso	1	1	Autunno	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_1	0	confine	fangoso	0	0	Primavera	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_2	1	aperto	fangoso	0	1	Primavera	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_3	1	aperto	fangoso	0	1	Primavera	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_1	1	confine	fangoso	0	0	Estate	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_2	1	aperto	fangoso	0	1	Estate	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_3	1	aperto	fangoso	0	1	Estate	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_1	1	confine	fangoso	0	0	Autunno	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_2	1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	permanente	canale
Medio_5	Medio_5_3	1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_1	0	aperto	fangoso	0	1	Primavera	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_2	0	aperto	fangoso	0	1	Primavera	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_1	0	aperto	fangoso	1	1	Estate	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_2	0	aperto	fangoso	1	1	Estate	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_1	0	aperto	fangoso	1	1	Estate	permanente	canale
Medio_6	Medio_6_2	0	aperto	fangoso	1	1	Estate	permanente	canale
Medio_7	Medio_7_1	0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	fiume
Medio_7	Medio_7_1	0	aperto	roccioso	1	0	Estate	permanente	fiume
Medio_7	Medio_7_1	0	aperto	roccioso	1	0	Autunno	permanente	fiume
Medio_8	Medio_8_1	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	permanente	pozza
Medio_8	Medio_8_2	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	permanente	pozza
Medio_8	Medio_8_3	0	confine	roccioso	0	0	Primavera	permanente	canale
Medio_8	Medio_8_1	0	bosco	fangoso	0	0	Estate	permanente	pozza
Medio_8	Medio_8_2	0	bosco	fangoso	0	0	Estate	permanente	pozza

Medio_8	Medio_8_3	0	confine	roccioso	0	Estate	permanente	canale
Medio_8	Medio_8_1	0	bosco	fangoso	0	Autunno	permanente	pozza
Medio_8	Medio_8_2	0	bosco	fangoso	0	Autunno	permanente	pozza
Medio_8	Medio_8_3	0	bosco	roccioso	0	Autunno	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_1	0	confine	fangoso	1	Primavera	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_2	0	aperto	fangoso	0	Primavera	temporaneo	canale
Medio_10	Medio_10_3	1	aperto	fangoso	0	Primavera	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_1	0	confine	fangoso	1	Estate	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_2	Prosciugato						
Medio_10	Medio_10_3	1	aperto	fangoso	0	Estate	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_1	0	confine	fangoso	1	Autunno	permanente	canale
Medio_10	Medio_10_2	0	aperto	fangoso	0	Autunno	temporaneo	canale
Medio_10	Medio_10_3	0	aperto	fangoso	1	Autunno	permanente	canale
Nord_1	Nord_1_1	0	aperto	fangoso	1	Primavera	permanente	fiume
Nord_1	Nord_1_1	0	aperto	fangoso	1	Estate	permanente	fiume
Nord_1	Nord_1_1	0	aperto	fangoso	1	Autunno	permanente	fiume
Nord_3	Nord_3_1	0	aperto	fangoso	1	Primavera	permanente	fiume
Nord_3	Nord_3_1	0	aperto	fangoso	1	Estate	permanente	fiume
Nord_3	Nord_3_1	0	aperto	fangoso	1	Autunno	permanente	fiume
Nord_4	Nord_4_1	0	confine	roccioso	1	Primavera	temporaneo	fiume
Nord_4	Nord_4_1	Prosciugato						
Nord_4	Nord_4_1	Prosciugato						
Nord_5	Nord_5_1	0	aperto	roccioso	1	Primavera	permanente	fiume
Nord_5	Nord_5_1	0	aperto	roccioso	1	Estate	permanente	fiume
Nord_5	Nord_5_1	0	aperto	roccioso	1	Autunno	permanente	fiume
Nord_6	Nord_6_1	0	confine	fangoso	0	Primavera	permanente	canale
Nord_6	Nord_6_2	1	confine	fangoso	0	Primavera	permanente	pozza
Nord_6	Nord_6_1	0	confine	fangoso	0	Estate	temporaneo	canale
Nord_6	Nord_6_2	1	confine	fangoso	0	Estate	permanente	pozza
Nord_6	Nord_6_1	Prosciugato						

Nord_6	Nord_6_2	1	confine	fangoso	0	0	Autunno	permanente	pozza
Nord_9	Nord_9_1	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	canale
Nord_9	Nord_9_2	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	temporaneo	fiume
Nord_9	Nord_9_3	0	bosco	fangoso	0	0	Primavera	permanente	pozza
Nord_9	Nord_9_1	Prosciugato							
Nord_9	Nord_9_2	Prosciugato							
Nord_9	Nord_9_3	0	bosco	roccioso	0	0	Estate	permanente	pozza
Nord_9	Nord_9_1	Prosciugato							
Nord_9	Nord_9_2	0	bosco	fangoso	0	0	Autunno	temporaneo	fiume
Nord_9	Nord_9_3	0	bosco	roccioso	0	0	Autunno	permanente	pozza
Ceronda(bordo)		0	confine	fangoso	1	1	Primavera	permanente	
Ceronda		0	aperto	roccioso	1	0	Primavera	permanente	
Bassa Colleria		1	bosco	fangoso	0	0	Primavera	permanente	
Fosso Prato		1	aperto	fangoso	0	1	Primavera	permanente	
Pascolo									
Borgo Castello		Prosciugato							
Ceronda(bordo)		0	confine	fangoso	1	1	Estate	permanente	
Ceronda		0	confine	roccioso	1	0	Estate	temporaneo	
Bassa Colleria		Prosciugato							
Fosso Prato		0	aperto	fangoso	0	1	Estate	permanente	
Pascolo		1	aperto	fangoso	0	1	Estate	temporaneo	
Borgo Castello		0	confine	fangoso	1	1	Autunno	permanente	
Ceronda(bordo)		0	aperto	roccioso	1	1	Autunno	permanente	
Ceronda		1	bosco	fangoso	0	1	Autunno	temporaneo	
Bassa Colleria		1	aperto	fangoso	0	0			
Fosso Prato		1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	permanente	
Pascolo		1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	temporaneo	
Borgo Castello		1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	permanente	
		1	aperto	fangoso	0	1	Autunno	temporaneo	

Parametri numerici campionati nelle tre stagioni nell'area di pre-parco ed all'interno del Parco La Mandria (campionamento 2014)

Area	Sito	Punti	Presenza	N_Lim	T	TcCond	Cond	TDS	Sal	Dosat	DO	Ph
Mandria	Bivio C.na		0		20,98	96	0,088	0,062	0,04	39,6	3,53	7
Mandria	Bivio C.na		0		19,13	199	0,176	0,129	0,09	30,2	2,79	7
Mandria	Bivio C.na		0		16,87	205	0,173	0,134	0,1	24,1	2,33	7
Mandria	Galliassi Basso		1	5	19,12	87	0,077	0,056	0,04	41	3,79	7
Mandria	Galliassi Basso		0		19,49	231	0,206	0,15	0,11	38,9	3,57	7
Mandria	Galliassi basso		0		16,23	109	0,09	0,071	0,05	31,8	3,13	7
Mandria	Prati Galliassi		0		14,74	92	0,074	0,06	0,04	42,7	4,33	6
Mandria	Prati Galliassi		0		25,7	80	0,081	0,052	0,04	44,5	3,63	6
Mandria	Prati Galliassi		0		15,63	120	0,099	0,078	0,06	35,8	3,57	6
Mandria	Galliassi Alto		1	3	18,65	50	0,044	0,033	0,02	49,7	4,64	7
Mandria	Galliassi Alto		0		19,63	103	0,093	0,067	0,05	50,6	4,63	7
Mandria	Galliassi Alto		0		15,7	200	0,164	0,13	0,09	37,7	3,74	7
Mandria	Ceronda_1		0		15,03	100	0,081	0,065	0,05	59,1	5,95	7
Mandria	Ceronda_1		1	1	20,51	107	0,098	0,07	0,05	37,2	3,35	7
Mandria	Ceronda_1		1	7	15,12	111	0,09	0,072	0,05	38,9	3,91	7
Mandria	Ceronda_1_2		0		16,15	94	0,078	0,061	0,04	47	4,62	7
Mandria	Ceronda_1_2		0		19,63	103	0,093	0,067	0,05	50,6	4,63	7
Mandria	Ceronda_1_2		0		15,23	95	0,083	0,063	0,04	48,7	4,63	7
Mandria	Ceronda_2		1	7	13,73	92	0,072	0,06	0,04	53,4	5,54	7
Mandria	Ceronda_2		0		17,75	146	0,126	0,095	0,07	37,8	3,6	7
Mandria	Ceronda_2		1	3	17,23	118	0,101	0,077	0,06	37,1	3,57	7

Mandria	Bizzarria_1			0		13,3	94	0,073	0,061	0,04	52,8	5,52	6
Mandria	Bizzarria_1			0		18,52	100	0,088	0,065	0,05	45,4	4,25	6
Mandria	Bizzarria_1			0		13,71	109	0,086	0,071	0,05	35,2	3,65	6
Mandria	Bizzarria_1_2		20	1		16,61	103	0,087	0,067	0,05	37	3,6	7
Mandria	Bizzarria_1_2			0		16,56	238	0,2	0,155	0,11	40	3,9	7
Mandria	Bizzarria_1_2			0		16,3	138	0,115	0,09	0,06	30,6	3	7
Mandria	Bizzarria_2			0		15,09	96	0,078	0,063	0,04	55,2	5,56	7
Mandria	Bizzarria_2			0		18,54	101	0,089	0,066	0,05	37,8	3,54	7
Mandria	Bizzarria_2			0		13,68	111	0,087	0,072	0,05	32,4	3,36	7
Mandria	Ninfee_1		3	1		25,34	57	0,058	0,037	0,03	55,8	4,58	7
Mandria	Ninfee_1		1	1		28,39	58	0,062	0,038	0,03	41,6	3,23	7
Mandria	Ninfee_1		11	1		20,81	62	0,057	0,04	0,03	39	3,64	7
Mandria	Ninfee_2			0		22,27	75	0,071	0,049	0,03	40,7	3,54	7
Mandria	Ninfee_2		18	1		21,72	71	0,066	0,046	0,03	33,5	2,95	7
Mandria	Ninfee_2		10	1		18,62	121	0,106	0,079	0,06	39,6	3,7	7
Mandria	Rete Pista Fiat		10	1		26,43	46	0,047	0,03	0,02	45,5	3,66	7
Mandria	Rete Pista Fiat		14	1		22,12	150	0,141	0,097	0,07	33,3	2,9	7
Mandria	Rete Pista Fiat			0		21,08	193	0,179	0,126	0,09	37,6	3,35	7
Mandria	Bassa Collieria		12	1		18,75	97	0,085	0,063	0,04	22,7	2,11	7
Mandria	Bassa Collieria			0		19,99	138	0,093	0,089	0,06	31,8	2,89	7
Mandria	Bassa Collieria		2	1		15,65	241	0,198	0,156	0,11	39	3,87	7
Mandria	Fosso Piano Mule			1									
Mandria	Fosso Piano Mule		23	1		24,34	99	0,098	0,064	0,05	30,3	2,54	7
Mandria	Fosso Piano Mule		19	1		23,41	179	0,173	0,116	0,08	25,4	2,16	7
Mandria	Fosso Piano Mul		5	1		15,83	112	0,092	0,073	0,05	40,2	3,98	7

Parametri numerici campionati nelle tre stagioni nell'area di pre-parco ed all'interno del Parco La Mandria (campionamento 2014)

Area	Sito	Punti	Alghe	Zona	Fondo	Acqua_Corrente	Lumachine	Periodo	Ripetizione	Pozza	Tipo
Mandria	Bivio C.na		1	aperto	fangoso	0	0	primavera	3	permanente	pozza
Mandria	Bivio C.na		1	aperto	fangoso	0	0	estate	3	permanente	pozza
Mandria	Bivio C.na		1	aperto	fangoso	0	0	autunno	3	permanente	pozza
Mandria	Galliassi Basso		1	confine	fangoso	1	1	primavera	3	permanente	canale
Mandria	Galliassi Basso		1	confine	fangoso	1	1	estate	3	permanente	canale
Mandria	Galliassi basso		1	confine	fangoso	1	1	autunno	3	permanente	canale
Mandria	Prati Galliassi		1	confine	fangoso	1	1	primavera	3	permanente	canale
Mandria	Prati Galliassi		1	confine	fangoso	1	1	estate	3	permanente	canale
Mandria	Prati Galliassi		1	confine	fangoso	1	1	autunno	3	permanente	canale
Mandria	Galliassi Alto		0	bosco	fangoso	0	1	primavera	3	permanente	pozza
Mandria	Galliassi Alto		0	bosco	fangoso	0	1	estate	3	permanente	pozza
Mandria	Galliassi Alto		0	bosco	fangoso	0	1	autunno	3	permanente	pozza
Mandria	Ceronda_1		1	confine	fangoso	1	1	primavera	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_1		1	confine	fangoso	1	1	estate	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_1		1	confine	fangoso	1	1	autunno	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_1_2		0	aperto	roccioso	1	0	primavera	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_1_2		0	aperto	roccioso	1	0	estate	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_1_2		0	aperto	roccioso	1	0	autunno	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_2		0	aperto	fangoso	1	1	primavera	3	permanente	fiume
Mandria	Ceronda_2		0	aperto	fangoso	1	1	estate	3	permanente	fiume

