

Traduzione di Brunella Pernigotti

Prima evidenza di diffusa positività ai rodenticidi anticoagulanti nei lupi (*Canis lupus*)

PUNTI SALIENTI

- Nessuno studio ha quantificato l'esposizione ai rodenticidi nei grandi carnivori europei.
- Abbiamo testato i lupi trovati morti in Italia (n= 186) e creato un modello in base alla tendenza dal 2018 al 2022.
- La maggior parte dei lupi (61,8%) è risultata positiva a uno o più rodenticidi.
- L'esposizione aumenta con l'antropizzazione dei territori e dopo il 2020.
- Il controllo dei roditori potrebbe mettere a rischio i carnivori di grandi dimensioni nei territori antropizzati d'Europa.

Sommario

I rodenticidi anticoagulanti (AR) di seconda generazione possono essere critici per i carnivori, a causa del loro uso diffuso e impattante. Sebbene molti studi abbiano esplorato l'impatto degli AR sui piccoli e mesocarnivori, nessuno ha mai valutato il grado di contaminazione dei grandi carnivori che frequentano zone antropizzate.

Abbiamo colmato questa lacuna studiando le tendenze spaziotemporali dell'esposizione del lupo grigio (*Canis lupus*) agli AR nelle aree dell'Italia centrale e settentrionale, sottoponendo un ampio campione di lupi morti (n = 186) al metodo LC-MS/MS.

La maggior parte dei lupi (n = 115/186, 61,8%) è risultata positiva agli AR (1 composto, n = 36; 2 composti, n = 47; 3 composti, n = 16; 4 o più composti, n = 16). Bromadiolone, brodifacoum e difenacoum, erano i composti più comuni, con brodifacoum e bromadiolone che sono risultati i più ricorrenti (n = 61).

1. Introduzione

Si ritiene spesso che la conservazione a lungo termine dei grandi mammiferi nelle zone antropizzate dipenda da una combinazione di protezione legale, sfruttamento sostenibile, disponibilità di habitat e risorse trofiche adeguate, tolleranza umana e sviluppo delle infrastrutture (Apollonio et al., 2017; Di Marco et al., 2014; Di Minin et al., 2016; Kauffman et al., 2021; Wolf e Ripple, 2016). Inoltre, molti studi hanno evidenziato il rischio rappresentato da malattie infettive o parassitarie (Cunningham et al., 2017).

Tuttavia, l'esposizione dei grandi mammiferi alle sostanze chimiche di origine antropica ha ricevuto la giusta attenzione solo negli ultimi anni (https://www.ewg.org/interactive-maps/pfas_in_wildlife/map/). Ciò nonostante il fatto che le sostanze chimiche persistenti, bioaccumulabili e tossiche (PBT) possano entrare nella catena trofica e alterare la fisiologia, il comportamento, la salute e la riproduzione dei mammiferi (Torquetti et al., 2021; Saaristo et al., 2018; Zala e Penn, 2004; Köhler e Triebkorn, 2013), con un impatto a loro volta sulle loro popolazioni (Desforges et al., 2018). L'impatto dei PBT può essere particolarmente critico per i grandi carnivori (Rodríguez-Estival e Mateo, 2019), le cui popolazioni in molte parti del Nord del mondo, sebbene in ripresa (Ingeman et al., 2022), sono ancora relativamente limitate e potenzialmente suscettibili a una significativa contrazione.

I rodenticidi anticoagulanti (di seguito AR) sono tra i PBT più utilizzati e più problematici per i predatori, a causa della possibilità di esposizione secondaria al veleno attraverso la predazione diretta di roditori o il

consumo di roditori morti (Elmeros et al., 2019; Fernandez-de-Simon et al., 2019, 2022; Geduhn et al., 2015; L'opez-Perea et al., 2019; Rattner e Harvey, 2021; Wright et al., 2022) dato il loro probabile impatto sul sistema immunitario dei mammiferi (Serieys et al., 2018). Ciò è particolarmente vero per gli AR di seconda generazione che sono più efficaci contro i roditori rispetto ai composti di prima generazione e più persistenti nell'ambiente.

Sebbene l'Unione Europea abbia adottato normative che hanno progressivamente limitato l'uso degli AR, l'esposizione ad essi nei mammiferi predatori, non direttamente bersaglio, è rimasta elevata (Elmeros et al., 2018), anche a causa delle diverse leggi nazionali e degli accordi di libero scambio tra gli Stati membri (Eisemann et al., 2018).

Il lupo grigio (*Canis lupus*) ha costantemente ampliato la propria distribuzione in Europa negli ultimi tre decenni, a causa dei cambiamenti ambientali e della maggiore protezione legale (Cimatti et al., 2021). Nonostante i lupi in Europa possano essere esposti agli AR poiché: **i**) i roditori fanno parte della loro dieta (Newsome et al., 2016; Zlatanova et al., 2014) e **ii**) si stanno espandendo in aree in cui il controllo dei roditori è un'attività di routine, nessuno studio ha esplorato questo fenomeno. Questa lacuna è sorprendente perché gli AR sono stati recentemente trovati nei mesocarnivori e nei grandi carnivori che vivono attorno agli insediamenti umani, indicando che l'esposizione secondaria a queste sostanze non è più limitata ai piccoli carnivori (Serieys et al., 2018, 2019; McMillin et al., 2018; Rudd et al., 2018; Lestrade et al., 2021).

Qui vogliamo colmare questa lacuna esplorando le tendenze spaziotemporali nell'esposizione del lupo agli AR nell'Italia centrale e settentrionale, basandoci su un ampio campione di animali trovati morti tra il 2018 e il 2022 e testati utilizzando protocolli di laboratorio standardizzati.

2. Metodo

2.1. Area di studio

L'area di studio comprende l'Emilia-Romagna e la Lombardia, nonché la porzione più settentrionale della regione Toscana (Fig. 1). Quest'area è caratterizzata da diversi ecosistemi temperati e mediterranei, con un'urbanizzazione che si verifica principalmente nelle pianure. La popolazione umana è stimata in circa 10,5 milioni di persone, su una superficie di 46.039 km², con una densità di 269,4 ± 167,6 abitanti/km² (media ± deviazione standard). La densità dei lupi varia approssimativamente da 4,9 a 13,2 lupi/100 km² (La Morgia et al., 2022), mentre la presenza del lupo in Lombardia è ancora limitata per lo più a singoli individui dispersi (Dondina et al., 2020). Nel corso degli ultimi tre decenni, i lupi hanno progressivamente colonizzato la maggior parte dell'area di studio, partendo dagli habitat più indisturbati delle montagne per poi raggiungere gli ambienti agricoli e periurbani delle pianure (Bassi et al., 2015; Zanni et al., 2023).

Mentre nell'area di studio i lupi predano principalmente ungulati selvatici, quali il capriolo (*Capreolus capreolus*) e il cinghiale (*Sus scrofa*) (Bassi et al., 2017, 2020; Ferretti et al., 2019; Mori et al., 2017; Milanese et al., 2012; Mattioli et al., 2011; Capitani et al., 2004), studi recenti suggeriscono che possano includere nella loro dieta anche altri tipi di prede, come la nutria (*Myocastor coypus*, Ferretti et al., 2019).

Nell'area di studio la derattizzazione è autorizzata ai sensi del Regolamento n. 582/2012 (<https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:en:PDF>), Regolamento n. 1107/2009 (<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:it:PDF>) e il Regolamento n. 1062/2014 (<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/uri=CELEX%3A32014R1062>) dalla Commissione Europea. In Italia sono autorizzati sia gli AR di prima generazione (clorofacinone, cumatetralil) che di seconda generazione (brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, difetialone, flocoumafen).

Nella Tabella 1, il numero di formulazioni rodenticide anticoagulanti disponibili sul mercato in Italia, in base al principio attivo indicato.

Il controllo dei roditori prende di mira quasi esclusivamente le specie sinantropiche, vale a dire il topo domestico (*Mus musculus*), il ratto bruno (*Rattus norvegicus*) e il ratto nero (*Rattus rattus*). Inoltre, sebbene questa pratica sia illegale, prove empiriche indicano che gli AR sono comunemente usati per controllare la nutria nei terreni coltivati (vedere la Discussione per ulteriori dettagli). La derattizzazione viene eseguita per lo più da operatori di disinfestazione (di seguito: PCO), che possono acquistare qualsiasi principio attivo, con concentrazioni fino a 50 ppm di principio attivo (Sinergitech, 2020). È degno di nota che i rodenticidi possono essere acquistati anche da privati cittadini, anche se solo in piccole confezioni con concentrazioni di principio attivo inferiori a 30 ppm (https://www.izs.it/IZS/Engine/RAServeFile.php/f/pdf_normativa/Biocidi-Rodenticidi/Biocidi_IZSTeramo.pdf). I rodenticidi sono tipicamente utilizzati per controllare i roditori in ambienti esterni, poiché gli interventi interni si basano solitamente sulla cattura con trappole. A differenza di altri stati europei (es. Regno Unito), in Italia non esistono restrizioni all'uso dei principi attivi più tossici (es. brodifacoum e flocoumafen) negli interventi in aree aperte.

TABELLA 1 Numero di formulazioni rodenticide anticoagulanti disponibili sul mercato in Italia, in base al principio attivo (dati aggiornati al 2020). Questi includono rodenticidi che rientrano nel Tipo di Prodotto (PT) 14, ovvero formulazioni destinate a Professionisti formati, Professionisti, Pubblico in generale.

FIGURA. 1. Distribuzione dei lupi trovati morti nell'area di studio e risultati negativi (punti bianchi) o positivi (punti rossi) ai rodenticidi anticoagulanti (AR). Sono evidenziate le province delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Toscana interessate dalla raccolta dati. La posizione dell'area di studio in Italia è mostrata nella figura in basso a sinistra.

2.2. Raccolta dati e analisi di laboratorio

Il nostro campione finale comprendeva 186 lupi (Fig. 1), raccolti tra il 2018 e il 2022 dalle autorità locali e poi sottoposti ad un'autopsia e ad un esame tossicologico finalizzato all'individuazione di AR. Durante la necropsia, ogni animale è stato sottoposto a un'ispezione esterna finalizzata a valutare lo stato nutrizionale e lo sviluppo degli organi genitali, nonché a ispezionare e rilevare anomalie nello scheletro, nella pelle, nelle mucose, nei bulbi oculari, nei lobi delle orecchie, nella cavità orale e nelle narici. L'età di ciascun animale è stata stimata in base allo sviluppo dentale, alle dimensioni corporee e al peso (Brasington et al., 2023). Gli individui avevano un rapporto tra i sessi equilibrato (53,6% erano maschi) e il nostro campione comprendeva sia lupi giovani che adulti (1° anno di età = 27,9%; 2° anno di età = 34,6%, 3° anno di età o superiore = 37,7%). Successivamente, la carcassa è stata posta in decubito dorsale e scuoiata. La necropsia completa è iniziata con l'apertura della cavità addominale, seguita dall'apertura della cavità toracica ed infine del cranio. In ciascuna di queste fasi, le cavità e gli organi sono stati ispezionati e valutati individualmente prima di essere campionati per le analisi di laboratorio.

La determinazione degli anticoagulanti (coumafuril, warfarin, cumatetralil, coumacloro, bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen, difetialone) è stata effettuata mediante metodo LC-MS/MS (Vandenbroucke et al., 2008; Fourel et al., 2017 ; Bertero et al., 2020). Nel dettaglio il fegato è stato omogeneizzato prima dell'analisi, un campione (tipicamente di 40 g) è stato estratto mediante vigorosa agitazione con acetone (100 mL); dopo filtrazione su carta, una quota (2 mL) è stata essiccata sotto un leggero flusso di azoto a 40 °C. Il residuo è stato ricostituito con 2 mL di soluzione di ammoniaca al 2% in acetonitrile. Sono seguite tre fasi di sgrassamento con n-esano (2 mL). Infine, una quota (1 mL) è stata portata a secco e ricostituita con 0,4 mL di acetonitrile. Un volume di 1 µL è stato iniettato in un sistema LC-MS/MS (Agilent QQQ 6460, dotato di un UPLC Agilent 1290 Infinity II). La colonna cromatografica era Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 × 50 mm, 1,8 µm). La temperatura della colonna è stata impostata a 40 °C. La separazione cromatografica è stata effettuata attraverso un gradiente lineare utilizzando come fase acquosa una soluzione di acido formico allo 0,1% e come fase organica una soluzione di acido formico allo 0,1% in acetonitrile. La velocità di flusso è stata fissata a 0,4 ml/min. Il tempo di esecuzione è stato di 11 minuti, con un ricondizionamento post-tempo di 2 minuti.

La quantificazione è stata effettuata con il metodo dello standard esterno in modalità MRM (ESI negativo) acquisendo due transizioni tipiche e appropriate, quantificatore e qualificatore, per ciascun analita (Tabella S1) [analita = nell'analisi chimica quantitativa, sostanza disciolta in soluzione a concentrazione incognita. N.d.t.]. I parametri MS/MS sono stati impostati come segue: capillare 4000 V, temperatura del gas 300 °C, flusso di gas 10 L min⁻¹, nebulizzatore 35 psi, temperatura della guaina del gas sheath 300 °C, flusso del gas nella guaina 12 L/min.

Il limite di quantificazione (LOQ) era di 1 µg/Kg per tutti gli analiti, con un recupero medio >80% e ciascun lotto di analisi aveva 1 controllo positivo e uno negativo. Una concentrazione rilevata ≥ 1 µg/Kg indicava un campione positivo, mentre una concentrazione < 1 µg/Kg indicava un campione negativo. Una panoramica delle concentrazioni, per ciascun composto, è disponibile nella Tabella S3.

Per valutare se una positività al test anticoagulante può essere classificata come un'intossicazione con segni clinici è necessario correlare i dati analitici, il quadro anatomopatologico e l'anamnesi. In particolare, sarebbe necessario conoscere i tempi e il livello di esposizione (quanto anticoagulante è stato ingerito e quando) e la storia medica di ciascun lupo. Tuttavia, poiché ci siamo affidati a un campionamento opportunistico, non conoscevamo né il tempo né il livello di esposizione, né la storia medica.

Pertanto, abbiamo classificato come intossicati solo quegli individui per i quali l'esame tossicologico è risultato positivo (presenza di anticoagulanti) in associazione ad un quadro anatomopatologico indicativo di disturbi della coagulazione del sangue; per es. petecchie, ecchimosi, ifema, pallore della mucosa, sanguinamento nasale, vaginale e dell'orecchio, emorragia polmonare ed emotorace, emorragia pleurica e pericardica, emorragia subdurale e cerebrale, sanguinamento gastrointestinale, emoperitoneo, emorragia ed ematoma del parenchima renale, sanguinamento ed ematoma del parenchima epatico (Valchev et al., 2008; Lombardo et al., 2013). Nel caso di soggetti con politraumi da impatto, la coagulopatia non è attribuibile a positività agli AR in quanto potrebbe essere stata causata dal trauma dell'impatto. Un fattore che può complicare l'interpretazione dei dati è lo stato di conservazione della carcassa, che quando non ottimale, può alterare il quadro anatomopatologico ed interferire con il reperto degli AR.

In questo studio non abbiamo creato un modello della relazione tra esposizione agli AR e sintomatologie come le coagulopatie. Sebbene la letteratura disponibile indichi che gli AR possono influenzare la salute dei grandi carnivori (Fraser et al., 2018; Serieys et al., 2018), mancavano però informazioni adeguate su alcuni co-fattori fondanti potenzialmente importanti. Questi includono il tempo trascorso tra l'assunzione degli AR e il momento in cui è stato trovato un determinato lupo, la quantità di AR ingeriti, le condizioni di salute preesistenti, lo stato fisiologico o nutrizionale di ciascun individuo, nonché le differenze genetiche.

Senza queste informazioni, qualsiasi relazione tra la quantità di AR e le coagulopatie o altre malattie avrebbe potuto produrre risultati spuri.

2.3. Analisi statistiche

Abbiamo creato un modello del modo in cui l'effetto delle caratteristiche del territorio, rilevate nei siti in cui erano stati trovati i lupi, influenzava **i**) la loro probabilità di risultare positivi a 1, 2, 3 o più AR (tra brodifacoum, bromadiolone, coumatetralyl, difenacoum, difethialone, flocoumafen) e **ii**) la presenza di brodifacoum e bromadiolone, i due AR più comuni (vedi sotto), rilevati nei loro fegati.

Il controllo dei roditori nell'area di studio è associato alle aree urbane e alle aziende agricole. In questi ambienti, ci aspettavamo che i lupi fossero positivi a un numero maggiore di AR, a causa della maggiore esposizione a roditori contaminati, che i predatori avrebbero mangiato sotto forma di carcasse già morte o di prede cacciate direttamente.

Tuttavia, nelle aree antropizzate, i lupi potrebbero risultare positivi a un maggior numero di AR, semplicemente per una maggiore disponibilità e facilità di reperire rodenticidi sul mercato. Gli operatori

della disinfestazione infatti spesso associano prodotti diversi, ritenendo che questa pratica ottenga una maggiore efficacia contro i roditori. Per escludere questa seconda ipotesi, abbiamo anche creato un modello circa la concentrazione dei due rodenticidi più comuni, brodifacoum e bromadiolone, nel fegato dei lupi. Lo abbiamo fatto perché gli AR vengono metabolizzati rapidamente dal fegato, quindi solo l'assunzione di questi composti nei roditori può garantire la loro presenza in questo organo. Se il consumo di roditori contaminati è la principale via di esposizione, poiché i lupi li consumano regolarmente in ambienti antropizzati, la probabilità di trovare un lupo che ha consumato un roditore contaminato poco prima di morire sarebbe sistematicamente maggiore. A sua volta, la concentrazione di AR nel fegato sarebbe sistematicamente più elevata.

Le caratteristiche ambientali dei siti di recupero sono state quantificate aggregando importanti attributi ambientali con l'analisi per raggruppamento Partitioning Around Medoids (Kassambara, 2017). Invece di utilizzare solo la presenza di infrastrutture umane, abbiamo optato per la creazione di un indice composito, che rifletta sia la presenza umana che altre importanti caratteristiche topografiche e di copertura del suolo dell'area di studio. Questi includevano **i)** la presenza di infrastrutture umane, utilizzando come mezzo l'Indice dell'Impronta Umana (Venter et al., 2016), **ii)** la percentuale di copertura arborea e **iii)** i terreni coltivati a una scala di 250 m, misurati attraverso il MODIS/ Terra Vegetation Continuous Fields (<https://lpdaac.usgs.gov/products/mod44bv006/>), **iv)** l'elevazione, **v)** l'asperità del terreno in ogni punto e **vi)** l'indice della posizione topografica, che indica se un certo punto era sulla cima di una montagna o sul fondo di una valle (Wilson et al., 2007). Le variabili ambientali sono state calcolate come valori mediani in un interspazio con un raggio di 6 km attorno al punto. Questa dimensione corrisponde ad una superficie di ca. 113 km², che riflette le stime più recenti del raggio d'azione della specie in Italia (Mancinelli et al., 2018; Mattioli et al., 2018).

Il metodo della silhouette, il metodo del gomito e la statistica del gap supportavano l'esistenza di due diverse condizioni ambientali (Fig. S1). Sovrapponendoli con immagini satellitari dell'area di studio ed esplorando la distribuzione delle caratteristiche ambientali nei due gruppi (Fig. S2), abbiamo notato che il primo gruppo corrispondeva ad aree relativamente indisturbate su colline e montagne, con alti livelli di copertura di alberi e terreni accidentati e scarsa presenza di infrastrutture umane. Il secondo gruppo corrispondeva invece alle aree pianeggianti con un'elevata presenza di infrastrutture umane e terreni coltivati.

Abbiamo creato un modello della probabilità di risultare positivi a più AR attraverso una formulazione di un Modello di Regressione Logistica Bayesiana (Bürkner e Vuorre, 2019). D'altra parte, abbiamo utilizzato una regressione Gamma con alterazioni pari a zero (Zuur et al., 2017) per avere un modello della presenza di brodifacoum e bromadiolone rilevati nel fegato dei lupi testati. Nei nostri modelli, abbiamo anche controllato il sesso e la classe di età di ciascun individuo, due variabili potenzialmente confondenti* e che sono state misurate come variabili ordinate con contrasti polinomiali. L'antropizzazione è stata considerata un fattore predittivo potenzialmente importante di positività agli AR, poiché il controllo dei roditori nell'area di studio è concentrato principalmente nelle aree urbane e nelle aziende agricole. Inoltre, nei territori antropizzati, i lupi potrebbero essere esposti a una maggiore esposizione agli anticoagulanti poiché possono includere regolarmente roditori nella loro dieta, a causa della mancanza di ungulati. Infine, si presumeva che i giovani lupi maschi fossero più a rischio di esposizione agli AR, poiché questo è il gruppo più coinvolto nella dispersione (Ausband, 2022; Morales-González et al., 2022; Caniglia et al., 2014), quando gli individui non possono fare affidamento sulla caccia in branco, orientandosi così verso prede più piccole, come i roditori. Abbiamo utilizzato spline bivariate a piastre sottili [funzioni geometriche computazionali – N.d.t.] per misurare la correlazione spaziale delle osservazioni e una spline cubica ciclica per misurare le variazioni temporali cicliche nei recuperi (Wood, 2006). Le analisi esplorative hanno indicato che le variabili predittive non avevano alcuna associazione tra loro, né alcun modello spaziale o temporale.

*termine inerente la scienza della Statistica

2.4. Confronto con altri animali selvatici recuperati

Per raggiungere una comprensione più completa delle tendenze temporali relative all'esposizione agli AR della fauna selvatica, abbiamo confrontato i nostri risultati dello studio sui lupi, con la positività agli AR in altri animali selvatici che sono stati recuperati e testati alla ricerca di questi composti nella regione Emilia-Romagna. Contrariamente ai lupi che sono sempre stati testati per l'AR, solo gli individui che mostravano segni di coagulopatie acquisite all'esame patologico sono stati testati per l'AR. Questo set di dati (n = 176), includeva i recuperi di più specie, che potevano predare o consumare roditori morti, avvenuti tra il 2018 e il 2022, principalmente volpe rossa (*Vulpes vulpes*, n = 67), poiana comune (*Buteo buteo*, n = 23), tasso eurasiatico (*Meles meles*, n = 13), cinghiale (*Sus scrofa*, n = 9), riccio europeo (*Erinaceus europaeus*, n = 9), nutria (n = 7), topo domestico e ratti (n = 7), martora e faina (*Martes sp.*, n = 4), ed altri rapaci diurni (n = 15) e notturni (n = 8). Gli individui sono stati sottoposti alle stesse analisi di laboratorio utilizzate per i lupi, quindi abbiamo creato un modello circa le tendenze temporali della positività a cumatetralil, brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, difetialone e flocoumafen. Questo set di dati è stato utilizzato come "controllo" per rilevare eventuali cambiamenti temporali nell'uso dei rodenticidi, almeno per una parte dell'area di studio. Un Modello Additivo Generalizzato Bayesiano, con una spline cubica ciclica e una distribuzione di Bernoulli della risposta, è stato utilizzato per modellare le fluttuazioni temporali nella probabilità che un animale recuperato fosse positivo ai rodenticidi. La selezione del modello, sia per i lupi che per la fauna selvatica recuperata, è stata eseguita con approccio graduale, partendo da un modello nullo, e quindi valutando l'effetto di ciascuna covariata* sull'accuratezza predittiva dei modelli candidati, attraverso la validazione incrociata "leave-one-out" [= lasciane fuori uno] (Vehtari et al., 2017). Le analisi statistiche sono state effettuate con il software statistico R (R Core Team, 2023) e con STAN (Carpenter et al., 2017), attraverso il pacchetto 'brms' (Bürkner, 2017). Un set di dati riproducibile e un codice software sono disponibili al seguente link: <https://osf.io/yqv4n/>

*termine inerente la scienza della Statistica

3. Risultati

I nostri risultati indicano che la maggior parte dei lupi (n = 115/186, 61,8%) è risultata positiva agli AR (1 composto, n = 36; 2 composti, n = 47; 3 composti, n = 16; 4 o più composti, n = 16). I composti più comuni erano bromadiolone (n = 97), brodifacoum (n = 93) e difenacoum (n = 26, Fig. S3). Nel complesso, brodifacoum e bromadiolone sono stati gli AR che si sono riscontrati maggiormente (n = 61), seguiti da brodifacoum e difenacoum (n = 20; Tabella S2). Le concentrazioni medie dei vari AR sono riportate nella Tabella S3. Dei 115 lupi risultati positivi agli AR, 19 presentavano un quadro anatomopatologico riconducibile a coagulopatie con evidenti alterazioni della coagulazione, mentre gli altri 96 sono morti per altre cause quali collisioni con veicoli, spari, aggressioni intraspecifiche, malattie, e sono risultati positivi agli AR, anche se in assenza di lesioni patologiche caratteristiche. La convalida incrociata leave-one-out ha mantenuto l'antropizzazione e il tempo in cui i lupi sono stati trovati come covariate significative. Rispetto ai lupi provenienti da aree più remote, quelli provenienti da aree antropizzate avevano una minore probabilità di risultare negativi agli AR o di risultare positivi per un singolo composto. Viceversa i lupi provenienti dalle aree più antropizzate avevano una più elevata probabilità di risultare positivi a 2 o più AR (Fig. 2). Inoltre, i lupi mostravano un rischio maggiore di risultare positivi agli AR dalla fine dell'estate alla fine dell'inverno, e questa probabilità è diventata più elevata dopo il 2020, in particolare la probabilità di risultare positivi a 3 o più AR (Fig. 3).

Complessivamente, l'R al quadrato del modello logit meglio ordinato era 0,62 (McKelvey e Zavoina, 1975). La selezione del modello ha indicato che i lupi provenienti da aree più antropizzate avevano anche una maggiore concentrazione di brodifacoum nel fegato (Fig. 4), mentre la concentrazione di bromadiolone non era significativamente più alta. Come per altre specie selvatiche, è risultata positiva agli AR in percentuale

particolarmente elevata la volpe rossa, di cui 60 individui su 67 (89,6%) presentavano tracce di rodenticidi. Inoltre sono risultate positive anche 18 poiane su 23 (78,3%). Tuttavia, se si considera la distribuzione temporale della positività agli AR, tra tutte le varie specie selvatiche, non è emersa alcuna tendenza chiara (Fig. S4).

Una panoramica completa della selezione del modello è fornita nell'Appendice S1.

4. Discussione

Il lupo è ormai diffuso in Italia, con una popolazione stimata di 2945–3608 individui (La Morgia et al., 2022), e uno stato di conservazione passato da “Vulnerabile” a “Quasi minacciato” nel corso dell’ultimo decennio (Rondinini et al., 2022). Tuttavia, i nostri risultati evidenziano una situazione preoccupante per quanto riguarda l’esposizione di questa specie agli AR sia di prima che di seconda generazione.

A nostro avviso, i nostri risultati dovrebbero sollevare preoccupazioni circa **i)** la nostra reale comprensione dell’ecologia del lupo nei territori occupati dall’uomo, **ii)** la misura in cui i lupi in Italia, e più in generale in Europa, potrebbero essere soggetti a un’esposizione secondaria agli AR e **iii)** la mancanza di selettività del controllo dei roditori attraverso gli AR e la necessità di aggiornare le normative riguardanti il loro utilizzo.

4.1. Comprensione dell'ecologia del lupo nelle aree antropizzate.

Più della metà dei lupi del nostro campione sono risultati positivi a uno o più AR, in particolare dopo il 2020. Mentre ci aspettavamo che alcuni individui mostrassero tracce di rodenticidi (Di Blasio et al., 2020), a causa della flessibilità trofica della specie, una tale quantità era in gran parte inaspettata.

Inoltre, sia il numero di AR sia la presenza di brodifacoum nel fegato dei lupi, sono aumentati negli individui rinvenuti in ambienti antropizzati.

In Europa, i lupi, pur essendo capaci di sfruttare molti tipi diversi di prede, sono stati tradizionalmente considerati come dipendenti da ungulati selvatici o bestiame domestico (Zlatanova et al., 2014). I nostri risultati però indicano che i roditori potrebbero essere consumati regolarmente da determinati individui e in determinate condizioni ambientali, in particolare quando gli ungulati selvatici e il bestiame scarseggiano. Questo consumo potrebbe avvenire attraverso la predazione o l’ingestione di carogne e coinvolgere sia nutrie che ratti.

Ferretti et al. (2019) hanno segnalato come preda frequente nelle terre coltivate dell'Italia centrale la nutria, animale alloctono e invasivo, la cui importanza può essere paragonabile a quella del capriolo. La nutria adulta pesa tra 5 e 10 kg e potrebbe raggiungere densità elevate (16-55 individui/km di bacini idrici; Balestrieri et al., 2016), fornendo ai lupi una biomassa paragonabile a quella degli ungulati selvatici. Poiché le nutrie sono uno delle principali piaghe nell'Italia centrale e settentrionale (Cocchi e Bertolino, 2021), le prove provenienti dai giornali locali indicano che sono soggette ad esche illegali con AR da parte degli agricoltori (Tabella S4).

I lupi nomadi che si muovono in paesaggi sconosciuti (denominati “floater”, sensu Fuller et al., 2003) sono probabilmente più inclini a essere esposti agli AR. Non cacciando grandi prede in gruppo (MacNulty et al., 2012), i lupi nomadi di solito si spostano verso prede più facili, come il bestiame domestico (Imbert et al., 2016). Tuttavia, negli ambienti antropizzati, dove il bestiame non è comune, potrebbero predare le nutrie, che vengono prese di mira dagli AR. Considerando che i lupi attorno agli insediamenti umani sfruttano i rifiuti alimentari umani e i sottoprodotti degli animali, potrebbero anche predare ratti sinantropici, come *R. rattus* o *R. norvegicus*, che si concentrano anch’essi attorno a queste risorse.

Fig. 2 Probabilità previste che i lupi risultassero positivi a un certo numero di rodenticidi anticoagulanti (AR), tra aree con diversi livelli di antropizzazione. Grafico degli effetti condizionali dal modello logit ordinato Bayesiano, che rappresenta la distribuzione a posteriori: la sezione più grande del diagramma del violino indica i valori con la probabilità più alta.

Fig. 3 Probabilità previste che i lupi risultassero positivi per un certo numero di rodenticidi anticoagulanti (AR), nel tempo. Grafico degli effetti condizionali dal modello logit ordinato Bayesiano.

Inoltre, è noto che i lupi si nutrono di cibo ogni volta che possono, in particolare quando sono fuori dal branco (Ciucci et al., 2020). Pertanto, i lupi solitari che abitano in aree antropizzate potrebbero regolarmente nutrirsi di nutrie e ratti che hanno precedentemente consumato AR, e quindi bio-accumulare questi composti.

Nella nostra area di studio, man mano che i branchi hanno progressivamente saturato gli habitat non popolati (Bassi et al., 2015), negli ultimi 4-5 anni i nomadi e le giovani coppie (Zanni et al., 2023) hanno trovato nuovi territori e si sono insediati principalmente in aree antropizzate di pianura e hanno iniziato a fare molto affidamento sui roditori (Zanni et al., risultati non pubblicati). Questo modello potrebbe aver aumentato la loro esposizione agli AR e portare progressivamente al marcato aumento della positività agli AR osservato dopo il 2020.

È interessante notare che le nostre tendenze temporali sono solo parzialmente simili a quelle riportate da Rial-Berriel et al. (2021) per le Isole Canarie.

Dal 2018, anno in cui è entrata in vigore la restrizione sulla concentrazione di principi attivi nelle esche (<30 ppm), si è verificata una diminuzione della concentrazione di questi composti nel fegato dei rapaci ma anche un aumento del loro numero medio.

Sebbene abbiamo riscontrato un aumento sia delle concentrazioni che del numero di composti negli ambienti antropizzati, abbiamo osservato due diversi andamenti temporali. Il numero di composti trovati nei lupi è aumentato dopo il 2020, ma non abbiamo rilevato alcuna tendenza temporale nelle concentrazioni. Non abbiamo una spiegazione chiara per questa differenza, ma potrebbe essere stata causata da una maggiore disponibilità sul mercato e/o dalla maggiore facilità di reperire vari AR con principi attivi diversi. Ad esempio, Di Blasio et al. (2020) hanno segnalato che i magazzini di privati cittadini erano responsabili della presenza di endosulfan nei loro campioni, anche anni dopo che questa sostanza era stata bandita.

Pertanto, il nostro studio richiede una valutazione dettagliata della dieta del lupo, dei suoi movimenti nei territori occupati dall'uomo e di come gli individui che attraversano diverse fasi della vita potrebbero cambiare la loro dieta.

Fig. 4 Concentrazioni previste di brodifacoum (a) e bromadiolone (b), espresse in microgrammi per kg, tra aree con diversi livelli di antropizzazione. Grafico degli effetti condizionali dal modello gamma Bayesiano ad alterazione zero, che rappresenta la distribuzione a posteriori: la sezione più grande del diagramma del violino indica i valori con la massima probabilità.

Inoltre, i nostri dati si basano sulla raccolta opportunistica di lupi morti. Sebbene questo metodo possa essere adatto per identificare modelli spaziali, potrebbe soffrire del fatto che non sappiamo come gli AR vengono metabolizzati ed escreti dai lupi. La ricerca futura dovrebbe esplorare la tossicocinetica degli AR in questa specie e sviluppare metodi che tengano conto dei cambiamenti temporali nella probabilità di rilevare gli AR (ad esempio analisi scat, Prat-Mairet et al., 2017).

4.2. Selettività del controllo chimico dei roditori.

Dopo aver rilevato per la prima volta un livello significativo di contaminazione da anticoagulanti nei lupi, il nostro studio rappresenta un avvertimento circa la penetrazione dei rodenticidi anticoagulanti fino al vertice della catena alimentare dell'ecosistema terrestre in Europa. Infatti, il riscontro di alte frequenze di contaminazione in una specie che si ritiene preda principalmente di ungulati solleva serie preoccupazioni sull'effettivo livello di bioaccumulo che il controllo dei roditori può determinare, anche in quelle specie che non sono specializzate in roditori. Altri studi precedentemente suggerivano che gli AR potessero essere presenti nei grandi carnivori, ma questi erano stati condotti su piccoli campioni. Per esempio, Berny et al. (1997) testarono un singolo individuo di lince eurasiatica (*Lynx lynx*), mentre Riley et al. (2007) hanno testato 4 leoni di montagna (*Puma concolor*). Il nostro studio, al contrario, è stato condotto su un ampio

campione di individui e ha rivelato un'ampia diffusione spaziale, con significative variazioni temporali, nell'uso dei rodenticidi nell'area di studio, interessandoci anche di alcuni dei principi attivi più persistenti.

In tutto il mondo, i rodenticidi sono la tecnica più utilizzata per il controllo dei roditori (Capizzi et al., 2014). L'evidenza empirica suggerisce che i rodenticidi vengono utilizzati senza un'adeguata consapevolezza e come misura preventiva, ricorrendo spesso ai cosiddetti adescamenti permanenti. Sebbene questa pratica sia esplicitamente vietata nei documenti ufficiali dell'UE, trova ancora applicazione nelle pratiche quotidiane di molti professionisti e dilettanti impegnati nella derattizzazione, almeno in Italia. È necessario identificare approcci integrati al controllo dei roditori che possano limitare l'uso dei rodenticidi alle situazioni in cui siano veramente necessari, dando priorità alla cattura e alla sanificazione ambientale altrove. Inoltre, dovrebbero essere preferiti i composti con minore persistenza e tossicità nei confronti delle specie non bersaglio (ad esempio, colecalciferolo, Witmer, 2018). Nel regolamentare l'uso di queste sostanze, il rischio ambientale deve essere bilanciato con i benefici sociali del controllo sinantropico dei roditori (ad esempio, Van Den Brink et al., 2018).

Infine, per apprezzare ulteriormente il reale livello di selettività degli AR gli studi dovrebbero anche quantificare la dispersione dei roditori contaminati nell'ambiente (Walther et al., 2021) e la misura in cui vengono predati o eliminati dai grandi carnivori (Montaz et al., 2014).

4.3. Esposizione agli AR nell'espansione delle popolazioni e del potenziale di lupi conseguenze per la conservazione.

La potenziale diffusa positività agli AR richiede la rapida creazione di una rete di sorveglianza paneuropea per le sostanze chimiche tossiche nel recupero delle popolazioni di grandi carnivori. I nostri risultati si basano su un campione di convenienza che probabilmente includeva più lupi provenienti da aree antropizzate e/o in fase di trasformazione di un comportamento nomade. Anche se il nostro risultato circa il livello di esposizione difficilmente può essere considerato rappresentativo dell'intera popolazione nell'area di studio, esso indica ragionevolmente che l'esposizione agli AR può coinvolgere un numero considerevole di individui.

Sebbene crediamo che il consumo di roditori contaminati sia la via principale attraverso la quale i lupi vengono esposti agli AR, la diffusa positività a noi risultante potrebbe anche essere parzialmente originata da tentativi di avvelenamento deliberati. In Italia, la persecuzione del lupo non è rara e talvolta viene effettuata mediante esche velenose (Musto et al., 2021), spesso contenenti AR. Anche se crediamo che l'avvelenamento deliberato abbia contribuito marginalmente ai nostri risultati, la mancanza di informazioni circa il raggruppamento spaziali o temporale che di solito caratterizza la persecuzione della fauna selvatica (Faulkner et al., 2018) e la diffusa positività agli AR tra volpi e rapaci diurni, indicano che sono necessarie ricerche future su questo fenomeno.

Considerando che la derattizzazione è comune in molte altre parti d'Italia e d'Europa (Eisemann et al., 2018), dove colpisce già i rapaci (Gomez et al., 2022; Nakayama et al., 2019), i carnivori più piccoli (Wright et al., 2022; Fernandez-de-Simon et al., 2019, 2022; Elmeros et al., 2018, 2019; López-Perea et al., 2019; Geduhn et al., 2015) e animali domestici (Calzetta et al., 2018; Berny et al., 2010) riteniamo che l'esposizione secondaria agli AR potrebbe essere un fenomeno trascurato per quanto riguarda le popolazioni di lupi europee. Ciò potrebbe avere due conseguenze per i lupi. Il primo è la tossicosi, che si sospetta sia una rilevante fonte di mortalità per i coyote urbani (*Canis latrans*) nel Nord America (Poessel et al., 2015).

Considerando che la derattizzazione è comune in molte altre parti d'Italia e d'Europa (Eisemann et al., 2018), dove colpisce già i rapaci (Gomez et al., 2022; Nakayama et al., 2019), i carnivori più piccoli (Wright et al., 2022; Fernandez-de-Simon et al., 2019, 2022; Elmeros et al., 2018, 2019; López-Perea et al., 2019; Geduhn et al., 2015) e animali domestici (Calzetta et al., 2018; Berny et al., 2010) riteniamo che l'esposizione secondaria agli AR potrebbe essere un fenomeno trascurato per quanto riguarda le popolazioni di lupi europee.

Ciò potrebbe avere due conseguenze per i lupi. Il primo è la tossicosi, che si sospetta sia una rilevante fonte di mortalità per i coyote urbani (*Canis latrans*) nel Nord America (Poessel et al., 2015). Questo scenario potrebbe essere realistico solo per quei lupi la cui dieta è in gran parte basata su roditori e per gli individui anziani, che potrebbero soffrire del progressivo accumulo di residui di AR (Rattner e Harvey, 2021). Tuttavia, come sappiamo, è difficile fare previsioni sul suo impatto, poiché attualmente non esistono valori soglia per gli AR nel lupo grigio.

D'altra parte, ci sono prove che gli AR possono amplificare le disfunzioni immunitarie nei carnivori, aumentandone l'impatto sulla mortalità. Ad esempio, Serieys et al. (2015) hanno scoperto che le linci rosse (*Lynx rufus*), che erano state esposte agli AR, avevano una maggiore probabilità di ammalarsi più gravemente di rogna. Studi successivi (Fraser et al., 2018; Serieys et al., 2018) hanno dimostrato che ciò potrebbe essere dovuto alle molteplici conseguenze degli AR sul sistema immunitario, inclusa l'espressione genetica, che hanno compromesso la risposta immunitaria delle linci rosse contro la rogna. Inoltre, si sospetta che gli AR possano influenzare le gravidanze nei cani domestici (Fitzgerald et al., 2018) e il loro impatto può anche essere esacerbato dall'esposizione simultanea a più composti (Serieys et al., 2015). Dei 115 lupi risultati positivi agli AR, 19 presentavano un quadro anatomopatologico con disturbi della coagulazione del sangue come emorragie estese, generalizzate e multiple (Valchev et al., 2008; Lombardo et al., 2013). Nel dettaglio, nei 19 lupi con segni patologici i reperti macroscopici più frequenti sono stati emorragie polmonari ed emotorace, associati in alcuni casi a: emorragie pleuriche e pericardiche, emorragie subdurali e cerebrali, emorragie gastrointestinali ed emoperitoneo, emorragie nel parenchima renale e congestione viscerale. È da precisare che la maggioranza dei lupi positivi non presentava un quadro anatomopatologico indicativo di disturbi della coagulazione. Ciò potrebbe indurre a pensare che molti lupi positivi presentassero concentrazioni subletali che avrebbero potuto essere una concausa della morte. Infatti, l'esposizione cronica agli AR avrebbe compromesso il metabolismo epatico, la coagulazione e il comportamento dei lupi, minando la loro capacità di reagire a situazioni pericolose (Fournier-Chambrillon et al., 2004; Valchev et al., 2008). Inoltre, gli individui avvelenati, a causa dell'alterazione comportamentale e dell'incapacità di cacciare efficacemente, potrebbero essere più propensi ad avvicinarsi agli insediamenti umani, rimanendo vittime di incidenti automobilistici o di persecuzione diretta (Musto et al., 2021). Ciò potrebbe rappresentare un inconveniente nella strategia di campionamento, ma comunque è qualcosa che è inevitabilmente presente negli studi di ecotossicologia basati sull'analisi di animali trovati morti, senza incidere sulla coerenza dei risultati (Schwartz et al., 2020).

Anche se dobbiamo ancora capire fino a che punto gli AR possono influenzare la loro risposta immunitaria, le popolazioni di lupi in Europa soffrono regolarmente di malattie infettive e parassitarie (Mill'an et al., 2016; Kołodziej-Sobocińska et al., 2014). e talvolta hanno una bassa variabilità genetica (Hindrikson et al., 2017), due minacce il cui impatto demografico potrebbe essere amplificato dall'esposizione subletale agli AR.

Sebbene sia improbabile che gli AR abbiano colpito i lupi che vivono in aree indisturbate, l'aumento della mortalità dei lupi nelle aree antropizzate potrebbe generare dinamiche source-sink [il processo per cui dalle nascite che superano le morti, si passa al contrario N.d.t.] diffuse e imprevedibili. Questi scenari sono particolarmente preoccupanti, data la crescente pressione in alcune aree d'Europa per arrivare a ottenere il controllo letale dei lupi, una pratica il cui impatto a lungo termine sulle popolazioni di lupi è ancora incerto (Lennox et al., 2018; Treves et al., 2016), e vista la difficoltà nel monitorare le popolazioni di lupo con una risoluzione temporale e spaziale che consentirebbe una gestione adattiva (Merli et al., 2023).

5. Conclusione

Questo studio sottolinea un fatto importante: oggi l'uso degli AR nei paesi europei come l'Italia è così diffuso che questi composti stanno influenzando l'intera catena alimentare e un numero significativo di animali selvatici non bersaglio (Elliott et al., 2016), costituendo un problema di salute pubblica. (Alabau et al., 2020; Di Blasio et al., 2020). I nostri dati mostrano che gli AR possono essere trovati anche in quelle

specie, come i grandi carnivori, dove dovrebbero essere relativamente rari. Questo fatto comporta tre conseguenze per la ricerca, la conservazione e la definizione delle politiche.

In termini di ricerca, i nostri risultati sottolineano la necessità di comprendere meglio l'ecologia dei grandi carnivori che popolano i territori antropizzati. Si ritiene generalmente che i lupi facciano affidamento sugli ungulati selvatici e domestici, ma la loro diffusa esposizione agli AR nelle aree antropizzate potrebbe indicare che i grandi roditori e i ratti facciano parte della loro dieta, sotto forma di prede vive o di carogne, con una frequenza maggiore di quanto si pensasse in precedenza. Pertanto, dobbiamo studiare la dieta e i movimenti dei lupi che abitano questi ambienti, durante il loro intero ciclo di vita.

In termini di conservazione, la diffusa positività agli AR nei lupi italiani, richiede l'urgente valutazione di questo fenomeno su scala spaziale più ampia. Il controllo dei roditori è comune in molti paesi europei e anche i lupi che vi vivono potrebbero essere esposti agli AR. Ciò potrebbe a sua volta amplificare altre minacce come le malattie infettive/parassitarie e complicare la gestione adattativa di questa specie. Pertanto, esiste l'urgente necessità di creare un monitoraggio paneuropeo degli AR nei lupi e negli altri grandi carnivori, basato su protocolli anatomopatologici e tossicologici standardizzati. Infine, i nostri risultati sollevano dubbi sul reale livello di selettività raggiunto con il controllo dei roditori e sull'uso illegale degli AR per uccidere le nutrie.

In termini politici, riteniamo che nuove norme sull'uso degli AR dovrebbero essere definite e applicate per **i)** monitorare meglio il loro utilizzo, **ii)** limitare la loro disponibilità per i comuni cittadini, **iii)** ridurre l'uso permanente delle esche e **iv)** incoraggiare il controllo integrato dei roditori.