

Utilizzo del vaccino immunocontraccettivo GonaCon™ nell'ambito dell'eradicazione dello scoiattolo grigio in Umbria

Relazione predisposta da Valentina La Morgia e Piero Genovesi (ISPRA) con il supporto di Giovanna Massei (Animal & Plant Health Agency, UK).

Citazione raccomandata: La Morgia V., Genovesi P., Massei G., 2016. Utilizzo del vaccino immunocontraccettivo GonaCon™ nell'ambito del programma di eradicazione dello Scoiattolo grigio in Umbria. Rapporto tecnico ISPRA-APHA; pp:1-7.

Preambolo

Il presente rapporto intende analizzare le potenzialità applicative della immunocontraccezione nell'ambito del programma di eradicazione dello Scoiattolo grigio Americano (*Sciurus carolinensis*) in Umbria. Si evidenzia che l'eradicazione dello Scoiattolo grigio rappresenta un obbligo ai sensi delle norme nazionali e comunitarie, e che l'Unione Europea ha co-finanziato un programma di eradicazione di questa specie invasiva in Umbria, tramite un progetto LIFE. Quest'ultimo prevede anche, per una limitata proporzione di animali, interventi di rimozione degli scoiattoli tramite cattura, sterilizzazione chirurgica e rilascio in aree idonee. Nell'ambito delle attività del LIFE, il 2 dicembre 2015 si è tenuto a Perugia un incontro con le associazioni animaliste, a seguito del quale è stato chiesto ad ISPRA di realizzare un'analisi della possibilità di utilizzare, in alternativa alla sterilizzazione chirurgica, tecniche di immunocontraccezione, al fine di limitare l'invasività delle tecniche di intervento.

Introduzione

In una recente *review* sui metodi applicabili per il controllo della fertilità della fauna, Massei e Cowan (2014) hanno passato in rassegna i vantaggi e gli svantaggi dei diversi inibitori della fertilità, che includono:

- inibitori ormonali, ampiamente usati negli animali domestici o in cattività;
- vaccini immunocontraccettivi;
- altri metodi ancora in fase preliminare di sviluppo.

Tra questi ultimi, l'inibitore di colesterolo DiazaCon™, testato su femmine di scoiattolo grigio come contraccettivo orale in cattività (sommministrato in dosi pre-definite), ha ridotto il colesterolo degli animali a livelli che suggerivano assenza di riproduzione per vari mesi senza effetti collaterali osservabili (Yoder et al. 2011, Mayle et al. 2013). Questo contraccettivo ha la possibilità di influenzare il colesterolo in mammiferi e uccelli e la ricerca non ha ancora stabilito né i possibili effetti sulla catena trofica né gli effetti in caso di overdose. Un quadro delle ricerche condotte negli ultimi decenni, tra cui sperimentazioni di vaccini immunocontraccettivi veicolati da organismi geneticamente modificati, e delle conseguenti prospettive di sviluppo nel campo del controllo della fertilità è anche fornito da Cohn e Kirkpatrick (2015).

Fra i vari inibitori di fertilità, i vaccini immunocontraccettivi mono-dose sembrano offrire le migliori prospettive per la gestione delle popolazioni di animali selvatici. Essi causano la produzione di anticorpi che attaccano proteine o ormoni essenziali per la riproduzione. In particolare, il vaccino GonaCon™ causa la

produzione di anticorpi che neutralizzano il GnRH (ormone per il rilascio delle gonadotropine), che a sua volta controlla la produzione di ormoni necessari per l'ovulazione e la spermatogenesi (Massei et al. 2008). Il GonaCon™ è stato messo a punto dal *National Wildlife Research Center* negli USA e in tale paese è registrato come contraccettivo per cavalli (*Equus caballus*), asini selvatici (*Equus africanus*) e cervi dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*). In Europa, il *National Wildlife Management Center* di York (affidente all'*Animal & Plant Health Agency* che è parte del Ministero dell'Ambiente, Alimentazione e Agricoltura) coordina i progetti che utilizzano il GonaCon™ per il controllo di fertilità della fauna selvatica. Attualmente l'importazione di questo vaccino in Italia richiederebbe l'autorizzazione del Ministero della Salute.

Contesto di possibile utilizzo e criteri di valutazione

Al fine di assicurare una valutazione oggettiva di vantaggi e svantaggi legati all'utilizzo del GonaCon™, nella presente analisi si fa riferimento a criteri standardizzati ed a dati supportati da specifiche sperimentazioni. La più recente letteratura scientifica in materia riporta ad esempio che un agente contraccettivo ideale dovrebbe essere valutato considerando criteri quali la possibilità di somministrazione remota, l'efficacia e la reversibilità dell'effetto, la selettività e gli impatti sulla catena trofica, nonché il benessere generale degli animali e specificatamente l'assenza di effetti collaterali (Becker e Katz 1993, Kirkpatrick et al. 2011, Massei e Cowan 2014). Tutti i criteri di valutazione devono essere interpretati tenendo conto degli specifici contesti di applicazione, in questo caso l'eventuale applicazione per la sterilizzazione di scoiattoli grigi al di fuori del loro *range* naturale. In riferimento a quanto evidenziato in preambolo, l'uso del GonaCon™ sarà anche specificamente valutato come alternativa alla sterilizzazione chirurgica degli animali, già attuata nell'ambito di progetti di eradicazione della specie in Italia.

Metodi di somministrazione

Attualmente, è possibile somministrare il GonaCon™ esclusivamente tramite iniezione intramuscolare (Pai 2009). La somministrazione orale di vaccini immunocontraccettivi per lo scoiattolo grigio è stata studiata alcuni anni fa ma tali ricerche non hanno dato i risultati sperati (Moore et al. 1997). Sono in corso studi per la messa a punto di tecniche di somministrazione orale nel ratto, ma tali ricerche sono ancora in una fase di sperimentazione in laboratorio, e non sono attualmente disponibili tecniche di somministrazione orale del vaccino per alcuna specie selvatica. Tecniche alternative di diffusione di contraccettivi in popolazioni naturali (es. Cross et al. 2011; Cohn e Kirkpatrick 2015), sono tuttora in una fase molto preliminare (A. Sheppard e L. Hinds, com.pers.).

Attualmente la somministrazione del GonaCon™ richiede pertanto la cattura e successiva manipolazione degli animali. Va altresì evidenziato che il vaccino non è specie-specifico (si veda sotto, § Selettività e impatti sulla catena trofica) e la somministrazione per via orale, qualora diventasse disponibile un'ideale formulazione del vaccino, richiederebbe l'utilizzo di sistemi di distribuzione in grado di escludere effetti su specie non-target, *in primis*, per lo specifico caso in esame, sullo scoiattolo comune europeo o scoiattolo rosso (*Sciurus vulgaris*). Sperimentazioni di alimentatori selettivi per lo scoiattolo grigio sono state effettuate in particolare nel Regno Unito (Pepper 1990, Pepper e Stocker 1993, Pepper e Currie 1998, Barr et al. 2002), ai fini della somministrazione del warfarin come anticoagulante per il controllo della popolazione. Le ricerche condotte hanno portato alla realizzazione di alimentatori in grado di evitare impatti significativi su altre specie non target (es. di piccoli mammiferi e uccelli, Pepper e Stocker 1993), ma tali studi non hanno accertato che questi alimentatori escludano lo scoiattolo rosso. Allo stato attuale delle

conoscenze, qualora si rendesse disponibile una formulazione del vaccino per via orale, la distribuzione andrebbe pertanto prevista solo in aree di esclusiva presenza dello scoiattolo grigio.

Efficacia e reversibilità dell'effetto

L'efficacia di un vaccino immunocontraccettivo è legata alla risposta immunitaria degli animali, che può differire non soltanto tra specie, ma anche tra individui della stessa specie; a causa della variabilità nella risposta individuale, nelle sperimentazioni in natura l'efficacia di questi vaccini ha raramente raggiunto il 100% (Kirkpatrick et al. 2011). Inoltre, l'attività sessuale di un animale trattato con un vaccino immunocontraccettivo viene sospesa fino a quando la concentrazione degli anticorpi al vaccino rimane relativamente elevata ed in varie specie una singola somministrazione rende l'animale non fertile per alcuni anni (Massei et al. 2008, Kirkpatrick et al. 2011, Massei et al. 2012).

Per quanto riguarda specificatamente gli Sciuridi, è stato verificato che una singola dose di 400 µg di vaccino GonaCon™ induce una risposta immunologica in grado di inibire la riproduzione nei maschi di scoiattolo grigio, ma non è stata verificata la sua efficacia a lungo termine (Pai 2009, Pai et al. 2011). Per lo scoiattolo volpe (*Sciurus niger*), Krause et al. (2014a) hanno documentato che il GonaCon™ inibisce la riproduzione nel 100% di maschi e nelle femmine per circa 3 stagioni riproduttive. L'efficacia è stata riportata anche per altre specie di sciuridi (Nash et al. 2004, Yoder et al. 2010). L'efficacia sul lungo periodo tuttavia dipende dalla persistenza dell'antigene in relazione alla sopravvivenza degli animali e ad oggi non sono stati effettuati studi a lungo termine in grado di escludere un declino degli anticorpi GnHR nello scoiattolo grigio (Pai 2009). L'efficacia a lungo termine della singola dose sullo scoiattolo grigio potrebbe quindi non essere del 100% per tutta la durata della vita di vita uno scoiattolo grigio, che si aggira solitamente intorno ai 4-6 anni. I dati attualmente disponibili non permettono perciò di escludere *a priori* la necessità di somministrazione di una seconda dose di contraccettivo, opportunamente distanziata nel tempo, al fine di garantire l'efficacia contraccettiva a lungo termine.

Si evidenzia che, quando, come nel caso in esame, se l'obiettivo dell'intervento è l'eradicazione di una popolazione, è necessario poter assicurare la sterilizzazione del 100% degli animali trattati e la durata di questo effetto nel tempo, soprattutto perché negli scoiattoli una popolazione può insediarsi anche a partire da un numero limitatissimo di coppie riproduttive. Pertanto anche la presenza di pochi esemplari riproduttivi in natura può dare inizio a una nuova popolazione (Bertolino 2009).

Ciò premesso, anche qualora l'obiettivo di un intervento non sia quello eradicativo ma il contenimento di numerico di popolazione, va comunque evidenziato che un'alta percentuale di femmine (almeno il 70%) deve essere trattato perché vi sia un effetto significativo sulla dinamica delle popolazioni (Krause et al. 2014b, Cowan e Massei 2008), escludendo in ogni caso meccanismi di compensazione delle nascite legati, ad esempio, ad un incremento del tasso riproduttivo della percentuale di femmine non sottoposte a trattamento (Massei e Cowan 2014, Krause et al. 2014b).

Selettività e impatti sulla catena trofica

Come sopra evidenziato, il GonaCon™ agisce sull'ormone GnRH, che nei mammiferi è altamente conservato sia nella struttura sia nella funzione (Temple et al. 2003), e per questo motivo risulta difficile lo sviluppo di vaccini specie-specifici. Nella sua attuale formulazione iniettabile, il GonaCon™ è ovviamente selettivo (in quanto somministrabile alla sola specie target). Viceversa, la formulazione di questo vaccino

come immunocontraccettivo orale (ancora non disponibile) dovrebbe valutare il possibile impatto su specie non-target.

Negli USA, la *Environmental Protection Agency* nel 2009 ha decretato che il GonaCon™ può essere utilizzato sui cervi dalla coda bianca anche se tali animali entrano nella catena alimentare umana, in quanto il pericolo associato con il consumo di carne di animali trattati con questo vaccino è minimo. Simili vaccini, basati sul GnRH, sono disponibili in Europa e utilizzati per la castrazione chimica di suini di allevamento.

Effetti collaterali su fisiologia, benessere e comportamento degli animali trattati

Il GonaCon™, in quanto vaccino immunocontraccettivo aspecifico, è stato sperimentato su diverse specie di ungulati. Nella maggior parte di tali specie, GonaCon™ non ha avuto significativi effetti collaterali sul comportamento degli animali, sul benessere e sulla fisiologia.

Per gli Sciuridi, in particolare, sia Pai (2009), sia Krause et al. (2014a) hanno riportato casi di ascessi nel sito di inoculo. Krause et al. (2014a) riportano di casi di effetti particolarmente severi per lo scoiattolo volpe, mentre per quanto riguarda lo scoiattolo grigio Pai (2009) riporta 4 casi di ascesso su 40 animali trattati con GonaCon™, anche se a tale proposito è opportuno precisare che tali ascessi non comportano necessariamente significativi effetti negativi per il benessere animale. Secondo Krause et al. (2014a), le reazioni potrebbero essere in particolare legate all'utilizzo di una specifica formulazione, individuata però in quanto in grado di assicurare un effetto di più lungo periodo.

Nello scoiattolo grigio, Pai (2009) non riporta casi di riduzione significativa di peso corporeo, di peggioramento generale delle condizioni degli animali e riporta che non sono stati osservati cambiamenti istologici nelle ghiandole pituitarie, che al contrario avrebbero potuto indicare un'interferenza con altri meccanismi fisiologici. Non sono documentate interferenze con gravidanze preesistenti o con l'allattamento. Nello scoiattolo volpe è stato invece osservato un peggioramento generale delle condizioni di salute degli animali con persistenza di ascessi nel sito di inoculo per anni e con circa un terzo degli animali che zoppicavano o camminavano con un arto irrigidito (Krause et al. 2014b).

Per quanto riguarda il comportamento, dati preliminari indicano un incremento nell'attività di *self-grooming* nei maschi di scoiattolo grigio trattati con GonaCon (Pai 2009). Nessun effetto collaterale negativo è stato ad oggi riportato in altre specie di sciuridi (Californian ground squirrel e black-tailed prairie dog) (Nash et al., 2004, Yoder et al. 2010).

Nel complesso, gli effetti collaterali sono dunque variabili nelle diverse specie di scoiattoli, anche in relazione alla formulazione del vaccino, e pochi sono i dati disponibili per lo scoiattolo grigio, per il quale non vi sono evidenze che debbano necessariamente manifestarsi gli stessi effetti collaterali osservati su altre specie, incluso lo scoiattolo volpe. Prima di un eventuale utilizzo del GonaCon™ su questa specie, dovrebbe quindi essere completata una fase di sperimentazione in cattività che escluda tali effetti.

Ulteriori valutazioni

Costi

I costi connessi al controllo di fertilità tramite somministrazione di GonaCon™ sono legati a:

- test in cattività con varie formulazioni del vaccino e una-due dosi per verificare possibili effetti collaterali, efficacia e durata dell'effetto;
- attività di campo per catture, somministrazione vaccino e successivi controlli;
- costo del vaccino;
- attività di elaborazione dati da parte di gruppi di ricerca specializzati, ai fini della valutazione dell'efficacia del trattamento.

Accettabilità sociale

Il controllo di fertilità tramite somministrazione di GonaCon™ si configura come un'attività gestionale in grado di assicurare una maggior accettazione sociale, anche rispetto alla sterilizzazione chirurgica, degli interventi di controllo delle popolazioni di scoiattoli alloctoni (Barr et al. 2002, Massei e Cowan 2014).

Conclusioni

L'analisi condotta, sulla base della miglior conoscenza disponibile, indica che l'uso del GonaCon™ come vaccino immunocontraccettivo non soddisfa alcuni dei requisiti che sarebbero specificatamente richiesti per l'eradicazione di popolazioni di scoiattolo grigio. Tale conclusione deve tuttavia essere considerata limitata allo specifico caso dello scoiattolo grigio, mentre per alcune specie a più basso tasso riproduttivo, l'uso di vaccini immunocontraccettivi mono-dose potrebbero portare, teoricamente, all'estinzione locale delle popolazioni, anche in assenza di una efficacia del 100%, purché il controllo della fertilità sia sostenuto nel tempo (es. Raiho et al. 2015).

Al contrario, nel caso dello scoiattolo grigio, è ampiamente documentato come abbondanti popolazioni, con elevato potenziale invasivo, si siano generate dal rilascio anche soltanto di poche coppie di esemplari (Bertolino 2009). Per questo motivo, prevedendo il rilascio in ambiente naturale degli animali sterilizzati e dovendo salvaguardare i nuclei di scoiattoli rossi ancora presenti sul territorio, talora in condizioni di simpatria con la specie alloctona, il GonaCon™ dovrebbe:

- essere efficace, al 100%, con una sola dose, che necessiterebbe la cattura degli animali e la somministrazione del vaccino tramite iniezione;
- avere un effetto irreversibile, in quanto il rilascio in natura di esemplari in grado di riprodursi, anche se a diversi anni di distanza dalla vaccinazione, inficerebbe tutte le attività di controllo;
- essere privo di effetti collaterali.

Ad oggi, non sono disponibili studi circa la durata a lungo termine e circa l'irreversibilità dell'effetto del GonaCon™ né per lo scoiattolo grigio né per altri Sciuroidi quali lo scoiattolo volpe. Le informazioni relative al possibile impatto sulla dinamica di popolazione di altri sciuroidi, quali lo scoiattolo volpe Krause et al. (2014b), indicano che la contraccizione attuata tramite somministrazione di GonaCon™ può ridurre, ma non eliminare, la popolazione di scoiattoli, a condizione che una percentuale molto elevata di femmine (>> 70%) venga trattata (Moore et al. 1997, Cowan e Massei 2008, Krause et al. 2014b, Massei e Cowan 2014); ad esempio, Cowan e Massei (2008), sulla base di un modello teorico, concludono che sterilizzando il 90% delle femmine si potrebbe arrivare a estinzione locale dello scoiattolo grigio nell'arco di 7/8 anni, qualora si assicurasse uno sforzo costante di sterilizzazione.

Per questi motivi, e per i possibili effetti collaterali che andrebbero valutati in studi di cattività, l'attuale formulazione del GonaCon™ non è al momento applicabile per l'eradicazione della specie e non può essere

considerata in interventi di controllo su popolazioni naturalizzate su ampie porzioni di territorio. Attualmente, la sua applicazione potrebbe quindi essere limitata a contesti molto specifici, quali interventi finalizzati al controllo delle popolazioni di scoiattolo grigio in parchi urbani non connessi con aree naturali, isole, o altri contesti di bassa estensione (indicativamente < 100 ha). In tal caso, l'impiego dell'immunocontraccezione per l'eradicazione locale di una popolazione può essere valutato, a condizione che l'impegno (in termine di costi, personale, etc.) per tale metodo sia adeguato e che si assicuri la prosecuzione degli interventi per tutto il periodo necessario al completamento dell'intervento, che può richiedere molti anni.

Bibliografia

- Barr, J.J.F. et al., 2002. Evaluation of Immunocontraception as a Publicly Acceptable Form of Vertebrate Pest Species Control: The Introduced Grey Squirrel in Britain as an Example. *Environmental Management*, 30(3), pp.342–351.
- Becker, S.E. e Katz, L.S., 1993. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs or active immunization against GnRH to control fertility in wildlife. *Contraception in wildlife management*, Paper 4. Available at: <http://digitalcommons.unl.edu/nwrcontraception/4>.
- Bertolino, S., 2009. Animal trade and non-indigenous species introduction: the world-wide spread of squirrels. *Diversity and Distributions*, 15(4), pp.701–708.
- Cohn, P. e Kirkpatrick, L.S., 2015. History of the Science of Wildlife Fertility Control: Reflections of a 25-Year International Conference Series. *Applied Ecology and Environmental Sciences* 3.1: 22-29
- Cowan, D.P. e Massei, G., 2008. Wildlife contraception, individuals, and populations: how much fertility control is enough? In R. M. Timm e M. B. Madon, eds. Proc. 23rd Vertebrate Pest Conference. Davis, pp. 220–228.
- Cross, M.L. et al., 2011. Could recombinant technology facilitate the realisation of a fertility-control vaccine for possums? *New Zealand Journal of Zoology*, 38(1), pp.91–111.
- Kirkpatrick, J.F., Lyda, R.O. e Frank, K.M., 2011. Contraceptive vaccines for wildlife: a review. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 66(1), pp.40–50.
- Krause, S.K., Kelt, D.A., Gionfriddo, J.P., et al., 2014a. Efficacy and health effects of a wildlife immunocontraceptive vaccine on fox squirrels. *The Journal of Wildlife Management*, 78(1), pp.12–23.
- Krause, S.K., Kelt, D.A., Van Vuren, D.H., et al., 2014b. Regulation of tree squirrel populations with immunocontraception: a fox squirrel example. *Human-Wildlife Interactions*, 8(2), pp.1–12.
- Lioy, S. et al., 2016. Weight operated see-saw feeding hoppers are not selective for red squirrels when greys are present. *Mammalian Biology*, pp.1–29.
- Massei, G. e Cowan, D., 2014. Fertility control to mitigate human–wildlife conflicts: a review. *Wildlife Research*, 41(1), pp.1–21.
- Massei, G. et al., 2008. Effect of the GnRH vaccine GonaCon on the fertility, physiology and behaviour of wild boar. *Wildlife Research*, 35(6), pp.540–547.
- Massei, G. et al., 2012. Long-term effects of immunocontraception on wild boar fertility, physiology and behaviour. *Wildlife Research*, 39(5), pp.378–385.

- Mayle B.A., Ferryman M., Peace A., Yoder C.A., Miller L. & Cowan D. (2013) The use of DiazaCon™ to limit fertility by reducing serum cholesterol in female grey squirrels, *Sciurus carolinensis*. *Pest Management Science*, 69, 414–424
- McLeod, S.R. et al., 2008. Prospects for the future: is there a role for virally vectored immunocontraception in vertebrate pest management? *Wildlife Research*, 34(7), pp.555–566.
- Moore, H., Jenkins, N.M. e Wong, C., 1997. Immunocontraception in rodents: a review of the development of a sperm-based immunocontraceptive vaccine for the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Reproduction, Fertility and Development*, 9, pp.125–129.
- Nash, P. B., D. K. James, L. T. Hui, and L. A. Miller. 2004. Fertility control of California ground squirrels using GnRH immunocontraception. *Proceedings Vertebrate Pest Conference*, 21:274–278.
- Pai, M., 2009. *Field evaluation of the immunocontraceptive GonaCon™ in reducing Eastern gray squirrel fecundity in urban areas*. All Dissertations.
- Pai, M. et al., 2011. Immunocontraception in Eastern Gray Squirrels (*Sciurus carolinensis*): Morphologic Changes in Reproductive Organs. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(4), pp.718–722.
- Pepper, H. e Currie, F., 1998. *Controlling grey squirrel damage to woodlands*, Edinburgh: Forestry Commission.
- Pepper, H.W., 1990. *Grey squirrel damage control with Warfarin*, Forestry Commission.
- Pepper, H.W. e Stocker, D., 1993. *Grey squirrel control using modified hoppers*, Forestry Commission.
- Raiho, A. M., Hooten, M. B., Bates, S. e Hobbs, N. T. (2015). Forecasting the Effects of Fertility Control on Overabundant Ungulates: White-Tailed Deer in the National Capital Region. *PloS one*, 10(12), e0143122.
- Temple, J.L., Millar, R.P. e Rissman, E.F., 2003. An Evolutionarily Conserved Form of Gonadotropin-Releasing Hormone Coordinates Energy and Reproductive Behavior. *Endocrinology*, 144(1), pp.13–19.
- Yoder C.A., Mayle B.A., Furcolow C.A., Cowan D.P. & Fagerstone K.A. (2011) Feeding of grey squirrels (*Sciurus carolinensis*) with the contraceptive agent DiazaCon™: effect on cholesterol, hematology, and blood chemistry. *Integrative Zoology*, 6, 409-419
- Yoder, C. A., and Miller, L. A. (2010). Effect of GonaCon_ vaccine on black-tailed prairie dogs: immune response and health effects. *Vaccine* 29, 233–239.

Ringraziamenti

Si ringrazia Dave Cowan per la revisione critica della prima stesura di questo documento.