

Projecto LIFE Med-Wolf

**Boas Práticas para a Conservação do Lobo  
em Regiões Mediterrânicas**



# SEMINÁRIO

**AVALIAÇÃO DE PREJUÍZOS  
CAUSADOS POR LOBOS:  
COMPORTAMENTO PREDATÓRIO  
E ANÁLISE FORENSE**

**Vila Real 12 de Março de 2014**

Hospital Veterinário da UTAD

# MANUAL DE APOIO



## Projecto MedWolf

# Boas Práticas para a Conservação do Lobo em Regiões Mediterrânicas

LIFE11 NAT/IT/o69

### Parceiros Nacionais

Grupo Lobo (*Coordenador Nacional*)

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ALDEIA – Acção, Liberdade, Desenvolvimento, Educação, Investigação, Ambiente



Website: [www.medwolf.eu](http://www.medwolf.eu)

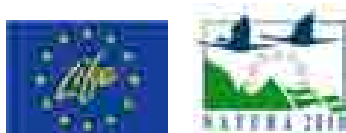
E-mail: [lifemedwolf@fc.ul.pt](mailto:lifemedwolf@fc.ul.pt)

---

### Apoio Institucional



### Apoio Financeiro



Créditos Fotográficos: Grupo Lobo e Duarte Pereira

# Índice

<b>Apresentação .....</b>	<b>1</b>
<b>O Projecto Med-Wolf .....</b>	<b>2</b>
<b>Programa .....</b>	<b>3</b>
<b>Formadores .....</b>	<b>4</b>
<b>Manual de Procedimentos para Avaliação de Prejuízos de Predadores nos Animais Domésticos .....</b>	<b>6</b>
<b>Protocolos de Recolha de Amostras Biológicas para Análise Genética .....</b>	<b>20</b>
<b>Bibliografia complementar .....</b>	<b>25</b>

## Apresentação

Damos-lhe as boas vindas a este Seminário, “Avaliação de Prejuízos Causados por Lobos”, que pretende aprofundar o conhecimento dos Técnicos e Vigilantes da Natureza (ICNF), ligados ao processo de vistoria e pagamento de prejuízos causados pelo lobo, bem como dos Médicos Veterinários dos concelhos incluídos na área de intervenção do Projecto MedWolf.

Em Portugal a área de intervenção do projecto situa-se nos Distritos da Guarda e de Castelo Branco, integrando sítios Rede Natura 2000, bem como Áreas Protegidas. Abrange parte leste do núcleo populacional de lobo a sul do rio Douro, onde a presença desta espécie é considerada menos estável: concelhos de Figueira de Castelo Rodrigo, Almeida, Pinhel, Guarda, Sabugal, Penamacor e Idanha-a-Nova.

A formação teórico-prática *ex situ*, dedicada aos conhecimentos necessários ao exame das carcaças e à recolha de amostras biológicas para análise forense, será da responsabilidade do Dr. Simone Angelucci (Parque Nacional de Majella, Itália) e do Dr. Nuno Santos (Pygargus, Lda).

A sessão prática incluirá o exame de carcaças de animais recolhidas de prejuízos de lobo e ainda o acompanhamento, com a presença de um médico veterinário, de vistorias a prejuízos atribuídos a este predador. Esta formação *in situ* estará dependente dos prejuízos declarados numa das Áreas Protegidas situadas na área de actuação do Projeto (PNDI, PNSE, RNSM, PNTI).

Este evento é organizado pelo Grupo Lobo em colaboração com diversas entidades, às quais aqui deixamos o nosso agradecimento pelo apoio e colaboração prestados, e decorre no âmbito do Projeto MedWolf – Boas Práticas para a Conservação do Lobo em Regiões Mediterrânicas.

Agradecemos também a Vossa presença, esperando que este Seminário possa resultar, para que todos em conjunto, consigamos contribuir para a conservação do lobo.

Vila Real, 12 de Março de 2014

**Prof. Doutor Francisco Petrucci-Fonseca**

Presidente do Grupo Lobo

## O Projecto MED-WOLF

O Projeto LIFE MED-WOLF - Boas Práticas para a Conservação do Lobo em Regiões Mediterrânicas, tem por objectivo diminuir o conflito entre a presença do lobo e as actividades humanas, em regiões rurais onde os hábitos culturais de coexistência se perderam. O MED-WOLF engloba organizações italianas e portuguesas de natureza agrícola e ambiental, entidades estatais e centros de investigação, numa colaboração única.

**Em Itália será desenvolvido no território da Província de Grosseto**, no Parque Regional de Maremma e no parque do Monte Amiata, onde a presença do lobo foi confirmada por estudos anteriores. **Em Portugal as áreas de intervenção estão inseridas nos Distritos da Guarda e de Castelo Branco** abrangendo o núcleo populacional a sul do rio Douro, cuja existência tem sido muito afectada pela destruição do habitat e pela presença de barreiras físicas e sociais.

As principais actividades a desenvolver são:

- Realização de censos fiáveis sobre a presença e a situação do lobo e caracterização dos conflitos causados pela presença do lobo nas áreas do projecto;
- Formação dos actores locais envolvidos na conservação do lobo, que foquem: a monitorização da população lupina, a avaliação dos prejuízos e o estabelecimento de relações de confiança com os criadores de gado e caçadores;
- Aplicação de medidas eficazes de prevenção de prejuízos, como vedações eléctricas ou convencionais, cães de gado de qualidade e bem-educados, e um maneio do gado que reduza o risco de predação pelo lobo;
- Troca de experiências com projectos similares e com especialistas em diferentes aspectos da conservação do lobo;
- Criação de grupos de coordenação nacionais e internacionais sobre técnicas de protecção dos animais domésticos e de diminuição dos prejuízos, e de métodos de conservação do lobo;
- Avaliação das áreas ecologicamente mais adequadas ao lobo, onde os conflitos sociais existem e representam entraves à expansão da espécie, utilizando técnicas de informação geográfica e de mitigação das barreiras sociais;
- Campanhas de sensibilização dos criadores de gado e do público em geral sobre as formas de coexistência entre o lobo e as actividades humanas;
- Aumento da consciencialização e do conhecimento técnico dos gestores, através de reuniões temáticas e acções de formação.

O projecto tem a duração de cinco anos, prolongando-se até Março de 2017. O Grupo Lobo é responsável pela coordenação nacional, e tem como parceiros a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, o Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária e a Associação ALDEIA. A coordenação internacional está a cargo do Instituto de Ecologia Aplicada (Itália), estando ainda envolvidas mais seis entidades Italianas.

## **Programa**

**09:30 – Abertura**

**10:00 – Diagnóstico: ferimentos, lesões *intra-vitam* e *post-mortem***

**Comportamento predatório do lobo**

Dr. Simone Angelucci

*Parque Nacional de Majella (Itália)*

**11:15 – Pausa para café**

**11:30 – Predação de animais domésticos: enquadramento, mortes múltiplas**

Dr. Simone Angelucci

*Parque Nacional de Majella (Itália)*

**13:30 – Almoço**

**14:30 – Exame prático: necrópsias**

Dr. Simone Angelucci

*Parque Nacional de Majella (Itália)*

Dr. Nuno Santos

*Pygargus, Lda*

**Amostragem genética: análise forense**

Prof. Dr. Francisco Petrucci-Fonseca

*Grupo Lobo*

**17:00 – Encerramento**

## **Dr. Simone Angelucci**

**Parque Nacional de Majella, Itália**

---

Nasceu em 1977, em Chieti, na região de Abruzzo, em Itália. Doutorado em Medicina Veterinária pela Universidade de Teramo em 2000, com distinção. Após um período de formação em Patologia Veterinária da fauna selvagem, durante um ano no Istituto Zooprofilattico de Abruzzo e Molise, começou a trabalhar na gestão do javali e na avaliação de prejuízos em animais domésticos desde 2002.

Tem mais de dez anos de experiência na avaliação de prejuízos causados por predadores em animais domésticos, na necrópsia de animais selvagens, na captura e monitorização sanitária da vida selvagem (lobo, ungulados).

Deu vários seminários nacionais e internacionais sobre avaliação e gestão da predação no gado causada por carnívoros, o desenvolvimento de actividades agrícolas e pecuárias em áreas protegidas, e captura e manejo da vida selvagem. Tem escrito alguns artigos sobre gestão veterinária da fauna selvagem e é co-autor de um livro sobre análise forense de fauna selvagem.

Colabora com universidades italianas em cursos sobre epidemiologia da vida selvagem (Siena) e gestão sanitária da fauna selvagem (Urbino), e ainda com as iniciativas do Programa LIFE.

A sua pesquisa mais recente centra-se na captura de lobos e telemetria por GPS, captura de camurça, gestão sanitária da fauna selvagem e interação com os animais domésticos, ciência forense aplicada à fauna selvagem, e o desenvolvimento rural em regiões de montanha.



## **Dr. Nuno Santos**

**Pygargus, Lda**

---

Licenciado em Medicina Veterinária pela Universidade Técnica de Lisboa, em 1997, é Mestre em Saúde Pública Veterinária pela Universidade Técnica de Lisboa, em 2007, sobre o tema da tuberculose em javali em Portugal. Atualmente é aluno de doutoramento do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde, Universidade do Minho, debruçando-se sobre a epidemiologia da tuberculose em ungulados selvagens.

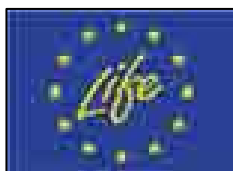
Trabalha desde 1997 em medicina da conservação, nomeadamente na recuperação de fauna selvagem, em estudos sobre sanidade, captura e necrópsia de fauna selvagem. Apoiou o programa do ICNF, de indemnizações dos prejuízos provocados por lobos em animais domésticos, entre 1997 e 2011, nomeadamente no tratamento de animais feridos e em peritagens em casos de suspeita de fraude.

Publicou 12 artigos científicos em revistas internacionais na área da medicina da conservação e apresentou mais de 40 comunicações em congressos nacionais e internacionais. É autor de capítulos de livros sobre conservação de abutres, epidemiologia da tuberculose e diagnóstico molecular de doenças infecciosas em fauna selvagem. Leciona aulas de medicina da conservação nas faculdades de Medicina Veterinária de Lisboa e do Porto.

Os interesses atuais prendem-se com a epidemiologia da tuberculose em ungulados selvagens, agentes infecciosos e parasitários em lobos e captura de carnívoros selvagens.







# MANUAL DE PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO DE PREJUÍZOS DE PREDADORES NOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

(Elaborado no âmbito do Projecto LIFE07/NAT/IT/000502 “Improving the conditions for large carnivore conservation: a transfer of best practices” EXTRA)

Editado por: Dr. Umberto Di Nicola<sup>1</sup>

Com a colaboração de: Dr. Simone Angelucci<sup>2</sup>

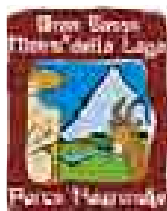
Dr. Daria Di Sabatino<sup>3</sup>

Dr. Marco Innocenti<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Médico Veterinário Parque Nacional Gran Sasso e Monti della Laga

<sup>2</sup> Médico Veterinário Parque Nacional Majella

<sup>3</sup> Médico Veterinário freelance



Vers. 01      Abril 2010  
(adaptado para Português, Março 2014)

## 1. Introdução

As situações de conflito no mundo zootécnico têm lugar em áreas utilizadas para a criação e pastoreio de gado e que são, ao mesmo tempo, habitadas por espécies selvagens, como lobos.

As regras são muito heterogéneas, não só de país para país, mas também em função da responsabilidade das entidades territoriais específicas.

O principal sistema utilizado para a gestão de conflitos decorrentes da predação de gado é a compensação com base numa avaliação dos prejuízos, acompanhada por uma investigação forense e finalizada pela detecção e recolha de dados, de forma padronizada – útil para comparação e utilizável a nível de gestão.

## 2. Avaliação de Prejuízos na Pecuária

A vistoria faz parte do procedimento realizado por instituições competentes e responsáveis na sequência de uma denúncia por suposta predação sobre o gado e é necessária para observar e documentar o que aconteceu com a carcaça em questão.

**O objetivo da vistoria é avaliar e documentar o que aconteceu.**

O pessoal autorizado realiza a vistoria, examinando a carcaça e a área circundante.

Dificuldades e riscos relacionados com a vistoria:

- Dificuldade em alcançar a carcaça dada a ausência de um espaço adequado e confortável, necessário para a avaliação *post-mortem*, juntamente com a dificuldade em manipular ferramentas de corte;
- Riscos biológicos relacionados com o animal vivo (dada a presença de parasitas, agentes de zoonoses, dispersão de líquidos orgânicos, animais portadores de infeções, etc.) e a carcaça e o seu estado de decomposição (díptera e outros insectos necrófagos que poderiam actuar como portadores, ou possuírem ferrões, flora polimicrobiana relacionada com fenómenos de putrefacção, etc.). Conhecimento da história de saúde do território e uma avaliação correcta da história reduzem e limitam o risco biológico. As avaliações e decisões serão deixadas para os serviços veterinários competentes, em caso de dúvida.

## 3. Avaliação

### Anamnese

É necessário reunir o máximo de informação possível sobre os acontecimentos, usando como fonte pessoas que saibam o que aconteceu e quem fez o pedido de compensação. É importante não negligenciar nada do que foi dito, mas ao mesmo tempo é preciso não ser condicionado por esses discursos.

### Inspeção geral do ambiente

É necessário recolher informações sobre o ambiente em torno do cadáver, a fim de direccionar as investigações subsequentes. Pistas podem ser dadas pelo campo de luta, pegadas, arrastamentos, sinais ou eventuais manchas de sangue, a presença de falésias, cursos de água, etc.



### **Identificação da carcaça**

É necessário marcar a carcaça com uma etiqueta, a fim de realizar uma documentação fotográfica da avaliação. A etiqueta representa o elo entre as fotografias e as carcaças.

Data:

Localidade:

Espécie:

Identificação:

Número de etiqueta de orelha:

Responsável pela vistoria:

### **Exame externo da carcaça**

Deve ser efectuado um exame geral externo da carcaça, especificamente da pele, do aparelho músculo-esquelético, do aparelho genital, dos orifícios externos relacionados com os aparelhos digestivo e respiratório, assim como dos órgãos dos sentidos que podem ser inspeccionados. A primeira fase da investigação estima o PMI (Intervalo Post-Mortem; o tempo que decorreu desde a morte) e coloca em evidência, através de uma primeira observação cuidadosa, quaisquer irregularidades.

### **Esfolar a carcaça**

Esfolar o animal permite reunir informações sobre o contacto ambiental e distingue, já a este nível, feridas em vida (intra-vitais) de feridas *post-mortem*.

### **Exame interno da carcaça**

O aparelho músculo-esquelético e as cavidades internas (tórax/ abdómen) são examinadas, em seguida, a serosa e os órgãos que eles contêm.

### **Investigação detalhada do meio ambiente**

A busca de elementos de comparação e a confirmação do diagnóstico formulado é efectuada; em caso de incongruência, efectua-se uma busca por elementos para um eventual re-exame do caso.

## **4. Predação**

A predação é o processo em que um animal gasta uma certa quantidade de energia para encontrar uma presa viva, e mais energia para a ferir ou matar (E. Curio). As feridas intra-vitais são o resultado anatomopatológico de todas as interações entre o predador, a sua presa e o ambiente envolvente.

### **O predador**

Lobo / Urso / Lince/ Raposa/ Cão

Cada espécie utiliza diferentes técnicas predatórias relacionadas com as suas características físicas. As feridas na vítima são geralmente diferentes, porque cada predador tem uma maneira diferente de caçar a sua presa.

## **A presa**

Veado / Javali / Corço/ Vacas / Ovinos / Cavalos

Cada espécie selvagem tem e usa diferentes mecanismos anti-predadores, relacionados com as suas características físicas. Os animais domésticos são consideravelmente mais fáceis de caçar pois perderam grande parte desses mecanismos, por causa da selecção.

A acção do predador sobre a presa produz feridas directas.

## **O ambiente**

Floresta / Pastagens abertas/ Pastagens com arbustos ou árvores

A técnica de ataque do predador e os mecanismos de defesa da presa são influenciados por características ambientais, como áreas cobertas (onde o predador se pode esconder), superfícies impermeáveis e obstáculos de vária natureza. As presas podem sofrer feridas indirectas causadas por um contexto ambiental particular.

## **5. Avaliação do Evento de Predação**

Uma acção preliminar de fundamental importância durante a vistoria é recolher informações de pessoas que conhecem os factos. Cada fragmento de informação deve ser anotado e avaliado, mas não deve influenciar a perícia forense em busca de detalhes. A carcaça deve ser identificada, preenchendo-se a etiqueta de identificação. Em primeiro lugar, ela é fotografada sozinha, em seguida, dentro do ambiente circundante e, finalmente, serão feitas fotografias de detalhes específicos e de regiões anatómicas específicas (ex. cabeça, tórax, abdómen, membros).

A reportagem fotográfica é seguida pela análise do ambiente ao redor da carcaça, em busca de sinais e elementos relacionados com ela, tomando nota deles e fotografando-os (ex. vestígios de sangue, material orgânico, pegadas, dejectos).

**Pelos, dejectos e pegadas de um predador representam sinais de sua presença na região, mas de forma alguma bastam para o ligar ao evento de predação.**

**Nem mesmo o consumo comprovado de uma carcaça pode ligar um predador à morte, podendo ser apenas a expressão de um comportamento necrófago comum a quase todos os predadores, especialmente nos primeiros anos de vida.**

Depois de envergar os equipamentos de proteção necessários, a carcaça pode ser examinada externamente, de forma precisa e padronizada, partindo da cabeça para a cauda, a fim de, eventualmente, encontrar:

**Interrupções na pele:** devem ser cuidadosamente examinadas uma a uma, distinguindo as intra-vitais das *post-mortem*, estabelecendo a forma como elas foram produzidas.

Um ferimento sofrido em vida traz uma reacção caracterizada por um estado inflamatório. Será possível notar um aumento no diâmetro dos vasos capilares em torno do ferimento, um edema inflamatório e um enfarte hemorrágico. Não haverá reacção dos tecidos numa lesão sofrida após a morte.

As dentadas produzem uma ferida lacerada e contusa, dada a acção de compressão e tracção praticada pela boca e pela cabeça do predador, através do seus dentes. Um



dente canino tem uma forma cónica (curva, com uma margem medial convexa e uma margem distal côncava) com uma secção oval, margens arredondadas e uma extremidade simples em ponto arredondado.

Quando o dente penetra na pele, produz uma ferida com forma oval e margens esgarçadas e bordos arredondados. Feridas de laceração são causadas por ferramentas com pontas, enquanto que as feridas causadas por ferramentas de corte são resultado da acção do gume fino, afiado e recto do objecto. Uma arma de corte produz feridas com uma forma oblonga, com margens direitas e extremidades agudas.

**Fracturas:** os músculos ao redor e o periósteo são observados para destacar contusões e derramamento de sangue, a fim de determinar se eles foram produzidos em vida ou após a morte. A causa da fractura (mordida, impacto, etc.) pode ser evidenciada através do exame das bordas da ferida e das estruturas circundantes.

Espécimes com pelo espesso devem ser rapados, para permitir a análise e documentação de eventuais ferimentos externos de forma mais fácil e mais precisa.

O exame externo da carcaça é seguido por um exame subcutâneo e muscular. Esta fase exige o esfolamento da carcaça, uma operação que deve ser realizada respeitando as competências profissionais, os regulamentos e as leis sobre procedimentos veterinários e segurança no trabalho.

O esfolamento evidencia o seguinte:

**Feridas intra-vitais e pós-morte;**

**Feridas de mordidas e cortes;**

O tecido muscular tem menor elasticidade em comparação com a pele; consequentemente, as dentadas conservam uma forma oval com margens esgarçadas e bordos arredondados, mas apresentam um aspecto mais irregular no que respeita à ferida cutânea correspondente. A ferida pode apresentar extroversão dos tecidos das extremidades, devido à forma arredondada dos dentes caninos e como consequência da retracção do dente.

As feridas de cortes apresentam uma forma alongada, com margens rectas, extremidades agudas e lisas e bordos regulares.

**Outras feridas de órgãos e tecidos e fracturas;**

**Reações sistémicas.**

A investigação não pode ser repetida, portanto tudo deve ser amplamente documentado.

## 6. Formulário de Recolha de Dados

Tudo o que afectou a carcaça durante o período anterior à morte do animal deve ser comprovado através da investigação: a forma como ele interagiu com o ambiente, com o predador provável ou com a causa (trauma, patologias infecciosas ou não, etc.), que determinou essa morte.

O formulário padrão facilita a recolha objectiva dos dados e permite reunir as mesmas informações para todas as investigações, para que possam depois ser feitas comparações.

A subdivisão das formas de recolha de dados por sectores permite um fluxo lógico no processo de avaliação e a subdivisão dos dados em categorias.

### Identificação da pessoa prejudicada

Exemplo: nome do criador, espécies criadas (em espécie, raças e número), cães de trabalho (tipo, raça e número), o local e o tipo de pastagem, o tipo de abrigo noturno.

### Identificação da vistoria

Exemplo: data, hora da vistoria, os animais envolvidos (espécie e número), animais mortos, animais feridos, animais perdidos, animais adultos (sexo e idade), animais jovens (sexo e idade), data da descoberta da carcaça, data do pedido, PMI de cada carcaça, lugar onde cada carcaça foi encontrada (nome e tipo do local), coordenadas do local, informações específicas referidas pelo criador ou por testemunhas.

### Identificação ambiental

Exemplo: presença de vestígios de sangue, fezes, pegadas, peles.

### Exame da carcaça

Exemplo: espécie, raça, identificação da carcaça (número da etiqueta, número do brinco), exame da pele, exame subcutâneo, exame do aparelho músculo-esquelético, exame das cavidades internas, peso estimado, percentagem estimada do consumo (ex. cabeça 10%, tórax 20%, 20% abdômen, membro anterior direito 10%, membro anterior esquerdo 10%, etc.).

### Conclusões

Exemplo: se o evento foi causado por predação ou por outra causa, se haverá direito a reembolso ou não; local e data, nome do investigador, apelido e assinatura.

## 7. Predação por Lobos

O lobo (*Canis lupus*, L. 1758) é um mamífero predador, sendo o maior da família dos canídeos. É o antepassado selvagem do cão.

As dimensões do corpo variam, dependendo da área geográfica e da subespécie considerada. Mesmo a cor do pelo, geralmente mimética, é muito variável e tende a ter tons mais claros nas populações mais a norte. O crânio é plano e amplo, com o perfil superior do focinho tipicamente plano e sem o chamado "stop".



As dentição do lobo é composta por 42 dentes. Os carniceiros são particularmente desenvolvidos e preservam a função de partir ossos e tendões.

FÓRMULA DENTAL PERMANENTE (adulto)						
M	Pm	C	I	C	Pm	M
2	4	1	6	1	4	2
3	4	1	1	4	3	6

O lobo é um carnívoro generalista e oportunista, com uma dieta muito variável, mas fortemente especializada na predação. É um predador muito adaptável, que preda animais domésticos que perderam a capacidade de se defender durante o processo de domesticação e, portanto, representam uma presa atractiva e fácil, em comparação com as presas silvestres.

O lobo desenvolveu a capacidade de seleccionar e caçar a sua presa, atacando-o com grande habilidade em zonas do corpo nas quais a sua mordida poderosa tem uma funcionalidade elevada, que pode ser verificada nas feridas das carcaças.

### **Ovinos e caprinos**

Em presas de tamanho médio, tais como ovelhas e cabras, com um peso variável de 40 a 80 kg, o tamanho do animal e a sua altura em relação ao solo, assim como o diâmetro do pescoço e a espessura da pele, permitem a mordida numa zona vital, que é extremamente funcional, como evidenciado pelas feridas nas carcaças.

### Método de Captura

Uma ou mais mordidas localizadas na parte superior do pescoço, logo atrás da mandíbula, na região da glândula salivar parótida. No caso de carneiros grandes, podemos notar mais mordidas na área alvo, como consequência da dificuldade (dada as dimensões maiores) em morder e segurar a presa. A mordida nesta região fere e estimula os barorreceptores das carótidas (presentes no ponto de bifurcação da artéria carótida) assim como o nervo vago. A estimulação dos barorreceptores das carótidas provoca vasodilatação e inibição cardíaca com hipotensão, bradicardia e diminuição do débito cardíaco, enquanto que a estimulação vagal provoca bradicardia.

### Avaliação

Feridas contusas dilaceradas nos tecidos subcutâneos e nos músculos perto do pescoço com grande equimose e derramamento de sangue. Sem ferimentos directos em outras zonas do corpo. Em animais feridos poderá haver dificuldades respiratórias provocadas pela quebra dos anéis da traqueia.

### **Vitelos recém-nascidos**

Com menos de uma semana de idade. São presas fáceis porque ainda não são capazes de acompanhar a mãe, permanecendo durante muito tempo no mesmo lugar, com movimentos lentos e incertos, para além de não serem miméticos. Os episódios de predação sobre bezerros desta idade estão muito ligados aos reduzidos cuidados maternos das vacas (especialmente para as primíparas).

### Método de Captura

Ataques diretamente ao abdómen, à região do umbigo, onde a pele é mais fina e o acesso à cavidade abdominal é facilitado. A rapidez e a funcionalidade do ataque está, por conseguinte, claramente dirigida para o consumo dos animais.

### Avaliação

Feridas contusas laceradas no tecido subcutâneo e nos músculos das paredes do abdómen com equimoses e derramamento de sangue. Sem ferimentos directos noutras zonas do corpo.

### **Vitelos de 1 a 6 meses de idade**

O risco de predação aumenta após o primeiro mês de vida, porque os bezerros tornam-se mais independentes e afastam-se mais das suas mães. O risco de predação diminui após os primeiros seis meses de vida, porque os bezerros crescem e tornam-se reactivos.

### Método de Captura

Ataques nos membros traseiros (na superfície latero-caudal da coxa) e nos membros anteriores (na superfície latero-caudal do ombro). A mordida dilacera os músculos anti-gravitacionais dos membros. Também são mordidos no terço proximal do pescoço e na cabeça (na região da mandíbula). O movimento para baixo e para trás da cabeça do animal altera o centro de gravidade do animal desacelerando-o. O diâmetro considerável do pescoço e a pele espessa e redundante não permitem feridas importantes para a estrutura funcional ao nível da região da parótida.

### Avaliação

Feridas contusas laceradas no tecido subcutâneo e nos músculos do ombro e da coxa com grandes hematomas e derramamento de sangue. Feridas contusas laceradas no terço proximal do pescoço, na região ventro-lateral da mandíbula e no chanfro. Sem ferimentos directos noutras regiões do corpo.

### **Equinos**

A predação é geralmente dirigida aos potros, com idade média de 1 a 6 meses.

### Método de Captura

Ataques nos membros traseiros (na superfície latero-caudal da coxa) com ferimentos importantes nos músculos anti-gravitacionais. Também são mordidos na parte superior do pescoço, logo atrás da mandíbula, na região da parótida, com feridas e estimulação dos barorreceptores das carótidas.

### Avaliação

Feridas contusas laceradas no tecido subcutâneo e nos músculos das coxas com grandes hematomas e derramamento de sangue, juntamente com ferimentos de mordidas em correspondência com a parte proximal do pescoço com grande equimose e derramamento de sangue. Sem ferimentos directos noutras regiões do corpo. Dada a estrutura angulosa particular, a mordida muitas vezes estilhaça a mandíbula.



## 8. Material para a Vistoria

Uma vez que a vistoria pode ocorrer em locais de difícil acesso, os técnicos devem levar apenas o material estritamente necessário. O material deve, contudo, permitir: actuar em segurança; documentar tudo de forma exaustiva, quer através de documentos, quer de registos de foto/vídeo (considerando que a vistoria não pode ser repetida); examinar a carcaça (tosquiar, dissecar); colher, conservar e transportar amostras biológicas para análises adicionais.

### Lista de Material

1. Material para segurança no trabalho (protecção individual): ex. luvas de látex descartáveis e máscaras;



2. Material para documentação: craveira, bloco de notas, caneta, etiquetas de identificação, câmaras de vídeo-foto;



3. Material para tosquia: máquina de tosquia, bisturi, lâminas;

4. Material para esfolar e examinar a carcaça: bisturi, tesoura, faca, cortador de costela, alicates;



5. Material por recolher amostras biológicas: sacos de polietileno, tubos de ensaio, envelopes de papel para amostras de pelo, etc.;



6. Material para transporte das amostras: caixa isotérmica ou mini-frigorífico portátil.

## 9. Fenómeno Cadavérico

Consiste no fenómeno que surge na carcaça, sendo usado para determinar o PMI. Ocorre na seguinte ordem cronológica:

1. Perda de consciência;
2. Perda de sensibilidade;
3. Perda de mobilidade;
4. Perda do reflexo da córnea e da pupila;
5. Paragem respiratória e cardíaca;
6. Hipostase *post-mortem* (*livor mortis*);
7. Coagulação do sangue;
8. Efeito de refrigeração (*algor mortis*);
9. Secagem das partes húmidas;
10. *Rigor mortis*;
11. Autólise;
12. Decomposição.

### Hipostase *post-mortem* (*livor mortis*)

Caracterizado pela presença de manchas hipostáticas que se formam quando há uma paragem da circulação e quando o sangue flui para zonas do cadáver em posição inferior e não comprimidas. As manchas hipostáticas surgem após 8 horas e atingem a intensidade máxima na 12ª hora.

### Coagulação do sangue

Surge em vasos de grande calibre e em cavidades cardíacas devido à transformação do fibrinogénio em fibrina. Normalmente, os coágulos surgem 4-5 horas após a morte. Em caso de deterioração orgânica, choque anafilático, envenenamento, leucemia ou antraz a coagulação é incompleta. Os coágulos podem ser: vermelhos, compostos por fibrina com células vermelhas do sangue; avermelhados, com uma consistência mole e gelatinosa; ou brancos, compostos por fibrina, ou com uma cor branco-amarelada.

### Efeito de resfriamento (*algor mortis*)

É influenciado por causas intrínsecas (espécie, raça, tamanho, temperatura do animal no momento da morte) e extrínsecas (temperatura externa, ventilação, humidade, protecção da carcaça).

- Nas primeiras 3-5 horas a diminuição é de 0,5°C/hora, devido ao calor produzido pela actividade celular remanescente.
- Nas 5-10h após a morte, a diminuição é de 1°C/hora.
- A diminuição continua progressivamente de  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{3}$ °C por hora, até atingir a temperatura do ambiente circundante.

Uma carcaça com 70 kg atinge a temperatura ambiente em 18 a 20 horas.

### *Rigor mortis*

Após a morte celular, a membrana celular deixa de ser capaz de manter o gradiente osmótico, com o consequente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e a formação de ligações de actina-miosina, com a contracção dos miofilamentos até estarem presentes os substratos de suporte do metabolismo anaeróbico (ATP, glicogénio). A rigidez está correlacionada com a temperatura e com a actividade metabólica no momento da morte. Com febre alta (tétano, carbúnculo, stress de transporte, insolação), o rigor aparece quase simultaneamente à morte. Uma temperatura externa muito baixa, inferior a 0°C, pode

bloquear o rigor que pode começar de novo de forma descoordenada. Em animais em estado caquético, ou em longa agonia, o *rigor mortis* pode começar passado bastante tempo. Se o *rigor mortis* começa rapidamente, resolve rapidamente, e vice-versa. O curso do *rigor mortis* (lei de Nysten) desenvolve-se de uma forma ântero-posterior: cabeça (músculos masseter) - nuca - pescoço - tronco - membros anteriores - região posterior; e desaparece na mesma ordem.

### **Cronologia do *rigor mortis***

- Início: 3-6 horas (em cerca de 12-24 horas a rigidez está completa);
- Rigidez completa estável: 24-48 horas;
- Resolução: 48-96 horas.

### Autólise

Corresponde à decadência espontânea dos tecidos mortos pela atividade das enzimas proteolíticas lisossomais que são libertadas após a morte celular. Envolve principalmente os órgãos do aparelho digestivo. O frio retarda a progressão da autólise, enquanto o calor a favorece.

### Decomposição

Decomposição das substâncias orgânicas dos tecidos provocada pela proliferação de microorganismos saprófitos ambos de origem interna (intestino) e externa. Ao fenómeno da decomposição é adicionado o fenómeno da autólise.

### **A decomposição pode ainda ser classificada em:**

**Período cromático ou de manchas verdes:** aparecimento de manchas verdes em correspondência às áreas onde o desenvolvimento dos microrganismos se verifica. Desenvolvimento centrífugo.

**Período de desenvolvimento gasoso:** inchaço do corpo devido à acumulação de gás (ex. sulfeto de hidrogénio produzido por bactérias anaeróbicas). Desenvolvimento centrífugo.

**Período coliquativo:** dissecação da camada córnea através da acção de microorganismos anaeróbios que alastram até a pele. Caracterizado por um desenvolvimento centrípeto.

**Período de esqueletização:** caracterizado pela redução do esqueleto da carcaça.

Mesmo as modificações do globo ocular podem ser usadas como um parâmetro para determinar o momento da morte.

Elas são representadas por:

1. Relaxamento da íris;
2. Enevoamento da córnea (6-7 horas após a morte em consequência da autólise enzimática);
3. Definhamento do globo ocular: após a evaporação dos líquidos dos olhos, o globo ocular encolhe e afunda-se na cavidade orbital. As pálpebras fechadas impedem a desidratação da córnea;
4. Manchas enegrecidas na esclera;
5. Turbidez do olho;
6. Enevoamento do cristalino: torna-se opaco mais rapidamente quando está frio.



## 10. Entomologia Forense

Lida com o estudo dos insectos para efeitos legais, a fim de estabelecer o lugar e o momento da morte. As diferentes categorias de insectos seguem os passos seguintes das várias fases de evolução do cadáver.

1. Insectos necrófagos;
2. Insectos necrofílicos: predadores ou parasitas dos insectos necrófagos;
3. Insectos omnívoros: alimentam-se de tecidos, pelos, etc.
4. Insectos oportunistas: utilizam a carcaça como abrigo.

A presença ou ausência específica de um grupo de insectos e o período de presença podem variar consoante os factores que influenciam a população de insectos de determinado local (estações do ano, dados climáticos e meteorológicos, dimensões da carcaça, etc.).

ARTRÓPODES	INTERVALO PÓS-MORTEM (DIAS)																											
Ordem / Família	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	20	30	40	50	60	80	100	150	365				
Diptera																												
Calliphoridae																												
Sarcophagidae																												
Muscidae																												
Piophilidae																												
Fanniidae																												
Hymenoptera																												
Vespidae																												
Formicidae																												
Coleoptera																												
Staphylinidae																												
Dermestidae																												
Histeridae																												
Scarabaeidae																												
Tenebrionidae																												
Cleridae																												
Silphidae																												
Dermaptera																												
Collembola																												
Blattaria																												

Adaptado de: "L'entomologia forense e le sue applicazioni nella medicina legale - La data della morte". Laboratorio de Antropologia. Instituto Anatómico Forense. Ciudad Universitaria. Madrid.

## 11. Bibliografia

AA.VV. 1998a. Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 212 (7).

AA.VV. 1998b. Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 213 (5).

AA.VV. 1998c. Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 213 (9).

AGUGGINI G. 1998. Cuore e circolo. In Aguggini G., Beghelli V., Clementi M.G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongin A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. UTET, II Edizione, 10:357-438.

ALOTTO C. 2003. Etude du phénomène de prédation causée par le loup au sein d'une aire protégée (Parc National du Gran Sasso et Monts de la Laga, Italie Centrale). Rôle du vétérinaire dans la



reconnaissance des dommages causée au cheptel domestique. Tesi di laurea in medicina veterinaria alla Facoltà di Nantes (non pubblicata).

ANGELUCCI et al. 2005. Predazioni sul bestiame monticante nel parco nazionale della majella. analisi del fenomeno ed aspetti gestionali – Vol. 115 Biologia e Conservazione della Fauna.

ANONIMO 1980. Ecological aspects of urban stray dogs. Continuing Education Article n.4, Vol. 2 (9), In: Morosetti G. (Ed.), Osservazioni sul comportamento predatorio del cane domestico e di alcuni carnivori selvatici. Assessorato provinciale alla Sanità, Provincia Autonoma di Bolzano – Alto Adige.

BARONE R. 1993. Anatomia comparata dei mammiferi domestici – Volume V - Angiologia parte prima – Cuore e arterie. Edizioni Agricole.

BAUER E.A. 2003. Predators – Coyotes & Wild Dogs. In: [www.shagharkridge.com/info/coyote.html](http://www.shagharkridge.com/info/coyote.html)

BECK A.M. 1974. Ecology of unwanted and uncontrolled pets. In: Morosetti G.: Osservazioni sul comportamento predatorio del cane domestico e di alcuni carnivori selvatici. Assessorato provinciale alla Sanità, Provincia Autonoma di Bolzano – Alto Adige, 23.2.

BECK A.M. 1975. The ecology of “feral” and free-roving dogs in Baltimore. In: Fox M.W. (Ed.), The Wild Canids. Their Systematics, Behavioral, Ecology and Evolution: 380-390. Behavioral Science Series, Von Nostrand Reinhold Company.

BERMAN M. & DUNBAR J. 1983. The social behaviour of free-ranging suburban dogs. Applied Animal Ethology, 10:5-17.

BORCHELT P.L., LOCKWOOD R., BECK A.M., & VOITH L.V. 1983. Attacks by Packs of Dogs Involving Predation on Human Beings. Public Health Reports, Vol. 98 (1).

BOWNS J. E. 1976. Field criteria for predator damage assessment. Utah Sci. 37:26-30.

CARUCCI A.& ZACCHIA C. 1999. Monitoraggio del randagismo canino e dei lupi in un'area del Parco dei Monti Lucretili. I quaderni faunistici del Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili, Regione Lazio, Roma.

CAUSEY K.M. & CUDE C.A. 1980. Feral dog and whitetailed deer interactions in Alabama. Journal of Wildlife Management, 44: 481-483.

CLUTTON-BROCK J. 1992. The process of domestication. Mammal Rev., 22: 79-85. COZZA K., FICO R., & BATTISTINI L. 1996a. Wildlife predation on domestic livestock in central Italy: a management perspective. J. of Wildlife Research, 1: 260-262.

COZZA K., FICO R., & BATTISTINI L. 1996b. The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. Biological Conservation, 78: 329-336.

DANIELS T. 1983. The social organisation of free-ranging urban dogs 1: non oestrous social behavior. Applied Animal Ethology 10: 341-346.

FICO et al. 2005. Accertamento dei casi di predazione sul bestiame domestico: metodi, validazione dei risultati e implicazioni gestionali. lupo o cane: chi è stato? – Vol. 115 Biologia e Conservazione della Fauna.

LATINI et al. 2005. Conflitto tra grandi carnivori e attività antropiche nel parco nazionale d'abruzzo, lazio e molise: entità, esperienze e prospettive di gestione – Vol. 115 Biologia e Conservazione della Fauna.

FICO R. 2004. Randagismo canino e conflitti con la zootecnia: vent'anni di occasioni mancate per la conservazione del lupo. In: Cecere, F. (Ed.), Il lupo e i Parchi, (Santa Sofia, 12-13 aprile 2002).

FICO R., KACZENSKY P., HUBER T., HUBER D., & FRKOVIC A. 1998. Chi è stato? Riconoscere e documentare gli animali da preda e le loro tracce. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo.

FICO R., MOROSETTI G. & GIOVANNINI A. 1993. The impact of predators on livestock in the Abruzzo region of Italy. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz., 12: 39-50.

FICO R. 1995. Studio e gestione di una popolazione canina. Rapporti di Sanità Pubblica Veterinaria, ISS/WHO/FAO-CC/IZSTe/95.25.

FRITTOLI M. 1997. Sulla perizia medico-legale. Sintesi di pensiero giuridico e competenze medico-biologiche. Il Progresso Veterinario, 21: 775-776.



- GANONG W.F. 1991. *Fisiologia Medica*. Piccin Nuova Libreria S.p.A., VIII Edizione Italiana, Padova.
- GENOVESI P. (A CURA DI) 2002. Piano Nazionale d'Azione per la Conservazione del Lupo (*Canis lupus*). Ministero Ambiente e Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Quad. Cons. Natura, 13.
- GENOVESI P. & DUPRÈ E. 2000. Strategia nazionale di conservazione del Lupo (*Canis lupus*): indagine sulla presenza e la gestione dei cani vaganti in Italia. *Biologia e Conservazione della Fauna*, 104:1–36.
- KLINGLER K. & BREITENMOSER U. 198. Die Identifizierung von Raubtierrissen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 125: 359-370.
- KRAMES L., MILGRAM N.W., & CHRISTIE D.P. 1973. Brief report: predatory aggression: differential suppression of killing and feeding. *Behav. Biology* 9: 641-647.
- MECH L. D. 1970. The wolf. Ecology and behavior of an endangered species. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- MECH L.D., 1975. Hunting behaviour in two similar species of social canids. In: Fox, M.W. (ED.), *The Wild Canids. Their Systematics, Behavioral, Ecology and Evolution*: 363-368. Behavioral Science Series, Von Nostrand Reinhold Company.
- MOLINARI P., BREITENMOSER U., MOLINARI-JOBIN A., & GIACOMETTI M. 2000. Predatori in azione – Manuale di identificazione delle predazioni e di altri segni di presenza dei grandi mammiferi carnivori. Wildvet Projects.
- OWENS J. 1984. I cani rinselvaticiti: un serio problema per le aree rurali. *Selezione Veterinaria* 25: 1387-1400.
- ROY L.D. & DORRANCE M.J. 1976. Methods of investigating predation on domestic livestock – A manual for investigating officers. Alberta Agriculture, Edmonton.
- SCHAEFER J.M., ANDREWS R.D., & DINSMORE J.J. 1981. An assessment of coyote and dog predation on sheep in Southern Iowa. *Journal of Wildlife Management*, 45: 883-893.
- SINGER C. 1998. More on dangerous dog breeds. *JAVMA*, Vol. 212(8).
- TAPSCOTT B. 1974. Something's been killing my sheep – but what? How to difference between coyote and dog predation. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- TRUMLER E. 1974. *Hunde ernstgenommen*. Piper R.e Co.ed., München, Zürich. UMBERGER S.H., GEYER L.L., & PARKHURST J.A. 1996. Addressing the consequences of predator damage to livestock and poultry. Virginia Cooperative Extension, Knowledge for the Common Wealth, 410-030.
- WAYNE R.K., LEHMANN N., ALLAR M.W., & HONEYCUTT R.L. 1992. Mitochondrial DNA Variability of the Gray Wolf: Genetic Consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation. *Conservation Biology* 6:559 - 569.
- ZIMEN E. 1971. *Wölfe und Königspudel – Vergleichende Verhaltensbeobachtungen*. Piper, München.
- LEONARDO GOMES; Cláudio J. Von Zuben Forensic entomology and main challenges in Brazil, Depto. Zoologia, Univ Estadual Paulista.
- PAOLO BISEGNA, 2005. RELATORE Prof. Giusto Giusti “La Stima Dell'ora Della Morte Mediante Il Metodo Termometrico” - Tesi di Laurea in Medicina Legale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Degli Studi di Roma, Tor Vergata.
- MARGHERITA GUERZONI, 2008. Relatore dott.sa Roberta Frison, “Criminalistica: analisi della scena del crimine (refertazione delle tracce, analisi di laboratorio e scienze forensi)” - TESI DI Specializzazione, Scuola di Specializzazione in Scienze Criminologiche, Istituto MEME srl Modena.
- ABIGAIL L. GREMILLION, 2005. “Insect Colonization of Child-Sized Remains and Delay of Post Mortem Interval: An Exploratory Study in The Behavioral Analysis of Pig Carcasses Via 24 Hour High Resolution Video Surveillance”, The Department of Geography and Anthropology, B.A., Louisiana State University.
- MARIA T. ALLAIRE, 2002. “Postmortem Interval (PMI) Determination at Three Biogeoclimatic Zones in Southwest Colorado”, The Department of Geography and Anthropology, B.A., Louisiana State University.



# **PROCOLOS**

## **RECOLHA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISE GENÉTICA**



**Março  
2014**

## **Precauções Básicas de Higiene e Segurança**

---

Os devidos cuidados de higiene e de segurança devem ser respeitados na colheita das amostras biológicas. É da responsabilidade do colectador assegurar-se que toma as devidas precauções. Alguns cuidados básicos são descritos a seguir:

- Usar sempre luvas quando se recolhem ou manuseiam as amostras.
- Não comer, beber, fumar ou tocar na cara quando se manuseia o material biológico e as amostras, e só depois de lavar ou desinfectar as mãos.
- Minimizar o risco de ferramentas afiadas manuseando-as com cuidado e colocando-as em contentores sólidos.
- Após a recolha, o material utilizado deve ser desinfectado e guardado correctamente.
- Os materiais descartáveis usados devem ser depositados nos locais apropriados. Caso contenham vestígios de sangue poderão ser enviados para o INIAV onde serão devidamente destruídos.

## **Risco de Contaminação das Amostras**

---

A contaminação de amostras de ADN é um problema sério quando se recolhem ou transportam amostras. É necessário evitar contaminação de outras amostras biológicas ou de qualquer superfície que entre em contacto com a amostra. As seguintes regras deverão ser seguidas:

- Manusear as amostras de forma cuidadosa e o menos possível.
- Armazenar sempre amostras individuais em contentores separados devidamente selados.
- Sempre que possível, usar materiais descartáveis para colheita de amostras.
- Assegurar que os materiais não descartáveis foram devidamente esterilizados antes de serem usados.

**Como as evidências de ADN se degradam rapidamente e são facilmente contaminadas, é importante recolher as amostras o mais rapidamente possível.**

**O sucesso da análise genética está dependente da qualidade da amostra, mas também da forma como a colheita é efectuada e como a amostra é conservada.**

**Estes Protocolos pretendem contribuir para diminuir a contaminação e reduzir a degradação do ADN, e assim aumentar o sucesso da análise.**



# **Colheita de amostras de saliva de feridas de animais atacados**

---

- **Utilizar sempre luvas para a colheita de amostras.**
- **Se o mesmo animal tiver várias feridas, utilizar uma zaragatoa por ferida.**
- **Se a ferida estiver seca, humedecer a zaragatoa (dando duas borrifadelas, uma de cada lado, para humedecer o algodão, mas sem encharcar) com água estéril e passar na ferida; deixar secar ao ar antes de guardar no tubo.**
- **Todas as amostras devem ser devidamente identificadas.**

## **PROCEDIMENTO**

1. Retirar a zaragatoa do tubo de recolha com cuidado para não tocar em nenhuma superfície.
2. Passar a ponta de algodão da zaragatoa, várias vezes, exercendo pressão suficiente e rodando alternadamente a zaragatoa. Ter especial cuidado para que a ponta de algodão da zaragatoa toque somente na ferida do animal do qual se está a recolher a amostra.
3. Reintroduzir a zaragatoa no tubo tentando não tocar nas paredes do tubo.
4. Identificar devidamente a amostra:
  - 1 – espécie atacada
  - 2 – local onde decorreu o ataque
  - 3 – data
  - 4 – zona do corpo de onde foi colhida a amostra
5. Colocar o tubo com a zaragatoa, devidamente identificado, numa mala térmica, com acumuladores de frio. Manter no frio (frigorífico - refrigerado, não congelado) até ao seu envio em recipiente refrigerado com acumuladores de frio.

6. Entregar as amostras aos técnicos do Grupo Lobo ou enviar directamente para o Grupo Lobo, sempre acompanhadas de acumuladores de frio.
7. As amostras deverão ser acompanhadas de uma Ficha de Registo, devidamente preenchida (ver Anexo).

## Colheita de amostras de dejectos

---

- **Utilizar sempre luvas para a colheita de amostras.**
- **Todas as amostras devem ser devidamente identificadas.**

### PROCEDIMENTO

1. Retirar a amostra do ambiente para um tubo estéril utilizando material limpo (luva, pinça, pá, etc.) e fechar o tubo.
2. Identificar devidamente a amostra:  
1 – local  
2 – data
3. Colocar de imediato o tubo, devidamente identificado, numa mala térmica, com acumuladores de frio.
4. Armazenar em frigorífico (não mais que 2-3 dias) ou congelador (até 1-2 semanas) até ao envio da amostra para o laboratório.
5. Entregar as amostras aos técnicos do Grupo Lobo ou enviar directamente para o Grupo Lobo, sempre acompanhadas de acumuladores de frio.
6. As amostras deverão ser acompanhadas de uma Ficha de Registo, devidamente preenchida (ver Anexo).

# Colheita de amostras de pelos

---

- **Utilizar luvas para a colheita de amostras.**
- **Todo o material auxiliar de recolha de amostras (pinça, etc.) deve ser limpo com bastante água e seco com papel absorvente entre duas recolhas para evitar contaminação.**
- **Todas as amostras devem ser devidamente identificadas.**

## PROCEDIMENTO

1. Retirar a amostra do ambiente para um papel de filtro dobrado ao meio (com o auxílio de pinça, etc.), colocar num envelope novo e fechá-lo sem colar.
2. Identificar devidamente a amostra:  
1 – local  
2 – data
3. Colocar a amostra à temperatura ambiente, em local seco.
4. Armazenar as amostras em local seco e entregar aos técnicos do Grupo Lobo ou enviar directamente para o Grupo Lobo.
5. As amostras deverão ser acompanhadas de uma Ficha de Registo, devidamente preenchida (ver Anexo).

## ACCERTAMENTO DEI CASI DI PREDAZIONE SUL BESTIAME DOMESTICO: METODI, VALIDAZIONE DEI RISULTATI E IMPLICAZIONI GESTIONALI. LUPO O CANE: CHI È STATO?

### *Livestock predation assessment: methods, validation and management outcome. Wolf or dog predation: who did it?*

ROSARIO FICO<sup>\*°</sup>, SIMONE ANGELUCCI<sup>\*\*</sup>, ILENIA PATUMI<sup>\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

<sup>\*\*</sup>Ente Parco Nazionale della Majella

<sup>\*\*\*</sup>Università degli Studi di Padova. Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

<sup>°</sup>Autore per la corrispondenza

#### Sommario:

- Riassunto/Summary
- Introduzione
- Il corretto approccio metodologico in un sopralluogo per l'accertamento di un caso di predazione
- Le basi biologiche e comportamentali del differenziamento tra attacco da parte di cani e di lupi
- Parte sperimentale: differenziamento dei casi di predazione causati da cane o da Lupo
  - Introduzione
  - Materiali e Metodi
  - Risultati
  - Discussione
- Conclusioni
- Bibliografia

#### Riassunto

L'analisi dei sistemi di accertamento dei danni al bestiame da predatori attualmente in vigore in Italia evidenzia come l'accertamento dei casi di predazione venga effettuato in maniera empirica e senza una specifica preparazione delle figure professionali incaricate.

Il fenomeno delle predazioni sul bestiame domestico sembra, pertanto, notevolmente sovrastimato a causa della scarsa qualità dei metodi di accertamento. Inoltre, anche le leggi di indennizzo attualmente in vigore sembrano rispondere più ad esigenze di carattere politico-sociale che gestionale. Si suggerisce pertanto l'adozione di procedure operative standard di accertamento dei casi di predazione, al fine di consentire la raccolta di dati omogenei sul fenomeno e individuare, pertanto, le scelte gestionali più efficaci per l'attenuazione del conflitto predatori – zootecnia.

Il problema della differenziazione fra attacchi al bestiame da cani e da lupi viene discusso sulla base delle caratteristiche biologiche e comportamentali dei due predatori. I risultati di una ricerca effettuata in parallelo nell'Isola d'Elba, dove gli unici predatori sono i cani, e in Abruzzo, dove

sono presenti lupi e cani, confermano la possibilità di discriminare, con elevata probabilità di successo, l'attacco al bestiame da cani o da lupi.

#### Summary

The analysis of verification procedures of livestock depredations currently employed in Italy underlines that they are carried out in an empirical manner and that personnel charged with verification are generally not trained to perform an accurate assessment. Therefore, the extent of livestock depredation in Italy caused by species of conservation value, such as wolf, and by free-roaming dogs may be highly overestimated. Also, damage compensation laws actually applied in many Italian Regions seem to account mostly for social demands of claimants than for management requirements. A practically-based approach should seek to achieve the re-organisation of predation assessment methods by revision of the claim validation procedure, tackling the practical aspect of predation management on the basis of reliable data.

The differentiation between dog and wolf attacks on livestock is also discussed on the basis of their biological and behavioural characteristics. The results of a research project carried out on the Island of Elba (Tuscany), where the only livestock predators are free-roaming dogs, and in the Abruzzo Region, where both wolves and dogs are present, confirm that it is possible to discriminate, with a good degree of accuracy, between dog and wolf aggression on livestock.

#### INTRODUZIONE

La predazione sul bestiame allevato allo stato brado ha costituito e costituisce ancora oggi uno dei principali problemi di conservazione dei grandi predatori quali il Lupo (*Canis lupus*) e l'Orso (*Ursus arctos*), sia in Italia che in Europa. Il quadro attuale sullo stato della conservazione del Lupo in Italia è sintetizzato nel Piano d'Azione Nazionale per la Conservazione del Lupo (*Canis lupus*) (Genovesi 2002), edito dal Ministero del-

l'Ambiente, che rappresenta la sintesi delle più aggiornate informazioni disponibili relative alla biologia, distribuzione, abbondanza e problemi di conservazione di questa specie. Nel Piano d'Azione, redatto con il contributo dei maggiori esperti del Lupo in Italia, vi sono elencati, tra i principali fattori di minaccia per questa specie, i conflitti con la zootecnia.

In Italia, a partire dagli anni settanta, grazie ad una maggiore sensibilità dell'opinione pubblica alle problematiche ambientali, alla tutela legale delle specie selvatiche ed all'istituzione di aree protette, la gestione delle predazioni sul bestiame domestico attraverso la persecuzione diretta dei predatori è diventata illegale. Nonostante ciò, l'uccisione di Lupi per mezzo di bocconi avvelenati, lacci ed armi da fuoco avviene tutt'oggi e ha origine nell'insufficiente gestione dei conflitti economici e sociali generati dalla coesistenza, sullo stesso territorio di popolazioni di predatori e bestiame allevato allo stato brado.

Da quando il Lupo e gli altri predatori non sono stati più oggetto di abbattimenti legali, la principale misura messa in atto per attenuare il problema delle perdite di bestiame da predazione è consistita, e consiste tutt'oggi, nel risarcimento dei danni arrecati da questa specie (Lupo) e da altre specie protette (ad esempio Orso, Aquila Reale), o tutelate comunque dallo Stato (i cani). Tutte le regioni italiane interessate dal fenomeno hanno provveduto con una propria normativa, che può prevedere, oltre che all'istituzione di fondi per il risarcimento dei danni, anche l'erogazione di contributi per l'adozione di misure di prevenzione degli attacchi (recinti, utilizzo di cani da guardia) (ad esempio, Regione Toscana; *cfr.* Banti *et al.* *questo volume*).

Negli ultimi decenni si è aggiunto, a quelli selvatici, un nuovo predatore: il cane vagante.

L'incremento della presenza dei cani vaganti, per lo più con padrone (Fico 1995), ha determinato un forte inasprimento del conflitto tra allevatori e il Lupo, soprattutto per il fatto che il personale accertatore non è tecnicamente preparato ad effettuare la perizia. Inoltre, al fine di attenuare il conflitto con gli allevatori attraverso l'erogazione di fondi altrimenti non disponibili, vengono attribuiti al Lupo gran parte delle perdite di bestiame brado, anche nei casi in cui o non esiste tale evidenza o le condizioni della carcassa non permettono addirittura di risalire alla causa di morte (Alotto 2003). Il quadro viene ulteriormente complicato da altri fattori: in alcuni casi le leggi concedono l'indennizzo con modalità diverse e in diversa percentuale a seconda che il danno sia stato attribuito a cane o a Lupo (Regione Abruzzo, Aree Protette) o, in altri casi, l'ente competente per il territorio in cui è avvenuto il danno non è autorizzato a liquidare i danni da cani ma solo quelli da fauna selvatica (Parchi Nazionali), costringendo l'allevatore danneggiato far intervenire in successione più figure professionali a seconda del predatore ipotizzato come causa del danno (Guardie Forestali nel caso si sospetti che l'aggressione sia stata effettuata da

un animale selvatico, o veterinario A.S.L. nel caso si ipotizzi che siano stati i cani). Alcune leggi, per ovviare a questi problemi, non richiedono il differenzamento fra cani e Lupo per erogare l'indennizzo (ad esempio, Regione Toscana; Banti *et al.* *questo volume*), ma anche questo approccio non è privo di conseguenze negative. Infatti, sia a causa della costante espansione del Lupo, che sta ricolonizzando aree da cui era scomparso da secoli, che per il permanere del fenomeno del vagabondaggio canino, soprattutto nelle regioni Centro Meridionali, i casi di predazione sul bestiame domestico sono in costante aumento e pertanto l'entità degli indennizzi sta divenendo, per molte amministrazioni, economicamente insostenibile.

In Italia, a tutt'oggi, non esiste un quadro giuridico omogeneo relativo al problema predazione. Ogni regione ha legiferato in maniera diversa sull'argomento, in alcuni casi con un approccio palesemente volto ad elargire contributi a pioggia agli allevatori sottoforma di indennizzi per danni al bestiame da aggressioni da Lupo. Ad esempio, la Regione Lazio (L.R. 48/82, poi modificata dalla L.R. 17/95) rende possibile l'indennizzo del danno in base ai risultati di un sopralluogo effettuato entro 45 giorni dal ritrovamento del bestiame morto, e la Regione Basilicata (L.R. 23/2000) eroga automaticamente all'allevatore l'indennizzo per danni da Lupo, se il veterinario incaricato non effettua l'accertamento entro 48 ore dalla denuncia del danno. A questi singolari approcci "gestionali" del problema predazione va aggiunto che, le figure professionali individuate dalle singole leggi regionali come responsabili dell'accertamento, sono le più svariate. La Regione Campania (L.R. 8/96) individua come responsabili dell'accertamento carabinieri, vigili urbani, veterinari e varie altre professionalità; comunque, per nessuna di queste, è prevista una specifica formazione. La conseguenza facilmente intuibile di questa situazione è che al momento, in Italia, è impossibile non solo quantificare la reale entità dei danni al bestiame da predatori, ma anche utilizzare i dati sinora disponibili per poter individuare scelte gestionali basate sulla reale conoscenza del fenomeno.

L'accertamento di un caso di predazione sul bestiame domestico è, di fatto, una perizia medico-legale. Oltre a rispondere, per le finalità stesse dell'accertamento, ai requisiti di legge previsti per le perizie medico legali (Frittoli 1997) esistono comunque dei rischi sanitari (possibilità di contrarre infezioni zoonosiche: brucellosi, carbonchio ematico, tubercolosi e svariate altre) connessi all'esame della carcassa (scuoimento, manipolazione di organi o visceri) che solo un veterinario può prevenire o ridurre. Per tale motivo la figura professionale più indicata ad effettuare l'accertamento dei casi di predazione è un medico veterinario preparato, attraverso appositi incontri formativi, a riconoscere il quadro anatomo-patologico caratteristico di un episodio di predazione. Infatti, sebbene i predatori possano essere responsabili di uccisioni e ferimenti di animali domestici e selvatici, anche malattie, parassitosi, traumi, avvelenamen-

ti e cause accidentali (folgorazione) possono determinare la morte o il ferimento degli animali per i quali si è chiamati in prima istanza a certificare un caso di predazione. Questa premessa implica che la richiesta da parte dell'allevatore di identificare il predatore causa di una uccisione di bestiame domestico al fine di ottenere un indennizzo si traduca di fatto in un accertamento della causa di morte, attività di peculiare carattere sanitario; basti riflettere sul fatto che il rapporto finale sul supposto caso di predazione è, in effetti, la certificazione della causa di morte di un animale. Come tale può essere eseguita e certificata solo da un medico veterinario abilitato all'esercizio della professione.

Anche la definizione giuridica di perizia medico-legale si adatta perfettamente all'attività di accertamento di un caso di predazione sul bestiame domestico. In Medicina Legale la perizia (Frittoli 1997) è "...l'esame da parte di un esperto debitamente qualificato diretto al conseguimento ed alla convalida di una valutazione e di una constatazione specifica". Con il termine di *perizia medico-legale* s'intende, quindi, *una risposta logica, motivata ed obiettiva a specifici quesiti tecnico - scientifici, riguardanti le discipline mediche o veterinarie che presentano aspetti giuridici o legislativi*. E tale è, di fatto, l'accertamento di un caso di predazione sul bestiame domestico. Le qualità inerenti il perito devono essere: l'idoneità tecnica (e quindi la documentata formazione ad effettuare l'attività richiesta), la capacità giuridica di testimoniare e la capacità morale che garantisce l'attendibilità delle risposte (imparzialità). La certificazione finale o perizia o relazione peritale, deve quindi essere caratterizzata da:

- ricapitolazione dei fatti e delle risultanze del sopralluogo;
- coordinamento dei risultati ottenuti;
- considerazioni diagnostiche-differenziali;
- considerazioni conclusive in relazione al quesito richiesto;
- conclusioni sintetiche.

Di fondamentale importanza è che la relazione conclusiva sia dettagliata, documentata, ma, soprattutto, eviti dubbi interpretativi (Frittoli 1997). Pertanto, al fine di soddisfare la condizione dell'idoneità tecnica, il veterinario deve essere, in ogni caso preparato a:

1. Distinguere, in caso di presenza di ferite riferibili a morsi o a graffi, se le lesioni riscontrate sulla carcassa sono state inferte sulla preda quando questa era in vita o dopo la morte (predazione *versus* necrofagia).
2. Stabilire le condizioni generali di salute dell'animale predato (predazione *versus* pseudopredazione, ossia uccisione di capi già in difficoltà per cause sanitarie, ad esempio clostridiosi).
3. Esclusa la predazione, individuare o sospettare altre possibili cause di morte (clostridiosi, meteorismo acuto, eventi traumatici non correlabili alla predazione, avvelenamento, intossicazione alimentare, folgorazioni, frodi), comprese eventuali patologie trasmissibili all'uomo o agli

animali (Brucellosi, Carbonchio ematico, ecc.) per le quali richiedere eventualmente ulteriori esami di laboratorio.

Purtroppo tutte le leggi regionali sull'argomento non prevedono una formazione professionale *ad hoc* del personale addetto ad effettuare i sopralluoghi in caso di sospetta predazione. Le conseguenze di questa insufficiente preparazione tecnica esitano spesso in errate attribuzioni di morte di bestiame domestico per predazione, oppure nell'attribuzione del danno al predatore sbagliato. E' stato dimostrato che le conclusioni a cui arriva un veterinario preparato ad effettuare l'accertamento, e quindi dotato della competenza tecnica richiesta dalla perizia medico legale, rispetto a quelle del personale genericamente incaricato dalla legge ad effettuare il sopralluogo risultano estremamente diverse. Per esempio, di 57 animali la cui morte era stata attribuita ad attacco da Lupo dal personale forestale incaricato dell'accertamento, solo 6 sono stati confermati come tali da un veterinario debitamente formato (Alotto 2003). Si comprende come risultati così discordanti sugli stessi casi esaminati e fortemente condizionati dalla figura professionale incaricata dell'accertamento possano avere forti ripercussioni sia sulla quantità di indennizzi erogati (spesso non dovuti), sia sulle scelte gestionali individuabili in base ai dati disponibili sui casi di predazione. La corretta classificazione delle cause di morte del bestiame, nonché l'identificazione attendibile del predatore coinvolto nell'attacco, è l'unica possibilità per individuare le scelte gestionali più adeguate all'attenuazione del conflitto predatori-zootecnia.

#### **IL CORRETTO APPROCCIO METODOLOGICO IN UN SOPRALLUOGO PER L'ACCERTAMENTO DI UN CASO DI PREDAZIONE**

La premessa fondamentale per effettuare un corretto accertamento di un caso di predazione è il tempestivo sopralluogo dopo l'attacco, da effettuarsi al massimo entro 24-36 ore dall'accaduto. In questo modo si può operare senza che il consumo della carcassa da parte di animali necrofagi presenti nell'area (Volpi, Cani, Lupi, ma anche Cinghiali etc.) determini l'asportazione delle parti interessate dai segni dell'aggressione o confonda i segni lasciati dal predatore durante l'attacco. E' buona norma, quindi, che gli allevatori che abbiano subito un danno da predazione mettano in atto tutte le misure necessarie a conservare i resti dell'animale morto fino all'intervento degli accertatori. Il semplice ritrovamento di resti di scheletro o di parte della pelle dell'animale ritenuto predato non consente quasi mai di stabilire la vera causa di morte dell'animale. Una volta giunti sul luogo del ritrovamento della carcassa, è necessario procedere a:

1. *Localizzare il sito di attacco e di uccisione della preda.* Per questo motivo sarebbe bene che l'allevatore evitasse di spostare le carcasse dal luogo in cui sono state trovate.
2. *Prendere nota della posizione della carcassa.* Va considerato che i fenomeni di ipostasi ca-



daverica possono simulare versamenti emorragici di natura traumatica nel sottocute.

3. *Osservare se esistono segni di lotta.* Per esempio sangue sul terreno, vegetazione schiacciata, ciuffi di pelo sparsi attorno: tutti i segni che indicano una lotta tra il predatore e la preda, o che dimostrano tentativi di opporre resistenza all'aggressione da parte della preda stessa e possono indicare un episodio di predazione.
4. *Osservare se esistono segni di presenza del predatore,* quali orme, escrementi, peli. Nel caso in cui si individuino questi segni, bisogna essere cauti nel trarre conclusioni affrettate. Infatti, i segni di presenza indicano solamente che il predatore è stato lì, ma non si può dire, a priori, che esso sia anche il responsabile della predazione. Frequentemente la modalità di consumo della carcassa viene considerata come una prova che il predatore che se è nutrito sia stato anche quello che ne ha causato l'uccisione. Questo approccio può generare grossolani errori di valutazione. Infatti ciò può essere vero solo per la lince e non nel 100% dei casi (P. Molinari *com. pers.*). Per tutti gli altri (Cane, Lupo, Volpe, Orso, etc.) può dare indicazioni solo su chi si è nutrito della carcassa. Gli unici segni di cui si deve tener conto sono quelli delle ferite mortali o non, subite dalla preda durante l'inseguimento, la lotta e l'uccisione da parte del predatore.
5. *Esaminare la carcassa alla ricerca di ferite.* Dato che ciascun predatore ha una modalità di uccisione diversa della preda, spesso la localizzazione e la tipologia delle lesioni sulla carcassa possono essere caratteristiche ed aiutare ad identificare univocamente il predatore protagonista dell'attacco. Inoltre, dove possibile, bisogna *rilevare la distanza tra i canini* (che consente di distinguere facilmente tra morsi di volpe, mustelidi o altri carnivori di maggiore mole).
6. *Scuoicare la carcassa,* testa inclusa (per evidenziare la presenza di versamenti emorragici sottocutanei dovuti ai traumi o alle ferite subiti durante l'aggressione).
7. *Aprire il torace e l'addome* alla ricerca di patologie in atto che potrebbero aver favorito il successo dell'attacco o essere la reale causa di morte del bestiame.
8. *Prendere nota dell'età e del sesso dell'animale.* Fattore importante da considerare in quanto spesso i giovani, in particolari condizioni, sono più facilmente predabili che non gli adulti oppure più facilmente soggetti a patologie (polmoniti, onfaliti, miodistrofie carenziali) che possono favorire la predazione; ciò è particolarmente vero per i puledri ed i vitelli.
9. *Controllare la carcassa per una valutazione dello stato di salute generale dell'animale.* È importante per differenziare una predazione da una causa di morte per malattia.
10. *Osservare le condizioni del pascolo.* Va ricordato che possono verificarsi casi di mortalità del bestiame legati dovuti all'ingestione di piante

tossiche, soprattutto quando vi sono condizioni di sovrappascolamento.

11. *Verificare se vi sono anomalie nel resto della mandria* al fine di scoprire eventuali sintomi di patologie infettive in atto.
12. *Verificare se vi sono potenziali fonti di intossicazione,* per esempio: confezioni di insetticidi aperti, batterie abbandonate, contenitori di oli di macchinari agricoli, ecc..
13. *Determinare o ipotizzare la causa della morte:*
  - *Predazione:* il predatore ha ucciso un capo di bestiame sano.
  - *Pseudopredazione:* il predatore ha ucciso un capo di bestiame il cui precario stato di salute ha facilitato il successo dell'attacco o che sarebbe morto comunque come conseguenza delle patologie in atto.
  - *Altre cause di morte:* traumi accidentali, eventi meteorici: folgorazioni; malattie
14. In caso di predazione, *determinare il predatore causa dell'attacco.*

La sequenza di azioni descritta può essere codificata in una procedura standard di accertamento (Fico 2004) che consente di raccogliere le evidenze oggettive del caso di predazione in esame in modo da evitare conclusioni influenzate da fattori soggettivi legati all'accertatore: pregiudizi o condizionamenti esterni di natura ambientale o psicologica.

In merito ai condizionamenti che il personale responsabile dell'accertamento può subire si può sinteticamente dire che chi effettua un accertamento può essere influenzato, nel trarre le conclusioni, da vari fattori che sono riconducibili alla situazione di "stress decisionale" in cui viene a trovarsi e la cui gestione è fondamentale per eseguire un accertamento realmente oggettivo. Ad esempio, condizioni climatiche avverse durante il sopralluogo o la percezione di uno stato di palese difficoltà dell'allevatore in seguito a continue perdite di bestiame dovute a cause diverse dalla predazione possano indurre l'accertatore a decidere a favore dell'allevatore pur di attenuare o eliminare la situazione di stress in cui si trova. La gestione di tale problematica richiede una specifica trattazione in altra sede.

Pertanto solo con un appropriato approccio metodologico si potrà identificare con elevata probabilità il predatore responsabile dell'uccisione. La diagnosi di predazione deve essere sempre inserita all'interno del contesto ambientale in cui ci si trova. Pertanto è di fondamentale importanza essere a conoscenza sia dei predatori presenti in zona, che delle tecniche di gestione dell'azienda colpita.

L'errata attribuzione a predatori di perdite di bestiame dovute in realtà ad altre cause, o l'errata attribuzione del danno ad un predatore piuttosto che ad un altro, non comporta solo lo spreco di risorse finanziarie pubbliche, ma anche conseguenze negative legate all'individuazione di scelte gestionali sbagliate: proposte di abbattimento dei predatori ritenuti causa dei danni, oppure attivazione di misure di prevenzione laddove invece la causa di mortalità è legata ad una cattiva gestione sanitaria dell'azienda.

Uno dei problemi più sentiti nell'accertamento dei casi di predazione sul bestiame è il differenziamento tra attacchi da lupi e attacchi da cani. Come già illustrato (vedi Introduzione), il quadro legislativo nazionale in materia configura varie situazioni in merito a questo problema, con alcune regioni che non richiedono la differenziazione cane-Lupo per indennizzare il danno da predazione (ad esempio Toscana, Marche, ecc.), ed altre che indennizzano con fondi distinti i danni da cane o da Lupo, identificando addirittura figure professionali diverse a seconda del predatore ipotizzato come causa dell'aggressione (Regione Abruzzo). Tuttavia questo approccio poco selettivo e a volte farraginoso, non favorisce, nella fase di sopralluogo, la raccolta di dati che potrebbero essere utilizzati per gestire il problema a lungo termine.

I casi di predazione in aree precedentemente poco o affatto interessate dal fenomeno, amplificati dal sensazionalismo giornalistico e convalidati poco correttamente dal personale incaricato, possono indurre o rafforzare un atteggiamento ostile dell'opinione pubblica nei confronti della presenza dei predatori, anche se protetti, e spingere amministratori e politici a promuovere iniziative gestionali non basate sulla reale entità del fenomeno.

Un fattore che acuisce notevolmente il conflitto tra la zootecnia ed il Lupo è la presenza di cani vaganti sul territorio. In assenza di criteri differenziali codificati di valutazione delle modalità di attacco tra cane e Lupo, è possibile che predazioni al bestiame domestico da parte di cani siano erroneamente attribuite al Lupo alimentando il braccaggio su questa specie.

#### **LE BASI BIOLOGICHE E COMPORTAMENTALI DEL DIFFERENZIAMENTO TRA ATTACCO DA PARTE DI CANI E DI LUPI**

Il "comportamento predatorio" viene definito come "un'interazione interspecifica che include una sequenza di azioni per mezzo delle quali una preda viene uccisa e mangiata" (Krames *et al.* 1973).

Il Cane Domestico (*Canis familiaris*) è un carnivoro filogeneticamente molto vicino al Lupo, specie da cui è derivato recentemente (Wayne *et al.* 1989, citato in Evans 1993; Wayne *et al.* 1992). Si può senza dubbio asserire che il cane sia la specie che da più tempo si è coevoluta a stretto contatto con l'uomo. Una volta avvenuto l'addomesticamento, l'uomo ha tentato di selezionare il cane affinché risultasse utile ai suoi diversi scopi: la caccia, la guardia, ecc.. Così, da centinaia di anni si sono venute a creare varie razze di cani, con morfologia, attitudine e carattere dissimili tra loro, ciascuna delle quali esaltante maggiormente una o più caratteristiche volute dall'uomo. Si è giunti quindi alla situazione attuale, che conta la presenza di oltre 400 diverse razze canine, che non sono altro che il risultato di una scelta artificiale operata arbitrariamente dall'uomo (Clutton-Brock 1992).

A differenza di quanto accade in un branco di lupi, dove i cuccioli perfezionano le tecniche di caccia osservando la madre e gli altri membri del branco

durante le fasi di inseguimento, attacco e uccisione della preda, nel cane questa componente viene a mancare. Infatti, i cani, spesso vengono allontanati da cuccioli dalla madre e adottati dall'uomo molto precocemente. Ciò comporta la privazione, durante l'ontogenesi, di quel periodo che il cucciolo dovrebbe trascorrere con la madre ed i fratelli, fondamentale per lo sviluppo di un comportamento predatorio efficace. Al cane vengono quindi a mancare le esperienze necessarie per l'apprendimento delle tecniche di caccia, del comportamento predatorio e della capacità di riconoscere una preda cacciabile da una non cacciabile (Zimen 1971). Questo è il motivo che spiega come, per il cane, la caccia e la predazione assumano solamente un ruolo occasionale e secondario per la sopravvivenza (Anonimo 1980; Barman & Dumbbar 1983; Daniels 1983).

Esistono diversi studi che confermano che i cani, nel caso in cui non vengano nutriti direttamente dall'uomo, tendano a cibarsi esclusivamente di rifiuti o di cibo comunque originati dall'uomo (Anonimo 1980; Barman & Dumbbar 1983; Daniels 1983; Beck 1974, Fico 1995). Dato che la caccia non è indispensabile per sopperire al suo fabbisogno nutritivo, si suppone che non sia la necessità di soddisfare la propria fame che spinge il cane a predare. E' questo il motivo per cui, in questa specie, viene a mancare la selezione naturale che favorisce quegli individui in grado di compiere efficacemente una predazione.

In uno studio condotto in Gran Bretagna si è osservato che gli inseguimenti di cani su cervi, anche se non si concludono con l'uccisione diretta degli inseguiti, possono provocare notevoli spostamenti, alterazioni comportamentali, rischio di ferimenti e alterazioni fisiopatologiche che portano gli animali inseguiti a morte per stress (Bateson & Bradshaw 1997, citato in Genovesi & Duprè 2000).

O'Farrel (1991) ritiene che nell'atto predatorio dei cani, in particolare nell'inseguimento della preda che fugge, vi sia una notevole componente auto-gratificante; quindi il comportamento si manifesta indipendentemente dalla fame o dalla possibilità di consumare la preda.

Si ritiene che lo stimolo chiave che innesca il comportamento predatorio nel cane sia dato dalla visione della preda (oggetto, animale o persona) in fuga o in movimento. Capita spesso che il cane cominci istintivamente ad inseguire una "preda" senza che abbia la finalità di abbatterla (automobili, ungulati selvatici, domestici, il postino in bicicletta), in quanto esso non è in grado di distinguere una preda cacciabile o meno e, soprattutto, non la insegue con la finalità di ucciderla e nutrirsi. Probabilmente questa è una delle ragioni per cui le cacce dei cani domestici sugli ungulati selvatici si rivelano spesso infruttuose (Causey & Cude 1980; Beck 1974; Anonimo 1980). L'inseguimento delle prede può prolungarsi anche delle ore, causando un notevole stress anche in quegli individui non direttamente inseguiti. Questi animali si presenteranno esausti, spaventati, all'erta, traumatizzati



fisicamente, con scolo schiumoso dalle narici o dalla bocca (sintomo di edema polmonare).

Un importante fattore che condiziona l'effettiva riuscita del tentativo di predazione (e cioè l'abbattimento della preda) è l'esperienza del predatore che, come spiegato prima, spesso manca ai cani (Trumler 1974).

I cani quindi, privi di esperienza e di insegnamenti materni, generalmente hanno grosse difficoltà ad atterrare ed uccidere efficacemente la preda. Per questo motivo i cani tentano di bloccare la preda mordendola a caso in più parti del corpo (soprattutto quelle che offrono facili "appigli": coda, orecchie, mammella, piega della grassella), balzando addosso in modo non coordinato (Klingler & Breitenmoser 1983) e lasciando sul mantello evidenti segni di unghiate (dato che le unghie del cane sono ottuse non provocano sanguinamento esterno) (Molinari *et al* 2000). Per questo motivo il più delle volte la preda non viene uccisa, ma viene ferita più o meno superficialmente in diverse parti del corpo nelle zone che il cane ha tentato di afferrare per abbatterla. Le lesioni, spesso mai gravi e comunque difficilmente in grado di provocare *di per sé* la morte della preda, sono localizzate soprattutto a livello di:

- coda, orecchie, mammella (capezzoli): in queste zone si possono riscontrare lacerazioni, lesioni da strappamento, mutilazioni;
- faccia: a questo livello si possono riscontrare anche lesioni da graffio, soprattutto in prede di grosse dimensioni;
- groppa;
- torace;
- fianchi;
- porzione ventrale e laterale della parete addominale;
- gola;
- inguine;
- arti posteriori ed anteriori.

A differenza del Lupo, che morde la preda in aree vitali, in particolare una, come si vedrà in seguito, con la forza e con l'intento di ucciderla, il cane manifesta oltre ad una casualità di morsi, una "gradualità del morso" (inibizione del morso), che determina sulla preda numerose ferite spesso non mortali. Inoltre mentre il Lupo quando morde è in grado di sviluppare sulle cuspidi dei denti una pressione di oltre 106,2 kg/cm<sup>2</sup>, tale da tranciare di netto il femore di un bovino, (Lopez 1978), il cane infligge morsi molto più lievi (circa 53 kg/cm<sup>2</sup>, in un pastore tedesco; *cfr.* Flauto E.R., in: [www.wolfcountry.org](http://www.wolfcountry.org)), superficiali, non in grado, generalmente, di provocare danni gravi anche se localizzati in aree vitali del corpo della preda.

Data la ridotta potenza il morso del cane non sono in grado, generalmente, di offrire una buona presa sul corpo della preda; quando questa si divincola, il cane, per tentare di afferrarla meglio, la morde più volte, provocando le lesioni multiple. Spesso, nel caso in cui il cane stia predando delle pecore, nel tentativo di morderle, afferra il vello, che si

strappa, disseminando così brandelli di pelo lungo tutto il percorso dell'inseguimento. Il vello diffuso sul luogo dell'attacco manca, generalmente, negli attacchi da Lupo (R. Fico dati non pubbl.). Inoltre, i morsi dei cani possono essere così inefficaci, da non riuscire nemmeno a lacerare la superficie cutanea della preda, provocando contusioni evidenziali solo con lo scuoiamento sottoforma di pandimenti emorragici e soffusioni a livello sottocutaneo.

Le prede aggredite dai cani potranno venire a morte in seguito, o per lo shock, o per l'infezione delle lesioni riportate (Schaefer *et al.* 1981), ma solo raramente morirà a causa diretta delle lesioni.

Bisogna comunque tener presente che esistono anche dei cani che possono essere particolarmente portati ad effettuare un attacco efficace, ad un esempio quelli appartenenti a razze di tipo nordico-primitivo (Siberian Husky, Alaskan Malamute, Samoiedo), i quali, geneticamente molto vicini al Lupo, possono presentare un comportamento predatorio simile a quello del predatore ancestrale.

Ci sono diversi studi che documentano la possibilità che, in presenza di più prede, i cani possano arrivare a ferire, senza uccidere, molti animali (Owens 1984; Klingler & Breitenmoser 1983).

In America, dove spesso la diagnosi differenziale nei casi di predazione riguarda cane e coyote, molti Autori (Bowns 1976; Roy & Dorrance 1976; Schaefer *et al.* 1981; Umberger *et al.* 1996; Tapscott 1997; AA.VV., 1998 a,b,c) attribuiscono la predazione ai cani quando sono presenti queste caratteristiche:

- presenza di un numero elevato di pecore ferite;
- mutilazioni indiscriminate, ma non fatali a livello della testa, collo, fianchi, costato, spalle, quarti posteriori ed anteriori, mammella, orecchie e capezzoli strappati;
- le prede uccise non vengono consumate e raramente il predatore torna a cibarsi sulla carcassa della preda uccisa;
- l'attacco può avvenire in qualsiasi momento del giorno (in quanto il cane non teme l'uomo);
- dato che il cane è un cacciatore inesperto l'attacco dura per un periodo prolungato, si attua su di un terreno molto esteso (le eventuali carcasse o gli animali feriti sono sparsi su di un'area diffusa; sono presenti brandelli di vello sparpagliati attorno al sito dell'attacco), gli animali sono attaccati indipendentemente dalla loro età (il cane non è un cacciatore selettivo);
- perdite indirette del bestiame in seguito agli attacchi: ferite infette, stress, aborto, calo di incremento ponderale, calo della produzione di latte, esaurimento, soffocamento.

Questi Autori concordano nel sostenere che il cane è un predatore inefficiente e che le caratteristiche della predazione sono tipiche. Una carcassa di un animale predato da un cane presenterà quindi:

- lesioni riferibili a morsi e a graffi disposte disordinatamente su tutto il corpo (orecchie, faccia, gola, spalle, torace, fianchi, mammelle, arti anteriori e posteriori);

- morsi di diversa profondità e gravità;
- nel caso in cui la predazione sia effettuata contemporaneamente da cani di taglia diversa<sup>1</sup>, sul corpo dell'animale si trovano morsi di varia grandezza;
- il rinvenimento di sierosità schiumosa emorragica nella trachea può essere indicativo di un lungo inseguimento con conseguente edema polmonare causato da insufficienza cardio-respiratoria.

Il Lupo, al contrario, è un predatore specializzato. Gli animali domestici, anche se sani, sono delle prede relativamente "facili" per il Lupo (Boitani & Soccodato 1979). Ciò accade sia perché il bestiame, "grazie" al processo di addomesticamento, ha perso gran parte del comportamento antipredatorio, sia perché le tecniche di allevamento, rendono gli animali facilmente soggetti alle predazioni; come ad esempio i cavalli impastoiati lasciati di notte al pascolo. Queste pratiche di allevamento possono facilitare la predazione. Gli animali domestici vengono attaccati di notte o al crepuscolo nel caso di bovini ed equini lasciati incustoditi, mentre le pecore sono attaccate anche di giorno (Cozza *et al.* 1996a), soprattutto in condizioni meteorologiche avverse.

Il Lupo sceglie accuratamente la sua preda e la attacca in modo silenzioso e mirato. Se la preda prescelta è di piccola mole, come una pecora, l'attacco viene portato nella parte anteriore del corpo (muso, collo, gola) ed, al massimo, questa viene trattenuta per i quarti posteriori prima che venga inferto il morso letale alla gola (Ewer 1973; Mech 1975).

In particolare, alcuni autori ritengono che il morso alla gola sia l'unica lesione letale evidenziabile in animali predati di taglia medio-piccola (Fico *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 2000). A questo proposito si ricordi come il ritorno del Lupo nella Murgia (Puglia) sia stato rivelato da una predazione su alcune pecore che presentavano, come unica lesione letale, l'impronta di un unico morso inferto nella regione laringo-tracheale (R. Fico *com. pers.*), nel terzo anteriore del collo. Anche Ragni (1990) riferisce di un episodio di predazione su 3 pecore tutte uccise nello stesso modo: un unico morso alla gola (Carucci & Zacchia 1999).

Raramente il Lupo attacca le prede di taglia medio-piccola (ovini, caprini) ai quarti posteriori; questo sito di attacco è tipico delle predazioni di animali di maggiore mole, quali bovini e cavalli, vitelli e puledri. Durante l'inseguimento questi vengono azzannati più volte ai fianchi o alle cosce, con emorragie sottocutanee molto abbondanti. In questo caso le lesioni inferte sono molto gravi e consistono nell'asportazione completa di gruppi musco-

lari, soprattutto a carico degli arti posteriori (Fico *et al.*, 1998; Molinari *et al.*, 2000). Una volta bloccata, la preda viene spesso soffocata da morsi al muso. Può accadere che la preda sfugga all'attacco e resti in vita, ma comunque l'animale è destinato a morire, in quanto fortemente mutilato (Fico *et al.*, 1998). Questo comportamento predatorio è perfettamente noto agli allevatori delle aree in cui il Lupo non è mai scomparso ed essi sono perfettamente in grado di distinguere l'attacco da parte di cani o di lupi ma chiaramente, per la differente rapidità od entità dei rimborsi, a seconda della legge in vigore, tendono a "forzare" la decisione del personale accertatore verso la conclusione che si sia trattato di lupi.

## **PARTE SPERIMENTALE: DIFFERENZIAMENTO DEI CASI DI PREDAZIONE CAUSATI DA CANI O DA LUPO**

### **Introduzione**

Sinora in Italia non era mai stato effettuato uno studio caso-controllo sul problema del differenziamento tra attacchi da parte di cani o di lupi. Pertanto, al fine di stabilirne i parametri differenziali, si sono analizzate le caratteristiche degli attacchi al bestiame sicuramente causati da cani e da lupi in due diverse aree di studio.

Come *area di riferimento* o *area di controllo negativo* è stata scelta l'Isola d'Elba, territorio in cui, non essendo presenti lupi, gli unici predatori potenzialmente in grado di uccidere il bestiame sono i cani. La regione Abruzzo è stata scelta come area di studio, in quanto sono presenti sia cani vaganti che lupi, entrambi responsabili di attacchi al bestiame.

### **Materiali e metodi**

È stata condotta un'indagine retrospettiva riguardante i casi di predazione sul bestiame domestico da parte di cani, verificatisi nell'Isola d'Elba negli anni compresi tra il 1999 ed il 2002. I dati sono stati ottenuti esaminando i verbali di accertamento dei danni al bestiame provocati da cani conservati nell'archivio dell'ASL Portoferraio, Località San Rocco, Isola d'Elba (LI). Non è stato possibile analizzare i dati relativi agli anni precedenti al 1999 in quanto andati distrutti durante un'alluvione.

Il numero di cani presenti nell'isola, iscritti all'anagrafe canina, è di circa 1.760 individui. Molti cani di proprietà hanno la possibilità di vagare incontrollati per l'isola. La popolazione totale di ovini e caprini è pari a circa 1.000 capi, distribuiti in 42 allevamenti. La maggior parte di questi è a gestione "familiare" (con 3-4 capi ciascuno), mentre sono presenti solo due allevamenti di dimensioni

(1) A questo proposito è opportuno ricordare che, soprattutto in ambiente rurale, più cani possono riunirsi temporaneamente a formare un gruppo attorno ad una femmina in estro, oppure perché hanno fonti di cibo comuni. Questi gruppi non raggiungono mai la stessa organizzazione sociale di un branco di lupi, anche se è possibile che un cane un pò più esperto nella caccia svolga il ruolo di "Lupo adulto" ed insegni qualche strategia agli altri cani. Ad ogni modo, gli animali, in gruppo, possono arrivare ad attaccare prede che, da soli, non avrebbero predato (Borchelt *et al.*, 1983).

maggiori, con circa 130 capi ciascuno (Dr. Arus, *com. pers.*).

Dato che gli unici predatori presenti nell'Isola d'Elba sono i cani, non rendendosi necessaria una diagnosi differenziale con il Lupo ai fini del risarcimento, i verbali non presentano descrizioni particolareggiate delle condizioni ambientali in cui è avvenuto l'attacco, né delle caratteristiche anatomo-patologiche delle lesioni riscontrate sul corpo degli animali aggrediti, ma solo la causa di morte e la localizzazione delle ferite da morso.

I dati raccolti nell'ambito della Regione Abruzzo sono invece consistiti nell'analisi di alcuni casi di predazione di cui sono stati responsabili cani o lupi per l'osservazione diretta dei predatori mentre effettuavano l'attacco o mentre si allontanavano dopo l'attacco.

I dati relativi alla distribuzione delle lesioni sulle prede per ciascuna area di studio sono state classificate secondo una stessa griglia di selezione e confrontati statisticamente allo scopo di verificare se vi fosse una differenza significativa fra le due aree. Il numero dei casi esaminati è limitato, ma è chiaro, per chi ha esperienza sull'argomento, che le possibilità di assistere ad un atto di predazione sono veramente rare e quindi i casi esaminati, in un arco di 4 anni, riteniamo che rappresentino comunque un campione significativo. Per verificare statisticamente la differenza fra le aree di studio, relativamente alla frequenza di localizzazione delle lesioni da morso sugli animali predati, sono state confrontate (Chi-quadrato di Pearson,  $\chi^2$ ; Siegel 1985) le distribuzioni dei morsi sulle carcasse delle pecore uccise nell'Isola d'Elba con quelle rilevate sulla stessa categoria di bestiame (ovini e caprini) nel territorio della regione Abruzzo su casi di predazione causati da Lupo o cani.

## Risultati

Nella tabella 1 vengono riportate, l'area di studio, la sintesi delle lesioni riscontrate e il predatore

causa del danno così come descritto dai certificati dei veterinari dell'A.S.L. di Portoferraio, Isola d'Elba (LI), o dal veterinario che ha effettuato l'accertamento negli altri casi. Su tutte le 14 predazioni avvenute nel corso di 4 anni all'Isola d'Elba, il referto del veterinario A.S.L. attribuiva la causa di morte degli animali a collasso cardiocircolatorio conseguente a lesioni da ferite multiple da morsi di cane. La dizione utilizzata nel referto necroscopico traduce sinteticamente un quadro anatomico patologico caratterizzato da lesioni da morso in varie parti del corpo dell'animale predato e la morte per stress dello stesso (Dr. Arus, *com. pers.*). In Abruzzo sono stati 15 i casi in cui il predatore è stato avvistato durante o appena dopo l'attacco e per cui l'individuazione del predatore è certa. In questi casi è stato possibile individuare con precisione le lesioni inferte *intra vitam* dal predatore sui corpi delle prede.

Confrontando con il Chi-quadrato la diversa distribuzione delle lesioni rilevate sugli animali predati nelle due aree di studio, si evince che vi è meno di una probabilità su mille ( $\chi^2=10,311$ ; g.l.=1;  $P<0,001$ ) che la differenza riscontrata sia dovuta al caso. In altri termini, vi è una differenza statisticamente significativa nella distribuzione delle lesioni rilevate sugli animali predati nell'Isola d'Elba rispetto a quelle rilevate negli animali predati nell'area di studio Abruzzo. La differenza consiste nel fatto che laddove sono presenti solo i cani (Isola d'Elba) nella totalità dei casi i morsi sono distribuiti a caso su tutto il corpo della preda, mentre in Abruzzo, in relazione alla presenza sia di lupi che di cani, le lesioni da morso si distribuiscono in due gruppi, quelle causate dall'attacco di uno o più lupi, caratterizzate da un unico morso letale nel terzo anteriore del collo e quelle causate dall'attacco da cani, distribuite su varie regioni del corpo della preda, sovrapponibili a quelle riscontrate a carico delle pecore e capre uccise da cani all'Isola d'Elba.

Tipologia delle lesioni sugli animali predati			
Area di studio	Lesioni riferibili a un morso letale localizzato esclusivamente nella regione retro-mandibolare (Lupo)	Lesioni riferibili a un morso localizzate in varie parti del corpo (cani)	Totale
	[n. casi]	[n. casi]	
Isola d'Elba	0	14	14
Abruzzo	8	7	15
Totale	8	21	29

Tabella 1: Tabella riassuntiva relativa alle diverse tipologie di lesioni riscontrate sugli animali predati nelle aree di studio considerate. L'Area di studio dell'Abruzzo comprende la somma dei casi relativi ai sopralluoghi nel Parco Nazionale della Majella, alle necroscopie effettuate all'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise ed ai sopralluoghi effettuati per conto dello stesso Istituto.

## Discussione

Nell'Isola d'Elba l'unico predatore responsabile di attacchi al bestiame è il cane e, i dati disponibili sui casi di predazione provocati da cane ( $n=14$ ) hanno messo in evidenza come, in tutti i casi, le lesioni riscontrate sugli animali attaccati fossero costituite da ferite riferibili a morso in varie parti del corpo. Le lesioni da morso inferte dai cani non sono state considerate dagli accertatori come causa diretta della morte degli animali attaccati, ma questa è stata invece attribuita genericamente a collasso cardiocircolatorio. Pertanto la morte è stata causata da politraumatismo associato allo stress conseguente all'attacco disordinato dei cani così come descritto da altri autori (Bowns 1976; Roy & Dorrance 1976; Schaefer *et al.* 1981; Ungerberger *et al.* 1996; Tapscott 1997; AA.VV., 1998 a,b,c, Bateson & Bradshaw, 1997).

In Abruzzo, ove coesistono popolazioni di cani vaganti e lupi, causa ambedue di aggressioni al bestiame, l'analisi dei casi di predazione ( $n=15$ ), in cui il predatore è stato univocamente identificato in cane ( $n=7$ ) o Lupo ( $n=8$ ), ha messo in evidenza due nette e diverse distribuzioni e tipologie di lesioni da morso sul corpo delle prede a seconda del predatore interessato. Negli attacchi da cani le lesioni sul corpo delle prede corrispondono a quelle

riscontrate nell'Isola d'Elba. Infatti, anche in questo caso le lesioni da morso sono diffuse in varie parti del corpo e associate a politraumatismi (escoriazioni, ferite lacere, graffi, contusioni).

Negli attacchi da Lupo la tipologia delle lesioni è stata invece caratterizzata da ferite da morso (una, al massimo due o tre) localizzate unicamente nella regione retromandibolare del corpo della vittima (terzo superiore del collo, *cfr.* Fig. 1). In questo caso la morte degli animali predati è sopravvenuta esclusivamente per l'effetto del morso inferto in quest'area anatomica.

Il fatto che il Lupo possa uccidere una preda delle dimensioni di una pecora, con un unico ed efficace morso nella regione retromandibolare fa ipotizzare che la conseguente lesione vada ad interessare particolari strutture anatomiche. Quando il Lupo morde la preda nella regione retromandibolare esercita una violenta compressione, con lacerazione dei tessuti profondi, in un'area interessata dalla presenza di importanti strutture neurovascolari: la carotide interna (Fig. 1) e le strutture neurovegetative ad essa connesse, il nervo vago e i barocettori presenti nella parete del vaso arterioso citato.

In molti casi anche la trachea è sede di lesioni causate dal violento morso (frattura degli anelli tra-

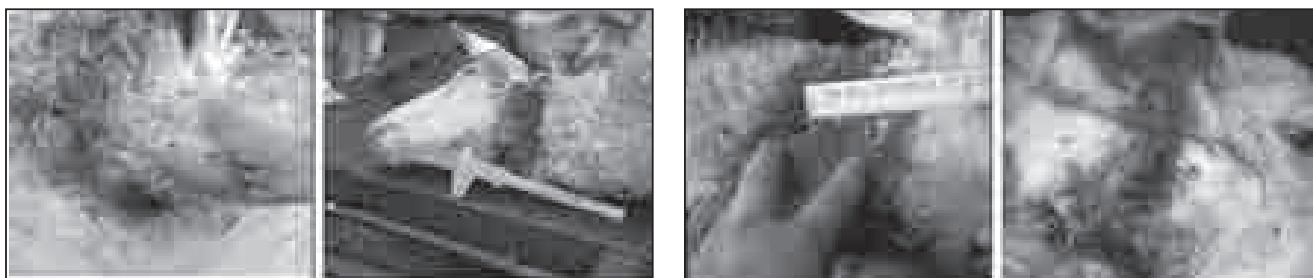
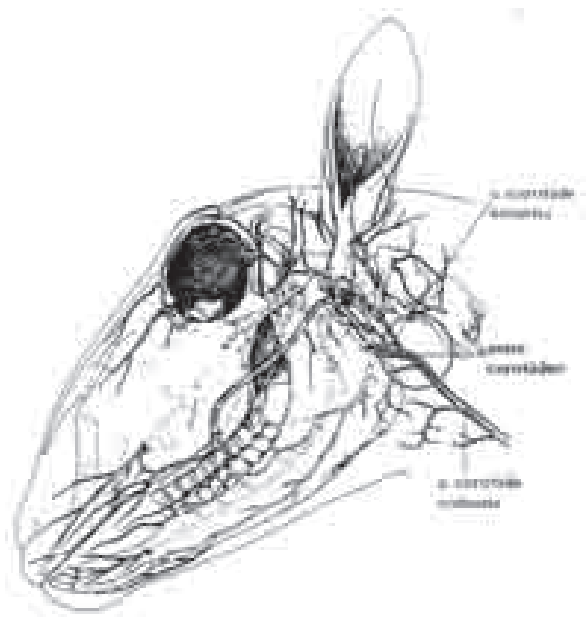


Figura 1: Immagini relative alla localizzazione delle lesioni da morso nella regione retromandibolare in caso di predazione da lupo. La figura al centro rappresenta uno schema delle arterie della testa di pecora, veduta laterale sinistra (modificata da Barone, 1993).



cheali sottostanti l'area del morso).

Nei mammiferi, uomo compreso (Ganong 1991), all'interno di quest'arteria, in corrispondenza del seno carotideo, una piccola dilatazione dell'arteria carotide interna, situata subito dopo il punto in cui l'arteria carotide comune si divide in carotide esterna ed interna, sono presenti dei barocettori, o recettori di pressione, che vengono stimolati dalla distensione della parete dell'arteria. In particolare, a seconda delle variazioni della pressione sanguigna all'interno del lume arterioso, i relativi neuromediatori (adrenalina o noradrenalina) possono presentare un aumento o una diminuzione della frequenza di scarica. L'effetto è una stimolazione dell'attività del centro vasomotore e cardioregolatore. Nel caso di un brusco aumento di pressione nel lume vasale, come avviene in seguito ad un morso violento con compressione del vaso, si ha un aumento della secrezione dei neuromediatori i quali, da un lato inibiscono l'attività tonica del centro vasocostrittore, dall'altro eccitano il centro nervoso cardioinibitore. Dai barocettori carotidei originano impulsi che risalgono lungo il piccolo nervo di Hering o nervo del seno, ramo distinto del glossofaringeo (IX) e gli impulsi quindi raggiungono il nucleo del tratto solitario del midollo allungato. Ne risulta una vasodilatazione generalizzata con conseguente ipotensione, bradicardia e diminuzione della gittata cardiaca (Aggugini 1998). La contemporanea stimolazione compressiva del nervo vago, che decorre nella doccia giugulare e nella stessa area anatomica, accentua la bradicardia, che, determinando una diminuzione della gittata cardiaca, determina l'arresto cardiaco. L'associazione di queste due violente stimolazioni provoca nell'animale attaccato un collasso cardiocircolatorio pochi secondi dopo il morso. Il morso alla gola comporta anche una notevole compressione della trachea contro le strutture osteoarticolari e muscolari del collo ed infatti, nella carcassa, si possono evidenziare spesso gli anelli tracheali fratturati. La rapidità della morte, spiega anche l'assenza dell'edema polmonare, presente invece negli animali che muoiono per stress dopo un prolungato inseguimento.

Risulta quindi evidente come, anche con un unico morso nella regione retromandibolare, il Lupo vada a danneggiare contemporaneamente più strutture vitali della preda provocandone la morte o il collasso in pochi secondi. Questa modalità di aggressione risponde all'esigenza del Lupo di elaborare una tecnica di caccia che gli consenta di uccidere la preda con il minimo dispendio energetico, ricavandone il massimo beneficio. Questa tecnica di caccia (il Lupo affianca la pecora, la morde alla gola e la tiene stretta fino a quando riesce ad atterrarla) viene appresa dai piccoli osservando la madre o gli altri componenti del branco mentre cacciano e attaccano (Mech 1970). La tecnica viene poi "raffinata" con l'esperienza.

### Conclusioni

L'utilizzo di una procedura operativa standard da utilizzare nel corso di sopralluoghi in casi di pre-

dazione consente di esaminare con criteri comuni dati raccolti in aree e tempi diversi. Da un punto di vista dello studio del fenomeno predazione, una raccolta omogenea dei dati risulta di estrema importanza, in quanto permette da un lato di individuare i fattori facilitanti e/o predisponenti i casi di predazione, dall'altro di intervenire con sistemi preventivi adeguati ad ogni singola situazione. Ad esempio, in un'area in cui le predazioni siano legate principalmente ad attacchi al bestiame da parte di cani vaganti sul territorio, sarà opportuno prendere dei provvedimenti al fine di controllare il randagismo/vagabondaggio canino. Al contrario, se il maggior responsabile delle aggressioni risulta essere il Lupo, sarà opportuno adottare delle misure preventive per il controllo dei danni (per esempio incrementando il numero di cani da pastore a guardia del gregge e fornendo recinzioni adeguate per la protezione del bestiame).

Il passaggio dalla attuale gestione del problema predazione basata sull'indennizzo economico dei danni, spesso aspecifico, all'adozione di misure adeguate per attenuare l'impatto dei predatori sulla zootecnia rappresenta il futuro della sopravvivenza del Lupo in Italia. Per questo motivo, solo alla luce di una raccolta dettagliata di dati oggettivi relativi al fenomeno sarà possibile rivisitare la legislazione vigente e adeguarla maggiormente alle esigenze di conservazione e di produttività degli allevamenti. Indiscutibilmente, però, il personale incaricato dell'accertamento dovrà essere formato a seguire una corretta metodologia d'indagine. L'analisi dell'attuale quadro legislativo relativo all'accertamento dei danni al bestiame da cani vaganti e lupi evidenzia come 17 regioni su 20 prevedano l'indennizzo dei danni sulla base dell'identificazione del predatore, ma, in nessun caso, è effettuata la formazione professionale del personale incaricato dell'accertamento.

Gli aspetti anatomo-patologici e sanitari legati ad una diagnosi di morte per predazione si sono dimostrati determinanti sia per la individuazione della causa di morte che per l'identificazione del predatore causa del danno. Pertanto si ritiene che la figura professionale più indicata per lo svolgimento di un corretto accertamento sia il medico veterinario.

I risultati ottenuti dimostrano che è generalmente possibile distinguere le predazioni sul bestiame domestico (nello specifico pecore e capre) da parte di cani o da parte di lupi. In accordo con la letteratura internazionale (Bowns 1976; Roy & Dorrance 1976; Schaefer *et al.* 1981; Umberger *et al.* 1996; Tapscott 1997; AA.VV., 1998a,b,c; Bauer 2003), questo studio ha dimostrato che la caratteristica dell'attacco da parte di cani è la localizzazione diffusa dei morsi in diverse parti del corpo della preda. La morte dell'animale attaccato non si verifica per il fatto che i morsi danneggiano strutture vitali ma per lo stress conseguente al politraumatismo, allo spavento e spesso al lungo inseguimento. Nel caso di predazione da Lupo, invece, la lesione mortale è costituita da uno o al massimo due morsi (ma generalmente è unico) localizza-

ti esclusivamente nella regione retromandibolare della vittima, concordemente con quanto asserito precedentemente da alcuni autori (Coccia 1984; Fico *et al.* 1998; Molinari *et al.* 2000). Siamo convinti che i parametri diagnostico-differenziali individuati potranno essere utilizzati in futuro per discriminare con maggiore precisione gli attacchi da cane da quelli da Lupo e consentire così la gestione del conflitto predatori-zootecnia sulla base di dati oggettivi.

Nessuna gestione efficace è possibile in assenza di una conoscenza approfondita e scientifica del fenomeno.

## Bibliografia

- AA.VV., 1998a - Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 212 (7).
- AA.VV., 1998b: - Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 213 (5).
- AA.VV., 1998c - Animal Behavior Case of the Month. JAVMA, Vol. 213 (9).
- AGUGGINI G., 1998 - Cuore e circolo. In Aguggini G., Beghelli V., Clementi M.G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L.F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongin A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. UTET, II Edizione, 10:357-438.
- ALOTTO C., 2003 - Etude du phénomène de prédation causée par le loup au sein d'une aire protégée (Parc National du Gran Sasso et Monts de la Laga, Italie Centrale). Rôle du vétérinaire dans la reconnaissance des dommages causée au cheptel domestique. Tesi di laurea in medicina veterinaria alla Facoltà di Nantes (non pubblicata).
- ANONIMO, 1980 - Ecological aspects of urban stray dogs. Continuing Education Article n.4, Vol. 2 (9), In: Morosetti G. (Ed.), Osservazioni sul comportamento predatorio del cane domestico e di alcuni carnivori selvatici. Assessorato provinciale alla Sanità, Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige.
- BARONE R., 1993 - Anatomia comparata dei mammiferi domestici - Volume V - Angiologia parte prima - Cuore e arterie. Edizioni Agricole.
- BAUER E.A., 2003 - Predators - Coyotes & Wild Dogs. In: [www.shagharkridge.com/info/coyote.html](http://www.shagharkridge.com/info/coyote.html)
- BECK A. M., 1974 - Ecology of unwanted and uncontrolled pets. In: Morosetti G. : Osservazioni sul comportamento predatorio del cane domestico e di alcuni carnivori selvatici. Assessorato provinciale alla Sanità, Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige, 23.2.
- BECK A.M., 1975 - The ecology of "feral" and free-roving dogs in Baltimore. In: Fox M.W. (Ed.), The Wild Canids. Their Systematics, Behavioral, Ecology and Evolution: 380-390. Behavioral Science Series, Von Nostrand Reinhold Company.
- BERMAN M. AND DUNBAR J., 1983 - The social behaviour of free-ranging suburban dogs. *Applied Animal Ethology*, 10:5-17.
- BOITANI L.& SOCCODATO A., 1979 - senza titolo. Panda, Anno XIII, Vol. 1. WWF Italia, Roma.
- BORCHELT P.L., LOCKWOOD R., BECK A.M., & VOITH L.V., 1983 - Attacks by Packs of Dogs Involving Predation on Human Beings. Public Health Reports, Vol. 98 (1).
- BOWNS J. E., 1976 - Field criteria for predator damage assessment. *Utah Sci.* 37:26-30.
- CARUCCI A.& ZACCHIA C., 1999 - Monitoraggio del randagismo canino e dei lupi in un'area del Parco dei Monti Lucretili. I quaderni faunistici del Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili, Regione Lazio, Roma.
- CAUSEY K.M. & CUDE C. A., 1980 - Feral dog and white-tailed deer interactions in Alabama. *Journal of Wildlife Management*, 44: 481-483.
- CLUTTON-BROCK J., 1992 - The process of domestication. *Mammal Rev.*, 22: 79-85.
- COCCIA L., 1984 - Avventure con orsi e lupi - Vissute e narrate da un ex agente del Parco Nazionale d'Abruzzo. Pescasseroli.
- COZZA K., FICO R., & BATTISTINI L., 1996a - Wildlife predation on domestic livestock in central Italy: a management perspective. *J. of Wildlife Research*, 1: 260-262.
- COZZA K., FICO R., & BATTISTINI L., 1996b - The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biological Conservation*, 78: 329-336.
- DANIELS T., 1983 - The social organisation of free-ranging urban dogs 1: non oestrous social behavior. *Applied Animal Ethology* 10: 341-346.
- EVANS H. E., 1993- Miller's Anatomy of the Dog. Terza edizione. W.B. Saunders Company.
- EWER R. P., 1973 - The Carnivores. Cornell Univ. Press., Ithaca, N.Y.
- FICO R., 2004 - Randagismo canino e conflitti con la zootecnia: vent'anni di occasioni mancate per la conservazione del lupo. In: Cecere, F. (Ed.), Il lupo e i Parchi, (Santa Sofia, 12-13 aprile 2002).
- FICO R., KACZENSKY P., HUBER T., HUBER D., & FRKOVIC A., 1998 - Chi è stato? Riconoscere e documentare gli animali da preda e le loro tracce. Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo.
- FICO R., MOROSETTI G. & GIOVANNINI A., 1993 - The impact of predators on livestock in the Abruzzo region of Italy. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 12: 39-50.
- FICO R., 1995 - Studio e gestione di una popolazione canina. Rapporti di Sanità Pubblica Veterinaria, ISS/WHO/FAO-CC/IZSTe/95.25.
- FRITTOLE M., 1997 - Sulla perizia medico-legale. Sintesi di pensiero giuridico e competenze medico-biologiche. *Il Progresso Veterinario*, 21: 775-776.
- GANONG W.F., 1991 - Fisiologia Medica. Piccin Nuova Libreria S.p.A., VIII Edizione Italiana, Padova.
- GENOVESI P. (A CURA DI), 2002 - Piano Nazionale d'Azione per la Conservazione del Lupo (*Canis lupus*). Ministero Ambiente e Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Quad. Cons. Natura, 13.
- GENOVESI P. & DUPRÉ E., 2000. Strategia nazionale di conservazione del Lupo (*Canis lupus*): indagine sulla presenza e la gestione dei cani vaganti in Italia. *Biologia e Conservazione della Fauna*, 104:1 - 36.
- KLINGLER K. & BREITENMOSER U, 1983 - Die Identifizierung von Raubtierrissen. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125: 359-370.
- KRAMES L., MILGRAM N. W., & CHRISTIE D. P., 1973 - Brief report: Milgramy aggression: differential suppression of killing and feeding. *Behav. Biology* 9: 641-647.
- LOPEZ B., 1978 - Lupi. Dalla parte del miglior nemico dell'uomo. Edizione Italiana, Piemme (1999).
- MECH L. D., 1970 - The wolf. Ecology and behavior of an endangered species. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- MECH L.D., 1975 - Hunting behaviour in two similar species of social canids. In: Fox, M.W. (ED.), The Wild Canids. Their Systematics, Behavioral, Ecology and Evolution: 363-368. Behavioral Science Series, Von Nostrand Reinhold Company.
- MOLINARI P., BREITENMOSER U., MOLINARI-JOBIN A., & GIACOMETTI M., 2000 - Predatori in azione - Manuale di identificazione delle predazioni e di altri segni di presenza dei grandi mammiferi carnivori. Wildvet Projects.

- O'FARREL V., 1991 - Comportamento e psicologia del cane. A. Mondatori, Milano.
- OWENS J., 1984 - I cani rinselvaticiti: un serio problema per le aree rurali. *Selezione Veterinaria* 25: 1387-1400.
- ROY L. D. & DORRANCE M.J., 1976 - Methods of investigating predation on domestic livestock – A manual for investigating officers. Alberta Agriculture , Edmonton.
- SCHAEFER J. M., ANDREWS R. D., & DINSMORE J. J., 1981. - An assessment of coyote and dog predation on sheep in Southern Iowa. *Journal of Wildlife Management*, 45: 883-893.
- SIEGEL S., 1985 - Statistica non parametrica per le scienze comportamentali. Ed. Organizzazioni Speciali, Firenze.
- SINGER C., 1998 - More on dangerous dog breeds. *JAVMA*, Vol. 212 (8).
- TAPSCOTT B., 1974 - Something's been killing my sheep – but what? How to difference between coyote and dog predation. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- TRUMLER E., 1974 - Hunde ernstgenommen. Piper R.e Co.ed., München, Zürich.
- UMBERGER S. H., GEYER L.L., & PARKHURST J. A., 1996 - Addressing the consequences of predator damage to livestock and poultry. Virginia Cooperative Extension, Knowledge for the Common Wealth, 410-030.
- WAYNE R.K., LEHMANN, N., ALLARD, M.W., & HONEYCUTT, R.L., 1992 - Mitochondrial DNA Variability of the Gray Wolf: Genetic Consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation. *Conservation Biology* 6:559-569.
- ZIMEN E., 1971 - Wölfe und Königspudel – Vergleichende Verhaltensbeobachtungen. Piper, München.



# Anatomopathological findings and wolf predation dynamics observed on domestic preys in Apennine.

Simone Angelucci, Umberto Di Nicola, Rosario Fico.

The study area of the present work includes the two National Parks of Majella and Gran Sasso-Monti della Laga, for a total area of 2250 km<sup>2</sup>, in the central Apennine.

Data were collected from 2002 in the Majella National Park and from 2003 in the GSL National Park, within the inspections made by the veterinarian of each Park and by the Corpo Forestale dello Stato, after receiving complaint (report) about damage to livestock, as provided by each respective disciplinary laws of the two protected areas.

Inspections on damages to livestock by predators are analyzed following a standardized procedure which includes survey of environmental and management information and the anatomical-pathological report made by the Park veterinarian. The attribution of preys to the wolf is made by means of a procedure of medical-legal analysis: animals were classified as wolf preys according to what provided by the more recent literature (Fico *et al.*, 2005; Angelucci *et al.*, 2005).

The necroscopical practice, through the survey of *intra vitam* lesions (injuries), permits to reconstruct the physiopathogenetic processes happened in the animal before death: ***intra vitam lesions are, in fact, the anatomical-pathological result of all the interactions realized among predator, prey and environment.***

It is than clear that such information are useful not only to trace the death of an animal back to a predatory event (predation), but also to reconstruct the predatory dynamics, at the moment in which the expert is able to correlate the anatomical-pathological observations to the environmental ones.

In particular, the formation and the characteristics of *intra vitam* lesions can be affected by :

- ***the predator***: because of predatory technique, energetic needs (requirement), physical characteristics;
- ***the prey***: because of behaviour and anti-predatory capacities and physical characteristics;
- ***the environment***: because of characteristics capable of influencing both the predator's predatory technique and the prey's anti-predatory capacity.

The interaction between predator and prey in a particular environment is therefore able to induce the formation, on the body of the prey still living, of:

- ***direct lesions***: as consequence of the predator action on the prey, interaction which can be, however, influenced by environmental and context factors;
- ***indirect lesions***: which the prey can get hold of in a particular environment, not for the direct action of the predator, but happened within the prey reaction to the predator's attack.

The anatomical-pathological analysis of *intra vitam* injuries, thus, resulting in a ***reconstruction of physiopathogenetic mechanisms*** occurred before the death of the prey, represent a concrete ***indication of predatory dynamics*** realized and it is such as to give information useful first of all to the assessment of the occurred predatory event, then to the predator identification and finally to the methods of hunting and predation, much often, in its turn, useful to the comprehension of the reasons of vulnerability of the hit farms.



Briefly, among the more frequent *intra vitam* lesions found out in case of predation, these could be enumerated:

- cutaneous level
  - lacerated contused wounds related to bites, with or without substance (anat. matter) loss
  - grazes of different degree, referable (attributable) to non piercer bites, scratches, rubs against rocks, vegetation ecc., with or without exudation and scab
  - ecchymosis more or less large
- subcutaneous level
  - active hyperemia corresponding to the bite or trauma headquarters (places, positions)
  - hematomas more or less large, depending on the anatomical headquarters and the trauma gravity (seriousness)
- muscular and skeletal level
  - distractions (inattentions), breaks, lacerations of muscular heads
  - deep bruises
  - fractures of bone segments
- visceral level
  - active hyperemia or other signs of systemic reaction
  - hyperemia, inflammation or necrosis, depending on the lesions of the circulation (bloodstream)
  - breaks, hemorrhages, cavitary effusions ecc..

The survey of these lesions, beginning from the cutaneous and subcutaneous ones that **as first** “describe” the interaction among predator-prey-environment in the last minutes of prey’s life, and arriving to the visceral lesions, that can be an index of prey reactions, prolonged (extended) as well, and with a complex evolution, as well as prey generalized reactions (and so indirect) at the moment of the predation (intense stress, pulmonary edema, cardiac exhaustion, metabolic acidosis, myopathy ecc.).

In Apennine context, in case of predations by wolf on sheeps and goats, then domestic animals of medium size, the typical observation is the presence of lacerated contused wounds caused by bites on the high jugular and retro-mandibular region: this lesion interest neurovascular annexes and structures with a big physiopathological importance: the mechanical stimulation sudden, intense and most of the times prolonged (extended) at this level induces, in fact, generalized vasodilatation consequent to baroreceptorial hyperstimulation (inhibition of the vasoconstrictive centre by a stimulation of carotid baroreceptors) and reflected bradycardia consequent to a vagal hyperstimulation.

The anatomical-pathological report exposes a clear ***orientation of the wolf predatory approach***, because it concerns lesions most of the times extremely defined and, from the anatomical point of view, circumscribed into the area, which, if interested by mechanical stimulation, produces ***systemic effects such as to functionally inactivate the prey in extremely quick times***. Such definition is comforted (confirmed) by the fact that, together with this lesion, it is not usual to find out injuries in other vital areas, that is other anatomical areas the stimulation of which could involve systemic effects so serious to bring the prey to death or, at least, to an heart failure.

Rather, the other lesions, even though very defined, imply only local damages, but assume, if present, a certain value on the dynamic of predator/prey interaction.

The bite on high jugular region is, in fact, sufficient to the complete and immediate functional inactivation of the prey and it comes true within ideal predatory contexts, such as to permit that effectiveness of attack which allows the minimum energetic waste on the food acquirement.

The wolf, to realize this type of approach and the lesions just described, has to:

- be able to place itself side by side to the prey and approach the cranial-cervical area;
- be able to seize (grab) the prey and bring it down towards earth, holding for a several tens of seconds the aforesaid area;
- be able to hold the prey, at least for few seconds.

During these phases, because of the lesions in this headquarters, other pathogenetic mechanisms can occur too, such as:

- large hemorrhages caused by breaking of the cervical vessels
- trachea compression and temporary hypoxia

This approach to the animal is, therefore sufficient to “eliminate” the prey in a small time, allowing the predator, in ideal situations, to carry on the aggression on other preys, maximizing the food intake.

In some situations in these carcasses, together with the typical lesions described above, it was observed the presence of large lacerated contused *intra vitam* wounds on the abdominal region, with the discharge of abdominal viscera: *intra vitam* consumption (eating), probably begun in situations in which the predator have not sufficient guarantees of feeding safely, give evidence (testify) that, even if preys are not yet dead, they are in fact functionally inactivated, because of the pathogenetic mechanisms cited above.

The coming alongside of preys one by one, thus, will be an indispensable condition to produce the mentioned vital lesions: such condition, in order to minimizing the energetic waste, would consent to induce the prey inactivation only by one or some bites in the high jugular region; if the approach is favourable, there are not motivations (explanations) that are valid from the “energetic” point of view that are valid from the “energetic” point of view to pursue (follow) another predator approaches, that is to cause other wounds in other anatomical regions.

Probably, these situations happen:

- when the wolf don't warn risks related to the presence of men or guarding dogs and thus he can easily approach preys with the more efficient manner;
- when the wolf can carry out (perform) ambushes on animals far off the anthropical risk and thus on animals isolated because of management reasons or in particular weather situations;
- when the wolf is able to disperse the animals (heads) even if well guarded or grouped, but that, when dispersed, can be preyed and eaten in less dangerous conditions for the predator.

The removal of preys from the anthropical danger for the wolf often promotes also ideal hunting situations, within which, if there is the possibility to reach-come alongside-attack such as to optimize the time needed to functionally inactivate every single prey, the predator will be easily able to attack other succeeding preys too: this observation bring to define events of “multiple killing” in which tens of preys show anatomical-pathological patterns completely overlapping and there are, evidently, the predator/prey/environment interactions economically most advantageous for the wolf, who succeed in maximizing the food intake in a unique and easy, effortless predatory attack.

These events, when happened in the afternoon, occurred mostly on lands with bushes, that permit a favourable approaching to the prey and the predisposition of an attack dynamics particularly suitable for minimizing of the preys alert status.

As far as the weather conditions are concerned, instead, it was observed that with rain and fog, that is with a reduced visibility, extremely effective predations are very frequent, even if they are turned to few heads, because performed in the immediate proximity to groups guarded by dogs or shepherds; relating predations happened during night, they occurred mostly with clear weather: this probably because this condition may, in some way, favours the attack, allowing the predator to better locate the preys in the darkness of the night and to chase them more safely.

But the determinant factor, actually, for the risk of big predations during night are the management variables: in the episodes of “multiple killing” at night, the observation of a missed custody of the animals and of their missed coming back to the fold (that is to the custody areas) are extremely frequent: this, as previously explained, promote an ideal predatory situation for the wolf who, as well as to join every single prey with great efficiency, optimizes the predatory effort trying to kill more heads in a single attack.

The observation of other anatomical-pathological lesions on wolf preys can be entirely sited into the concept of predator/prey/environment interactions and can configure particular predatory dynamics observed in Apennine context. Lesions never follow purposeless and physically devastating actions, as often observed in dog predations, but they follow precise utilities functional to the predatory dynamics, in terms of an effort and risk minimization. Among these *intra vitam* lesions we can include:

- lacerated contused bite wounds on the hind quarters, particularly to the thigh (leg) muscles, with or without loss of cutaneous and muscular substance: these lesions are frequently observed in case of an approach to groups of massed animals (for example into an electric fence), in a way such to permit to the predator an approach only to the hind quarters, or, while chasing, so with an obvious holding purpose.
- lacerated contused bite wounds or grazes of II and III degree attributable to non penetrating bites, with hematomas below, in dorsal or lumbar region; in some situations, where the approach of a prey occurs from the top to the bottom, for example predations along flumes or gorges, it is directed towards the dorsal-lumbar part: the structure of the anatomical region is such as that often canine teeth are not able to enter the cutaneous plane but they can provoke only grazes of different gravity. This was observed even in case of an approach on preys that are already in sternal decubitus, as, for example, still inert calves: in this case it could be functionally interpreted as a bite made for an *intra vitam* consumption.
- lacerated contused bite wounds with large substance loss in sternal or abdominal region; anatomical-pathological find observed in animals affected by systemic pathologies or incapable to move. This is, in fact, an *intra vitam* consumption, because the predator is not involved in an attack action oriented to inactivate the prey.
- grazes of I or II degree consequent to scratches made trying to hold the prey: observation quite frequent in case of chase in steep or uncomfortable areas.
- large subcutaneous hematomas, with little wounds by canine teeth, tissular suffering, subcutaneous edema, together with bite lesions typical in vital areas: this observation, visible in Apennine context from autumn, can be attributed to bites of predators with a smaller size, with a less accurate approach and less clean lesions.
- grazes of II degree by bites in the high jugular region, with large subcutaneous hematic effusions and presence of other diffuse lesions: these are usual observations in case of

sheeps with a big size (breed animals for meat, for example), in which the efficiency of the jugular bite is relatively inhibited by the larger neck diameters and cutis (skin) thickness and in which the reaching of other holding prey headquarters may be functional.

Environmental conditions, meant as the totality of management conditions with which animals are kept at pastures (are kept grazing), the orographical and vegetation characteristics, weather conditions, are able to influence the predatory dynamics and its variability can be efficaciously reconstructed within the medical-legal sphere.

---

# Using Genetic Analyses to Identify Predators

C. L. Williams and J. J. Johnston

USDA, Wildlife Services, National Wildlife Research Center, 4101 LaPorte Ave., Fort Collins, CO 80521 USA

**Keywords:** Coyote, Forensic, Genetic Analysis, Microsatellite, mtDNA, Predation

## Introduction

Coyote and dog depredation account for much of the economic losses to livestock in the United States (National Agricultural Statistical Service, 2000, 2001). However, depredation by other species (such as members of reintroduced wolf populations) can be more socially and politically contentious. Predators are often elusive and attacks on livestock are not often witnessed but the species of predator causing stock losses can sometimes be ascertained from evidence near the carcass (such as scat or hair), the attack pattern, or size and spacing of bite wounds. However, these species assignments can be subjective and may be influenced by the experience level of personnel, the condition of the carcass, and knowledge of previous predation history at the site. Variation among conspecific predators in attack pattern, and inter-specific overlap in those patterns, may be another complication to accurate predator species identifications. There are wide ranges in accuracy of identifying species based on scat morphology (Farrell et al., 2000). Variation in individual feeding preferences (Fedriani and Kohn, 2001) may also complicate accurate species identification from scat. Sociological considerations also may influence results. For example, local or regional compensation schemes may unintentionally result in biases in predator species identification (Cozza et al., 1996). Using common field methods, the accurate identification of the gender of a predator responsible for a specific predation event is unlikely. Likewise,

although there may be assumptions about which specific individual was responsible for an attack on livestock, those assumptions may not be based on any concrete data. Clearly, an unambiguous method to determine the predator species would remove identification biases. A method to identify the specific individual responsible for kills would benefit our understanding of predation and would be useful in certain situations. Both methods, even if used strictly in research situations, might ultimately result in improved approaches to minimize livestock losses to predation.

Samples, such as hair, scat, and saliva (referred to as noninvasive samples), contain DNA, although the DNA tends to be in low quantity and degraded (Taberlet et al., 1999). Despite this difficulty, these samples can be analyzed using the polymerase chain reaction (PCR), which allows the analysis of even minute amounts of degraded DNA. Because the mitochondrial (mt) genome is small and is present in multiple copies in most cells, mtDNA lends itself well to PCR analysis. Importantly, certain regions of the mt genome are variable among species (Foran et al., 1997). By analyzing for such mtDNA differences, unknown samples (including noninvasive samples) can be identified to species. For example, Foran et al. (1997) demonstrated the ability to use mtDNA to identify scat samples from a wide range of wildlife species. Likewise, Woods et al. (1999) used mtDNA to differentiate black bear from brown bear hair collected from snares. By using highly variable nuclear DNA regions, such as microsatellite DNA loci, identification of the individual animal responsible for predation is also possible from noninvasive samples. Woods et al. (1999) were also able to differentiate

individual bears based on unique multi-locus microsatellite DNA genotypes generated from those hair samples. Additionally, the gender of an animal leaving a noninvasive sample can be determined based on analysis of regions of the sex chromosomes that vary between male and female (Woods et al., 1999; Williams et al., 2003b).

Studies that use genetic analysis of noninvasive samples to delineate regions of species overlap, census populations, or track elusive or rare species are becoming more frequent (Woods et al., 1999; Kohn et al., 1999; Palomares et al., 2002). However, the genetic analysis of noninvasive samples also has potential applications in situations involving livestock predation. Predators often leave traces of scat, hair, or saliva at a kill site, and those samples have the potential to allow the unambiguous genetic identification of the predator (Ernest et al., 2002). These noninvasive samples are not identical in utility, however. The usefulness of scat or hair found near a kill site must be carefully considered. Although found physically near a kill site, there may be some ambiguity whether the hair or scat sample was deposited at the exact time of the kill and whether it was deposited by the individual that made the kill. However, saliva left on predation wounds offers the opportunity for direct identification of the predator. Saliva has been increasingly used as a source of DNA in human criminal investigations in recent years. Despite the low quantity and quality of DNA in such samples, multi-locus genotypes have been generated from unintentionally deposited saliva samples that allowed the matching of a sample to a specific suspect (Sweet and Hildebrand, 1999). Analysis of saliva has only recently been applied to investigations of livestock predation. For example,

Williams et al. (2003b) used analysis of saliva to identify species and gender of predators killing sheep (*Ovis aries*) at a site in California. At that site the most important predator of sheep was coyotes (*Canis latrans*); (Neale et al., 1998), but other potential predators were also present (bobcat, *Lynx rufus*; black bears *Ursus americanus*; dogs, *Canis familiaris*; mountain lions, *Puma concolor*). Williams et al. (2003b) demonstrated the ability to generate microsatellite genotypes from those saliva samples. Blejwas et al. (in prep) took the identification of predators at that site further by comparing microsatellite genotypes from coyotes in the area (obtained from tissue samples; Williams et al., 2003a) to microsatellite genotypes obtained from saliva on predation wounds. Blejwas et al. (in prep) successfully identified some of the individual coyotes responsible for specific sheep kills at that study site.

## Approaches for sample collection and genetic analysis

Hair samples obtained from kill sites are collected and preserved dry, in an envelope. Scat samples may be frozen or stored at room temperature in ethanol or a buffer solution (Ernest et al., 2000; Frantzen et al., 1998). To collect saliva swabs the carcass should be skinned and attack wounds distinguished from scavenging by the presence of sub-dermal hemorrhaging. Attack wounds are individually sampled using a dry, sterile swab. The swabs are air dried, then stored in an envelope or bag. Care must be taken to minimize potentially cross contaminating samples. The cotton tip of the swabs should not be handled or touched to any surface other than the single bite it is being used to swab. Samples must be stored individually.

DNA from scat or saliva is isolated using a commercially available kit (Qiagen, Valencia, Calif.) and the manufacturer's instructions. The DNA from hair is typically isolated using a commercially available resin (Chelex 100, Bio-Rad, Hercules, Calif.). An aliquot of DNA, or an aliquot of a 1:10 dilution for scat samples, is used as a template for PCR amplifications, which are targeted to amplify specific genetic regions. For species identification, primers are used that amplify a

short fragment of the mtDNA, typically the control region (Kocher et al., 1989; Foran et al. 1997; Woods et al., 1999). This genetic region varies among species either in length (so some species result in fragments of different lengths) or in DNA sequence. For example using primers developed by Pilgrim et al. (1998), black bears produce a distinctly different fragment pattern than canids, and the felids show multiple fragments due to heteroplasmy (not shown). Other species, such as the canids, require digestion of the amplification product with restriction enzymes to resolve sequence differences. Determining gender relies on analyzing regions on the sex chromosomes which may require species-specific primers (Woods et al., 1999). Conserved primers for mammalian gender determination would be of particular use for saliva or hair samples (Woods et al., 1999), unless the fragments they amplify are large (Shaw et al., 2003). Determining an individuals' genotype is accomplished by microsatellite DNA analysis. Microsatellite primers, which target these short, highly variable, genetic regions have been developed for most large and many small predators (Ostrander et al., 1993; Paetkau and Strobeck, 1995; Ernest et al., 2000).

## Technical Issues

The degraded quality and low quantity of DNA from noninvasive samples makes such samples prone to contamination. Special precautions should be taken to minimize cross contamination, such as handling samples with gloves and packaging individually in the field. Laboratory precautions have been discussed by Taberlet et al. (1999) and include facilities and equipment dedicated for low-template samples, as well as additional negative controls. The nature of noninvasive samples means some samples will yield no information on species identification. However, they should not yield incorrect species identification. The degraded state of DNA from noninvasive samples also means primers targeting large DNA fragments may not result in amplification, and necessitates the use of relatively short DNA regions for all genetic analyses. For example, saliva swabs from livestock carcasses have not yielded amplification using primers that amplify a mtDNA

fragment about 600 bases long (H16498 and L15774, Foran et al., 1997), but did result in amplification of an approximately 165 base fragment using other primers (Pilgrim et al., 1998; data not shown). Although markers have been developed to differentiate even closely related species (Paxinos et al., 1997) those markers rely on relatively long genetic regions and so may not be of use with all noninvasive samples.

Although scat may contain degraded DNA from both predator and prey, saliva swab samples will likely contain degraded DNA from the predator in the presence of less degraded prey DNA (from blood), which may interfere with some identifications (Williams et al., 2003b). All types of noninvasive samples can produce erroneous microsatellite genotypes (Taberlet et al., 1999). To ensure the correct microsatellite genotype is obtained for an individual predator, additional special precautions are required. Such precautions include establishing criteria for accepting genotypes, in order to account for allelic drop out and false alleles (Taberlet et al., 1999; Fernando et al., 2003). Generating individual multi-locus microsatellite genotypes will not be practical for all samples identified to the species level, given the additional time and expense required.

Hybridization between species could also be a complicating issue for genetic species identification (Roy et al., 1994; Vila et al., 2003). Hybrids carry the mt genome of their mother, and mt analysis alone would identify a hybrid as being a member of its mothers' species. Individuals that are the descendants of hybrids may also carry a misleading mt genome. For example, a dog mt haplotype was detected in coyotes in the southeastern United States, presumably as a result of a historical hybridization during range expansion into that portion of the country (Adams et al., 2003b). Similarly, wolves in certain regions in North America carry coyote mt genomes due to hybridization (Lehman et al., 1991). For accurate species identification, mt variation among individuals in a population or among species of interest may need to be established.

## Discussion

Genetic methods can be successfully applied to evidence left on or near live-



stock carcasses to identify predator species, gender and individual genotype (Williams et al., 2003b; Ernest et al. 2002). Similar methods are being used to identify predators attacking humans. Genetic identification of predator species can be conclusive and may offer resolution to ambiguous or controversial cases. Clearly, genetic markers have the capacity to easily differentiate more distant species. For example, differentiating canids from felids is readily accomplished, as is differentiating either from ursids. More closely related species may require more thorough analysis and, as mentioned, differentiating among canid species can be more technically challenging (Adams et al., 2003a). One of the greatest logistical difficulties is finding carcasses of missing livestock in a suitable timeframe. On large ranches, where livestock may be most vulnerable to predation, it may not be feasible to search pastures often enough to distinguish predation wounds from scavenging. However in situations where livestock can be checked daily or more frequently, or for research purposes, success in identifying predation wounds and predator species can be high (Williams et al., 2003b; Blejwas et al., in prep). Genetic analysis can be used not only to determine the presence of a particular species at a certain location, but also to determine the identity of prey items in predator scat or stomachs (Scribner and Bowman, 1998; Fedriani and Kohn, 2001). So, for example, a scat containing both coyote and sheep DNA could indicate livestock depredation. However, we have not discussed this approach because predation could not typically be readily differentiated from scavenging using that method.

Genetic analyses offer new approaches to predator identification and can play a part in a better understanding of livestock depredation. Genetic analysis also offers a means to confirm that management programs are targeting the predators responsible for depredation. In addition to identifying predators responsible for individual cases, such data may assist investigations into prey base shifts, and the effects of multiple, overlapping predator species.

## Literature Cited

- Adams, J. R., B. T. Kelly, and L. P. Waits. 2003a. Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology* 12:2175-2186.
- Adams, J. R., J. A. Leonard, and L. P. Waits. 2003b. Widespread occurrence of a domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern U.S. coyotes. *Molecular Ecology* 12:541-546.
- Cozza K., R. Fico, M.-L. Battistini, and E. Rogers. 1996. The damage-conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy. *Biological Conservation* 78:329-336.
- Ernest, H. B., M. C. T. Penedo, B. P. May, M. Syvanen, and W. M. Boyce. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* 9:433-441.
- Ernest, H. B., E. S. Rubin, and W. M. Boyce. 2002. Fecal DNA analysis and risk assessment of mountain lion predation of bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 66:75-85.
- Farrell, L. E., J. Roman, and M. E. Sunquist. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9:1583-1590.
- Fedriani, J. M., and M. Kohn. 2001. Genotyping faeces links individuals to their diet. *Ecology Letters* 4:477-483.
- Fernando, P., T. N. C. Vidya, C. Rajapakse, A. Dangolla, and D. J. Melnick. 2003. Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality? *Journal of Heredity* 9:115-123.
- Foran, D. R., K. R. Crooks, and S. C. Minta. 1997. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. *Wildlife Society Bulletin* 25:835-839.
- Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. K. Wayne, and M. H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* 7:1423-1428.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 86:6196-6200.
- Kohn, M. H., E. C. York, D. A. Kamradt, G. Haught, R. M. Sauvajot, and R. K. Wayne. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 266:657-663.
- Lehman, N., A. Eisenhawer, K. Hansen, L. D. Mech, R. O. Peterson, P. J. P. Gogan, and R. K. Wayne. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. *Evolution* 45:104-119.
- National Agricultural Statistical Service. 2000. Sheep and goat predator loss. Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., U.S.A.
- National Agricultural Statistical Service. 2001. Cattle predator loss. Agricultural Statistics Board, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., U.S.A.
- Neale J. C. C., B. N. Sacks, M. M. Jaeger, and D. R. McCullough. 1998. A comparison of bobcat and coyote predation on lambs in north-coastal California. *Journal of Wildlife Management* 62:700-706.
- Ostrander, E. A., G. F. Sprague, Jr., and J. Rine. 1993. Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)<sub>n</sub> markers for genetic mapping in dog. *Genomics* 16:207-213.
- Paetkau, D. and C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-495.
- Palomares, F., J. A. Godoy, A. Piriz, S. J. O'Brien, and W. E. Johnson. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11: 2171-2182.
- Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls, and R. Fleischer. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* 6:483-486.
- Pilgrim, K. L., D. K. Boyd, and S. H. Forbes. 1998. Testing for wolf-coyote hybridization in the Rocky Mountains using mitochondrial DNA. *Journal of Wildlife Management* 62: 683-689.



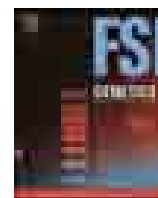
- 
- Roy, M. S., E. Geffen, D. Smith, E. A. Ostrander, and R. K. Wayne. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 11:553-570.
- Scribner, K. T., and T. D. Bowman. 1998. Microsatellites identify depredated waterfowl remains from glaucous gull stomachs. *Molecular Ecology* 7:1401-1405.
- Shaw, C. N., P. J. Wilson, and B. D. White. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy* 84:123-128.
- Sweet, D., and D. Hildebrand. 1999. Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report. *International Journal of Legal Medicine*. 112:201-203.
- Taberlet, P., L. P. Waits, and G. Luikart. 1999. Noninvasive sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 8:323-327.
- Vilà, C., C. Walker, A.-K. Sundqvist, Ø. Flagstad, Z. Anderson, A. Casulli, I. Kojola, H. Valdmann, J. Halverson, and H. Ellegren. 2003. Combined use of maternal, paternal and biparental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity* 90:17-24.
- Williams, C. L., K. Blejwas, J. J. Johnston, and M. M. Jaeger. 2003a. Temporal genetic variation in a coyote (*Canis latrans*) population experiencing high turnover. *Journal of Mammalogy* 84:177-184.
- Williams, C. L., K. Blejwas, J. J. Johnston, and M. M. Jaeger. 2003b. A coyote in sheep's clothing: predator identification from saliva. *Wildlife Society Bulletin* 31:1-7.
- Woods, J. G., D. Paetkau, D. Lewis, B. N. McLellan, M. Proctor, and C. Strobeck. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27:616-627.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Forensic Science International: Genetics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsig](http://www.elsevier.com/locate/fsig)



### Case report

# Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches

Romolo Caniglia<sup>a,\*</sup>, Elena Fabbri<sup>a</sup>, Luigi Mastrogiuseppe<sup>b</sup>, Ettore Randi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio di Genetica, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), Via Cà Fornacetta 9, 40064 Ozzano dell'Emilia (Bo), Italy

<sup>b</sup> Dipartimento di Prevenzione U.O. Igiene degli Allevamenti e delle Produzioni Zootecniche, Azienda Sanitaria Regionale Molise, Piazza della Vittoria 14, 86100 Campobasso (CB), Italy

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 12 July 2012

Received in revised form 31 October 2012

Accepted 5 November 2012

##### Keywords:

*Canis lupus*

Forensic molecular genetics

Livestock predation

Microsatellites

mtDNA

Salivary samples

#### ABSTRACT

Molecular identifications of salivary DNA are increasingly applied in wildlife forensic investigations, and are successfully used to identify unknown livestock predators, or elucidate cases of large carnivore attacks to humans. In Europe most of livestock predations are attributed to wolves (*Canis lupus*), thought free-ranging dogs are sometime the responsible, and false predations are declared by breeders to obtain compensations. In this study we analyzed 33 salivary DNA samples collected from the carcasses of 13 sheep and a horse presumably predated by wolves in seven farms in central Italy. Reliable individual genotypes were determined in 18 samples (corresponding to samples from nine sheep and the horse) using 12 unlinked autosomal microsatellites, mtDNA control-region sequences, a male-specific ZFX/ZFY restriction-site and four Y-linked microsatellites. Results indicate that eight animals were killed by five wolves (a male and four different females), the ninth by a female dog while the horse was *post-mortem* consumed by a male dog. The genotype of one female wolf matched with the genetic profile of a female wolf that was non-invasively sampled 4 years before in the same area near livestock predation remains. Genetic identifications always supported the results of veterinary reports. These findings show that salivary DNA genotyping, together with detailed veterinary field and necropsy reports, provides evidence which helps to correctly identify species, gender and individual genetic profiles of livestock predators, thus contributing to clarify attack dynamics and to evaluate the impact of wolf predations on husbandry.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The conservation of large carnivores (brown bear *Ursus arctos*, wolf *Canis lupus*, lynx *Lynx lynx*, and wolverine *Gulo gulo*) in developed European countries is strictly conditioned not only by habitat and prey availability, but also by conflicts with local communities and stakeholders: livestock breeders and hunters [1,2]. Conflicts are mainly caused by predations on domestic ungulates, or by presumed competition with hunters for the same wild ungulate prey [3]. Conservation plans pay particular attention to minimize damages through prevention measures or economical compensations [4]. Unfortunately, these policies are not always efficient, and they are sometime implemented without the necessary technical expertise [5]. Thus, stakeholder pressures fuel uncontrolled illegal killings of wild carnivores, which are almost everywhere protected by national legislation [6,7]. Negative public

opinion [8] might, moreover, push managers and politicians to launch more drastic predator control plans [9,10].

The wolf is the most widespread large carnivore in Europe [11]. After centuries of population decline and range contraction, wolves are now expanding recolonizing parts of their historical ranges, reappearing not only in natural areas, but also in developed agricultural regions [12–14]. Wolves preferentially predate on wild animals [11,15], but, when available, they certainly do not ignore domestic ungulates [16]. It is estimated that about 10,000 livestock per year are killed by wolves in Europe [17]. Wolf predations might be confused with those of other carnivores, mainly free-ranging domestic dogs, which are widespread in south European countries [18]. Dog predations might be ascertained through skilful evaluations of the evidence collected on killing sites, through the identification of scat or hair samples, the size and spacing of bite wounds on prey, and the behavioural pattern of the attacks [19]. However, confusing field conditions or the insufficient skill of technicians makes it often difficult to obtain correct identifications [20]. In these cases, wolves are innocently blamed, exacerbating the anger of stakeholders and managers. Moreover, some countries generically compensate for canid damages,

\* Corresponding author. Tel.: +39 051 6512251; fax: +39 051 796628.

E-mail address: [romolo.caniglia@isprambiente.it](mailto:romolo.caniglia@isprambiente.it) (R. Caniglia).

regardless of whether predators are wolves or dogs [17]. These strategies are very inefficient, because compensation costs significantly increase and breeders are encouraged to report false predations. Sound management plans, targeted to minimize frauds and reduce compensation costs, require realistic evaluations of the impact of wolf predations. Thus, there is a need to implement adequate procedures for the identification of predators. Recent developments in forensic veterinary medicine and non-invasive genetics can offer a contribution [21–25].

Molecular techniques and genetic databases are being used to identify species, individuals and gender in DNA extracted from biological samples such as hair, faeces, urine and blood traces, collected in and near predation sites [26], and from saliva samples collected from bitten skins [27–29]. Here we report the results of a case-study planned to evaluate the power of non-invasive molecular genetic methods to identify the predator species, if wolves or dogs, in areas of the Italian Apennines. We collected salivary DNA from the bodies of 13 killed sheep and a horse. They were genotyped at the mtDNA control-region (diagnostic for the Italian wolf population [30]), 12 unlinked autosomal microsatellites (which are informative to identify wolves, dogs and their first two generation hybrids [31]), a male-specific restriction-site of the ZFX/Y gene (used to sex samples [32]), and four Y-linked microsatellites (used to identify paternal autosomal haplotypes [33]). Multilocus genotypes were matched to a large database of Italian wolf and dog genotypes (the ISPRa *Canis* database; [34]) and used to: (i) identify their population of origin: dogs, wolves or hybrids; (ii) estimate the minimum number of individuals presumably involved in the predation events; and (iii) search for matches between salivary DNA and the genetic profiles of the livestock-guard dogs owned by attacked farmers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample collection

Salivary swab samples were collected from bite wounds on 10 sheep and three lambs that were killed or injured by unidentified canids during seven attacks that occurred from February to August 2010 in six different farms (named A, B, C, D, E and F in Table 1) in central Italy (Molise Region, Campobasso Province). In another farm (G) we collected salivary swab samples from the body of a female horse that, according to the breeder, was killed by wolves. However, the veterinary necropsy showed that the horse died due to natural causes (intestinal obstruction) and it was apparently *post-mortem* consumed by unknown carnivores. The sheep farms had between 3 and 150 heads of livestock and, with the exception of farm G, were protected by fencing shelters 1.5–2.0 m high. Farms B, D, G used also trained guard dogs (Table 1).

Predators' bites were identified by the presence of sub-dermal haemorrhages behind the wounds. It is well known that, in contrast, consumers' bites do not show such kind of haemorrhages [35]. We collected from one to six samples per wound for a total of 33 samples (Table 1), using dry sterile cotton swabs, rubbed around the edge of the bites, that were stored dry. Skin and tissue fragments were cut around the bites too, and stored in 10 volumes of 95% ethanol. Samples from multiple bites in the same carcass were collected and stored separately. All samples (except in farm E) were collected from killings that occurred less than 36 h before the inspection. Salivary DNA degradation was assessed by replicating sampling from two injured sheep in farm F after ca. 72 h. Finally, we collected three mouth swabs from the guard dogs in farms B and D to check for matches with the putative predators. Unfortunately we were not permitted to sample the two guard dogs in farm G, where the horse died.

Detailed veterinary reports were compiled, reporting descriptions of predation patterns, location, size and shape of bite wounds in prey bodies, results of necropsies, presumed day of death, identification of putative predators, exclusion of alternative causes of death, evidences of *post-mortem* consumption by scavengers [19,35]. All samples were collected, shipped to the laboratory and genetically analyzed blind, without any reference to the results of the veterinary reports. Molecular and veterinary identifications were compared only at completion of the laboratory analyses.

### 2.2. Microsatellites and mtDNA genotyping

Total DNA was extracted using the Zymo Research Quick-DNA™ MiniPrep kit (Zymo Research Corporation, USA), with the following two small variations of the standard protocol described by the manufacturer: (1) to improve DNA quantity and quality, the extractions were preceded by a pre-digestion step; each sample was digested at 56 °C for 45 min in a lysis buffer containing 175 µL white cell lysis buffer (WCLB), 20 µL proteinase K (for the enzymatic digestion of membranes and other protein structures) and 5 µL 10% sodium dodecyl sulphate solution (SDS; an anionic detergent that solubilizes cell membranes and denatures the proteins) and (2) the DNA samples were recovered through a final elution in 100 µL of 10 mM TE (Tris–EDTA) buffer.

Each DNA sample was used to PCR-amplify 12 canine unlinked autosomal microsatellite loci (STR; short tandem repeat): seven dinucleotides (CPH2, CPH4, CPH5, CPH8, CPH12; C09.250 and C20.253) and five tetranucleotides (FH2004, FH2079, FH2088, FH2096 and FH2137), selected for their high polymorphism and reliable scorability in wolves and dogs [36], and used for individual identification in a long-term non-invasive monitoring project of the Italian wolf population and in forensic applications [23,34,36]. Preliminary testing showed that these markers do not amplify domestic or wild ungulate DNA [32]. The probability-of-identity [37], that is, the probability of finding, by chance, more than one individual with the same genotype (shadow effect; [38]) with this panel of 12 STR loci was:  $PID = 3.2 \times 10^{-10}$  (among unrelated individuals),  $PIDSibs = 1.1 \times 10^{-4}$  (among full sibs) as estimated using 1086 not related Italian wolf genotypes (these probabilities were not corrected for substructure, which was never detected in the recently expanding wolf population of the Apennines [11]); and  $PID = 5.3 \times 10^{-12}$  and  $PIDSibs = 4.2 \times 10^{-5}$  in 405 dogs. Samples were sexed by a PCR-RFLP assay of the zinc-finger protein genes ZFX/Y [32], and paternal haplotypes, characterized by different allele frequencies in dogs and wolves [39], were identified by four Y-linked STR (MS34A, MS34B, MSY41A and MS41B [33]).

DNA samples were genotyped using a multiple-tube protocol requiring from four to eight independent amplifications per locus [36,40]. After the first four replicates, samples showing  $\leq 50\%$  positive PCR (PCR+) over a total of 48 amplifications at the 12 autosomal STR loci were discarded. A reliability analysis (with software RELIOTYPE; [41]) was performed on samples showing  $> 50\%$  PCR+, and unreliable loci (at threshold  $R < 0.95$ ) were additionally replicated four times. Only complete genotypes, which obtained a final  $R > 0.95$  were definitively accepted. Consensus genotypes were reconstructed using GIMLET v. 1.3.3 [42] and the following rules: heterozygotes were accepted only if the two alleles were seen at least in two replicates; homozygotes were accepted only if one and only one allele was seen at least in four replicates. The consensus genotypes were matched among them and with the ISPRa *Canis* database, using GenALEX v. 6.4 [43].

The panel of autosomal and Y-linked STR loci was amplified in seven multiplexed primer mixes using the QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany), an Applied Biosystems Thermal Cycler (ABI GeneAmp® PCR System 9700) and the following thermal profile: 94 °C/15 min, 94 °C/30 s, 57 °C/1 min and 30 s,

**Table 1**

Description of the attacked farms.

Farm	Locality	N <sup>a</sup>	F <sup>b</sup>	HD <sup>c</sup>	A <sup>d</sup>	P <sup>e</sup>	H/A <sup>f</sup>	S <sup>g</sup>	ID <sup>h</sup>	SK <sup>i</sup>	SD <sup>l</sup>	PMI <sup>m</sup>	T <sup>n</sup>	E <sup>o</sup>	H <sup>p</sup>
A	Riccia	15	1	0	1	2	2	L	CB2	RS	15/02/10	>24 < 36	6		20.00–07.00
A	Riccia							L	CB3	RS	15/02/10	>24 < 36	6		20.00–07.00
B	Petrella	130	2	2 (1F, 1M)	1	1	1	S	CB5	S	10/05/10	1	20		17.00–17.30
C	Tufara	15	1.5	0	1	1	1	S	CB6A	S	12/05/10	>24 < 27	25		5.30–7.00
C	Tufara							S	CB6B	S	12/05/10	>24 < 27	25		19.30–08.00
C	Tufara							S	CB6C	RS	12/05/10	>24 < 27	25		19.30–08.00
D	Pietracatella	50	1.5	1 (1M)	1	1	1	S	CB9A	S	20/07/10	4	35		20.00–06.30
D	Pietracatella							S	CB9B	S	20/07/10	4	35		20.00–06.30
D	Pietracatella							S	CB9C	S	20/07/10	4	35		20.00–06.30
D	Pietracatella							S	CB9D	RS	20/07/10	4	35		20.00–06.30
E	Gambatesa	20	1.80	0	1	1	1	S	CB10	S	26/07/10	>72	29	PT	7.00–7.30
F	Tufara	20	1.80	0	1	7	3	S	CB11A	S	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB11B	S	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB11C	S	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB11D	RS	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB11E	RS	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB11F	RS	31/07/10	>3 < 14	25	WG	20.00–7.00
F	Tufara							S	CB12	S	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							L	CB13A	S	31/07/10	>3 < 14	25	AR	20.00–7.00
F	Tufara							L	CB13B	S	31/07/10	36	23	AR	20.00–7.00
F	Tufara							L	CB13C	RS	31/07/10	36	23	AR	20.00–7.00
F	Tufara				2		4	S	CB14A <sup>q</sup>	S	17/08/10	>3 < 7 <sup>q</sup>	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB14B <sup>q</sup>	RS	17/08/10	>3 < 7 <sup>q</sup>	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB15A <sup>q</sup>	S	17/08/10	>3 < 7 <sup>q</sup>	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB15B <sup>q</sup>	RS	17/08/10	>3 < 7 <sup>q</sup>	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB16A	S	17/08/10	>3 < 7	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB16B	RS	17/08/10	>3 < 7	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB17A	S	17/08/10	>3 < 7	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB17B	RS	17/08/10	>3 < 7	36		03.00–06.00
F	Tufara							S	CB14C <sup>r</sup>	RS	20/08/10	72 <sup>r</sup>	34	PT	03.00–06.00
F	Tufara							S	CB15C <sup>r</sup>	RS	20/08/10	72 <sup>r</sup>	34	PT	03.00–06.00
G	Sepino	3	0	2 (2M)		1	1	H	CB4A	RS	27/04/10	>24 < 36	16		20.00–08.00
G	Sepino	3						H	CB4B	S	27/04/10	>24 < 36	16		20.00–08.00

<sup>a</sup> N, number of raised animals<sup>b</sup> F, high in m of the fend.<sup>c</sup> HD, number and sex (F=females; M=males) of herding dogs.<sup>d</sup> A, number of attacks for each farm<sup>e</sup> P, number of preyed individuals<sup>f</sup> H/A, number of preyed heads per attack.<sup>g</sup> S, species (L, lamb; S, sheep; H, horse).<sup>h</sup> ID, sample identification: same numbers with different letters indicate multiple samples from a same prey.<sup>i</sup> SK, sample kind (RS, rubbed skin; S, saliva).<sup>l</sup> SD, sampling date: dd/mm/yy.<sup>m</sup> PMI, time (in h) between the attack and sample collection.<sup>n</sup> T, environmental temperature (°C) at which sampling was performed.<sup>o</sup> E, event that could influence genetic results (PT, prolong time after death; AR, abundant rainfall; and WG, wound far from rain and protected by ground).<sup>p</sup> H, estimated horary interval at which attacks occurred.<sup>q</sup> Samples from injured sheep.<sup>r</sup> Samples from the injured sheep after they died.

72 °C/1 min (40 cycles), followed by a final extension step of 72 °C/10 min. Amplifications were carried out in 10 µL total volume including: 2 µL DNA solution, 5 µL QIAGEN Multiplex PCR Kit, 1 µL QIAGEN Q solution, 0.4 µM deoxynucleotide triphosphates (dNTP), from 0.1 up to 0.4 µL of 10 µM primer mix (forward and reverse) and RNase-free water up to the final volume.

The first 250 bp of the mtDNA control-region, which contain diagnostic mutations for the identification of the Italian wolf haplotype W14, were amplified in 10 µL PCR, including 2 µL DNA and 0.3 pmol of the primers WDloopL (TCCCTGACACCCCTACATTC) and WDloopH254 (GTTTCTCGAGGCATGGTGAT), using the following thermal profile: 94 °C/2 min, 94 °C/15 s, 55 °C/15 s, 72 °C/30 s (40 cycles), followed by a final extension of 72 °C/5 min. PCR products were purified using exonuclease/shrimp alkaline phosphatase (Exo-Sap; Amersham) and sequenced in both directions using the ABI Big Dye Terminator kit with the following steps (25 cycles): 96 °C/10 s, 55 °C/5 s, and 60 °C/4 min of final extension. PCR products were analyzed in an ABI 3130 XL automated sequencer. The allele sizes of the STR loci were estimated using the

ABI GENEMAPPER V. 4.0 software. Sequences were visually edited, and aligned using SEQSCAPE V. 2.5 (ABI) and BioEDIT V. 7.0.1 [44]. Salivary DNA was extracted, amplified and genotyped in three separate rooms only dedicated to low-template DNA samples, under sterile UV laminar flood hoods. Negative (no biological sample during extraction and no DNA in PCR) and positive (a wolf DNA sample of good quality and with known genotype) controls were always used to check, during each step, for possible contaminations and correct allelic assignment, respectively.

### 2.3. Variability and error rate analysis

GIMLET was used to compute the proportion of PCR+ (the number of successful PCR divided by the total number of PCR runs across samples) per locus and per sample, the rate of allelic drop-out (ADO, the number of allelic drop-outs over the number of successful amplifications of heterozygous genotypes at a given locus) and false alleles (FA, the number of amplifications leading to one or more false alleles at a locus over the total number of

successful amplifications at that locus) [45]. GENALEX was used to estimate genetic variability and population diversity parameters such as probability-of-identity and match-probability values.

#### 2.4. Bayesian assignment analyses

STRUCTURE V. 2.3.1 [46] was used to assign the genotypes to their population of origin, independent of any prior non-genetic information. Reference wolf ( $n = 168$ ) and dog ( $n = 160$ ) genotypes were randomly sampled from the ISPRA *Canis* database. Wolves, sampled from across the species' distribution range in Italy, had the typical coat colour pattern and did not show any detectable phenotypic and genetic signals of hybridization [31]. For

comparative purposes we also included three captive-bred male wolf  $\times$  female dog F1 hybrids. We run STRUCTURE with five repetitions of  $10^5$  iterations following a burn-in period of  $10^4$  iterations, selecting the "admixture" (each individual may have ancestry in more than one parental population) and the "I" (independent allele frequencies) models. The optimal number of populations  $K$  was identified running the software with  $K = 1-10$  and using the  $\Delta K$  statistics implemented in STRUCTURE HARVESTER v.0.6.7 [47]. The unknown individual genotypes were assigned to one cluster (wolves or dogs) if the proportion of membership was  $q_i \geq 0.97$  (see results), or to both clusters if the proportion of membership was  $q_i < 0.97$  (admixed individuals). STRUCTURE results were compared with those obtained using the Paetkau et al.'s [48]

**Table 2**

Molecular identification of the saliva and rubbed skin the samples collected of prey, and their correspondent veterinary diagnosis.

Farm	ID <sup>a</sup>	GE <sup>b</sup>	mtDNA <sup>c</sup>	Y-STR <sup>d</sup>	SP <sup>e</sup>	S <sup>f</sup>	PH <sup>g</sup>	VD <sup>h</sup>
A	CB2	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
A	CB3	WCB1M	W14	U	Wolf	M	1	Wolf intra vitam
B	CB5	DCB2F	D8		Dog	F	1	Dog intra vitam
C	CB6A	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
C	CB6B	WCB2F	W14		Wolf	F		
C	CB6C	WCB2F	W14		Wolf	F		
D	CB9A	WCB3F	W14		Wolf	F	1	Wolf intra vitam
D	CB9B	WCB3F	W14		Wolf	F		
D	CB9C	nd	nd	nd	nd	nd		
D	CB9D	WCB3F	W14		Wolf	F		
E	CB10	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
F	CB11A	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
F	CB11B	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB11C	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB11D	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB11E	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB11F	WCB4F	W14		Wolf	F		
F	CB12	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
F	CB13A	nd	nd	nd	nd	nd	1	Wolf intra vitam
F	CB13B	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB13C	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB14A	WCB5F	W14		Wolf	F	1	Wolf intra vitam
F	CB14B	WCB5F	W14		Wolf	F		
F	CB15A	WCB5F	W14		Wolf	F	1	Wolf intra vitam
F	CB15B	WCB5F	W14		Wolf	F		
F	CB16A	WCB5F	W14		Wolf	F		
F	CB16B	WCB5F	W14		Wolf	F	1	Wolf intra vitam
F	CB17A	WCB5F	W14		Wolf	F	1	Wolf intra vitam
F	CB17B	WCB5F	W14		Wolf	F		
F	CB14C	nd	nd	nd	nd	nd		
F	CB15C	nd	nd	nd	nd	nd		
G	CB4A	DCB1M	D8	D-H6	Dog	M	1	Dog post mortem
G	CB4B	DCB1M	D8	D-H6	Dog	M		

<sup>a</sup> ID, sample identification.

<sup>b</sup> GE, genetic identification (W, wolf; D, dog) CB, Campobasso Province of the Molise Region; F, female; and M, male.

<sup>c</sup> mtDNA, mitochondrial control region haplotypes.

<sup>d</sup> Y-STR, Y-linked STR haplotypes detected in males.

<sup>e</sup> SP, specie identification.

<sup>f</sup> S, sex.

<sup>g</sup> PH, number of predated heads per farm and per attack.

<sup>h</sup> VD, veterinary diagnosis explaining if livestock heads were intra vitam killed or post mortem scavenged by wolves or dog as veterinary autopsy performed on each carcass suggested.

nd, information not detectable.



frequency-based assignment test in GENALEX. Individual multilocus scores were visualized by a Factorial Correspondence Analysis (FCA [49]) in GENETIX V. 4.05 [50].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Identification of the individual multilocus genotypes

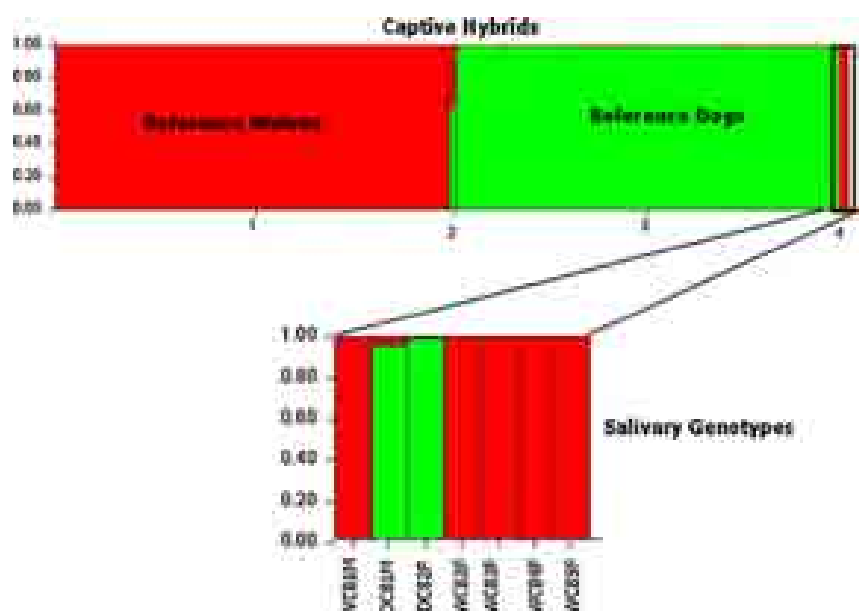
The first step of the multi-tube protocol led to discard 14 samples (42%) that showed  $\text{PCR}^+ \leq 0.50$  (i.e.,  $\leq 24/48$  amplifications per locus on average overall the 12 autosomal STR loci). The two samples replicated in farm F after ca. 72 h did not amplify, suggesting fast degradation rates in salivary DNA samples [18,20]. The other 19 samples (58%) successfully passed the first step, showing  $\text{PCR}^+ > 0.50$ . Thirteen of them (40%) had reliability scores  $R > 0.95$  and were directly accepted. The other six samples with  $R < 0.95$  were further amplified four times at unreliable loci. Only one of these samples was discarded, while the other five reached the threshold  $R > 0.95$  and were definitely accepted. Thus, 18 (55%) salivary samples were reliably and completely genotyped at all the 12 autosomal STR markers (Table 2). Their average allelic drop-out and false allele rates were:  $\text{ADO} = 0.19$  ( $\text{SE} = 0.05$ ) and  $\text{FA} = 0.026$  ( $\text{SE} = 0.010$ ), within the ranges of the error rates reported in other salivary and non-invasive DNA identification studies [22,36]. We did not observe significant differences ( $P = 0.70$ ,  $\chi^2$  test) in genotyping success between DNA extracted from prey skins ( $n = 9/15$ ) or swabbed samples ( $n = 9/18$ ), contrary to what we expected assuming that prey blood traces in skins might inhibit PCR efficiency [28]. Genotyping success was independent from the external temperature at which the samples were collected ( $P = 0.73$ ;  $\chi^2$  test), but it was strongly related ( $R = -0.560$ ;  $P = 0.005$ ) to sample freshness (time interval between predation events and sample collection; Table 2). Although the sample size used in this study was not large enough to generalize, it is apparent that external environmental conditions might affect the rates of salivary DNA degradation and genotyping success [29,51].

The 18 complete genotypes were assigned to seven distinct individuals, five females and two males. One male had the dog Y-STR haplotype D (that was detected in 36% of the 225 male dogs in the ISPRA *Canis* database [34]). The other male had the most frequent Italian wolf Y-STR haplotype named U by Caniglia et al. [34] or H1 by Iacolina et al. [39], which was detected in 81% of the 670 male wolves in the ISPRA *Canis* database. Analyses of the mtDNA control-region showed that 15 over 18 salivary DNA sequences exactly matched the diagnostic Italian wolf haplotype W14. The other three sequences matched the dog haplotype D8, which has been included into the dog cluster C1 [30]. The male with the dog Y-STR haplotype D had the dog mtDNA haplotype D8; the male with the wolf Y-STR haplotype U had the Italian wolf mtDNA haplotype W14 (Table 2). Hence, maternal mtDNA and paternal Y-STR haplotypes concordantly identified presumed wolf or dog DNA samples.

#### 3.2. Assignment of the salivary genotypes to dog or wolf reference populations

The optimal number of genetic clusters in the wolf and dog reference samples was  $K = 2$ , which showed the largest  $\Delta K$  value and average  $\ln P(D) = -8554.12$  (with  $K = 1$  the average  $\ln P(D)$  was  $-10,824.06$ ; with  $K > 2$  values of the average  $\ln P(D)$  were  $\leq -8501.16$ ). At  $K = 2$ , all reference dogs were assigned to the same cluster with average  $q_d = 1.00$  (90% CI: 0.97–1.00), while all reference wolves were assigned to the other cluster with  $q_w = 1.00$  (90% CI: 0.99–1.00; Fig. 1). None of the dogs or wolves was assigned to their respective clusters with individual assignment values  $q_i < 0.97$ . Individual  $q_i$  ranged between  $0.97 < q_d < 1.00$  in dogs; and between  $0.99 < q_w < 1.00$  in wolves. In contrast, the known captive hybrids were partially assigned to both clusters with individual assignment values ranging between  $0.36 < q_w < 0.43$ .

Two genotypes (one male and one female) of the seven individual salivary samples were assigned to the dog cluster with individual  $q_d = 0.97$  (90% CI: 0.81–1.00; genotype DCB1M) and



**Fig. 1.** Assignment of seven canid salivary genotypes (determined at 12 multilocus autosomal microsatellites) to a reference Italian wolf (left side of the plot, in red) and to a reference dog (right side, in green) genetic cluster, obtained with STRUCTURE [46] analyses assuming  $K = 2$  clusters and with the “admixture” and “ $T$ ” models. Each individual is represented by a vertical bar fragmented in two coloured sections, according to their proportion of membership to the wolf or dog cluster. Two salivary genotypes (DCB1M and DCB2F) were assigned to the reference dog population with  $q_d \geq 0.97$ , while the other five genotypes were assigned to the wolf population with individual  $q_w > 0.97$ . Three known captive wolf  $\times$  dog hybrids have been included for comparative purposes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

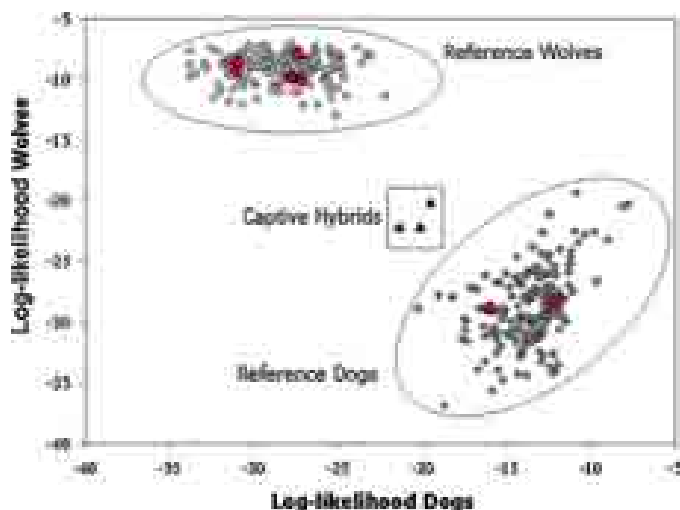


Fig. 2. Graphical plotting of the log-likelihood of reference wolf (light grey dots), reference dog (dark grey dots), known captive hybrids (black triangles) and salivary (red dots) genotypes, estimated by Paetkau et al.'s frequency-based assignment test [48] as implemented in GenAlec [43]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

$q_d = 1.00$  (90% CI: 0.99–1.00; genotype DCB2F). The other five genotypes (one male and four females) were assigned to the wolf cluster, all with individual  $q_w = 1.00$  and 90% CI ranging from 0.98 to 1.00 (Fig. 1; Table 2). The frequency-based population assignment test in GENALEX confirmed STRUCTURE results, assigning all reference dogs and wolves to their own clusters. The two dogs and the five wolves identified in the salivary DNA samples were, respectively, assigned to the reference dog and wolf clusters with probability  $P = 1.00$ . The three captive hybrids were assigned to a third distinct cluster (Fig. 2). The FCA plot showed that reference dogs and wolves plot separately, and that the three captive hybrids are intermediate (Fig. 3). The two dog salivary genotypes (DCB1M and DCB2F) were included within the reference dog cluster, while the five wolf salivary genotypes plot within the reference wolf cluster. Thus, all assignment procedures concordantly led to identify two dogs and five wolves among the salivary DNA samples, concordantly with the mtDNA and Y-STR haplotype identifications.

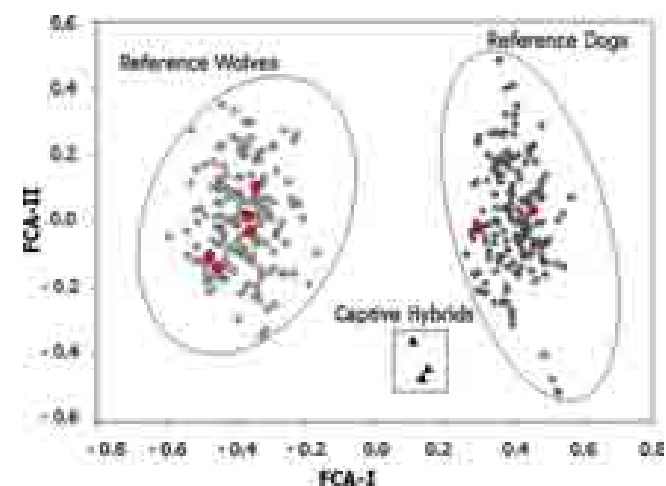


Fig. 3. Scores of individual reference wolf (light grey dots), reference dog (dark grey dots), known captive hybrids (black triangles) and salivary (red dots) genotypes plotted on the first two axes of a factorial correspondence analysis (FCA) performed using GENETIX [50]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

The two dog salivary genotypes did neither match with the genotypes of the two guard dogs sampled in farms B and D, nor with the canine DNA profiles in the ISPRA database. The wolf salivary genotypes did not match with the genetic profiles of wolves in the ISPRA database, except for genotype WCB3F, corresponding to the female wolf responsible for the sheep killing at farm D, which perfectly matched the genotype of a female wolf named W922F in the database. This wolf was identified from DNA extracted from hair samples collected in 2006 in a farm about 70 km far from farm D, where 13 sheep were predated. We also successfully genotyped the two salivary samples collected from the horse that died in farm G, which, concordantly with the veterinary response, but in contrast with the owner opinion, were both assigned to a male dog never sampled before (Table 2).

### 3.3. Reconstructing the dynamics of predations

We identified the genetic profile of single predators in the DNA samples from each prey reliably genotyped, thus we could not find evidence that any of the killed or injured sheep was attacked by more than one individual (Table 2). Attacks were all nocturnal, confirming the crepuscular hunting behaviour of the wolf [11]. In contrast, the dog predation in farm B occurred in the afternoon (Table 1). Four of the five attacks were carried out by females: three wolves and a dog. Most of the wolf attacks occurred in May, July and August, as it is usual in central Italy [52]. The six farms in which predations occurred were no more than 15 km apart in a straight line, a distance that can be easily covered in less than a night by wolves [53]. However, each predator apparently acted alone and only in one single farm. We detected a single case in which the same wolf (WCB5F) killed a number of sheep, during the second attack in farm F (Table 2). We cannot exclude that in cases of multiple killings individual wolves might kill multiple prey [11]. The contemporarily presence of more wolves in these farms could be not excluded. It is also plausible that, in a longer period, the same wolves could predate in more than one farm during consecutive occasions.

## 4. Conclusions

Wolves in Italy are expanding, recolonizing areas from where they have been absent for decades, and breeders have long abandoned traditional sheep' defense methods [17]. At the same time, also the number of free-ranging dogs is increasing, particularly in central and southern Italy [18]. Thus, numbers and costs of livestock predations are significantly increasing [17]. Reliable information on the frequency and patterns of wolf and dog predations is needed to prevent or minimize damages [15,54,55]. The use of DNA evidence, integrated in an appropriate sampling scheme, can contribute to identify true wolf attacks and solve false predations. In this case-study, species and individual genetic profiles of the predators have been obtained from salivary DNA samples. All molecular identifications confirmed the presumptive conclusions reached by veterinary reports, thus contributing to produce strongly supported objective certifications of the most likely causes of livestock death. We recommend that samples are collected by trained veterinaries, which should be able to describe the environmental context of predation events, the lesion patterns observed on the prey, unmask fraudulent prey manipulations by owners, and identify *post-mortem* consumption by scavengers. Salivary samples should be collected as fresh as possible, in any case less than 36 h after the predations [19]. DNA contaminations from multiple individuals or scavengers might be avoided by collecting swab samples from wounds caused by a single tooth. Multiple samples from each prey might ensure that at least some of them will provide enough DNA for genetic analyses



[22]. Improved salivary DNA extraction protocols [56] and whole genome amplification methods [57] might help to raise the rates of PCR success, reduce PCR errors, thus making more efficient the use of low quality DNA samples. Novel genomic methods will soon allow genotyping large panels of diagnostic markers using DNA microarrays or other very efficient SNP platforms [57] for reliable identification of wolf and dog DNA [58]. Integrated surveillance programmes, using non-invasive genetics and camera-trapping methods in areas of recurrent livestock predations could produce the information needed to quantify the risk and adopt efficient prevention actions.

## Acknowledgements

This study was supported by the Italian Ministry of Environment. Laboratory and data analyses were carried out at ISPRA by R. Caniglia and E. Fabbri. Field inspections, sample collection, necropsies and veterinary reports were done by L. Mastrogioseppe. E. Randi, head of the Laboratory of genetics at ISPRA, managed and supervised the project. We are deeply indebted to H.B. Ernest (School of Veterinary Medicine, University of Davis, California, USA) and our colleagues at ISPRA: C. Mengoni, N. Mucci, A. Palladini, A. Viglino and M. Galaverni, for insights and help with DNA extraction from salivary samples and data elaboration. We are particularly grateful to the FSI Associated Editor and two anonymous referees for their comments that helped to improve an early version of this manuscript.

## References

- [1] J.D.C. Linnell, J. Odden, M.E. Smith, R. Aanes, J.E. Swenson, Large carnivores that kill livestock: do problem individuals really exist? *Wild Soc. Bull.* 27 (1999) 698–705.
- [2] K.M. Berger, Carnivore–livestock conflicts: effects of subsidized predator control and economic correlates on the sheep industry, *Conserv. Biol.* 20 (2006) 751–761.
- [3] U. Breitenmoser, Large predators in the Alps: the fall and rise of man's competitors, *Biol. Conserv.* 83 (1998) 279–289.
- [4] C. Rondini, L. Boitani, Systematic conservation planning and the cost of tackling conservation conflicts with large carnivores in Italy, *Conserv. Biol.* 21 (2008) 1455–1462.
- [5] L. Naughton-Treves, R. Grossberg, A. Treves, Paying for tolerance: rural citizens' attitudes toward wolf depredation and compensation, *Conserv. Biol.* 17 (2003) 1500–1511.
- [6] M. Gusset, M.J. Swarner, L. Mponwane, K. Keletile, J.W. McNutt, Human–wildlife conflict in northern Botswana: livestock predation by endangered African wild dog *Lycaon pictus* and other carnivores, *Oryx* 43 (2009) 67–72.
- [7] K. Safi, N. Pettorelli, Phylogenetic, spatial and environmental components of extinction risk in carnivores, *Global Ecol. Biogeogr.* 19 (2010) 352–362.
- [8] A. Treves, K.U. Karanth, Human–carnivore conflict and perspectives on carnivore management worldwide, *Conserv. Biol.* 17 (2003) 1491–1499.
- [9] A. Zabel, K. Holm-Müller, Conservation performance payments for carnivore conservation in Sweden, *Conserv. Biol.* 22 (2008) 247–251.
- [10] A. Zabel, B. Roe, Optimal design of pro-conservation incentives, *Ecol. Econ.* 69 (2009) 126–134.
- [11] L.D. Mech, L. Boitani (Eds.), *Wolves: Behaviour, Ecology and Conservation*, University of Chicago Press, Chicago, 2003.
- [12] E. Fabbri, C. Miquel, V. Lucchini, A. Santini, R. Caniglia, C. Duchamp, J.M. Weber, B. Lequette, F. Marucco, L. Boitani, L. Fumagalli, P. Taberlet, E. Randi, From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population, *Mol. Ecol.* 16 (2007) 1661–1671.
- [13] J. Aspi, E. Roininen, J. Kiiskila, M. Ruokonen, I. Kojola, L. Bljundnik, P. Danilov, S. Heikkinen, E. Pulliainen, Genetic structure of the north western Russian wolf populations and gene flow between Russia and Finland, *Conserv. Genet.* 10 (2009) 815–826.
- [14] N. Sastre, C. Vilà, M. Salinas, V.V. Bologov, V. Urios, A. Sánchez, O. Francino, O. Ramírez, Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations, *Conserv. Genet.* 12 (2011) 701–712.
- [15] L. Mattioli, C. Capitani, A. Gazzola, M. Scandura, M. Apollonio, Prey selection and dietary response by wolves in a high-density multi-species ungulate community, *Eur. J. Wildl. Res.* 57 (2011) 909–922.
- [16] S. Kaartinen, M. Luoto, I. Kojola, Carnivore–livestock conflicts: determinants of wolf (*Canis lupus*) depredation on sheep farms in Finland, *Biodiv. Conserv.* 18 (2009) 3503–3517.
- [17] L. Boitani, P. Ciucci, E. Raganella-Pelliccioni, Ex-post compensation payments for wolf predation on livestock in Italy: a tool for conservation? *Wildl. Res.* 37 (2010) 722–730.
- [18] K. Cozza, R. Fico, M.L. Battistini, E. Rogers, The damage conservation interface illustrated by predation on domestic livestock in central Italy, *Biol. Conserv.* 78 (1996) 329–336.
- [19] R. Fico, S. Angelucci, I. Patumi, Livestock predation assessment: methods, validation and management outcome, *Biol. Conserv. Fauna (INFS, Bologna)* 115 (2005) 52–63 (in Italian).
- [20] C.L. Williams, J.J. Johnston, Using genetic analyses to identify predators, *Sheep Goat Res. J.* 19 (2004) 85–88.
- [21] J.E. Cooper, M.E. Cooper, Forensic veterinary medicine: a rapid evolving discipline, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 4 (2008) 75–82.
- [22] A. Sundqvist, H. Ellegren, C. Vila, Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey, *Conserv. Genet.* 9 (2008) 1275–1279.
- [23] R. Caniglia, E. Fabbri, C. Greco, M. Galaverni, E. Randi, Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 334–338.
- [24] A.S. Glen, O. Berry, D.R. Sutherland, S. Garretson, T. Robinson, P.J. De Tores, Forensic DNA confirms intraguild killing of a chuditch (*Dasyurus geoffroii*) by a feral cat (*Felis catus*), *Conserv. Genet.* 11 (2010) 1099–1101.
- [25] K.E. Steffens, M.D. Sanders, D.M. Gleeson, K.M. Pullen, C.J. Stowe, Identification of predators at black-fronted tern *Chlidonias albobristatus* nests, using mtDNA analysis and digital video recorders, *N.Z. J. Ecol.* 36 (2012) 48–55.
- [26] D. Onorato, C. White, P. Zager, L.P. Waits, Detection of predator presence at elk mortality sites using mtDNA analysis of hair and scat samples, *Wildl. Soc. Bull.* 34 (2006) 815–820.
- [27] DNA identification of mountain lions involved in livestock predation and public safety incidents and investigations, T.P. Slamon, A.C. Crabb (Eds.), *Proceedings of the 26th Vertebrate Pest Conference*, University of California, Davis, 2000, pp. 290–294.
- [28] C.L. Williams, K. Blejwas, J.J. Johnston, M.M. Jaeger, A coyote in sheep's clothing: predator identification from saliva, *Wildl. Soc. Bull.* 31 (2003) 926–932.
- [29] K. Blejwas, C.L. Williams, G.T. Shin, D.R. McCullough, M.M. Jaeger, Salivary DNA evidence convicts breeding male coyotes of killing sheep, *J. Wildl. Manage.* 70 (2006) 1087–1093.
- [30] E. Randi, V. Lucchini, M.F. Christensen, N. Mucci, S.M. Funk, G. Dolf, V. Loeschcke, Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolf: detecting the consequence of small population size and hybridization, *Conserv. Biol.* 14 (2000) 464–473.
- [31] E. Randi, V. Lucchini, Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation, *Conserv. Genet.* 3 (2002) 29–43.
- [32] V. Lucchini, E. Fabbri, F. Marucco, S. Ricci, L. Boitani, E. Randi, Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps, *Mol. Ecol.* 11 (2002) 857–868.
- [33] A.K. Sundqvist, H. Ellegren, M. Olivier, C. Vilà, Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers, *Mol. Ecol.* 10 (2001) 1959–1966.
- [34] R. Caniglia, E. Fabbri, C. Greco, E. Randi, Non-invasive genetic monitoring of the wolf (*Canis lupus*) population in Emilia-Romagna, in: R. Caniglia, E. Fabbri, C. Greco, E. Randi (Eds.), *Proceeding of the Conference: Scientific Research and Management for Wolf Conservation in Italy*, Nat. Conserv. Rep. 33, MATTM-ISPRA, Bologna, Italy, 2010, pp. 19–66 (in Italian).
- [35] L. Krames, N.W. Milgram, D.P. Christie, Brief report: predatory aggression: differential suppression of killing and feeding, *Behav. Biol.* 9 (1973) 641–647.
- [36] R. Caniglia, E. Fabbri, S. Cubaynes, O. Gimenez, J.D. Lebreton, E. Randi, An improved procedure to estimate wolf abundance using non-invasive genetic sampling and capture-recapture mixture models, *Conserv. Genet.* 13 (2012) 53–64.
- [37] L.P. Waits, G. Luikart, P. Taberlet, Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines, *Mol. Ecol.* 10 (2001) 249–256.
- [38] L.S. Mills, J.J. Citta, K.P. Lair, M.K. Schwartz, D.A. Tallmon, Estimating animal abundance using non-invasive DNA sampling: promise and pitfalls, *Ecol. Appl.* 10 (2000) 283–294.
- [39] L. Iacolina, M. Scandura, A. Gazzola, N. Cappai, C. Capitani, L. Mattioli, F. Vercillo, M. Apollonio, Y-chromosome microsatellite variation in Italian wolves: a contribution to the study of wolf–dog hybridization patterns, *Mamm. Biol.* 75 (2010) 341–347.
- [40] P. Taberlet, S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L.P. Waits, J. Bouvet, Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR, *Nucl. Acids Res.* 24 (1996) 3189–3194.
- [41] C. Miller, P. Joyce, L. Waits, Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood, *Genetics* 160 (2002) 357–366.
- [42] N. Valière, Gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data, *Mol. Ecol. Notes* 2 (2002) 377–379.
- [43] R. Peakall, P.E. Smouse, GenAlex v. 6.1: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Mol. Ecol. Notes* 6 (2006) 288–295.
- [44] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41 (1999) 95–98.
- [45] T. Broquet, N. Menard, E. Petit, Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates, *Conserv. Genet.* 8 (2007) 249–260.

- [46] D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard, Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics* 164 (2003) 1567–1587.
- [47] G. Evanno, S. Regnaut, J. Goudet, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Mol. Ecol.* 14 (2005) 611–620.
- [48] D. Paetkau, W. Calvert, I. Stirling, C. Strobeck, Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears, *Mol. Ecol.* 4 (1995) 347–354.
- [49] J.P. Benzécri, *Data Analysis. Vol. 2. Correspondence Analysis*, Dunod, Paris, France, 1973 (in French).
- [50] K. Belkhir, P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme, GENETIX 4.05, population genetic software in Windows TM, in: *Genome Laboratory, Populations, Interactions*, CNRS UMR 5000, University of Montpellier II, Montpellier, France, 1996–2004 (in French).
- [51] J.L. Stenglein, M. De Barba, D.E. Ausband, L.P. Waits, Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species, *Mol. Ecol. Res.* 10 (2010) 109–114.
- [52] P. Ciucci, L. Boitani, Wolf and dog depredation on livestock in central Italy, *Wildl. Soc. Bull.* 26 (1998) 504–514.
- [53] P. Ciucci, W. Reggioni, L. Maiorano, L. Boitani, Long-distance dispersal of a rescued wolf from the northern Apennines to the western Alps, *J. Wildl. Manage.* 73 (2009) 1300–1306.
- [54] A. Meriggi, S. Lovari, A review of wolf predation in southern Europe: does the wolf prefer wild prey to livestock? *J. Appl. Ecol.* 33 (1996) 1561–1571.
- [55] A. Gazzola, C. Capitani, L. Mattioli, M. Apollonio, Livestock damage and wolf presence, *J. Zool.* 274 (2008) 261–269.
- [56] K. Mitsouras, E.A. Faulhaber, Saliva as an alternative source of high yield canine genomic DNA for genotyping studies, *BMC Res. Notes* 2 (2009) 219–226.
- [57] G. Rincon, K. Tengvall, J.M. Belanger, L. Lagoutte, J.F. Medrano, C. André, A. Thomas, C.T. Lawley, M.S.T. Hansen, K. Lindblad-Toh, A.M. Oberbauer, Comparison of buccal and blood-derived canine DNA, either native or whole genome amplified, for array-based genome-wide association studies, *BMC Res. Notes* 4 (2011) 226–232.
- [58] B.M. vonHoldt, J.P. Pollinger, D.A. Earl, et al., A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids, *Genome Res.* 21 (2011) 1294–1305.