

RISOLUZIONE
DELLA COMUNITÀ DI LAVORO DELLE REGIONI ALPINE (ARGE ALP)
SUL TEMA DELLA
“GESTIONE TRANSFRONTALIERA DEL LUPO”

adottata dalla
53ª conferenza dei Capi di Governo di ARGE ALP il 21 ottobre 2022 a Innsbruck

I Capi di Governo della Comunità di Lavoro delle Regioni Alpine – ARGE ALP – hanno adottato una risoluzione relativa al “Controllo della popolazione di lupo nell’area alpina” in occasione della loro 49ª conferenza tenutasi a Scuol il 29 giugno 2018 nonché una risoluzione su “Agricoltura e alpeggio tradizionali nell’arco alpino minacciati da un ritorno non controllato del lupo” in occasione della loro 51ª conferenza tenutasi a Salisburgo il 30 settembre 2020.

Anche il Comitato Europeo delle Regioni ha emesso diversi pareri sulla questione dei grandi predatori, e più recentemente, durante la sessione plenaria del 26/27 gennaio 2022 nell’ambito del parere “Una visione a lungo termine per le zone rurali dell’UE”, ha invitato a istituire un sistema comune europeo di gestione del lupo e dei grandi predatori.

Gli esponenti governativi competenti in materia di politica agricola provenienti dalle regioni ARGE ALP Baviera, Alto Adige, Trentino, Salisburgo, Vorarlberg e Tirolo hanno posto l’accento su queste rivendicazioni dei Capi di Governo di ARGE ALP e del Comitato Europeo delle Regioni firmando una convenzione di lavoro sulla gestione transfrontaliera del lupo il 10 marzo 2022 a Innsbruck, con la quale promuovono una cooperazione concreta affinché, allo scopo di mantenere un’attività agricola capillare sul territorio montano e di garantire la gestione degli alpeggi montani nelle regioni ARGE ALP, si possa effettuare una gestione del lupo transfrontaliera in accordo con le autorità competenti in materia.

In questo contesto, ARGE ALP afferma che i seguenti obiettivi di merito vengono perseguiti con continuità:

- miglioramento del monitoraggio dei grandi predatori, in particolare del lupo; il monitoraggio deve essere ottimizzato attraverso il coordinamento con gli organismi di monitoraggio nazionali;
- migliore coordinamento delle regole di gestione del lupo o dei piani di gestione del lupo nelle regioni ARGE ALP;

- continuo scambio di esperienze e dati relativi all'andamento dei grandi predatori nelle regioni ARGE ALP e nell'arco alpino;
- facilitazione della comparabilità dei campioni genetici tramite l'armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura per una migliore identificazione della popolazione alpina del lupo e dei suoi spostamenti;
- scambio di esperienze in particolare su misure di protezione delle greggi efficaci e nuovi sviluppi.

Ciò premesso, i Capi di Governo di ARGE ALP decidono, al fine di tutelare l'agricoltura alpina e l'alpeggio, di continuare a sostenere, nell'ambito delle future presidenze e in conformità con l'orientamento strategico di ARGE ALP, la convenzione di lavoro allegata tramite i membri di ARGE ALP, rispettandola il meglio possibile anche a livello nazionale. In quest'ottica, l'attenzione dovrebbe concentrarsi sull'implementazione delle seguenti misure:

- Scambio e confronto di dati annuale tra le regioni ARGE ALP: per ottenere una base comune di dati sull'andamento delle popolazioni di grandi predatori nelle Alpi e sulle ripercussioni della presenza dei grandi carnivori sull'agricoltura di montagna e sulla gestione degli alpeggi alpini, vengono effettuati, su iniziativa della rispettiva regione che esercita la presidenza di ARGE ALP, uno scambio e un confronto dei dati del lupo alle varie aree alpine a intervallo annuale, in modo che i dati siano disponibili entro il 30 giugno di ogni anno. Le regioni partner dichiarano la propria disponibilità a cooperare per una raccolta di dati standardizzata.
- Scambio di dati relativi a lupi specifici (genotipizzati): per tracciare meglio gli spostamenti dei lupi, soprattutto di quelli che migrano attraversando i confini, si procede a uno scambio di dati e, ove necessario, di campioni di DNA dei lupi identificati individualmente (genotipizzati).
- Armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura: i quattro laboratori attualmente incaricati dalle regioni di analizzare i campioni genetici hanno presentato un concetto comune per l'armonizzazione dei metodi di esame genetico "Relazione Workshop" dal 21 giugno 2022. Da parte dei laboratori c'è la volontà di puntare in futuro a una tecnologia uniforme per l'analisi genetica e quindi di consentire una descrizione transnazionale della popolazione dei lupi nella regione alpina.

Per lo sviluppo di uno standard uniforme in tutti e quattro i laboratori partecipanti, sono necessari investimenti iniziali di importo diverso. Questi possono essere visti nel concetto allegato. Le regioni si dichiarano disposte a esaminare la fattibilità del concetto comune presentato dai laboratori incaricati dell'esame dei campioni genetici e a promuovere nei rispettivi Stati nazionali che gli investimenti iniziali necessari siano sostenuti di conseguenza. Inoltre, è necessario un investimento in totale di circa 50.000 euro per la creazione di un database comune per lo spazio alpino. I Capi di Governo di

ARGE ALP accettano di finanziare questo importo con i fondi di ARGE ALP. La manutenzione tecnica continua di questo database deve essere effettuata presso il laboratorio in cui si troverà.

Queste misure rendono possibile per la prima volta l'istituzione di una base di dati comune nonché la creazione dei presupposti per un monitoraggio e una gestione del lupo in modo efficace e uniforme nell'arco alpino, oltre che gettare le basi per una convivenza tra questi legittimi interessi, prestando un importante contributo per preservare l'attività di alpeggio e garantire la salvaguarda dell'agricoltura montana nelle regioni ARGE ALP in un'ottica di reinsediamento del lupo nelle Alpi.

Le suddette misure tecniche per un monitoraggio e –derivato di questo - una gestione del lupo più efficiente e uniforme sono complementari alle risoluzioni già approvate da ARGE ALP il 29 giugno 2018 a Scuol e il 30 settembre 2020 a Salisburgo, ribadendo l'urgente necessità della corretta gestione delle popolazioni di lupo nell'arco alpino.

L'obiettivo delle regioni ARGE ALP rimane la tutela dell'agricoltura alpina, unica nel suo genere. La gestione delle malghe e degli alpeggi non solo rappresenta una componente della cultura e della tradizione della nostra società, ma ha anche un'enorme importanza per l'agricoltura alpina su piccola scala, la cura e la salvaguardia del paesaggio, la protezione e la promozione della biodiversità, la mitigazione e l'adattamento agli effetti del cambiamento climatico e, infine, la creazione di valore in ambito turistico e quindi anche per l'economia delle aree rurali.

Le regioni ARGE ALP continuano a promuovere possibili misure a salvaguardia delle greggi e la gestione dei grandi carnivori, tenendo conto delle condizioni e delle strutture locali, con particolare attenzione ai lupi e agli orsi. Tuttavia, saranno prese anche misure appropriate per valutare congiuntamente lo stato di conservazione della popolazione della regione biogeografica alpina tra le regioni. L'ARGE ALP persegue - influenzando la Commissione Europea - una riduzione dello stato di protezione del lupo al massimo anche in sottozone transfrontaliere in cui esiste uno stato di conservazione favorevole, attraverso l'inserimento della specie nell'allegato V anziché nell'allegato IV della Direttiva Habitat, e promuove l'adozione di misure rapide per l'attuazione dei requisiti nell'ambito della gestione del lupo. L'ARGE ALP si impegnerà anche a livello europeo affinché le normative di tutela del lupo tengano maggiormente conto delle esigenze economiche, sociali, culturali e regionali delle aree alpine.

Allegati: Convenzione di lavoro dei responsabili di politica agricola del 10.3.2022
Relazione Workshop dal 21 giugno 2022

Convenzione di lavoro dei responsabili di politica agricola delle regioni partner della **Comunità di lavoro delle regioni alpine – ARGE ALP BAVIERA, ALTO-ADIGE, TRENINO, SALISBURGO, VORARLBERG e TIROLO zum **tema della gestione transfrontaliera del lupo****

I Capi di Governo della Comunità di Lavoro delle Regioni Alpine - Arge Alp - durante la loro 49a conferenza tenutasi il 29 giugno 2018 a Scuol hanno approvato una risoluzione sul tema "Controllo della popolazione di lupo nell'area alpina" ed in occasione della loro 51a conferenza, tenutasi il 30 settembre 2020 a Salisburgo, hanno approvato una risoluzione sul tema "Agricoltura e alpeggio tradizionali nell'arco alpino minacciati da un ritorno non controllato del lupo".

Anche il Comitato Europeo delle Regioni ha più volte reso noto il proprio parere sul tema dei grandi predatori, e recentemente, in occasione della sessione plenaria del 26/27 gennaio 2022 nel contesto del parere "Una visione a lungo termine per le zone rurali dell'UE", ha richiesto l'armonizzazione della gestione di lupo e grandi predatori a livello europeo.

I membri dei governi delle regioni Arge Alp dalle regioni Baviera, Alto-Adige, Trentino, Salisburgo, Vorarlberg e Tirolo competenti in materia di politica agricola appoggiano la richiesta dei Capi di Governo di Arge Alp e del Comitato Europeo delle Regioni, promuovendo una cooperazione concreta affinché, allo scopo di mantenere l'attività agricola capillare sul territorio montano e di garantire la gestione degli alpeggi montani nelle regioni Arge Alp, in accordo con le autorità competenti in materia, si possa instaurare una gestione del lupo transfrontaliera.

Per questo, le sopraccitate regioni Arge Alp si impegnano a perseguire i seguenti obiettivi di merito:

- Miglioramento del monitoraggio dei grandi predatori, in particolare del lupo
- Migliore coordinamento nella gestione del lupo o dei piani di gestione del lupo nelle regioni Arge Alp
- Continuo scambio di esperienze e dati relativi all'andamento dei grandi predatori nelle regioni Arge Alp e nell'arco alpino
- Facilitazione della comparabilità dei campioni genetici tramite l'armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura per una migliore identificazione della popolazione alpina del lupo e dei suoi spostamenti.

I responsabili di politica agricola delle regioni Arge Alp Baviera, Alto-Adige, Trentino, Salisburgo, Vorarlberg e Tirolo decidono che, di concerto con le autorità competenti, in una prima fase saranno implementate le seguenti misure:

- Scambio e confronto dei dati su base annuale tra le regioni Arge Alp: per avere a disposizione una base di dati relativa allo sviluppo delle popolazioni dei grandi predatori nelle Alpi nonché alle ripercussioni della presenza di grandi predatori sull'agricoltura montana e sull'alpeggio, annualmente le regioni Arge Alp si scambiano e confrontano i dati relativi ai propri territori alpini, che dovranno essere disponibili rispettivamente entro la fine del primo trimestre di un dato anno.

- Scambio di dati su determinati lupi (genotipizzati): per poter comprendere meglio i movimenti dei lupi soprattutto a livello transfrontaliero, vengono scambiati i dati e - qualora necessario - i campioni di DNA di lupi definiti individualmente (genotipizzati). Lo scambio di campioni di dati avverrà tra le regioni Arge Alp a partire dalla metà del 2022, nel contesto di una prima fase mirante all'armonizzazione dei metodi di analisi genetica a livello bilaterale o multilaterale. I laboratori partecipanti saranno incaricati di comunicare entro il 30.05.2022 le procedure e i costi derivanti.
- Armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura: i quattro laboratori attualmente incaricati dalle regioni di analizzare i campioni genetici saranno incaricati di presentare, entro la metà di settembre 2022, un piano per l'armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura comprensivo di cronoprogramma e stima dei costi.
- Il laboratorio di analisi genetiche dell'Università di veterinaria di Vienna viene incaricato dalle regioni Tirolo, Vorarlberg e Salisburgo di fungere da capofila per il coordinamento dello scambio di dati e di campioni tra i laboratori, nonché di elaborare un piano per l'armonizzazione dei metodi di analisi genetica e dei sistemi di marcatura. A questo fine si prevede un budget di massimo € 10.000.

Queste prime misure rendono possibile per la prima volta l'istituzione di una base di dati comune nonché la creazione dei presupposti per un monitoraggio e una gestione del lupo efficaci nell'arco alpino, prestando un importante contributo per garantire l'attività di alpeggio e il mantenimento dell'agricoltura montana nelle regioni Arge Alp nell'ottica di un reinsediamento del lupo nelle Alpi.

La presente convenzione di lavoro sarà presentata al Comitato Direttivo di Arge Alp con la richiesta di sottoporla alla conferenza dei Capi di Governo di Arge Alp del 21 ottobre 2022 per una eventuale delibera.

Innsbruck, 10 marzo 2022



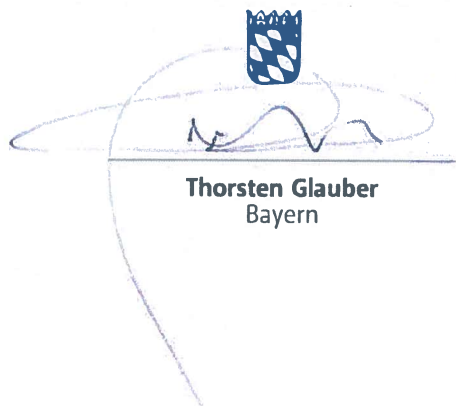

Christian Gantner
 Vorarlberg





Josef Schwabinger
 Salzburg



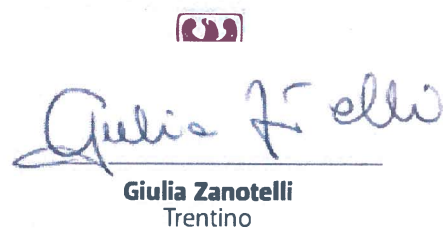

Michaela Kaniber
 Bayern





Thorsten Glauber
 Bayern




Arnold Schuler
 Südtirol




Giulia Zanotelli
 Trentino




Josef Geisler
 Tirolo



Workshop: un approccio comune alla genotipizzazione del lupo nell'era dei metodi ad alta resa

Sintesi del workshop e raccomandazioni

Contenuto

Informazioni sul workshop	3
Data	3
Laboratori partecipanti dalle regioni Arge Alp	3
Laboratori alpini associati.....	3
Partecipanti al workshop.....	3
Introduzione	4
Status-quo nelle regioni Arge Alp.....	5
Tabella 1: sintesi dell'utilizzo e delle procedure applicate nei laboratori Arge Alp	5
Tabella 2: corrispondenze nei marcatori microsatellitari utilizzati nei laboratori alpini	6
Possibilità esistenti per lo scambio di dati	6
Tecnologia futura e potenziale di standardizzazione	6
Tabella 3: cronoprogramma proposto per il passaggio a un metodo comune di genotipizzazione	8
Sostegno/finanziamento fornito da Arge Alp.....	9
Tabella 4: voci di spesa necessarie e costi stimati per il passaggio a un metodo HTS comune	9
Sintesi e prospettive	12

Informazioni sul workshop

Data

21.06.2022

Laboratori partecipanti dalle regioni Arge Alp:

Fondazione Edmund Mach (FEM), Italia

Università di Losanna (UL), Svizzera

Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung (*Società Senckenberg per la ricerca sulla natura, SGN*), Germania

Forschungsinstitut für Wildtierkunde und Ökologie (*Istituto di ricerca per la scienza della fauna selvatica e l'ecologia, FIWI*), Austria

Laboratori alpini associati:

Università di Lubiana, Slovenia

DivjaLabs, Slovenia

Antagene, Francia

ISPRA, Italia

Partecipanti al workshop

- Steve Smith, host, Direttore del Laboratorio di Vienna, Laboratorio nazionale di riferimento Austria
- Georg Rauer, FIWI Vienna
- Carsten Nowak, SGN, Direttore del Laboratorio nazionale di riferimento Germania
- Sebastian Collet, Analista dei dati sul lupo, SGN
- Heidi C. Hauffe, Direttrice del Laboratorio di genomica della conservazione, FEM, Trento
- Barbara Crestanello, Direttrice tecnica, FEM, Trento
- Nadia Mucci, Direttrice di Laboratorio, Centro nazionale di riferimento ISPRA, Bologna, Italia
- Romolo Caniglia, Direttore di ricerca, Laboratorio nazionale di riferimento ISPRA, Bologna, Italia
- Luca Fumagalli, Direttore del Laboratorio di Losanna, Laboratorio nazionale di riferimento Svizzera
- Tomaž Skrbinšek, Direttore di Laboratorio dell'Università di Lubiana, Laboratorio nazionale di riferimento Slovenia
- Astrid Vik Stronen, Università di Lubiana
- Pierre Taberlet, CNRS, Francia, Consulente tecnico, Laboratorio nazionale di riferimento Francia - ANATAGENE Francia (Lione)
- Martin Janovsky, Land Tirolo

Introduzione

Alla riunione dei rappresentanti governativi di Arge Alp del 10.03.2022 sono stati definiti i seguenti obiettivi per le regioni partner:

1. Ottimizzazione del monitoraggio transnazionale dei grandi carnivori sul territorio Arge Alp, in particolare del lupo
2. Migliore coordinamento della gestione del lupo e dei piani di gestione del lupo nelle regioni partner
3. Migliore scambio di dati ed esperienze sugli sviluppi dei grandi carnivori nelle regioni Arge Alp e in tutto l'arco alpino.
4. Definizione di protocolli comuni al fine della comparabilità dei campioni genetici tramite l'armonizzazione dei metodi di campionamento, delle procedure di analisi genetica e dei sistemi di marcatura per un migliore tracciamento della popolazione di lupi nell'area alpina e dei suoi movimenti migratori.

Per raggiungere questi obiettivi, il 21 giugno 2022 si è tenuto un workshop online cui hanno partecipato i responsabili di tutti i laboratori Arge Alp e gli esperti dei laboratori associati dalle regioni o dai paesi limitrofi. L'obiettivo di questo workshop era quello di identificare i punti in comune delle procedure di monitoraggio genetico applicate dai laboratori Arge Alp, sviluppare un piano di armonizzazione di tali procedure e operare un confronto dei dati direttamente comparabili.

Il presente report sintetizza le conclusioni dell'incontro e fornisce una proposta dettagliata, comprensiva delle tempistiche, per lo sviluppo di un approccio comune a tutti i laboratori sull'elaborazione dei campioni genetici di lupo.

Già da tempo l'armonizzazione delle procedure di genotipizzazione tra i vari laboratori rappresenta una sfida per l'arco alpino. Tutte le regioni Arge Alp hanno avviato il monitoraggio del lupo indipendentemente l'una dall'altra, e con condizioni infrastrutturali, risorse finanziarie e finalità diverse, il che ha determinato l'impiego di set di marcatori diversi in tutti i laboratori, ostacolando quindi lo scambio diretto di dati a livello transfrontaliero. Questo problema è già stato affrontato in passato, sia in un contesto informale, sia formale, nell'ambito del progetto LIFE WOLFALPS, finanziato dall'UE, e del suo follow-up LIFE WOLFALPS 2. Finora, tuttavia, non esiste una soluzione chiaramente definita per l'armonizzazione del monitoraggio genetico del lupo a livello interlaboratoriale.

Altre aree europee (ad esempio i laboratori ISPRA in Italia e i laboratori del Consorzio CEwolf, di cui fanno parte anche Germania e Austria) sono state in grado di armonizzare le loro procedure al punto da rendere possibile uno scambio diretto di dati di genotipizzazione tra i laboratori. La realizzazione di un approccio comune per quanto riguarda l'Europa centrale deriva dalla reintroduzione relativamente tardiva del lupo in quest'area e dalla consapevolezza (basata sulle esperienze passate) che un approccio congiunto e capillare è utile. Nonostante questo vantaggio, i laboratori del Consorzio CEwolf si trovano di fronte alla recente difficoltà di dover introdurre procedure di genotipizzazione ad alta resa per far fronte al rapido aumento della quantità di campioni. La necessità di incrementare la produttività è un problema che riguarda tutto il territorio alpino. Questo è il momento cruciale per impostare un passaggio coordinato alle nuove tecnologie *high-throughput* in tutto il territorio Arge Alp e nei paesi limitrofi.

Status-quo nelle regioni Arge Alp

Esistono grandi differenze tra i laboratori delle varie regioni in termini di numero di campioni analizzati, tempi di elaborazione e procedure utilizzate. Il numero di campioni analizzati annualmente varia da alcune centinaia a diverse migliaia e il tempo di elaborazione da tre a trenta giorni. Comune a tutte le regioni alpine è un aumento annuale quasi esponenziale del numero di campioni.

Tabella 1: sintesi dell'utilizzo e delle procedure applicate nei laboratori Arge Alp

Status-Quo	FEM	Uni Losanna	SGN	FIWI
Campioni (2021)	410	1000	4000	673
Branchi (2021)	28	16	158 ¹	3
Lupi solitari (2021)	67	148	777	48
Metodo di identificazione della specie	mtDNA ² /Msat ³	mtDNA/Msat	mtDNA/Msat/ SNP ⁴	mtDNA/Msat/ Amilasi-CNV ⁵
Metodo di identificazione degli individui solitari	CE-Msats ⁶ 12 marcatori	HTS-Msat ⁷ 22 marcatori	CE-Msats 13 marcatori	CE-Msats 21 marcatori
Tempo di elaborazione (giorni lavorativi)				
Identificazione delle specie	3/14 giorni (veloce/normale)	5 giorni	3/5 giorni (veloce/normale)	7/10 giorni (veloce/normale)
Identificazione degli individui solitari	10/60 giorni (veloce/normale)	14 giorni	3/14 giorni ⁸ (veloce/normale)	10/15 giorni (veloce/normale)

¹ Più 27 coppie di lupi e 20 lupi solitari territoriali; ² sequenziamento della regione di controllo del mtDNA per determinare gli aplotipi significativi della specie associati a una conferma dei dati con ³ marcatori microsatelliti e ⁴ a un assay SNP per individuare gli ibridi (96 marcatori) oppure ⁵ una stima del numero di copie genetiche dell'amilasi 2B per individuare gli ibridi; ⁶ elettroforesi capillare dei loci di marcatori microsatelliti sviluppati dall'ISPRA a livello nazionale; ⁷ sequenziamento ad alta resa dei loci di marcatori microsatelliti; ⁸ il Centro Senckenberg per la genetica della fauna selvatica offre anche un'elaborazione di massa per l'identificazione di individui solitari con un tempo di elaborazione di diverse settimane.

Tre dei quattro laboratori Arge Alp utilizzano attualmente il metodo tradizionale dell'elettroforesi capillare dei marcatori microsatelliti (CE-Msats) per l'identificazione del genotipo degli individui solitari. Nella procedura CE-MSATs viene amplificato un set di marcatori di DNA che differisce da individuo a individuo per la lunghezza degli alleli dei marcatori. Tale amplificazione funziona bene per il DNA del lupo da campioni non invasivi (ambientali) come feci fresche, urina o saliva. Per ragioni storiche e a causa di priorità divergenti per quanto riguarda il confronto dei dati tra i laboratori della propria regione e quelli delle regioni confinanti, in tutti i laboratori vengono utilizzati diversi set di marcatori. Ci sono corrispondenze tra i marcatori dei tre laboratori che utilizzano ancora i marcatori microsatelliti tradizionali (si veda sotto), il che consente di confrontare singole caratteristiche

identificative, ma solo fino a un certo punto, poiché la capacità differenziale è minore quando si confrontano meno marcatori.

Tabella 2: corrispondenze nei marcatori microsatelliti utilizzati nei laboratori alpini

	FEM	Università di Losanna	SGN	FIWI
FEM	12			
Università di Losanna	0	22		
SGN	4	0	13	
FIWI	7	0	13	21

Attuali opzioni per lo scambio di dati

I sistemi analitici esistenti nei vari laboratori alpini offrono poco spazio per lo scambio di dati per poter tracciare i lupi solitari a livello transfrontaliero. Attualmente non esiste alcuna possibilità di scambio diretto di dati tra l'Università di Losanna e gli altri laboratori partner di Arge Alp (l'Università di Losanna e il Laboratorio alpino associato dell'Università di Lubiana utilizzano lo stesso sistema di marcatori e possono quindi scambiare direttamente i dati tra loro, ma non con gli altri laboratori). La SGN in Germania e il FIWI in Austria grazie alla corrispondenza completa dei loro marcatori si scambiano regolarmente dati sugli individui in dispersione a livello transfrontaliero. I laboratori della FEM e del FIWI potrebbero potenzialmente scambiarsi i dati, ma è improbabile che i sette marcatori corrispondenti siano sufficientemente significativi per un'identificazione accurata dei lupi solitari (per sondare questa possibilità la FEM sta inviando a Vienna dei campioni di DNA standard).

Un'altra possibilità per tracciare i lupi in dispersione a livello transfrontaliero è lo scambio occasionale di campioni di DNA di singoli individui tra i laboratori. Questo approccio si è già dimostrato efficace per il confronto di tracce di DNA in campioni provenienti dalla Svizzera e dal Tirolo, ma ci sono dei problemi logistici che ne ostacolano l'applicazione costante. I costi di spedizione, autorizzazione e analisi sono a carico di uno o di entrambi i laboratori coinvolti. I ritardi, inevitabili nel trasporto internazionale, possono determinare il fatto che i dati non siano disponibili in tempo. Il FIWI austriaco ha accettato di fungere da centro per lo scambio e il trattamento del DNA dei lupi transfrontalieri, ma non è ancora chiaro come verrà finanziata l'intera operazione.

Tecnologia futura e potenziale di standardizzazione

I partecipanti al workshop hanno discusso in dettaglio le diverse possibilità per il futuro approccio al monitoraggio dei lupi solitari, in particolare l'armonizzazione dei dati sui genotipi per agevolare lo scambio di informazioni sulle popolazioni transfrontaliere di lupi, sugli individui in dispersione e sugli ibridi. A seguire le principali conclusioni:

- Il workshop ha messo in luce il fatto che il numero di campioni in tutti i laboratori Arge Alp subirà un consistente incremento nell'immediato futuro e che i laboratori dovranno puntare sul sequenziamento ad alta resa (high-throughput sequencing, HTS) o su un altro metodo ad alta resa per l'identificazione di singoli individui (ove ciò non sia già avvenuto, come per esempio presso l'Università di Losanna). Un aspetto importante è che il passaggio all'HTS consente l'uso di un numero maggiore di marcatori, necessari per la corretta identificazione degli individui consanguinei e degli ibridi cane-lupo, nonché un'analisi bioinformatica automatizzata che riduce il tempo necessario per la genotipizzazione e la probabilità di distorsioni statistiche (bias).
- Le attuali capacità delle tecnologie HTS utilizzano il sequenziamento degli ampliconi dei loci di marcatori microsatelliti o di marcatori SNP.
 - I microsatelliti per l'HTS sono stati recentemente ottimizzati e introdotti presso le università di Losanna e Lubiana.
 - Per la piattaforma Fluidigm sono stati sviluppati e ottimizzati due panels, composti da 96 marcatori SNP ciascuno, che SGN e ISPRA hanno testato con successo, ma l'unico panel che la SGN impiega regolarmente nel monitoraggio del lupo è quello per la distinzione dell'ibrido lupo-cane. Dal momento che altri laboratori europei non dispongono della tecnologia Fluidigm, che è protetta, questo procedimento per il monitoraggio dei lupi non si è affermato in altri paesi europei, ad eccezione dei laboratori in Scandinavia, che lo applicano abitualmente. Alcuni laboratori europei inviano abitualmente alla SGN campioni selezionati per l'analisi degli SNP quando c'è il sospetto di un ibrido.
- I protocolli per la tipizzazione HTS-Msats (comprese le pipeline bioinformatiche) su campioni biologici non invasivi come i pellet fecali sono già stati analizzati presso le Università di Losanna e Lubiana e vengono ora utilizzati di routine in entrambi i paesi per il monitoraggio del lupo (i risultati saranno pubblicati a breve).
 - Entrambi i laboratori utilizzano la piattaforma di sequenziamento di Illumina per i microsatelliti HTS, ma teoricamente il processo può essere applicato a tutte le piattaforme HTS.
- Tutti i laboratori Arge Alp sono disponibili a una sperimentazione del panel HTS-Msat con un finanziamento adeguato, laddove:
 - la FEM (Provincia di Trento) è vincolata alla metodologia standard del Laboratorio nazionale di riferimento ISPRA. Questo significa che il passaggio all'HTS-Msat deve essere accompagnato da un piano per estendere l'armonizzazione a tutta l'Italia. La FEM è attualmente in trattativa con l'Università di Losanna per verificare la fattibilità di un simile passaggio;
 - la FEM potrebbe fungere da laboratorio di prova per la sperimentazione dell'HTS in collaborazione con l'ISPRA;
 - la SGN (Germania) presenta anch'essa in una situazione particolarmente difficile, perché solo una minima parte delle aree interessate dal lupo in Germania si trova nell'arco alpino. La priorità per la SGN è mantenere lo scambio di dati con i laboratori del Consorzio CEwolf (Polonia, Repubblica Ceca, Paesi Bassi, Belgio, Lussemburgo, Austria e Danimarca). Il passaggio a una nuova procedura di genotipizzazione dovrebbe sempre prevedere l'estensione dell'armonizzazione a tutta l'Europa centrale;
- anche il FIWI (Austria) deve mantenere lo scambio di dati con i laboratori del consorzio CEwolf. <https://www.senckenberg.de/de/institute/senckenberg-gesellschaft-fuer->

naturforschung-frankfurt-main/abt-fliessgewaesseroekologie-und-naturschutzforschung/das-cewolf-konsortium/

- Vale la pena menzionare che i loci dei marcatori SNP potrebbero essere inclusi nel panel HTS-Msats per fornire ulteriori informazioni su singoli campioni (ad esempio il grado di introggressione con cani/sciacalli, la popolazione di origine).
- Per ottenere dei tempi di elaborazione più brevi, alcuni laboratori dovrebbero acquistare sequenziatori HTS. Le possibilità sono le seguenti:
 - Illumina MiniSeq (attualmente in uso presso l'Università di Losanna)
 - Oxford Nanopore Minlon (protocolli attualmente in fase di sviluppo a Vienna e in Francia ed eventualmente disponibili entro 12 mesi)
- Ulteriori elementi:
 - I campioni archiviati (degli ultimi 2 o 3 anni) dovrebbero essere riesaminati con il nuovo metodo HTS per consentire il futuro monitoraggio dei singoli individui.
 - Della necessaria introduzione pratica al sequenziamento ad alta resa potrebbero occuparsi i laboratori di Losanna o di Lubiana.
 - La creazione di una banca dati individuale dei genotipi agevolerebbe e migliorerebbe enormemente lo scambio di dati.
 - L'attuale onere per effettuare il campionamento varia notevolmente da paese a paese. In alcune regioni il monitoraggio si basa esclusivamente su campioni inviati nell'ambito di segnalazioni di danni, mentre altre regioni effettuano regolarmente campionamenti coordinati. Un'armonizzazione dell'onere dei campionamenti e dei metodi di genotipizzazione consentirebbe di operare un confronto capillare della densità dei lupi e dei branchi in tutta l'area.
 - Il problema dei lunghi tempi di elaborazione e dei costi elevati associati all'HTS persiste. I campioni urgenti dovrebbero essere elaborati a basso costo entro pochi giorni, il che è problematico per il sequenziamento ad alta resa. Per risolvere questo problema è necessario ottimizzare un sottoinsieme di marcatori per l'analisi classica della lunghezza dei frammenti nel sequenziatore Sanger.

Tabella 3: cronoprogramma proposto per il passaggio a un metodo di genotipizzazione condiviso

Fase di armonizzazione	Data proposta
● Scambio di DNA dei lupi transfrontalieri	● Con effetto immediato
● Training HTS-Msat	● Novembre 2022
● Acquisizione delle attrezzature necessarie	● Dicembre 2022
● Adattamento del processo per l'utilizzo con Oxford Nanopore Minlon	● Dicembre 2023
● Elaborazione dei campioni per mezzo del sequenziamento ad alta resa parallelamente alla genotipizzazione tradizionale	● Maggio 2023 - aprile 2024
● Genotipizzazione di campioni di DNA archiviati con il nuovo metodo HTS-Msat	● Marzo 2023 - giugno 2023

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● Creazione e aggiornamento di una banca dati online per i singoli genotipi di lupo nelle Alpi | <ul style="list-style-type: none"> ● Aprile 2023 - ottobre 2023 con successiva manutenzione continua |
|---|---|

Sostegno/finanziamento fornito da Arge Alp

Per raggiungere l'obiettivo dell'armonizzazione tra tutti i laboratori Arge Alp, il passaggio a nuove tecnologie richiede notevoli investimenti in termini di **infrastrutture, personale e tempo**. È essenziale che i laboratori partner di Arge Alp siano in grado di generare dati coerenti e comparabili che possano essere utilizzati su tutto il territorio. La piattaforma tecnologica utilizzata deve inoltre soddisfare i requisiti di produttività, costi e tempi di elaborazione di tutti i laboratori partecipanti. Pertanto, potrebbe non esistere una piattaforma tecnologica applicabile a livello universale in tutti i laboratori e in tutte le regioni. Ogni laboratorio dovrebbe investire in nuove attrezzature, personale pipeline per generare e condividere dati attendibili e direttamente comparabili sui lupi solitari. La seguente tabella elenca alcune delle voci di spesa che ciascun laboratorio Arge Alp deve sostenere prima di passare a un nuovo **approccio metodologico comune**.

Molti dei costi, come l'introduzione dell'HTS parallelamente al metodo tradizionale per un periodo di almeno 12 mesi, sono difficili da quantificare e variano da laboratorio a laboratorio. Occorre inoltre tenere conto delle spese per il personale aggiuntivo durante la fase di transizione, che sono difficili da stimare. I laboratori Arge Alp hanno bisogno di un notevole supporto per introdurre i nuovi sistemi, pur continuando a svolgere le proprie **attività di monitoraggio già in corso**.

Tabella 4: voci di spesa necessarie e costi stimati per il passaggio a un metodo HTS condiviso

Voce di spesa	Costi stimati (€)	Motivazione
FEM		
<ul style="list-style-type: none"> ● Sequenziatore ad alta resa 	<ul style="list-style-type: none"> ● Illumina MiniSeq - 55.000,00 ● Contratto di manutenzione annuale - 4.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● I sequenziatori ad alta resa (HTS) non fanno parte della dotazione standard della maggior parte dei laboratori Arge Alp. L'HTS è spesso affidato a grandi laboratori di servizio, ma i tempi di elaborazione sempre più lunghi rendono questa opzione inservibile per il monitoraggio dei lupi nell'arco alpino.
<ul style="list-style-type: none"> ● Elaborazione dei campioni parallelamente ai metodi tradizionali per un periodo di 12 mesi 	<ul style="list-style-type: none"> ● Spese per il personale - 90.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● Un cambio di sistema non è possibile senza un periodo di prova per verificare la validità dei risultati. Per questo periodo di transizione sarà necessario personale aggiuntivo. ● Un/a tecnico/a di laboratorio a tempo determinato per 2 anni

<ul style="list-style-type: none"> ● Genotipizzazione di campioni di DNA archiviati con il nuovo approccio HTS-Msat 	<ul style="list-style-type: none"> ● 100,00 per campione ● ~ 100 campioni <ul style="list-style-type: none"> ● Totale circa 10.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tutti i laboratori devono comunque essere in grado di confrontare i nuovi dati con i campioni più vecchi per garantire la continuità del monitoraggio dei branchi e delle relazioni di parentela.
Stima regionale¹	159.000,00 €	
Università di Losanna		
<ul style="list-style-type: none"> ● Training HTS-Msat 	<ul style="list-style-type: none"> ● Reagenti di laboratorio - 2.000,00 ● Viaggio e alloggio - per 9 persone e 3 notti - 5.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● Il processo è già stato ottimizzato e introdotto in modo che altri laboratori possano beneficiare delle competenze acquisite. ● Tre rappresentanti di ciascuno dei tre laboratori Arge Alp visitano Losanna.
<ul style="list-style-type: none"> ● Ordine all'ingrosso di primer Msat HTS usuali 	<ul style="list-style-type: none"> ● 12.000,00 per 2.500 primer 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ordine collettivo a basso costo di primer marcati per l'amplificazione di 44 loci Msat e di un locus per la determinazione del sesso in 8 repliche, ● da condividere tra i laboratori alpini.
<ul style="list-style-type: none"> ● Genotipizzazione di campioni di DNA archiviati con il nuovo approccio HTS-Msat 	<ul style="list-style-type: none"> ● 100,00 per campione ● ~ 500 campioni <ul style="list-style-type: none"> ● Totale circa 50.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tutti i laboratori devono comunque essere in grado di confrontare i nuovi dati con i campioni più vecchi per garantire la continuità del monitoraggio dei branchi e delle relazioni di parentela.
Stima regionale	69.000,00 €	
SGN		
<ul style="list-style-type: none"> ● Sequenziatore ad alta resa 	<ul style="list-style-type: none"> ● Illumina MiniSeq - 55.000,00 ● Contratto di manutenzione annuale - 4.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● I sequenziatori ad alta resa (HTS) non fanno parte della dotazione standard della maggior parte dei laboratori Arge Alp. L'HTS è spesso affidato a grandi laboratori di servizio, ma i tempi di elaborazione sempre più lunghi rendono questa opzione inservibile per il monitoraggio dei lupi nell'arco alpino.
<ul style="list-style-type: none"> ● Elaborazione dei campioni parallelamente 	<ul style="list-style-type: none"> ● Spese per il personale - 90.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> ● Un cambio di sistema non è possibile senza un periodo di prova per verificare la validità dei

ai metodi tradizionali per un periodo di 12 mesi		<p>risultati. Per questo periodo di transizione sarà necessario personale aggiuntivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> Un/a tecnico/a di laboratorio a tempo determinato per 2 anni
<ul style="list-style-type: none"> Genotipizzazione di campioni di DNA archiviati con il nuovo approccio HTS-Msat 	<ul style="list-style-type: none"> 100,00/campione ~ 2500 campioni <ul style="list-style-type: none"> Totale 250.000,00 	<ul style="list-style-type: none"> Tutti i laboratori devono comunque essere in grado di confrontare i nuovi dati con i campioni più vecchi per garantire la continuità del monitoraggio dei rami e delle relazioni di parentela.
Stima regionale	399.000,00 €	
FIWI		
<ul style="list-style-type: none"> Sequenziatore ad alta resa 	<ul style="list-style-type: none"> Illumina MiniSeq – 55.000,00 (+ 20% di IVA) Contratto di manutenzione annuale – 4.000,00 (+ 20% di IVA) 	<ul style="list-style-type: none"> I sequenziatori ad alta resa (HTS) non fanno parte della dotazione standard della maggior parte dei laboratori Arge Alp. L'HTS è spesso affidato a grandi laboratori di servizio, ma i tempi di elaborazione sempre più lunghi rendono questa opzione inservibile per il monitoraggio dei lupi nell'arco alpino.
<ul style="list-style-type: none"> Elaborazione dei campioni parallelamente ai metodi tradizionali per un periodo di 12 mesi 	<ul style="list-style-type: none"> Costi del personale – 90.000,00 (costi completi inclusi i contributi del datore di lavoro) 	<ul style="list-style-type: none"> Un cambio di sistema non è possibile senza un periodo di prova per verificare la validità dei risultati. Per questo periodo di transizione sarà necessario personale aggiuntivo. Un/a tecnico/a di laboratorio a tempo determinato per 2 anni
<ul style="list-style-type: none"> Genotipizzazione di campioni di DNA archiviati con il nuovo approccio HTS-Msat 	<ul style="list-style-type: none"> 100,00 per campione (+ 20 % di spese generali) ~ 200 campioni <ul style="list-style-type: none"> Totale 20.000,00 (+ 20 % di spese generali) 	<ul style="list-style-type: none"> Tutti i laboratori devono comunque essere in grado di confrontare i nuovi dati con i campioni più vecchi per garantire la continuità del monitoraggio dei rami e delle relazioni di parentela.
Stima regionale	169.000,00 €	
Tutti i laboratori		
<ul style="list-style-type: none"> Creazione e aggiornamento di una banca dati online per i 	<ul style="list-style-type: none"> Tecnico/a bioinformatico/a a tempo pieno per 8 mesi (creazione del database) 	<ul style="list-style-type: none"> Il primo passo nello scambio di dati è la generazione di genotipi comparabili. Al fine di utilizzare nel

singoli genotipi di lupo nelle Alpi	– 50.000,00 • IT-Manager per la manutenzione della banca dati come lavoro part-time in assunzione permanente – 25.000,00/anno	modo più efficiente possibile i dati generati, tali dati devono essere facilmente accessibili e conservati in modo sicuro, in modo che tutti gli utenti autorizzati di Arge Alp possano consultarli individualmente.
Spese condivise ²	75.000,00 €	

¹ Le stime delle regioni si riferiscono alle spese sostenute nei primi 12 mesi dopo il passaggio a un metodo armonizzato di genotipizzazione HTS. Dopo il termine di questo periodo i costi di gestione a livello nazionale devono essere inclusi nelle spese generali di monitoraggio.

² Spese condivise per acquisti di materiali utilizzati da tutti i laboratori, ma che devono essere situati in una delle regioni partner. Quale regione fornirà il database comune sarà deciso dopo ulteriori consultazioni con i laboratori partecipanti.

Sintesi e prospettive

Il problema dello scarso potenziale per uno scambio di dati sul lupo nell'arco alpino è ormai noto da oltre un decennio. Sebbene la necessità di una maggiore armonizzazione delle procedure esista da quando c'è il monitoraggio del lupo stesso, finora è stato possibile utilizzare la maggior parte dei dati solo all'interno dei confini nazionali, a causa delle differenze nelle infrastrutture di laboratorio e nelle competenze. Per quanto in passato si sia cercato di porre rimedio a questa situazione, le risorse limitate e la mancanza di accordo sul metodo più promettente hanno finora ostacolato l'attuazione. Durante la riunione dei direttori di laboratorio del 21.06.2022 è emerso un **forte consenso** per quanto riguarda un approccio comune alla genotipizzazione per tutto l'arco alpino e oltre.

I partecipanti al workshop hanno riconosciuto che tale armonizzazione richiederebbe **tempo e risorse**, ma costituirebbe un passo importante verso un approccio globale al monitoraggio e alla gestione del lupo nelle aree interessate. Pertanto, è previsto un **approccio di genotipizzazione HTS** con un panel consolidato di marcatori microsatelliti e la possibilità di utilizzare la genotipizzazione SNP. Il passaggio a un approccio comune **richiederà molto tempo** (almeno 2 anni) e comporterà problematiche specifiche per i laboratori che richiedono una scrupolosa gestione da parte di direttori di laboratorio esperti e un intenso networking tra i laboratori Arge Alp e le **regioni limitrofe**. In particolare, la cooperazione e l'integrazione dei laboratori del consorzio **CEwolf** saranno essenziali per l'integrazione della SGN (Germania) e del FIWI (Austria) nel processo di armonizzazione di lungo termine in tutto il territorio. I laboratori Arge Alp dovrebbero ora prendere l'iniziativa e adottare un approccio HTS condiviso, impegnandosi però contemporaneamente nello **sviluppo continuo delle procedure**, in modo da poterle integrare senza problemi nei flussi di lavoro di altri laboratori di riferimento in Europa.

La presente proposta illustra il sostegno richiesto dalla Comunità di Lavoro Arge Alp in termini di finanziamento **immediato e permanente** per promuovere una armonizzazione del monitoraggio genetico del lupo. Non si tratta di uno stanziamento di fondi una tantum, bensì piuttosto di un impegno a lungo termine per creare una rete e così agevolare lo scambio di dati in tutto l'arco alpino. Ci sono ancora molti ostacoli lungo il percorso verso un approccio armonizzato alla genotipizzazione,

e i costi e i tempi necessari non sono da sottovalutare. I vantaggi di uno scambio di dati per la gestione del lupo su larga scala sono ben noti, e noi come laboratori partner attendiamo con gioia i prossimi passi per realizzare questo impegno.