

Isolamento di *Brucella suis* biovariante 2 da un cinghiale in Abruzzo, Italia

Fabrizio De Massis, Andrea Di Provvido, Daria Di Sabatino, Daniela Di Francesco, Katuscia Zilli, Massimo Ancora & Manuela Tittarelli

Riassunto

Un cinghiale selvatico femmina, di circa due anni di età, è stato trovato morto dai Servizi Veterinari a Pianola di Roio a L'Aquila, Provincia situata nella Regione Abruzzo nell'Italia centrale. La carcassa è stata conferita all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" di Teramo per l'esecuzione dell'esame autoptico. Dai linfonodi sotto-mandibolari di questo esemplare è stato isolato un ceppo di *Brucella suis* biovariante 2. Questa è la prima segnalazione d'isolamento di *B. suis* nella Regione Abruzzo. Diversi autori hanno accettato, in passato, l'ipotesi che *B. suis* biovariante 2 sia stata introdotta in Italia attraverso l'importazione di lepri provenienti dai paesi europei in cui l'infezione è endemica nelle popolazioni selvatiche. Questa considerazione ha portato le autorità italiane a rafforzare i controlli esistenti sulle lepri selvatiche importate a scopo di ripopolamento. Tuttavia, attualmente, non è in vigore alcuna disposizione (né lo è stata in passato) per il controllo della brucellosi nei cinghiali movimentati, sia a livello nazionale che europeo. L'isolamento di *B. suis* biovariante 2 da cinghiali in altre Regioni italiane geograficamente distanti potrebbe suggerire che questa specie, piuttosto che le lepri importate, possa essere stata la fonte d'introduzione dell'infezione in tali aree. Le norme nazionali ed europee di gestione della brucellosi nella fauna selvatica dovrebbero essere indirizzate al controllo dello stato di salute dei cinghiali negli allevamenti prima

delle movimentazioni o del rilascio, con l'obiettivo di prevenire la diffusione di questo patogeno in territori indenni.

Parole chiave

Abruzzo, *Brucella suis* biovariante 2, Brucellosi, Cinghiale, Italia, Maiale, MLVA, *Multiple locus variable number tandem repeat analysis*.

Introduzione

Brucella suis comprende cinque biovarianti; l'infezione nei suini è causata dalle biovarianti 1, 2 e 3. L'infezione negli animali causata dalle biovarianti 1 e 3 differisce da quella causata dalla biovariante 2 per la specificità degli ospiti recettivi e per la distribuzione geografica (8). L'infezione da *B. suis* biovarianti 1 e 3 è stata segnalata in Europa in diverse specie animali e nell'uomo (6, 13), tuttavia, la biovariante di *B. suis* più comunemente isolata negli animali in Europa è la biovariante 2 (8). Diversi casi umani di brucellosi causati da *B. suis* biovariante 2 sono stati segnalati in Europa (10, 17, 23, 28).

Nei suini domestici sono stati riportati casi sporadici d'infezione da *B. suis* in Austria, Danimarca, Francia, Germania, Portogallo e Spagna (8). Negli ultimi cinque anni, la presenza della forma clinica è stata inoltre segnalata all'Organizzazione mondiale per la Sanità Animale (*Office International des Épizooties*: OIE) da diversi paesi quali Austria, Croazia, Repubblica Ceca, Francia, Germania, Montenegro, Portogallo, Romania e Serbia (32). Per quanto concerne le specie selvatiche,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Laboratorio di Referenza OIE per la Brucellosi, Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
f.demassis@izs.it

L'isolamento di *B. suis* biovariante 2 è stato segnalato nei cinghiali e nelle lepri, identificando il cinghiale come potenziale fonte di trasmissione di questa biovariante agli allevamenti suini di tipo domestico o estensivo.

Evidenza sierologica dell'esposizione a *Brucella* spp. nei cinghiali è stata riportata in molti Paesi europei come Belgio (14), Bulgaria (21), Europa centrale e sud-orientale (29), Croazia (4, 5), Repubblica Ceca (15), Francia (9), Germania (20), nord-ovest dell'Italia (11), Polonia (27), Portogallo (30), Spagna (26) e Svizzera (19). Tuttavia, l'isolamento dell'agente eziologico è stato possibile solo in pochi casi e le informazioni esistenti sulla distribuzione di questo patogeno nelle popolazioni selvatiche di cinghiali nell'Unione europea sono poche (o nessuna) (8). In Italia, l'isolamento di *B. suis* biovariante 2 nei cinghiali è stato segnalato in un Parco Regionale della Regione Piemonte (3, 11). Precedentemente, *B. suis* biovariante 2 era stata isolata nel 1995 in Italia meridionale da un esemplare maschio di lepri (*Lepus europaeus*) importato dall'Ungheria (24). Tuttavia, gli studi sierologici che furono condotti in Toscana a seguito di questa segnalazione non riuscirono a evidenziare l'esposizione a *Brucella* spp. di cinghiali (7), confermando risultati simili ottenuti in passato nella stessa regione (12).

Scopo del presente lavoro è descrivere il primo caso d'isolamento di *B. suis* bio-variante 2 in un cinghiale selvatico in Abruzzo, Italia centrale.

Materiali e metodi

Campioni raccolti

Un esemplare femmina di cinghiale selvatico di circa due anni è stato trovato morto dai Servizi Veterinari a Pianola di Roio a L'Aquila, provincia situata in Abruzzo nell'Italia centrale. La carcassa è stata conferita all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" di Teramo per l'esecuzione dell'esame autoptico. I linfonodi sottomandibolari, retrofaringei e mammari sono stati prelevati durante l'autopsia e in

seguito inviati al Laboratorio del medesimo Istituto per l'isolamento di *Brucella* spp. Tutti i linfonodi prelevati sono stati sottoposti anche ad esame batteriologico standard e all'isolamento di *Mycobacterium* spp. (25), eseguito secondo quanto previsto nel Manuale OIE (31).

Isolamento di *Brucella* spp.

I linfonodi sono stati sterilizzati in superficie attraverso il passaggio su fiamma ed in seguito sono stati tagliati con forbici sterili. Il materiale ottenuto è stato omogenato in un sacchetto da Stomacher con l'aggiunta di tampone fosfato (PBS). La sospensione ottenuta è stata seminata su due piastre di terreno Thayer-Martin modificato e su due piastre di agar sangue, mentre per l'arricchimento è stata inoculata una provetta di brodo Thayer-Martin. Una piastra di Thayer-Martin e una di agar sangue sono state incubate in condizioni di aerobia a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, mentre le restanti piastre ed il brodo sono state incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in atmosfera arricchita del 5%-10% (v / v) di CO_2 . Settimanalmente, per un totale di sei settimane, dal brodo d'arricchimento sono state effettuate delle sub-colture seminando una piastra di Thayer-Martin. Tutte le piastre seminate sono state osservate a partire da tre giorni d'incubazione ed in seguito con cadenza giornaliera per individuare la presenza di colonie batteriche riferibili a *Brucella* spp. Le colonie sospette sono state reisolate e sottoposte a Colorazione di Gram, test della catalasi, dell'ossidasi, dell'urea e della mobilità. Le colonie confermate come *Brucella* spp. sono state sottoposte ad identificazione di specie e biovariante (31).

Identificazione di specie e biovariante

L'identificazione di specie e biovariante è stata eseguita valutando l'agglutinazione con sieri monospecifici anti-A, anti-M e anti-R (*Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone*), la produzione di H_2S , la dipendenza dalla CO_2 e la crescita in presenza di fucsina basica e tionina alla concentrazione finale di $20 \mu\text{g/ml}$. I risultati sono stati confermati con le tecniche PCR-AMOS (*Abortus Melitensis Ovis Suis-polymerase chain reaction*) e *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*

(PCR-RFLP). La PCR-AMOS è stata eseguita utilizzando i primers descritti nel Manuale OIE (31). Le miscele di amplificazione di reazione sono state preparate in un volume di 50 µl utilizzando la PCR Master Mix 2× (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). L'amplificazione è stata iniziata tramite una fase di denaturazione del campione per 5 minuti a 95°C, seguita da 33 cicli a 94°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi. Al termine dell'ultimo ciclo, i campioni sono stati incubati per ulteriori 7 minuti a 72°C per l'estensione finale ed in seguito conservati a 4°C. I prodotti PCR ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare utilizzando QIAxcel Advanced System (Qiagen Srl, Milano). Questo è stato utilizzato tramite una cartuccia DNA QIAxcel di screening a 12 capillari, preparata in conformità con le raccomandazioni del produttore. Per garantire un accurato dimensionamento dei prodotti DNA, sono stati utilizzati simultaneamente un marker molecolare QX DNA da 100-3 000 bp e un marker d'allineamento da 15-3 000 bp. Per la RFLP, i prodotti PCR omp2a e omp31 sono stati digeriti rispettivamente utilizzando gli enzimi endonucleasi di restrizione *NcoI* e *AvaII* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin). Le reazioni di digestione del DNA sono state eseguite in un volume di 10 µl contenente 5 µl di prodotto PCR, 1 µl di buffer apposito, 0,4 µl di endonucleasi e 3,6 µl di acqua priva di nucleasi. Le reazioni sono state incubate a 37°C per 2 h e, al termine dell'incubazione, è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%, utilizzando come colorante il SYBR®-safe (Sigma-Aldrich Srl, Milano). I profili di restrizione sono stati visualizzati utilizzando un transilluminatore Alpha Innotech (Alpha-Innotech, ProteinSimple, Santa Clara, California).

La tipizzazione è stata supportata anche dall'utilizzo dell'analisi "multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis" (MLVA) (31). Il DNA genomico totale è stato estratto utilizzando il Kit Maxwell 16 cell DNA purification (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) in conformità con le istruzioni del produttore. I lisati risultanti sono stati stoccati

a -20°C fino al momento dell'uso. L'amplificazione dei diversi "variable number of tandem repeats" (VNTR) per MLVA-16 è stata eseguita secondo i metodi descritti in precedenza da altri autori (2, 18). La reazione di amplificazione è stata effettuata in un volume totale di 25 µl contenente 1 ng di DNA, 1×PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), 0,5 µM di ciascun primer e 1 M di betaine (Sigma-Aldrich Srl, Milano). I cicli di amplificazione sono stati eseguiti su un termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, California), con il seguente profilo termico: denaturazione iniziale a 96°C per 5 minuti, 30 cicli di denaturazione a 96°C per 30 secondi, annealing a 60°C per 30 secondi ed estensione a 70°C per 60 secondi. L'estensione finale è stata effettuata a 70°C per 5 minuti. L'analisi MLVA è stata effettuata mediante elettroforesi capillare QIAxcel utilizzando un volume standard (<0,1 µl) del prodotto PCR per ogni analisi. Per garantire un accurato dimensionamento del DNA, durante la corsa con il QIAxcel è stato utilizzato un marker molecolare QX DNA da 50-800 bp (contenente il peso molecolare standard di 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp e 800 bp). Per permettere un'accurata assegnazione del numero di ripetizioni è stato utilizzato un ceppo di riferimento di *B. melitensis* 16M i cui pesi molecolari degli alleli sono noti.

Il software di analisi Biocalculator (QIAxcel, Qiagen) ha permesso di determinare il peso molecolare dei prodotti amplificati rappresentandoli come elettroferogramma e immagine virtuale del gel di agarosio. L'esportazione dei dati su di un foglio di calcolo elettronico ha permesso la conversione del peso molecolare degli alleli amplificati in unità di ripetizione corrispondente.

Risultati

Necroscopia

All'esame necroscopico l'animale risultava in buono stato di nutrizione con abbondante presenza di grasso sottocutaneo e periviscerale. La cute del grugno si presentava sporca di sangue. All'esame delle cavità naturali è stato

possibile osservare un importante emotorace ed emoadome con rottura della milza. L'esame dell'apparato muscolo scheletrico ha evidenziato la presenza di una frattura semplice, completa e non esposta della sinfisi pubica. I linfonodi regionali della testa risultavano interessati da un processo di linfadenite. Per quanto evidenziato in sede autoptica, in accordo con le informazioni fornite in sede anamnestica dai servizi veterinari, si è attribuita la morte dell'animale ad un evento traumatico riferibile ad incidente automobilistico.

Isolamento

A due settimane dall'inizio della prova (ossia dopo una settimana d'incubazione della prima sub-coltura dei linfonodi sottomandibolari) l'osservazione diretta delle piastre ha permesso di evidenziare colonie piccole, traslucide, color miele d'acacia, circolari e convesse, riferibili a *Brucella* spp. All'esame microscopico le colonie isolate sono risultate essere costituite da coccobacilli Gram-negativi. I test della catalasi, dell'ossidasi e dell'ureasi hanno fornito risultato positivo, mentre il test di motilità ha fornito risultato negativo. L'isolamento di *Brucella* spp. dagli altri linfonodi ha dato esito negativo. Tutti i linfonodi sono risultati inoltre negativi

all'esame batteriologico e all'isolamento di *Mycobacterium* spp.

Identificazione della specie e della biovariante

Come mostrato in Tabella I, gli isolati di *Brucella* sono risultati positivi esclusivamente all'agglutinazione con siero monoclonale specifico anti-A. Gli isolati sono cresciuti in presenza di tionina ma non in presenza di fucsina basica e, come le altre *B. suis* biovariante 2 (NCTC10095), non hanno richiesto la presenza della CO₂ per le fasi iniziali di crescita e non hanno prodotto H₂S.

I risultati della AMOS-PCR eseguiti sul ceppo di *Brucella* sono mostrati in Figura 1. La AMOS-PCR ha evidenziato la non appartenenza dell'isolato a *B. suis* biovarianti 1 o 3 (Fig. 1; *B. suis* biovarianti 4 e 5 non sono mostrate).

I risultati della PCR-RFLP effettuati sugli isolati di *Brucella* sono riportati in Figura 2. L'analisi della PCR-RFLP dei prodotti omp2a e omp31 ha confermato l'appartenenza dell'isolato a *B. suis* biovariante 2 e la non appartenenza a *B. suis* biovariante 1 o 3.

I risultati della MLVA effettuati sugli isolati di *Brucella* sono riportati in Figura 3. Le relazioni genetiche sono state comparate con quelle ottenute dai ceppi italiani ed esteri, pubblicati

Tabella I

Risultati di cinque prove classiche, in aggiunta alle prove molecolari, per l'identificazione del ceppo di *Brucella* isolato, in comparazione con altri ceppi di *Brucella suis*

Specie	Colorazione di Gram	Esigenza di CO ₂	Produzione di H ₂ S	Agglutinazione con Anti-A	Agglutinazione con Anti-M	Crescita in presenza di Tionina	Crescita in presenza di Fucsina basica
<i>Brucella suis</i> biovariante 1 1330	Piccoli Coccobacilli Gram-negativi	-	+	+	-	+	-
<i>Brucella suis</i> biovariante 1 NCTC 10316	Piccoli Coccobacilli Gram-negativi	-	+	+	-	+	-
<i>Brucella suis</i> biovariante 2 NCTC 10095	Piccoli Coccobacilli Gram-negativi	-	-	+	-	+	-
<i>Brucella suis</i> biovariante 1 NCTC 10511	Piccoli Coccobacilli Gram-negativi	-	-	+	-	+	+
Ceppo isolato	Piccoli Coccobacilli Gram-negativi	-	-	+	-	+	-

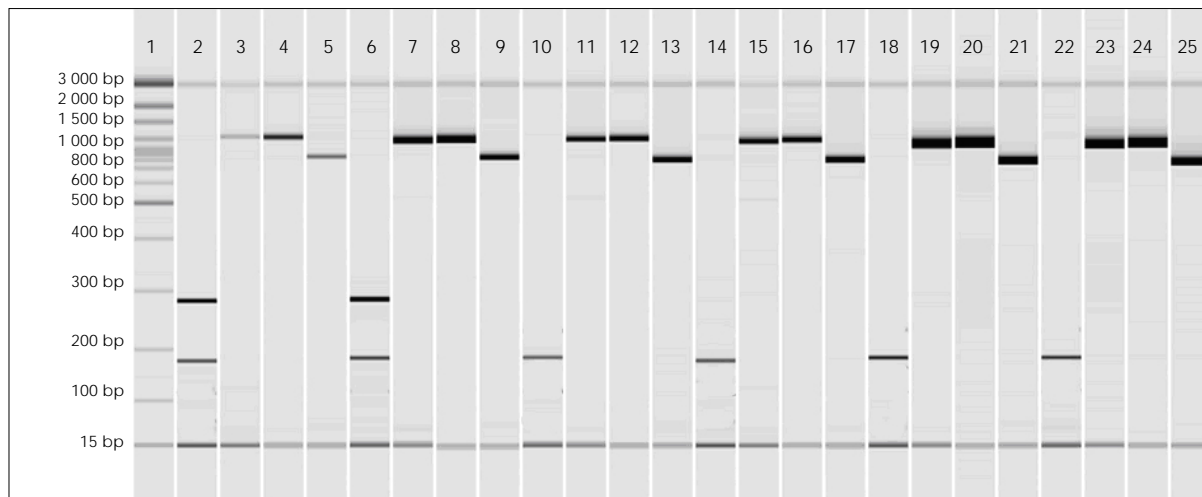


Figura 1

Risultati della AMOS PCR (*Abortus Melitensis Ovis Suis polymerase chain reaction*) sul ceppo di *Brucella* isolato, confrontati con altri ceppi di *Brucella suis*

Pozzetto 1: peso molecolare standard

Pozzetti 2, 3, 4, 5: *B. suis* biovariante 1 1330 (AMOS PCR, omp2a PCR, omp2b PCR, omp31 PCR, rispettivamente)

Pozzetti 6, 7, 8, 9: *B. suis* biovariante 1 NCTC 10316 (AMOS PCR, omp2a PCR, omp2b PCR, omp31 PCR, rispettivamente)

Pozzetti 10,11,12,13 e 14,15,16,17: *B. suis* biovariante 3 NCTC 10511 (AMOS PCR, omp2a PCR, omp2b PCR, omp31 PCR, rispettivamente)

Pozzetti 18, 19, 20, 21: *B. suis* biovariante 2 NCTC 10095 (AMOS PCR, omp2a PCR, omp2b PCR, omp31 PCR, rispettivamente)

Pozzetti 22, 23, 24, 25: AMOS PCR, omp2a PCR, omp2b PCR, omp31 PCR del ceppo di *Brucella* isolato, rispettivamente

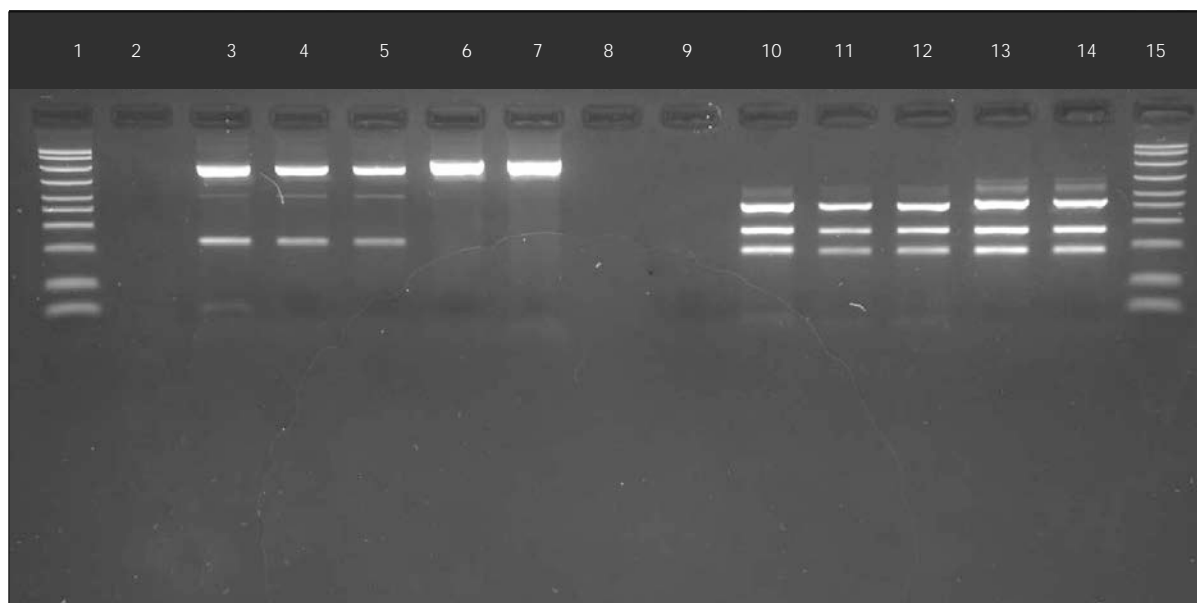


Figura 2

Risultati della *restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction* sul ceppo di *Brucella* isolato, confrontati con altri ceppi di *Brucella suis*

Pozzetti 1 e 15: peso molecolare standard (dalla cima al fondo: 2 000 bp, 1 500 bp, 1 000 bp, 700 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp, 50 bp)

Pozzetti 3, 4, 5, 6, 7: NcoI (5' G↓G(A/T)CC 3'/ 3'... CC(T/A)G↑G 5') profilo di restrizione per il prodotto PCR omp 2a di *Brucella suis* biovariante 1, 1330, *B. suis* biovariante 1 NCTC 10316, *B. suis* biovariante 3 NCTC 10511, *B. suis* biovariante 2 NCTC 10095 e ceppo di *B. suis* isolato, rispettivamente

Pozzetti 10, 11, 12, 13, 14: Ava II (5' C↓CATG G. 3'/3' GGTAC↑C 5') profilo di restrizione per il prodotto PCR omp 31 di *B. suis* biovariante 1 1330, *B. suis* biovariante 1 NCTC 10316, *B. suis* biovariante 3 NCTC 10511, *B. suis* biovariante 2 NCTC 10095 e ceppo di *Brucella* isolato, rispettivamente

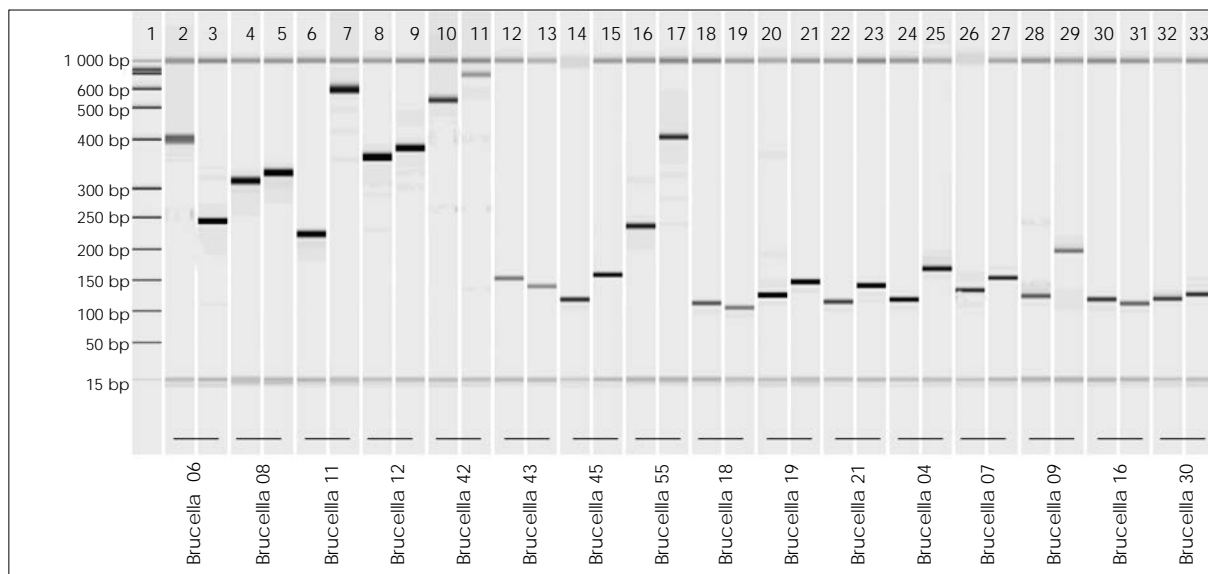


Figura 3
Profili di amplificazione della *multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis* sul ceppo di *Brucella* isolato, confrontati con *Brucella melitensis* biovar 1 (ceppo di riferimento 16M)
Pozzetti pari: *Brucella melitensis* biovar 1 (ceppo di riferimento 16M)
Pozzetti dispari: ceppo di *Brucella* isolato
Pozzetto 1: peso molecolare DNA standard

sulla versione 2010 del sito web MLVA-NET (minisatellites.u-psud.fr). Il profilo allelico è stato identificato come quello di *B. suis* biovariante 2 (Profilo genetico 2-5-8-14-5-1-5-7-4-21-9-8-12-17-2-7). Le ripetizioni in tandem (VNTR) per MLVA-16 sono state organizzate nel seguente ordine: loci Bruce 06-08-11-12-42-43-45-55-18-19-21-04-07-09-16-30. Gli isolati di *Brucella* comparati con il database *Brucella* 2010 (minisatellites.u-psud.fr) hanno mostrato una differenza nel marker 12, in particolare quando comparati con i genotipi 16 e 20 (MLVA8) e con il genotipo 57 (MLVA11).

Discussione

Nel presente lavoro è stato riportato il caso di un cinghiale femmina, trovato morto in Abruzzo, sottoposto a esame necroscopico e alla ricerca di agenti batterici da vari tessuti. Il cinghiale è risultato infetto da *B. suis* biovariante 2. Questo è il primo caso d'isolamento di *B. suis* in Abruzzo, in Italia centrale. In Italia l'isolamento di questo patogeno nel cinghiale era stato segnalato in un Parco Regionale in Piemonte nel nord-ovest dell'Italia (11), ma in questo caso l'area di studio era limitata e circoscritta rispetto al

restante territorio regionale. In precedenza *B. suis* biovariante 2 era stata isolata in sud Italia da un esemplare maschio di lepre importata dall'Ungheria nel 1995 (24). Tuttavia, gli studi sierologici che sono stati condotti in Toscana a seguito di questa segnalazione non sono riusciti a evidenziare l'esposizione a *Brucella* spp. nei cinghiali (7), confermando risultati simili ottenuti in passato nella stessa area (12).

In passato, diversi autori hanno concordato sull'ipotesi che *B. suis* biovariante 2 potesse essere stata introdotta in Italia attraverso l'importazione di lepri provenienti da paesi europei in cui l'infezione è endemica nelle popolazioni selvatiche (3, 7, 11). Questa ipotesi era supportata dal fatto che la distribuzione geografica di *B. suis* biovariante 2 era storicamente riconosciuta come confinata in Scandinavia e nei Balcani (1, 31), nonché dal fatto che lepri provenienti dall'Est europeo, dove la brucellosi dovuta a *B. suis* biovariante 2 è endemica, erano introdotte per operazioni di ripopolamento a fini venatori (7). Altri autori, inoltre, sostenevano che le lepri possono fungere da fonte d'infezione di *B. suis* biovariante 2 per gli altri animali con cui

condividono lo stesso habitat, tra cui sicuramente i cinghiali (31). Ciò ha portato il Ministero della Salute a rinforzare i controlli già esistenti sulle importazioni di lepri a fini di ripopolamento (16).

Negli ultimi decenni sono stati importati dall'Est europeo anche esemplari di cinghiale (7). In Italia il ripopolamento dei cinghiali a fini venatori è iniziato negli anni '50 proprio con l'utilizzo di animali importati dall'estero, per poi proseguire, negli anni successivi, principalmente attraverso l'uso di animali allevati in Italia. Tuttavia, ancora oggi, diverse amministrazioni provinciali, soprattutto nelle regioni del sud, comprano cinghiali allevati direttamente a fini di ripopolamento o autorizzano altre istituzioni (associazioni venatorie, aziende faunistiche venatorie, ecc.) ad operare tale attività. Alcune Regioni in Italia hanno vietato l'allevamento del cinghiale a fini di ripopolamento e ne hanno anche esplicitamente proibito il rilascio sul loro territorio (22).

Il presente lavoro rappresenta il primo caso confermato della presenza di *B. suis* biovariante 2 in un cinghiale selvatico in un'area precedentemente indenne, dovuto probabilmente ad importazione di cinghiali. Risulta opportuno uno studio approfondito sulla prevalenza di quest'organismo nel cinghiale e una valutazione del rischio per la produzioni di animali d'allevamento.

Per confermare e identificare le specie di *Brucella* e le relative biovarianti, la caratterizzazione fenotipica o i metodi di biotipizzazione rimangono ad oggi gli unici metodi per la diagnosi conclusiva e rappresentano inoltre il "gold standard". AMOS-PCR e RFLP-PCR sono test altamente affidabili, accurati e riproducibili; e presentano inoltre ulteriori vantaggi, come la rapidità d'esecuzione, la minima attività necessaria per la preparazione dei campioni, un rischio

ridotto d'esposizione per l'operatore. L'analisi MLVA non è generalmente raccomandata per la tipizzazione degli isolati a livello di specie, tuttavia, come dimostrato in questo lavoro, questa tecnica può essere utile a fornire ulteriori informazioni molecolari sullo specifico profilo genetico dell'isolato batterico, soprattutto nel caso di futuri isolamenti di *B. suis* biovariante 2, ampliando in tal modo il potenziale dell'analisi MLVA come strumento epidemiologico per la diagnosi della brucellosi.

Conclusioni

Attualmente non è in vigore alcuna disposizione (né lo è stata in passato) per il controllo della brucellosi nei cinghiali movimentati, sia a livello nazionale che europeo. A livello nazionale sono previsti esclusivamente controlli sulle lepri importate dall'estero ai fini del ripopolamento. Nel presente lavoro è stato riportato un caso d'isolamento di *B. suis* biovariante 2 da un cinghiale selvatico ed è stato fatto riferimento a segnalazioni analoghe effettuate in altre Regioni italiane peraltro distanti (11). Ciò potrebbe suggerire che la fonte d'introduzione dell'infezione sia da attribuire alla movimentazione di animali appartenenti a questa specie, piuttosto che a lepri importate dall'estero. Le norme nazionali ed europee di gestione della brucellosi nella fauna selvatica dovrebbero essere indirizzate al controllo dello stato di salute dei cinghiali negli allevamenti prima delle movimentazioni o del rilascio, con l'obiettivo di prevenire la diffusione di questo patogeno in territori indenni.

Bibliografia

1. Alton G.G. 1990. *Brucella suis*. In Animal brucellosis (K. Nielsen & J.R. Duncan, eds). CRC Press, Boston, 453 pp.
2. Al Dahouk S., Le Flèche P., Nöckler K., Jacques I., Grayon M., Scholz H. C., Tomaso H., Vergnaud G. & Neubauer H. 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods*, **69**, 137-145.

3. Bergagna S., Zoppi S., Ferroglio E., Gobetto M., Dondo A., Di Giannatale E., Gennero M.S. & Grattarola C. 2009. Epidemiologic survey for *Brucella suis* biovar 2 in a wild boar (*Sus scrofa*) population in northwest Italy. *J Wildl Dis*, **45**, 1178-1181.
4. Cvetnić Z., Mitak M., Ocepek M., Lojkić M., Terzić S., Jemersić L., Humski A., Habrun B., Sostarić B., Brstilo M., Krt B. & Garin-Bastuji B. 2003. Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Vet Hung*, **51**, 465-473.
5. Cvetnić Z., Tončić J., Spicić S., Lojkić M., Terzić S., Jemersi L., Humski A., Curić S., Mitak M., Habrun B., Brstilo M., Ocepek M. & Krt B. 2004. Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Vet Med (Praha)*, **49**, 115-122.
6. Cvetnić Z., Spicić S., Curić S., Jukić B., Lojkić M., Albert D., Thiébaud M. & Garin-Bastuji B. 2005. Isolation of *Brucella suis* biovar 3 from horses in Croatia. *Vet Rec*, **156**, 584-585.
7. Ebani V.V., Cerri D., Poli A. & Andreani E. 2003. Prevalence of *Leptospira* and *Brucella* antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *J Wildl Dis*, **39**, 718-722.
8. European Food Safety Authority (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) (EFSA) 2009. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). *EFSA J*, **1144**, 1-112.
9. Garin-Bastuji B., Hars J., Thiébaud M. & Artois M. 2000. Brucellosis of domestic pigs. Reemergence of *Brucella suis* biovar 2 in France. *Epidémiol Santé Anim*, **38**, 1-5.
10. Garin-Bastuji B., Vaillant V., Albert D., Tourrand B., Danjean M.P., Lagier A., Rispal P., Benquet B., Maurin M., De Valk H & Mailles A. 2006. Is brucellosis due the biovar 2 of *Brucella suis* an emerging zoonosis in France? Two case reports in wild boar and hare hunters. In Proc. 1st International meeting on treatment of human brucellosis, 7-10 November, Ioannina. International Society of Chemotherapy Disease Management, Ioannina (document available on CD).
11. Gennero M.S., Grattarola C., Zoppi S., Di Giannatale E. & Dondo A. 2004. Brucellosis in wild boars in Piedmont Region. *Epidémiol Santé Anim*, **45**, 77-79.
12. Giovannini A., Cancellotti F. M., Turilli C. & Randi E. 1988. Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *J Wildl Dis*, **24**, 127-132.
13. Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech*, **21**, 277-286.
14. Godfroid J., Michel P., Uytterhaegen L., De Smedt C., Rasseneur F., Boelaert F., Saegerman C. & Patigny X. 1994. Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Ann Med Vet*, **138**, 263-268.
15. Hubálek Z., Tréml F., Juřicová Z., Huňady M., Halouzka J., Janík V. & Bill D. 2002. Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. *Vet Med (Praha)*, **47**, 60-66.
16. Ministero della Salute della Repubblica Italiana 2000. Norme sanitarie per l'importazione di lepri destinate al ripopolamento. Decreto 7 dicembre 2000. *Gazz Uff*, **38**, 15 febbraio 2001.
17. Lagier A., Brown S., Soualah A., Julier I., Tourrand B., Albert D., Reyes J. & Garin-Bastuji B. 2005. Brucellose aiguë à *Brucella suis* biovar 2 chez un chasseur de sanglier. *Med Mal Infect*, **35**, 185.
18. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A. & Vergnaud G. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, **6**, 9.
19. Leuenberger R., Boujon P., Thür B., Miserez R., Garin-Bastuji B., Rüfenacht J. & Stärk K.D.C. 2007. Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Vet Rec*, **160**, 362-368.
20. Melzer F., Lohse R., Nieper H., Liebert M. & Sachse K. 2006. A serological study on brucellosis in wild boars in Germany. *Eur J Wildl Res*, **53**, 153-157.
21. Mineva I., Likov B., Minev M., Makedonski I., Kalolianov Z. & Sandev R. 1991. Intensity and dynamics of epizootological process caused by *Brucella suis* in Shumen region for the period 1978-1990. In Bulletin of the Scientific Conference of Regional Veterinary Institute, Stara Zagora, 24 ottobre 1991.
22. Monaco A., Carnevali L. & Toso S. 2010. Linee guida per la gestione del Cinghiale (*Sus scrofa*) nelle aree protette, 2° edizione. Quad Cons Natura, 34, Ministero dell'Ambiente della Repubblica Italiana, ISPRA, Roma, 121 pp.
23. Paton N.I., Tee N.W.S. Vu C.K.F. & Teo T.P. 2001. Visceral abscesses due to *Brucella suis* infection in a retired pig farmer. *Clin Infect Dis*, **32**, 129-130.

24. Quaranta V., Farina R., Poli A., Cerri D. & Palazzo L. 1995. Sulla presenza di *Brucella suis* biovar 2 nella lepre in Italia. *Selezione Vet*, **36**, 953-958.
25. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. & Carter G.R. 1994. *Clinical veterinary microbiology*. Wolfe Publishing, New York, 648 pp.
26. Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Höfle U., Villanúa D., Gauss C., Segalés J., Almería S., Montoro V.L. & Gortázar C. 2006. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, **65**, 731-743.
27. Szulowski K., Iwaniak W., Pilaszek J. & Murat J. 2008. Wild boars and hares as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Poland. *In Proc. Brucellosis 2008 International Research Conference (including the 61st Brucellosis Research Conference)*, 10-13 September, London. Veterinary Laboratories Agencies, Londra, 224 pp.
28. Teyssou R., Morvan J., Leleu J.P., Roumegou P., Goullin B. & Carteron B. 1989. About a case of human brucellosis due to *Brucella suis* biovar 2. *Med Mal Infect*, **19**, 160-161.
29. Taleski V., Zerva L., Kantardjiev T., Cvetnić Z., Erski-Biljic M., Nikolovski B., Bosnjakovski J., Katalinić-Janković V., Panteliadou A., Stojkoski S. & Kirandziski T. 2002. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of central and southeast Europe. *Vet Microbiol*, **90**, 147-155.
30. Vaz Y., Rodeia S. & Corrêa de Sá M.I. 2004. Available data on *Brucella suis* in Portugal. Oral communication at COST 845 Brucellosis in animals and man *B. suis* meeting, Laboratório Nacional de Investigaçao Veterinaria (LNIV), 6-7 May, Lisbon. LNIV, Lisboa (documento disponibile su CD).
31. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2011. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2011*. Chapter 2.4.3. Bovine brucellosis. OIE, Paris, 1 343 pp. (www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_bovine_bruce.pdf ultimo accesso data 1 agosto 2012).
32. World Organisation for Animal Health (Office International des Épizooties: OIE) 2011. *World Animal Health Information Database (WAHID) Interface*. OIE, Paris (web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines ultimo accesso 1 agosto 2012).