

STUDIO SULLA PREVALENZA DI *Brucella suis* NELLE POPOLAZIONI DI SUIDI DOMESTICI E SELVATICI DELL'UMBRIA

STUDY ON PREVALENCE OF *Brucella suis* INFECTION IN DOMESTIC PIGS AND WILD BOARS IN UMBRIA REGION

COSTARELLI S., MARESCA C., FACCENDA L., CROTTI S., TENTELLINI M.,
CUCCO L., PANZIERI C., MARIOTTI C., SENSI M., MAGISTRALI C.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Umbria e Marche –Perugia

Parole chiave: *Brucella suis*, suini domestici e cinghiali

Key Words: *Brucella suis*, domestic pigs, wild boars

Riassunto

Da un punto di vista epidemiologico all'interno dei Paesi dell'unione europea la diffusione di *Brucella suis* risulta poco conosciuta. Nel tentativo di colmare, almeno in parte, l'assenza di informazioni sull'eventuale presenza e diffusione della *B. suis* nei suidi del nostro territorio abbiamo avviato un progetto di Ricerca i cui risultati preliminari vengono proposti in questo lavoro. Il progetto ha previsto controlli sierologici su popolazioni diverse di suidi della Regione Umbria. Sono stati controllati cinghiali selvatici abbattuti nel corso di tre stagioni venatorie (2009-2010-2011), suini *outdoor* e suini di allevamenti intensivi. Sono stati effettuati controlli sierologici in siero agglutinazione rapida (SAR) e Fissazione del Complemento (FdC) in tutti gli animali. In caso di un titolo di FdC ≥ 20 UISC/ml si è proceduto con l'isolamento batterico e la PCR. L'obiettivo è stato quello di effettuare una stima della prevalenza dell'infezione negli allevamenti suini umbri di tipo intensivo e *outdoor* e nei suidi selvatici. I risultati hanno evidenziato percentuali di siero prevalenza nei cinghiali selvatici abbattuti che oscillano tra 0,79% e 1,02% nei tre anni. In un animale è stata isolata *B. suis* Biovar 2. Sierologicamente negativi tutti i suini *outdoor* e quelli degli allevamenti intensivi. In conclusione, i cinghiali possono costituire una fonte di infezione di *B. suis* per l'uomo e per gli animali domestici in Umbria; di conseguenza si raccomanda un monitoraggio costante di questa infezione in questa categoria di suini.

Abstract

There is a lack of systematic epidemiological data on *Brucella suis* infection within the EU. In order to fill this gap, a project was carried out to gather information about the presence and diffusion of *B. suis* infection in Umbria Region in different population of pigs. Wild boars hunted during three different hunting seasons (2009-2010-2011), outdoor reared pigs and pigs from intensive farming were tested for brucellosis by direct and indirect analysis, to evaluate the prevalence of *B. suis* infection in these different populations. In particular, all the animals were serologically tested using Rose Bengal Test and Complement Fixation Test (CFT). When international complement fixation test units (ICFTU) were equivalent to 20/mL or above, PCR and culture were also performed. The prevalence of *B. suis* infection in hunted wild boars ranges from 0,79 to 1,02 in the three years considered. Moreover, a strain of *B. suis* Biovar 2 was isolated from a wild boar. Outdoor reared pigs and pigs from intensive farming were serologically negative. In conclusion, wild boars can constitute a source of *B. suis* infection for man and domestic animals in Umbria; therefore, a continue monitoring of this infection in wild boars is recommended.

INTRODUZIONE

La brucellosi è una zoonosi diffusa in tutto il mondo (500.000 nuovi casi all'anno nel mondo), con valori di prevalenza ed incidenza che variano da paese a paese. Cinque sono le specie del genere *Brucella* causa di infezione negli animali domestici: *B. abortus* (infetta prevalentemente i bovini), *B. melitensis* (infetta prevalentemente gli ovini ed i caprini), *B. ovis* (causa di infezione negli arieti), *B. canis* (causa di infezione nel cane) e *B. suis*.

Delle 5 biovarianti di *B. suis* attualmente conosciute, le biovariante 4 e 5 riconoscono come ospiti abituali i ruminanti delle zone artiche, la biovariante 2 può infettare suidi e lepri, le biovarianti 1 e 3 hanno come ospiti naturali i suidi. In queste specie l'infezione *Brucellare* può decorrere in modo asintomatico ma, in alcuni casi, si possono manifestare anche forme cliniche per lo più ad andamento cronico (Anonimo, 2009c).

La biovariante 3 sembra essere presente in forma endemica soprattutto in Nordamerica e Cina Meridionale, la biovariante 2 è, invece, significativamente diffusa in Europa.

Nei suidi l'infezione da *B. suis* decorre spesso in forma asintomatica ma talvolta è possibile evidenziare una sintomatologia clinica caratterizzata da lesioni di tipo infiammatorio a carico dell'apparato riproduttore sia maschile che femminile e turbe riproduttive.

La principale, potenziale, fonte di infezione per i suini domestici è il cinghiale soprattutto nelle regioni europee in cui risulta diffuso l'allevamento suino all'aperto. In queste situazioni il contatto tra popolazione domestica allevata all'aperto e animale selvatico, oltre a rendere possibile la trasmissione dell'infezione tra le due popolazioni, rischia di alimentare la persistenza della diffusione brucellare nell'ambiente con il possibile coinvolgimento di altre specie domestiche animali e dell'uomo.

Indagini a carattere prevalentemente sierologico evidenziano la presenza di *B. suis* nei suidi selvatici in tutta Europa (Ruiz-Fons et al., 2006; Garin Bastuji et al., 2000; Garin Bastuji et al., 2001; Godfroid, 1994, Cvetnic et al., 2003; Hubalek et al., 2002) ma anche nelle popolazioni selvatiche di lepri dell'Est europeo (Anonimo, 2009c) che costituiscono anch'esse serbatoi naturali di questo agente infettante. In Italia, il Piemonte è stato una delle prime regioni in cui si siano attuati consistenti monitoraggi sierologici sulla popolazione dei cinghiali; oltre ad emergere elevate percentuali di sieropositività, sia in SAR sia in FdC, il 8,4% dei campioni esaminati batteriologicamente hanno evidenziato la presenza di *B. suis* biovar 1 e biovar 2 (Gennero et al., 2004). Altre indagini effettuate su diversi territori italiani hanno fatto evidenziare la presenza di *B. suis* nei cinghiali selvatici dell'Emilia Romagna (Rugna et al., 2011) e nei cinghiali e nei suini allevati della Sardegna (Alongi et al., 2008; Addis et al. 2010;).

Nel giugno 2009 a seguito di una richiesta da parte della Commissione Europea (DG Salute e Tutela dei Consumatori) è stato chiesto un parere sulla brucellosi suina al gruppo di esperti scientifici sulla salute e benessere degli animali (AHAW) (Question number: EFSA-Q-2008-665 Adopted: 05 June 2009 Published: 26 June 2009). All'interno dell'Ue la situazione epidemiologica è varia, alcuni paesi sembrano indenni alla malattia, altri hanno presentato focolai sporadici, altri segnalano l'infezione nei suidi come problematica emergente.

Non esistendo, al momento, alcun obbligo per il monitoraggio e la sorveglianza di *B. suis* nei suini domestici o selvatici c'è mancanza di dati epidemiologici sistematici nella maggior parte degli Stati membri. Ne deriva pertanto la necessità di approfondire le conoscenze sulla diffusione dell'infezione brucellare nelle specie selvatiche riconosciute come possibili *reservoir* e, possibilmente, nei suini domestici, soprattutto quelli allevati all'aperto.

Per questa ragione nel 2009 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche ha proposto un Progetto di Ricerca Corrente atto ad approfondire la situazione

epidemiologica della Brucellosi suina nelle regioni di sua competenza.

In particolare l'obiettivo è stato quello di effettuare una stima della prevalenza dell'infezione negli allevamenti suini umbri di tipo intensivo e *outdoor* e nei suidi selvatici, in Umbria.

MATERIALI E METODI

La popolazione oggetto del nostro studio è stata:

- A. Cinghiali selvatici
- B. Suini allevati a carattere intensivo e outdoor

A. Cinghiali selvatici:

Sono stati esaminati tutti i campioni appartenenti ad animali abbattuti in occasione di tre stagioni venatorie: 2009-2010, 2010-2011 e 2011-2012, ancora in corso. Allo scopo sono stati organizzati appositi incontri formativi con i responsabili degli ATC regionali ed i capisquadra venatori per illustrare le finalità del progetto e le modalità operative relative al prelievo di sangue e degli organi da effettuare al momento degli abbattimenti. Sulla base dei risultati sierologici ottenuti è stata calcolata la siero prevalenza basata su di una popolazione sconosciuta con i relativi intervalli di confidenza (I.C.) al 95%. (Altman *et al*,2000)

B. Suini allevati:

Per valutare la siero prevalenza di allevamento sono stati realizzati due campionamenti casuali di tipo *random* con diversi parametri per le due popolazioni di suini umbre (*outdoor* e intensivo) valutando la popolazione specifica presente in banca dati nazionale il 30 ottobre 2011;

Per quanto riguarda gli allevamenti intensivi il monitoraggio sierologico è iniziato alla fine del 2011 ed è ancora in corso; ha riguardato aziende a ciclo aperto e a ciclo chiuso con un numero di capi >5. Sono stati esclusi gli ingrassi.

E' stato previsto un campionamento casuale semplice attribuendo a ciascuna ASL 30 allevamenti, tranne l'ASL 3 che ha campionato tutti gli allevamenti intensivi presenti nel suo territorio. In questo modo si è potuto calcolare la siero prevalenza con un livello di confidenza del 95%, una precisione del 6% ed una prevalenza ipotizzata del 50%.

Gli allevamenti intensivi del territorio regionale registrati in BDN al momento in cui è iniziato lo studio erano 165, così distribuiti:

Tabella 1: distribuzione degli allevamenti intensivi da campionare, in base alle ASL di appartenenza				
<i>Table 1: distribution of the intensive herds to be sampled, according to the ASL competence</i>				
	ASL 1	ASL 2	ASL 3	ASL 4
N° allevamenti intensivi presenti	48	61	22	34
N° allevamenti da campionare	30	30	22	30

Anche per gli allevamenti *outdoor* il monitoraggio sierologico è iniziato alla fine del 2011 ed è ancora in corso. Sono state estratte 66 aziende considerando una prevalenza ipotizzata del 50%, una precisione del 10% ed un livello di confidenza (L.C.) del 95%. Gli allevamenti da campionare sono stati stratificati tra le varie AASSLL secondo lo schema seguente:

Tabella 2: distribuzione degli allevamenti out-door da campionare, in base alle ASL di appartenenza

Table 2: distribution of the out-door herds to be sampled, according to the ASL competence

	ASL 1	ASL 2	ASL 3	ASL4
N° allevamenti Outdoor presenti	9	47	63	98
N° allevamenti da campionare	3	15	17	31

All'interno di ogni allevamento il numero di capi soggetti a prelievo è stato lo stesso di quello previsto dal Piano di Sorveglianza della Malattia Vescicolare Suina, considerando una prevalenza attesa del 10% con un l.c. del 95%.

Tutti i sieri sono stati saggiati per brucellosi mediante Siero agglutinazione rapida al Rosa Bengala (SAR) e Fissazione del Complemento (FdC) (Manuale OIE, 2011). Sono stati considerati positivi alla fissazione i sieri con un titolo ≥ 20 UISC/ml.

In caso di positività alla SAR e Fissazione del Complemento o anche alla sola FdC si è proceduto all'isolamento batterico dagli organi e alla PCR.

L'esame batteriologico per *Brucella* è stato condotto sulla base di quanto indicato dal Manuale OIE (Anonimo, 2009°; Anonimo, 2009b). In breve, i campioni di tessuto sono stati frammentati mediante Stomacher in PBS (Phosphate Buffered Saline) in proporzione 1:9. Successivamente la sospensione è stata inoculata in Agar sangue e *Brucella* agar selettivo (Farrell's medium) e le piastre incubate a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ in aerobiosi e microaerofilia (8% CO₂) per una settimana; 0,1 mL della sospensione sono state inoltre inoculate in 9 mL di *Brucella* Brodo selettivo (Farrell's broth) ed incubate a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia (8% CO₂). In seguito, in caso di negatività al colturale diretto, dalle colture in brodo sono state allestite subcolture settimanali in Agar Sangue e Agar *Brucella*, successivamente incubate a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ in microaerofilia (8% CO₂). Per confermare la negatività, le subcolture sono state allestite per 6 settimane a partire dal momento dell'inoculo.

Le colonie con morfologia macro e microscopicamente riconducibile al genere *Brucella* sono state quindi sottoposte a PCR per identificazione di genere e specie secondo quanto descritto da Garcia Yoldi D. et. al. (2006), ed inviate per la conferma e l'identificazione del biovar al Centro di Referenza per la Brucellosi presso l'IZSAM, sede di Teramo.

L'analisi epidemiologica e statistica, possibile al momento soltanto per la popolazione di cinghiali selvatici controllata per tre anni consecutivi, ha considerato come "caso positivo" un animale il cui siero sia risultato ≥ 20 unità sensibilizzanti il complemento/ml (UISC/ml). La valutazione delle differenze tra le siero prevalenze degli anni 2010 e 2011 è stata effettuata tramite il test esatto di Fisher a due code considerando significativo un valore di $p \leq 0,05$.

RISULTATI

A. Cinghiali selvatici :

Il numero complessivo di cinghiali abbattuti e saggiati in Umbria nelle tre stagioni venatorie (2009-2011) ed i relativi risultati sono riportati nella Tab. 3 . Per quanto riguarda la Tab. 3 i capi positivi in FdC erano già positivi in SAR.

Tabella 3: N° di cinghiali saggiati durante le stagioni venatorie 2009-2011 in Umbria e relative positività

Table 3: number of wild boars sampled in 2009-2011 hunting Seasons in Umbria and resulted positive for brucellosis

	2009-2010	2010-2011	2011-2012	Totale
N° capi saggiati	341	379	501	1221
N° capi positivi SAR	24	36	11	71 (5,8%)
N° capi positivi in FdC	0	3	5	8 (0,6%)
N° capi positivi isolamento	0	1	0*	1 (0,08%)

* per 4 campioni l'esame batteriologico è ancora in corso

Per l'anno 2009, non essendoci stati sieri positivi tra i campioni esaminati, la sieroprevalenza nella popolazione di cinghiali è stata stimata pari allo 0,88% come massimo (l.c. 95%). Nel 2010 la sieroprevalenza è risultata dello 0,79% con intervalli di confidenza al 95% che oscillano tra lo 0, 20% ed il 2, 49%. Nel 2011 è risultata dello 1,02% con intervalli di confidenza al 95% che oscillano tra lo 0,37% ed il 2, 50%.

Le differenze tra le siero prevalenze riscontrate nel 2010 e nel 2011 non sono statisticamente significative.

L'unico campione risultato positivo all'esame batteriologico, tra i cinghiali selvatici della stagione di caccia, è stato un animale abbattuto nella stagione venatoria 2010-2011, nell'Area del Lago Trasimeno, di età superiore ai due anni, di sesso maschile. La reazione di siero agglutinazione rapida ha dato reazione immediata. La fissazione del complemento aveva un titolo pari a 106,6 UISC/ml. La milza, da cui sono state isolate le colonie di *Brucella suis*, presentava lesioni granulomatose diffuse, macroscopicamente evidenti. La PCR eseguita dalle colonie isolate ha permesso di identificare *Brucella suis*. Il ceppo batterico isolato è stato inviato presso il Centro di Referenza Nazionale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Teramo che l'ha identificato come *Brucella suis* biovar 2.

B e C. Suini di allevamenti intensivi e *outdoor*:

Gli allevamenti suini *outdoor* testati sono stati 23, per un totale di 102 animali. Gli allevamenti a carattere intensivo testati sono stati 66 per un totale di 654 capi (Tab. 4).

Nessun suino è risultato positivo alla SAR, né alla Fissazione del Complemento.

Tabella 4: n° allevamenti e di suini domestici saggiati in Umbria dal 2011

Table 4: number of herds and domestic pigs tested in Umbria from 2011

	Suini allevamenti	
	OUTDOOR	INTENSIVI
N° ALLEVAMENTI SAGGIATI	23	66
N° ANIMALI SAGGIATI	102	654

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

A partire dagli anni '90 la brucellosi sostenuta da *B. suis* è stata ripetutamente segnalata nelle popolazioni di cinghiali dell'Europa Centrale (Godfroid et al., 1994, 2002; Hars et al., 2000; Garin-Bastuji et al., 2000; Hubalek et al., 2002; Cvetnicet al., 2003; Godfroid and Kasbohrer, 2002). Isolamenti e sieropositività hanno interessato indifferentemente individui di diverse fasce d'età chiarendo come, nel cinghiale, l'infezione tenda a manifestarsi con patogenicità limitata, diversamente dal suino domestico. Nell'animale selvatico infatti la sintomatologia può essere anche inesistente mentre, nel suino, disturbi riproduttivi, aborti e mortalità neonatale si presentano con frequenza (Godfroid, 2002). Se si fanno alcune eccezioni (Sud Est Asiatico, Sud America) in cui l'infezione sostenuta da *B. suis* nel suino domestico sembra essere molto diffusa, la sua prevalenza risulta limitata nei suini allevati della maggior parte del mondo. Tuttavia in alcune realtà europee il successo che ha avuto l'allevamento suino all'aperto, in alternativa alle tipologie tradizionali, sembrerebbe aver creato le condizioni per una possibile trasmissione dell'infezione dal selvatico al domestico. Non sembra casuale pertanto l'elevato numero di focolai di brucellosi in aziende di suini outdoor che si è registrato dal 1994 al 2001 (Garin-Bastuji et Hars, 2001).

In Italia la presenza di *B. suis* nei cinghiali è accertata da tempo in diverse regioni del territorio nazionale in cui le sieropositività registrate sono state seguite anche da isolamenti batterici (Gennero et al., 2004; Gennero et al., 2006); inoltre è stata segnalata la positività *Brucella suis* in suini allevati in Sardegna (Alongi et al., 2008; Addis et al., 2010)

I risultati della nostra ricerca sembrano confermare questi dati. In Umbria tuttavia le percentuali di positività sono molto basse (0,6% in FdC e 0,08% all'isolamento).

La *Brucella* isolata nel cinghiale abbattuto in Umbria è stata identificata come *B. suis* biovar 2, la cui patogenicità per l'uomo è scarsa. Tuttavia, eccezionalmente, sono stati segnalati casi di brucellosi umana sostenuta da *B. suis* biovar 2 (Teyssou et al., 1989; Paton et al., 2001). Al contrario *B. suis* bv 1 e bv 3 sono altamente patogene. La patogenicità delle diverse specie di *Brucella* è generalmente specie-specifica ma non sono da escludere stabili adattamenti a specie diverse. E' quanto si è verificato in Sud-America in cui *B. suis* bv 1 si è definitivamente adattata al bovino e nella stessa specie sono stati osservati casi di infezione sostenuta da *B. suis* bv 2 (Andersen and Pedersen, 1995; Godfroid et al., 2005).

La presenza di *Brucella suis* biovar 2 nella popolazione dei suidi selvatici in Umbria, se pure con livelli di prevalenza contenuti, si colloca in un contesto di diffusione endemica di questa infezione nei cinghiali presenti in Italia. Questo dato suggerisce di mantenere ed estendere l'attività di monitoraggio dell'infezione nelle popolazioni selvatiche suscettibili, per prevenire l'infezione nell'uomo ed in particolare nei cacciatori. Inoltre, la circolazione di *Brucella suis* rappresenta un rischio per le popolazioni domestiche in particolare nelle situazioni di contatto con le popolazioni selvatiche. Questa possibilità è particolarmente diffusa negli allevamenti *outdoor*, o nei piccoli allevamenti familiari tipici delle regioni Appenniniche dell'Italia centrale, come in Umbria. I dati raccolti nell'ambito della nostra ricerca non hanno evidenziato finora casi di infezione da *B. suis* in allevamenti intensivi e outdoor umbri, ci sembra tuttavia importante che gli operatori della filiera suina siano consapevoli del rischio e possano accedere ad informazioni epidemiologiche aggiornate, per consentire il contenimento dello stesso.

BIBLIOGRAFIA

- Addis G., Cannata P., Deidda M., Cogoni M., Crobeddu S., Trincas M., Pilo C., Liardi M., Aloï D., Rolesu S. (2010) Sieroprevalenza di *Brucella* spp. in cinghiali catturati durante l'annata venatoria 2009-2010 nel sud della Sardegna. Atti del XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Genova, 27-29 ottobre 2010: 126-127.
- Alongi C, Spazziani A, Zulato B, Deiana A, Frongia M, Orrù G, Liciardi M. (2008); "Isolamento di *Brucella suis* in allevamenti suini della Sardegna"; X Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.
- Altman D.G., Machin D., Bryant T.N. and Gardner M.J., (Eds) (2000) Statistics with Confidence, "nd edn, BMJ Books, London
- Andersen, F. M., and K. B. Pedersen, 1995: Brucellosis. A case of natural infection of a cow with *Brucella suis* biotype 2. Dan. Vet. 78, 408.
- Anonymous (2009a) Bovine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCCELL.pdf
- Anonymous (2009b) Porcine brucellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2011. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.08.05_PORCINE_BRUC.pdf
- Anonymous (2009c) Scientific opinion of the Panel on Animal health and Welfare (AHAW) on a request from the commission on porcine brucellosis (*Brucella suis*). The EFSA Journal 1144, 1-112
- Cvetnic Z. *et al.* (2003) Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. Acta Ve. Hung., 51: 465-473
- Garin-Bastuji B., J. Hars, D. Calvez, M. Thiebaud, M. Artois (2000). Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvagés a *Brucella suis* biovar 2 en France. Med Mal Infect, 31 Suppl 2:202-216. Epidémiol. et santé anim., 2000, **38**, 1-5
- Garin-Bastuji, B. and Delcuelleirerie, F. (2001). Les brucelloses humaine et animale en France en l'an 2000. Situation épidémiologique - programmes de contrôle et d'éradication. Med Mal Infect, 31 Suppl 2:202-216
- B.Garin Bastuji and J. Hars (2001) Situation épidémiologique de la brucellose a *Brucella suis* Biovar 2 en France. Bulletin épidémiologique Afssa, 1/2001
- Garcia-Yoldi D., Marin C.M., De Miguel P.M., Munoz P.M., Vizmanos J.L. & Lopez-Goni I. (2006) "Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1"; Clin. Chem., 52, 779-781.
- Gennero M. S., Grattarola C., Zoppi S., Di Giannatale E., Dondo A. (2004). "Brucellosis in wild boars in Piedmont Region". Epidemiologie et Sante' Animale 45: 77-79.
- Gennero M. S., Grattarola C., Bergagna S., Zoppi S., Barbaro A., E., Dondo A. (2006). "Trend of *Brucella suis* infection in wild boar in Piedmont Region". Epidemiologie et Sante' Animale 49: 59-62.
- Godfroid, J., Michel, P., Uytterhaegen, L., Smedt, C. D., Rasseneur, F., Boelaert, F., Seagerman, C., and Patigny, X. (1994). Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. Ann. M. ed. V. et., 138:263-268.
- Godfroid, J. and Kasbohrer, A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Veterinary Microbiology, 90:135- 145.
- Godfroid, J., A. Cloeckeaert, J. P. Liautard, S. Kohler, D. Fretin, K. Walravens, B. Garin-Bastuji, and J. J. Letesson, (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the

discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet. Res.* 36, 13–25.

Hars, J., M. Valery, F. Chaduc, B. Garin, Bastuji, O. Pinguet, and S. Rossi (2000). Surveillance de la Brucellose du sanglier et du lievre dans le département de l'Allier. *Bulletin d'Information sur la Pathologie des Animaux Sauvages en France* 23: 121–138.

Hubalek, F. Treml, Z. Juricova, M. Hunady, J. Halouzka, V. Janik, D. Bill (2002) Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. *Vet. Med. – Czech*, 47, 2002 (2–3): 60–66

Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M.L., Pongolini S., Sozzi E., Tamba M., Vicari N., Merialdi G. (2011) Monitoraggio sanitario della popolazione di cinghiali (*Sus scrofa*) in Emilia Romagna. Risultati degli anni 2006-2010. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento del Suino, XXXVII Meeting Annuale, Piacenza*: 185-93.

Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Hofle U., Villanua D., Gauss C., Segales J., Almeria S., Montoro V., Gortazar 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

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.* (2001) 32 (8): e129-e130.

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. *Méd. Mal. Infect.*, 19, 160–161.