

# CIRCOLAZIONE DI *Brucella suis* NEGLI ALLEVAMENTI DI CINGHIALI NELLA REGIONE MARCHE

## *Brucella suis* INFECTION IN WILD BOARS HERDS IN MARCHE REGION

COSTARELLI S.<sup>1</sup>, GAVAUDAN S.<sup>1</sup>, SENSI M.<sup>1</sup>, MARILUNGO L.<sup>2</sup>,  
MORELLI M.S.<sup>2</sup>, PANICCIÀ M.<sup>1</sup>, ANTOLINI A.<sup>1</sup>, D'ANGELO G.<sup>1</sup>,  
BARCHIESI F.<sup>1</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria Marche- Perugia;

<sup>2</sup> Azienda Sanitaria Unica Regione Marche, Servizio veterinario

**Parole chiave:** *Brucella suis*, cinghiale, biosicurezza, Regione Marche

**Key words:** *Brucella suis*, wild boar, bio-security, Marche Region

### **Riassunto**

Nella Regione Marche l'allevamento del cinghiale viene adottato da qualche decina di aziende che utilizzano principalmente aree collinari marginali altrimenti inutilizzate. La maggior parte di queste aziende è a carattere estensivo, con una popolazione di cinghiali limitata, allevata all'aperto, in territori recintati. L'allevamento è indirizzato verso la produzione di carne di cinghiale di qualità che si distingue nettamente da quelle provenienti dalla caccia in braccata.

L'organizzazione aziendale varia dalla gestione familiare degli allevamenti più piccoli alla gestione più organizzata simile a quella delle aziende suinicole a carattere estensivo.

Scopo di questo lavoro è stato quello di indagare la presenza di *B. suis* nelle popolazioni di cinghiali degli allevamenti della Regione Marche.

Complessivamente sono stati controllati 9 allevamenti per un totale di 160 capi, effettuando un campionamento di sangue e organi in fase di macellazione. Il siero di ogni animale è stato saggiato in doppio mediante siero agglutinazione rapida al Rosa Bengala Test e Fissazione del Complemento. In caso di sieropositività in SAR e FdC o anche alla sola FdC, gli organi venivano sottoposti ad esame batteriologico per la ricerca di *Brucella* spp..

Capi provenienti da due aziende sono risultati positivi alla FdC e da un esemplare è stata isolata *B. suis*. Nonostante nelle Marche una norma regionale (DGRM 1147/2009) vieti dal 2009 la riproduzione dei capi di cattura, gli allevamenti di cinghiale dovranno implementare quelle norme di biosicurezza che impediscano l'instaurarsi di 'connecting point' con i suidi selvatici e domestici allevati in maniera estensiva.

### **Abstract**

In the Marche Region, wild boar breeding consists of a few dozens of productive units, used mainly as tools for the recovery of marginal areas and for a better quality of wild boars meat. Most of these units are extensive, with a population of wild boars limited to a few animals, which are kept outdoor in fenced areas. The typology is extremely variable. There are production units, both outdoors or indoors, managed according to intensive pigfarming strategies, together with smaller farms, family run. Aim of this work, was to investigate *B. suis* infection within wild boar herds in Marche Region.

Nine farms, for a total of 160 heads, were checked at slaughter house. The serum of each animal was assayed in duplicate using Rapid Serum Agglutination Test (SAT) and Complement Fixation Test (CFT).

Organs from CFT positive animals, were bacteriologically tested for *Brucella* spp. detection. Animals from two different herds resulted positive by CFT and *Brucella suis* was isolated in one animal..

In Marche Region a regional law (DGRM 1147/2009) is regulating wild boar breeding and trapped animals since 2009. banning the last category from reproduction. Nenevertheless the low biosecurity farms could act s a ‘connecting point’ between pathogens of the wild population and the domestic one.

## INTRODUZIONE

In Italia la presenza *Brucella* spp. in cinghiali selvatici è stata documentata a più riprese nel corso degli ultimi anni in diverse realtà regionali (Gennero et al., 2006; Alongi et al., 2008; Rugna et al., 2011; Addis et al., 2011) ; tale positività è generalmente da ricondursi alla presenza di *Brucella suis* biovar 2, che rappresenta un rischio contenuto per l’uomo in quanto dotata di scarse potenzialità zoonosiche. Tuttavia, in Piemonte, seppure in un territorio circoscritto, è stata dimostrata la presenza di infezione da *B. melitensis* e *B. suis* biovar 1; quest’ultima è stata segnalata anche in Sardegna (Addis et al. 2010) .

La circolazione di *Brucella* spp. nelle popolazioni selvatiche rappresenta quindi un pericolo potenziale per l’uomo ed in particolare per i cacciatori ma anche per gli animali domestici, per la possibilità di reintrodurre l’infezione negli allevamenti.

L’introduzione di *Brucella* spp. all’interno della popolazione domestica di suini può realizzarsi attraverso il contatto con le popolazioni selvatiche: gli allevamenti out-door, in particolare se localizzati in zone boschive, rappresentano quindi il principale fattore di rischio, come dimostrato dai focolai registrati nel corso degli ultimi anni in Europa (Anonimo, 2009c).

Nella regione Marche, un monitoraggio sierologico effettuato nel periodo 2002-2007 aveva segnalato la presenza di sieropositività per *Brucella* spp. nei cinghiali provenienti anche da Aree protette di regioni limitrofe.

Tali animali provenivano da recinti di cattura e, dopo essere trasferiti per un breve periodo d’ingrasso presso allevamenti marchigiani, erano destinati unicamente alla macellazione.

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di verificare la presenza dell’infezione da *Brucella* spp. in allevamenti della Regione Marche.

## MATERIALI E METODI

I cinghiali sottoposti a prelievo erano capi macellati in stabilimenti autorizzati della Regione Marche nel periodo marzo-dicembre 2011.

In sede di macellazione da ogni capo sono stati prelevati il sangue, la milza, le tonsille, l’utero o i testicoli; i feti qualora presenti.

Per ogni partita è stata compilata un’apposita scheda anamnestica con notizie relative al soggetto e all’allevamento di origine riservando particolare attenzione a quelle rilevanti ai fini della circolazione di *B. suis*.

Ogni siero è stato sottoposto a SAR e FdC (Anonimo 2009a, Anonimo 2009b ). A fronte di una positività in SAR e FdC o anche alla sola FdC si è proceduto a sottoporre gli organi all’esame culturale e all’eventuale conferma in PCR da colonia.

L’esame batteriologico per *Brucella* spp. è condotto sulla base di quanto indicato dal Manuale OIE (Anonimo 2009a, Anonimo 2009b ). In breve, i campioni di tessuto sono stati frammentati mediante Stomacher in PBS (Phosphate Buffered Saline) in proporzione 1:9, quindi la sospensione è stata inoculata in Agar sangue e *Brucella* agar selettivo (Farrell’s medium) e le piastre incubate a 37°C±1°C in aerobiosi e microaerofilia (8% CO<sub>2</sub>) 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°C±1°C in microaerofilia (8% CO<sub>2</sub>). In seguito, in caso di negatività alla semina diretta, dai brodi colturali sono state allestite subcolture settimanali in Agar Sangue e Agar Brucella, successivamente incubate a 37°C±1°C in microaerofilia (8% CO<sub>2</sub>). Tali subcolture sono state allestite per 6 settimane a partire dal momento dell'inoculo al termine delle quali sono state considerate negative. Quindi, le colonie con morfologia riconducibile al genere *Brucella* sono state sottoposte a PCR per identificazione di genere e specie secondo la metodica descritta da Garcia Yoldi D. et. al. (2006), e infine inviate per l'individuazione della bio variante al centro di Referenza per la Brucellosi presso l'IZS Abruzzo e Molise.

## RISULTATI

Il numero delle aziende di cinghiale esaminate nella Regione Marche ed i relativi risultati, sono riportati in Tabella 1

<b>Tab. 1:</b> aziende di cinghiale esaminate nella Regione Marche nel 2011 e relativi risultati <i>Table 1: wild boar farms sampled in Marche Region, year 2011, and results</i>	
ALLEVAMENTI CINGHIALE - Marche	
N° aziende saggiate	9
N° capi saggiati	160
N° capi positivi SAR	6
N° capi positivi in FdC	11*
N° aziende positive FdC	2 (22%)
N° capi positivi isolamento	1 (0.6%)
N° aziende positive isolamento	1 (11%)

\* 6 già positivi in SAR

Le sieropositività registrate, sia in SAR sia in FdC, sono da ricondurre a capi di 3 allevamenti distinti:

**A:** nel primo allevamento, su 15 animali inviati al macello, si sono registrate 2 positività in SAR.

La FdC eseguita su tutti gli animali ha dato esito negativo, motivo per cui non si è proceduto con l'isolamento batterico.

**B:** nel secondo allevamento su 12 cinghiali inviati al macello, un capo ha reagito positivamente sia alla SAR che alla FdC, altri tre capi hanno reagito positivamente solo alla FdC.

**C:** il terzo allevamento ha inviato al macello 20 cinghiali. Di questi, tre animali hanno dato SAR e FdC positivi; quattro sono risultati positivi alla FdC. I titoli hanno oscillato tra i valori di 26,6 UISC/ml e 265,6 UISC/ml

<b>Tab. 2:</b> animali con reazione positiva a SAR e/o FdC nelle tre aziende positive <i>Table 2: positive animals to SAT and/or CFT into the three positive farms</i>			
	Solo SAR +	SAR + / FdC+	Solo FdC +
Azienda A	2	0	0
Azienda B	0	1	3
Azienda C	0	3	4*
	2	4	7

\* in uno dei 4 animali è stata isolata *B. suis*

Gli organi degli 11 animali positivi in FDC sono stati processati per l'isolamento batterico. Erano tutti soggetti di età compresa tra 12 e 24 mesi, 7 femmine e 4 maschi.

Nessuna delle schede anamnestiche raccolte riportava episodi di aborti epidemici a carico delle aziende campionate, nemmeno in quelle in cui si sono registrate sieropositività o l'isolamento batterico. L'esame anatomopatologico effettuato al macello non ha evidenziato lesioni macroscopiche a carico degli organi bersaglio di *B. suis* quali milza, fegato, testicoli, né lesioni riconducibili a brucellosi.

La tabella 3 evidenzia la suddivisione degli animali in sieropositivi e sieronegativi, suddivisi per fasce d'età e sesso. Essendo animali destinati al macello la maggior parte dei capi rientrava nella fascia d'età sub-adulta (1-2 anni) mentre il numero di animali dei due sessi è pressoché equivalente.

Il maggior numero di sieropositività si sono apprezzate nei soggetti compresi tra 1 e 2 anni (12/95: 12,6%) e in capi oltre i due anni di età (1/19 : 5%). Negli animali giovani non sono state evidenziate sieropositività.

Dalle tonsille di un soggetto di sesso femminile, di 2 anni di età, sierologicamente positivo in SAR ed FdC con un titolo pari a 265,6 UI/SC/ml, l'isolamento colturale ha dato esito positivo per *B. suis*.

**Tab. 3:** risultati sierologici divisi per sesso ed età. La sieropositività (Siero+) è intesa come reazioni FDC+ e/o SAR+)

**Tab. 3:** serological results divided by age and sex;

	< 1 aa		1-2 aa		> 2 aa		Tot.
	Siero+	Neg.	Siero+	Neg.	Siero+	Neg.	
<b>Femmine</b>	0	8	8	54	1	12	83
<b>Maschi</b>	0	25	4	41		7	76
	0	33	12	95	1	19	160

L'azienda di provenienza del capo risultato positivo all'isolamento produce prevalentemente selvaggina minuta (fagiano e lepore) e selvaggina ungueolata. Consta di più unità produttive allevate all'aperto, separate per specie da recinti a rete con maglia romboidale (4x4 cm), doppia per un'altezza di circa mezzo metro e interrata di 40 cm.

I gruppi presenti sono costituiti da:

- circa 60 cinghiali, tra riproduttori e animali in accrescimento.
- circa 70 cinghiali in finissaggio, provenienti da "catture con chiusini" in aree protette, introdotti in allevamento previa identificazione con marca auricolare individuale e mantenuti separati per sesso fino alla macellazione.
- alcune decine di suini di razza locale (capi riproduttori e in accrescimento);

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel corso dell'indagine è emersa la difficoltà di diagnosticare *B. suis* negli allevamenti di cinghiali.

Per quanto riguarda i test sierologici infatti, 11 animali hanno dato sieropositività alla FDC a fronte di 4 cinghiali SAR positivi, confermando l'importanza di procedere con i test sierologici in parallelo (SAR e FDC) al fine di aumentare la sensibilità delle prove. In un'indagine simile Dondo e coll. (2003) hanno ottenuto isolamenti di *Brucella* spp. in cinghiali negativi alla SAR e positivi alla FDC, negativi alla FDC e positivi alla SAR o negativi ad entrambe le prove.

Nell'azienda risultata positiva per *B. suis*, la SAR ha dato reazione inequivocabilmente

positiva. Questo fatto, insieme ai titoli di fissazione così elevati in tutti i soggetti positivi, ha fatto ipotizzare che *B. suis* fosse presente in elevate prevalenze intra-aziendali. L'isolamento di *B. suis* ha tuttavia dimostrato l'infezione in un solo capo dei 4 che hanno avuto le medesime reazioni sierologiche. Tale aspetto è anche da imputarsi a caratteristiche colturali; *B. suis* appare infatti sensibile ad alcuni fattori selettivi addizionati ai terreni per Brucella (De Miguel, 2011) e, rispetto ad altre specie dello stesso genere, è maggiormente sensibile alle basse temperature di conservazione delle matrici di partenza. Questi elementi possono rendere ragione del basso numero di isolamenti ottenuti comparandoli con le positività all'esame sierologico.

In tutti i casi da noi osservati, non è stato possibile rilevare lesioni a carico di organi e tessuti a conferma che la patogenicità di *B. suis* biovar 2 nel cinghiale è più limitata di quanto non lo sia nel suino. In questa specie è possibile apprezzare lesioni granulomatose o ascessi epatici, splenici, testicolari, che possono essere del tutto assenti nel cinghiale dove le infezioni sono generalmente a carattere latente (Miller and Paige, 1998).

Vista la difficoltà di emettere già il solo sospetto della presenza dell'infezione in allevamento o in sede di macellazione, risulta plausibile una notevole sottostima dell'infezione, se non altrimenti indagata attraverso specifici piani di monitoraggio. Questi andrebbero comunque integrati da apposite norme atte a ridurre il rischio di trasmissione di *B. suis* da animali provenienti da catture alle altre specie recettive allevate, tutelando concretamente sia gli aspetti di gestione faunistica che le esigenze commerciali relative a questa specie. Da questo punto di vista la Legge Regionale della Regione Marche (DGRM 1147/2009) rappresenta un punto di partenza necessario per l'implementazione delle norme di biosicurezza degli allevamenti di cinghiali in quanto ci appaiono numerosi i punti critici che ancora insistono su questi allevamenti. La "criticità" di ogni singola azienda, infatti, può condizionare il livello di rischio di un intero territorio e in questo contesto certe realtà di allevamento possono costituire dei veri e propri "connecting points" fra i patogeni presenti nel mondo silvestre e quelli delle popolazioni domestiche dei suidi.

## **BIBLIOGRAFIA**

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\\_BRUCELL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.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](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

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.

De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. (2011) Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol.* 2011 Apr;49(4):1458-63

Regione Marche- Giunta regionale DGRM 1147/2009 (2009) ‘Misure per la gestione sanitaria e lo spostamento dei cinghiali selvatici catturati vivi’.

Dondo A., Grattarola C., Gennero S., Zoppi S., Di Giannatale E. (2003) Osservazioni preliminari sulla presenza di *Brucella suis* biovar 1 nel Piemonte. *Il Progresso Veterinario Anno LVIII, n° 3.*

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., Bergagna S., Zoppi S., Barbaro A., Dondo A. (2006). “Trend of *Brucella suis* infection in wild boar in Piedmont region (2002–2005)”. *Epidemiologie et Sante’ Animale* 49: 59–62.

Miller, M. A., and J. C. Paige, 1998: Other food borne infections. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 14, 71–89.

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.*