

AGGIORNAMENTI SULLA SITUAZIONE DELLA PED IN ITALIA

GIACOMINI E.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna, Brescia

Parole chiave: PED, diagnosi, coronavirus

Key words: PED, diagnosis, coronavirus

INTRODUZIONE

La prima segnalazione del virus della (Porcine Epidemic Diarrhoea = PED) in Europa è avvenuta nel Regno Unito nel 1971 e in seguito in altri Paesi Europei durante gli anni '80. Nel decennio successivo l'incidenza della malattia si è ridotta e non ci sono state altre segnalazioni di episodi importanti ad andamento altamente diffusivo, con la sola esclusione dell'epidemia nel nostro Paese del 2005-2006 (1). A partire dal 2010 numerosi focolai gravi sono stati descritti in Cina e nel 2013 lo stesso ceppo si è diffuso negli Stati Uniti causando la morte di 7 milioni di suini nel primo anno di diffusione e perdite economiche molto importanti. Sempre negli Stati Uniti, nel 2014 si è avuta la diffusione di un secondo ceppo (S-INDEL) ritenuto a bassa patogenicità e di un altro coronavirus (Delta Coronavirus, PDCoV) che causa sintomatologia simile alla PED. Pur non essendo inclusa nella lista OIE delle malattie notificabili, le strategie adottate dall'Unione Europea (UE) per gestire la situazione PED e impedire l'introduzione di ceppi altamente virulenti segnalati in America, hanno perseguito il principio della massima precauzione. E' stato richiesto nel 2014 un parere scientifico all'EFSA (2), per la valutazione del rischio di potenziali vie d'ingresso di PEDV e PDCoV nell'Unione europea (UE). Questo parere raccomanda la messa a punto di nuovi strumenti diagnostici nei confronti del virus, l'acquisizione di maggiori conoscenze riguardo la sequenza genomica dei ceppi circolanti, l'implementazione di un monitoraggio per definire la sieroprevalenza nei diversi paesi, la realizzazione di prove sperimentali per ottenere maggiori conoscenze sulla patogenesi e la sintomatologia delle infezioni, l'esecuzione di indagini mirate a definire l'eventuale presenza di PDCoV e la definizione dell'importanza dei mangimi contenenti sangue e plasma essiccato di suino come fattore di rischio di introduzione e diffusione della infezione da PEDV. La Diarrea Epidemica del suino è una malattia virale causata da Coronavirus, la sintomatologia è prevalentemente enterica con diarrea liquida giallastra che colpisce tutte le classi d'età nell'allevamento suino, differenziandosi però sul tasso di mortalità che può raggiungere nei suinetti sottoscrofa e in svezzamento il 50-100% (3,4), mentre nei riproduttori e nei suini all'ingrasso è quasi nullo. La morbilità in tutte le età si attesta tra 80-100%.

Il virus viene facilmente inattivato con i comuni disinfettanti (5): formalina 1%, carbonato di sodio anidro 4% (soda), solventi dei lipidi, iodofori in acido fosforico 1%, idrossido di sodio 2% (soda caustica). PEDV sopravvive per tempi variabili fuori dall'ospite in funzione della presenza di materiale organico e delle condizioni di temperatura e umidità relativa: almeno 28gg nel fango a 4°C, 7gg in alimento secco contaminato da feci a 25°C, fino a 14gg a 25°C in alimento umido e almeno 28gg in miscele umide a 25°C. PEDV perde la propria infettività a T°>60°C ed è stabile a pH 6.5-7.5 a 37°C e pH 5-9 a 4°C. La principale via di trasmissione risulta essere quella oro-fecale con oggetti, attrezzature e veicoli contaminati da feci (2).

SITUAZIONE DELLA PATOLOGIA NEI PRINCIPALI PAESI EUROPEI

Il virus in Europa ha iniziato a circolare nel maggio 2014 in Germania per poi diffondersi in altri Paesi, come riportato in tabella 1.

Tabella 1. PED in Europa

PAESE	Inizio Epidemia	PAESE	Inizio Epidemia
Germania	Maggio/'14	Spagna	2015
Ucraina	Summer/'14	Olanda	2015
Francia	Dicembre/'14	Austria	2015
Slovenia	Dicembre/'14	Estonia	2015
Belgio	Gennaio/'15	Romania	2015
Portogallo	Gennaio/'15		

Nei focolai riscontrati in Germania è stato eseguito il sequenziamento genomico che ha rivelato una percentuale di identità genomica col ceppo PEDV OH851 (ceppo S-INDEL responsabile negli USA di focolai a moderata patogenicità) del 99,5%, mentre in tutti gli altri Paesi riportati in tabella il sequenziamento ha riscontrato un'identità genomica col virus GER/L00719/2014 (virus riscontrato in Germania nel 2014) del 99,9%, con la sola esclusione dell'Ucraina dove è viceversa stato identificato un ceppo PEDV riconducibile (99,8% identità nucleotidica) ai virus americani ad alta patogenicità Kansas29/2013 e Colorado30/2013 (6). La Francia in seguito ai focolai del 2014-'15 ha decretato l'obbligo di notifica per i focolai di PEDV altamente patogeni.

SITUAZIONE DELLA PATOLOGIA IN ITALIA

In Italia la PED è presente dagli anni '90 e tra il 1994 e il 2000 il 14,2% di casi di enterite è risultato positivo a PED in microscopia elettronica. Tra maggio 2005 e giugno 2006 è stata segnalata l'ultima epidemia (1), con sintomi clinici paragonabili a tutti i focolai che si sono poi avuti nei vari Paesi Europei ossia diarrea liquida, vomito e riduzione dell'assunzione dell'alimento. I focolai segnalati in quegli anni sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Casistica osservata durante l'ultima epidemia di PED in Italia nel 2005-2006

Tipologia aziendale	Numero di focolai	
	2005	2006
Ciclo chiuso	5	18
Svezamento	2	2
Ingrasso	14	22

Tra il 2008 e il 2014 i casi di PED diagnosticati (ME, ELISA e PCR) sono stati 91 su un totale di 1778 campioni (5,12%) ed hanno coinvolto 64 differenti aziende. Nel luglio 2014 sono stati diagnosticati i primi 2 focolai nel Nord Italia in un'area ad alta densità suinicola (7) ma solo a partire da gennaio 2015 vi è stata una diffusione endemica della PED. Grazie ad una scheda anamnestica (figura 1) stilata in concerto con le varie sedi territoriali dell'Istituto

Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna si è proceduto ad acquisire i dati anagrafici e identificativi degli allevamenti sede di focolai, la percentuale di morbilità e mortalità riscontrata nel momento della visita e sono stati eseguiti prelievi di matrici biologiche (sangue e feci) per condurre esami di laboratorio al fine di avere la conferma diagnostica del focolaio e rilevare eventuali anticorpi nei confronti del virus.



SCHEDA E PROTOCOLLO CAMPIONAMENTO FOCOLAI PED 2015

TIMBRO AZIENDALE

CODIC ALLEV. TEL. ALLEVATORE

TIPOLOGIA ALLEVAMENTO: CC CA ING Altro

N° RIPRODUTTORI N° SUINI MACELLO CONSEGNA

VETERINARIO RESPONSABILE TELEFONO

DATA INIZIO FOCOLAIO ____/____/____ SETTORE INIZIO SINTOMATOLOGIA..CAP.....

ULTIMI DUE CARICHI:;

1. CAP DATA CAT ANIMALI / MANGIME / ALTRO

2. CAP DATA CAT ANIMALI / MANGIME / ALTRO

CARICO DEI SUINI: INTERNO ESTERNO

DISINFETTANTE UTILIZZATO PER MEZZI DI TRASPORTO:

CATEGORIA	SINTOMATOLOGIA		ANIMALI SINTOMATICI CON DIARREA %				INAPPETENZA SI/NO		MORTALITA' %	NOTE
	SI	NO	0-5	6-20	21-50	>50	SI	NO		
FECONDAZIONE ARTIFICIALE										
GESTAZIONE IN GABBIA										
GESTAZIONE IN BOX										
SCROFE IN SALA PARTO										
SUINETTI SOTTOSCROFA										
SVEZZAMENTO										
MAGRONAGGIO										
INGRASSO										

Figura 1. Scheda anamnestica utilizzata per la raccolta di dati in sede di focolaio

La sintomatologia riscontrata in tutti i focolai è assolutamente sovrapponibile con gli altri casi avutosi negli anni precedenti nel nostro Paese ossia diarrea liquida, dimagrimento e cachessia associata talvolta ad un alto tasso di mortalità nei suinetti sottoscrofa; diarrea liquida, vomito, ipertermia, inappetenza e agalassia nelle scrofe; diarrea liquida e inappetenza nei suini in fase di svezzamento e diarrea liquida, vomito, ipertermia e riduzione dell'assunzione dell'alimento nei suini all'ingrasso. Di seguito si riportano alcune immagini prese durante un focolaio nei diversi settori dell'allevamento (Figure 2-4).

In un numero rappresentativo di aziende da riproduzione (18) è stata rilevata la mortalità nei suinetti sottoscrofa: la percentuale media è stata del 26%, con range tra 1% e 80%. Da notare la reinfezione a distanza di più di 4 mesi in 2 aziende (1 riproduzione e 1 ingrasso).

Figura 2. Diarrea liquida in box da ingrasso

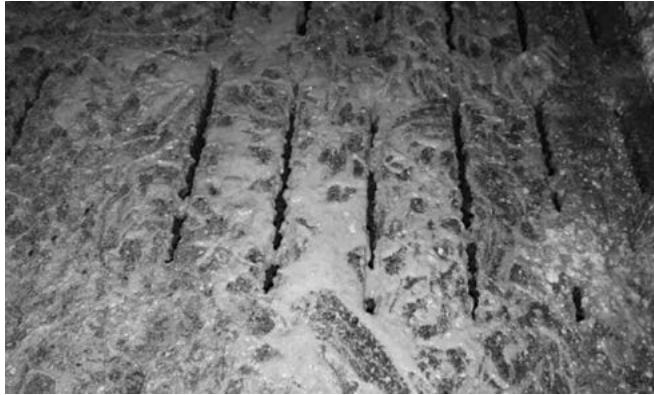


Figura 3. Sintomatologia in scrofe in gestazione in gabbia



Figura 4. Sintomatologia in suinetti sottoscrofa



I focolai riscontrati da gennaio 2015 ad ottobre 2015 sono stati in totale 165. Suddividendoli in funzione dell'indirizzo produttivo delle aziende sono stati 10 in Riproduzione a ciclo chiuso, 59 in riproduzione a ciclo aperto e 96 in allevamenti da ingrasso. Suddividendo i casi per settimana dell'anno, notiamo che il virus si è diffuso velocemente arrivando a 21 focolai diagnosticati nella 14° settimana per poi decrescere progressivamente, (Grafico 1). L'area maggiormente colpita è stata la provincia di Brescia (Figura 5).

Grafico 1. Andamento temporale dei casi di PED osservati da gennaio a ottobre 2015

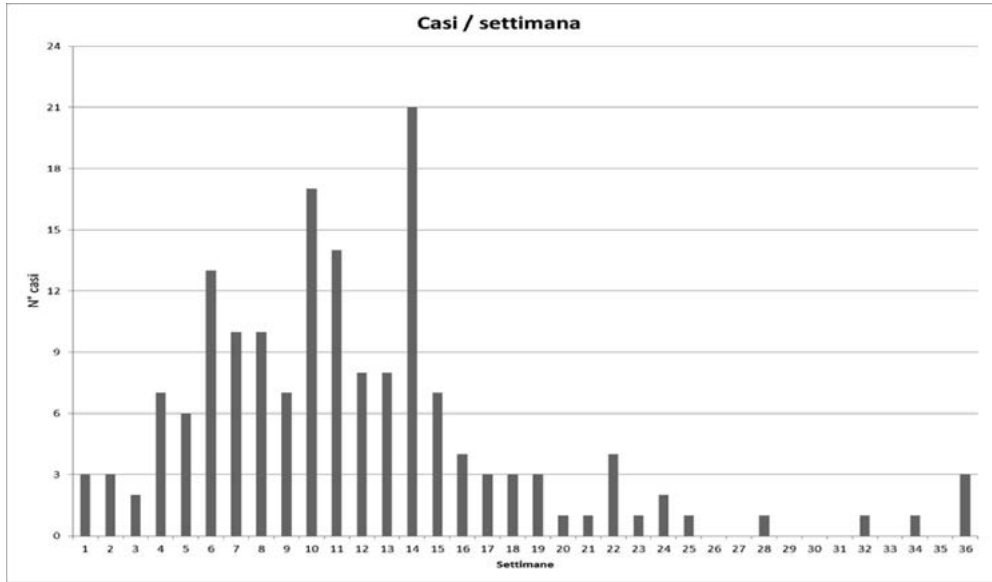
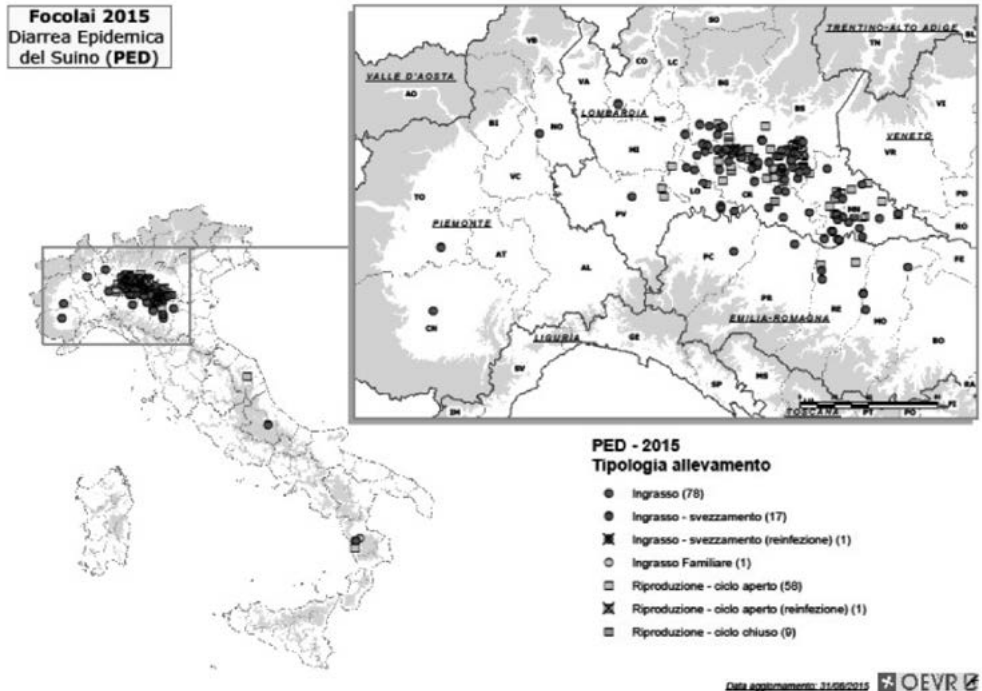


Figura 5. Mappa dei focolai di PED in Italia nel periodo gennaio-ottobre 2015



L'analisi della sequenza genomica completa eseguita su 8 campioni positivi rilevati in Italia dimostra una elevata percentuale di identità (>99%) con i ceppi circolanti in Germania, Francia, Belgio e in altri paesi europei nel 2014-2015 e con il ceppo USA OH851, ma una bassa identità con i virus circolanti tra il 2009 e il 2012 in Italia.

In conclusione si può affermare che il virus della PEDV è stato identificato maggiormente nell'area ad alta densità di suini nel Nord Italia. Tutti i 165 focolai diagnosticati hanno avuto una clinica ed un impatto sulla mandria simile, con sintomatologia classica rispetto alla malattia e causando una perdita a volte elevata di suinetti sottoscrofa. Negli animali in svezzamento invece è stata moderata. L'andamento del numero di focolai rispetto alla settimana/anno mostra un iniziale incremento per poi velocemente regredire, questo fenomeno potrebbe essere spiegato dal fatto che in molti allevamenti è stata condotta una diagnosi esclusivamente clinica senza avere una conferma diagnostica. Ne consegue che il numero di focolai reali rispetto a quelli riportati potrebbe essere superiore.

STUDIO LONGITUDINALE

Lo studio, il cui scopo era di meglio capire la dinamica d'infezione della PED, si è svolto in 4 aziende da riproduzione a ciclo aperto che hanno avuto sintomatologia riferibile a PED. Nei 4 allevamenti si è dapprima proceduto al prelievo di feci da animali sintomatici per avere la conferma diagnostica. In ogni azienda sono state campionate 10 scrofe in sala parto e 30 suinetti, prendendone 3 per ogni scrofa. I suinetti sono stati identificati tramite marca auricolare e si è prelevato il sangue venoso e le feci tramite tampone rettale ogni 2-4 settimane. I campioni sono stati fatti pervenire mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica dell'IZSLER di Brescia. Le scrofe sono state campionate una sola volta al momento dell'inizio dello studio con prelievo di sangue venoso e feci. Il sangue è stato analizzato per la ricerca di anticorpi tramite kit ELISA mentre sulle feci è stata svolta la RT-PCR quantitativa (qRT-PCR). Lo studio ha avuto inizio in momenti differenti nei 4 focolai rispetto alla comparsa dei primi sintomi (infezione) e diverso è stato il settore inizialmente colpito. In tabella 3 vengono riassunti i dati delle 4 aziende.

Tabella 3. Dati riassuntivi delle aziende in cui è stato condotto lo studio longitudinale.

Azienda	Settore comparsa sintomatologia	Settore inizio studio
1	Gestazione gabbia	sala parto
2	Ingrasso	sala parto
3	Sala parto	sala parto
4	Gestazione box	sala parto

Scrofe

La percentuale delle scrofe che hanno mostrato un livello anticorpale nei confronti del virus varia dal 30% nell'allevamento numero 3 al 80% nell'allevamento numero 1. La percentuale delle scrofe positive a qRT-PCR varia da 70% nell'azienda numero 4 a 100% nella numero 2 e 3 mentre la media di copie genomiche per grammo di feci ottenuta tramite qRT-PCR ha un range tra 1,4E+06 e 2,00E+08 come riportato in tabella 4.

Azienda	% Scrofe positive AcELISA	% Scrofe positive qRT-PCR	Media qRT-PCR (copie genomiche/gr feci)
1	80	80	1,4E+06
2	50	100	2,00E+08
3	30	100	1,4E+08
4	33	70	1,9E+06

Suinetti

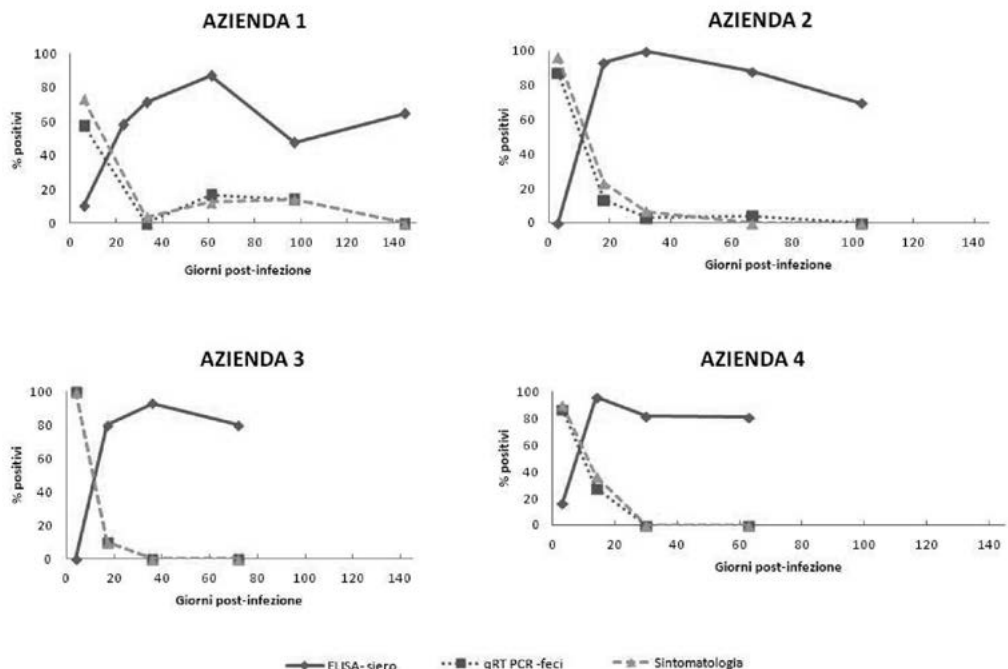
Sierologia Ac ELISA

I campionamenti sono stati eseguiti per 145, 103, 72 e 63 giorni post-sintomatologia mentre nelle aziende 4 e 5 per 70 giorni circa. Il comportamento sierologico anticorpale degli animali del focolaio 3, 4 è sovrapponibile (Figura 6). A fronte di un rapido aumento della percentuale di animali sierologicamente positivi nei primi 20 giorni post-infezione, dopo circa 10 giorni, si assiste ad un lieve decremento. Diversamente nella prima azienda si è assistito ad un aumento di animali positivi nei primi 60 giorni post-infezione, un lieve decremento e un successivo nuovo aumento.

qRT-PCR e sintomatologia

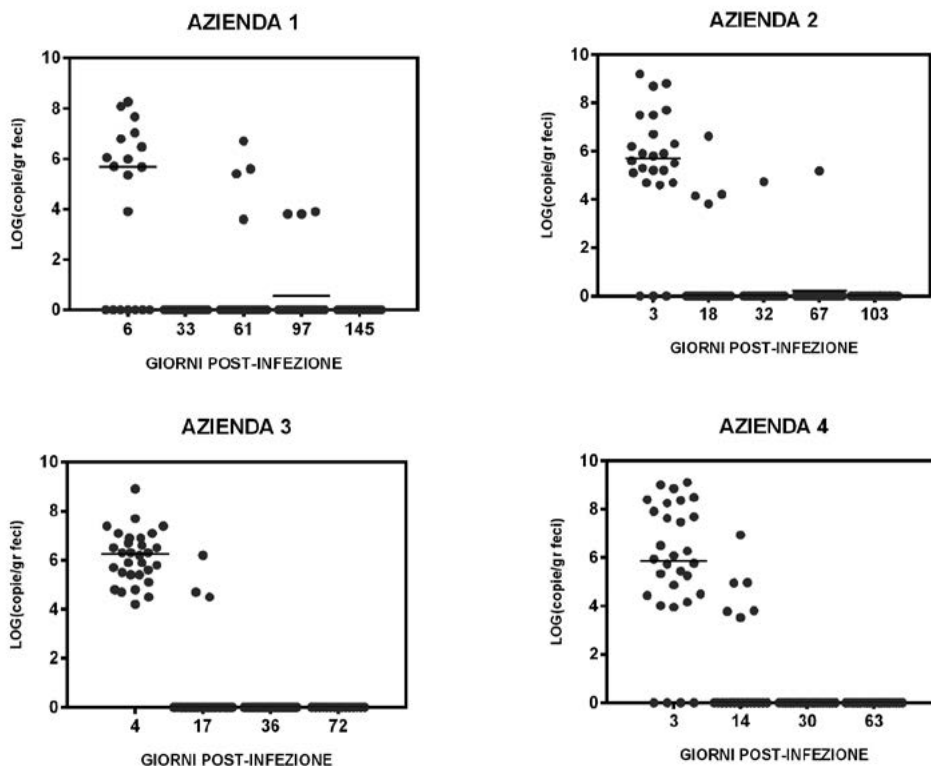
Gli animali percentualmente positivi in RT-PCR dalle feci e sintomatici hanno seguito una dinamica simile nei focolai 2,3 e 4 (Figura 6): la percentuale di animali positivi al primo campionamento è stata rispettivamente di 87.5, 100 e 86.7 per cento. Col procedere dei campionamenti si è notato una diminuzione degli animali positivi fino alla negatività osservata in media a 45 giorni dall'infezione. Nell'azienda numero 1 la percentuale di animali positivi è stata del 58%; in seguito ad un decremento del titolo virale a 33 giorni post-infezione tutti gli animali sono risultati negativi per poi assistere ad una riacutizzazione tra i 34 e 61 giorni post-infezione in cui si è registrato il 17% di positività. L'andamento della percentuale degli animali sintomatici nei 4 focolai ricalca la positività virale.

Figura 6. Suinetti; qRT-PCR vs sintomatologia vs sierologia Ac ELISA



La quantificazione delle copie genomiche su grammo di feci tramite qRT-PCR dimostra dei titoli alti vicino all'inizio dell'infezione per poi regredire col trascorrere del tempo come dimostrato nella Figura 7.

Figura 7. Suinetti; titoli in copie genomiche/gr di feci



In conclusione, tramite lo studio longitudinale in 4 aziende si sono evidenziate % di mortalità e % di positività al virus molto diverse. Il momento dell'entrata del virus nelle aziende rispetto al momento del parto, e quindi il grado di immunità delle scrofe e il livello di circolazione del virus, possono aver determinato la maggiore o minore gravità della PED in queste aziende.

MONITORAGGIO MEZZI DI TRASPORTO

Il periodo di studio è stato tra gennaio e settembre 2015 ed ha coinvolto 4 impianti di macellazione situati nel Nord Italia. Presso il punto di scarico dei suini è stato eseguito sulla motrice del mezzo di trasporto un primo tampono ambientale (sporco) mentre un secondo (pulito) è stato ottenuto con le medesime procedure dopo l'avvenuto lavaggio e disinfezione dell'automezzo. I tamponi ambientali utilizzati sono costituiti da un manico in legno sulla cui estremità è fissata una garza assorbente.

I tamponi ("sporco" e "pulito") sono venuti a contatto con un metro quadrato di pavimentazione del pianale dell'automezzo. I campioni sono stati fatti pervenire mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica dell'IZSLER di Brescia. Le matrici sono state analizzate tramite qRT-PCR per la ricerca e quantificazione del virus.

I risultati qualitativi rivelano su un totale di 409 tamponi eseguiti, dei quali 213 sporchi e 196 puliti una percentuale di positività del 7,1%. I tamponi sporchi positivi sono stati 23 cioè il 10,8% mentre quelli puliti 6, ovvero il 3,1% come mostrato in tabella 5. I risultati quantitativi rivelano nei tamponi sporchi una media di copie genomiche/ml di $6,46E+08$ mentre su quelli puliti $6,99E+05$.

5. Risultati del monitoraggio dei mezzi di trasporto

Tamponi	Numero	Positivi	% Positività
Sporco	213	23	10,8%
Pulito	196	6	3,1%
Totale	409	29	7,1%

Questo studio preliminare dimostra l'importanza dei mezzi di trasporto come fattore di rischio nella diffusione della Diarrea Epidemica del suino, sia come veicoli attivi se non adeguatamente sanificati sia come veicoli passivi nella movimentazione di suini infetti ed eliminatori tra un'azienda ed un'altra.

BIBLIOGRAFIA

1. Martelli P., Lavazza A., Nigrelli A.D., Merialdi G., Alborali L.G. and Pensaert M.B., 2008. *Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy*. Vet Rec. **Vol. 162** (issue 10); pag. 307-310.
2. Bøtner A., *EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare)*, 2014. *Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging pig deltacoronavirus*. 2014, European Food Safety Authority.
3. Saif L.J., Pensaert M.B., Sestak K., Yeo S.G. and Jung K. 2012 *Coronaviruses in Diseases of Swine*, Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S. and Taylor D. (Eds) Blackwell: Oxford. pag. 501–524.
4. Stevenson G.W., Hoang H., Schwartz K.J., Burrough E.R., Sun D., Madson D., Cooper V.L., Pillatzki A., Gauger P., Schmitt B.J., Koster L.G., Killian M.L. and Yoon K.J., 2013. *Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences*. J Vet Diagn Invest. **Vol. 25** (issue 5); pag. 649-54.
5. Hofmann M. and Wyler R., 1989. *Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV)*. Vet Microbiol. **Vol. 20** (issue 2); pag. 131-142.
6. Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S. 2015. *Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine*. Emerg Infect Dis. **Vol. 21** (issue 12) pag. 2235-2237 <http://dx.doi.org/10.3201/eid2112.150272>
7. Boniotti M.B., Papetti A., Lavazza A., Alborali G., Sozzi E., Chiapponi C., Faccini S., Bonilauri P., Cordioli P., and Marthaler D. 2016. *Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus in Italy*. Emerg infect Dis 22;83-87.