

**AGGIORNAMENTO SULLA DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED):
SITUAZIONE ATTUALE, DIAGNOSI E CONTROLLO**

*Redatto a cura del Gruppo di lavoro IZSLER: Dr. Antonio Lavazza, Dr. Loris Alborali, Dr.ssa Beatrice Boniotti
con il contributo dei Colleghi dei Reparti di Genomica, Virologia e Agenti ad alta diffusione e biotecnologie
diagnostiche della Sede di Brescia e delle Sezioni Diagnostiche di Mantova, Brescia e Reggio-Emilia*

La Diarrea Epidemica del suino è una malattia virale causata da Coronavirus (Porcine Epidemic Diarrhoea Virus = PEDV) clinicamente caratterizzata da diarrea, diffusa in Europa ed in Asia e dall'Aprile 2013 diffusa anche nelle Americhe. Ad oggi sono segnalati più di 9000 focolai in USA e in Canada, cui si è associata, più recentemente, una estensione al Centro e Sud America (Colombia, Repubblica Domenicana, Mexico, Perù etc). Le perdite produttive legate alla mortalità e alla riduzione degli incrementi ponderali hanno determinato notevoli danni economici tanto da mettere a dura prova il settore suinicolo del Nord America, che si stima aver perduto circa il 25% della propria produzione. L'enorme risalto e la gravità della situazione americana hanno destato non solo forti ripercussioni dal punto di vista commerciale ma anche serie preoccupazioni per il rischio d'introduzione del PEDV in altri Paesi e segnatamente in Europa.

Ciò anche in considerazione del fatto che, accanto al PEDV, è stato identificato e ritenuto co-responsabile dei quadri clinici osservati un secondo coronavirus suino (il Deltacoronavirus), geneticamente separato dal PEDV, segnalato per la prima volta ad Hong Kong nel 2011. A oggi, il Porcine deltacoronavirus (PDCoV) è stato identificato negli USA in oltre 240 aziende in 14 stati, spesso in associazione al PEDV, ed alcuni focolai sono stati registrati anche in Canada (Ontario). Non è tuttavia noto il reale ruolo di questo virus nell'eziopatogenesi delle enteriti acute osservate. Non a caso, quindi, la DG-Sanco ha ritenuto di porre uno specifico quesito all'EFSA per conoscere, tra gli altri aspetti, di valutare il rischio d'introduzione di PEDV e Deltacoronavirus in Europa e le possibili conseguenze sul settore suinicolo europeo, indicando nel contempo possibili strategie di prevenzione e controllo. Nell'ottobre 2014 l'EFSA ha quindi prodotto una "Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus" [<http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/3877.htm>]

Sintesi della situazione della PED in Europa e in Asia

La PED è stata segnalata per la prima volta in Europa (UK) nel 1971 e in seguito in altri Paesi Europei. Negli anni novanta la PED è stata riscontrata con progressiva frequenza in Asia (Giappone, Korea, Filippine, Tailandia, Cina). Inoltre, in Cina sono stati segnalati diversi focolai nel 2010-2013 con un andamento epidemico ed elevata virulenza (simile a quelli osservati in Italia del 2005-2006, vedi oltre). Viceversa in Europa negli anni '80 e '90 i casi clinici attribuibili al PEDV si sono ridotti a pochi casi isolati ed anche la sieroprevalenza si è andata via via riducendo. Non vi sono, infatti, altre segnalazioni di episodi importanti ad andamento altamente diffusivo, oltre all'epidemia nel nostro Paese del 2005-2006 [Martelli et al., 2008]. Negli ultimi mesi del 2014 la PED è stata segnalata, oltre che in Italia (2 casi nel 2014) anche in Germania, Olanda ed Ucraina e i ceppi identificati sono risultati geneticamente simili al ceppo USA (OH851) che è considerato meno aggressivo e grave rispetto a quello che inizialmente comparve in USA.

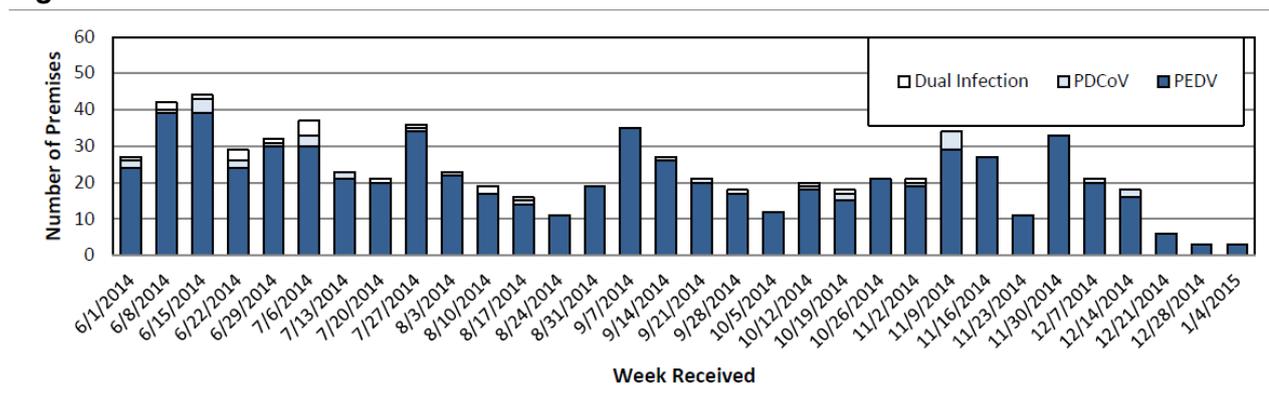
Situazione in USA

I primi focolai in USA si sono verificati ad aprile 2013 e si sospetta a seguito di importazione di prodotti contaminati. Le analisi filogenetiche hanno evidenziato una stretta relazione con i ceppi presenti in Asia e in particolare in Cina. Le caratteristiche principali della malattia gastroenterica erano: 1) elevata morbilità in tutte le età (> 80%); 2) elevata mortalità in suinetti sottoscrofa e

svezziati. Una seconda introduzione avrebbe poi portato sul suolo americano un secondo ceppo di origine cinese, a minor patogenicità. A giugno 2014, la malattia era stata segnalata in 30 stati USA con oltre 7000 focolai. Nel 2014 si è registrata la diffusione in Canada, Centro America (Messico e Repubblica Dominicana) e Sud America (Perù, Colombia). Le perdite stimate in USA sono state di 4-5 milioni di suinetti in un anno. Con l'applicazione di strategie di intervento basate principalmente sulla rigida applicazione di misure biosicurezza e l'adozione della vaccinazione si è ridotta ma non annullata l'incidenza della malattia. L'andamento settimanale dei casi di PED da giugno 2014 ad oggi è consultabile sul sito dell'USDA:

http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/swine/downloads/secd_sit_rep_01_15_15.pdf.

Figura 1



Situazione in Italia

In Italia la Diarrea Epidemica Suina (*Porcine Epidemic Diarrhoea* - PED) è presente sin dai primi anni '90. La sua diffusione è andata aumentando con il contemporaneo declino dei casi di Gastroenterite Trasmissibile (TGE), l'altra enterite da Coronavirus del suino, largamente diffusa negli anni '70 e '80. La prima seria ondata epidemica di PED si è registrata all'inizio degli anni '90. Di fatto, dopo la sua comparsa, la PED ha avuto nel nostro Paese un andamento ciclico con picchi epidemici l'ultimo dei quali risale al periodo 2005-2006. In particolare nel periodo 1994-2000, l'esame al ME ha permesso di evidenziare particelle virali riferibili a PEDV in un totale di 296 (14.2%) su 2072 campioni esaminati. Proprio in concomitanza con l'ultima epidemia di PED, descritta in maniera dettagliata nel lavoro di Martelli et al. [2008], al fine di affinare le metodiche diagnostiche e ottenere risultati affidabili, presso l'IZSLER si sono sviluppati metodi diagnostici di screening e di conferma. Tra i primi per la diagnosi virologica una double antibody sandwich (DAS) ELISA basata su anticorpi monoclonali (MAbs) prodotti verso il ceppo di riferimento europeo (CV-777) [Sozzi et al., 2008] e un'ELISA sierologica, tipo "antigen capture", sempre basata sull'uso di MAbs, per la identificazione di anticorpi specifici [Sozzi et al., 2007]. Per una diagnosi di conferma si è utilizzata la tecnica di RT-PCR descritta da Kim et al. [2001] che utilizza primers per il gene S. Nel periodo 2008-2014 il riscontro di positività virologiche in forma costante ma sporadica (vedi tabella 1) indica presumibilmente una situazione caratterizzata da una consistente immunità di popolazione. Ne è prova il fatto che positività virali sono state identificate nelle stesse aziende anche a distanza di tempo (1-3 anni). Su 1756 conferimenti in 7 anni, i casi totali sono stati 73 in 60 aziende (Tabella 1).

Tabella 1

Anno	n° esaminati	n° casi positivi	n° aziende positive
2008	252	4	3
2009	193	23	16
2010	157	21	19

2011	204	9	9
2012	373	10	9
2013	294	4	2
2014	283	2	2
TOTALE	1756	73	60

Nel corso del 2014 sono stati identificati 2 soli casi di PED, mentre nella seconda metà di gennaio 2015 sono stati diagnosticati 6 focolai di PED in Lombardia (4 in provincia di Brescia e 2 in Provincia di Mantova) e 2 nel resto d'Italia (1 in Piemonte ed 1 in Calabria); tutti clinicamente e dal punto di vista dei danni indotti sovrapponibili ai focolai descritti in Italia negli anni precedenti. Tuttavia, a differenza dei ceppi PEDV identificati fino al 2012, il ceppo responsabile di questi focolai (2014-2015) è geneticamente simile al ceppo americano OH851, che, come già ricordato, è considerato meno aggressivo e grave rispetto a quello ad elevata virulenza che in America ha causato i gravi danni descritti.

Le indagini sierologiche effettuate dapprima nel 2007 [Sozzi et al., 2007] e poi sporadicamente negli stessi anni avvalorano l'ipotesi di una presenza endemica della malattia. Più di recente, proprio sulla spinta delle notizie provenienti dagli USA si è avviata presso il nostro Ente un'indagine volta a verificare la sieroprevalenza in aziende della Pianura che ha confermato, in via preliminare la presenza di un certo numero di aziende positive con prevalenze estremamente variabili all'interno di ciascuna azienda.

Le indagini biomolecolari sui ceppi PEDV identificati sono state realizzate all'IZSLER anche grazie ai metodi diagnostici sviluppati nel progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute dal titolo "*Sviluppo di metodologie di biologia molecolare in sanità*" (Responsabile Scientifico Dr.ssa Beatrice Boniotti). In particolare è stato sviluppato un protocollo "Pan-Coronavirus" [Lelli et al. 2013] che permette di rilevare e identificare le diverse specie virali appartenenti alla famiglia Coronaviridae incluso anche il nuovo Deltacoronavirus, fino ad oggi non segnalato in Europa. Nel contempo sono state sviluppate metodiche PCR specifiche per amplificare porzioni rispettivamente della RdRp (530 nt), e della proteina M (555nt) dei soli coronavirus suini (PEDV e TGEV), nonché la già citata metodica di RT-PCR decritta da Kim et al. [2001] per l' amplificazione di porzioni (651nt) della proteina esterna S1 del PEDV. Attualmente è in corso un' analisi filogenetica dei prodotti amplificati e sequenziati di 26 differenti campioni positivi identificati dal 2006 al 2013, oltre ovviamente a tutti i ceppi identificati nel 2014 e 2015, posti a confronto con sequenze di PEDV depositate in GenBank.

Sorveglianza e controllo della PEDV in allevamento

L'approccio al controllo della malattia è basato sostanzialmente sulla sorveglianza attiva e sulla diagnosi rapida, sulla sorveglianza passiva, sull'applicazione di rigide misure di biosicurezza negli allevamenti e sui protocolli di pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto che movimentano animali, prodotti e mangimi.

Il sospetto di PED si deve avanzare quando compare improvvisamente una forma enterica caratterizzata da diarrea liquida e profusa e diffusione rapida tra suini dello stesso settore e tra capannoni contigui. Normalmente la morbilità è molto elevata (80-100%) mentre la mortalità è molto bassa o assente nei riproduttori e nei grassi ed elevata nei suinetti sottoscrofa ed in svezzamento. Un episodio sospetto si può considerare accertato quando si ha un riscontro di laboratorio con evidenziazione di positività per coronavirus mediante RT-PCR e/o ELISA. Di seguito viene effettuata la tipizzazione del ceppo al fine di monitorare l'eventuale circolazione di nuovi ceppi. I campioni possono essere conferiti a tutte le Sezioni Diagnostiche dell'IZSLER.

Per una sorveglianza passiva negli allevamenti può essere utilizzato lo screening sierologico quale metodo per individuare gli allevamenti infetti e i settori produttivi coinvolti. Per l'attivazione della

sorveglianza passiva è indispensabile in prima istanza far riferimento alla definizione di episodi sospetti e confermati di PED sopra riportata. Il campionamento dovrà essere effettuato prelevando un congruo e significativo numero di sieri da ciascun settore produttivo (riproduttori, magronaggio, ingrasso, svezzati e sottoscrofa). L'analisi sierologica viene attualmente eseguita all'IZSLER con un test sviluppato in-house basato sull'uso di anticorpi monoclonali verso il ceppo di referenza CV777.

In allevamento devono essere intensificate le misure di biosicurezza esterna ed interna previste nel protocollo della "Biosicurezza degli allevamenti suini" tenendo in particolare considerazione i parametri che riguardano la trasmissione via fecale degli agenti patogeni. Per quanto riguarda i mezzi di trasporto dovranno essere preferiti i carichi di animali (morti, scarti e venduti) all'esterno dell'azienda e comunque dovranno essere eseguite e verificate le tecniche di pulizia e disinfezione dei mezzi e la presenza di aree dedicate alla pulizia e disinfezione dei veicoli.

Riferimenti bibliografici:

1. Martelli P., Lavazza A., Nigrelli A.D., Merialdi G., Alborali L.G., Pensaert M.B. (2008). An epidemic of diarrhoea caused by Porcine Epidemic Diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec* 2008 MAR 8 162(10):307-310
2. Sozzi E, Luppi A., Lelli D, Moreno Martin A, Canelli E, Brocchi E, Lavazza A, Cordioli P. (2010). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RTPCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 88(1):166-168.
3. Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Moreno A, Canelli E, Cordioli P, Lavazza A, Brocchi E. (2008). Sviluppo e applicazione di un test ELISA per la determinazione del coronavirus della diarrea epidemica suina (PED) Atti Convegno SIPAS. - Vol. 34 – p. 247-252.
4. Sozzi E, Alborali L, Luppi A, Lelli D, Moreno A, Cordioli P, Brocchi E. (2007). ELISA con anticorpi monoclonali per la diagnostica sierologica della diarrea epidemica suina (PED) Atti Convegno SIPAS. - Vol. 33 - p 415-420.
5. Sozzi E., Papetti A., Lelli D., Boniotti B., Moreno Ana, Brocchi E., Alborali L., Lavazza A., Cordioli P. Diagnosis and investigations on PED in Northern Italy 8th Annual Meeting of EPIZONE 23-25 September 2014, Copenhagen, Denmark
6. Kim, S. Y., Song, D. S. & Park, B. K. (2001) Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus by duplex RT-PCR. *J. Vet. Diagn. Investig.* 13, 516-520
7. Lelli D., Papetti A, Sabelli C, Rosti E, Moreno A, Boniotti MB. "Detection of Coronaviruses in Various Bat Species in Italy. *Viruses.* 2013 Oct 31;5(11):2679-89