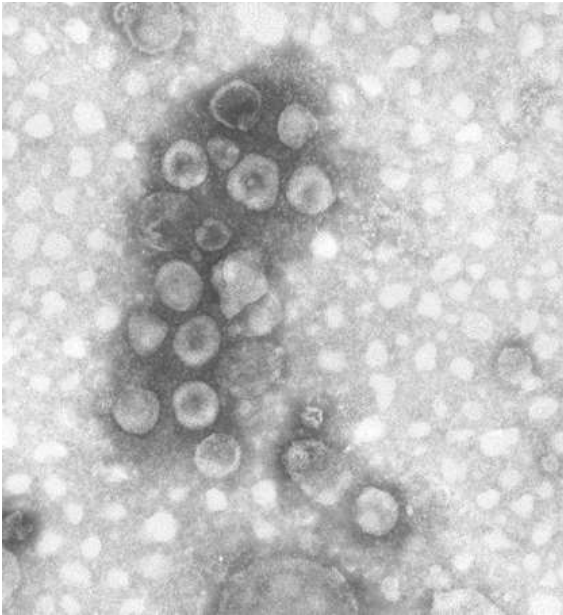


**Giornata Autunnale SIPAS
PARMA 9 ottobre 2015**



AGGIORNAMENTI SULLA SITUAZIONE DELLA PED IN ITALIA

Enrico GIACOMINI

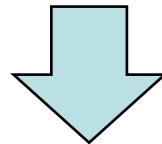
**Sezione Diagnostica di Brescia
IZSLER, Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia Romagna**

Agenda

- A. Il problema PED visto da EU e EFSA e fattori di rischio
- B. Situazione PED in Europa
- C. Situazione PED in Italia
 - 1. Quadro complessivo
 - 2. Studio Longitudinale
 - 3. Studio al macello
- D. Conclusioni

Situazione in Europa (fino al 2014)

- ✧ '70: Prima comparsa in Europa (Regno Unito)
- ✧ '80: segnalazione in diversi paesi Europei
- ✧ '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 altre segnalazioni di episodi importanti ad andamento altamente diffusivo, oltre all'epidemia nel nostro Paese del 2005-2006 [Martelli et al., 2008]

Strategie UE dopo emergenza USA

- ✧ misure precauzionali per prevenire eventuale introduzione in EU
- ✧ richiesta di parere scientifico ad EFSA (valutazione dei fattori di rischio)

EFSA

Regarding the risk assessment of potential entry routes of PEDV and PDCoV into the European Union (EU), it was agreed with the European Commission that this scientific opinion would describe the currently available scientific evidence and identify data gaps, but a full risk assessment would not be performed.

Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus1 EFSA Journal 2014;12(10):3877

Misure precauzionali per controllo in EU

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU)

No 483/2014 - 8 Maggio 2014

on protection measures in relation to porcine diarrhoea caused by a deltacoronavirus as regards the animal health requirements for the introduction into the Union of spray dried blood and blood plasma of porcine origin intended for the production of feed for farmed porcine animals

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU)

No 750/2014 -10 Luglio 2014

on protection measures in relation to porcine epidemic diarrhoea as regards the animal health requirements for the introduction into the Union of porcine animals

Prorogata con No 1746/2015 -30 Settembre 2015

Cosa ci raccomanda il report EFSA ?

EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2014. "Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging pig deltacoronavirus". EFSA Journal 2014;12(10):3877, 68 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3877

TOR1: The current epidemiological situation in North America and Asia and elsewhere in the world as regard PED and the new porcine deltacoronavirus

Promote harmonized diagnostic tools for PEDV as well as for PDCoV

TOR3: Possible differences between the European classical PED alphacoronavirus strains and the ones currently circulating in the rest of the world, in particular in the Americas, and the possible existence of cross-protecting immunity

The **genetic sequence** of further recent PEDV-EU isolates should be determined to understand PEDV evolution in Europe and the possible link with PEDV-Am and/or PEDV-As strains

Comparative animal studies including PEDV-EU, PEDV-Am and PEDV-As strains should be performed to obtain knowledge on their **differences in virulence**

More knowledge is required regarding the cross-protection between PEDV-EU, PEDV-Am and PEDV-As strains, which could be acquired by performing **cross-infection experiments**

Cosa ci raccomanda il report EFSA ?

TOR4: Impact of the different PED alphacoronavirus strains and of the new porcine deltacoronavirus in pigs in different immunological scenarios

The assessment of the possible impact of PEDV infection in the EU would require **monitoring of the PEDV-seroprevalence** level in Europe

TOR2: Characterisation of the new porcine deltacoronavirus as an emerging disease, especially as regards the severity of the disease induced

Experimental studies are needed to obtain more knowledge on the pathogenesis and clinical signs of PDCoV infection

TOR5: Risk assessment of potential entry routes of PED and the new porcine deltacoronavirus in the EU ranking them on the basis of the level of risk with a view to enhance risk mitigation, prevention and preparedness

More knowledge is required to assess the importance of **feed components, blood and semen** in the spread of PEDV

Cross-contamination of any object or feed with intestinal contents and faeces from PEDV-infected pigs should be prevented

The influence of variations in **spray-drying processes** should be validated more extensively for PEDV

Epidemiologia e Fattori di rischio

La principale via di trasmissione è oro-fecale con oggetti/materiali/attrezzature contaminate da feci

[Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging porcine deltacoronavirus¹ EFSA Journal 2014;12(10):3877]

Suini eliminatori: da 24-48 ore p.i. per 7 gg, evidenziata eliminazione fino a 2 mesi [Carvajal et al, 1995;. Canto et al, 2006;. Hesse et al, 2014), Hesse et al, 2014 Sun ed altri, 2014]

Automezzi: contaminati da feci infette identificati come importante veicolo di diffusione del virus tra aziende negli USA, conseguentemente vi è stato un drastico cambiamento nelle procedure di biosicurezza e disinfezione dei veicoli [Lowe et al., 2014]

Fattori di rischio (cont.)

Liquami: PEDV rimane infettivo se la massa è conservata per 14 gg a T° ambiente e per 28 gg a T° 4° C

Seme ed embrioni: non ci sono dati certi sulla capacità di queste due matrici di infettare o trasmettere il virus, ma il seme è risultato positivo in PCR [Ruiquin Sun et al., 2014]

Sangue intero: RNA rilevato a bassi livelli in questa matrice ma nessun studio che descrive un ruolo nella trasmissione del virus

Fattori di rischio (cont.)

Aria:

- RNA virale identificato aerosol da stanze dove sono detenuti suinetti infettati sperimentalmente [Alonso et al., 2014].
- Campioni di aria prelevati in condizioni di campo invece risultano negativi

Nel complesso PEDV può essere trasmesso per via aerea a breve distanza ma apparentemente non sarebbe in grado di infettare per via aerea altri suini (**teoria in forte discussione**)

Sangue e plasma spray-dried: ci sono studi che dimostrano la positività del virus in questa matrice e il suo potere infettante [Dee et al., 2014] ma di fatto non ci sono prove sperimentali che suggeriscono che suinetti alimentati con mangimi contenenti SDPP -PED positivo possano essere infettati

Situazione in Europa 2014-'15: Germania

Alcuni focolai nel **maggio 2014**

Ulteriori focolai nel 2015

Nei suini all'ingrasso alta morbilità ma non si è registrata mortalità

Negli allevamenti con riproduttori mortalità fino al 85% in suinetti sottoscrofa

Il sequenziamento dei ceppi virali tedeschi ha rivelato

- 99,5% di omologia genomica con il ceppo PEDV OH851 (GenBank KJ399978) responsabile negli USA di fenomeni clinici lievi
- 98,7% di omologia genomica con i ceppi attualmente circolanti in USA e Cina altamente virulenti
- <97% di omologia genomica con i ceppi storici (CV777)

[Dennis Hanke et al., 2015 Re-emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in Germany. 10° ESVV International Congress + 9° Epizone Annual Meeting. Montpellier (France) 31/8-4/9/2015]

Situazione in Europa 2014-'15: Francia

Dicembre 2014: 1° caso in Bretagna in allevamento RCC

Campioni raccolti: digiuno da 3 animali deceduti immediatamente e pool di feci di 5 animali sintomatici. Feci positive in RT-PCR per 29 giorni in suinetti sottoscrofa e 20 gg in suini grassi.

Il sequenziamento del virus, nominato PEDV FR / 001/2014 ha rivelato

- 99,9% di omologia genomica con ceppo tedesco GER/L00719/2014

Misura protettiva adottata dalla Francia: PED classificata nella prima categoria della lista delle patologie ad alto rischio per la salute degli animali di conseguenza rendendola **obbligatoriamente notificabile**

Beatrice Grasland et al., 2015 *Description of the first case of porcine epidemic diarrhea in France in December 2014 and the duration of viral shedding in the herd.* 10° ESVV International Congress + 9° Epizone Annual Meeting. Montpellier (France) 31/8-4/9/2015]

Situazione in Europa 2015: Belgio

Gennaio 2015: 1° focolaio in allevamento da ingrasso e successivamente altri sporadici casi in altre aziende

Il sequenziamento ha rivelato

- >99% di omologia genomica con ceppo PEDV tedesco (PEDV / GER / L00721/2014)
- 99,6-99,9% di omologia genomica (gene S1) con ceppo USA OH851
- < % di omologia con ceppo storico europeo (CV777)
- < % di omologia genomica con ceppi altamente virulenti USA

Isaura Christiaens et al., 2015 Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus strains isolated from novel outbreaks in the European Union, Belgium. 10° ESVV International Congress + 9° Epizone Annual Meeting. Montpellier (France) 31/8-4/9/2015]

Situazione in Europa 2014-'15: Slovenia

Dicembre 2014 - febbraio 2015 raccolte 63 feci provenienti da 10 allevamenti con sintomatologia riferibile a PED, ma con assenza di mortalità. Prima positività RT-PCR il 6 gennaio 2015 e poi a febbraio 2015

Il sequenziamento del virus ha rivelato

- 99,7% di omologia genomica gene S1 con virus tedesco (L00719/2014) e ceppi a bassa virulenza circolanti in USA nel 2013

Risultati preliminari con kit ELISA rivela il 51% animali sieropositivi nel 78% delle aziende esaminate

Ivan Toplak et al., 2015 First detection of porcine epidemic diarrhea virus in Slovenia, 2015. 10° ESVV International Congress + 9° Epizone Annual Meeting. Montpellier (France) 31/8-4/9/2015]

Situazione in Europa 2015: Portogallo

Gennaio 2015, nel Sud del Portogallo primo focolaio. Positività virale in RT-PCR

Il sequenziamento del virus ha rivelato

- 100% di omologia genomica gene S1 con virus tedesco (L00719/2014)

Mesquita JR et al. 2015. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal,

Situazione in Europa 2014-'15: Riassunto

PAESE	Inizio Epidemia
Germania	Maggio/'14
Francia	Dicembre/'14
Slovenia	Dicembre/'14
Belgio	Gennaio/'15
Portogallo	Gennaio/'15

Altri Paesi: **Olanda** (oltre 40 casi), **Spagna**, **Austria**

Nessun caso e assenza sieropositività in **UK** e **Danimarca**

Situazione in Italia

PED presente dagli anni '90

Diffusione sempre maggiore mentre regrediva la TGE

Andamento ciclico con picchi epidemici

Periodo 1994-2000 positivi 296 (14,2%) su 2072 campioni
da casi di enterite esaminati al ME

Ultima ondata epidemica: 2005-2006

Situazione in Italia

2005-2006

Focolai registrati tra Maggio 2005-Giugno 2006 [Martelli P. et al. 2008]

Prima volta che PED “riemerge “in un Paese europeo in forma epidemica

Sintomatologia: diarrea liquida, vomito, riduzione dell’assunzione dell’alimento fino al 50%, mortalità media 31% in azienda a ciclo aperto.

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

Situazione in Italia

2008-2014

Solo casi sporadici in gruppi di grassi e finissaggio:

ANNO	N° casi esaminati	N° casi positivi	N° aziende positive
2008	269	9	7
2009	194	24	16
2010	157	26	18
2011	204	14	10
2012	374	12	9
2013	294	4	2
2014	286	2	2
TOTALE	1778	91	64

- *91 casi di PED*
- *da 64 differenti aziende*
- *su un totale di 1778 casi di enterite (5,12%)*
- *Casi ricorrenti in aziende a distanza di 1-3 anni*

Segni clinici e andamento epidemiologico sempre sovrapponibili a quelli osservati in precedenza (nessun caso grave, né elevati tassi di mortalità)

Diagnosi

RT-PCR (metodiche diverse)

ELISA Ag (MAbs PEDV-specifici)

Sequenziamento gene S1 e analisi filogenetica

Sequenziamento genoma totale

C-ELISA Ac (competizione MAbs)

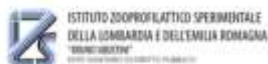
Diagnosi/PCR

1. RT-PCR Real Time PEDV/TGEV/Deltacoronavirus (kit commerciale)
2. RT-PCR Real Time quantitativa: determinazione della carica virale

Situazione in Italia 2015

Raccolta dei dati

La raccolta dei dati dei focolai è stata effettuata mediante una scheda che comprende informazioni anamnestiche, cliniche, epidemiologiche e di laboratorio (distribuita a Sezioni IZSLER, a veterinari LLPP e altri Istituti che hanno avuto focolai)



SCHEDA E PROTOCOLLO CAMPIONAMENTO FOCOLAI PED 2015

TIMBRIO AZIENDALE

CODICE ALLEV. _____ DEL ALLEVATORE _____

TIPOLOGIA ALLEVAMENTO: CC CA JWL ALV _____

N° RIPRODUTTORI: _____ N° SUINI _____ MACELLO CONSEGNA _____

VETERINARIO RESPONSABILE: _____ TELEFONO: _____

DATA INIZIO FOCOLAIO: ____/____/____ SETTORE INIZIO SINTOMATOLOGIA: CAP _____

ULTIMI SEI CARONI: _____

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 S/NO		MORTALITA' %	NOTE
	SI	NO	5-5	6-25	21-50	>50	SI	NO			
FECONDAZIONE ARTIFICIALE											
DESTAZIONE IN CABBIA											
DESTAZIONE IN BOX											
SCRIFE IN SALA PARTO											
SCRIFETTI											
NOTTOSCRIBIA											
SVEZZAMENTO											
MACRONAGGIO											
INGRASSO											

1. Anagrafica e identificativa dell'allevamento
2. Clinica (dati morbilità e mortalità)
3. PCR
4. Sierologia

Sintomatologia - Casi 2015

Focolai rilevati			
SINTOMATOLOGIA			
<i>Sottoscrofa</i>	<i>Riproduttori</i>	<i>Svezzamento</i>	<i>Magronaggio-Ingrasso</i>
Diarrea liquida, dimagrimento, cachessia	Diarrea liquida, ipertermia, vomito, inappetenza, agalassia	Diarrea liquida, inappetenza	Diarrea liquida, vomito, ipertermia, inappetenza

Casi clinici: Ingrasso



Casi clinici: gestazione



Casi clinici: sottoscrofa



Situazione in Italia 2015

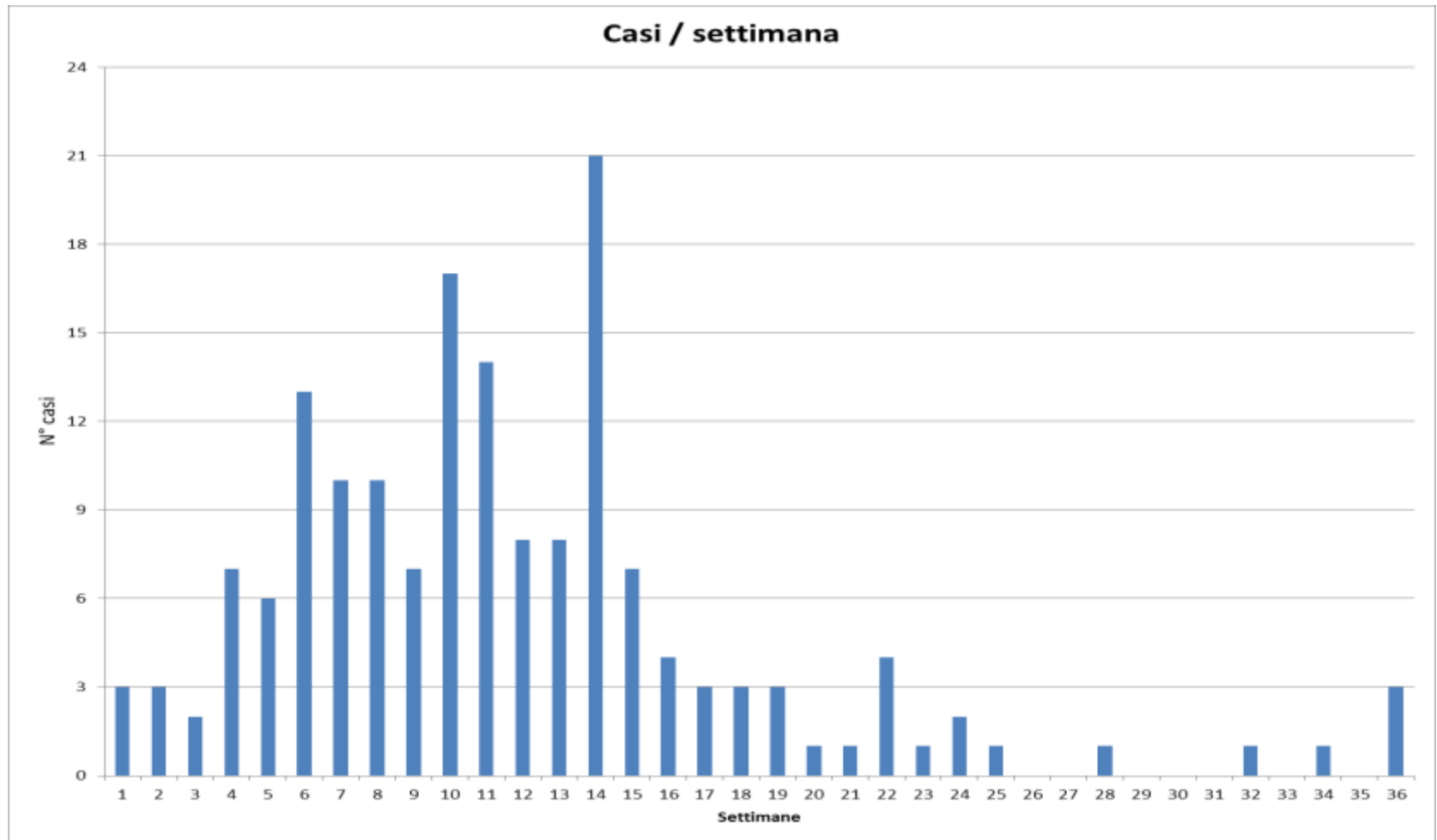
numero focolai PED da gennaio ad oggi

Tipologia aziendale	N° Focolai
RCC	10
RCA	59
Ingrasso	96
Totale	165

- 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%, in funzione di altri fattori/patogeni secondari
- reinfezione (> 4 mesi e/o sequenze differenti) in 4 aziende (2 riproduzione e 2 ingrasso)

Situazione in Italia 2015

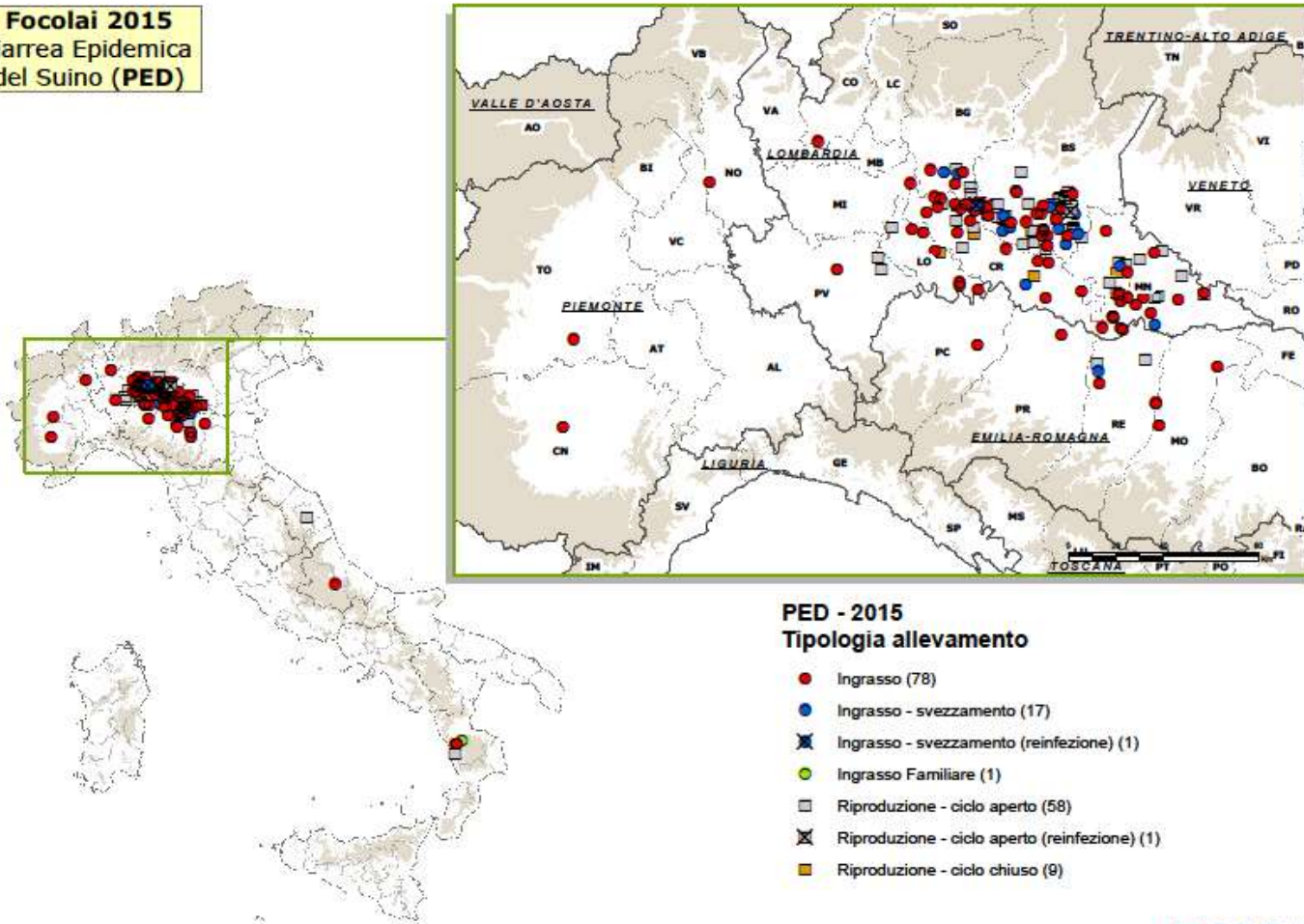
numero focolai PED da gennaio ad oggi



Situazione in Italia 2015

Localizzazione focolai PED da gennaio ad oggi

Focolai 2015
Diarrea Epidemica
del Suino (PED)



Data aggiornamento: 31/08/2015



Analisi sequenza completa (N° 8 ceppi Italiani)

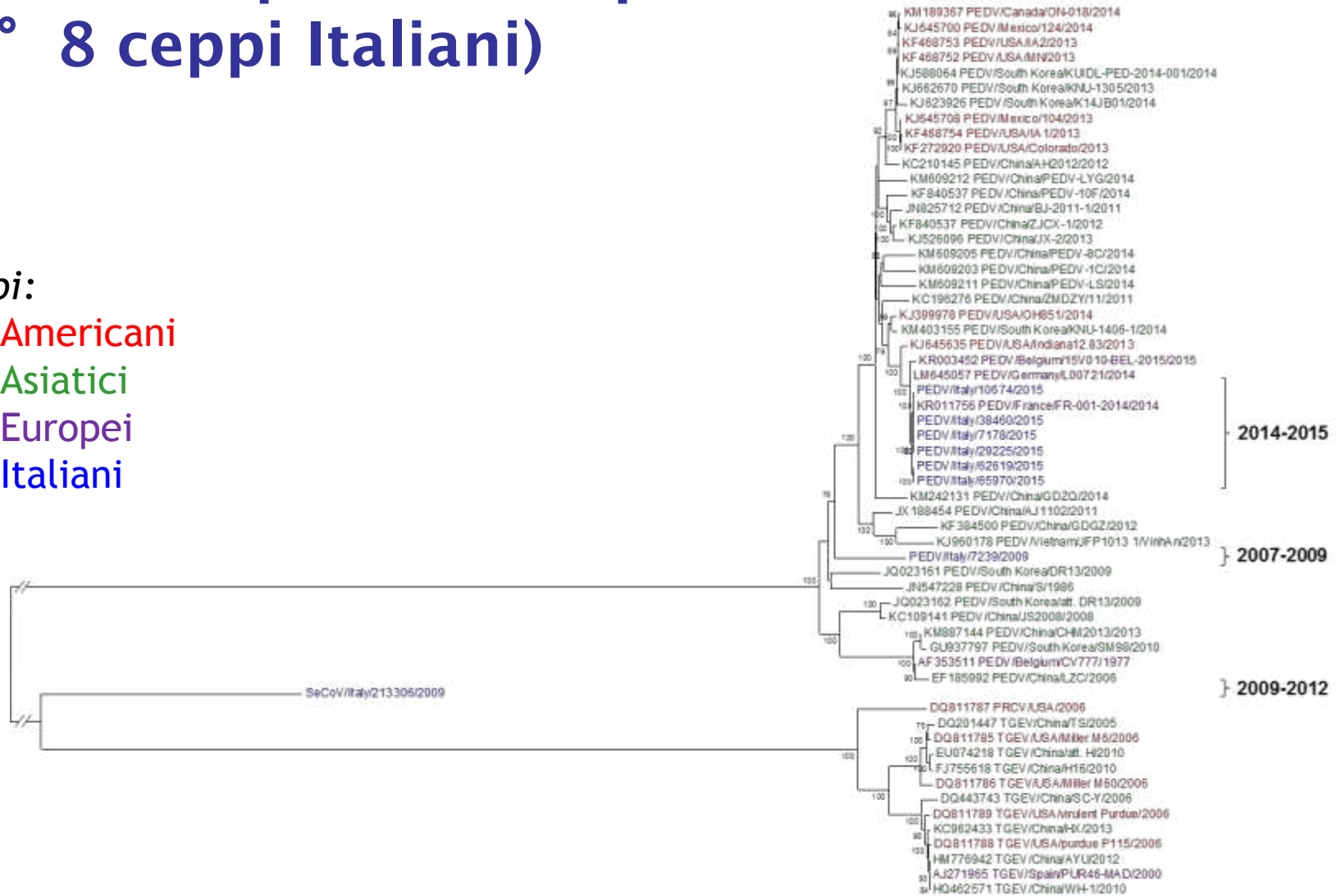
Ceppi:

Americani

Asiatici

Europei

Italiani



30

A.Papetti, M.B.Boniotti et al.,
Highly genetically distant and recombinant Swine Enteric Coronaviruses from Italy.
10° ESVV & 9° Epizone Congress Proceedings Montpellier (France) 2015, p25

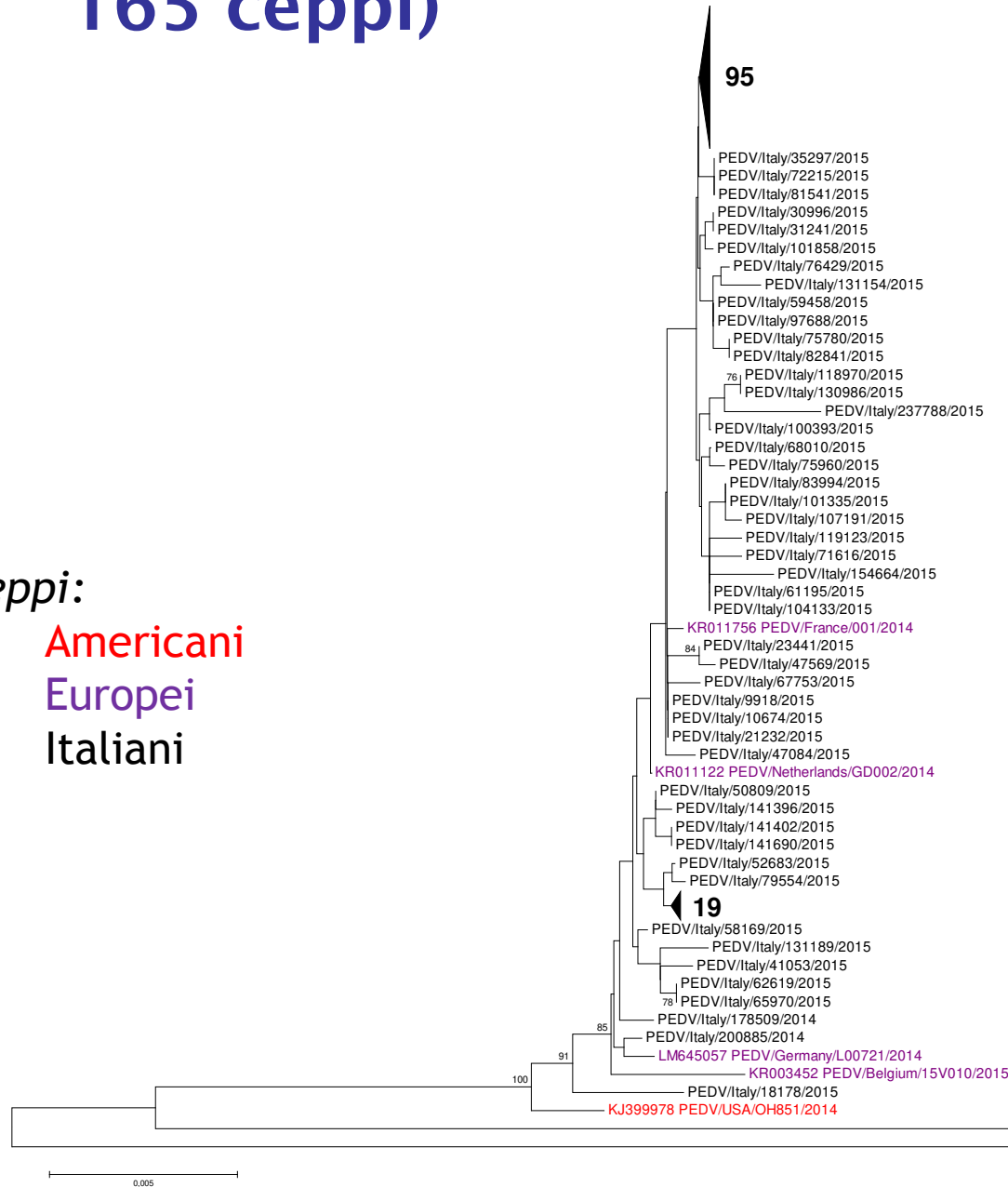
Analisi sequenza gene S1 (N° 165 ceppi)

Ceppi:

Americani

Europei

Italiani



- ✗ Identità dei ceppi PEDV italiani tra 98.7% e 100%
- ✗ Due principali gruppi (N= 95 e N=19) con la stessa sequenza
- ✗ La variabilità suggerisce la possibile introduzione di ceppi differenti in più momenti
- ✗e conferma la tendenza di PEDV a mutare facilmente

Studio longitudinale

Materiali e metodi

- 5 aziende da riproduzione coinvolte: 4 RCA e 1 RCC
- Inizio studio al momento della diagnosi clinica e di laboratorio
- 10 scrofe e 30 suinetti per ogni azienda (3 per ogni scrofa)
 - Scrofe; sangue e feci una sola volta al momento della diagnosi
 - Suinetti; sangue e tamponi rettali ogni 2-4 settimane

Studio longitudinale

Materiali e metodi

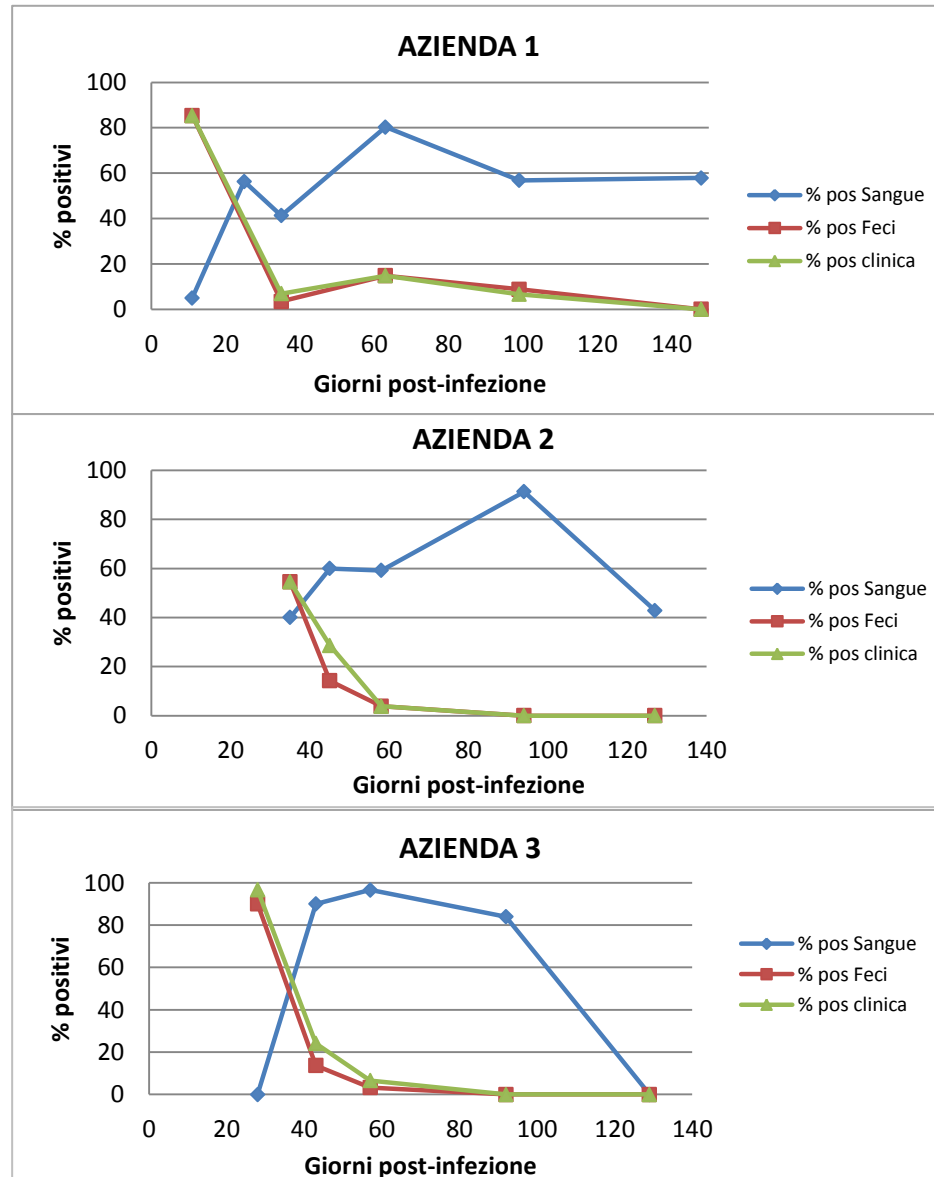
Azienda	gg infezione vs diagnosi	settore comparsa sintomatologia	settore inizio studio
1	11	Gestazione gabbia	sala parto
2	35	Ingrasso	sala parto
3	28	Ingrasso	sala parto
4	5	Sala parto	sala parto
5	19	Gestazione box	sala parto

Studio longitudinale

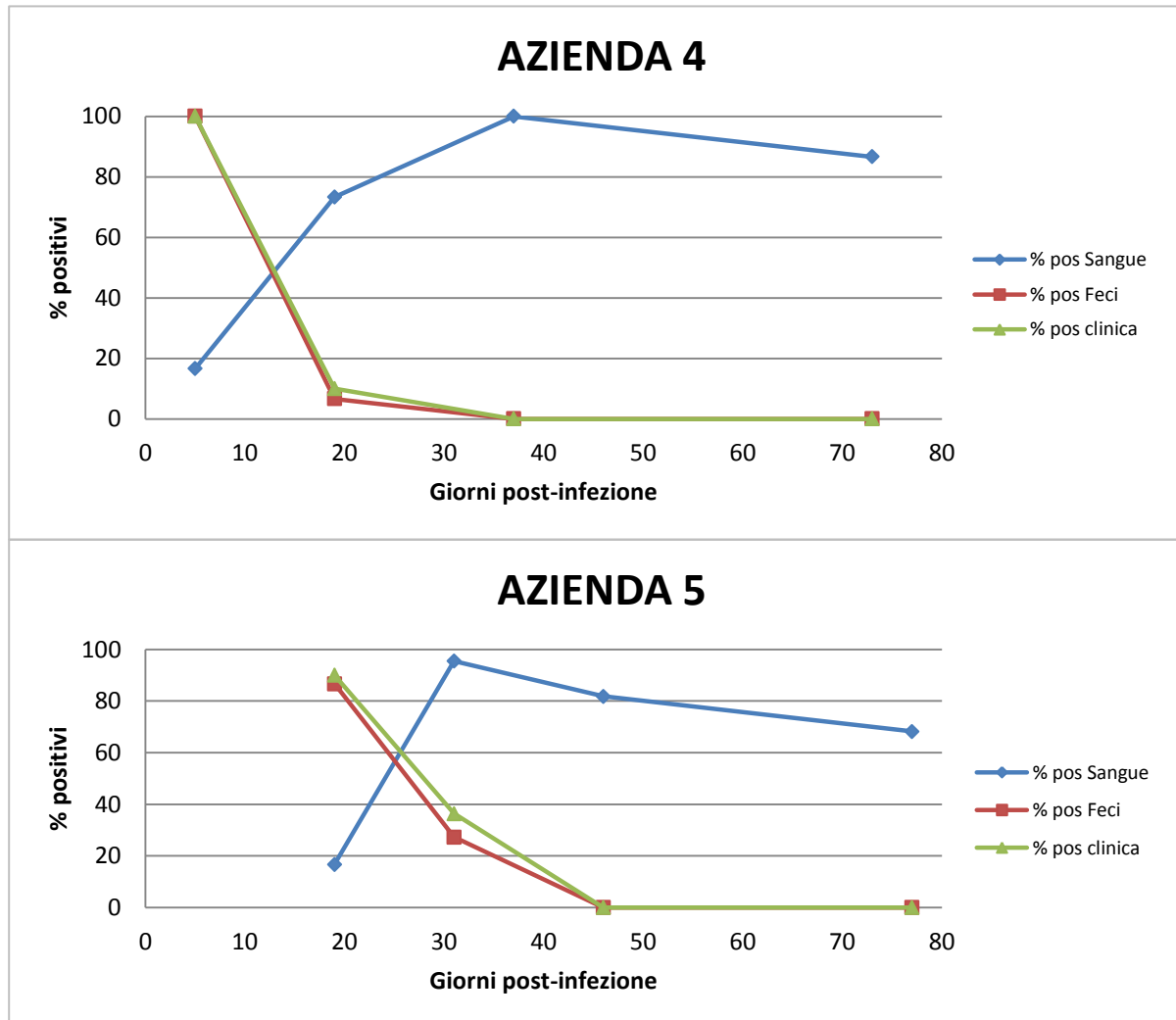
Risultati prelievi Scrofe

Azienda	% Scrofe positive AcELISA	% Scrofe positive RT-PCR	Media RT-qPCR (copie genomiche/gr feci)
1	100	100	$2,1 \times 10^8$
2	70	50	$4,5 \times 10^7$
3	0	90	$5,1 \times 10^8$
4	20	nd	nd
5	30	70	$3,8 \times 10^6$

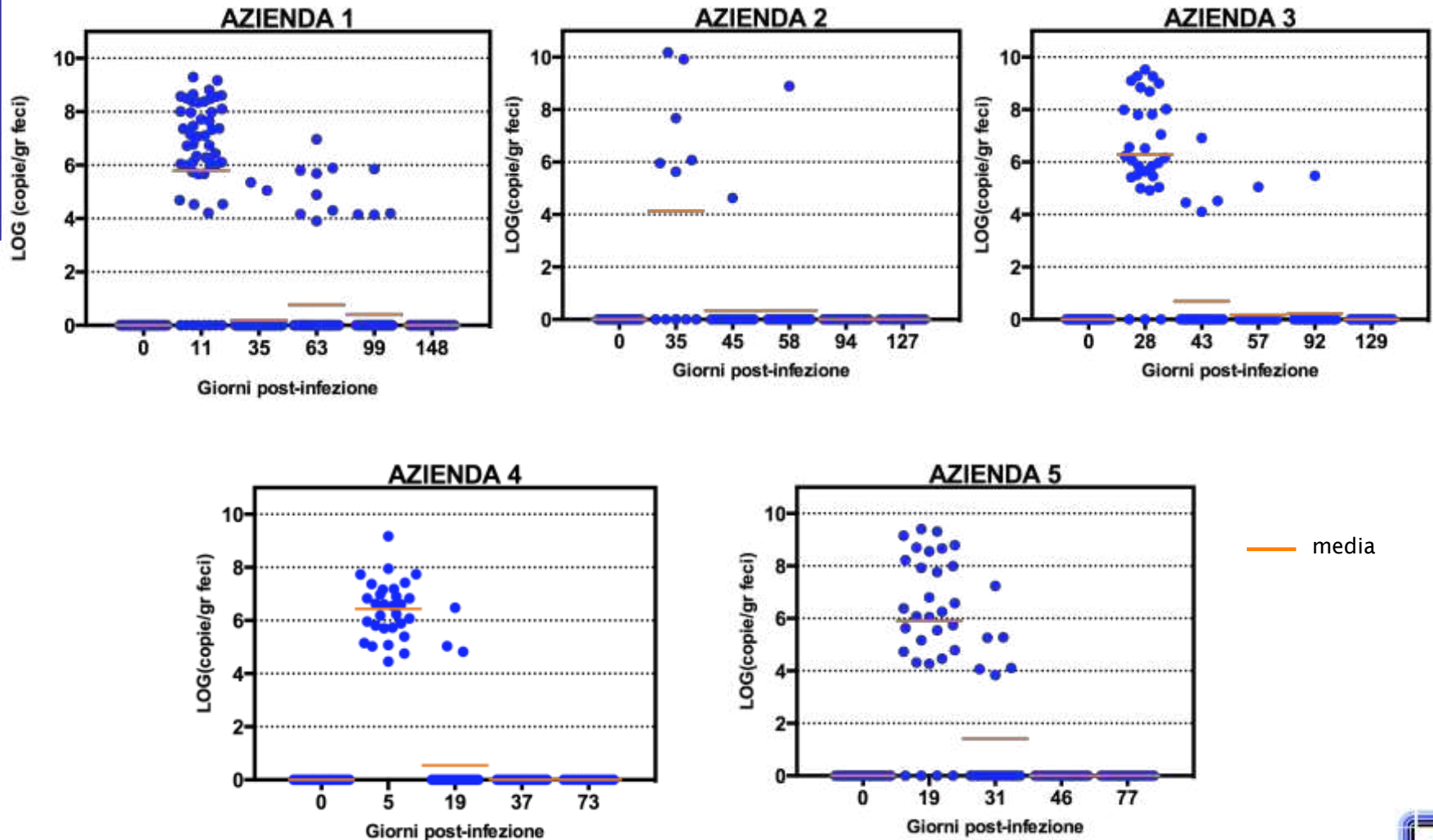
Studio longitudinale: ELISA vs RT-PCR vs clinica



Studio longitudinale: ELISA vs RT-PCR vs clinica



Studio longitudinale: RT-qPCR(copie genomiche/gr feci)



Monitoraggio mezzi di trasporto

- Periodo di monitoraggio Gennaio-Settembre 2015
- Coinvolti 4 macelli industriali della Lombardia
- Eseguiti 2 tamponi ambientali per ogni mezzo di trasporto (con procedura standardizzata):
 - uno al momento dello scarico dei suini (**Sporco**)
 - uno dopo l'avvenuto lavaggio e disinfezione del mezzo (**Pulito**)
- Trasporto dei campioni: catena del freddo
- Analisi: RT-PCR e qRT-PCR

Monitoraggio mezzi di trasporto

Risultati qualitativi

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

Risultati quantitativi

Tamponi	RT-qPCR media
Sporco	6,46E+08
Pulito	6,99E+05

Conclusioni e considerazioni

- ✧ **Distribuzione:** Focolai concentrati dove ci sono un numero maggiore di allevamenti
- ✧ **Clinica e impatto:** evidente e importante in suinetti sottoscrofa. Presente anche nei riproduttori ed ingrasso. Meno frequente negli svezzamenti
- ✧ **Incidenza:**
 - dopo una prima fase risalente al periodo gennaio-aprile in molti allevamenti soprattutto da ingrasso è stata condotta una diagnosi solo su base clinica: possibile sottostima dell'andamento complessivo
 - calo dei casi in estate: probabilmente legato ad alte temperature
- ✧ **Analisi sierologia:** utile per capire la circolazione virale nei diversi settori aziendali e il livello d'immunità di gruppo
- ✧ **Mezzi di trasporto:** nella diffusione della malattia non solo come veicoli attivi ma spesso come veicoli passivi nella movimentazione di suini infetti

Hanno contribuito.....

Alborali G.L., Lazzaro M.

Brescia Diagnostic Laboratory

Lavazza A., Lelli D., Moreno A.M.,
Sozzi E., Perulli S., Bresciani D,
Tirelli A, Zingarello L. Palotta C.,
Bozzoni G.

*Virology and Electron Microscopy
Unit*

Cerioli M., Zanoni M.G., Avisani D.

Epidemiological Unit

Boniotti M.B., Papetti A., Barbieri I.

Genomic Unit

Nigrelli A.D, Rosignoli C. Faccini S.

Mantova Diagnostic Laboratory

Luppi A., Dottori M., Bonilauri P.

Reggio Emilia Diagnostic Laboratory

Vezzoli F.

Lodi Diagnostic Laboratory

Chiapponi C.

Sequencing Unit, Parma

Tutti i colleghi di campo che hanno contribuito alla raccolta dati e al
conferimento dei campioni

Grazie per l'attenzione !



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA
"BRUNO UBERTINI"

ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO

enrico.giacomini@izsler.it