

FOCOLAI DI DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED) IN 3 ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA

OUTBREAKS OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA (PED) IN 3 FALLOW-TO-FINISH FARMS

GIACOMINI E., BONIOTTI MB., LAVAZZA A., LAZZARO M., PAPETTI A., SALOGNI C., GIOVANNINI S., LUPPI A., NIGRELLI A., ALBORALI G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"

Parole chiave: Suino, Diarrea epidemica del suino, PED

Key words: Pigs, Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PED

Riassunto

La Diarrea Epidemica del Suino (PED è l'acronimo di Porcine Epidemic Diarrhea) è una patologia sostenuta da coronavirus, caratterizzata da elevata morbilità e bassa mortalità, che si manifesta clinicamente con diarrea e disidratazione. Lo studio descrive tre episodi di PED che si sono verificati in aziende a ciclo chiuso della Lombardia segnalati nel volgere di pochi giorni a gennaio 2015. La sintomatologia era caratterizzata da anoressia e diarrea acquosa che ha interessato i riproduttori, i suinetti in sala parto e i suini in svezzamento, magronaggio ed ingrasso. Nei tre episodi la morbilità è stata del 80-100% e la mortalità assente in tutti i settori tranne nei suinetti sottoscrofa dove è stata del 25-50%. La diagnosi è stata fatta sia in PCR che in MAb-ELISA e l'analisi genomica preliminare dei ceppi identificati ha permesso di determinare che essi presentano un'elevata percentuale di identità con il ceppo USA OH851 considerato a moderata patogenicità. Le indagini epidemiologiche hanno evidenziato nei tre episodi la carenza di misure di biosicurezza esterna, in particolare riferite alla modalità di carico e scarico di animali vivi, della circolazione, pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto

Abstract

Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is a disease caused by coronavirus characterized by high morbidity, low mortality and clinically by diarrhea and dehydration. The study describes three outbreaks of PED occurred in farrow-to-finish farms located in Lombardy, which occurred within few days on January 2015. The clinical signs in breeders, piglets growing and fattening pigs were characterized by anorexia and watery diarrhea. In the three PED outbreaks morbidity was 80-100% and mortality missing in all categories but piglets in which it was 25-50%. The diagnosis was performed by PCR and MAb-ELISA and preliminary genomic analysis of the strains showed a high percentage of identity with the mild strain USA OH851. Epidemiological investigations in the three outbreaks have shown failure of external biosecurity measures related to the animal loading and unloading, movement, cleaning and disinfection of vehicles.

INTRODUZIONE

La Diarrea Epidemica del Suino è una malattia virale causata da Coronavirus (Porcine Epidemic Diarrhoea Virus = PEDv) assimilabile clinicamente alla TGE (1). Si manifesta clinicamente con inappetenza e diarrea liquida e caratterizzata da elevata morbilità in tutte le

età (80-100%) e bassa mortalità, anche se nei suinetti sottoscrofa e in svezzamento la mortalità può in casi estremi arrivare al 50-100% (2,3). PEDv è un virus a singolo filamento di RNA del genere Alphacoronavirinae appartenente alla famiglia *Coronaviridae*. La PED è endemica fin dagli anni '90 in Europa e in Asia mentre nel 2013 è comparsa per la prima volta anche in America causando gravi danni economici al settore suinicolo. Negli USA la PEDv ha infettato approssimativamente il 50% degli allevamenti da riproduzione dal luglio 2013 al luglio 2014 (4,5). Successivamente è comparsa in Canada e, più recentemente, nel Centro e Sud America (Colombia, Repubblica Dominicana, Mexico, Perù etc). 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. In Europa negli anni '80 e '90 i casi clinici attribuibili al PEDV si sono ridotti a pochi casi isolati e la sieroprevalenza si è andata via via riducendo. In Italia è stata segnalata nei primi anni '90 ed è rimasta limitata a episodi sporadici sino al 2005-2006, anni in cui si è verificata un'epidemia caratterizzata da episodi importanti ad andamento altamente diffusivo (6). Negli ultimi mesi del 2014 la PED è stata segnalata in Germania, Olanda ed Ucraina ed i ceppi identificati come geneticamente correlati allo stipite USA OH851 a moderata patogenicità. L'approccio al controllo della malattia è basato sostanzialmente sulla diagnosi rapida, sull'applicazione di rigide misure di biosicurezza e sul *tracing back* dei movimenti di animali, prodotti e mangimi.

Lo studio descrive tre episodi di PED che si sono verificati in aziende da riproduzione a ciclo chiuso della Lombardia segnalati e confermati a distanza di pochi giorni nel mese di gennaio 2015, ponendo particolare attenzione alla sintomatologia, alla circolazione della malattia in azienda, al protocollo diagnostico applicato e alle misure di biosicurezza rilevate nei diversi focolai.

MATERIALI E METODI

Descrizione degli allevamenti sede di focolaio

Allevamento 1. L'azienda è sita in un'area a media densità suinicola e non sono presenti allevamenti suini nel raggio di 1 km. E' un allevamento di 350 riproduttori a ciclo chiuso con vendita di una parte dei suini da vita ad un peso di circa 35 kg. L'azienda è costituita da 5 capannoni; due sono destinati alla gestazione in box e in gabbia, al settore lattazione costituito da sale parto con 6 posti ciascuna. Adiacente a quest'ultima struttura sono posizionate 4 capannine esterne in vetroresina per ospitare gli animali in fase di svezzamento. I rimanenti 3 capannoni sono dedicati alla fase di magronaggio ed ingrasso con alimentazione a bagnato e presentano box della capienza di circa 20 soggetti, ventilazione naturale, e pavimentazione in cemento grigliato.

Allevamento 2. L'azienda è localizzata in un'area ad alta densità suinicola con la presenza di 4 allevamenti nel raggio di 1 km. E' un allevamento a ciclo chiuso con 1000 riproduttori. I fabbricati aziendali a disposizione sono complessivamente 10 dei quali 6 destinati al magronaggio ed ingrasso con alimentazione a bagnato, suddivisi in box di circa 40- 50 animali con possibilità di accesso ad un area esterna, ventilazione naturale e pavimento grigliato in cemento. I restanti capannoni sono adibiti alla gestazione in gabbia e in box, alle sale parto e allo svezzamento. In alcuni comparti è presente una promiscuità fra le diverse categorie.

Allevamento 3. L'azienda è situata in un'area ad alta densità suinicola e non sono presenti allevamenti nel raggio di 1 km. L'allevamento è a ciclo chiuso con 350 riproduttori ed è costituito da 5 capannoni. La fase di magronaggio e ingrasso occupa 3 capannoni suddivisi in box di 20 animali, con pavimento sia in grigliata che pieno, ventilazione naturale e alimentazione con

siero. Le altre 2 strutture sono destinate alla gestazione in box e gabbia e alle sale parto e svezzamento. Ogni sala parto contiene 10 posti e il settore svezzamento è composto da stanze da circa 100 soggetti suddivise in gabbiette con pavimento in grigliato in plastica.

Sintomatologia e misure di biosicurezza.

Le 3 aziende sede di focolaio sono state sottoposte a visita clinica ed indagine epidemiologica al fine di individuare i principali fattori di rischio e l'applicazione delle misure di biosicurezza. Le osservazioni cliniche hanno riguardato le principali caratteristiche della malattia quali inappetenza, diarrea liquida, percentuale di animali con diarrea liquida (0-5%, 6-20%, 21-50%, 51-100%) e la percentuale di mortalità. La sintomatologia è stata rilevata nei diversi settori presenti negli allevamenti: fecondazione artificiale, gestazione in gabbia, gestazione in box, sala parto, svezzamento, magronaggio, ingrasso.

Le operazioni a rischio considerate sono state: introduzione di animali con stato sanitario non conosciuto, carico di animali, di carcasse, entrata in azienda di veicoli, entrata-uscita personale e visitatori. Al fine della valutazione delle misure di biosicurezza sono stati considerati i requisiti strutturali dell'allevamento, le modalità gestionali, i mezzi di trasporto e il personale. In particolare sono stati presi come riferimento i requisiti riguardanti la biosicurezza esterna quali: presenza di parcheggio o area di sosta fuori dal perimetro aziendale per il personale e i visitatori, presenza di barriere e locali adibiti a spogliatoio. Per quanto riguarda i mezzi di trasporto sono stati considerati la piazzola per disinfezione dei veicoli, la presenza di disinfettanti e loro modalità di utilizzo, e la circolazione degli automezzi. In merito alla movimentazione degli animali sono stati considerati il carico/scarico di suini vivi, degli scarti e dei morti, e se questo avveniva all'interno o all'esterno del perimetro aziendale.

Prelievo dei campioni e Indagini di laboratorio

Sono stati consegnati in laboratorio suinetti deceduti in sala parto e svezzamento e campioni di fecisingle provenienti da soggetti con diarrea liquida o "in pool" prelevate nei box in cui erano presenti animali con sintomatologia. Sono stati esaminati 22 suinetti e 26 campioni di feci. I suinetti sono stati sottoposti a esame anatomopatologico e sono stati prelevati intestino ed altri organi quali fegato, milza e rene utilizzati per esame batteriologico al fine di procedere all'isolamento dei principali patogeni batterici enterici. La ricerca di Coronavirus (PEDV, TGEV e Deltacoronavirus) è stata eseguita su omogenati di intestino e feci mediante Real time RT-PCR specifiche (kit PED/TGE/PDCV, Tetracore, USA). Inoltre, la metodica ELISA sandwich (DAS-ELISA) basata sull'uso di anticorpi monoclonali sviluppati verso il ceppo di referenza CV777 (7,8) è stata utilizzata per la ricerca di PEDV. In particolare, un numero variabile da 1 a 11 suinetti e da 6 a 10 campioni di feci è stato testato da tutte le aziende. L'analisi del genoma del ceppo presente in ogni azienda è stata eseguita tramite sequenziamento del gene S1 (2581 nt) e confrontata con ceppi presenti nella banca dati NCBI. La diagnosi differenziale è stata condotta per *E.coli*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, coccidi, Salmonella, TGEV, rotavirus.

RISULTATI

Allevamento 1

Sintomatologia. L'inappetenza e la diarrea liquida sono stati i sintomi comuni a tutti i settori dell'allevamento. La diarrea ha colpito ciascun settore con percentuali diverse: 51-100% in ingrasso e suinetti sottoscrofa; 21-50% gestazione in box, magronaggio e svezzamento; 6-20% in scrofe in sala parto, gestazione in gabbia e fecondazione artificiale. La comparsa della inappetenza e della diarrea liquida è avvenuta nella prima settimana di gennaio ed ha interessato inizialmente un capannone da ingrasso. Successivamente, la sintomatologia è passata alla gestazione in box e in gabbia, alle nidiate in sala parto e, a distanza di 72 ore, tutti i settori sono stati interessati. In un unico capannone da ingrasso, dislocato a margine delle altre

strutture aziendali la comparsa dei sintomi è avvenuta dopo 5 giorni dall'inizio dell'epidemia. In sala parto è stata osservata agalassia e la mortalità dei suinetti per disidratazione e cachessia è stata del 25%. Il vomito è stato osservato nel 20% dei soggetti ed esclusivamente nel settore da ingrasso nella fase iniziale dell'epidemia.

Biosicurezza. L'azienda non ha una recinzione perimetrale e l'ingresso è posto su una strada comunale con elevato transito di mezzi. E' presente una piazzola per la disinfezione degli automezzi in entrata e viene utilizzato un disinfettante a base di glutaraldeide. Il carico dei suini in uscita dall'azienda e lo scarico del mangime avvengono all'interno del perimetro aziendale. Le carcasse vengono conservate in una cella frigorifera e la raccolta avviene all'esterno tramite un mezzo aziendale. In azienda viene effettuata la rimonta esterna senza una struttura destinata alla quarantena con l'acquisto di circa 50 animali ogni 4 mesi accompagnati da un certificato sanitario. L'ultimo acquisto di scrofette risale a ottobre 2014. La derattizzazione è eseguita da personale interno all'azienda. Sui terreni adiacenti al perimetro aziendale non è stato eseguito spargimento di liquame nell'ultimo mese.

Allevamento 2

Sintomatologia. In tutti i settori dell'allevamento è stata segnalata la comparsa di inappetenza e diarrea liquida nei primi giorni dell'episodio. Al momento della visita la diarrea era presente in suinetti sottoscrofa (21-50%) e in un capannone da ingrasso (0-5%). La comparsa dei sintomi risale all'ultima settimana di dicembre 2014. I riproduttori in lattazione hanno manifestato altresì agalassia mentre i suinetti sotto scrofa a conseguenza del deperimento e dello stato cachettico hanno registrato un tasso di mortalità del 30%. Il vomito non è stato segnalato in alcun soggetto. I primi soggetti che hanno manifestato la patologia sono stati gli animali all'ingrasso, successivamente l'infezione ha circolato nei settori dello svezzamento, gestazione e in ultimo in lattazione a distanza di 15 giorni dalla comparsa dei sintomi.

Biosicurezza. La proprietà non ha una recinzione, l'ingresso posto su una strada privata è provvisto di cancello chiuso. E' presente la piazzola di disinfezione degli automezzi, che prevede l'utilizzo di prodotti a base di glutaraldeide. Il carico dei suini da inviare al macello e lo scarico del mangime finito avviene all'interno dell'azienda. E' presente la cella frigorifera per la raccolta delle carcasse ma il carico non sempre avviene esternamente. L'introduzione di animali da rimonta avviene a cadenza mensile con l'introduzione dei nuovi soggetti in una struttura per la quarantena ricavata all'interno della pertinenza aziendale. L'ultima entrata di animali risale a novembre 2014. La derattizzazione è operata internamente.

Allevamento 3

Sintomatologia. L'inappetenza e la diarrea liquida sono state osservate in tutti i settori nei primi 10 giorni dopo la comparsa dell'epidemia. Al momento della visita la diarrea colpiva i settori con percentuali diverse ad eccezione delle scrofe presenti nella zona di fecondazione artificiale che non avevano sintomi. La percentuale di suinetti sottoscrofa colpiti era molto elevata (51-100%) mentre in gestazione in box, svezzamento, magronaggio ed ingrasso la percentuale era ridotta (6-20%). Nelle scrofe in gestazione in gabbia solo pochi soggetti presentavano diarrea (0-5%). In sala parto a fronte di pochi soggetti con diarrea (0-5%) era marcata l'inappetenza e l'agalassia nelle scrofe e la mortalità dei suinetti (50%). Il vomito non è stato segnalato. L'esordio della sintomatologia si è verificato nella prima settimana di gennaio 2015 ed ha coinvolto dapprima gli animali all'ingrasso. La sintomatologia dopo tre giorni ha coinvolto i riproduttori in gestazione, gli animali in svezzamento e in sala parto.

Biosicurezza. L'azienda ha una recinzione su tutto il perimetro aziendale, l'ingresso è posto su una strada privata e non vi è transito di mezzi destinati al trasporto di animali vivi. Esternamente sono presenti la cella frigorifera e la barriera sanitaria, con arco per la disinfezione automatica dei mezzi in entrata. Il disinfettante utilizzato è a base di glutaraldeide. La derattizzazione

è effettuata da una ditta esterna secondo un programma prestabilito. Sui terreni adiacenti al perimetro aziendale non vi è spargimento di liquami. La rimonta viene effettuata esternamente a cadenza semestrali di 30 soggetti per volta.

Esami di laboratorio

L'esame anatomico-patologico ha evidenziato in 16 soggetti grave disidratazione, cachessia ed enterite catarrale caratterizzata dall'assottigliamento della parete. Due soggetti presentavano pericardite fibrinosa e polmonite lobulare localizzata soprattutto ai lobi apicali. All'esame batteriologico sono stati isolati E.coli emolitico in 2 soggetti e *Clostridium perfringens* in 1 soggetto. Le indagini per ricerca di *C. difficile*, *Salmonella* e coccidi sono risultate negative. Nei due soggetti che presentavano pericardite fibrinosa è stato isolato *S. suis*. La conferma di presenza di PEDv è stata ottenuta sia con tecniche molecolari (RT-PCR) sia in DAS-ELISA, con una buona concordanza di risultati, come peraltro già evidenziato in precedenza (7). La diagnosi di PEDv è stata effettuata complessivamente su 22 campioni di intestino e 26 di feci. Nel primo allevamento, gli intestini di 11 suinetti sono risultati tutti positivi in PCR Real time, mentre tra le feci solo 3 campioni su 6 sono risultate positive. Nel secondo allevamento, l'intestino di un suinetto è risultato positivo mentre delle 10 feci analizzate, 6 sono risultate positive e 4 negative. Nel terzo allevamento tutti i suinetti testati (10) e tutte le feci (10) sono risultati positivi. Nella maggior parte dei suinetti testati i valori Ct, ottenuti in PCR real time, evidenziano una presenza virale molto elevata.

La sequenza del gene S1 (2581 nt) è stata eseguita a partire dai campioni provenienti da ogni allevamento. Il confronto con le sequenze depositate nella banca dati NCBI ha evidenziato il 99% di identità nucleotidica con il ceppo USA OH851 e altri ceppi circolanti sia negli Stati Uniti che in Europa (Germania), (9).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel mese di gennaio 2015 sono stati segnalati 3 episodi con sospetto clinico riferibile a PED, confermati successivamente in laboratorio mediante PCR e ELISA. In tutti i focolai si è osservato un quadro clinico sovrapponibile, caratterizzato da diarrea liquida, sia nei riproduttori che in suini in accrescimento e assenza di mortalità. Solo nei suinetti sottoscrofa la diarrea acuta e la disidratazione hanno comportato un aumento della mortalità compreso tra il 25 % e il 50 % per le tre settimane successive alla comparsa della sintomatologia. Inoltre le scrofe in sala parto sono state interessate da agalassia e, in un solo allevamento, il settore del magronaggio-ingrasso ha presentato vomito nei primi giorni di esordio della malattia.

Le modalità di comparsa della malattia, l'andamento e la gravità dei sintomi si sono dimostrati simili a quanto osservato nei casi verificatisi negli anni precedenti. Tuttavia, tale situazione (3 focolai nel volgere di 1 settimana diagnosticati in un'area ad elevata produzione suinicola), se confrontata con quanto successo negli ultimi anni potrebbe far preludere ad una recrudescenza epidemica della malattia, così come verificatosi nel 2005-2006 (6).

La diagnosi è stata fatta sia in RT-PCR che in DAS-ELISA. Se la RT-PCR è quindi da considerare il metodo di identificazione di elezione in caso di sospetto di PEDv per l'elevata sensibilità e specificità, la DAS-ELISA si conferma come metodo attendibile di screening in tutti quei casi di indagine in corso di enteriti del suino, anche in assenza di sintomi strettamente indicativi di un sospetto di PED.

L'analisi genomica basata sul sequenziamento del gene S1 dei ceppi identificati ha permesso di determinare che essi presentano un'elevata percentuale d'identità con il ceppo USA OH851 considerato a moderata patogenicità. Peraltro ceppi con le medesime caratteristiche erano stati rilevati nell'estate 2014 in Italia e in altri paesi Europei quali Germania (9), Olanda e Ucraina. Le verifiche eseguite sui fattori di rischio e le misure di biosicurezza esterna hanno evidenziato

nei tre allevamenti carenze soprattutto nella gestione della movimentazione degli animali vivi e nel controllo dell'accesso di personale, visitatori e operatori esterni. Il carico e scarico di animali all'interno del perimetro aziendale non sono stati sufficientemente garantiti da una adeguata e corretta procedura di circolazione, pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto. Inoltre, l'inadeguatezza della zona filtro ha dimostrato di non essere in grado di obbligare personale, visitatori e operatori ad indossare indumenti e calzature dedicate o monouso.

Le indagini epidemiologiche, ancora in corso, non hanno permesso di stabilire l'origine dell'infezione. Tuttavia, pur considerando l'attuale situazione di presenza epidemica della PED nel continente Americano e nell'Est Asiatico, va tenuto conto che la PED è da considerare endemica nel nostro Paese, dove è stata diagnosticata fin dagli anni '90 con picchi periodici di incidenza. Pertanto, se da un lato nessuna ipotesi va a priori scartata nella ricerca e definizione dei fattori di rischio che favoriscono la trasmissione dell'infezione, dall'altro è chiaro che solo la rigida applicazione di protocolli di biosicurezza può impedire e limitare il diffondersi dell'infezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Hofmann and Wyler, 1989 M. Hofmann, R. Wyler. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet. Microbiol.*, 20 (1989), pp. 131–142
2. Saif et al., 2012.L.J. Saif, M.B. Pensaert, K. Sestak, S.-G. Yeo, K. Jung. Coronaviruses J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson (Eds.), *Diseases of Swine*, John Wiley & Sons, West Sussex, UK (2012), pp. 501–524
3. Stevenson et al., 2013. G.W. Stevenson, H. Hoang, K.J. Schwartz, E.R. Burrough, D. Sun, D. Madson, V.L. Cooper, A. Pillatzki, P. Gauger, B.J. Schmitt, L.G. Koster, M.L. Killian, K.J. Yoon. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 25 (2013), pp. 649–654
4. Goede, D.P., Morrison, R.B., 2014a. PED incidence, time to stability and production impact. In: Allen D. Leman Swine Conference. St. Paul, MN, USA, <https://docs.google.com/a/umn.edu/file/d/0BzGsnfsQ28heNEJlaHICamRLTkE/edit> (accessed 12.09.14).
5. Goede, D.P., Morrison, R.B., 2014b. Swine health monitoring project. Report 2014.16, http://www.cvm.umn.edu/sdec/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/@sdec/documents/content/cvm_content_490361.pdf (accessed 12.09.14).
6. 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
7. 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 RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 88(1):166-168.
8. 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.
9. Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Mar [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.141165>