

Workshop CVI

Tasks in case of an outbreak; example Schmallenberg virus

27-11-2012,

Ruth Bouwstra



Tasks

- Crisis organization; diagnostics of suspicions notifiable diseases en early warning
- International collaboration
- Advice government
- Diagnostics
- Scientific research

Schmallenberg

Introduction

■ Schmallenberg; how it all started



Aug 2011

Diarrhea and fever
in dairy cows

Nov 2011

Discovery SBV
Germany

8 Dec 2011

'diarrhea cows' SBV
positive

15 Dec 2011

Malformed lambs
SBV positive



CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR



Crisis organization

Unexplained disease outbreak cattle

- Reported to GD Deventer August / September 2011
- Acutely diseased cattle reported to Animal Health Service
- Milk producing cattle
- Severe diarrhea and milk drop
- Eastern part of the Netherlands/ border region Germany



Diarrhea outbreak cattle

- 7 farms sampled (GD Deventer)
 - 10 fecal samples of severely affected cattle selected for laboratory testing
 - Bacteriology
 - Parasitology
 - Electron Microscopy
 - Microarray viruses
 - RT-PCR
 - Coronavirus
 - Kobuvirus
 - Rotavirus
-
- GD
- CVI
- None of the detected agents clearly associated with clinical symptoms

Clinical signs ruminants

Koeien massaal aan de diarree

2 volgers · 431x bekeken ·

Overzicht · "Actueel" Forum · Permalink

Zoeken · Zoeken in dit onderwerp ·

▲ ▼ 6 september 2011 11:01

Nijeveen - Koeien in Nederland raken massaal aan de diarree en dat gaat gepaard met hoge koorts. Gevolg voor de boeren is een behoorlijk productieverlies, dat kan oplopen tot circa 20 procent van de opbrengst.

Dierenarts Bas Timmer van Dierenartspraktijk Zuidwest-Drenthe in Nijeveen zegt in het Dagblad van het Noorden dat hij dit nog niet eerder in zo'n hevige mate heeft meegemaakt.

"Het lijkt een nieuw virus, waarbij de koorts kan oplopen tot wel 41 graden", aldus Timmer. Bij de Gezondheidsdienst voor Dieren in Deventer kwamen zo veel meldingen binnen van boeren, dat de dienst een onderzoek instelt.

Zie hier het resultaat van alle cliënten <http://dokterternak.files.wordpress.com/2011/04/sapi-diare1.jpg>

Een koe met 2 staarten. Iemand chocolademelk?

<http://www.telegraaf.nl/mijnbedrijf/10495112/> Koeien aan de diarree .-html laatste aanpassing 6 september 2011 11:21

▲ ▼ 6 september 2011 11:08



International collaboration

Report detection of "Schmallenberg" virus, Germany

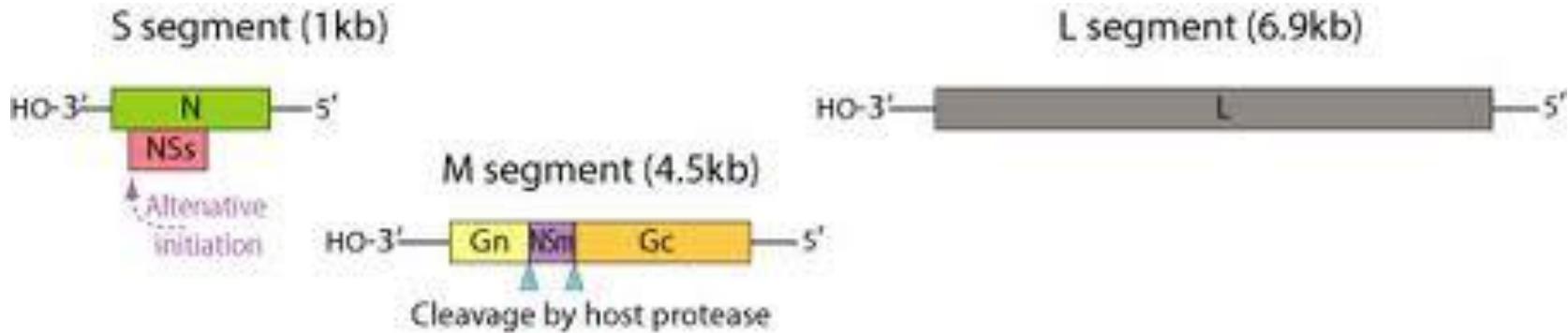
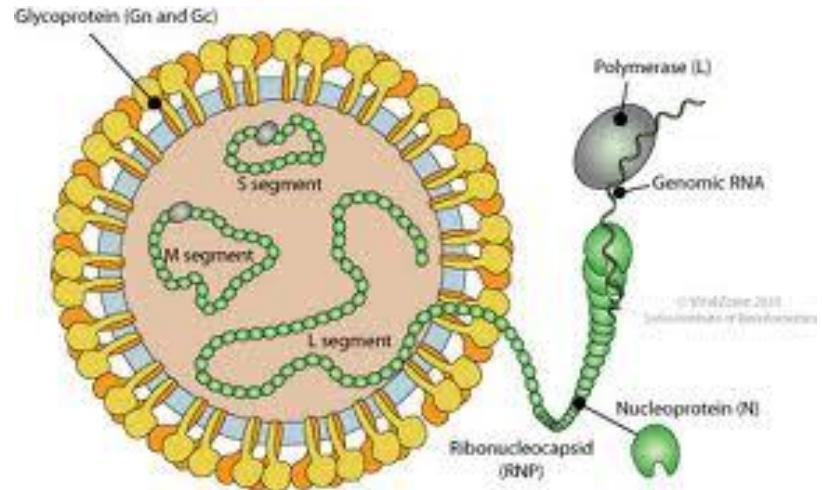
- Report 19th November 2011
- Fever and milk drop in 20 cattle farms, August 2011
- 3 pooled blood samples (1 farm)->Genome sequencer FLX
- sequences of orthobunyaviruses
 - Shamonda (96% homology S-segment, aa)
 - Aino, Akabane (70% homology, aa)
- RT-PCR assay developed targeting L-segment
- 100 blood samples tested (4 farms)->9 positives

Detection of “Schmallenberg” virus in cattle, the Netherlands, 8th Dec 2011

- 50 blood samples of cattle showing clinical diarrhea
- 8 farms
- RT-PCR assay FLI targeting L-segment
- 18/50 samples tested positive ($Ct < 35$)
- None of blood samples of controls positive: 0/115
- Conclusion: “Schmallenberg” virus associated with clinical diarrhea cattle East-Netherlands, Sept/Aug

Orthobunyaviruses /"Schmallenberg" virus classification, genome

- "Shamonda-like" virus
- Family Bunyaviridae
- Genus Orthobunyavirus
- ssRNA virus



Simbu-group viruses

- Cause congenital defects (principally arthrogryposis and hydranencephaly) and abortion in pregnant cattle, sheep and goats.



Source: dr. P. Mansell, Univ. Melbourne



Source: dr. B. Vanselow,
Beef Industry Centre,
Australia



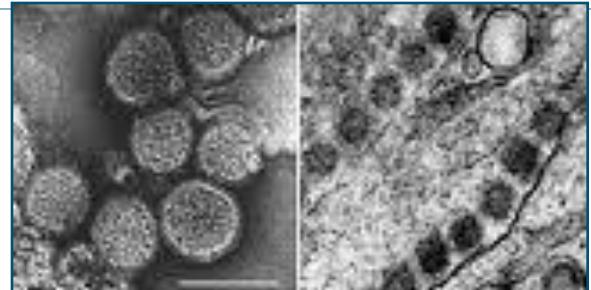
Source: dr. B. Vanselow,
Beef Industry Centre,
Australia

- Infection takes place between 30 and 70 days of gestation in the ewe and between 30 and 150 days of gestation in the cow.

Scientific information

- Orthobunya viruses

(other bunya's: hanta, crimean congo, RVF)



- Shamonda first isolated in cattle in Nigeria (1960), Akabane first isolated in cattle in Japan (1959)

- Arthropodborne viruses, culicoides vector

- Reported from Asia, Australia and Africa

- Ruminant teratology; No significant clinical signs in adult cattle and sheep

- No zoonotic potential reported



Crisis organization

Detection of “Schmallenberg” virus in sheep, the Netherlands,

Dec 15th 2011

- Malformations in newborn lambs in at least 10 farms, Dec 2012 (GD Deventer)
- Samples of 8 lambs (4 bloodsamples, 8 brain tissue samples) from two farms tested by RT-PCR (CVI-WUR)
- 2 brain samples tested positive



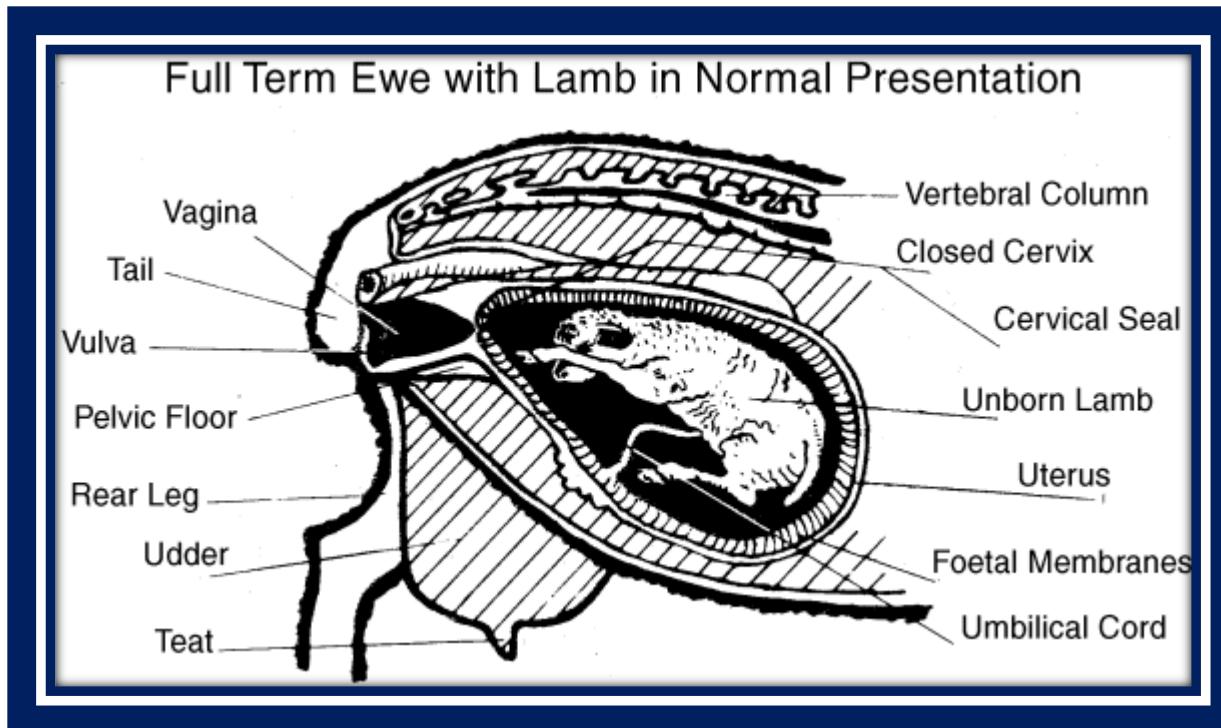
Clinical symptoms new born

- Arthrogryposis
- Hydranencephaly
- Torticollis



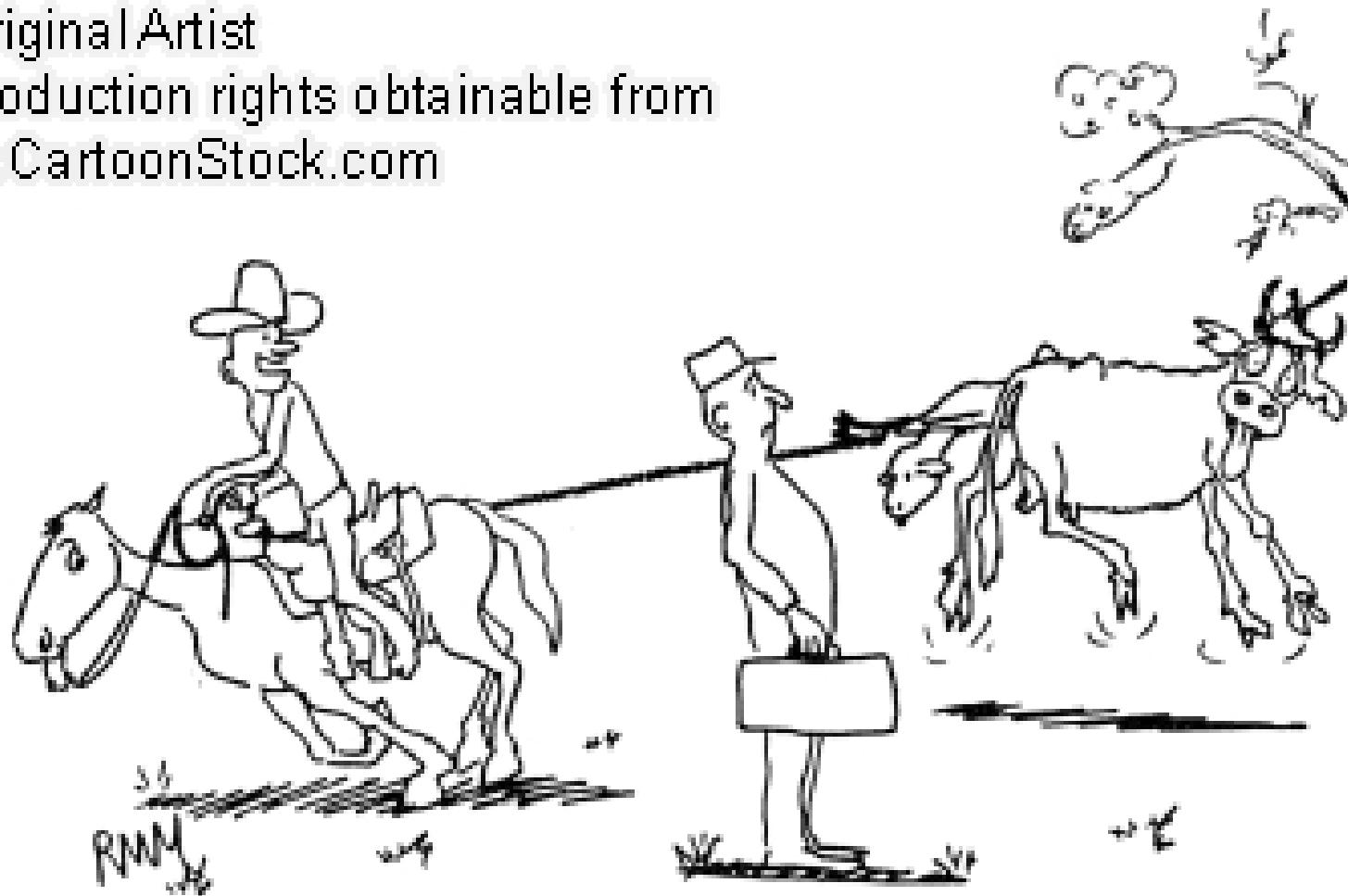
Consequences malformations

■ Lesson in veterinary obstetrics



Dystocia

© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



"Hi, Doc! I don't think I'm going to need you after all. I just about got the rascal out!"

Search ID: fmfin295

Farmers (vets) anxious

Enkele citaten:

- "Normaal is het lammerseizoen een leuke periode maar als ik nu zie hoe de lammeren 'eruit' komen dan is het niet leuk meer allemaal als ik bedenk wat er allemaal op mijn pad kan komen, komende weken."
- "Je hoort in de buurt wat er gebeurt en dat is soms 25 % en ik heb wel verhalen gehoord dat het nog veel erger is soms"
- "Je wil even weten wat gebeurt er wat er is.. En hoe het gaat en wat we moeten"

Schmallenberg media

Frankrijk stelt meldplicht Schmallenberg-virus in

Geplaatst: Gisteren - Laatste update: Gisteren

Auteur: Ruud Peij

Parijs – De directie gezondheid en veiligheid van voedsel van het ministerie van landbouw in Parijs heeft een meldplicht tegen het Schmallenberg-virus afgekondigd.

Verdachte en vastgestelde gevallen moeten worden aangemeld. De dienst heeft in dat kader de veegezondheidsdiensten en organisaties van dierenartsen verzocht hun medewerkers en leden te informeren over de mogelijke verschijnselen bij besmette dieren, zoals diarree en misvormde lammeren of kalveren.

De dienst stelt daarbij wel dat besmette bedrijven van tevoren geen beperkingen wordt opgelegd omdat het risico op verspreiding door knuttonen in de winterperiode gering wordt geacht. Op den duur kunnen de ontwikkelingen echter wel aanvullende maatregelen nodig maken.

De Franse autoriteiten voegen daaraan toe dat het besmettingsrisico momenteel het grootst is in de noordelijke departementen langs de grens met België.

Schmallenberg nog niet op rundveebedrijven

Den Haag – Op 48 verdachte rundveebedrijven is het Schmallenberg-virus niet aangetoond. Op 25 verdachte rundveebedrijven loopt het onderzoek nog. Dat meldt de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). Sinds maandag zijn er geen besmettingen van het Schmallenberg-virus bijgekomen. Het aantal aangetoonde gevallen blijft staan op 52 (51 schapenbedrijven en 1 geitenbedrijf).

Schmallenberg-virus op 56 bedrijven

Den Haag – Het aantal aangetoonde besmettingen met het Schmallenberg-virus is toegenomen naar 56. Dat meldt de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). Sinds dinsdag zijn er 4 schapenbedrijven bijgekomen (2 in Zuid-Holland, 1 in Noord-Brabant en 1 in Limburg). 29 rundveebedrijven, 44 schapenbedrijven en 4 geitenbedrijven zijn nog in onderzoek. > Pagina melk

Schmallenberg-virus risico voor Europa

Lelystad – "We moeten er rekening mee houden dat het Schmallenberg-virus zich naar de rest van Europa verspreidt." Dat zegt Wim van der Poel van het CVI.

De bedrijven die in Duitsland en België zijn besmet, liggen dicht bij de grens van Nederland. Volgens het CVI is de bron van de besmettingen waarschijnlijk te herleiden naar Nederland en niet naar Duitsland.

"Maar het kan nog wel even duren voordat we precies weten waar het vandaan komt. Van het

blauwtong-virus hebben we het ook nooit goed kunnen achterhalen", zegt van der Poel.

Hoe het Schmallenberg-virus in Nederland is terechtgekomen is onduidelijk. Het CVI probeert de genetische informatie van het virus te vergelijken met die van andere virussen en zo de oorsprong te achterhalen.

Onduidelijk is hoe besmettelijk het virus is. De nieuwe besmettingen zijn nakomelingen van dieren die in de nazomer al zijn besmet. Volgens het Centraal Vete-

rinair Instituut (CVI) is niet uit te sluiten dat het virus zich op dit moment niet verspreidt onder dieren. "We weten bijvoorbeeld nog niet zeker of een geïnfecteerd lam dat nu wordt geboren een ander schaap kan besmetten", aldus Wim van der Poel van het CVI.

Of het virus zich net zo snel als het blauwtong-virus verspreidt, is moeilijk te zeggen. Van der Poel: "Als het zich via knuttonen verspreidt, weten we meer als het knuttenseizoen in mei/juni begint. > Pagina 5



Schmallenberg virus

Risk assessment and Biosafety

- Sources: RIVM Netherlands, FLI Germany
- Schmallenberg virus unlikely to cause disease in humans (based on genetically similar viruses)
- Health of people in contact with infected animals should be carefully monitored
- FLI, RIVM, CVI: Biosafety levels
 - Laboratory: BSL2
 - Animal experiments: BSL3



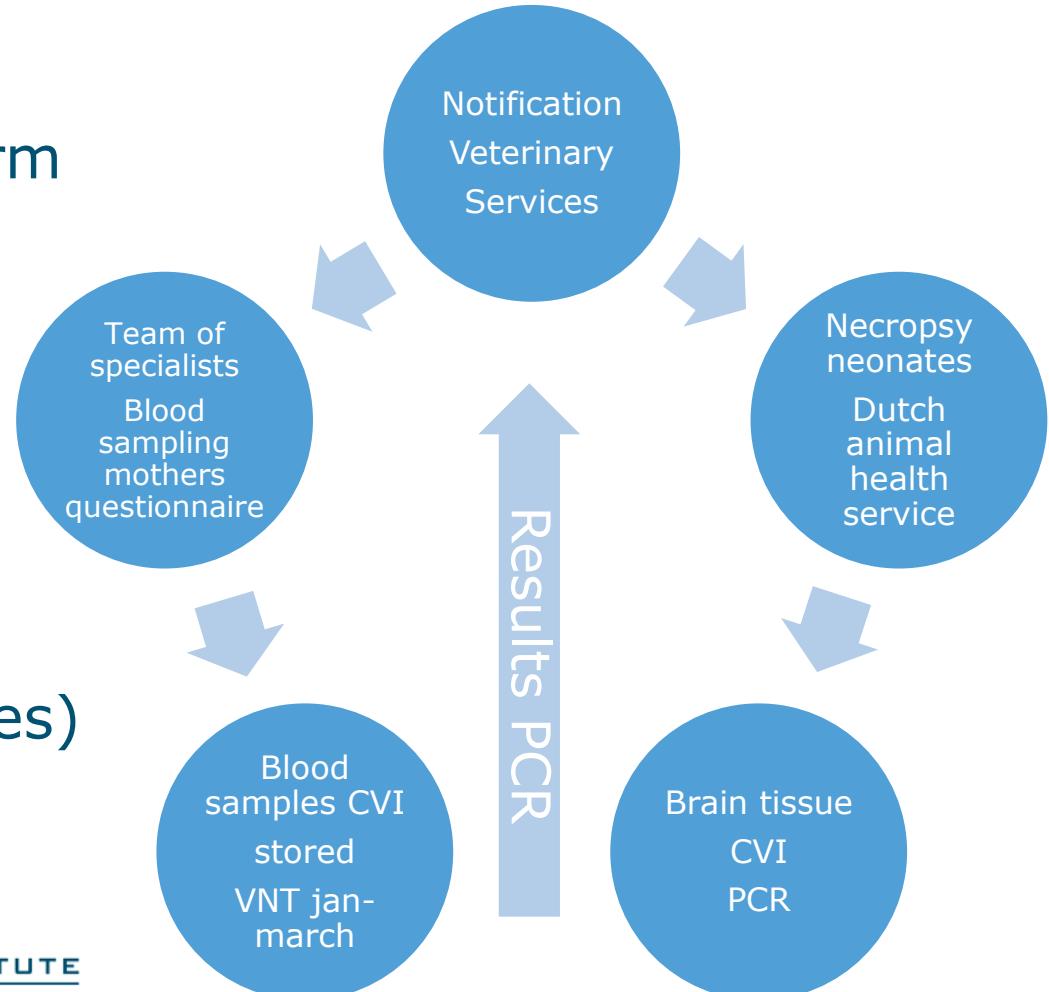
Advice government

20-12-2011 ministry: requirement for notification of malformed neonates in ruminants

- Max 5 lambs per farm
- Blood samples from mother animals
- Questionnaire

Tests

- RT-PCR FLI (neonates)
- VNT CVI (mothers)



Diagnostics

The logistic process

- Receiving of samples by the Dispatching Service Unit (DSU)
- Registration of samples in the Laboratory Information and Management System (LIMS)
- Control and pre analytic process
- Receiving of samples on the labs
- Analyses of the samples with different test methods
- Examination of the test
- Registration of the results in LIMS
- Validation of the test results
- Reporting

Location Houtribweg (High containment unit)



Location Edelhertweg



Receiving and unpacking of the samples



CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR

Registration of samples in LIMS



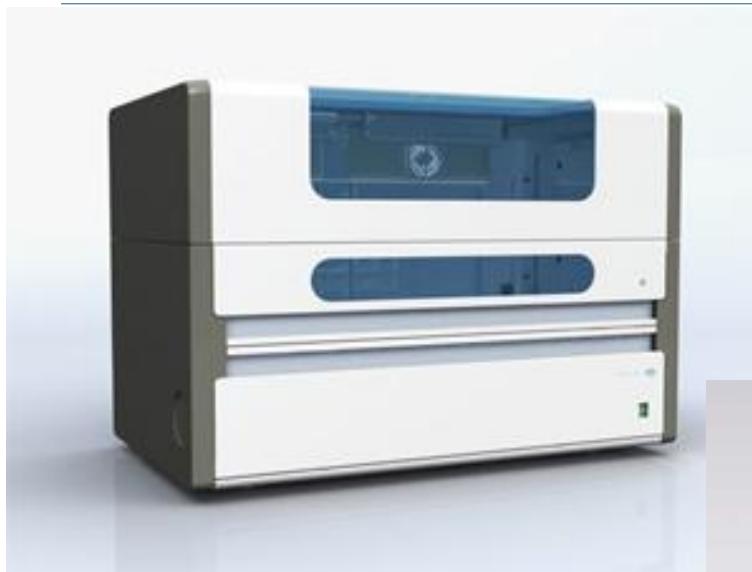
Processing samples for PCR (brain tissues)



Receiving of samples on the lab



Magnapure 96 wells & Stratagene



Testing brain
suspension by PCR

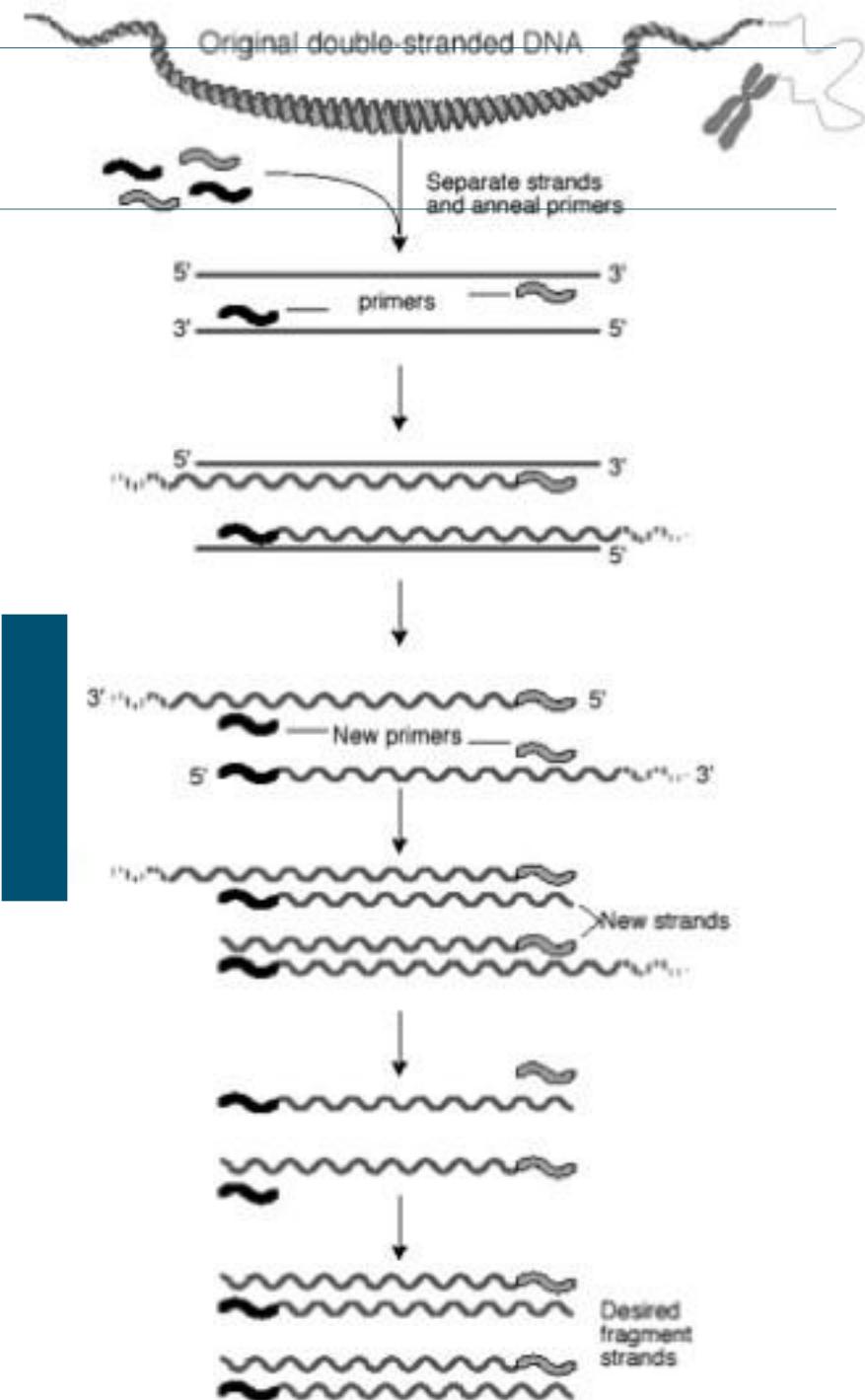


CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR

PCR

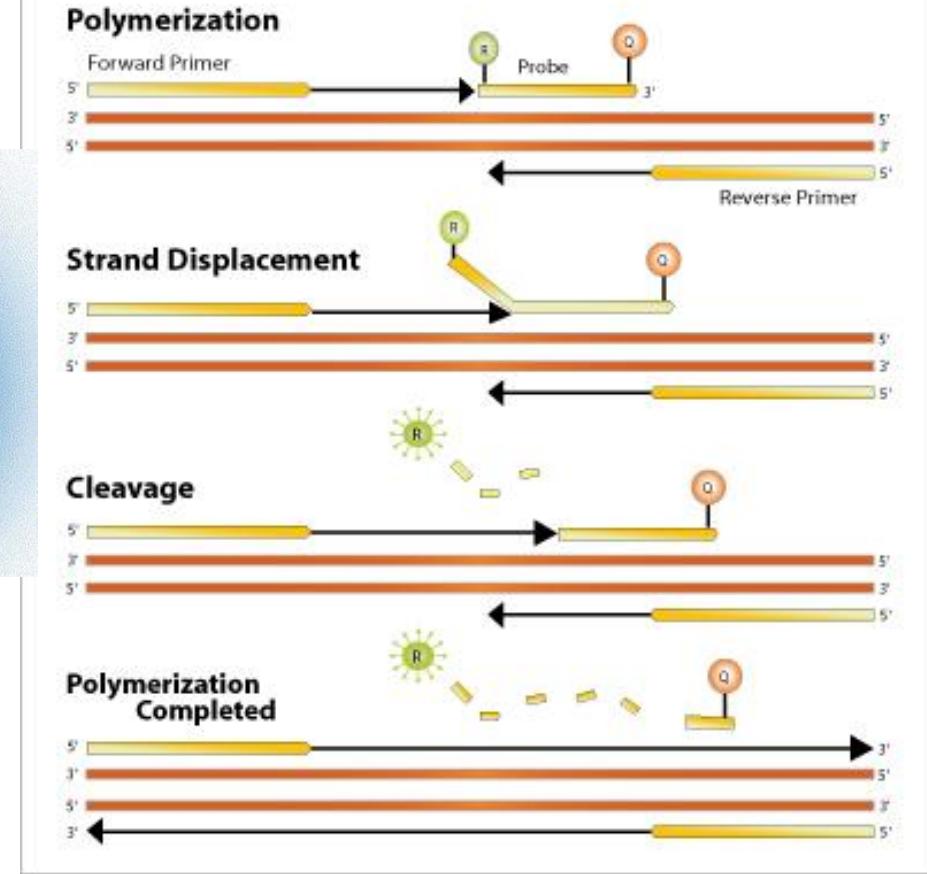
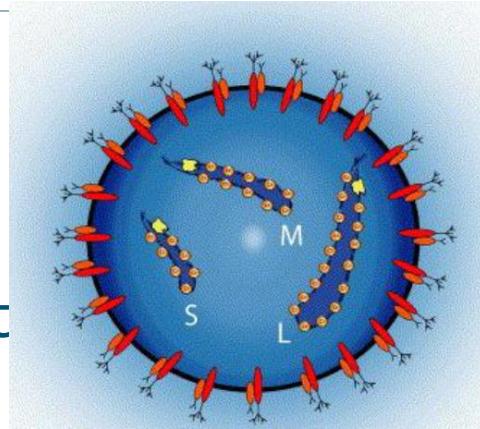
- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- The process of PCR

- cDNA separate strands
- Nucleotides, primers, probe, DNA Polymerase.
- Exponential increase in number of copies
 - $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 32 \rightarrow 64 \rightarrow 128 \rightarrow \text{etc..}$

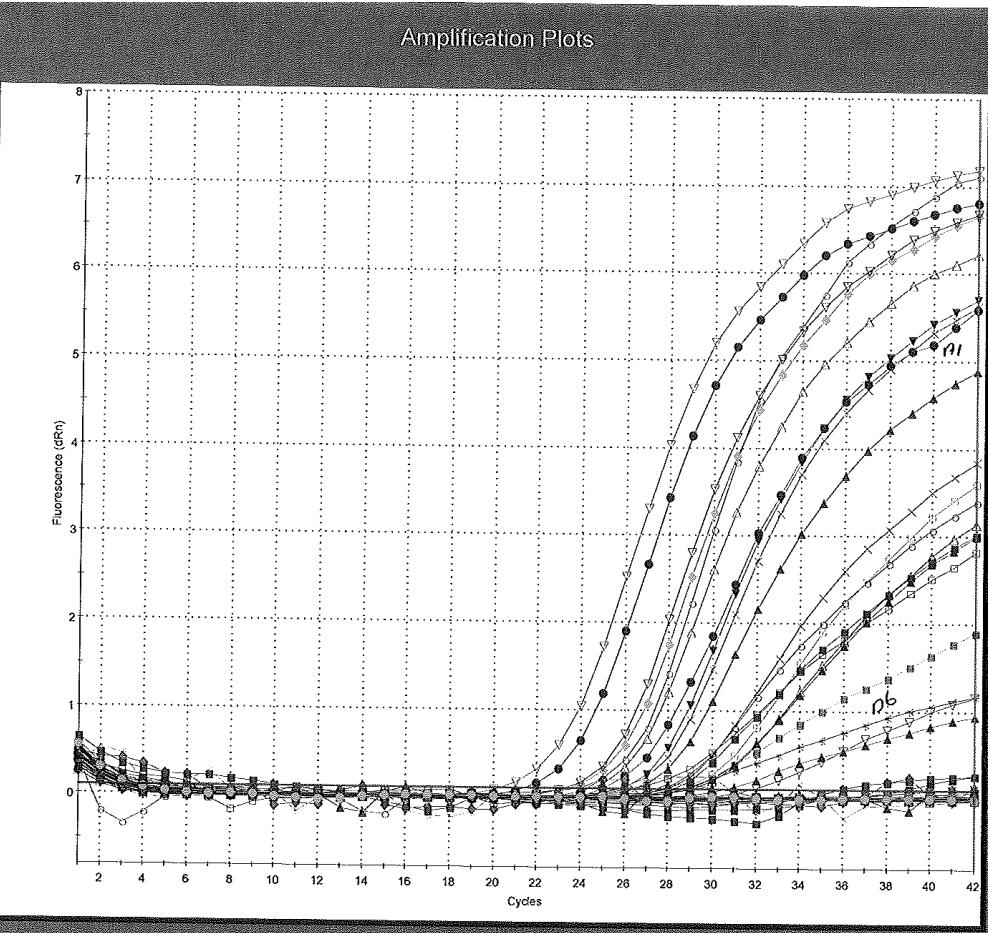


PCR SBV; FLI

- L/S segment
- 2 primers
- 1 Taqman probe
 - simple system
 - probe break down signal
 - Aspecific break down products false positive signal
- Qiagen kit



Results and validation



$Ct \leq 35$ = positive
 $Ct > 35$ = negative

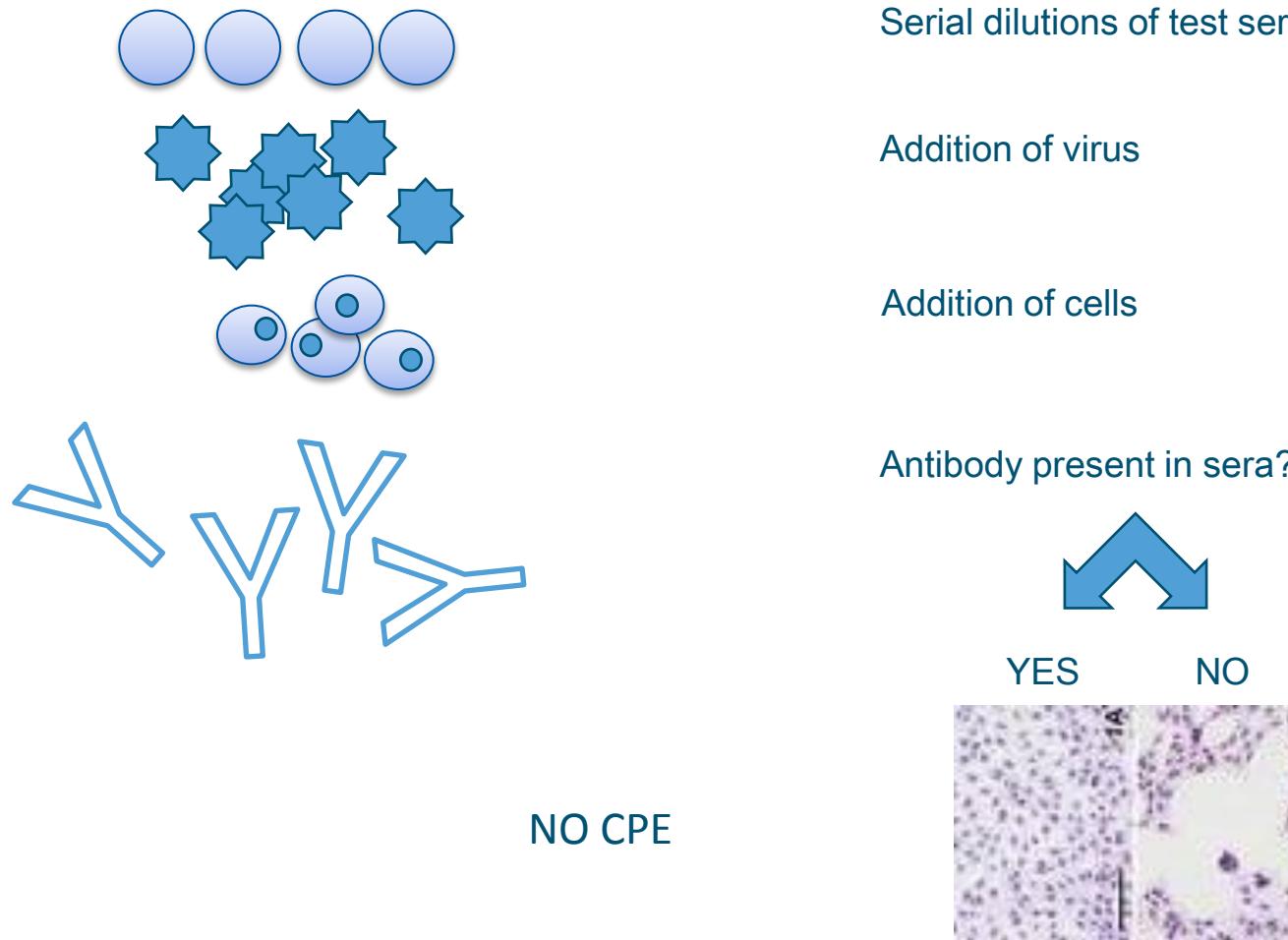
Negative, weak and strong positive controls

No re testing

Plate Sample Values											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Unknown Myc	25.01	38.63	No Ct	37.83	No Ct	23.77	26.17				
B No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	38.65	30.61			
C No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	25.70	No Ct			
D No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	28.81	40.54	28.70	No Ct	
E No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	20.34	21.46	35.75		
F No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	27.78	28.58	25.85	No Ct	
G No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	31.74	28.31	26.48	23.37	No Ct
H No Ct	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	40.67	No Ct	24.50	23.35	No Ct

Diagnostics

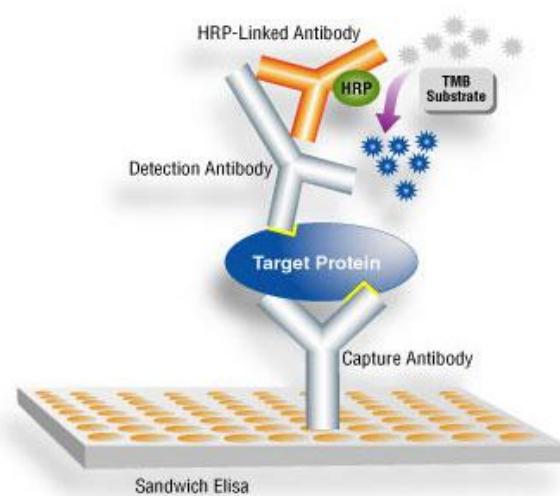
Test development; virus neutralisation test



Diagnostics

Test development; ELISA

- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- Detection of antibody
- Antigen binded to plates
- Detection with colour reaction. Binding of an enzyme.



Example of a report



Aan:

CC:

CC:

Behandeld door:
Dispatching Service Unit (DSU)

Ons kenmerk:
04016151

Uw kenmerk:

Onderwerp
Uitslag(en) van onderzoek

Hierbij ontvangt u de uitslag van het door u ingezonden materiaal.

UBN	Datum monstersname	: 01/09/2004
Naam eigenaar	Import/exportland	: Rusland
Adres	Diersoort	: Paard
Woonplaats	Reden van onderzoek	: Export
Datum ontvangst	Datum aanvang onderzoek	: 02/09/2004



Dit rapport met uitslagen mag alleen in zijn geheel worden gereproduceerd.
CIDC-Lelystad stondert u op de aangewezen tarielen 2004 voor diagnostisch onderzoek. De laatste versie van de tarievenlijst kunt u vinden op www.cidc-lelystad.nl.
Onderzoeksresultaat kan gestuurd worden naar Postbus 2004, 8203 AA Lelystad, t.a.v. DSU.

Centraal Instituut voor
DierenziektenControle Lelystad
(CIDC-Lelystad)
Postbus 2004, 8203 AA Lelystad
BEZOEKADRES: Edelhartweg 15
Houtbrug 39
8221 RA Lelystad

KVK
09098104 - Centraal Gelderland
BANKREKENING
39.70.89.120
(particulier RABONL2U)
INTERNET
www.cidc-lelystad.nl

TELEFOON
(0320) 23 88 00
FAX
(0320) 23 88 88
BTW-NUMMER
NL 8113.83.896.B.12

Rapportnummer: 5.1

Pagina 1 van 2
Datum: 06/09/2004
Uw kenmerk: XXXXXXXXXX
Ons kenmerk: 04016151
Rapport Nummer: 04016151-022381



Uitslagen onderzoek

Nr.	Identiteit	Monstertype	Onderzoek	Uitslag
001		Serum	Burkholderia mallei serologie (Malieus)*	Niet aangetoond Titre: <20
001		Serum	Equine Infect. Anaemie Virus serologie*	Niet aangetoond
001		Serum	Tryp. equiperdum (Dourme) serologie	Niet aangetoond

* = ISO 17025 geaccrediteerde test

Pagina 2 van 2
Datum: 06/09/2004
Uw kenmerk: XXXXXXXXXX
Ons kenmerk: 04016151
Rapport Nummer: 04016151-022381

Centraal Instituut voor
DierenziektenControle Lelystad
(CIDC-Lelystad)
Postbus 2004, 8203 AA Lelystad
BEZOEKADRES: Edelhartweg 15
Houtbrug 39
8221 RA Lelystad

KVK
09098104 - Centraal Gelderland
BANKREKENING
39.70.89.120
(particulier RABONL2U)
INTERNET
www.cidc-lelystad.nl

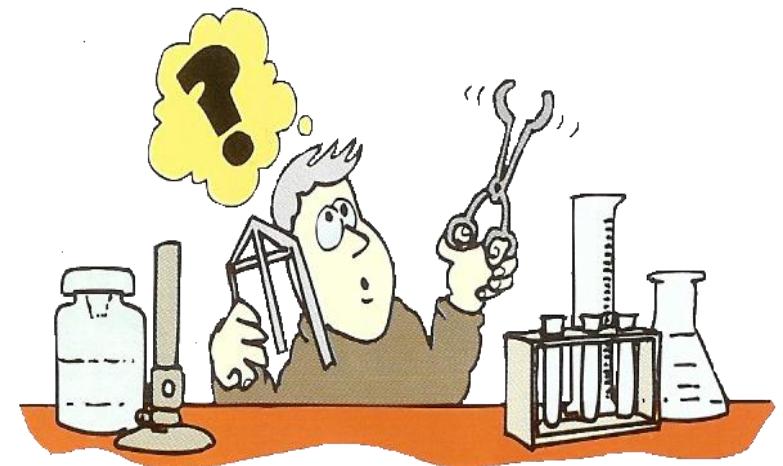
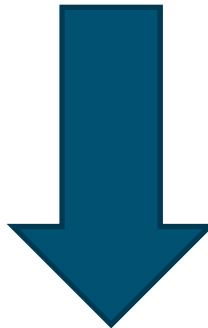
TELEFOON
(0320) 23 88 00
FAX
(0320) 23 88 88
BTW-NUMMER
NL 8113.83.896.B.12

Rapportnummer: 5.1

CIDC-Lelystad is een onafhankelijke
onderzoeksinstelling binnen de Stichting
DLO die de overheid ondersteunt bij de
uitvoering van wet- en regelgeving. De
betrouwbaarheid en onafhankelijkheid
van de uitvoering van deze taak wordt
ge waarborgd door het WDT-Statuut.

Sampling requirements

- 01-04-2012 ministry: no blood sampling of mother animals anymore
- 06-07-2012 ministry: no requirement for notification of malformed neonates in ruminants anymore

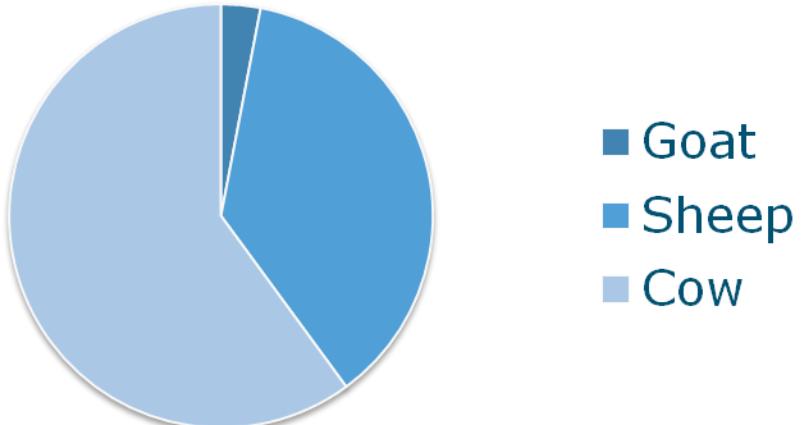


- PCR results till June 2012
- VNT results till March 2012

RT-PCR results per species July 2012

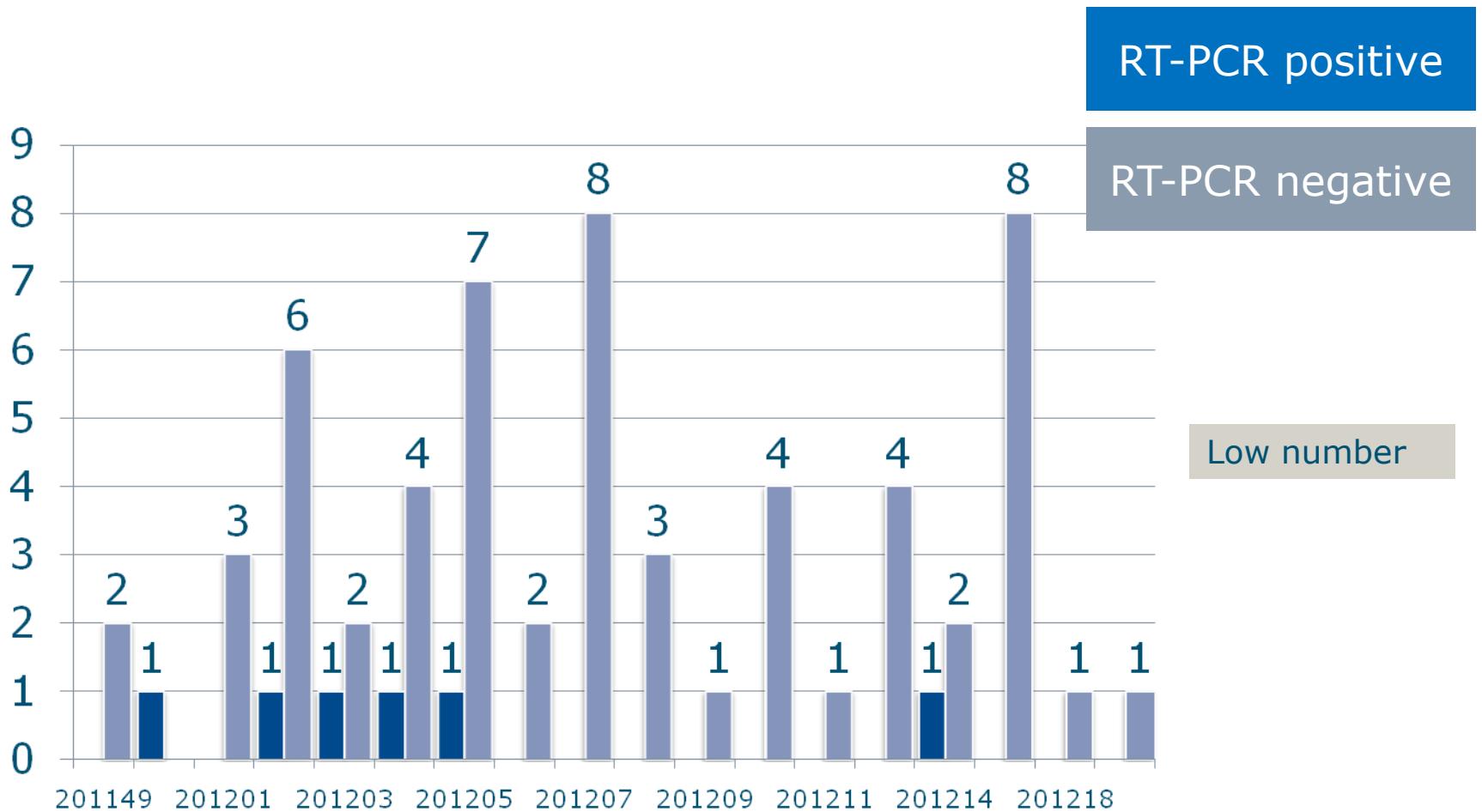
	Total tested	Virus detected	% positive
Goat-kids	65	6	9
Sheep lambs	800	232	29
Calves	1,301	185	14

Total tested

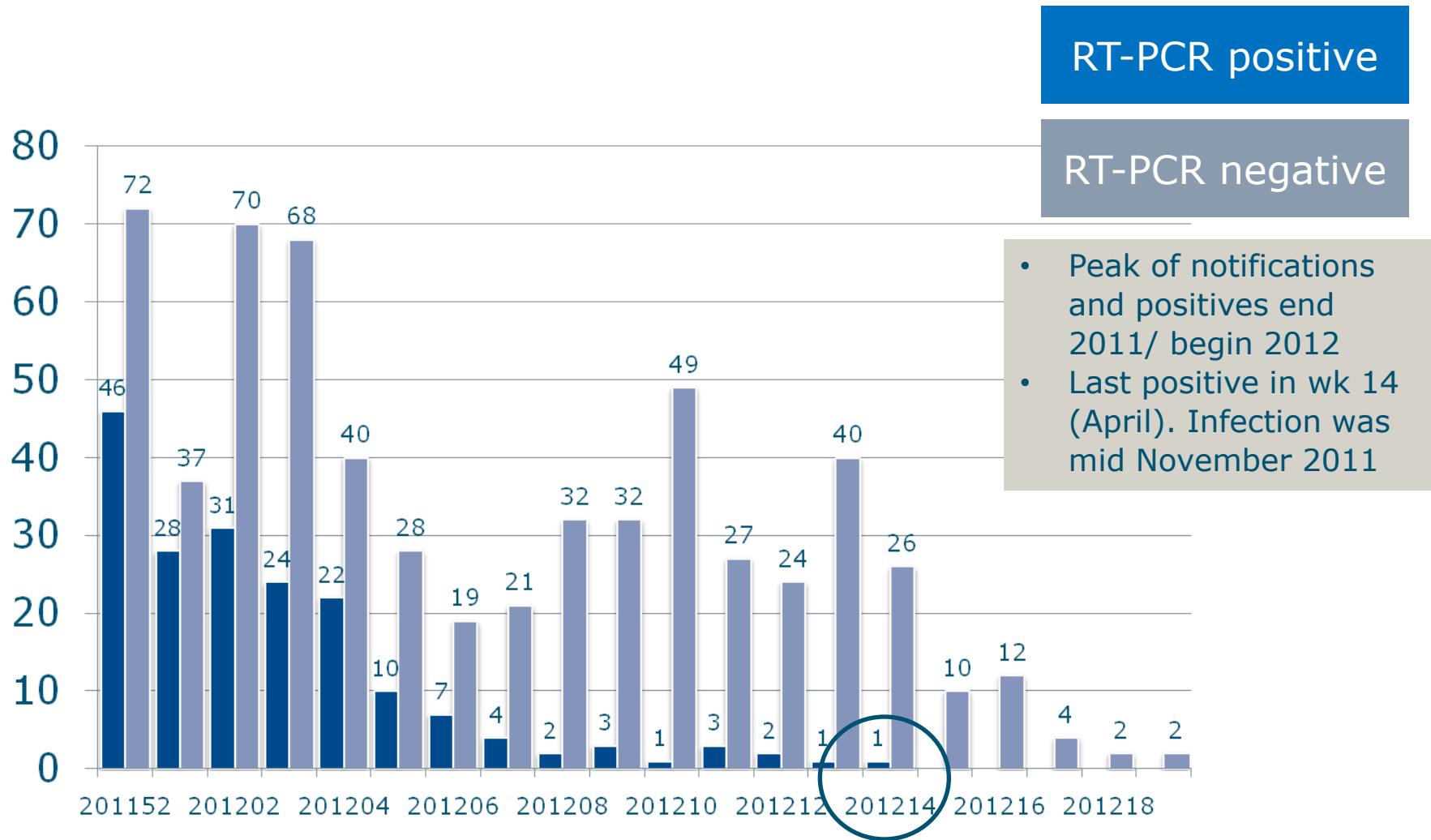


- Low number of goats-kids tested
 - Less malformations?
- Lambs are tested positive the most
 - Shorter pregnancy sheep
 - Mixed brain samples

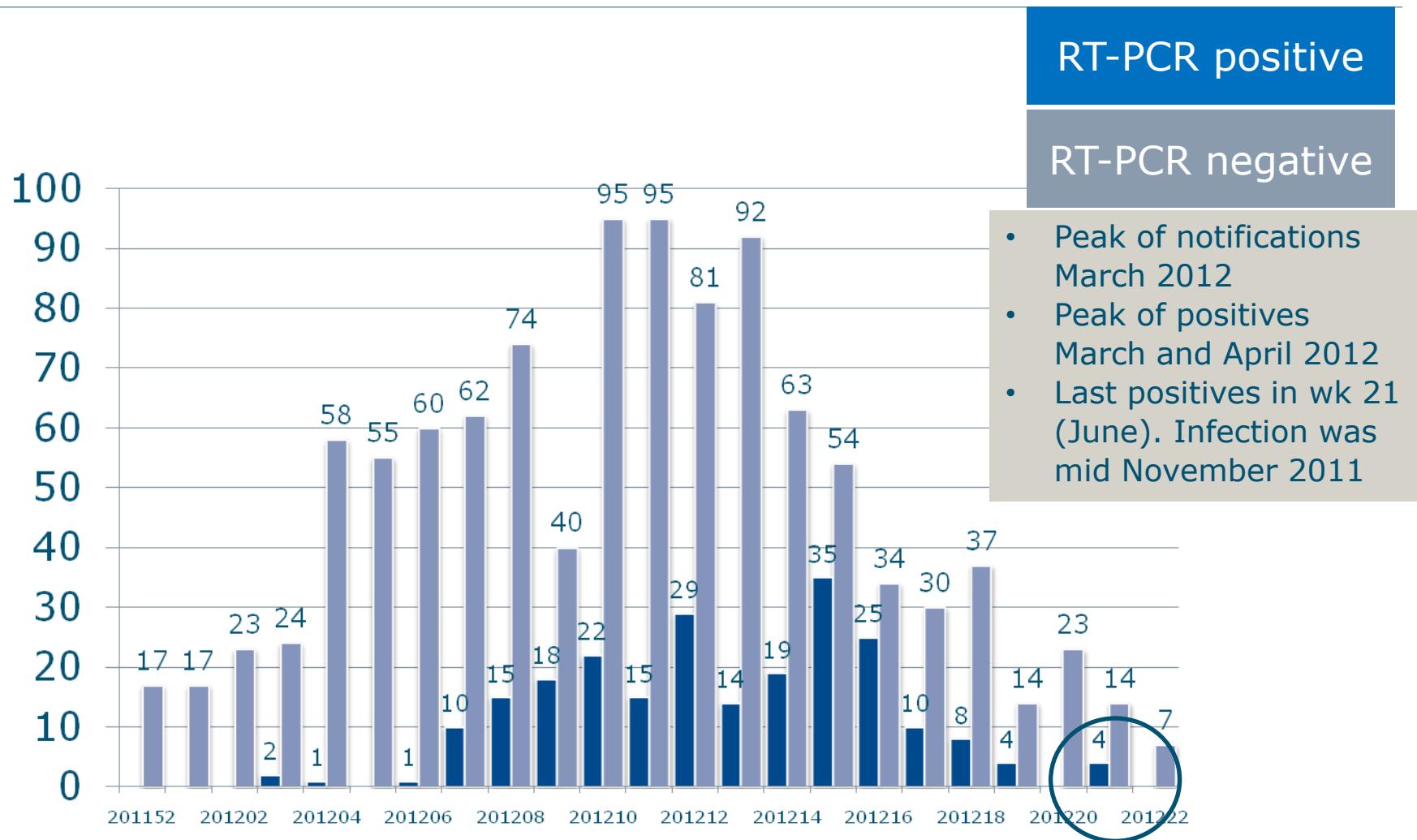
Goat-kids: PCR results



Sheep lambs: PCR results



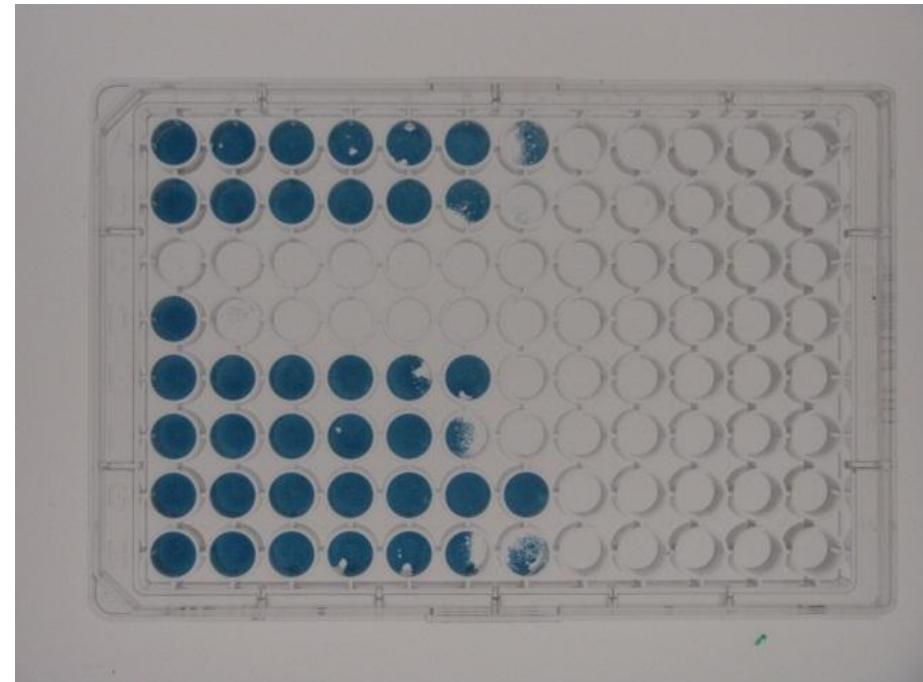
Calves: PCR results



Virus Neutralization Test

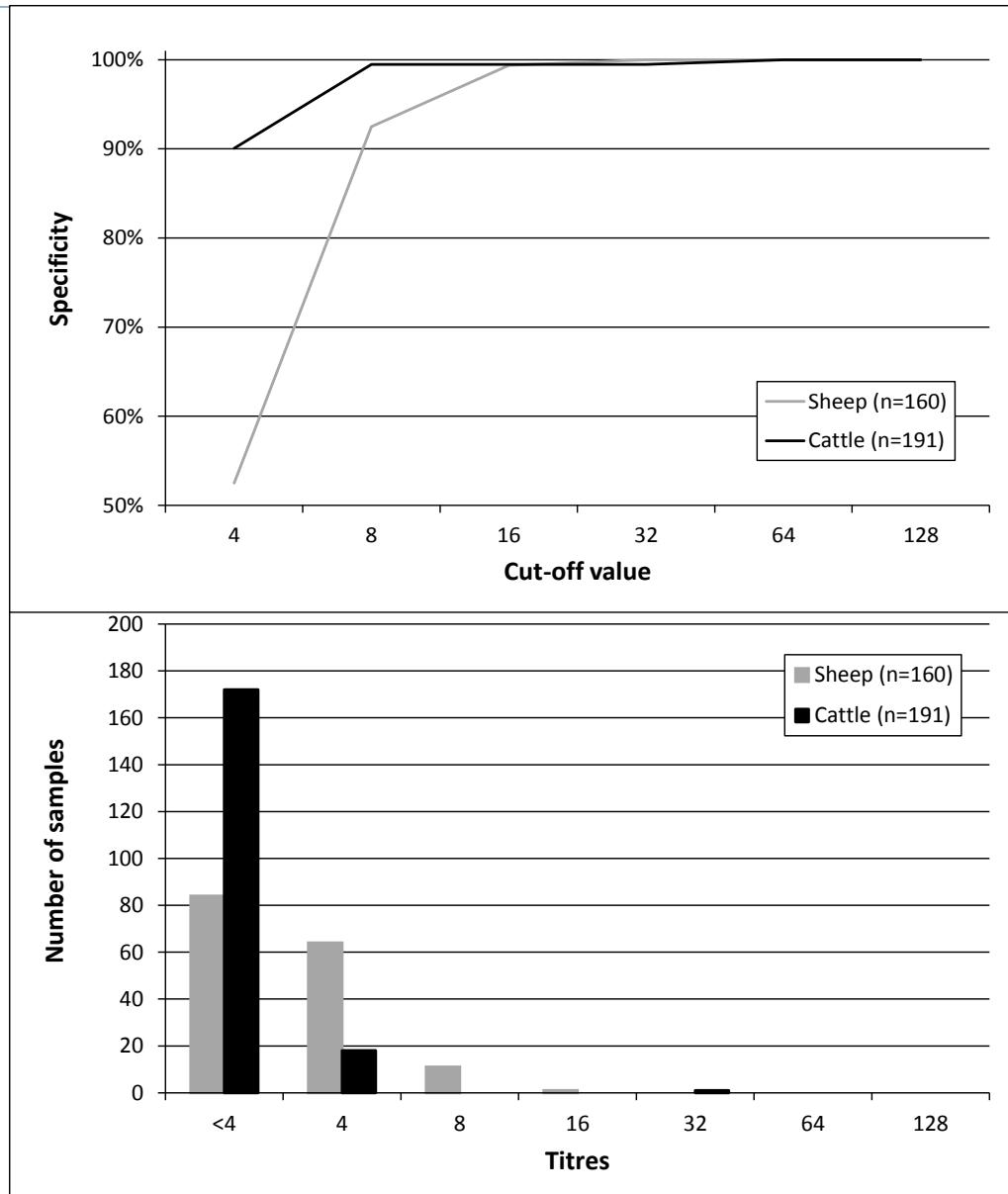
- Serum samples were diluted in the test plate, starting from 1:4, followed by two-fold dilutions until 1:512
- After 5 days, the plates were emptied and stained with amido black
- Titers ≥ 8 (cows) ≥ 16 (sheep) were defined as positive, based on a prior validation, in which a specificity and sensitivity of $> 99\%$ were estimated with this cut-off.
- Hands-on time is limited
(laborious)

Loeffen et al., 2012



SBV VNT

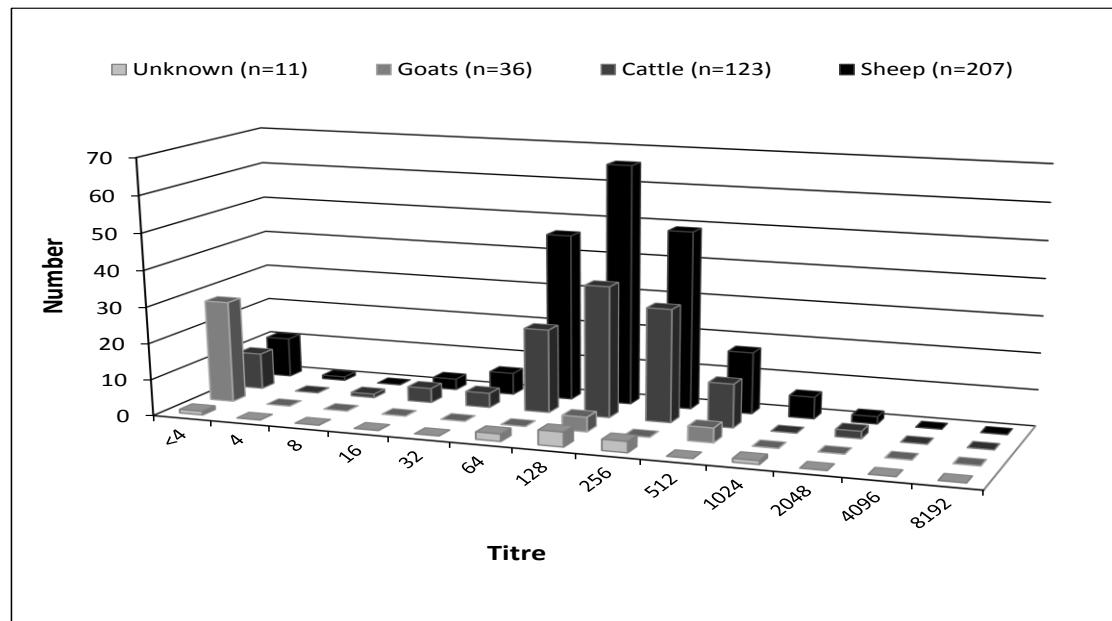
- Specificity
- Old sera
 - N=160 sheep
 - N=191 cattle
- Cut-off
 - Sheep ≥ 16
 - Cattle ≥ 8



SBV VNT mothers of malformed neonates

- 92% cattle positive (n=123)
- 94% sheep positive (n=207)
- About 25% of all samples were available at the time of the analysis

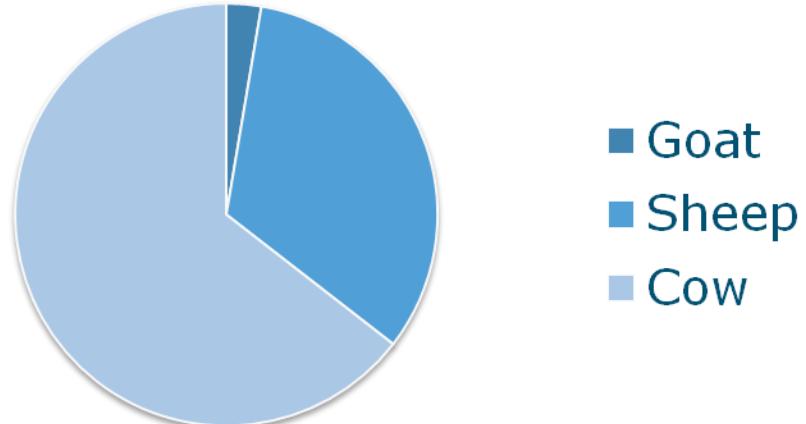
} Sensitivity?



VNT results per species April 2012

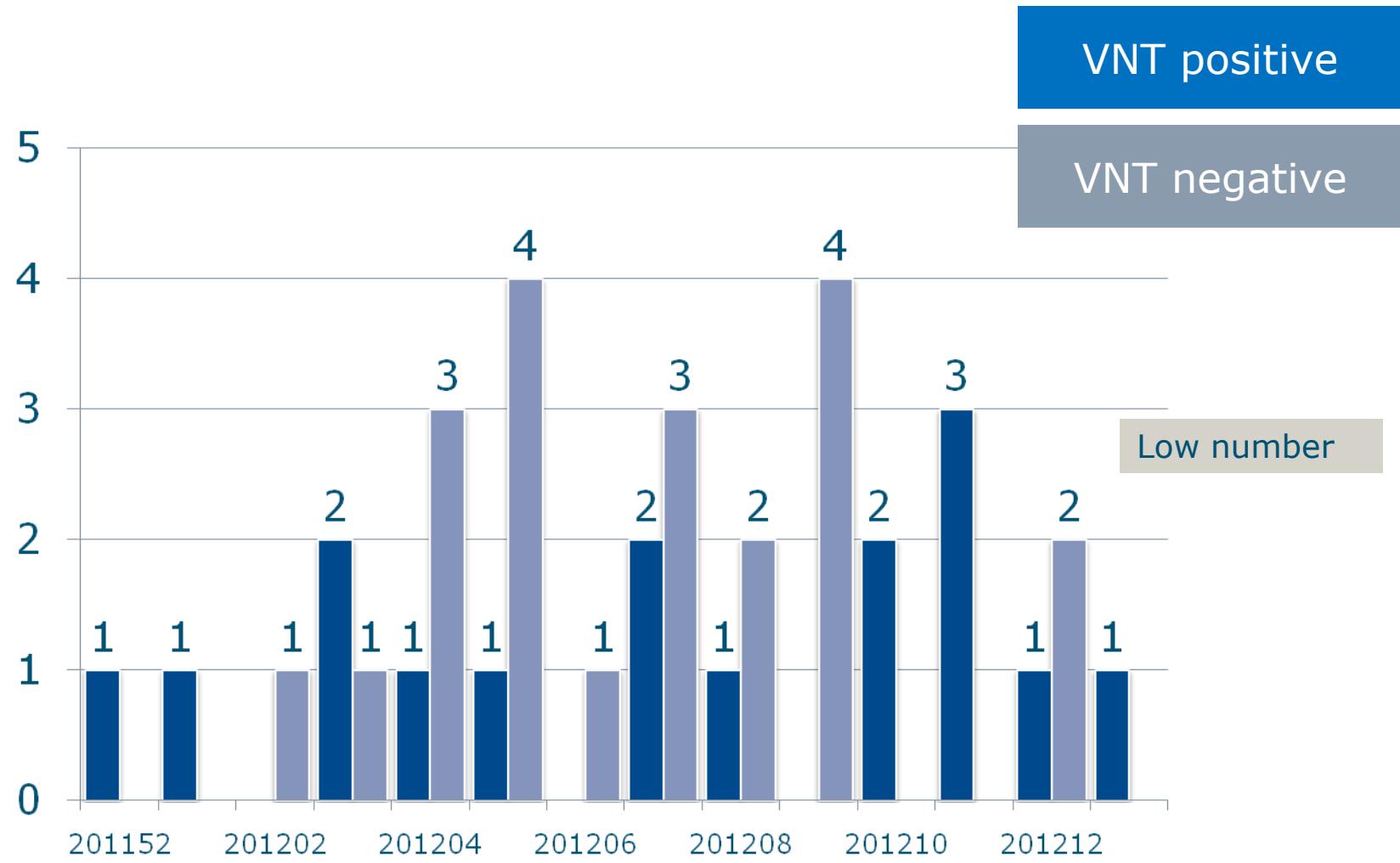
	Total tested	Antibodies detected	% positive
Goat	37	16	43
Sheep	458	422	92
Cow	899	860	96

Total tested

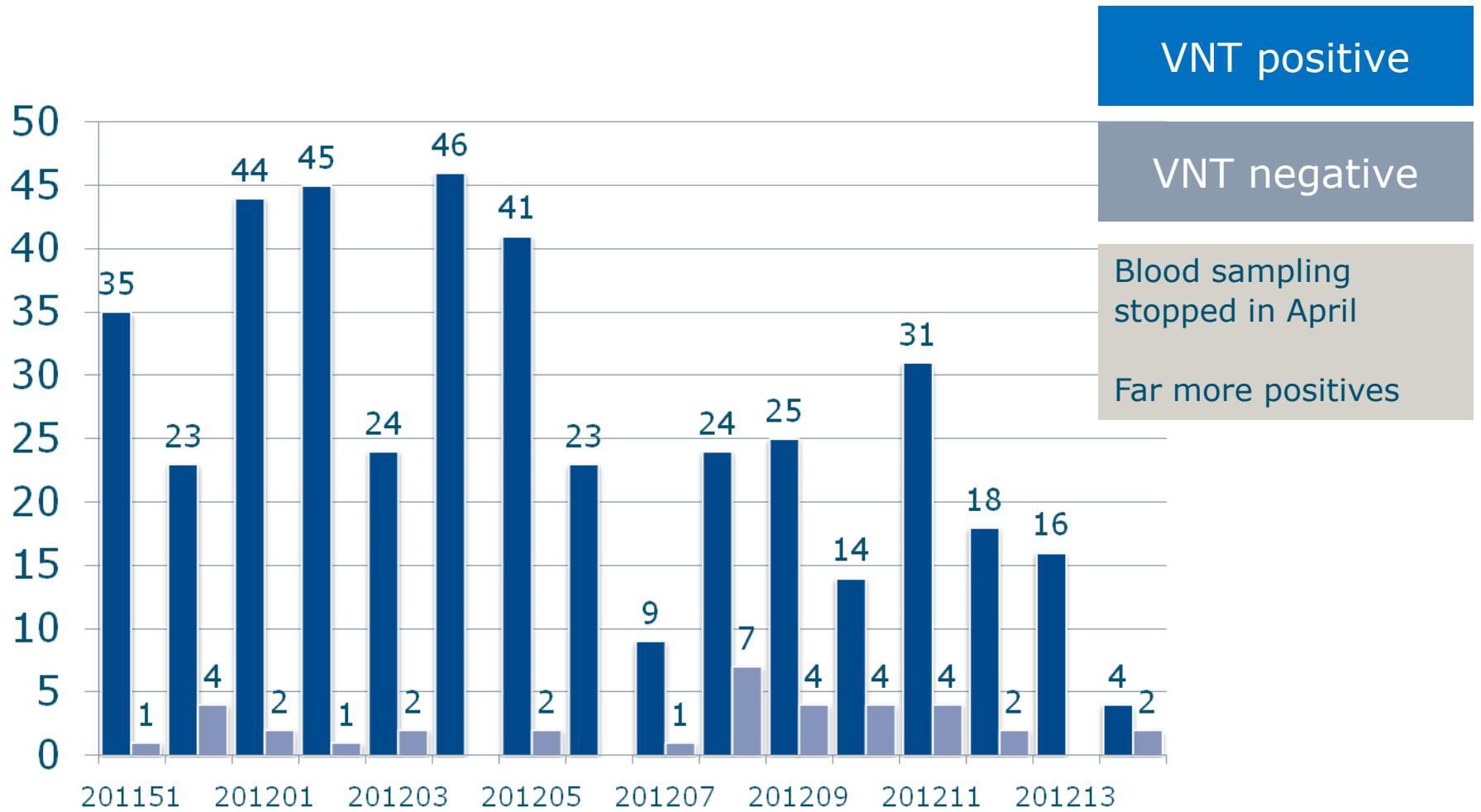


- Low number of goats tested
 - Less malformations?

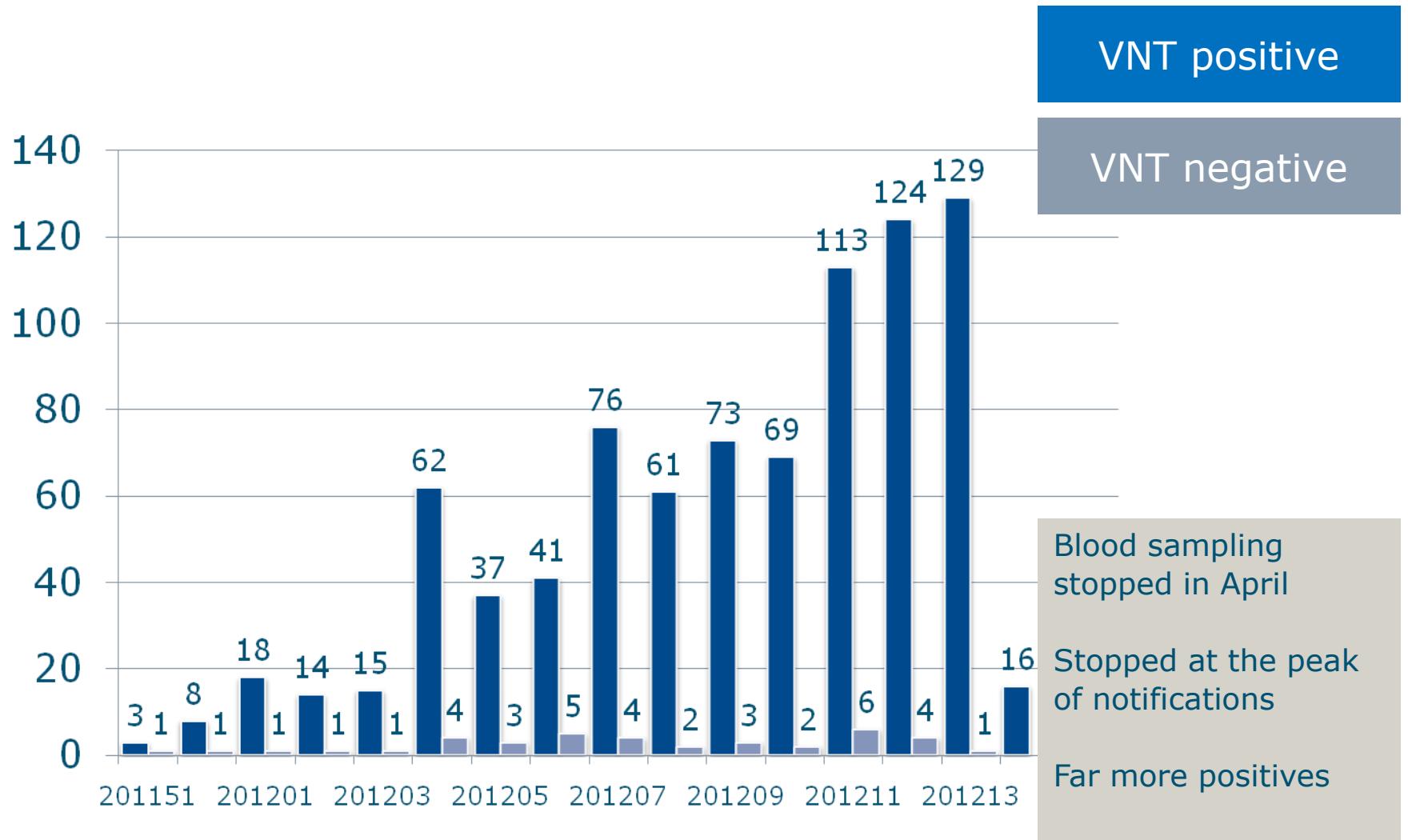
Goat: VNT results



Sheep: VNT results



Cow: VNT results



Results on farm level

	PCR -	PCR+	Total
VNT -	60 (5%)	2 (0%)	62
VNT+	884 (77%)	202 (18%)	1086
Total	944	204	1148 (1621)

- On 1148 farms both PCR tests on brain samples of malformed neonates and serological tests on mother animals were performed
- In 77% of the farms only one or more blood samples were antibody positive while none of the brain tissue samples were positive
- In 18% both tests were positive
- In 5% both tests were negative which might be really negative (non-exposed) farms

Results on farm level per species

Goat	PCR -	PCR+	Total
VNT -	16 (62%)	1 (4%)	17
VNT+	7 (27%)	2 (8%)	9
Total	23	3	26

Sheep	PCR -	PCR+	Total
VNT -	10 (4%)	0 (0%)	10
VNT+	168 (67%)	71 (29%)	239
Total	178	71	249

Cow	PCR -	PCR+	Total
VNT -	34 (4%)	1 (0%)	35
VNT+	709 (81%)	129 (15%)	838
Total	743	71	873

Discussion

- Goats low number of seropositives and PCR positives
 - Less samples: seroprevalence less precise
 - Housed indoors, less exposed?
- Pregnancy length cows longer than sheep
 - Might explain why number of RT-PCR positive calves lower
 - Difference in number of malformations and RT-positives over time.
- No direct correlation between seropositivity of mother animals and malformed neonates: therefore it is difficult to say something about diagnostic sensitivity
- However: no indication that the virus arrived before 2011, serological results might give more insight in the possible relation between malformation and infection
- Supposing that all malformations notified are truly caused by SBV, on farm level, diagnostic sensitivity of the RT-PCR seems to be lower in comparison with the VNT.

Scientific research

Seroprevalence study: why (feb 2012)

Reporting of suspect cases (malformations of the arthrogryposis hydranencephaly syndrome in calves, lambs and goat-kids) is likely to underestimate the true rate of infection of SBV

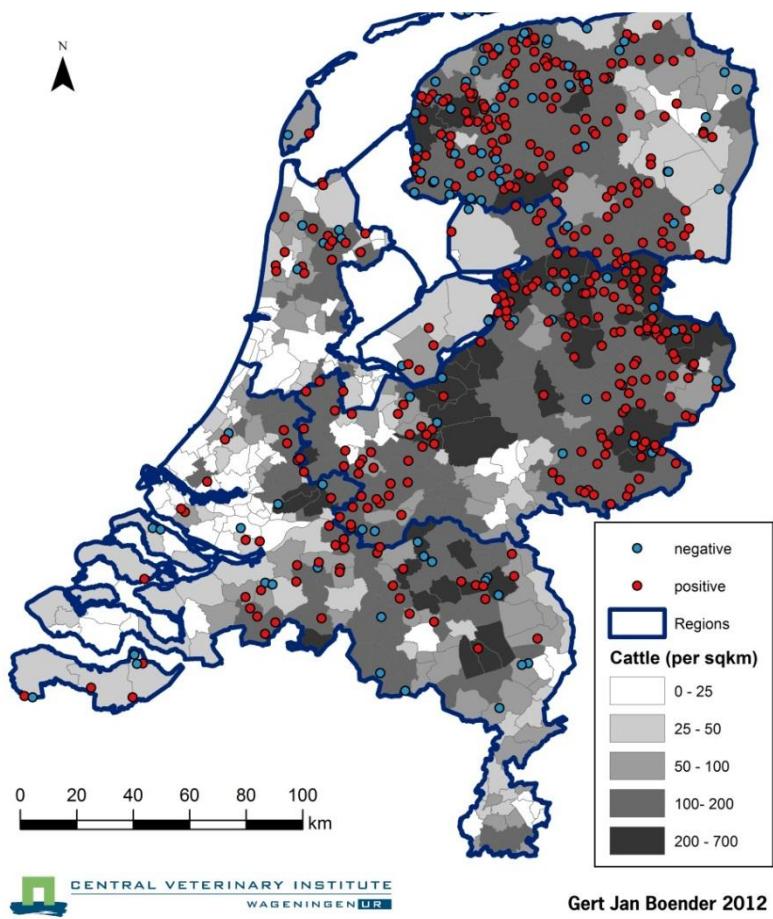
- not all infected livestock will produce malformed new-borns;
- not all malformed new-borns test PCR-positive



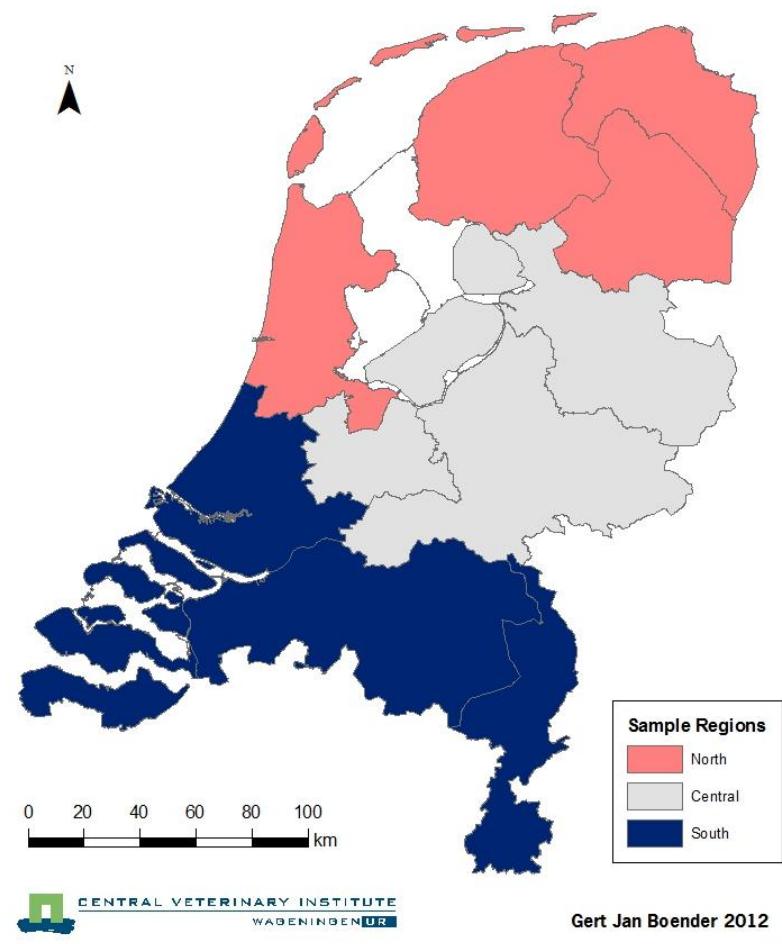
Seroprevalence of antibodies to SBV in livestock populations gives insight into true exposure to SBV

Seroprevalence of antibodies to SBV in dairy cattle

Overall 73 %



North: 67%, C east 83%, South 61%



Actual situation; Europe

- 02 Nov 2012 Schmallenberg virus - Europe (70): UK (N Ireland) 1st case
- 31 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (69): Ireland (CK) 1st case
- 29 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (68): Finland (mainland), Europe update
- 26 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (67): Norway, vector
- 17 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (66): Finland (AX) 1st case, Scotland ex England
- 13 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (65): Denmark, vector, spread
- 12 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (64): Belgium, vectors, 2011
- 11 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (63): UK, update
- 05 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (62): Sweden (BL) pos. serology
- 01 Oct 2012 Schmallenberg virus - Europe (61): Poland
- 26 Sep 2012 Schmallenberg virus - Europe (60): Austria, UK, Belgium
- 20 Sep 2012 Schmallenberg virus - Europe (59): Switzerland, clarification
- 14 Sep 2012 Schmallenberg virus - Europe (58): Switzerland, spread to mountains
- 07 Sep 2012 Schmallenberg virus - Europe (57): Switzerland, France
- 28 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (56): Netherlands, bulk milk survey
- 26 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (55): Switzerland
- 16 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (54): UK, Switzerland
- 15 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (53): Switzerland, OIE
- 07 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (52): UK, update
- 06 Aug 2012 Schmallenberg virus - Europe (51): update, surveillance, classificatio
- 27 Jul 2012 Schmallenberg virus - Europe (50): Switzerland (JU) 2nd case susp.
- 25 Jul 2012 Schmallenberg virus - Europe (49): UK, ovine, 2012 circulation
- 21 Jul 2012 Schmallenberg virus - Europe (48): Switzerland, 1st case

Reports 1st July-
14th Nov 2012:
More cases at the
borders of the
outbreak end
2011-begin 2012.



Actual situation; Europe

Reports March 2012



Reports 1st July-14th Nov 2012:
More cases at the borders of the
outbreak end 2011-begin 2012.



CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR

Actual situation; The Netherlands

Export diagnostics

- Animals
 - Semen
 - Seroconversion in animals for export
 - Seroconversion in bulls producing semen for export
 - Some PCR positive animals
- Again Virus circulation in The Netherlands Aug 2012



On going research

- Animal experiments – pregnant ewes
- Seroprevalence
- Transmission routes (vertical-semen)
- Vector competence



Keep in touch with the field

Are animals, naturally infected by Schmallenberg virus,
protected (lifelong) against re-infection ???



We don't know yet, needs to be investigated



Tasks

- Crisis organization; diagnostics of suspicions notifiable diseases en early warning
- International collaboration
- Advice government
- Diagnostics
- Scientific research

Schmallenberg

dystocia knut PCR intracerebral torticollis IPMA populatie vector neonaten blocking arthrogrypose virusneutralisatie misvormd intrauterien reversegenetics RNA DIVA transmissie schmallenberg Ctwaaardes

diarree DECE sectie entomologie orthobunyavirus epidemiologie ELISA LIMS segment

placenta vaccin

Research





CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR

lammeren

gezonde

kalveren

koeien

bedrijven

schapen

A collage of various farm animals including pigs, cows, chickens, and sheep.

VRAGEN?